

Farbwechsel in DNA

Diarylethen-Photoschalter und Cyaninfarbstoffe zur Untersuchung und Steuerung der DNA-Hybridisierung

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

M.Sc. Sebastian Barrois

aus Weiden in der Oberpfalz

Karlsruhe, 2014

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

*Meinem Opa Paul Schmal
und meiner ganzen Familie*

*Ein jeder lernt nur, was er lernen kann;
doch der den Augenblick ergreift, das
ist der rechte Mann (Mephisto)...Es ist
nicht genug zu wissen, man muss
auch anwenden. Es ist nicht genug zu
wollen, man muss auch tun
(Faust)...Denn was man schwarz auf
weiß besitzt, kann man getrost nach
Hause tragen (Schüler).*

Johann Wolfgang von Goethe, Faust I

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis Mai 2014 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Danksagung

Eine Doktorarbeit kann nicht ohne Hilfe entstehen, sei sie nun wissenschaftlicher oder persönlicher Natur. Daher möchte ich im Folgenden den Menschen danken, die nicht auf dem Titelblatt vermerkt sind, aber einen entscheidenden Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung, die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Vor allem bedanke ich mich für die Freiheit, eigene Ideen in die Arbeit mit einbringen und neue Projekte gemeinsam in vielen guten Gesprächen planen zu können.

Dr. Andreas Rapp und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung am KIT für die Messung meiner Proben, sowie Andreas im Speziellen für die Hilfe bei zahlreichen Computerproblemen.

Norbert Foitzik und seinen Mitarbeiterinnen Ingrid Roßnagel und Angelika Kernert für die immer schnelle und zuverlässige Anfertigung zahlreicher Massenspektren, sowie Norbert im Speziellen für die Hilfe rund ums Praktikum und die guten Gespräche bei den Institutsweihnachtsfeiern.

Karolin Niessner aus dem Arbeitskreis Bräse für die Hilfe bei einigen HPLC-Problemen, die Einweisung in die Quadrupol-ESI und die Messung vieler hochaufgelöster Massenspektren, auch wenn es mal etwas kurzfristiger war.

Annette Hochgesand für die Messung gefühlt tausender MALDI-Massen, vor allem diejenigen, bei denen ihr Blick schon sagte, dass sie die Messungen wiederholen muss.

Dr. Patrick Weis für die ESI-Messungen an den photoschaltermodifizierten Strängen.

Claudia Sommer für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Angelegenheiten. Ihr sonniges und offenes Gemüt in persönlichen Gesprächen machte auch ein nötiges Java-Update angenehm.

Meinen Kollegen Stefanie Arndt, Effi Bätzner, Peggy Bohländer, Dr. Thomas Ehrenschwender, Philipp Ensslen, Nadine Gaß, Dr. Carolin Holzhauser, Dr. Florian Menacher, Marcus Merkel, Dr. Alexander Penner, Krisana Peewasan, Barbara Reiß, Dr. Moritz Rubner, Dr. Wolfgang Schmucker, Dr. Sabrina Sezi, Claudia Stubinitzky, Heidi Walter, Dr. Michael Weinberger, Martin Weiser, Christian Wellner und Dr. Ulrike Wenge für die gute Zusammenarbeit und die schönen Jahre im AKW.

Samantha Wörner, die sich im Zuge ihrer Bachelorarbeit mit meinen DNA-Haarnadeln beschäftigte und sich auch am Ende eines langen Arbeitstages über die blasseste Rudi-Säule freuen konnte.

Nikolai Bartnick, dessen synthetische Unterstützung in seinem ersten Ausbildungsjahr bei mir unbezahlbar war und durch den ich einen tieferen Einblick in den deutschen Hip Hop bekommen konnte.

Andreas Dittmer, der als mein Sitznachbar viel Geduld und Ruhe beweisen musste, vor allem in meiner Schreibphase. Danke auch für den großartigen Einsatz als Rechtsaußen bei beiden ChemCups.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

Steffi, Effi, Nadine, Alex, Christian, Claudia, Jack, Andi, Alex und Wolle für die geniale Zeit im Großtechnikum, die jeden Synthese- und Schreibfrust erträglich machte.

Meinen Leuten aus Regensburg: Danke Pipp, Buckie, Janina, Sandor, Claudia I, Claudia II, Natascha, Julia, Effi, Annika, Magda, Vroni und Franzi für die überragende Zeit und eure Freundschaft.

Steffi, die meinen ersten, pinken Photoschalter synthetisieren konnte und mit ihrer wundervollen Art auch das Beobachten der Baustelle zu einem Erlebnis machte.

Carsten für viele, angenehme Gespräche und natürlich auch für die beste Unterstützung als eingekaufter Spieler beim ChemCup.

Jack, die mir die arbeitsreichen Wochenenden versüßt hat und die mich für die thailändische Küche begeistern konnte.

Peggy, von der ich viel über die Geheimnisse der HPLC lernen durfte und die mir mit ihrer ganz eigenen Art neue Seiten von Karlsruhe gezeigt hat.

Pille und Marcus, mit denen ich gemeinsam einige harte Synthesenüsse geknackt habe. Ich danke euch vor allem auch für die Feierabende in einem unvergesslichen Sommer 2012.

Nadschke und Barb, die mich bei diversen Problemen mit neuen Geräten unterstützt haben und mir gezeigt haben, dass Pfälzer eigentlich auch Bayern sind.

Sabrina und Claudia, die mir vor allem bei organisatorischen Sachen am Ende der Promotion geholfen haben und durch ihre Frohnatur den Umzug nach Karlsruhe und die Zeit danach erleichtert haben.

Heidi, die mir gezeigt hat, dass man mit Druckluft schneller tüpfeln kann und die, ob vor oder nach Feierabend, immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Christoph, der mich regelmäßig über den *daily gossip* im OC-Turm informiert hat und mich zum ersten Männerabend in Karlsruhe inspiriert hat.

Michael, der mir gezeigt hat, dass man auch aus MeCN lyophilisieren kann und mich in so manchen Abenden im Flynn's Inn für Whiskey begeistern konnte.

Dave, der mein Photoschalter Thema übernommen hat und jeden mit seiner ungehemmten Begeisterungsfähigkeit mitreißen kann.

Martin, der uns durch unsere einzigen beiden Tore beim ChemCup 2014 nicht ganz so alt hat aussehen lassen.

Christian, der als Laborchef des Großtechnikums immer motivieren konnte und trotz seiner niederbairischen Art immer die richtigen Worte gefunden hat.

Caro, die mich in die **TO** und **TR**-Synthese eingeführt hat und der ich meinen ersten Besuch in Kalifornien verdanke.

Tom, der mich auf die Idee des Superleuchteswitches brachte und mir viele, neue Tanzstile beibringen konnte.

Effi, die mir beigebracht hat, wie man auch den am schwersten löslichen Stein flüssig auftragen kann. Außerdem Danke ich ihr für die jahrelange Unterstützung, ob innerhalb oder außerhalb vom Labor. Durch ihre geduldige und warme Art wurde so mancher Regentag ein wenig sonniger.

Wie bei so vielen, beginnt auch diese Danksagung erst so richtig mit ihrem Schluss:

Ich danke meiner ganzen Familie für die jahrelange Unterstützung in jeglicher Hinsicht und dass sie mir immer das Gefühl gaben, dass alles möglich ist. Sie machten mich zu dem Menschen, der ich jetzt bin.

Und schließlich danke ich meinem Opa Paul Schmal, der mir beigebracht hat, auch die einfachsten Dinge zu hinterfragen.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
II.	TO und TR - Strukturaufklärung und Anwendung in Strangaustauschprozessen	3
1	Themenstellung	3
2	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer	5
2.1	Begriffserklärung	5
2.2	FRET-Systeme in DNA	8
3	TO und TR als wellenlängenverschiebende DNA-Sonden.....	13
3.1	Konzept der „DNA Traffic Lights“	14
3.2	Übertragung des Konzepts auf RNA.....	17
4	Spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von TO und TR in DNA	18
4.1	Orientierungs- und Abstandsabhängigkeit des Energietransfers	19
4.2	DNA-Synthese und Haarnadeldesign	20
4.3	Stabilitäten und optische Eigenschaften der Haarnadeln	21
4.4	Energietransfer vs. excitonische Wechselwirkungen	23
4.5	NMR-Messungen zur Bestimmung der Struktur von TO und TR in DNA.....	26
5	Visualisierung von Strangaustauschprozessen.....	30
5.1	Toehold-basierter Mechanismus	31
5.2	Anwendung in DNA-Nanomaschinen.....	33
5.3	Vereinen der Konzepte	35
5.4	DNA-Synthese und Strangdesign	36
5.5	Kinetische Messungen	38
5.6	Strangaustauschtitrationsen.....	39
5.7	Zwei aufeinanderfolgende Strangaustauschprozesse.....	42
6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	45
7	Experimenteller Teil	46
7.1	DNA-Synthese	47
7.2	Charakterisierung der Oligonukleotide	48
7.3	Daten zur optischen Charakterisierung der DNA-Haarnadeln.....	51
7.4	NaCl-Titration und thermische Daten von DNA16_17	52
7.5	Methoden und Daten der Strangaustauschexperimente	53

III. Diarylethen-Photoschalter in DNA	59
1 Themenstellung	59
2 Photoschalter zur reversiblen Steuerung von DNA	61
2.1 Definition, Mechanismen und Vergleich	61
2.2 Photoschaltbare DNA.....	64
2.3 Entwicklung der Diarylethene und bisherige Anwendungen in DNA	68
3 Nukleosidische Diarylethen-Photoschalter	76
3.1 Synthese	78
3.2 Photochrome Eigenschaften	80
4 Fluoreszente Diarylethen-Photoschalter	86
4.1 Synthese	87
4.2 Photochrome Eigenschaften	90
5 Diarylethen-modifizierte DNA.....	94
5.1 Synthese der DNA-Bausteine	95
5.2 31-modifizierte DNA.....	96
5.3 33- und 35-modifizierte DNA.....	100
6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	104
7 Experimenteller Teil	105
7.1 Synthesevorschriften.....	106
7.2 DNA-Synthese	135
7.3 Charakterisierung der Oligonukleotide	136
7.4 Belichtungsexperimente	137
7.5 Bestimmung der photochromen Ausbeute	142
IV. Zusammenfassung	143
V. Materialien und Methoden	147
1 Organische Synthese.....	147
2 Oligonukleotidsynthese	150
VI. Literaturverzeichnis	155
VII. Anhang	163

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
µL	Mikroliter		
A	Adenin, 2´-Desoxyadenosin, Akzeptor	g	Gramm
		G	Guanosin, Guanin
bzw.	beziehungsweise	h	Stunde
B	Helligkeit (<i>brightness</i>)	H ₂ O	Wasser
C	Cytosin, 2´-Desoxycytidin	H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ca.	circa	HCl	Salzsäure
CD	Circulardichroismus	HOMO	höchstes besetztes Molekül-orbital
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>		
D	Donor	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
d	Dublett, Schichtdicke		
dA	2´-Deoxyadenosin	HR-MS	Hochauflösende Massenspektroskopie (HR = <i>high resolution</i>)
DC	Dünnschicht-chromatographie		
DCM	Dichlormethan	Hz	Hertz
dG	2´-Deoxyguanosin	<i>J</i>	Kopplungskonstante
DiPEA	Diisopropylethylamin	K	Kelvin
DMSO	Dimethylsulfoxid	K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
DMF	Dimethylformamid	kcal	Kilokalorien
DMTr	4,4´-Dimethoxytrityl	konz.	Konzentriert
DMTrCl	4,4´-Dimethoxytritylchlorid	LED	lichtemittierende Diode
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
dU	2´-Desoxyuridin		
EE	Ethylacetat	m	Multipllett
EI	Elektrische Ionisation	M	molar; mol/L
em	Emission	MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
ESI	Elektrosprayionisation		
ET	Energietransfer	MB	<i>Molecular Beacon</i>
exc	Anregung (<i>excitation</i>)	mbar	Millibar
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>	MeCN	Acetonitril
FC	<i>Flash-Säulenchromatographie</i>	MeOH	Methanol
		Mel	Methyliodid

mg	Milligramm	RNA	Ribonukleinsäure
MHz	Megahertz	RP	Reversed Phase
min	Minute	RT	Raumtemperatur
mL	Milliliter	s	Singulett, Sekunde
mM	millimolar	s. o.	siehe oben
mm	Millimeter	s. a.	siehe auch
mmol	Millimol	t	Triplett
MS	Massenspektrometrie	T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung	T_M	Schmelztemperatur der DNA [°C]
n_D^{20}	Brechungsindex bei 20 °C und Deuteriumlampe	THF	Tetrahydrofuran
NaP _i	Natriumphosphatpuffer	TMS	Trimethylsilyl
Net ₃	Triethylamin	TO	Thiazolorange
nm	Nanometer	TR	Thiazolrot
nmol	Nanomol	U	Uridin
NaOH	Natriumhydroxid	UV/Vis	Ultraviolettes- und sichtbares Lichtspektrum (190 – 800 nm)
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)	UV	ultraviolett
ODF	Oligodeoxyfluorosides	Vis	sichtbar (visible)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	V	Volt
PEG	Polyethylenglyk	vgl.	vergleiche
pH	pH-Wert	WED	Weißlicht emittierende DNA (<i>White-Light-Emitting DNA</i>)
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>	δ	chemische Verschiebung
ppm	<i>parts per million</i>	φ	Quantenausbeute

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

^a *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

^b 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.

I. Einleitung

„*There's a plenty of room at the bottom*“.^[1] Das ist der Titel des Vortrages, in dem *Richard Feynman* bereits im Jahr 1959 die konzeptuellen Grundlagen für den Bereich der Wissenschaft entwarf, der heute als Nanotechnologie bezeichnet wird. Damit gilt er als intellektueller und theoretischer Vordenker des Gebietes,^[2] welches sich mit der Kontrolle und Manipulation von Atomen und Molekülen auf kleinster Ebene beschäftigt (*nános*, altgriechisch: Zwerg; $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} = 0.000000001 \text{ m}$).^[3] *Feynman* erörterte verschiedene Methoden, um Informationen auf kleinstem Raum zu speichern, zu verändern und wieder auszulesen. Mit einem theoretischen Gedankenexperiment kam er zu dem Ergebnis, dass pro Informationseinheit (bit) mindestens 100 Atome für ein sicheres, binäres Speichersystem gebraucht werden.^[1] So könnten alle bisher geschriebenen Informationen der Menschheit in einem Staubkorn, das gerade noch mit dem Auge zu sehen ist, gespeichert werden. Damals wie heute sind wir noch weit von einer derart hohen Informationsdichte entfernt.

Einen ersten, kleinen Schritt in diese Richtung machten *Donald M. Eigler* und *Erhard Schweizer*.^[4] Im Jahr 1990, also mehr als 30 Jahre nach *Feynmans* berühmter Rede, gelang es ihnen mit Hilfe eines Rastertunnelmikroskops 35 Xenonatome gezielt zu versetzen, um so den Schriftzug ihres Arbeitgebers auf eine Nickeloberfläche zu schreiben (s. Abbildung 1).

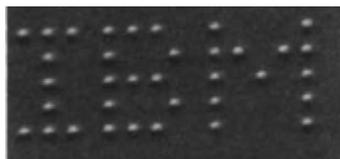


Abbildung 1: IBM Logo, geschrieben von *Eigler* und *Schweizer* durch Verschiebung von 35 Xenonatomen mit einem Rastertunnelmikroskop.^[4]

Zusammen mit *Nadrian C. Seeman* erhielt *Eigler* 2010 dafür den Kavli Preis für Nanotechnologie.^[5] *Seeman*, Professor an der New York University, konstruierte ebenfalls genau definierte Strukturen im Bereich von Nanometern. Durch das Ausnutzen der Selbstkomplementarität und gut untersuchten Struktur von DNA, gelang es ihm und seinen Mitarbeitern, allein durch Aggregation speziell designter, synthetischer Oligonukleotide, verschiedenste Nano-Architekturen aufzubauen.^[6] Damit gilt *Seeman* als Gründungsvater der DNA-Nanotechnologie.

Einleitung

Heute werden die gezielte Manipulation und der Aufbau von auf DNA-basierten Systemen vor allem in autonomen Nanomaschinen^[7-8] und im Bereich der Bioanalytik zur molekularen Zellbildung^[9-10] eingesetzt.

Dabei spielen bildgebende Analysemethoden zur Detektion von Prozessen auf molekularer Ebene eine große Rolle. Dadurch können eigentlich unsichtbare und komplexe Vorgänge sichtbar und damit verständlich gemacht werden. Mit der Untersuchung von Farbwechseln in DNA durch fluoreszente Cyaninfarbstoffe und farbgebende Diarylethen-Photoschalter soll in dieser Arbeit ein besserer Einblick in die Untersuchung und Steuerung der DNA-Hybridisierung gegeben werden.

II. TO und TR - Strukturaufklärung und Anwendung in Strangaustauschprozessen

1 Themenstellung

Die Entwicklung leistungsfähiger Fluoreszenzmarker für Nukleinsäuren spielt eine große Rolle in der chemischen Biologie.^[11-14] Vor allem wellenlängenverschiebenden DNA- und RNA Sonden, wie die Kombination aus Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR), werden als Werkzeug zur Lösung verschiedener biologischer und analytischer Problemstellungen verwendet (s. Abbildung 2).^[15-18]

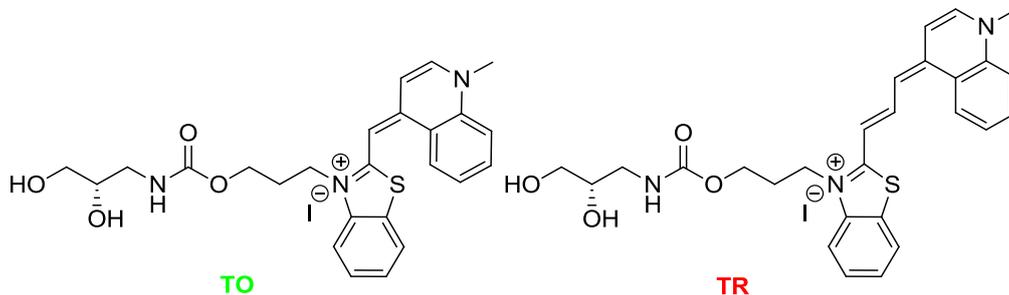


Abbildung 2: Strukturen von TO und TR als Basis für das Konzept der „DNA/RNA Traffic Lights“.

Es wurde bereits von *Wagenknecht et al.* gezeigt, dass verschiedene Wechselwirkungen zwischen den sogenannten „DNA/RNA Traffic Lights“ die Effizienz des Energietransfers beeinflussen können. Auf Grund der herausragenden Eigenschaften dieser Farbstoffkombination soll im folgenden Teil der Arbeit durch Variation der Struktur verschiedener TO- und TR-modifizierter DNA-Haarnadeln ein systematischer Zusammenhang zwischen den verschiedenen Farbstoffwechselwirkungen und der Effizienz des Energietransfers erarbeitet werden. Dabei sollen vor allem Methoden der optischen Spektroskopie zum Einsatz kommen. Diese Untersuchungen können als Grundlage zur Entwicklung neuer Chromophor-DNA-Architekturen dienen, sodass nicht nur das Konzept der „DNA/RNA Traffic Lights“, sondern auch andere wellenlängenverschiebende DNA-Sonden und Lichtsammelsysteme auf weitere Problemstellungen übertragen werden können.

Eine dieser Anwendungen, die im Weiteren hier behandelt werden soll, ist die Visualisierung *Toehold*-basierter DNA-Strangaustauschreaktionen. Dabei ist das Ziel dieser Arbeit weniger, neue Informationen über diesen bisher schon sehr ausführlich untersuchten Prozess zu erhalten. Viel mehr soll gezeigt werden, wie dessen Verlauf durch Detektion des hybridisierungssensitiven Fluoreszenzfarbwechsels von grün zu rot und umgekehrt, detailliert und anschaulich beschrieben werden kann.

Themenstellung

Um den Mechanismus des Energietransfers zwischen **TO** und **TR** zu verstehen und die Bedeutung der „DNA/RNA *Traffic Lights*“ in verschiedenen Anwendungen und deren Vorteile gegenüber anderen Systemen herauszustellen, wird im Folgenden zuerst auf die theoretischen Grundlagen eingegangen.

2 Fluoreszenz Resonanz Energietransfer

2.1 Begriffserklärung

Wird ein Molekül durch Absorption eines Photons aus dem Grundzustand (S_0) in den ersten, elektronisch angeregten Zustand (S_1) angehoben, kann es die aufgenommene Energie über verschiedene Prozesse wieder abgeben. Dabei spielen unter Anderem strahlungslose Relaxation (VR), verursacht durch Molekülschwingung oder Zusammenstöße mit Lösemittelmolekülen, und andererseits lichtemittierende Prozesse, wie zum Beispiel Fluoreszenz, eine Rolle. Letzteres entspricht der Abgabe von Licht durch einen direkten S_1 - S_0 -Übergang. Dabei ist die Wellenlänge des emittierten Lichts immer größer als das Absorptionsmaximum, da durch vorangestellte, strahlungslose Prozesse bereits Energie abgegeben wurde.^[19] Die Differenz aus Emissions- und Absorptionsmaximum wird als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet.^[20]

Eine weitere Möglichkeit ist die strahlungslose Abgabe der Energie an ein geeignetes, sich im Grundzustand befindendes Akzeptormolekül. Die Energieübertragung findet dabei durch Dipol-Dipol-Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Donor (D) und Akzeptor (A) statt. Dies wurde erstmals von Förster im Jahr 1948 beschrieben und wird als „Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer“ (FRET) bezeichnet.^[21]

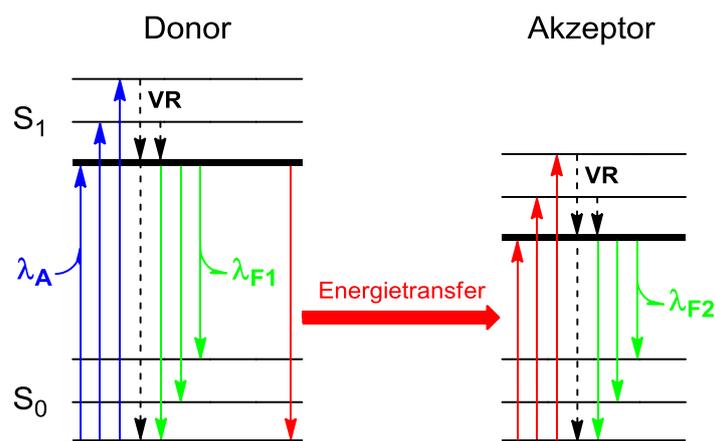


Abbildung 3: Schematische Darstellung einiger wichtiger Relaxationsprozesse und des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers; A = Absorption, F = Fluoreszenz, VR = strahlungslose Relaxation.

Dadurch wird wiederum der Akzeptor in den S_1 -Zustand angeregt und kann aus diesem entweder strahlungslos relaxieren (Fluoreszenzlöschung) oder seinerseits durch Fluoreszenz in den elektronischen Grundzustand zurückkehren (Abbildung 3).

Fluoreszenz Resonanz Energietransfer

Die Effizienz dieses Prozesses hängt von unterschiedlichen Faktoren ab und spiegelt sich auch in der Energietransferrate k_{FRET} wider:

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

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

τ_{D} : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

R_0 : Förster Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz)

r : Abstand zwischen Donor und Akzeptor

κ : Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor

Φ_{D} : Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

$J(\lambda)$: Spektrales Überlappintegral

n : Brechungsindex des Mediums zwischen den Chromophoren

Formel 1: Ausdruck für die Abhängigkeit der Energietransferrate des FRETs.^[22]

Aus Formel 1 wird ersichtlich, dass neben der Quantenausbeute und Fluoreszenzlebenszeit des Donors vor allem drei Bedingungen für eine hohe FRET-Effizienz erfüllt sein müssen. Zum einen müssen sich die Donor-Emission und Akzeptor-Absorption spektral überlappen ($J(\lambda) \neq 0$, Abbildung 4, z.B. $J(\text{TO/TR}) = 1.35 \cdot 10^{12} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$).

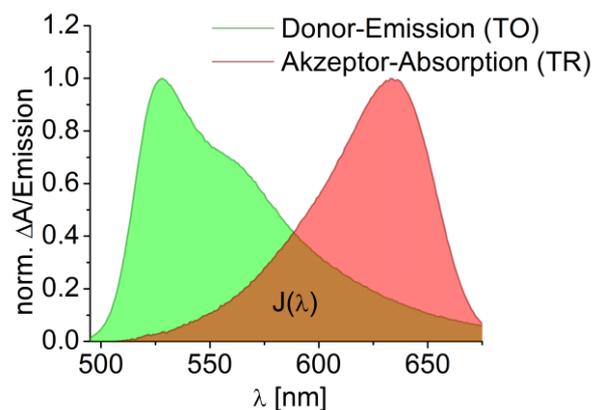


Abbildung 4: Spektrales Überlappintegral zwischen Donor-Emission und Akzeptor-Absorption am Beispiel von TO (Donor) und TR (Akzeptor).

Zum anderen müssen sich **D** und **A** in einer geeigneten geometrischen Anordnung zueinander befinden. Der Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor κ^2 ist abhängig vom Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der Farbstoffe (bei willkürlich orientierten Dipolmomenten wird meist der Durchschnittswert $2/3$ für κ^2 von frei rotierenden Dipolmomenten angenommen).^[23]

Der dritte Faktor ist die räumliche Nähe zwischen beiden Chromophoren. Die Abhängigkeit $k_{\text{FRET}} \sim r^{-6}$ zeigt, dass die Geschwindigkeit des FRETs mit steigendem Abstand stark abfällt. Ein schneller und damit effizienter Energietransfer ist so nur bei Donor-Akzeptor-Abständen von unter 10 nm möglich.

Vor allem die Abstands- und Orientierungsabhängigkeit des FRETs kann zur Untersuchung der Struktur und Wechselwirkung von Makromolekülen, wie zum Beispiel Proteinen und Nukleinsäuren^[24-25], verwendet werden. Das FRET-Signal fungiert dabei als „molekulares Lineal“ und kann zum Beispiel strukturelle Veränderungen in DNA Origami^[26], molekularen Sonden^[27], molekularen Sensoren^[28] oder Ribozymen^[29-30] anzeigen. Die Vorteile dieser Technik sind die sensitive Fluoreszenzdetektion auf Grund der großen Stokes-Verschiebung und die Möglichkeit, Abstände über einen großen Bereich genau zu bestimmen (10-100 Å). Auch die zeitaufgelöste Beobachtung dynamischer, molekularer Prozesse kann so realisiert werden.

Speziell in der DNA- und RNA-Analytik^[31] lassen sich so Faltungsgleichgewichte^[32-33] und Wechselwirkungen mit Proteinen^[34-35] beobachten. Neben anderen Arbeitskreisen^[36-38] erarbeitete die Gruppe um *Asanuma*^[39] systematisch den Zusammenhang zwischen der Orientierung und dem Abstand zweier Farbstoffe in DNA und der FRET-Effizienz. Dazu wurden die beiden Chromophore Pyren (**Py**) und Perylen (**Pe**) kovalent, über einen *D*-Threoninol-Linker an DNA geknüpft (Abbildung 5, rechts). **Py** und **Pe** stellen ein gut untersuchtes Donor-Akzeptor-Paar dar.^[40-42] Durch die flexible Anbindung an DNA ist es ihnen möglich, zwischen die natürlichen Nukleobasen zu interkalieren. Dies schränkt die freie Beweglichkeit der Farbstoffe stark ein, sodass der Abstand und die Orientierung genau kontrolliert und über die bekannten Strukturparameter der DNA abgeschätzt werden können. Nun wurden die FRET-Effizienzen bei variierendem Abstand der beiden Farbstoffe ($n = 1 - 21$ Basenpaare) über statische Fluoreszenzmessungen und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie bestimmt und mit theoretischen Berechnungen verglichen (Abbildung 5, links). Wie erwartet, sinkt die FRET-Effizienz mit steigendem Abstand der Chromophore. Entgegen dieser Tendenz zeigen die Oligonukleotide mit $n = 8, 13$ und 18 einen signifikant größeren Abfall der FRET-Effizienz. Dies ist sogar mit bloßem Auge zu erkennen (vgl. in Abbildung 5, unten Fluoreszenzfarbe $n = 8$ mit $n = 7$ und 9). Diese periodische Abweichung, alle 5 Basenpaare, entspricht ungefähr

Fluoreszenz Resonanz Energietransfer

einer 180° Drehung in der B-DNA-Helix und kann in guter Näherung mit den theoretischen Berechnungen anhand des Zylindermodells vorhergesagt werden.

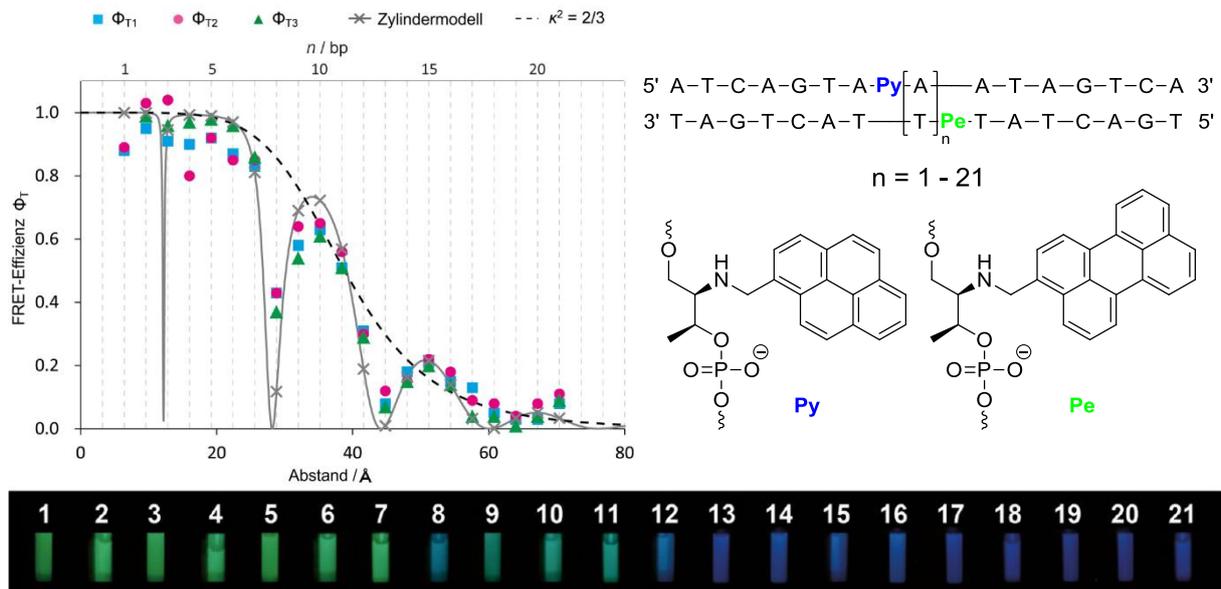


Abbildung 5: Struktur des *D*-Threoninol-verknüpften Pyrens (Py, Energiedonor) und des *D*-Threoninol-verknüpften Perylens (Pe, Energieakzeptor); Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand zwischen Py und Pe (links); Fluoreszenzfarbe der verschiedenen modifizierten DNA-Stränge für $n = 1 - 21$.^[39]

Somit wird die FRET-Effizienz zweier Chromophore in DNA auch von der Orientierung von **D** und **A** stark beeinflusst und muss damit bei Bestimmungen von Abständen in DNA berücksichtigt werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von *Wilhelmsson et al.*, die bereits 2009 ähnliche Untersuchungen vornahmen.^[38]

2.2 FRET-Systeme in DNA

Der Einsatz von Fluoreszenzsonden in der Biosensorik, der Nukleinsäure-Analytik und bei der Visualisierung einzelner Zellbestandteile ist heutzutage nicht mehr wegzudenken.^[14, 43-46] Dabei stehen vor allem die Beobachtung der zellulären Aufnahme von DNA und RNA und der damit verbundenen sequenzspezifischen Hybridisierung im Vordergrund. Auch die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) durch Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion kann so realisiert werden.^[47] Aber gerade bei Untersuchungen in Zellen besteht immer das Problem, dass falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse erhalten werden können. Bei Verwendung nur eines Fluoreszenzfarbstoffes oder der Kombination von Fluorophor und Löscharbstoff kann durch die Autofluoreszenz intrazellulärer Bestandteile oder durch unspezifische Fluoreszenzlöschung das Signal verändert werden und so zu einer falschen Interpretation der Experimente führen.

Durch Entwicklung wellenlängenverschiebender Sonden können diese Probleme minimiert oder umgangen werden. Neben dem Einsatz von Sonden, bei denen die Detektionswellenlänge durch Excimerfluoreszenz oder excimerartiger Fluoreszenz^[48-51] verschoben wird, beruhen viele Systeme auf dem physikalischen Prozess des FRETs.^[52-53] Durch Kombination zweier oder mehrerer Farbstoffe kann ein Farbwechsel während der Detektion erreicht werden.

Dazu werden oft *Molecular Beacons* (MBs) verwendet.^[47, 54] Diese sind mit Farbstoffen meist endständig modifizierte DNA-Haarnadelstrukturen, die durch Zugabe einer der Schlaufenregion komplementären Zielsequenz geöffnet werden können. Die Triebkraft für diese Konformationsänderung ist die höhere Stabilität des Interstrangdimers im Vergleich zum geschlossenen MB. Dadurch entfernen sich die beiden Farbstoffe voneinander und es kommt zum Farbwechsel. Auf Grund dieser Eigenschaft werden *Molecular Beacons* oft als Fluoreszenzsonden eingesetzt.^[55-56]

Das Konzept der wellenlängenverschiebenden *Molecular Beacons* wurde erstmals von *Tyagi et al.* im Jahr 2000 vorgestellt.^[57] Sie synthetisierten mehrere Haarnadeln, die jeweils im 5'-Arm einen *Harvester*-Fluorophor (**H**) und am 3'-Ende der Sequenz einen nicht-fluoreszenten Fluoreszenzlöscher (**Q**) enthalten.

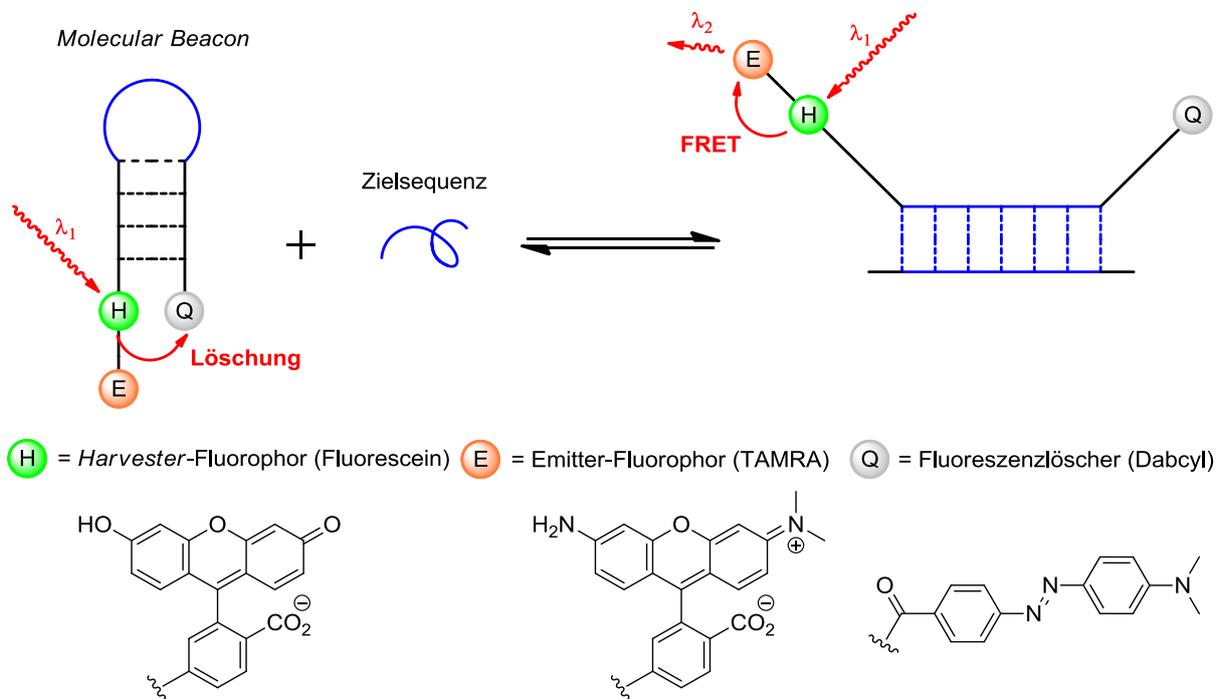


Abbildung 6: Konzept der wellenlängenverschiebenden MBs von *Tyagi et al.* mit dem *Harvester*-Fluorophor (**H**), dem Fluoreszenzlöscher (**Q**) und dem Emitterfluorophor (**E**); unten sind die Strukturen der verwendeten Farbstoffe dargestellt.

Der Emitter-Fluorophor (**E**) befindet sich einige wenige Nukleotide entfernt von **H** am 5'-Ende (Abbildung 6). In Abwesenheit einer zur Schlaufenregion komplementären

Fluoreszenz Resonanz Energietransfer

Zielsequenz befindet sich der MB in der geschlossenen Form und **H** ist somit im direkten Kontakt mit **Q**. Wird **H** an seinem Absorptionsmaximum angeregt, wird dessen Fluoreszenz durch **Q** gelöscht, man erhält nur ein schwaches Fluoreszenzsignal. Gibt man die Zielsequenz hinzu, wird der MB geöffnet, **H** befindet sich räumlich näher zu **E** und es kommt zum Energietransfer. Es lässt sich so, als positives Signal, die Fluoreszenz des Emitter-Fluorophors detektieren. Durch die große Stokes-Verschiebung ist es möglich, die Emission besser zu filtern, und somit ist die Detektion der Zielsequenz sensitiver. Zusätzlich kann man zwischen Abwesenheit der Zielsequenz und erfolgloser Zelltransfektion bei Verwendung unterschiedlicher Auslesewellenlängen unterscheiden. Neben diesem Beispiel existieren in der Literatur eine Vielzahl weiterer, teilweise auch mit drei Fluorophoren modifizierte, wellenlängenverschiebende MBs.^[58-62]

Ein weiteres Beispiel für wellenlängenverschiebende DNA-Sonden sind die WEDs (*white light emitting DNA*). Wie in Kapitel II.2.1 erläutert kann Pyren in Kombination mit Perylen als Energiedonor fungieren. Auch mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Nil Rot ist auf Grund seiner breiten Absorptionsbande bei ca. 620 nm ein Energietransfer möglich. *Wagenknecht et al.*^[63] brachten diese beiden Chromophore über einen Ethinyl-Linker an 2'-Desoxyuridin an (**PydU** und **NRdU**).

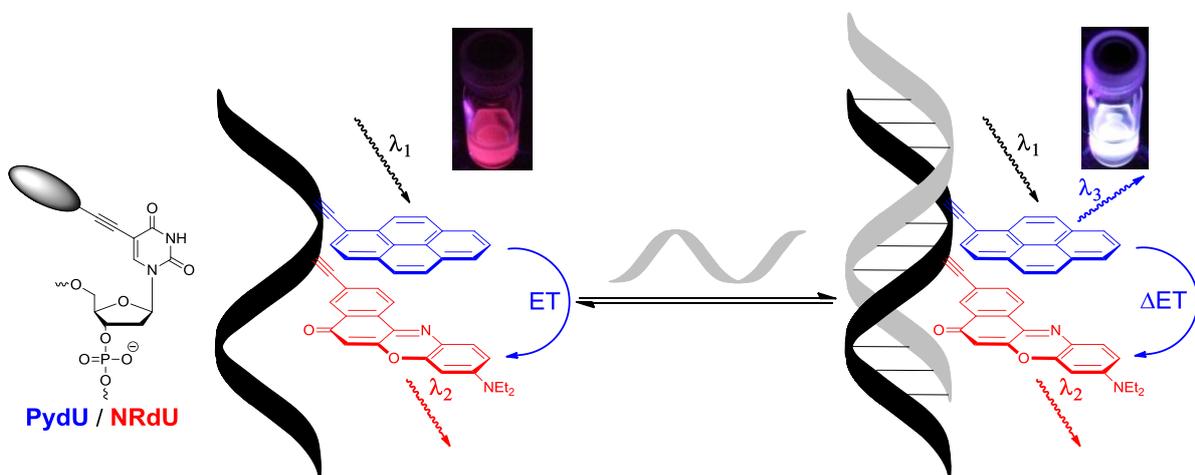


Abbildung 7: Struktur der Pyren- (**PydU**) bzw. Nil Rot- (**NRdU**) modifizierten Nucleoside in DNA (links); Prinzip des Farbwechsels der WEDs (rechts).^[63]

Die modifizierten Nucleoside konnten dadurch in DNA eingebaut werden, wobei angenommen wurde, dass die natürliche Basenpaarung nicht gestört wird (Abbildung 7, links). Um eine effiziente elektronische Wechselwirkung zu erhalten, wurden die beiden Chromophore direkt nebeneinander platziert. Wird nun **PydU** bei 380 nm angeregt kommt es im Einzelstrang zu einem effizienten Energietransfer auf **NRdU** und es überwiegt dessen rote Fluoreszenz bei 665 nm ($k_{\text{FRET}} = 5.24 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$,

Abbildung 7). Wird dieser Einzelstrang mit dem komplementären, unmodifizierten Gegenstrang hybridisiert, sinkt die FRET-Effizienz auf 83% des ursprünglichen Wertes ($k_{\text{FRET}} = 1.69 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$). Dieser Abfall wird auf die, in der helikal verdrehten Doppelhelix, veränderte Orientierung der Übergangsdipolmomente der beiden Farbstoffe zueinander zurückgeführt. Dadurch ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten des blau-grünen **PydU** (400 – 600 nm) und die des roten **NRdU** (600 – 750 nm) bei ca. 1 und es kommt zu einer weißen Emission. Zusätzlich lässt sich durch dieses System die Emissionswellenlänge thermisch steuern. Beim Erhitzen des Doppelstrangs kommt es zur Dehybridisierung und die rote Fluoreszenz wird wieder hergestellt. Dieser Farbwechsel ist reversibel und lässt sich durch Abkühlen umkehren.

Das Konzept der WEDs findet Anwendung als Sonde in Molecular Beacons^[58] und konnte durch die Kombination mit acpcPNA^[64] ((2S)-Aminocyclopentan-(1S)-carbonsäure Peptidnukleinsäure) erweitert und verbessert werden.^[65]

Neben diesen wellenlängenverschiebenden DNA-Sonden, deren Ausleseprinzip auf zwei Fluorophoren beruht, gibt es in der Literatur viele weitere, bei denen auch mehrere Farbstoffe kombiniert werden. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel stellen dabei die Oligodesoxyfluorosid-Sonden (ODF-Sonden) von *Kool et al.* dar.^[66] Sie synthetisierten Nukleoside in denen jeweils der Fluorophor (hier: Pyren (**Py**), Perylen (**Pe**), Benzpyren (**BPy**) und Dimethylaminostilben (**DMAS**)) die natürliche Base in einer 2'-Desoxyribose-Einheit ersetzt.^[67-68] Diese Bausteine wurden über eine *Split-and-pool-Synthesestrategie*^[69] zu kurzen ODFs (3 - 5 Fluoroside) aneinandergesetzt^[70-71] und die Oligomere wiederum, zusammen mit unmodifizierter 2'-Desoxyribose (**ABS**) als Platzhalter, über automatisierte DNA-Festphasensynthese verbunden (Abbildung 8, oben). Das negativ geladene DNA-Rückgrat macht die ODFs wasserlöslich und fördert die Wechselwirkung zwischen den flachen Aromaten (FRET, Exciplexe, Excimere, H-Dimere, usw.)^[71] Die Anregungswellenlängen aller Fluoroside liegen zwischen 340 nm und 380 nm, wohingegen die Fluoreszenzwellenlängen den ganzen sichtbaren Bereich abdecken (376 - 633 nm, Abbildung 8, unten). Damit kann eine fast beliebige Fluoreszenzfarbe bei einem sehr engen Anregungsbereich erhalten werden, wobei sich die einzelnen ODFs nur in der Abfolge und im Abstand von 4 verschiedenen Fluorophoren unterscheiden. Dadurch sind sie für *in vivo* Anwendungen geeignet und wurden bereits an HeLa-Zellen und in Zebrafisch-Embryos getestet.

Fluoreszenz Resonanz Energietransfer

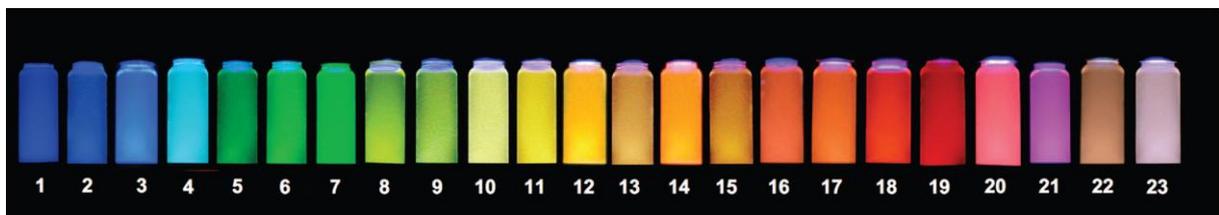
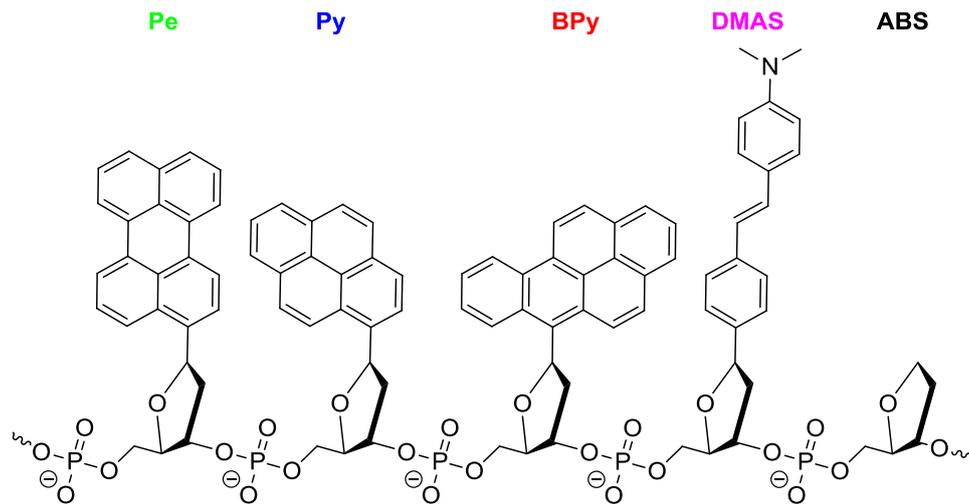


Abbildung 8: Struktur für ein ODF bestehend aus Perylen- (Pe), Pyren- (Py), Benzpyren- (BPy), Dimethylaminostilben- (DMAS) Nucleosiden und einem 2'-Desoxyribose-Platzhalter (ABS) (oben); Fluoreszenz von ODF-Lösungen, bestehend aus 4 Fluorociden in unterschiedlichen Kombinationen bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 354 \text{ nm}$ (unten).^[66]

In weiteren Arbeiten wurden sie erfolgreich zur Detektion kleiner organischer Moleküle,^[72-73] als Sonden für die DNA-Hybridisierung und zur Markierung von Biomolekülen^[74] benutzt und konnten auch durch den Einsatz weiterer Fluorophore weiterentwickelt werden.

3 TO und TR als wellenlängenverschiebende DNA-Sonden

Wie in Kapitel II.2.2 beschrieben, ist die Bedeutung von leistungsfähigen, wellenlängenverschiebenden DNA-Sonden enorm. Allerdings sind bei vielen Farbstoffkombinationen die FRET-Effizienzen und damit auch die Farbkontraste zwischen positivem und negativem Signal gering,^[15, 75] was wiederum eine *in vivo* Anwendung stark einschränkt. Eine Ausnahme davon sind die Fluoreszenzfarbstoffe TO und TR.^[18] Kovalent als Interstrang-Dimere an DNA gebunden ist zwischen Ihnen ein sehr effizienter Energietransfer mit gut voneinander separierten Fluoreszenzwellenlängen möglich. Dabei kommt es zum Farbwechsel von grün (TO) nach rot (TR) mit einem Kontrastverhältnis ($I_{\max, TR}/I_{\max, TO} = R/G$) von bis zu 20:1. Daher wird dieses FRET-Paar in der Literatur auch als „Traffic Lights“ bezeichnet.^[10] Auf Grund dieser herausragenden Eigenschaften und der zentralen Bedeutung in dieser Arbeit, wird im Folgenden näher auf das Konzept, die Optimierung und die verschiedenen Anwendungen der „DNA und RNA Traffic Lights“ eingegangen.

3.1 Konzept der „DNA Traffic Lights“

TO und TR sind Cyaninfarbstoffe, die jeweils aus einem Chinolin- und einem Benzothiazolring aufgebaut sind. Die beiden Heteroaromaten sind über eine Methinbrücke verbunden, wobei sich die beiden Farbstoffe nur in der Länge dieser Brücke unterscheiden. Mit einem azyklischen Linker können sie in das DNA-Rückgrat integriert werden (Abbildung 9, oben).^[18] Dieses Vorgehen hat mehrere Vorteile. Der Linker enthält keine glykosidische Bindung, so dass eine hohe chemische Stabilität gewährleistet ist. Außerdem sind die zwei Hydroxyl-Gruppen in ihrer Reaktivität denen der 2'-Desoxyribose ähnlich, wodurch der Linker kompatibel für die Phosphoramidit-Chemie ist. Zusätzlich ist durch seine konformationelle Flexibilität eine Interkalation der Farbstoffe in DNA möglich.^[10] Trotz deren Größe sinkt der Schmelzpunkt TO/TR-modifizierter DNA im Vergleich mit unmodifizierten Oligonukleotiden, die jeweils ein A-T-Basenpaar anstelle der Farbstoffe besitzen, nur um ca. 2 °C. Die beiden Farbstoffe können Grundzustands-Dimere bilden, wodurch die Destabilisierung durch die zwei fehlenden Basenpaare nahezu ausgeglichen wird. Dieser Umstand ist von Bedeutung, da, trotz der doppelten Modifikation, Hybridisierungs- und Dehybridisierungsprozesse direkt miteinander verglichen werden können.

Der oben erwähnte Unterschied in der Länge der Methinbrücke wirkt sich stark auf die optischen Eigenschaften der Farbstoffe in DNA aus. Die Absorptions- und Fluoreszenzwellenlängen von TR sind im Vergleich zu TO, je nach Sequenz, um bis zu 140 nm bathochrom verschoben. Dadurch überlappen die Emission von TO und die Absorption von TR spektral miteinander (Abbildung 4) und es kann nach Anregung von TO zu einem Energietransfer auf TR kommen (Abbildung 9, unten).

Auf Grund des Fluoreszenzfarbwechsels von grün (ca. 530 nm) nach rot (ca. 660 nm) mit einer großen Stokes-Verschiebung und großer Helligkeit der Farbstoffe ($B_{TO} = 3.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $B_{TR} = 8.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, s. Kapitel II.7.3, Tabelle 6) ist TO/TR-modifizierte DNA geeignet für Anwendungen in der bioanalytischen Bildgebung. Durch Mikroinjektion wurde diese DNA-Sonde erstmals 2010 von der Gruppe um Wagenknecht in Kooperation mit Breunig^[18] in lebende CHO-K1 Zellen eingeschleust und konnte dort mittels Konfokalmikroskopie zur Beobachtung von Zellprozessen verwendet werden, wobei das R:G-Verhältnis von 6:1 auch in den Zellen erreicht wurde. Um dieses Kontrastverhältnis noch zu verbessern, wurde die Orientierung der

TO und TR als wellenlängenverschiebende DNA-Sonden

Farbstoffe und deren Abstand zueinander im Doppelstrang systematisch variiert, so dass R/G-Verhältnisse von 16:1 und sogar 20:1 erhalten werden konnten.^[16]

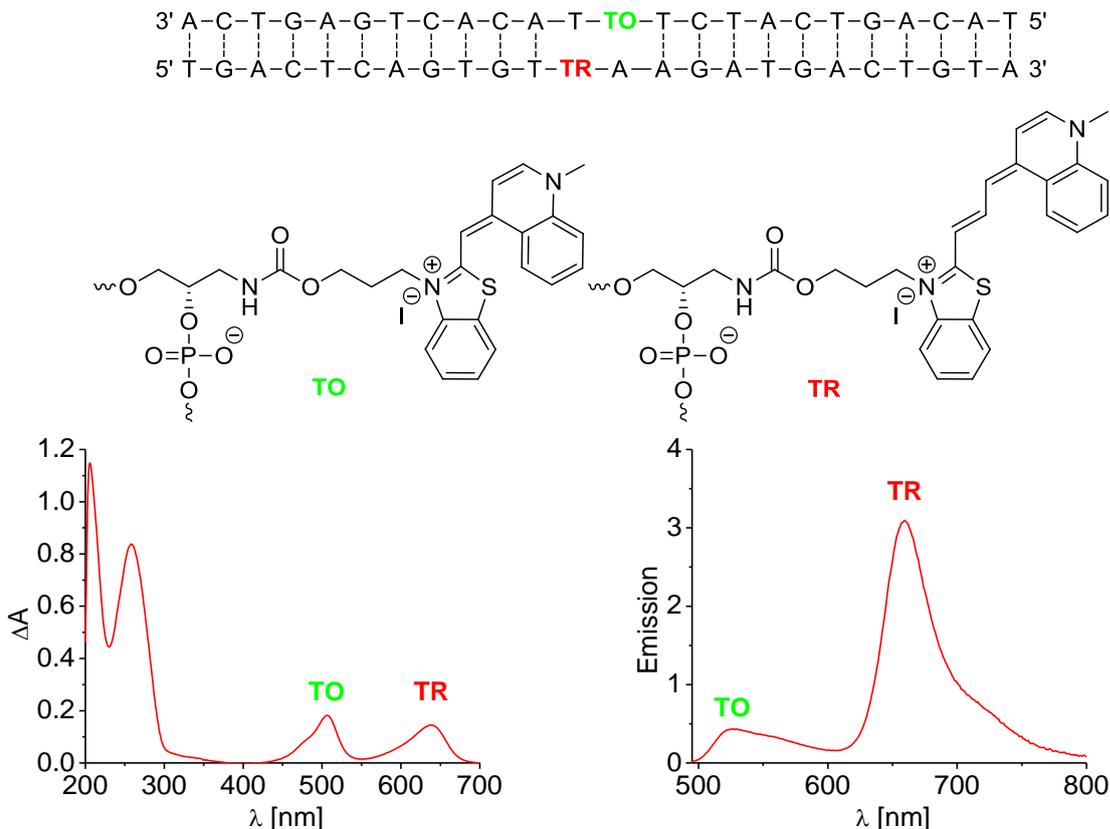


Abbildung 9: Strukturen von Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR) in einem repräsentativem DNA-Doppelstrang (oben) und deren Absorptions- und Fluoreszenzspektrum (unten).

Das zeigt, dass verschiedene, vermutlich excitonische Wechselwirkungen mit dem Energietransfer konkurrieren und beim Design molekularer Sonden berücksichtigt werden müssen. In Kapitel II.4 wird genauer auf die strukturelle Abhängigkeit des FRETs zwischen TO und TR eingegangen.

Neben der Bildgebung in Zellen konnten die „DNA Traffic Lights“ auch erfolgreich in *Molecular Beacons* eingebaut werden. Wagenknecht et al.^[15] synthetisierten vier verschiedene MBs, die sich jeweils in der Stammlänge unterschieden (5 – 11 Basenpaare), wobei die Erkennungssequenz der Schlaufenregion zufällig gewählt wurde. Vergleicht man die Schmelztemperaturen der geschlossenen MBs mit dem der geöffneten, mit der Zielsequenz hybridisierten Doppelstränge, zeigt sich, dass es günstig ist, die Erkennungssequenz nicht nur in die Schlaufenregion, sondern auch teilweise in den Stamm miteinzubringen. Anderenfalls werden die Chromophore beim Öffnen nicht genug voneinander isoliert und es verbleibt, auf Grund der unspezifischen Aggregation der Farbstoffe in der Stammregion, eine TR-Restfluoreszenz. Variiert man die Orientierung der Farbstoffe in einem MB

TO und TR als wellenlängenverschiebende DNA-Sonden

zueinander, bleibt der Schmelztemperaturunterschied zwischen offener und geschlossener Form ungefähr gleich, die Höhe des positiven Signals steigt allerdings um das Dreifache. Diese Diskrepanz wurde auf excitonische Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen zurückgeführt. Durch die Ausbildung von Grundzustands-Dimeren können TO und TR nicht mehr getrennt voneinander angeregt werden und es kommt zu einem Abfall der FRET-Effizienz (siehe Kapitel II.4). Durch Bestimmung der Schmelztemperaturunterschiede bei variierenden Stammlängen und kinetischen Studien beim Öffnen des *Beacons* konnte so das Design für eine möglichst effiziente Detektion der Zielsequenz optimiert werden. Demnach ist das System der „Traffic Lights“ in MBs mit unterschiedlichen Stammlängen und Schlaufensequenzen anwendbar und übertrifft in der Sensitivität kommerziell erhältliche MBs etwa um eine Größenordnung.

Neben der Detektion einzelsträngiger DNA ermöglicht das System aus TO und TR durch Anwendung in sogenannten Aptasensoren auch den optischen Nachweis von kleinen organischen Molekülen. *Patel et al.*^[76] zeigten durch NMR-Strukturaufklärung der entsprechenden DNA, dass in bestimmte G-reiche Sequenzen zwei Moleküle Adenosinmonophosphat (AMP) gebunden werden können. Dadurch bildet sich aus dem vorher ungeordnet vorliegendem Einzelstrang eine haarnadelförmige Struktur, mit dem Aptamer als Bindungstasche im Stamm. *Wagenknecht et al.*^[16] übertrugen diese Aptamersequenz in zwei getrennte Einzelstränge, wobei sie jeweils am linken Ende mit den Farbstoffen modifiziert und erweitert wurden, um die für einen effizienten Energietransfer nötige DNA Struktur zu erhalten (Abbildung 10).

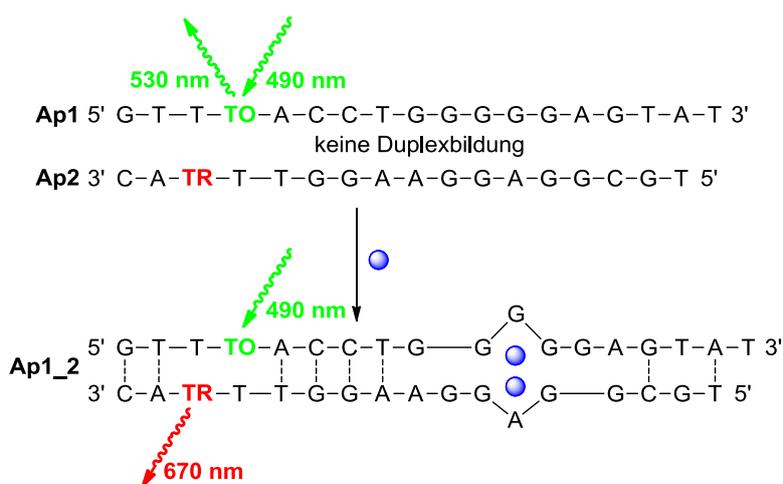


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aptasensors mit den Sequenzen von Ap1 und Ap2 und dem Zielmolekül (blau).

Die Komplementarität von maximal 4 Basenpaaren in Folge reicht nicht aus, um einen stabilen Duplex zu bilden. Wird nun zu den Einzelsträngen, Ap1 und Ap2,

Adenosin gegeben lagern sich zwei Moleküle in die Bindungstasche ein und es kommt zur Duplexbildung. Dadurch werden TO und TR in räumliche Nähe zueinander gebracht und es kommt zum Energietransfer. Bei erfolgreicher Bindung des Zielmoleküls wechselt die Fluoreszenzfarbe somit von grün nach rot. Damit lassen sich Adenosin und 2'-Desoxyadenosin erfolgreich detektieren und von strukturell ähnlichen Molekülen, wie 2-Aminopurin und 2'-Desoxyguanosin unterscheiden.

3.2 Übertragung des Konzepts auf RNA

RNA Interferenz stellt eine Möglichkeit dar, um mit sequenzspezifischer *small interfering* RNA (= siRNA), mRNA in Zellen zu binden und zu spalten und somit die Genexpression in eukaryotischen Zellen zu kontrollieren.^[77-78] Molekulare Bildgebung von siRNA in lebenden Zellen wird zur Untersuchung der Genfunktionen^[77-79] und zur Gentherapie verwendet.^[80-81] Die Herausforderungen, die heute in diesem Bereich noch überwunden werden müssen, sind die Kontrolle der geringen Stabilität von RNA in biologischen Medien und die Schwierigkeit, die zu regulierenden Zellen gezielt anzusteuern. Daher ist es von großer Bedeutung, die Integrität der siRNA während des Übertragungsprozesses verfolgen zu können. Dies kann durch wellenlängenverschiebende DNA-Sonden erreicht werden, wobei es in der Literatur dazu bisher nur wenige Ansätze gibt.^[82-84] Wie bereits in Kapitel II.3.1 erwähnt, zeigen gewöhnliche DNA-Sonden, bei denen die Chromophore am 3'- bzw. 5'-Ende der Sequenz angebracht sind, ein schlechtes Farbkontrastverhältnis und somit, in diesem Zusammenhang, einen kleinen dynamischen Bereich von 0 – 10% für die Detektion der in Zellen verarbeiteten siRNA. Daraus resultiert auch bei vielen Beispielen eine geringere Sensitivität.^[85-89] Daher entwickelten *Wagenknecht et al.*^[17] 2013 eine mRNA-Sonde basierend auf dem FRET-System aus TO und TR. Sie wählten die siRNA-Sequenz, die zum Ausschalten der Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in CHO-K1 Zellen im Stande ist. Die Modifikation mit den Farbstoffen erfolgte nicht in der Erkennungsregion, damit ein effektives Gen-Silencing gewährleistet ist. Dadurch erreichten sie einen erstaunlich breiten dynamischen Bereich von 0 – 50%. Auch die Aufnahme und Integrität der siRNA in den Zellen konnte durch Echtzeitverfolgung sichtbar gemacht werden. Damit erweist sich dieses System als leistungsstarkes Werkzeug für die molekulare Bildgebung.

4 Spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von **TO** und **TR** in DNA

Wie in Kapitel II.3 erläutert, werden die „DNA *Traffic Lights*“ auf Grund ihrer herausragenden Eigenschaften zur Lösung biologischer und analytischer Fragestellungen sehr vielseitig eingesetzt. Trotz dieses großen Interesses gibt es kaum oder nur oberflächliche Untersuchungen zur Struktur und den Wechselwirkungen dieser Farbstoffe in DNA.

Vor allem mit dem Zusammenhang der DNA-Struktur und der Effizienz des Energietransfers zwischen **TO** und **TR** beschäftigt sich der folgende Teil dieser Arbeit. In früheren Arbeiten von *Wagenknecht et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass die Art der Anknüpfung der Farbstoffe an DNA einen entscheidenden Einfluss auf deren optische Eigenschaften besitzt.^[18] Das R/G-Verhältnis bei einer Anknüpfung über den Chinolinstickstoff ist wesentlich kleiner ($R/G = 0.8$) als bei einer Konjugation über den Benzothiazolstickstoff ($R/G = 6$). Außerdem ist der Extinktionskoeffizient von **TR** im Fall der Anknüpfung über den Benzothiazolstickstoff bis zu 5mal höher. Daher wird im Weiteren nur auf diese Variante eingegangen.

Wie oben bereits erwähnt, ist die Lage der Übergangsdipolmomente der Farbstoffe entscheidend für die Effizienz des Energietransfers (s. Kapitel II.2.2). Da der verwendete Carbamat-Linker relativ kurz, aber dennoch flexibel ist, kann die Struktur der DNA einen direkten Einfluss auf diese Orientierung nehmen. Um einen genaueren Einblick in die Strukturverhältnisse und die Art und den Einfluss der Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen zu erhalten, soll dieser Umstand im Folgenden durch schrittweise Variationen in unmittelbarer Nähe zu den Farbstoffen untersucht werden.

4.1 Orientierungs- und Abstandsabhängigkeit des Energietransfers

Carolin Holzhauser aus dem Arbeitskreis *Wagenknecht* konnte über Absorptions- und Fluoreszenzmessungen eine klare Anhängigkeit der Effizienz des Energietransfers feststellen.^[16] Es wurden verschiedene Oligonukleotide synthetisiert, die sich in der relativen 3'-5'-Orientierung und der Zahl der Basenpaare zwischen den Farbstoffen unterschieden (s. Abbildung 11). Die spektralen Eigenschaften der Doppelstränge weisen starke Unterschiede auf. Bei Orientierungen, in denen die Farbstoffe jeweils näher zu den 5'-Enden der DNA platziert sind (**DNA3** und **DNA4**), besitzt **TR** einen annähernd doppelt so hohen Extinktionskoeffizienten als in der umgekehrten Orientierung (**DNA1** und **DNA2**).

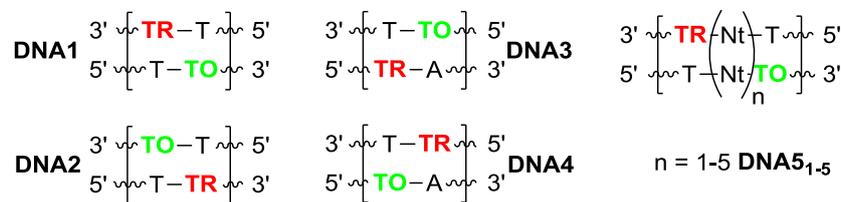


Abbildung 11: Ausschnitte aus den DNA-Sequenzen zur Untersuchung der Chromophor-Orientierung (links) und des Chromophor-Abstandes (rechts);^[16] Nt steht für eines der kanonischen Nukleotide.

Zusätzlich ist das **TR**-Absorptionsmaximum von **DNA3** und **DNA4** blauverschoben im Vergleich zu **DNA1** und **DNA2**. Unterschiede sind auch in den Fluoreszenzspektren zu erkennen. Das R/G-Verhältnis von **DNA3** und **DNA4** ist signifikant höher (R/G bis 20 für **DNA3**) als das von **DNA1** und **DNA2** (R/G unter 6), wobei einerseits die **TO**-Fluoreszenz geringer und die **TR**-Fluoreszenz höher ist.

Vergrößert man den Abstand der Farbstoffe zueinander um 1-5 Basenpaare (**DNA5₁₋₅**) bleibt die **TR**-Fluoreszenz annähernd konstant. Die **TO**-Fluoreszenz fällt zunächst ($n = 1$) und steigt danach wieder an ($n = 2-5$).

Wagenknecht et al. führten beide Effekte auf Grundzustandswechselwirkungen zwischen den Chromophoren zurück.^[16, 18] Bei bestimmten Orientierungen und kurzen Abständen zwischen den Farbstoffen liegen diese nicht isoliert, sondern als Grundzustandsdimer vor. Damit lassen sie sich nicht mehr getrennt voneinander anregen und ein möglicher Energietransfer wird unterbunden. Trotz dieser Erklärung bleibt der genaue Zusammenhang zwischen DNA-Struktur/-Stabilität und den verschiedenen Wechselwirkungen zwischen **TO** und **TR**, die die Effizienz des Energietransfers beeinflussen, unklar.

Daher werden im Folgenden verschiedene **TO**- und **TR**-modifizierte DNA-Haarnadeln beschrieben. Mit ihnen sollte es möglich sein, einen systematischen Zusammenhang zwischen DNA-Struktur und den spektralen Eigenschaften der „DNA Traffic Lights“

herzustellen. Dabei wird zuerst auf deren Synthese, das Design und die optischen Eigenschaften eingegangen.

4.2 DNA-Synthese und Haarnadeldesign

Die zur DNA-Synthese nötigen Phosphoramiditbausteine von **TO** und **TR** konnten nach Literaturvorschrift in einer 5- (**TO**) bzw. 6-stufigen (**TR**) Synthese hergestellt werden.^[18] Diese wurden als 0.084 M Lösungen in DCM in der automatischen DNA-Festphasensynthese eingesetzt. Dabei wurden Kupplungszeit und Menge an Phosphoramidit im Vergleich zu dem Standardprotokoll der natürlichen Basen erhöht, um einen möglichst effizienten Einbau zu erreichen (s. Kapitel II.7.1, Tabelle 1). Die Phosphoramidit-Bausteine des verwendeten THF Analogons (*abasic site*, **ABS**) und des Polyethylenglycol-Linkers (**PEG**) sind kommerziell erhältlich und deren Einbau in DNA erfolgte nach dem Standardprotokoll der natürlichen Basen. Dadurch konnten die verschiedenen modifizierten DNA-Haarnadeln (**DNA6 – DNA9** und **DNA11- DNA15**) synthetisiert werden (s. Abbildung 12).^[90] Die unmodifizierte **DNA10** ist kommerziell erhältlich.

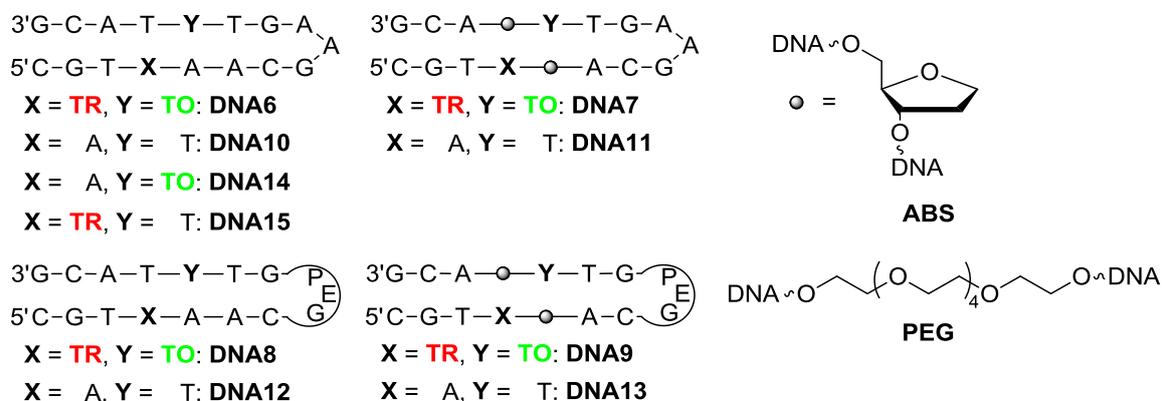


Abbildung 12: Sequenzen der farbstoffmodifizierten Haarnadeln (**DNA6 - DNA9, DNA14** und **DNA15**) und deren Referenzstränge (**DNA10 - DNA13**) (links); Strukturen des THF Analogon (*abasic site*, **ABS**) und des verwendeten Polyethylenglycol-Linkers (**PEG**) (rechts).

Die mit den Farbstoffen doppelt modifizierten Oligonukleotide wurden dabei *DMTr-on* synthetisiert; das bedeutet, dass die terminale DMTr-Schutzgruppe an der 5'-Hydroxylgruppe belassen wurde. Dies hat den Vorteil, dass bei der Reinigung durch *Reversed-Phase*-HPLC die Verweildauer des zu trennenden Strangs auf der Säule größer ist. Zusätzlich wurde die Chromatographie-Säule während der Trennung konstant auf 40 °C geheizt (s. Kapitel II.7.1, Tabelle 2). Auf Grund der geringen Ausbeute bei der Synthese der bis zu 5fach modifizierten Haarnadeln und deren Selbstkomplementärität ist dieses Vorgehen zur optimalen Reinigung

notwendig. Die terminale DMTr-Schutzgruppe konnte nach der Trennung durch Inkubation mit 80%iger Essigsäure abgespalten werden.

Die Ergebnisse von *Wagenknecht et al.* zeigen, dass die Orientierung der Farbstoffe in DNA einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz des Energietransfer hat (s. Kapitel II.0). Daher wurden **DNA6** und **DNA8** in Anlehnung an das Strukturmotiv von **DNA3**, welches das größte R/G-Verhältnis aufwies, synthetisiert. Die Farbstoffe **TO** und **TR** befinden sich in einer in 3'-5'-Richtung diagonalen Anordnung, wobei A als Gegenbase zu **TO** und T als Gegenbase zu **TR** dient und jeweils neben den Farbstoffen ein AT- und ein GC-Basenpaar sitzt. In **DNA7** und **DNA9** wurden die Gegenbasen zu **TO** und **TR** durch **ABSs** ersetzt. Diese erhöhen die lokale, strukturelle Flexibilität im Modifikationsbereich und sollten so eine intensive Wechselwirkung zwischen den Chromophoren erlauben.

Um die relativ kurze Stammregion der Haarnadeln mit 7 Basenpaaren, von denen zwei nicht komplementär zueinander sind, zu stabilisieren, besteht die Schlaufenregion von **DNA6** und **DNA7** aus einem GAA-Motiv. Dieses ist in der Lage, ausgesprochen stabile Haarnadel-Konformationen zu bilden.^[91-92] Um die Haarnadelstabilitäten zusätzlich zu variieren, ohne die Stammregion zu verändern, wurde bei **DNA8** und **DNA9** das GAA-Motiv durch einen **PEG-Linker** ersetzt. Dieser ist als nicht-nukleotidische Alternative zur Bildung von stabilen Haarnadeln bekannt.^[93-94]

Um den direkten Einfluss der Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen auf die Stabilität der Duplexe zu untersuchen, wurden Referenzduplexe (**DNA10**, **DNA11**, **DNA12** und **DNA13**) synthetisiert, in denen die jeweiligen Farbstoffmodifikationen fehlen. Als Referenz für die optischen Eigenschaften dienen die jeweils einfach modifizierten Duplexe **DNA14** und **DNA15**.

4.3 Stabilitäten und optische Eigenschaften der Haarnadeln

Die Absorptionsspektren aller DNA-Haarnadeln zeigen die für DNA typische Absorption bei 210 nm und 260 nm (s. Abbildung 13 und Kapitel II.7.3, Abbildung 30).^[90] Die farbstoffmodifizierten Stränge zeigen zusätzlich die Absorption von **TO** bei ca. 506 nm und von **TR** bei ca. 635 nm. Obwohl alle Messungen bei der gleichen Konzentration durchgeführt wurden, variiert der Extinktionskoeffizient der Farbstoffe sehr stark, wobei der Effekt für **TR** ($6.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - $28.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) stärker als der für **TO** ist ($25.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - $30.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, s. Kapitel II.7.3, Tabelle 5).

Spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von TO und TR in DNA

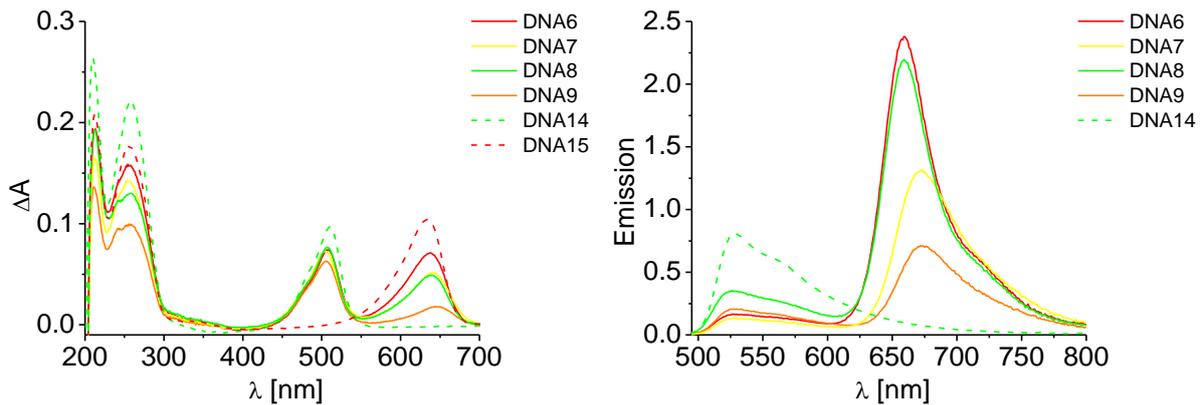


Abbildung 13: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der verwendeten DNA-Haarnadeln.

Zusätzlich ist der Wert der doppelt modifizierten Haarnadeln (**DNA6 - DNA9**) jeweils niedriger als für die einfach modifizierten Referenzduplexe (**DNA14** und **DNA15**). Auch die Lage der jeweiligen Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{abs, max}}$) unterscheidet sich. $\lambda_{\text{abs, max}}(\text{TO})$ variiert zwischen 504 nm und 510 nm und $\lambda_{\text{abs, max}}(\text{TR})$ zwischen 634 nm und 646 nm.

Die Fluoreszenzspektren der mit beiden Farbstoffen modifizierten Haarnadeln zeigen neben der Fluoreszenz von **TO** (ca. 527 nm) auch die klar getrennte Fluoreszenz von **TR** (ca. 660 nm), obwohl bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm **TR** nicht absorbiert. Dies ist eindeutig auf einen Energietransfer von **TO** auf **TR** zurückzuführen. Die Haarnadeln, bei denen jeweils **ABSs** gegenüber den Farbstoffen liegen (**DNA7** und **DNA9**), zeigen für die **TR**-Fluoreszenz niedrigere Intensitäten und sind zusätzlich signifikant rotverschoben (672 nm und 673 nm) im Vergleich zu **DNA6** und **DNA8** (659 nm). Bei direkter Anregung von **TR** (620 nm) sind dieselben Tendenzen zu beobachten (s. Kapitel II.7.3, Abbildung 30). Damit reichen die R/G-Verhältnisse von 3.4 für **DNA9** bis 14.4 für **DNA6**. Diese Unterschiede können sogar mit bloßem Auge wahrgenommen werden (s. Abbildung 14).

Zusätzlich liegen die Schmelztemperaturen für **DNA6 - DNA9** höher als für die jeweiligen Referenzduplexe (s. Kapitel II.7.3, Tabelle 5).

Die optischen Daten und Variationen in den Stabilitäten lassen vermuten, dass **TO** und **TR** im energetischen Grundzustand nicht vollständig isoliert voneinander vorliegen. Wird ein Grundzustandsdimer angeregt, koppeln die jeweiligen Übergangsdipolmomente der Farbstoffe miteinander und die Anregungsenergie wird über beide Farbstoffe delokalisiert. Damit lassen sie sich nicht mehr getrennt voneinander anregen. Da aber für einen Energietransfer ein angeregter Donor und

ein sich im Grundzustand befindender Akzeptor nötig ist, könnten so die Unterschiede in den Energietransfer-Effizienzen erklärt werden.

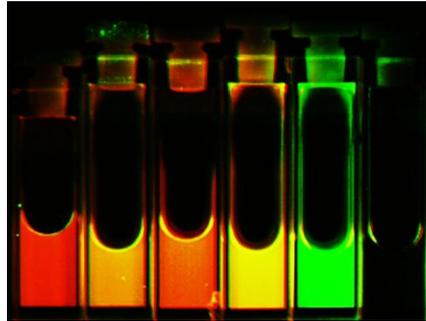


Abbildung 14: Aufnahmen der Küvetten von DNA6 - DNA9, DNA14 und DNA15 (von links nach rechts) mit einem Fluoreszenzbildgeber bei Anregung von **TO**.

4.4 Energietransfer vs. excitonische Wechselwirkungen

Derartige Grundzustandsdimere werden Exciton genannt und wurden bereits für zwei **TO**-Farbstoffe und andere Cyaninfarbstoffe beschrieben. Wenn sich zwei Chromophore parallel zueinander anordnen (H-Aggregate) kommt es durch die Kopplung der Übergangsdipolmomente zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität.^[95-99] *Kasha et al.* erklärten das für parallel angeordnete Übergangsdipolmomente mit einer Aufspaltung des angeregten Zustands des Dimers in zwei verschiedene excitonische Energiezustände (attraktive und repulsive Wechselwirkung zwischen den Übergangsdipolmomenten).^[100-101] Der Übergang zu dem höheren excitonischen Zustand ist für H-Aggregate erlaubt (hypsochrome Verschiebung im Absorptionsspektrum). Dieser relaxiert strahlungslos in den unteren excitonischen Zustand. Auf Grund der antiparallelen Anordnung heben sich hier die Übergangsdipolmomente im Extremfall gegenseitig auf und so kommt es zu keiner Fluoreszenz. Für J-Aggregate (lineare Anordnung der Übergangsdipolmomente) ist im Gegensatz dazu die Emission aus dem unteren excitonischen Zustand erlaubt. Dies resultiert für **TO-TO**-Dimere in einer bathochrom verschobenen, orangefarbenen Fluoreszenz bei 580 nm.^[50]

Die oben beschriebenen **TO**- und **TR**-modifizierten Haarnadeln weisen alle im Vergleich zu den einfach modifizierten Haarnadeln **DNA14** und **DNA15** verschobene $\lambda_{\text{abs, max}}$, $\lambda_{\text{fluor, max}}$ und entsprechend signifikant variierende ϵ_{max} und R/G-Verhältnisse auf.^[90] Dies ist ein starker Hinweis auf excitonische Wechselwirkungen. Um das zu belegen, wurden Anregungsspektren für die Emissionswellenlängen 527 nm (**TO**)

Spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von TO und TR in DNA

560 nm und 660 nm (TR) aufgenommen (s. Abbildung 15 und Kapitel II.7.3, Abbildung 31).

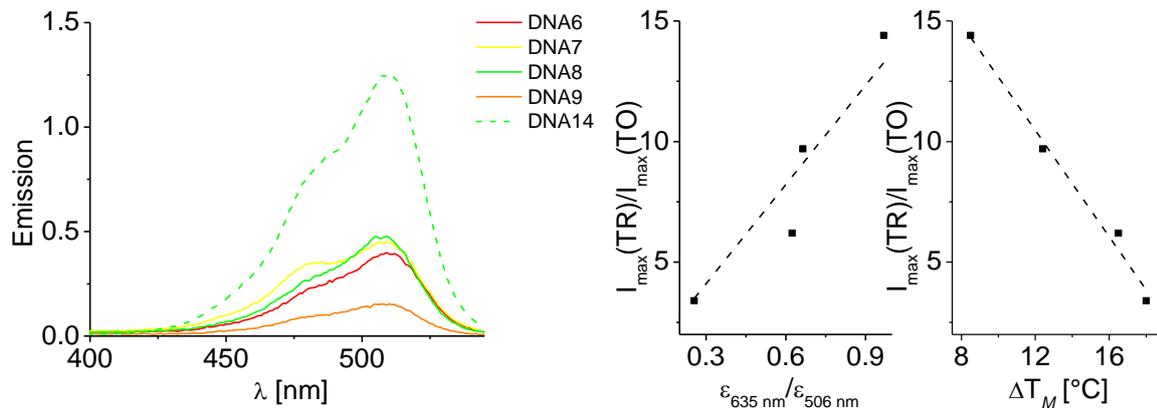


Abbildung 15: Anregungsspektren bei einer Emissionswellenlänge von 560 nm der Haarnadeln DNA6 - DNA9 und DNA14 (links) und Abhängigkeit des R/G-Verhältnisses von $\epsilon_{635 \text{ nm}}/\epsilon_{506 \text{ nm}}$ und von ΔT_M (rechts).

Vor allem die Spektren, die für eine Emissionswellenlänge von 560 nm aufgenommen wurden, zeigen für **DNA7** und **DNA9** ein signifikant höheres Absorptionsverhältnis $\Delta A_{485 \text{ nm}}/\Delta A_{509 \text{ nm}}$ (0.78 und 0.68) als **DNA6** und **DNA8** (0.61). Das zeigt eindeutig, dass die strukturelle Flexibilität, die durch die **ABSs** gegeben ist, excitonische Wechselwirkungen zwischen **TO** und **TR** ermöglicht. Dabei kommt es hauptsächlich zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität, aber auch nach Strukturänderung zu einer leicht rotverschobenen Fluoreszenz bei 560 nm.

Trifft diese Annahme zu, sollte sich das R/G-Verhältnis mit steigendem Extinktionskoeffizienten von **TO** und **TR** ebenfalls verbessern. Trägt man $I_{\max}(\text{TR})/I_{\max}(\text{TO})$ gegen $\epsilon_{635 \text{ nm}}/\epsilon_{506 \text{ nm}}$ auf, erhält man einen fast linearen Zusammenhang (s. Abbildung 15, rechts). Neben den optischen Daten sollten sich die excitonischen Wechselwirkungen auch in den Stabilitäten der Haarnadeln widerspiegeln. ΔT_M verhält sich ebenfalls direkt proportional zu dem R/G-Verhältnis, wobei die Tendenzen in beiden Fällen gleich sind. Zusätzlich wurden auch die Quantenausbeuten der Haarnadeln bei Anregung von **TO** (490 nm) und **TR** (620 nm) bestimmt (s. Kapitel II.7.3, Tabelle 6). Für die einfach modifizierten Stränge erhält man $\phi_{\text{TO}} = 14.3\%$ (**DNA14**) und $\phi_{\text{TR}} = 21.9\%$ (**DNA15**). Diese Werte stimmen gut mit der Literatur für jeweils einfach modifizierte Doppelstränge überein ($\phi_{\text{TO}} = 16.8\%$, $\phi_{\text{TR}} = 26.2\%$).^[18] Bei den doppelt mit Farbstoff modifizierten Haarnadeln **DNA6** – **DNA9** liegt ϕ_{TO} zwischen 0.1% und 5.5% und ist damit wesentlich niedriger als für die Referenzduplexe. Die ist vor allem auf den Energietransfer auf **TR** (**DNA6** und **DNA8**) bzw. die excitonischen Wechselwirkungen mit **TR** (**DNA9** und **DNA7**)

zurückzuführen. Auch die FRET-Effizienzen ($\phi_{\text{TR}, 490 \text{ nm}}/\phi_{\text{TR}, 620 \text{ nm}}$) sinken wie bei den oben beschriebenen R/G-Verhältnissen mit steigender Schmelztemperatur der Haarnadeln.

Damit ergibt sich insgesamt ein einheitlicher Zusammenhang zwischen Struktur und Stabilität der Haarnadeln und der Effizienz des Energietransfers. Die DNA-Haarnadeln mit **ABSs (DNA7 und DNA9)** zeigen auf Grund der Ausbildung stärkerer excitonischer Wechselwirkungen eine höhere Stabilität der Duplexe und damit eine niedrigere Effizienz des Energietransfers. Die DNA-Basen gegenüber den Farbstoffen in **DNA6** und **DNA8** verhindern diese Grundzustandswechselwirkung, wobei die umgebende DNA-Struktur die Chromophore in räumlicher Nähe hält, so dass ein effizienter Energietransfer stattfinden kann.

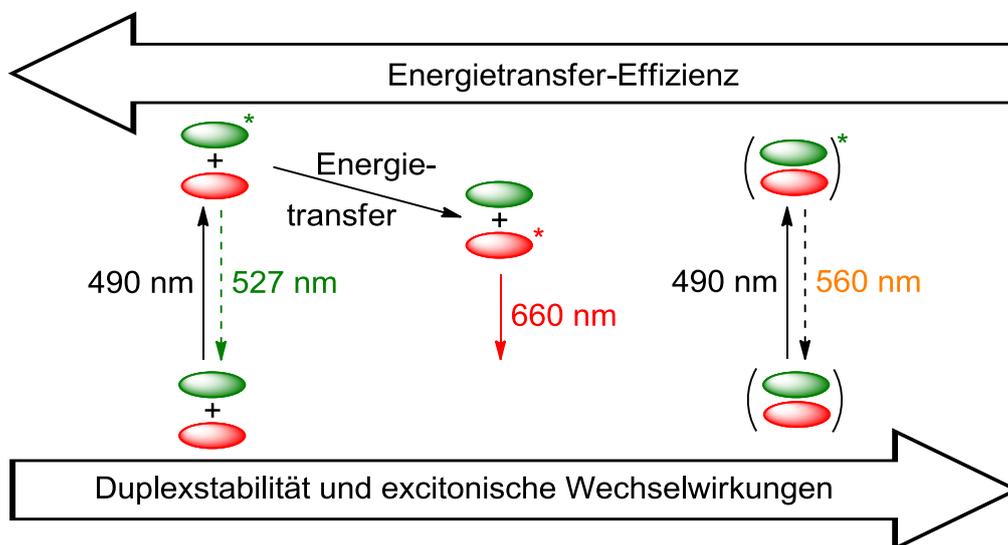


Abbildung 16: Energietransfer vs. excitonische Wechselwirkungen.

Durch die Flexibilität des **PEG-Linkers** in **DNA9** und **DNA8** kann die Haarnadel eine Konformation einnehmen, in der **TO** und **TR** stärkere excitonische Wechselwirkungen eingehen. Dies resultiert in einer höheren Stabilisierung und niedrigeren R/G-Verhältnissen. Das **GAA-Motiv** in **DNA6** und **DNA7** führt zu sehr stabilen Haarnadeln. Die Stabilisierung im Vergleich zu den Referenzduplexen ist allerdings auf Grund von geringeren excitonischen Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen kleiner und führt somit zu höheren Energietransfer-Effizienzen. Daher zeigt **DNA6** (A/T und GAA-Motiv) den besten und **DNA9** (**ABSs** und **PEG-Schleife**) den geringsten Farbkontrast.

4.5 NMR-Messungen zur Bestimmung der Struktur von **TO** und **TR** in DNA

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen ganz klar die Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers von der Stabilität und der direkten DNA-Umgebung. Rein optische Methoden sind allerdings nicht ausreichend, um ein vollständiges Bild von der Struktur **TO**- und **TR**-modifizierter DNA zu erhalten. Dabei ist vor allem die exakte Lage der Chromophore im Duplex, relativ zueinander und zu den umgebenden Basen, von Interesse.

NMR-spektroskopische Methoden sind zu dieser Aufklärung besonders gut geeignet, da Strukturen und Dynamik in Lösung bestimmt werden können.^[102-104] Es werden zum einen dynamische Prozesse im DNA-Doppelstrang berücksichtigt und zum anderen können die Messbedingungen (pH, Salzkonzentration, Temperatur) so gewählt werden, dass ein direkter Vergleich mit den optischen Daten möglich ist.

Unter den in Kapitel II.4 verwendeten Haarnadeln zeigt **DNA6** das beste R/G-Verhältnis, hohe thermische Stabilität und ein zu bisherigen Arbeiten vergleichbare Sequenz im Modifikationsbereich. Daher wäre diese Haarnadel für eine Strukturaufklärung durch NMR von großem Interesse. Um ein gutes Signal-Rauschverhältnis zu erhalten (vor allem für 2D-Messungen) werden dafür relativ hohe Probenmengen benötigt (bis 600 nmol). Da durch den doppelten Einbau von **TO** und **TR** in die DNA-Haarnadel und die aus der Selbstkomplementarität resultierende, schwierige Reinigung nur geringe Ausbeuten erzielt werden können, musste das Strangdesign verändert werden (s. Abbildung 17).

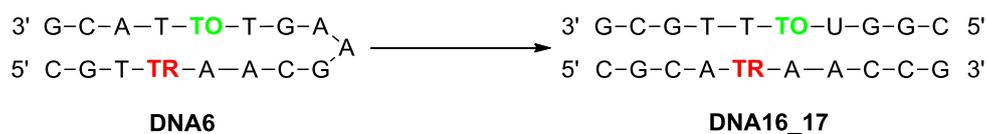


Abbildung 17: Änderung des Strangdesigns von **DNA6** hin zu **DNA16_17** zur Strukturaufklärung durch NMR-Messungen.

Um das Problem des Doppeleinbaus zu umgehen, wurde die GAA-Schleife entfernt. Der nun entstandene Doppelstrang besteht aus nur 7 Basenpaaren und ist somit für eine stabile Duplexbildung zu kurz. Daher wurden an den Enden insgesamt 3 GC-Basenpaare hinzugefügt.

Für die Auswertung der relativ komplexen NMR-Spektren ist es entscheidend, die Signale der Einzelstränge voneinander unterscheiden zu können. Daher wurde das AT-Basenpaar neben **TR** umgedreht, sodass **DNA16** kein A und **DNA17** kein T enthält. Anhand der jeweiligen Signale und deren Fernkopplungen mit den

benachbarten Basen sollte nun eine eindeutige Differenzierung zwischen den Einzelsträngen möglich sein. Um das auch für die Basen untereinander in den jeweiligen Einzelsträngen zu erreichen, wurde ein T in **DNA16** durch U ersetzt.

Insgesamt ist der Purin- bzw. Pyrimidinbasenanteil in **DNA16** und **DNA17** ausgeglichen, sodass der Doppelstrang eine symmetrische B-DNA-Helix ausbilden kann.

Der Einbau der beiden Farbstoffe in DNA wurde wie in Kapitel II.4.2 beschrieben durchgeführt. Der artifizielle DNA-Baustein U ist kommerziell erhältlich und wurde nach dem Standardprotokoll der natürlichen Basen eingebaut. So konnten **DNA16** und **DNA17** in für NMR-Messungen nötigen Mengen synthetisiert werden.

Zur vollständigen Charakterisierung des Doppelstrangs sind auch Phosphor-NMR-Messungen zur Bestimmung der Konformation des Phosphatrückgrats nötig. Es kann hierfür nicht der Standard-Phosphatpuffer (10 mM, pH = 7) als Lösemittel dienen, da dieser die Signale des Rückgrats überlagern würde. Als Ersatz dafür wurde Dimethylarsenat (Kakodylat, 1 mM, pH = 7) verwendet.

Um die Effektivität der Radiowelleneinstrahlung nicht zu verringern und somit die Signalschärfe zu erhöhen, muss zusätzlich der NaCl-Gehalt in der Probe im Vergleich zu den Standardbedingungen (250 mM) erniedrigt werden. Da aber die Duplexstabilität stark von der NaCl-Konzentration ($c(\text{NaCl})$) abhängig ist, wurde zuerst überprüft, bis zu welcher $c(\text{NaCl})$ -Untergrenze noch ein stabiler Duplex ausgebildet werden kann. Wie im vorherigen Kapitel erläutert, hängt die Duplexstabilität direkt mit der ET-Effizienz und damit von dem R/G-Verhältnis aus der **TO**- und der **TR**-Fluoreszenz zusammen. Daher kann die optimale NaCl-Konzentration durch einfache Fluoreszenzmessungen bestimmt werden.

Dazu wurde eine Lösung aus jeweils 2.5 μM **DNA16** und **DNA17** schrittweise mit einer NaCl-Lösung titriert (s. Kapitel II.7.4) und die gemessenen R/G-Verhältnisse gegen die jeweilige $c(\text{NaCl})$ aufgetragen (s. Abbildung 18, links, grün). Zu Beginn der Titration liegen die beiden DNA-Stränge vollständig dehybridisiert vor ($R/G = 0.5$). Die schwache **TR**-Fluoreszenz resultiert aus der geringen Extinktion von **TR** bei der Anregungswellenlänge. Mit Erhöhung von $c(\text{NaCl})$ steigt das R/G-Verhältnis an und erreicht ab ca. $c(\text{NaCl}) = 50 \text{ mM}$ einen nahezu konstanten Wert ($R/G = 13$). Die jeweiligen Absorptionsspektren zeigen ebenfalls die für steigende excitonische Wechselwirkungen zwischen **TO** und **TR** typische Variation von ϵ_{max} und λ_{max} (s. Kapitel II.7.4, Abbildung 32 und Abbildung 33). Damit werden bereits ab einer

Konzentration von 50 mM an NaCl stabile Duplexe bei einer 2.5 μM DNA-Lösung gebildet.

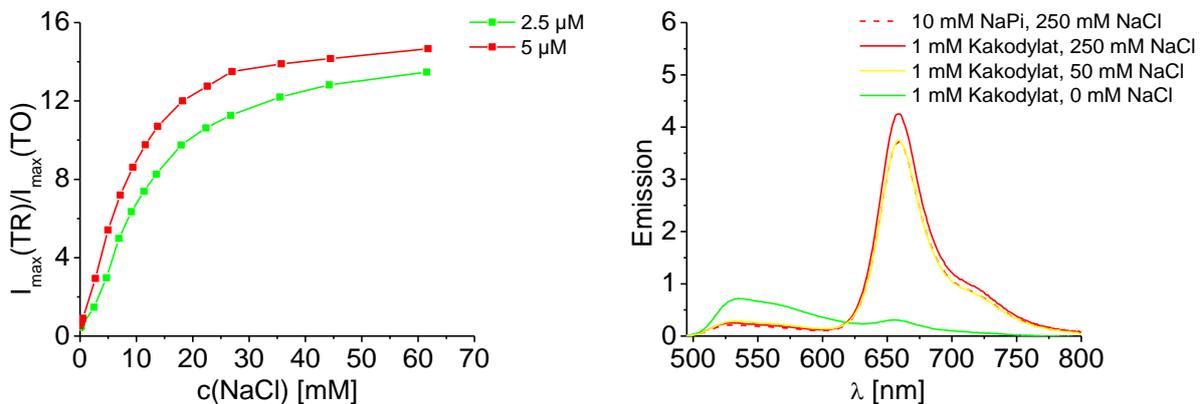


Abbildung 18: Änderung des R/G-Verhältnisses während der Titration von 2.5 μM und 5 μM DNA_{16_17} in 1 mM Kakodylatpuffer (links); Fluoreszenzspektren von DNA_{16_17} unter Standardbedingungen und mit Kakodylatpuffer bei variierenden NaCl-Konzentrationen (rechts).

Da für die NMR-Messungen eine ca. 500mal höhere DNA-Konzentration benötigt wird, musste noch überprüft werden, ob die Duplexstabilität von der Na^+ - bzw. Cl^- -Ionenstärke oder von dem Verhältnis von NaCl zu DNA abhängt. Im zweiten Fall müsste $c(\text{NaCl})$ angepasst werden. Dazu wurde eine 5 μM Lösung von **DNA16** und **DNA17** wie oben mit NaCl titriert. Die rote Kurve links in Abbildung 18 zeigt, dass die Änderung des R/G-Verhältnisses ebenfalls ab $c(\text{NaCl}) = 50 \text{ mM}$ nahezu konstant bleibt. Damit kann mit einer NaCl-Konzentration von 50 mM eine stabile Duplexbildung unabhängig von der Konzentration der DNA sichergestellt werden.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden zusätzlich Fluoreszenzspektren (s. Abbildung 18, rechts) bei direkter Hybridisierung von **DNA16_17** unter Standardbedingungen (10 mM NaPi, 250 mM NaCl, R/G = 16.8) und mit 1 mM Kakodylatpuffer bei variierenden $c(\text{NaCl})$ (0 mM, R/G = 0.5; 50 mM, R/G = 16.7 und 250 mM, R/G = 17.2) aufgenommen. Wie bereits oben gezeigt, liegen die Einzelstränge ohne NaCl vollständig dehybridisiert vor. Für alle anderen Bedingungen ergibt sich ein R/G-Verhältnis von ca. 17. Somit werden bei Verwendung des Kakodylatpuffers und auch für $c(\text{NaCl}) > 50 \text{ mM}$ stabile Doppelstränge gebildet. Die Schmelztemperaturen, die unter denselben Bedingungen bestimmt wurden, zeigen dieselben Tendenzen (s. Kapitel II.7.4, Tabelle 7). Daher wurden für die NMR-Messungen **DNA16** und **DNA17** als 1.25 mM Lösung in 1 mM Kakodylatpuffer (pH = 7) und 50 mM NaCl zum Doppelstrang **DNA16_17** hybridisiert.

Spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von TO und TR in DNA

Bei ersten Messungen wurde eine starke Verbreiterung der ^1H -NMR-Signale festgestellt. Das ist wahrscheinlich auf eine Aggregation der Doppelstränge über die Farbstoffe zurückzuführen. Eine Verbesserung der Signalqualität durch Erhöhung der Temperatur während der Messung (40 °C, 60 °C und 90°C) und niedrigere Konzentrationen an DNA (1.25 mM, 0.60 mM, 0.03 mM und 60 μM) konnte nicht beobachtet werden. Auch eine schrittweise Zugabe von THF, um eventuelle Farbstoffaggregationen zu unterbinden, lieferte keine besseren Ergebnisse. Daher kann an dieser Stelle nicht näher auf die Struktur von TO- und TR-modifizierter DNA eingegangen werden.

5 Visualisierung von Strangaustauschprozessen

Die Kapitel II.3 und II.4 zeigen an mehreren Beispielen, dass das Konzept der „DNA und RNA *Traffic Lights*“ ein wichtiges Werkzeug für die molekulare Bildgebung in Aptasensoren, *Molecular Beacons* und zur Verfolgung von siRNA in Zellen darstellt. Dabei fungiert die helikale Struktur der DNA als ein geeignetes Gerüst für einen Energietransfer zwischen **TO** und **TR**, wobei die Orientierung der Farbstoffe und die Struktur der direkten Umgebung eine wesentliche Rolle für die Effizienz dieses Energietransfers darstellt.

Der folgende Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit einer nicht-biologischen Anwendung der „*Traffic Lights*“. Der hybridisierungssensitive Farbwechsel von grün nach rot, und umgekehrt, kann auch zur Visualisierung von DNA-Strangaustauschprozessen genutzt werden. Dabei werden zwei DNA-Stränge, die teilweise oder ganz komplementär zueinander sind, miteinander hybridisiert, wobei einer oder mehrere der bereits hybridisierten Stränge verdrängt werden. Durch kovalente Modifikation der beteiligten DNA-Fragmente mit **TO** und **TR**, können, über die Verfolgung des R/G-Verhältnisses, Effizienz, Kinetik und Vollständigkeit des Strangaustauschs bestimmt werden. Dazu werden im Folgenden zunächst die Grundlagen, ausgewählte Beispiele und Anwendungen für Strangaustauschprozesse beschrieben.

5.1 *Toehold*-basierter Mechanismus

Die Kosten zur Herstellung und Reinigung von Oligonukleotiden sind in den letzten Jahrzehnten rasant gesunken,^[105] wodurch der Gebrauch von DNA als Material immer rentabler wird. Des Weiteren können durch thermodynamische Berechnungen quantitative und strukturelle Vorhersagen über die Wechselwirkungen verschiedener DNA-Fragmente getroffen werden.^[106] Diese beiden Entwicklungen führen dazu, dass DNA immer mehr für nicht-biologische Anwendungen im Bereich der Nanotechnologie verwendet wird. Die hohe Spezifität der Watson-Crick Basenpaarung und damit die Möglichkeit durch geschickte Wahl der Basensequenzen von Einzelsträngen den Aufbau von 2D- und 3D-Strukturen kontrollieren zu können, macht DNA zu einem vielfältigen Konstruktionsmaterial.^[107-110] Neben diesen strukturellen Ansätzen spielen auch dynamische, autonome DNA Nanomaschinen eine zentrale Rolle in der aktuellen Forschung. Hierbei steht weniger die Zusammensetzung des Gleichgewichts, sondern mehr die dynamischen Prozesse hin zu diesem Endzustand im Mittelpunkt. Solche dynamischen Nanomaschinen können Ribozyme oder Desoxyribozyme^[111-112] darstellen, doch auf Grund der größeren Relevanz in dieser Arbeit wird sich im Folgenden auf nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Desoxyoligonukleotiden beschränkt.

Der zentrale Prozess eines Großteils der DNA-basierten dynamischen Nanomaschinen ist der Strangaustausch. Wie oben schon erwähnt wird hierbei ein, zu einem DNA-Templat teilweise komplementärer Einzelstrang durch einen zweiten verdrängt. In der Molekularbiologie werden Strangaustauschprozesse durch Enzyme, wie zum Beispiel Polymerasen ermöglicht.^[113] Der oben genannte Prozess wird allerdings nur durch biophysikalische Parameter gesteuert. Solche enzymfreien Austauschprozesse sind bereits seit den 1970ern bekannt,^[114] werden jedoch erst seit ca. einem Jahrzehnt in der DNA-Nanotechnologie angewandt.

Zur Erläuterung des Mechanismus des Strangaustauschs ist es sinnvoll, die komplexe DNA-Struktur zu abstrahieren (Abbildung 19). Im Folgenden werden DNA-Einzelstränge als gerade Linien dargestellt, wobei das 3'-Ende einer Sequenz mit einem Halbpfleil markiert ist. Die genaue Basenabfolge der Einzelstränge ist dabei zweitrangig, da man annehmen kann, dass Strangaustauschprozesse unabhängig von der Sequenz ablaufen. Um jedoch trotzdem die Komplementarität der einzelnen Abschnitte zu verdeutlichen, werden die Einzelstränge in Domänen aufgeteilt und

Visualisierung von Strangaustauschprozessen

nummeriert. Domänen mit gleicher Nummer sind jeweils komplementär zueinander und werden durch unterschiedliche Farbe voneinander abgegrenzt.

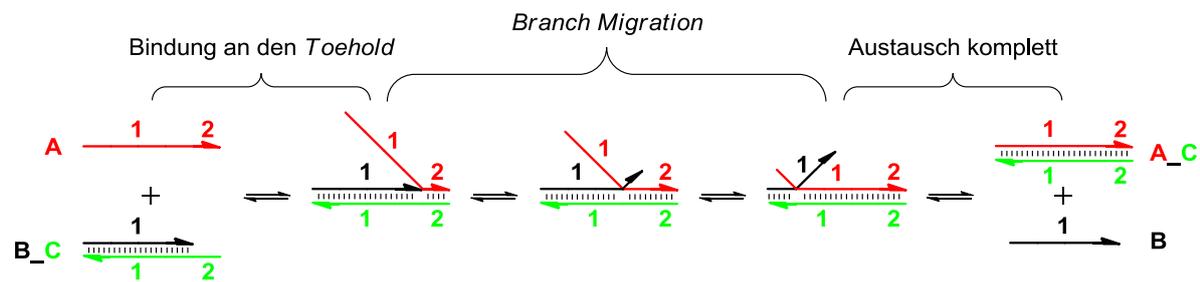


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines Strangaustauschprozesses mit Titrationstrang (A), Templatstrang (C) und Gegenstrang (B).

Abbildung 19 zeigt schematisch den Mechanismus eines Strangaustauschprozesses. Im ersten Schritt lagert sich ein Titrationstrang (A) an den Überhang (Domäne 2) eines aus Templatstrang (C) und Gegenstrang (B) bestehenden Doppelstrangs B_C an. Durch die Hybridisierung dieser freien Überhänge werden A und B_C so vororganisiert, dass ein Strangaustausch erleichtert und teilweise erst ermöglicht wird. Daher werden diese Überhänge auch *Toehold* (Ansatzpunkt) genannt. Durch eine Reihe von aufeinanderfolgenden, reversiblen Hybridisierungs- und Dissoziationsschritten einzelner Nukleotide (*Branch Migration*) wird daraufhin B nach und nach durch A verdrängt, wobei eine Domäne durch eine andere mit identischer Sequenz ausgetauscht wird.^[115] Nach Abschluss dieses Prozesses entsteht der neue Doppelstrang A_C und B wird freigesetzt.

Die Geschwindigkeit des Austauschs kann über die Länge und die Sequenz der beteiligten Stränge genau vorhergesagt werden.^[116] Dabei variieren die Ratenkonstanten zwischen $1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für *Toehold*-Längen von 0 bis 7. Auch die Sequenz des *Toeholds* spielt dabei eine Rolle. Strangaustauschprozesse mit G/C-reichen Überhängen laufen schneller ab, als solche mit *Toeholds*, die nur aus A/T-Basenpaaren bestehen. Der umgekehrte Fall (B reagiert mit dem Doppelstrang A_C und verdrängt A) läuft mit einer Geschwindigkeit, die um 6 Größenordnungen kleiner ist, ab. Damit ist die Rückreaktion praktisch nicht zu beobachten. Der Grund dafür ist, dass A_C keinen passenden *Toehold* zur Anlagerung von B besitzt und somit keine Vororganisation für die anschließende *Branch Migration* stattfindet. Dies zeigt, dass die Länge und die Sequenz des *Toeholds* einen entscheidenden Einfluss auf die Kinetiken von Strangaustauschprozessen besitzen und über diese der Verlauf der Reaktion gesteuert werden kann.

5.2 Anwendung in DNA-Nanomaschinen

Den Weg für den systematischen Gebrauch von *Toeholds* in einfachen und auch mehrfachen Strangaustauschprozessen ebneten *Yurke et al.*^[117]

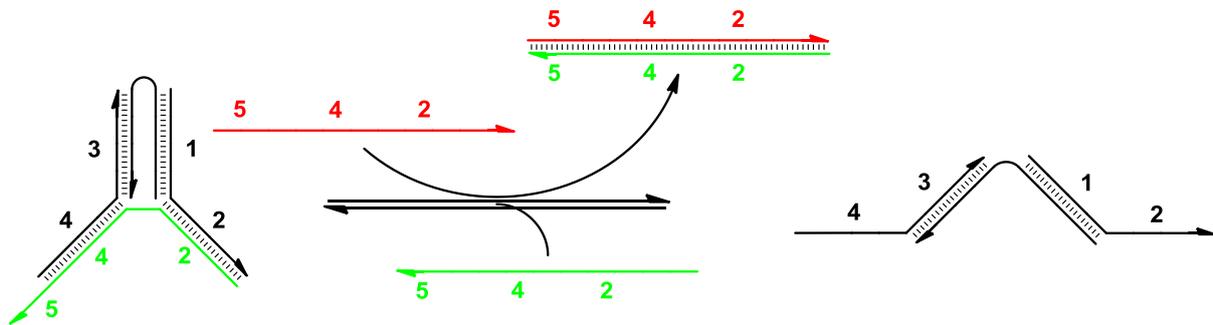


Abbildung 20: Ein DNA-Tweezer schaltet reversibel zwischen geschlossener Form (links) und offener Form (rechts) angetrieben durch die Initiatorstränge (rot und grün).

Sie zeigten, dass alleine durch Ausnutzen der sehr spezifischen DNA-Hybridisierung Strukturänderungen auf molekularer Ebene möglich sind.

Dieses Prinzip verdeutlichten sie an verschiedenen DNA-Tweezern (DNA-Pinzetten). Diese bestehen aus zwei DNA-Doppelsträngen, die über einen flexiblen DNA-Einzelstrang verbunden sind (Abbildung 20). Durch Zugabe bestimmter Einzelstränge, den sogenannten Initiatorsträngen (rot und grün in Abbildung 20), können diese Tweezer sehr schnell zwischen einer offenen und geschlossenen Form schalten.

Der *Toehold*-Mechanismus macht es möglich, gezielt einzelne Nanomaschinen anzusteuern, wohingegen für andere Beispiele,^[7-8, 118-119] bei denen durch Variation der Salzkonzentration der Temperatur oder des pH-Werts strukturelle Änderungen vorgenommen werden, dies nur sehr begrenzt möglich ist.

Basierend auf den Arbeiten von *Yurk* wurden in den darauffolgenden Jahren viele weitere komplexe Nanostrukturen entwickelt, die durch Strangaustauschprozesse geschaltet werden können. *Simmel* und *Yurk*^[120] erweiterten den oben beschriebenen original Tweezer und konnten daraufhin auch eine Anordnung entwickeln, die zwischen drei verschiedenen Zuständen schalten kann.^[121] An ineinandergreifende Zahnräder erinnern die Nanomaschinen von *Tian* und *Mao*, die ebenfalls mehrfach zwischen drei Zuständen schalten können.^[122] *Yan* und seine Mitarbeiter konstruierten eine rotierende DNA-Nanomaschine. Durch Zugabe zweier Einzelstränge konnte so die Verdrillung der DNA gesteuert werden. Dieses Element fügten sie zu einer langen linearen Ketten zusammen, sodass das Schalten zwischen den beiden Zuständen mit einem Atomkraftmikroskop sichtbar gemacht werden konnte.^[118, 123] Die Gruppe um *Feng* berichteten über ein zweidimensionales

Visualisierung von Strangaustauschprozessen

Oligonukleotidgitter, das durch Zugabe von Einzelstrang-DNA ausgeweitet oder kontrahiert werden konnte.^[124] *Anderson et al.* konstruierten eine schachtelförmige Struktur, deren „Deckel“ geöffnet und wieder geschlossen werden konnte,^[125] wobei diese potentiell in der Lage ist, kleine Moleküle zu transportieren und auch wieder freizugeben.

Diese rasante Entwicklung führte schließlich zu autonomen Nanomaschinen, wie zum Beispiel *DNA-Walkern* (DNA-Fußgänger). Inspiriert durch Motorproteine verbinden sie Strangaustauschprozesse mit rotierenden Elementen, um sich auf einem vorher festgelegten Pfad fortzubewegen. Drei Komponenten sind in jedem *Walkerdesign* enthalten. Der Motor ist für die Vorwärtsbewegung zuständig und wird durch die chemische Energie der Initiator-moleküle (grün in Abbildung 21) angetrieben.

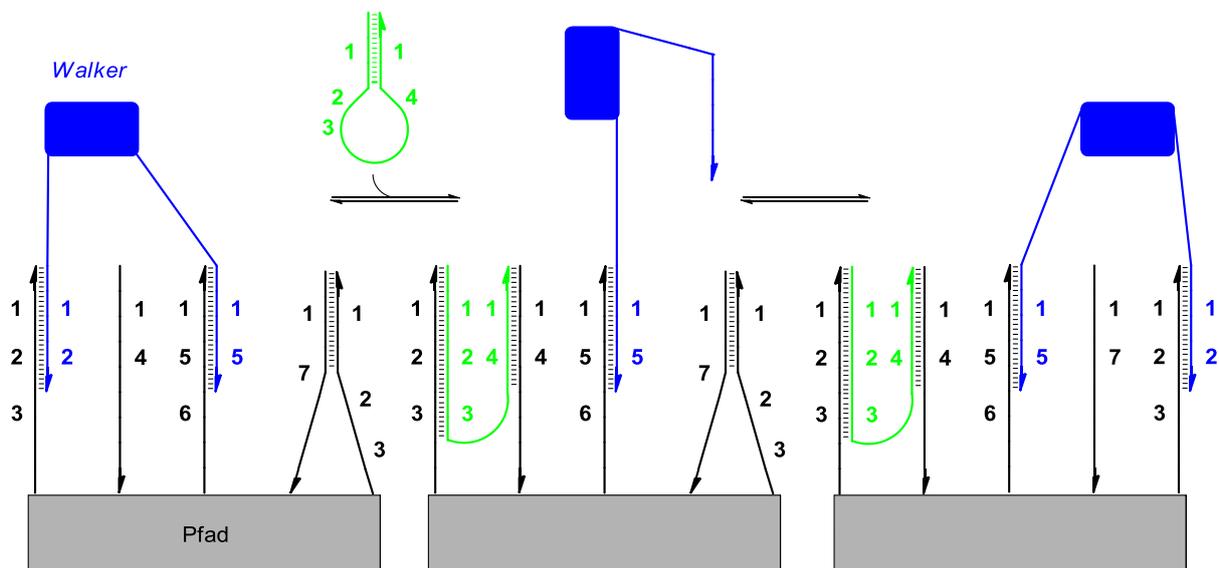


Abbildung 21: Schematische Darstellung eines Schrittes eines *DNA-Walkers* (blau). Der Initiatorstrang (grün) verdrängt das hintere Bein des *Walkers*. Das nun freie Bein reagiert mit dem Pfad (schwarz) wodurch eine gerichtete Vorwärtsbewegung entsteht.

Die dritte Komponente ist der Pfad (schwarz in Abbildung 21), entlang dessen die Bewegung stattfindet. Zunächst benötigte jeder Schritt eine extra Zugabe an Initiator-molekülen.^[126-127] Durch Weiterentwicklung des Systems^[128-129] und klarer Trennung von Motor, Initiator und Pfad^[130-131] kann nun eine autonome Bewegung mit 2-3 Schritten in Folge realisiert werden. Der limitierende Faktor der Reichweite eines *Walkers* ist die Herstellung eines langen, genau definierten, starren Pfades. Allerdings konnte die Möglichkeit, durch Selbstaggregation (DNA Origami) erheblich längere und komplexere Pfade herzustellen,^[132-133] dieses Problem lösen und erlaubte weitere Wege bei gleichzeitigem Gebrauch verschiedenster Motoren. Eine Anwendung dieser molekularen *Walker* könnte, ähnlich den Kinasen in Zellen, der

Transport von Wirkstoffen darstellen. *Gu et al.*^[132] berichteten über einen DNA-*Walker*, der entlang eines bestimmten Pfades einen Goldnanopartikel aufheben, eine Zeit lang transportieren und wieder ablegen kann.

Ein anderer Ansatz, in dem durch molekulare Maschinen Fracht transportiert wird, stammt von *Venkataraman*.^[134] Sie entwickelten einen Polymerisationsmotor, der im Stande ist, einzelne DNA-Doppelstränge, die mit zueinander passenden Überhängen versehen sind, über Strangaustauschreaktionen zu einem Polymer zusammenzufügen. Dabei können bis zu 20 Monomere der Reihe nach verbunden werden, so dass das wachsende Polymer Kraft gegen Objekte im Mikrometer-Maßstab ausübt. Die Geschwindigkeit des Wachstums liegt im Bereich von Nanometern pro Minute, was im Vergleich zu ähnlichen, auf Proteinen basierenden Mechanismen in Bakterienzellen (Mikrometer pro Minute) langsam, allerdings ein Schritt hin zu rein auf DNA-basierenden wachsenden Polymeren ist.

Neben den Anwendungen in steuerbaren und autonomen Nanomaschinen werden Strangaustauschprozesse außerdem in DNA-Schaltkreisen und Reaktionsnetzwerken, wie zum Beispiel in synthetischen, genregulierenden Signalisierungsnetzen,^[135-137] in Rechennetzwerken,^[138-139] und digitalen logischen Schaltkreisen^[140] verwendet.

5.3 Vereinen der Konzepte

Wie oben gezeigt, stellen einfache und mehrfache Strangaustauschprozesse zentrale Bestandteile autonomer Nanomaschinen dar. Durch die Entwicklung und das grundsätzliche Verständnis des *Toehold*-basierten Mechanismus konnten viele, teilweise auch sehr komplexe Nanomaschinen beschrieben werden. Vor allem die Kenntnis des Zusammenhanges zwischen Design, Sequenz und den Austauschkinetiken erlaubt es, die auf der Selbstaggregation von DNA basierenden Strukturen zu steuern.

Die Analyse der dynamischen Prozesse hin zum Endzustand und die Zusammensetzung dieses Gleichgewichts werden in den meisten Fällen durch gelelektrophoretische Trennung oder Fluoreszenzspektroskopie erreicht.^[117, 126-127, 132, 141-143] Auf Grund der hohen Sensitivität und der apparativ einfachen und schnellen Durchführung sind die fluoreszenzspektroskopischen Methoden dafür besonders geeignet. Der hybridisierungssensitive Anstieg bzw. Abfall der Fluoreszenzintensität wird dabei häufig durch Kombination mit einem Löscharbstoff

erreicht. Allerdings hat die Verwendung eines einzelnen Farbstoffs und damit die Detektion von nur einer bestimmten Wellenlänge mehrere Nachteile, die in Kapitel II.2.2 beschrieben wurden. Durch Einsatz von wellenlängenverschiebenden DNA-Sonden und damit einer simultanen Intensitätsänderung hin zu einer zweiten, deutlich separierten Fluoreszenzwellenlänge während des Strangaustauschs können diese Nachteile umgangen werden. Die „DNA Traffic Lights“ stellen dafür ein geeignetes FRET-Paar dar (Kapitel 3). **TO** und **TR** können über einen azyklischen Linker kovalent an DNA gebunden werden ohne die Duplexstabilität maßgeblich zu beeinflussen. Dadurch ist es potentiell möglich, diese hybridisierungssensitive DNA-Sonde mit klar getrennten Fluoreszenzsignalen zur Visualisierung von Strangaustauschprozessen zu verwenden. Dazu werden im Folgenden DNA-Synthese, Strangdesign und die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Untersuchung des Strangaustauschs beschrieben.

5.4 DNA-Synthese und Strangdesign

Der Einbau der beiden Farbstoffe in DNA wurde wie in Kapitel II.4.2 beschrieben durchgeführt.

Es konnten so **TO**-modifizierte **DNA18** und **TR**-modifizierte **DNA27** synthetisiert werden (s. Abbildung 22), wobei im Gegensatz zu oben die terminale DMTr-Schutzgruppe bereits während der DNA-Synthese abgespalten wurde (*DMTr-off-Synthese*).^[144] Die unmodifizierten DNA Stränge **DNA19 – DNA26** und **DNA28** sind kommerziell erhältlich.

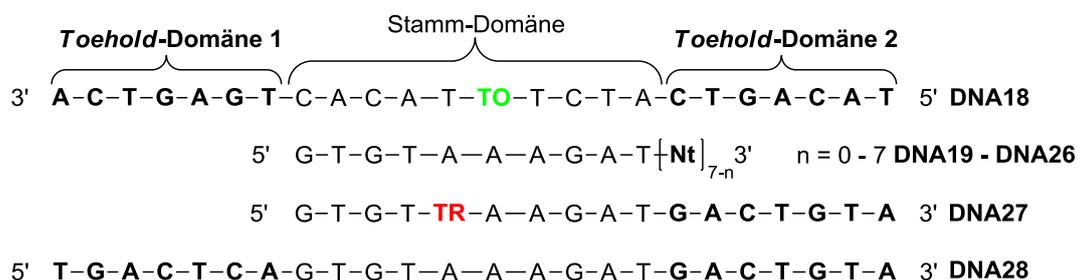


Abbildung 22: Sequenzen der für den Strangaustausch verwendeten DNA Stränge.

Nach Abspaltung von der festen Phase und Reinigung durch *Reversed-Phase*-HPLC (s. Kapitel II.7.1 und II.7.2) wurde **DNA18** jeweils mit den unmodifizierten Strängen **DNA19 – DNA26** hybridisiert. Die so gebildeten Doppelstränge **DNA18_19 – DNA18_26** weisen jeweils am 3'- und am 5'-Ende nicht hybridisierte Überhänge auf. Diese stellen die bereits in Kapitel II.5.1 ausführlich beschriebenen und für einen

Strangaustausch notwendigen *Toeholds* dar. *Toehold*-Domäne 1 hat eine Länge von 7 Basenpaaren, wohingegen die Länge der *Toehold*-Domäne 2, je nach Gegenstrang, zwischen 0 und 7 variiert. Die Sequenzen der *Toeholds* sind dabei so unterschiedlich gewählt, dass ein Strangaustausch jeweils nur an einer der Domänen stattfinden kann. In den Stamm-Domänen von **DNA18** und **DNA27** befinden sich die Farbstoffe **TO** und **TR** in einer in 3'-5'-Richtung diagonalen Anordnung, wobei A als Gegenbase zu **TO** und T als Gegenbase zu **TR** dient und sich jeweils neben den Farbstoffen ein AT- und ein GC-Basenpaar befindet. Wie in Kapitel II.4 beschrieben, führt diese Anordnung zu einem maximalen Energietransfer, falls eine starre, helikale DNA-Umgebung gegeben ist. Um dies sicherzustellen, wurde die Stammregion auf insgesamt 10 Basenpaare erweitert. **DNA27** beinhaltet neben **TR** ebenfalls die entsprechend komplementäre Sequenz zu *Toehold* 2. Dadurch ist es möglich, die jeweiligen unmodifizierten Gegenstränge zu verdrängen. Dabei wird **TR** in direkte räumliche Nähe zu **TO** gebracht und es kommt zum Farbwechsel. Der umgekehrte Prozess kann durch den Austausch von **DNA27** durch den unmodifizierten, zu **DNA18** komplett komplementären Strang **DNA28** erfolgen.

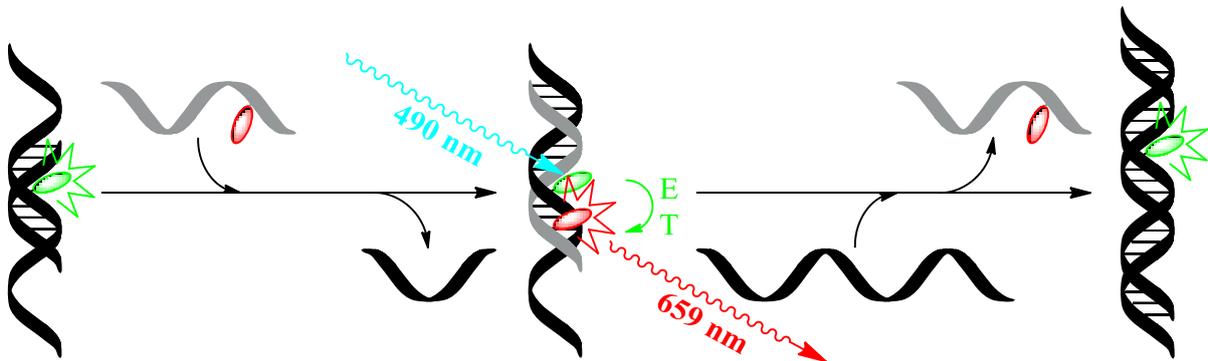


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Konzepts der Visualisierung von Strangaustauschprozessen durch die Verwendung von **TO** (grün) und **TR** (rot).

Durch dieses Design ist es nun möglich, verschiedene Strangaustauschexperimente durchzuführen. Dabei soll einmal durch Titration der jeweiligen **TO**-beinhaltenden Doppelstränge mit **DNA27** durch den Farbwechsel von Grün zu Rot der Einfluss der *Toehold*-Länge untersucht werden (*Toehold*-Domäne 2). Durch die sequentiell klar getrennte *Toehold*-Domäne 1 ist es weiterhin möglich, den umgekehrten Prozess (Farbwechsel von Rot zurück zu Grün) und ebenfalls zwei aufeinanderfolgende Austauschprozesse zu verwirklichen. Dazu wurde zunächst in verschiedenen kinetischen Experimenten untersucht, wie lange die Inkubationszeit während der Titration gewählt werden muss, um vollständigen Austausch zu erreichen.^[144]

5.5 Kinetische Messungen

Die Absorptionsspektren der verwendeten Doppelstränge und **DNA18** sind links in Abbildung 24 gezeigt.^[144] Für alle Stränge ist die typische DNA-Absorption bei 210 nm und 260 nm zu erkennen. Der Unterschied im Extinktionskoeffizienten ist auf die verschiedenen Längen der jeweiligen Duplexe und des Einzelstrangs zurückzuführen.

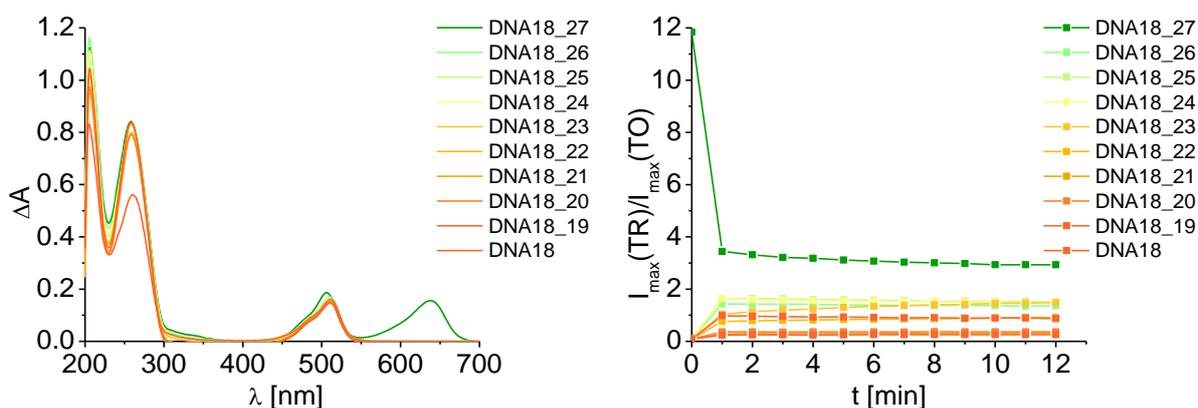


Abbildung 24: Absorptionsspektren von DNA18 und der Doppelstränge DNA18_19 – DNA18_27 (links); zeitlicher Verlauf der Änderung des R/G-Verhältnisses nach Zugabe von 0.5 eq DNA27 zu DNA18 und zu DNA18_19 – DNA18_26 und bei Zugabe von 0.5 eq DNA28 zu DNA18_27 (rechts).

Die **TO**-modifizierten Stränge **DNA18** und **DNA18_19 – DNA18_26** zeigen alle die **TO**-typische Absorption bei ca. 510 nm mit einer Schulter bei 480 nm. Der doppelt modifizierte Duplex **DNA18_27** zeigt zusätzlich die typische, breite, unstrukturierte **TR**-Absorption bei 640 nm. In diesem Spektrum ist des Weiteren die **TO**-Bande um 5 nm hypsochrom verschoben, was auf Grundzustandswechselwirkungen mit **TR** zurückzuführen ist (s. Kapitel II.4).

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung für die nachfolgenden Titrations wurden zu den oben besprochenen Doppelsträngen und dem Einzelstrang jeweils 0.5 eq **DNA27** (für **DNA18** und **DNA18_19 – DNA18_26**) und 0.5 eq **DNA28** (für **DNA18_27**) hinzugegeben und in 1 min Intervallen Fluoreszenzspektren aufgenommen.^[144] Diese sind im Einzelnen in Kapitel II.7.5 gezeigt. Trägt man das R/G-Verhältnis gegen die Inkubationszeit, auf ist zu erkennen, dass bereits nach 1 min bei allen Kombinationen keine signifikanten Änderungen mehr stattfinden (s. Abbildung 24, rechts). Das bedeutet, dass die Gleichgewichtseinstellung beendet ist und sehr schnell erfolgt. Dies ist, wie oben bereits erläutert, typisch für *Toehold*-basierte Strangaustauschprozesse. Außerdem ist der Unterschied in den Sättigungswerten der jeweiligen R/G-Verhältnisse bereits ein erster Hinweis auf die unterschiedliche Zusammensetzung des stationären

Zustands bei unterschiedlichen *Toehold*-Längen und bestätigt somit das Konzept des Strangdesigns.

Trotz der hohen Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung wurde bei folgenden Titrationsen eine Inkubationszeit von 10 min nach jeder Zugabe eingehalten, um zusätzlich eine ausreichende Thermostatisierung der Probe zu gewährleisten.

5.6 Strangaustauschtitrationsen

Um die Abhängigkeit der Effizienz des Strangaustauschs von der *Toehold*-Länge zu bestimmen, wurden zu den mit **TO** modifizierten Doppelsträngen **DNA18_19** – **DNA18_26** (*Toehold*-Längen 0 – 7) der mit **TR** modifizierte Einzelstrang **DNA27** in 0.1 eq Schritten (dann in 0.2 eq und 0.3 eq Schritten) hinzutitriert.^[144] Rechts in Abbildung 25 sind beispielhaft die Fluoreszenzspektren für den Strangaustausch mit der *Toehold*-Länge 5 dargestellt.

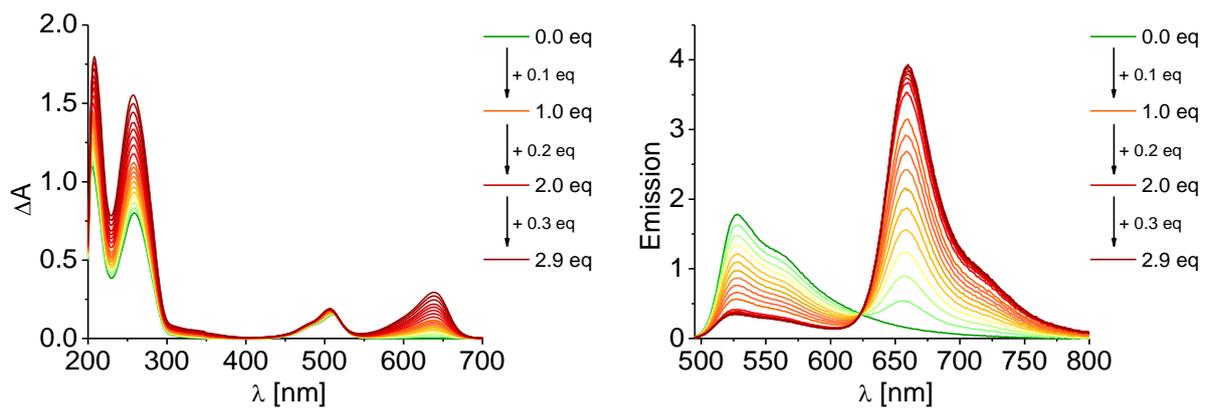


Abbildung 25: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) aufgenommen während der Titration von **DNA18_24** mit **DNA27**.

Zu Beginn der Titration zeigt das Spektrum nur die für **TO** typische grüne Fluoreszenz bei ca. 530 nm. Während der Zugabe von **DNA27** sinkt diese schrittweise ab, während die Fluoreszenz von **TR** bei ca. 660 nm ansteigt, obwohl dieses bei der Anregungswellenlänge von 490 nm keine signifikante Absorption besitzt. Nach einer Zugabe von 1.2 eq findet keine Farbänderung mehr statt und der Strangaustausch ist vollständig. Das Spektrum wird nun von der roten **TR** Fluoreszenz dominiert. Dies zeigt sehr deutlich, dass der unmodifizierte Strang **DNA24** durch **DNA27** verdrängt wurde und es somit, durch die räumliche Nähe von **TO** und **TR**, zum Energietransfer und damit zum Farbwechsel von Grün nach Rot kommt. Die Wechselwirkung der beiden Farbstoffe ist ebenfalls in den Absorptionsspektren zu erkennen (s. Abbildung 25, links). Zusätzlich zum Anstieg

der DNA- und **TR**-Absorption kommt es bei der schrittweisen Zugabe von **DNA27** durch Grundzustandswechselwirkungen zwischen den Farbstoffen zusätzlich zu einer hypsochromen Verschiebung der **TO**-Absorption um 5 nm. Dies bestätigt den erfolgreich stattfindenden Strangaustausch.

Beide Spektren (nicht nur bei dieser Titration, sondern auch bei allen anderen Experimenten, s. Kapitel II.7.5) zeigen jeweils einen isosbestischen Punkt bei 516 nm (Absorption) und 624 nm (Fluoreszenz). Dies, zusammen mit der hohen Geschwindigkeit des Prozesses (s. Kapitel II.5.5), zeigt, dass der Strangaustausch in einem Schritt abläuft und keine Zwischenstufen gebildet werden. Das untermauert unmittelbar den zu Grunde gelegten Mechanismus.

Um die einzelnen Titrationsexperimente direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen R/G-Verhältnisse gegen die Äquivalente an **DNA27** aufgetragen (s. Abbildung 26, links). Für *Toehold*-Längen zwischen 0 und 2 (**DNA18_19** – **DNA18_21**) findet kein signifikanter Strangaustausch statt ($R/G < 2$).

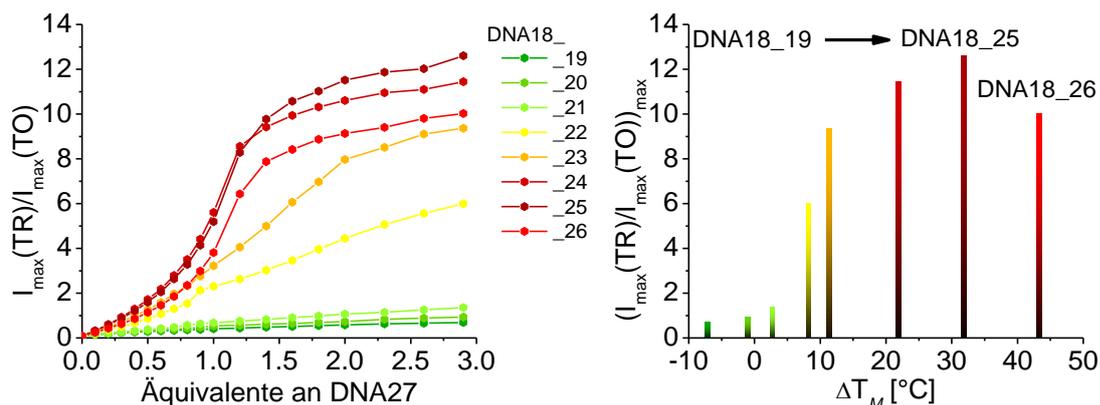


Abbildung 26: Vergleich der einzelnen Titrations von **DNA18_19** – **DNA18_26** mit **DNA27** (links) und Zusammenhang der R/G-Verhältnisse am Ende jeder Titration mit dem Schmelzpunktunterschied.

Der zentrale Schritt des Austauschmechanismus ist die Anlagerung des Titrationsstrang an den *Toehold*. Dies kann nur effizient ablaufen, wenn die jeweiligen Domänen komplementär sind und der *Toehold* lang genug ist, um eine stabile Übergangsstruktur auszubilden. Zweiteres ist in diesem Fall nicht gegeben.

Dies findet erst ab einer *Toehold*-länge von 3 statt (**DNA18_22**, $R/G = 6$). Vergleicht man allerdings das R/G-Verhältnis am Ende der Titration mit dem von **DNA18_27**, wenn dieser durch direkte Hybridisierung hergestellt wird ($R/G = 10.5$), wird deutlich, dass der Strangaustausch bei einer Zugabe von 2.9 eq noch nicht vollständig ist. Dies ist erst ab einer *Toehold*-Länge von 4 (**DNA18_23**, $R/G = 9$) und für Längen von 5 - 7 Basen (**DNA18_24** – **DNA18_26**, R/G bis 12) bereits ab einer Zugabe von 1.2 eq von **DNA27** der Fall. Es ist bekannt, dass erst ab einer *Toehold*-Länge von 4

bis 5 Basen (je nach GC-Gehalt) der Titrationsstrang effizient an den Templatstrang binden kann. Dies wird hier direkt über die Änderung des R/G-Verhältnisses bestätigt.

Die Schmelzpunktunterschiede ΔT_M zwischen den Templatsträngen (**DNA18_19** – **DNA18_26**) und dem gebildeten Doppelstrang (**DNA18_27**) reichen von -0.6 °C für **DNA18_19** bis $+40.8\text{ °C}$ für **DNA18_26** (Kapitel II.7.2, Tabelle 4). Das Gleichgewicht zwischen Templatstrang und gebildetem Doppelstrang wird im Wesentlichen durch diesen Unterschied der Duplexstabilitäten beeinflusst und kann durch die R/G-Verhältnisse am Ende jeder Titration visualisiert und quantifiziert werden. Trägt man diese gegen die entsprechenden ΔT_M -Werte auf erhält man einen sigmoidalen Verlauf (s. Abbildung 26, rechts). Daran wird deutlich, dass ein Strangaustausch für $\Delta T_M < 5\text{ °C}$ unvollständig und für $\Delta T_M > 10\text{ °C}$ vollständig abläuft. Da dies direkt über das R/G-Verhältnis bestimmt werden kann, wird wiederum die Leistungsfähigkeit der „DNA Traffic Lights“ zur Visualisierung und Charakterisierung von Strangaustauschprozessen bestätigt.

Eine Ausnahme zu den oben beschriebenen Tendenzen bildet das Strangaustauschexperiment mit **DNA18_26**. Das R/G-Verhältnis ($R/G = 10$) am Ende der Titration liegt unter dem zu erwartendem Wert ($R/G > 12$). T_M von **DNA18_26** befindet sich mit 12.2 °C unter der Messtemperatur von 20 °C . Daher kann angenommen werden, dass der Templatstrang zu Beginn der Titration nicht vollständig hybridisiert vorliegt.

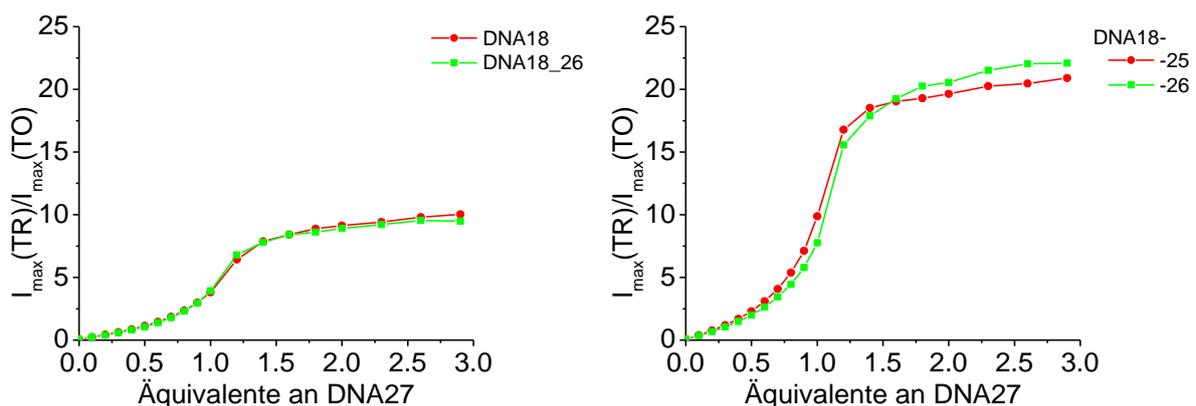


Abbildung 27: Vergleich der Titrations von DNA18 mit DNA18_26 (links) und DNA18_25 mit DNA18_26 bei jeweils 10 °C (rechts).

Vergleicht man diese Titration mit der Titration des Einzelstrangs (**DNA18**), erhält man einen nahezu identischen Kurvenverlauf (s. Abbildung 27, links). Führt man zusätzlich die Strangaustauschexperimente von **DNA18_25** und **DNA18_26** bei 10 °C durch, erhöht sich zum einen das R/G-Verhältnis auf bis zu 22 (R/G des

Referenzduplex **DNA18_27** bei 10 °C: 21). Zum anderen ist das R/G-Verhältnis von **DNA18_26** (R/G = 22) größer als das von **DNA18_25** (R/G = 20). Diese beiden Tatsachen bestätigen die Annahme, der unvollständigen Hybridisierung von **DNA18_26** bei 20 °C.

5.7 Zwei aufeinanderfolgende Strangaustauschprozesse

Neben den oben beschriebenen, an der *Toehold*-Domäne 2 stattfindenden Strangaustauschprozessen, kann durch das gewählte Strangdesign ebenfalls ein Farbwechsel von Rot zu Grün verwirklicht werden. Durch die, über die unterschiedliche Sequenz klar getrennte *Toehold*-Domäne 1, sollte es möglich sein, den Farbwechsel von Grün zu Rot aus den vorherigen Experimenten umzukehren. Um dies zu überprüfen, wurde der Doppelstrang **DNA18_27** mit dem unmodifizierten, zu **DNA18** vollständig komplementären Einzelstrang **DNA28** titriert.^[144] Das Vorgehen war dabei parallel zu den vorher beschriebenen Experimenten.

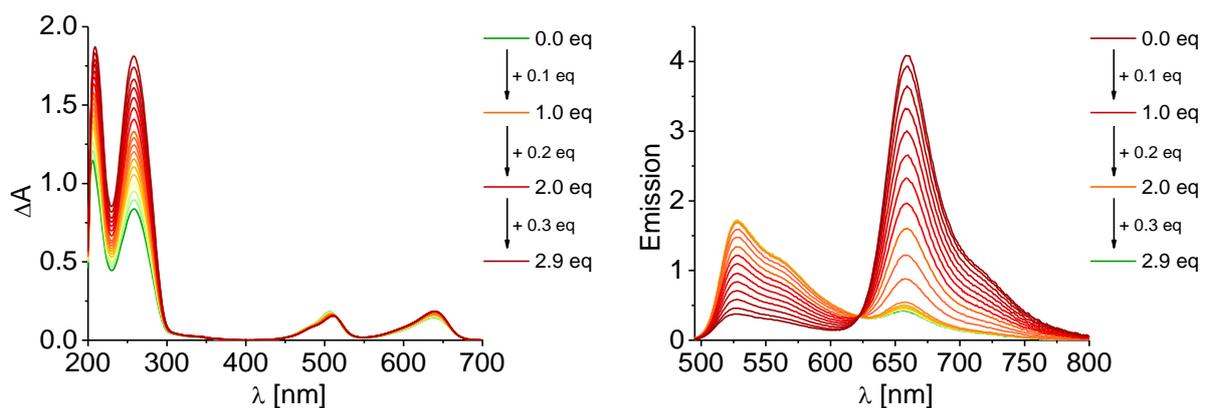


Abbildung 28: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) aufgenommen während der Titration von **DNA18_27** mit **DNA28**.

Vor der ersten Zugabe wird das Fluoreszenzspektrum von **DNA18_27** von der roten **TR**-Fluoreszenz dominiert. Die beiden Farbstoffe befinden sich in räumlicher Nähe und es kommt bei Anregung von **TO** zum Energietransfer auf **TR**. Bei schrittweiser Zugabe von **DNA28** wird **DNA27** verdrängt, der Energietransfer wird unterbunden und die **TR**-Fluoreszenz (660 nm) sinkt bei gleichzeitigem Anstieg der **TO**-Fluoreszenz (530 nm, s. Abbildung 28, rechts). Nach Zugabe von 1.2 eq von **DNA28** kann keine Farbänderung mehr beobachtet werden, der Strangaustausch ist komplett und das Spektrum zeigt fast ausschließlich die grüne **TO**-Fluoreszenz. Die schrittweise räumliche Trennung der Farbstoffe ist ebenfalls im Absorptionsspektrum zu erkennen (s. Abbildung 28, links). Neben der bereits oben beschriebenen, hier

aber auf Grund der Trennung der Farbstoffe bathochromen Verschiebung der **TO**-Bande, kommt es auch zu einem Anstieg und einer bathochromen Verschiebung der Absorption von **TR**. Dieses Verhalten wird ebenfalls durch die Änderung der Grundzustandswechselwirkungen der beiden Farbstoffe hervorgerufen. ΔT_M für diesen Prozess beträgt $+14.6\text{ }^\circ\text{C}$ und ist demnach ausreichend hoch, um einen effizienten Austausch zu ermöglichen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Visualisierung eines Strangaustauschs ebenfalls mit einem Rot-Grün-Wechsel realisiert werden kann. Da die Templatstränge **DNA18_26** – **DNA18_26** jeweils beide *Toehold*-Domänen (1 und 2) beinhalten, sollte es damit möglich sein, zwei aufeinanderfolgende Strangaustauschprozesse zu verwirklichen. Dafür wurde als Templatstrang **DNA18_24** gewählt, da bei diesem mit der *Toehold*-Länge von 5 Basen und einem ΔT_M -Wert von $+20.8\text{ }^\circ\text{C}$ ein effizienter Strangaustausch erreicht werden kann. Außerdem liegt der Schmelzpunkt des Doppelstrangs bei $32.4\text{ }^\circ\text{C}$, so dass er bei einer Messtemperatur von $20\text{ }^\circ\text{C}$ vollständig hybridisiert vorliegt.

Die **TO**-modifizierte **DNA18_24** wurde zunächst mit bis zu 1.4 eq der **TR**-modifizierten **DNA27** und daraufhin mit bis zu 1.4 eq der unmodifizierten **DNA28** titriert (s. Abbildung 29, links).^[144] Durch Austausch des unmodifizierten Einzelstranges **DNA24** mit **DNA27** wird **TR** direkt neben **TO** platziert, es kommt zum Energietransfer und das R/G-Verhältnis steigt.

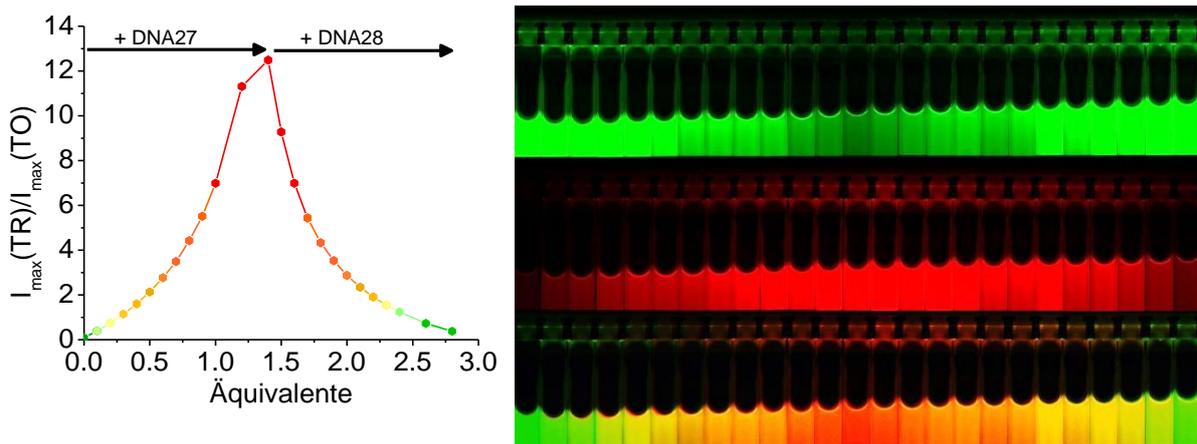


Abbildung 29: Änderung des R/G-Verhältnisses bei Titration von **DNA18_24** mit **DNA27** und **DNA28** (links) und Visualisierung des Farbverlaufs während dieser Titration (rechts).

Bei Zugabe von **DNA28** wird **DNA27** wieder verdrängt und es kommt zum umgekehrten Prozess. Das R/G-Verhältnis fällt wieder bis nahezu auf den Anfangswert ab. Dieser Farbverlauf während des doppelten Austauschs kann noch anschaulicher visualisiert werden. Es wurden während der Titration Bilder der

Visualisierung von Strangaustauschprozessen

Küvette in einem Fluoreszenzbildgeber aufgenommen. Abbildung 29 (rechts) zeigt die Aufnahmen der Küvette im grünen Kanal (535 ± 20.0 nm) und im roten Kanal (700 ± 17.5 nm) nach jeder Zugabe. Vor allem die Überlagerung beider Bilder veranschaulicht deutlich den Farbwechsel während des Strangaustauschs. Die Fluoreszenzfarbe ändert sich von grün (**TO**, 0.0 eq Zugabe) über orange bis hin zu rot (**TR**, 1.4 eq **DNA27**). Bei nachfolgender Zugabe von **DNA28** wechselt die Fluoreszenzfarbe wieder über orange zurück zu der grünen **TO**-Fluoreszenz.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit Hilfe von Absorptions- und Fluoreszenzmessungen konnte ein klarer Zusammenhang zwischen der Struktur und Stabilität von modifizierten DNA-Haarnadeln und der Effizienz des Energietransfers zwischen **TO** und **TR** herausgearbeitet werden. Es zeigte sich, dass variierende Modifikationen gegenüber den Farbstoffen und in der Schlaufenregion die Konformation der DNA-Helix soweit beeinflussen, dass excitonische Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren begünstigt oder unterbunden werden. Diese excitonischen Wechselwirkungen haben einen direkten Einfluss auf die Effizienz des Energietransfers und äußern sich vor allem im R/G-Verhältnis in den Fluoreszenzspektren.

Das Wissen um diese Zusammenhänge ist entscheidend für die Entwicklung zukünftiger Fluoreszenzsonden auf Basis des Konzepts der „DNA/RNA *Traffic Lights*“. Informationen über die exakte Struktur von **TO** und **TR** in DNA können allerdings nur mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Messungen erhalten werden. Dafür wurde ein für bisherige Anwendungen repräsentativer Doppelstrang synthetisiert. Die optimale Salz- und Pufferzusammensetzung konnte durch Fluoreszenzspektroskopie ermittelt werden und wurde mittels Schmelztemperaturmessungen bestätigt. Um die NMR-Signale genau zuzuordnen und damit eine sinnvolle Struktur vorschlagen zu können, muss jedoch noch die Selbstaggregation der Doppelstränge bei zu hohen Konzentrationen verhindert werden. Es ist bekannt, dass Zusätze von bestimmten Lösemitteln, wie zum Beispiel DMSO, MeCN, THF oder DMF einerseits eine basenspezifische Hybridisierung der DNA zulassen,^[145] andererseits aber Farbstoffaggregation unterbinden können.^[146] Dadurch könnte das Problem der Selbstaggregation gelöst werden.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kombination von **TO** und **TR** die Visualisierung von mindestens zwei aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen in Echtzeit ermöglicht. Über das Kontrastverhältnis von rot zu grün konnten die Vollständigkeit und die Effizienz dieses Prozesses direkt bestimmt und bewertet werden. Dadurch dienen diese Ergebnisse als Grundlage für die Beschreibung komplexerer DNA-Nanostrukturen.

7 Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben zu Materialien und Methoden, die in diesem Teil der Arbeit verwendet wurden, sind in Kapitel V aufgeführt.

Für Absorptions- und Emissionsspektren wurden, falls nicht anders angegeben, 2.5 μM DNA-Lösungen in 10 mM NaP_i -Puffer und 250 mM NaCl verwendet. Bei Fluoreszenzspektren **TO**- und **TR**-modifizierter DNA wurde **TO** mit $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm und **TR** mit $\lambda_{\text{exc}} = 620$ nm angeregt. Für beide Farbstoffmodifikationen betrug die Spaltbreite der Anregung 3 nm und die der Emission 2 nm.

Die Synthese der jeweiligen **TO/TR**-Phosphoramiditbausteine für die DNA-Synthese erfolgte nach Literaturvorschrift^[18] und ist daher hier nicht näher aufgeführt. **dU**-, **ABS**- und **PEG**-Phosphoramiditbausteine sind kommerziell erhältlich und wurden von der Firma *Glen Research* bezogen.

7.1 DNA-Synthese

Die **TO**- und **TR**-Phosphoramiditbausteine wurden als 0.084 M Lösungen in DCM zur DNA-Synthese eingesetzt. Um eine möglichst gute Kupplungseffizienz zu erreichen, wurde die Kupplungszeit im Vergleich zum Standardprotokoll der natürlich Basen (Kapitel V.2, Tabelle 14) von 96 s auf 5400 s erhöht, wobei nach 2700 s ein Spülschritt zur Regeneration des Phosphoramidits eingefügt wurde. In Tabelle 1 ist das genaue Syntheseprotokoll dargestellt.

Tabelle 1: Modifiziertes Kupplungsprotokoll zum Einbau von **TO/TR**-Phosphoramiditbausteinen in DNA.

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit [s]
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
22	DCM + Act	PULSE	20	0
23	TO/TR + Act	PULSE	6	0
23	TO/TR + Act	PULSE	2	900
23	TO/TR + Act	PULSE	2	600
23	TO/TR + Act	PULSE	5	200
22	DCM + Act	PULSE	1	500
22	DCM + Act	PULSE	3	300
3	DCM	PULSE	7	200
3	DCM	PULSE	40	0
22	DCM + Act	PULSE	10	0
23	TO/TR + Act	PULSE	6	0
23	TO/TR + Act	PULSE	2	900
23	TO/TR + Act	PULSE	2	600
23	TO/TR + Act	PULSE	5	200
22	DCM + Act	PULSE	1	500
22	DCM + Act	PULSE	3	300
3	DCM	PULSE	7	200
3	DCM	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	80	0

Die kommerziell erhältlichen Bausteine **dU**, **ABS** und **PEG** wurden als 0.083 M Lösungen in MeCN eingesetzt. Die Kupplungszeit und Pulsabfolge entsprach dabei dem Standardprotokoll der natürlichen Basen (s. Kapitel V.2, Tabelle 14).

Nach der DNA-Synthese und dem Abspalten vom CPG durch konzentrierte Ammoniak-Lösung (700 µL, 45 °C und 24 h), wurden die Oligonukleotide durch *Reversed-Phase*-HPLC gereinigt. Die zur analytischen und präparativen Trennung verwendeten Methoden sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Experimenteller Teil

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Methoden zur Reinigung der Oligonukleotide durch *Reversed-Phase-HPLC*.

DNA	5'-DMTr-	Modifikation	Laufzeit [min]	Gradient [% von B]	T [°C]	Detektionswellenlängen
DNA6	on	TO, TR	45	15 - 18	40	260 nm, 512 nm, 630 nm
DNA7	on	TO, TR, ABS	45	0 - 35	40	260 nm, 512 nm, 630 nm
DNA8	on	TO, TR, PEG	45	15 - 20	40	260 nm, 512 nm, 630 nm
DNA9	on	TO, TR, ABS, PEG	45	0 - 35	40	260 nm, 512 nm, 630 nm
DNA11	off	ABS	45	0 - 20	RT	260 nm
DNA12	off	PEG	45	0 - 20	RT	260 nm
DNA13	off	ABS, PEG	45	0 - 20	RT	260 nm
DNA14	off	TO	45	0 - 40	40	260 nm, 512 nm
DNA15	off	TR	45	15 - 17	40	260 nm, 630 nm
DNA16	off	TO, dU	45	0 - 20	RT	260 nm, 512 nm
DNA17	off	TR	45	0 - 20	RT	260 nm, 630 nm
DNA18	off	TO	45	0 - 45	RT	260 nm, 512 nm
DNA27	off	TR	45	0 - 45	RT	260 nm, 630 nm

Schließlich wurde die terminale DMTr-Schutzgruppe der *DMTr-on* synthetisierten Stränge (s. Tabelle 2) mit 80%iger Essigsäure abgespalten.

7.2 Charakterisierung der Oligonukleotide

Im Folgenden sind die Sequenzen der synthetisierten, modifizierten, sowie die der unmodifizierten, kommerziell erhältlichen Oligonukleotide gezeigt, die in diesem Teil der Arbeit verwendet wurden.

DNA6	3'-GCA-TT TO T-GAA-GCA-A TR T-GC-5'
DNA7	3'-GCA- ABSTO T-GAA-GCA- ABSTR T-GC-5'
DNA8	3'-GCA-TT TO T-G PEGC -AA TR -TGC-5'
DNA9	3'-GCA- ABSTO T-G PEGC -A ABSTR -TGC-5'
DNA10	3'-GCA-TTT-GAA-GCA-AAT-GC-5'

DNA11	3'-GCA- ABSTT -GAA-GCA- ABSAT -GC-5'
DNA12	3'-GCA-TTT- GPEGC -AAA-TGC-5'
DNA13	3'-GCA- ABSTT - GPEGC -A ABSA -TGC-5'
DNA14	3'-GCA-T TO T-GAA-GCA-AAT-GC-5'
DNA15	3'-GCA-TTT-GAA-GCA-A TRT -GC-5'
DNA16	3'-GCG-T TO - UGG -C-5'
DNA17	3'-GCC-AA TR -ACG-C-5'
DNA18	3'-ACT-GAG-TCA-CAT- TO TC-TAC-TGA-CAT-5'
DNA19	3'-ATG-TCA-GTA-GAA-ATG-TG-5'
DNA20	3'-TGT-CAG-TAG-AAA-TGT-G-5'
DNA21	3'-GTC-AGT-AGA-AAT-GTG-5'
DNA22	3'-TCA-GTA-GAA-ATG-TG-5'
DNA23	3'-CAG-TAG-AAA-TGT-G-5'
DNA24	3'-AGT-AGA-AAT-GTG-5'
DNA25	3'-GTA-GAA-ATG-TG-5'
DNA26	3'-TAG-AAA-TGT-G-5'
DNA27	3'-ATG-TCA-GTA-GAA- TR TG-TG-5'
DNA28	3'-ATG-TCA-GTA-GAA-ATG-TGA-CTC-AGT-5'

In Tabelle 3 sind die MS-Analytik und die molaren Extinktionskoeffizienten der modifizierten DNA-Stränge aufgelistet. Die zur Berechnung von ϵ_{260} nötigen Extinktionskoeffizienten von **TO** und **TR** bei $\lambda = 260$ nm wurden der Literatur entnommen.^[18] Die der kommerziell erhältlichen Phosphoramiditbausteine **ABS**, **PEG** und **dU** können im Produktdatenblatt des Herstellers eingesehen werden (Kapitel V.2, Formel 2).

Tabelle 3: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der **TO**, **TR**, **ABS**, **PEG** und **dU** modifizierten DNA-Stränge.

DNA	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DNA6	5681.1	5678.6	154.9
DNA7	5424.0	5421.9	133.1

DNA	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DNA8	5070.1	5070.1	116.6
DNA9	4813.0	4811.3	94.9
DNA11	4958.9	4957.4	154.9
DNA12	4604.9	4604.9	138.4
DNA13	4347.8	4347.1	116.6
DNA14	5440.0	5442.0	168.8
DNA15	5457.0	5459.3	162.8
DNA16	3258.6	3259.4	80.2
DNA17	3245.7	3246.1	88.9
DNA18	7507.3	7506.9	223.5
DNA27	5512.0	5512.4	168.1

Die Schmelztemperaturen T_M der hybridisierten Doppelstränge und Haarnadeln wurden unter Standardbedingungen gemessen und sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Schmelztemperaturen der untersuchten Doppelstränge und Haarnadeln.

DNA	T_M [°C]	DNA	T_M [°C]
DNA6	70.8	DNA18_19	53.8
DNA7	65.7	DNA18_20	52.3
DNA8	87.1	DNA18_21	49.3
DNA9	55.7	DNA18_22	44.6
DNA10	62.3	DNA18_23	42.2
DNA11	53.3	DNA18_24	32.4
DNA12	70.6	DNA18_25	23.1
DNA13	37.7	DNA18_26	12.4
DNA14	68.3	DNA18_27	53.2
DNA15	66.7	DNA18_28	67.8

7.3 Daten zur optischen Charakterisierung der DNA-Haarnadeln

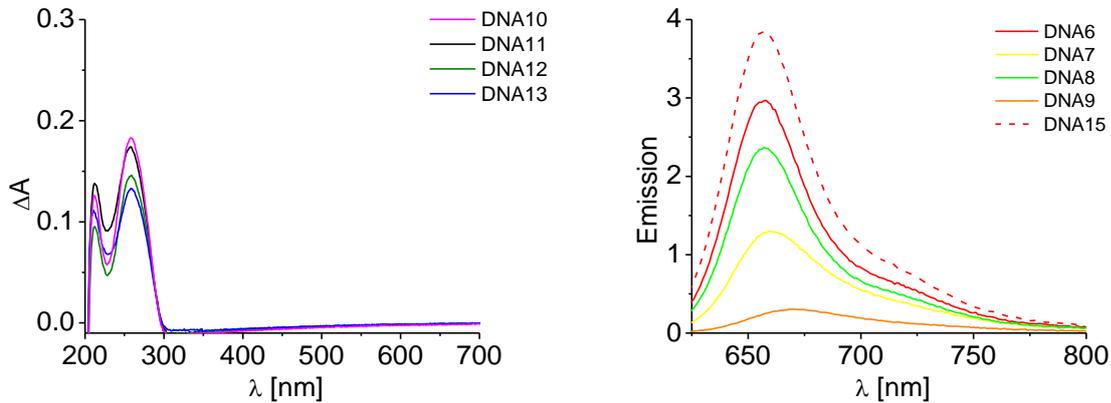


Abbildung 30: Absorptionsspektren von DNA10 – DNA13 (links); Fluoreszenzspektren von DNA6 – DNA9 und DNA15 bei einer Anregungswellenlänge von 620 nm (rechts).

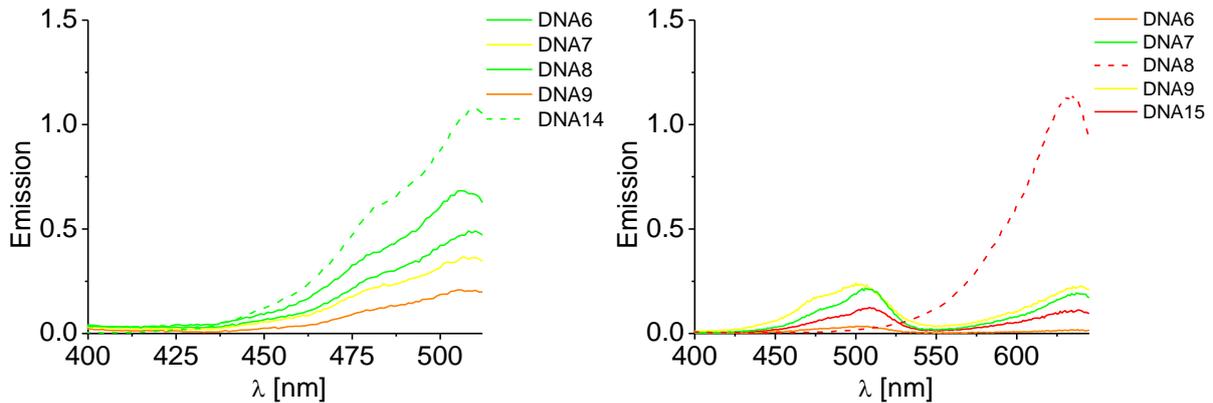


Abbildung 31: Anregungsspektren der Haarnadeln für eine Emissionswellenlänge von 527 nm (links) und 660 nm (rechts).

Tabelle 5: Optische Daten und Schmelztemperaturunterschiede von DNA6 – DNA9, DNA14 und DNA15.

	DNA6	DNA7	DNA8	DNA9	DNA14	DNA15
ΔT_m (°C)	8.5 ^a	12.4 ^b	16.5 ^c	18.0 ^d	6.0 ^a	4.4 ^a
$\varepsilon(\text{TO})$ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^e	29.1	29.5	30.6	25.1	37.4	-
$\varepsilon(\text{TR})$ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^f	28.2	19.6	19.1	6.4	-	41.6
$\lambda_{\text{fluor, max}}(\text{TO})$ [nm]	526	527	526	527	528	-
$\lambda_{\text{fluor, max}}(\text{TR})$ [nm]	659	672	659	673	-	657 ^g
$I_{\text{max}}(\text{TR})/I_{\text{max}}(\text{TO})$	14.4	9.7	6.2	3.4	-	-

^a verglichen mit DNA10; ^b verglichen mit DNA11; ^c verglichen mit DNA12; ^d verglichen mit DNA13; ^e bei 506 nm; ^f bei 635 nm; ^g bei Anregung mit 620 nm.

Experimenteller Teil

Tabelle 6: Absorptionen, Extinktionskoeffizienten, Quantenausbeuten und Helligkeiten von DNA6 – DNA9, DNA14 und DNA15.

	$\epsilon_{490 \text{ nm}}$ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	ϕ_{TO} [%]	$\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$		
			B_{TO} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	ϕ_{TR} [%]	B_{TR} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DNA6	19.6	0.9	0.2	24.7	4.8
DNA7	21.6	0.1	0.0	9.0	1.9
DNA8	20.5	5.5	1.1	12.7	2.6
DNA9	18.4	2.1	0.4	5.6	1.0
DNA14	24.5	14.3	3.5	-	-

	$\epsilon_{620 \text{ nm}}$ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	$\lambda_{\text{exc}} = 620 \text{ nm}$		
		ϕ_{TR} [%]	B_{TR} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	FRET-Effizienz $\phi_{\text{TR}, 490 \text{ nm}}/\phi_{\text{TR}, 620 \text{ nm}}$
DNA6	23.1	26.2	6.1	94.3
DNA7	15.3	11.7	1.8	76.9
DNA8	15.2	21.5	3.3	59.1
DNA9	4.5	13.9	0.6	40.3
DNA15	36.3	21.9	8.0	-

7.4 NaCl-Titration und thermische Daten von DNA16_17

Es wurde eine 2.5 μM und eine 5 μM Lösung von **DNA16_17** in 1 mM Kakodylatpuffer hergestellt und diese jeweils mit einer 10 mM NaCl-Lösung in 1 μL Schritten titriert. Nach jeder Zugabe und einer Inkubationszeit von 1 min wurden Absorption und Fluoreszenz gemessen (s. Abbildung 32 und Abbildung 33).

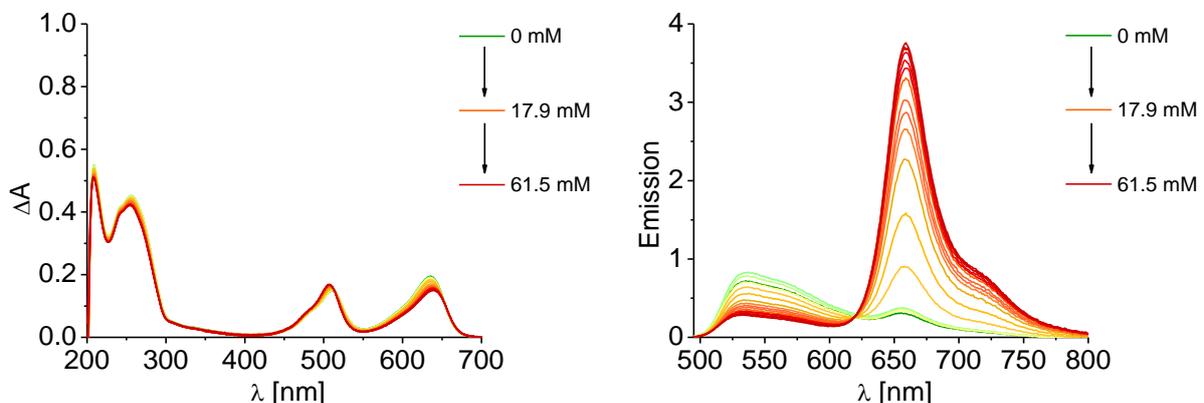


Abbildung 32: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) aufgenommen bei der Titration von DNA16_17 mit NaCl bei einer Konzentration von 2.5 μM .

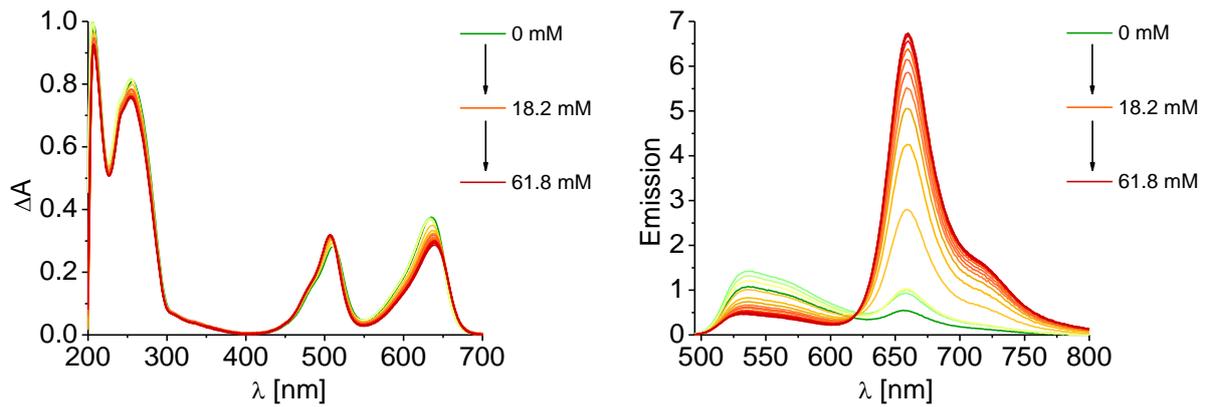


Abbildung 33: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) aufgenommen bei der Titration von DNA16_17 mit NaCl bei einer Konzentration von 5 μM .

Tabelle 7: Schmelztemperatur von DNA16_17 unter Standardbedingungen und mit variierenden Salzkonzentrationen und Kakodylatpuffer.

Puffer	Pufferkonzentration [mM]	NaCl-Konzentration [mM]	T_M [°C]
NaP _i	10	250	45.5
Kakodylat	1	250	42.9
Kakodylat	1	50	39.9
Kakodylat	1	0	< 10.0

7.5 Methoden und Daten der Strangaustauschexperimente

Für die Kinetik- und Titrationsexperimente wurde der vorgelegte Doppelstrang (**DNA18_19 - DNA18_26, DNA18_27**) als 2.5 μM Lösung in 600 μL Puffer unter Standardbedingungen verwendet. Um dessen Konzentration während der Titration konstant zu halten, besaß die Titrationslösung dieselbe Zusammensetzung mit zusätzlich bis zu 3.0 eq des Titrationstrangs (**DNA27** bzw. **DNA28**).

Um die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung während den Titrationen zu bestimmen wurden 100 μL Titrationslösung, die jeweils 0.5 eq des Titrationstrangs beinhalteten, zu dem vorgelegten Doppelstrang gegeben und in Abständen von 1 min Fluoreszenzspektren aufgenommen (s. Abbildung 34 und Abbildung 35).

Experimenteller Teil

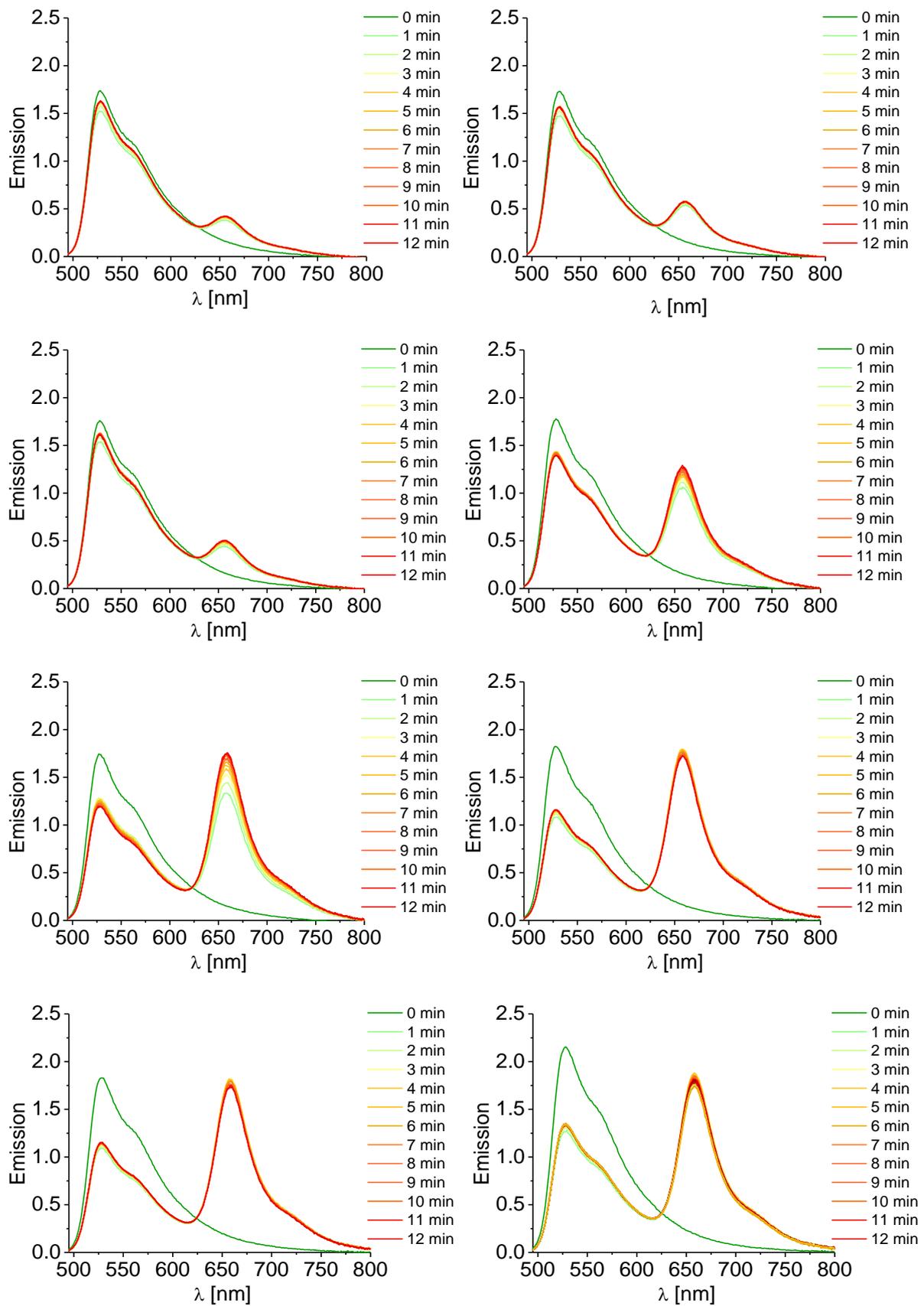


Abbildung 34: Fluoreszenzspektren der Kinetiken (von links oben nach rechts unten) von DNA18_19 - DNA18_26 mit DNA27.

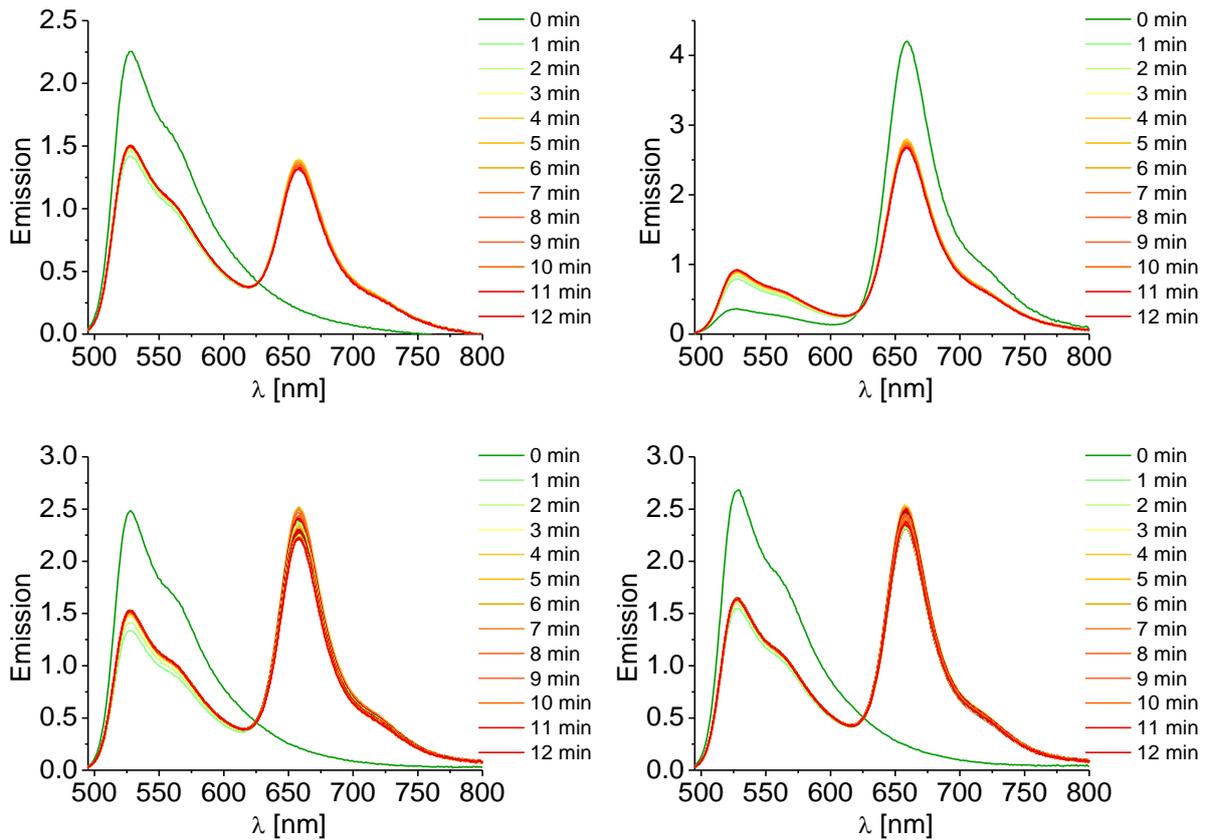


Abbildung 35: Fluoreszenzspektren der Kinetiken von DNA18 mit DNA27 (oben, links) und DNA18_27 mit DNA28 (oben, rechts), DNA18_25 (unten, links) und DNA18_26 (unten, rechts) mit DNA27 bei 10 °C.

Für die Titrationsen wurden 300 μ L der Titrationslösung, die jeweils 3.0 eq des Titrationsstrangs beinhalteten, in 0.1 eq Schritten (dann in 0.2 eq und 0.3 eq Schritten) zu dem vorgelegten Doppelstrang gegeben. Nach jeder Zugabe und einer Wartezeit von 10 min für Inkubation und Thermostatisierung wurden Absorption und Fluoreszenz der Probe gemessen (s. Abbildung 36 - Abbildung 39).

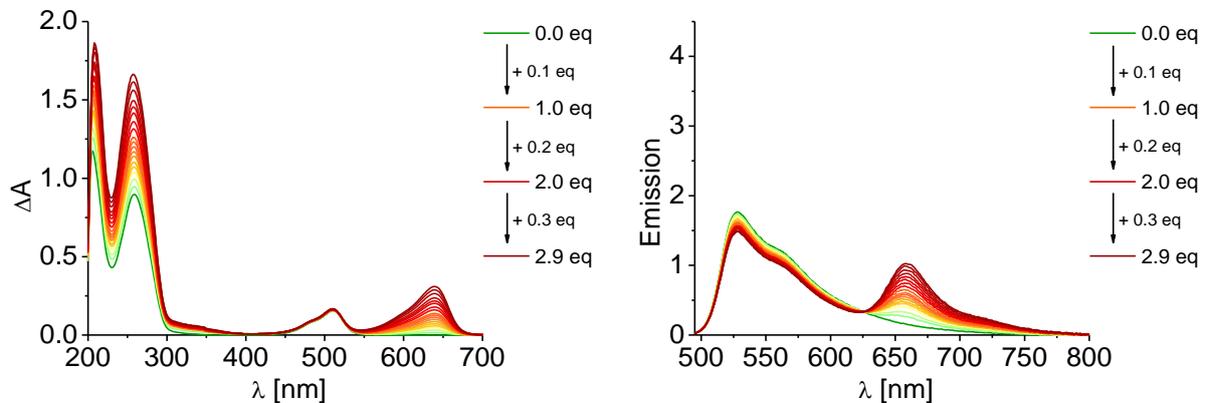


Abbildung 36: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der Titration von DNA18_19 mit DNA27.

Experimenteller Teil

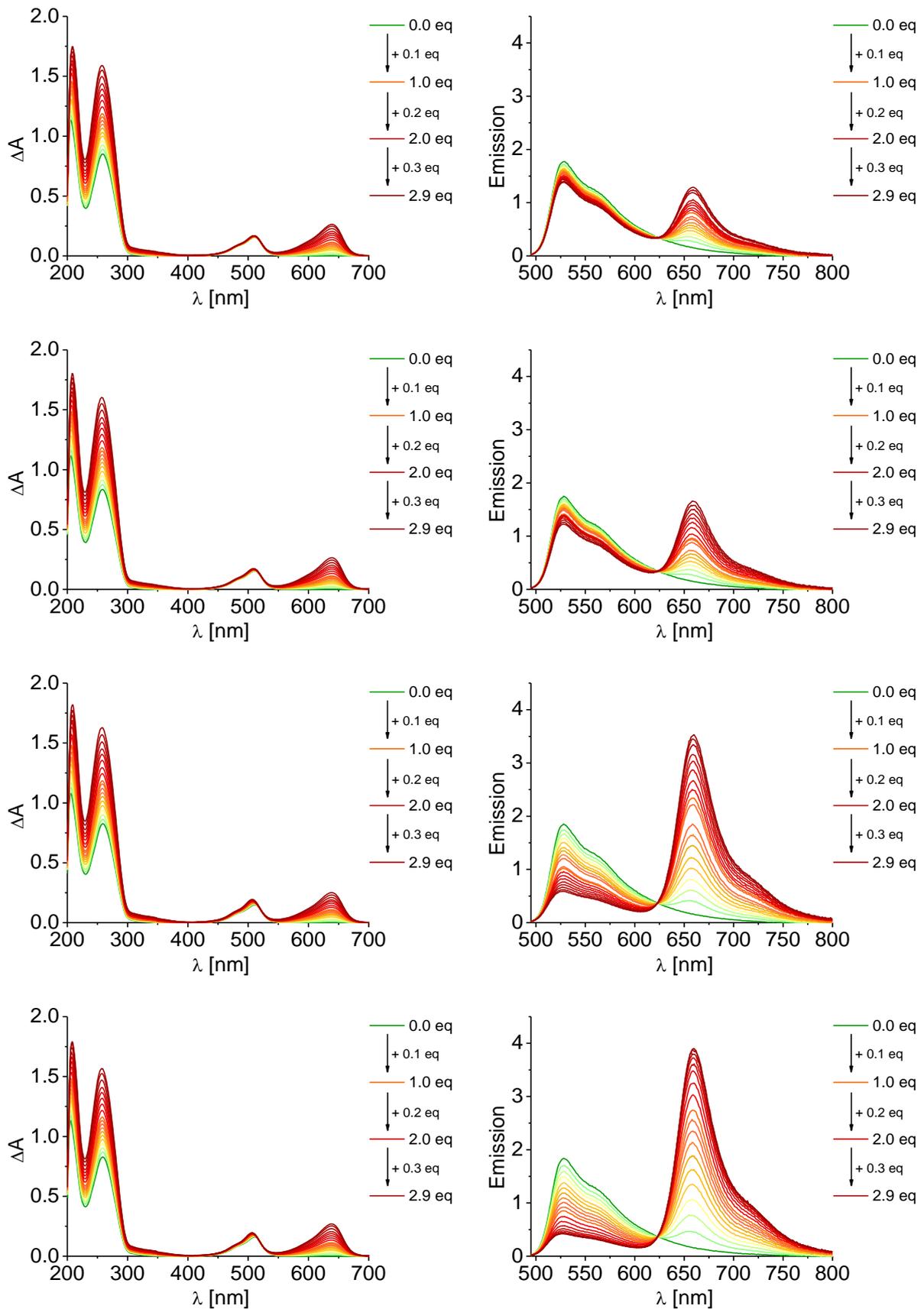


Abbildung 37: Absorptions- (je links) und Fluoreszenzspektren (je rechts) der Titrations (von oben nach unten) von DNA18_20 - DNA18_23 mit DNA27.

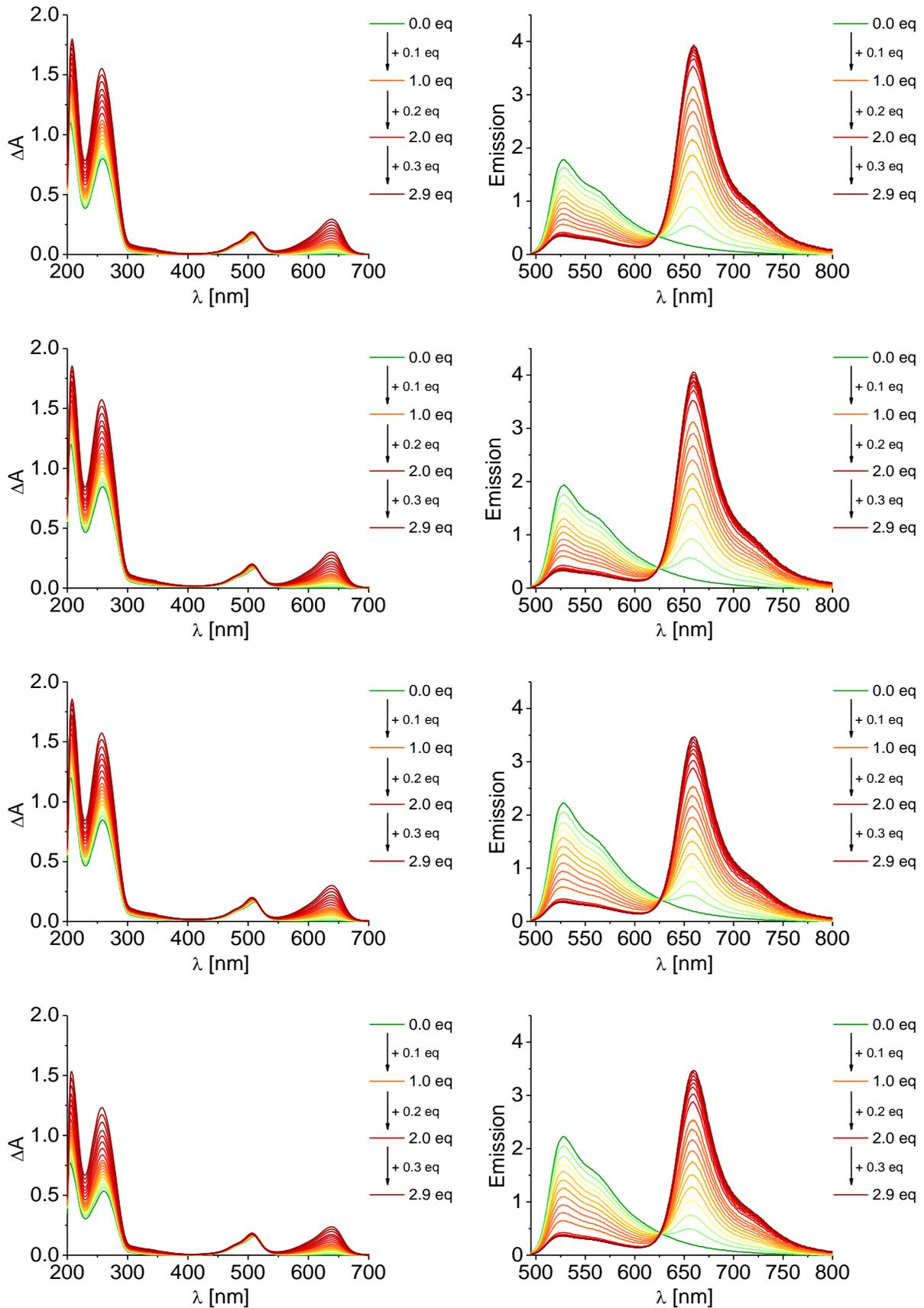


Abbildung 38: Absorptions- (je links) und Fluoreszenzspektren (je rechts) der Titrationsen (von oben nach unten) von DNA18_24 - DNA18_26 mit DNA27 und von DNA18 mit DNA27.

Experimenteller Teil

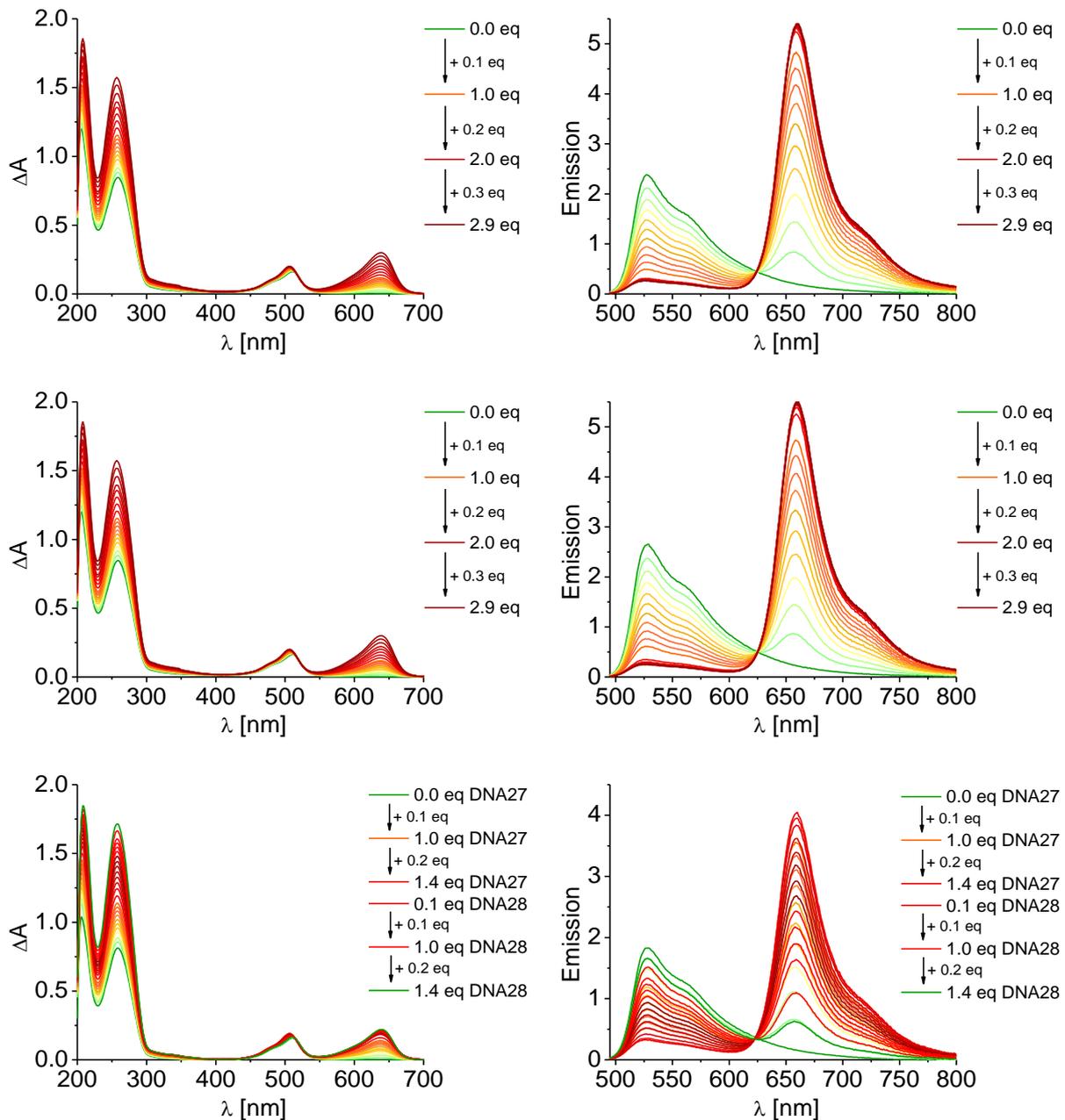


Abbildung 39: Absorptions- (je links) und Fluoreszenzspektren (je rechts) der Titrations von DNA18_25 (oben) und DNA18_26 (mitte) mit DNA27 bei 10 °C und DNA18_24 zuerst mit DNA27, dann mit DNA28 (unten).

Die Bilder der Fluoreszenz wurden in den jeweiligen, auch für die optischen Messungen verwendeten Küvetten aufgenommen. Diese wurden in einem *Stella* Fluoreszenzbildgeber der Firma *Raytest* platziert und unter Lichtausschluss 1 s lang belichtet. Für **TO**-modifizierte DNA wurde ein Emissionsfilter von 535 ± 20.0 nm und für **TR**-modifizierte DNA ein Emissionsfilter von 700 ± 17.5 nm verwendet.

III. Diarylethen-Photoschalter in DNA

1 Themenstellung

Die nicht-invasive Beeinflussung der Konformation und Aktivität von Biomolekülen hat großes Potential für die Untersuchung komplexer Prozesse in lebenden Zellen^[147-148] und für den Aufbau schaltbarer Nanostrukturen.^[149-150] Eine reversible Steuerung sollte dabei eine möglichst hohe räumliche und zeitliche Auflösung besitzen und auf Hinblick biologischer Anwendungen orthogonal zu den meisten Zellprozessen sein.^[151]

Eine Möglichkeit, das zu realisieren, ist die Verwendung von molekularen Diarylethen-Photoschaltern. Diese wurden bereits erfolgreich zur Steuerung der Proteinfaltung^[152] und Enzymaktivität^[153] eingesetzt. Im Bereich der Nucleinsäurechemie werden vor allem Azobenzole als schaltbare Fluoreszenzmarker und zur lichtkontrollierten Steuerung der DNA-Hybridisierung verwendet.^[154-157] Obwohl Diarylethene in vieler Hinsicht herausragende photochrome Eigenschaften besitzen, gibt es in diesem Zusammenhang nur wenige Arbeiten.^[158-160]

Im Zuge dieser Arbeit sollen verschiedene Diarylethen-Photoschalter synthetisiert und kovalent in DNA eingebracht werden. Dabei besteht zum einen die Möglichkeit, den Photoschalter über eine kurze Acetylenbrücke an 2'-Desoxyuridin (**dU**) zu binden (s. Abbildung 40). Diese nukleosidischen Photoschalter sollen dann über die Standard-Phosphoramidit-Festphasensynthese in DNA eingebracht werden und besitzen so eine direkte elektronische Kopplung zum Basenstapel (**1**, **2** und **3**).

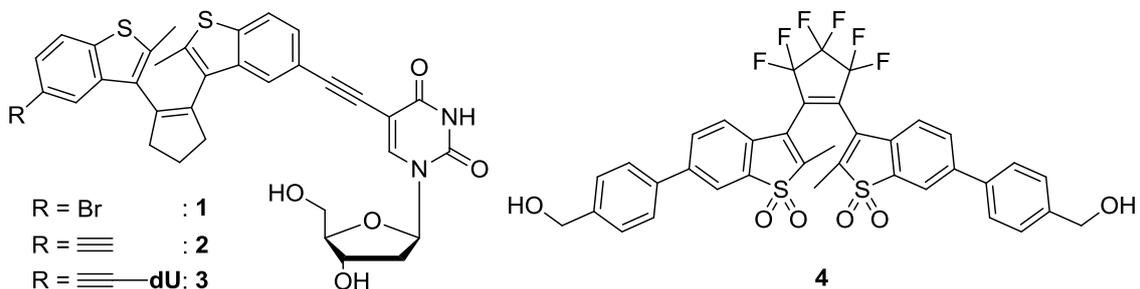


Abbildung 40: Strukturen der nukleosidischen Photoschalter (**1**, **2** und **3**) und des nicht-nukleosidischen Photoschalters **4**.

Zum anderen kann die Steuerung der Stabilität von DNA-Doppelsträngen auch durch einen nicht-nukleosidischen Photoschalter direkt am Phosphatrückgrat erreicht werden (**4**).

Themenstellung

Ziel der Arbeit soll neben der Synthese der Photoschalter auch die Bestimmung ihrer photochromen Eigenschaften in Hinblick auf Eignung für das Einbringen in DNA sein. Nach erfolgreichem Einbau soll überprüft werden, ob diese Eigenschaften in der DNA-Umgebung erhalten bleiben und ob damit Struktur und Stabilität der DNA-Helix beeinflusst werden können.

Dafür sollen verschiedene Belichtungsreaktoren für die Schaltexperimente und Methoden der optischen Spektroskopie und Flüssigchromatographie zur Charakterisierung des photostationären Zustands zum Einsatz kommen. Diese Arbeit soll damit die Voraussetzung für das Design neuer, auf leistungsfähigen Diarylethenen basierenden, schaltbaren Nanostrukturen und für die Steuerung biologischer Systeme schaffen.

2 Photoschalter zur reversiblen Steuerung von DNA

2.1 Definition, Mechanismen und Vergleich

Die Untersuchung chemischer und biologischer Prozesse sollte, um das System von Interesse nicht zu beeinflussen und damit die Ergebnisse zu verfälschen, möglichst nicht-invasiv sein. Dafür bietet die Verwendung von Licht in einem Bereich von über 300 nm optimale Voraussetzungen, da bei diesen Wellenlängen biologische Systeme im Allgemeinen keine Eigenabsorption zeigen.^[161] Man kann Licht sehr gut räumlich und zeitlich auflösen. Außerdem sind photoinduzierte Reaktionen orthogonal zu den meisten Prozessen in lebenden Systemen und sehr selektiv hinsichtlich der Verwendung in komplexen, chemischen Vorgängen. Zusätzlich wird die Probe nicht kontaminiert und über die Wellenlänge und Intensität des verwendeten Lichts kann die benötigte Energie präzise eingestellt werden.

Viele biologische Vorgänge, wie der Prozess des Sehens^[162] und die Photosynthese,^[163] werden durch Licht angetrieben. Die Konformation proteingebundener Chromophore wird durch Absorption von Licht geschaltet, was die Proteinstruktur verändert. Dies ist in der Regel vollständig reversibel und führt über eine Kaskade von weiteren Reaktionen zum gewünschten, biologischen Effekt.^[164]

Neben diesen Beispielen, wurden in den letzten Jahrzehnten auch eine Reihe synthetischer, molekularer Photoschalter entwickelt (s. Abbildung 41). Diese sind kleine organische Moleküle, die durch Absorption eines Photons (λ_1 , meistens UV-Licht) ihre Struktur verändern können. Dabei wird von einer farblosen Form in eine farbige Form geschaltet.^[165] Dieser Prozess ist reversibel und der Photoschalter kann durch Absorption eines Photons anderer Wellenlänge (λ_2 , meist sichtbares Licht) oder thermisch (ΔT) wieder geöffnet werden. Dieser Vorgang wird als Photochromie bezeichnet.

Man kann zwischen zwei Schaltmechanismen unterscheiden. Im Fall der Stilbene und Azobenzole handelt es sich um eine *cis-trans*-Isomerisierung. Die Änderung der Molekülgeometrie ist hier relativ groß. Die zweite Möglichkeit besteht in einer Ringschluss- bzw. in einer Ringöffnungsreaktion, wobei sich die Molekülgeometrie im Fall der Diarylethene nicht stark ändert. Neben den optischen Eigenschaften, können auch andere physikalische Größen wie Polarität, Ladungsverteilung und Leitfähigkeit geschaltet werden.^[166]

Photoschalter zur reversiblen Steuerung von DNA

Die planare *trans*-Form eines unsubstituierten Azobenzols zeigt im UV/Vis-Spektrum zwei Absorptionsmaxima.^[167] Die starke Bande bei ca. 320 nm resultiert aus einem π - π^* -Übergang und ist symmetrieerlaubt. Eine Anregung bei dieser Wellenlänge resultiert in einer Drehung um die *N-N*-Bindung und in der Bildung des *cis*-Isomers.

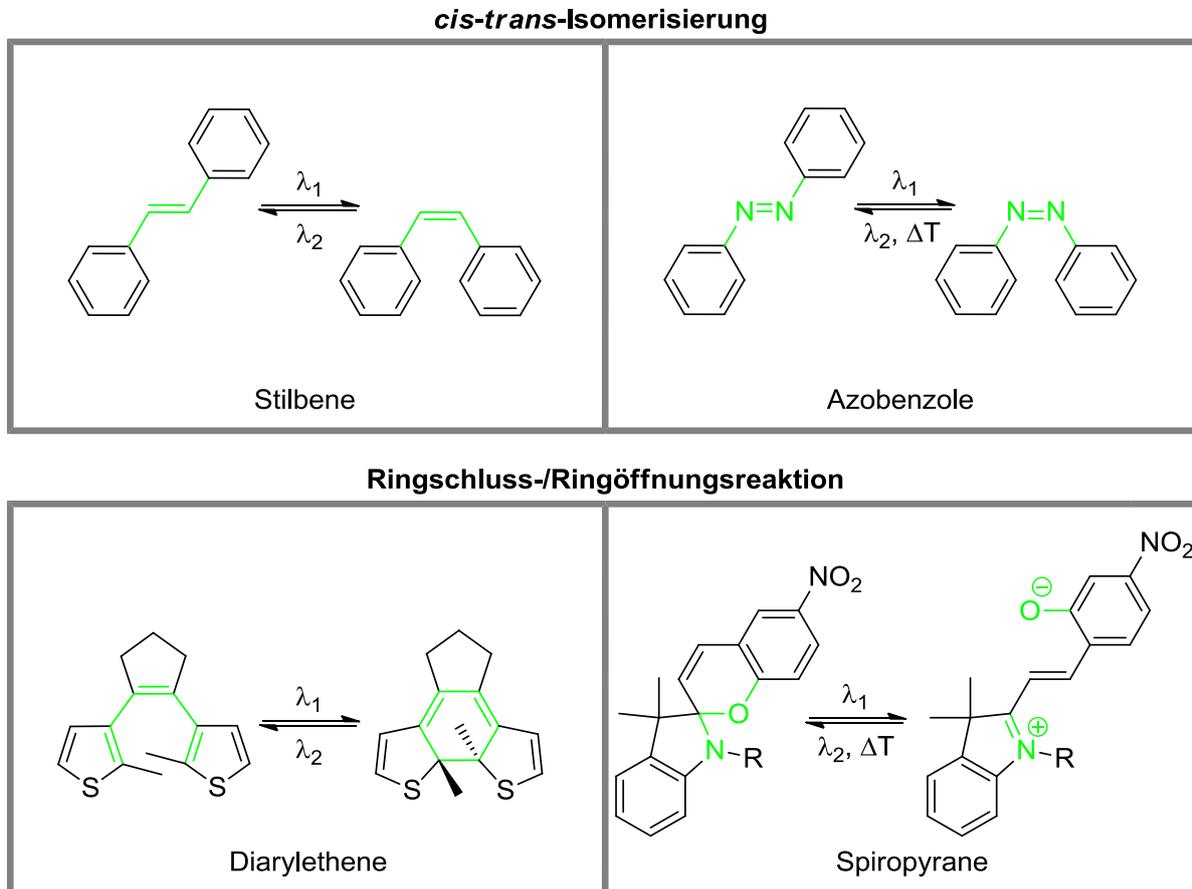
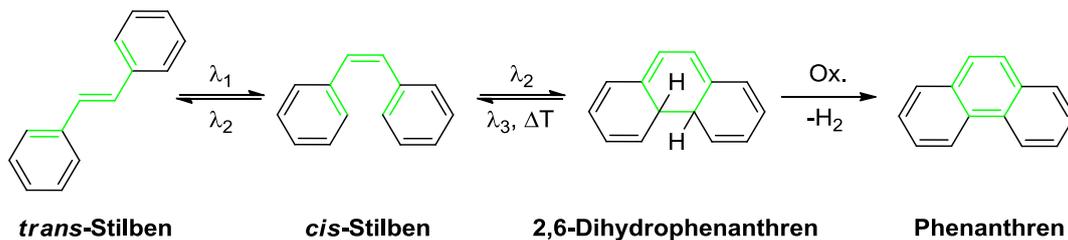


Abbildung 41: Auswahl an molekularen Photoschaltern; der Farbwechsel erfolgt über eine *cis-trans*-Isomerisierung (oben) oder über Ringschluss/Ringöffnungsreaktionen (unten); die beteiligten chemischen Bindungen sind jeweils grün markiert.

Eine Anregung bei der weniger intensiven, zweiten Absorptionsbande bei ca. 430 nm (Symmetrie verboten, n - π^* -Übergang) führt ebenfalls zur Bildung des *cis*-Isomers allerdings über einen der anderen möglichen Reaktionswege. Die umgekehrte Isomerisierung von der *cis*- in die stabilere *trans*-Form (ca. 10 kcal/mol) kann entweder thermisch oder bei Anregung im sichtbaren Bereich des Spektrums (> 460 nm) erfolgen. Die Geschwindigkeit der Isomerisierung und die photochrome Ausbeute sind dabei sehr stark von den Substituenten und der Polarität des Lösungsmittels abhängig.^[168] Zum Beispiel kann eine Kombination aus Elektronendonator- und Elektronenakzeptor-Substituenten eine Erniedrigung der thermischen Stabilität der *cis*-Form in polaren Lösemitteln verursachen.^[169] In

unpolaren Lösemitteln hingegen wird bei diesem Substituentenmuster die photochrome Ausbeute erhöht.^[170]

Das Schalten von unsubstituierten Stilbenen beruht auf demselben Mechanismus wie dem der Azobenzolen.^[171-172] Die Anregung beim Absorptionsmaximum von 313 nm führt zur *cis*-Isomerisierung. Allerdings ist die Energiebarriere für die thermische Reversion zur *trans*-Form mit 41-46 kcal/mol signifikant höher als bei Azobenzolen. Damit ist ein thermisches Zurückschalten bei Raumtemperatur praktisch nicht zu beobachten. Ein wesentlicher Nachteil dieser Photoschalterklasse ist die irreversible Oxidation der *cis*-Form (s. Schema 1).^[173]



Schema 1: *Cis-trans*-Isomerisierung, Ringschluss-/Ringöffnungsmechanismus und Oxidation zu Phenanthren von Stilben.

Nach photoinduziertem Ringschluss zu 2,6-Dihydrophenanthren, werden in Anwesenheit von Sauerstoff oder anderen Oxidationsmittel, wie zum Beispiel I₂, die H-Atome an der 2- und 6-Position eliminiert und es entsteht Phenanthren. Dieser Vorgang ist irreversibel, kann aber für die Synthese kondensierter Ringsysteme verwendet werden.^[174]

Der 6 π -Oxaelektrozyklisierungsmechanismus bei Spiropyranen unterscheidet sich grundlegend von der oben beschriebenen *cis-trans*-Isomerisierung.^[175-177] Bei Bestrahlung mit UV-Licht (360-370 nm) wird die C-O-Bindung im Pyranring heterolytisch gespalten. Es entsteht eine zwitterionische, konjugierte Spezies; die sogenannte Merocyanin-Form. Diese besitzt ein rotverschobenes Absorptionsmaximum und eine stark erhöhte Polarität im Vergleich zur Spiropyran-Form. Diese Isomerisierung ist ebenfalls thermisch und photochemisch (> 460 nm) reversibel. Das Gleichgewicht der beiden Spezies kann durch Erhöhung der Polarität der Umgebung und durch Einführung eines Nitro-Substituenten am Phenyling in Richtung der farbigen Form verschoben werden.^[178]

Der Schaltmechanismus der Diarylethene beruht ebenfalls auf einer Ringschluss-/Ringöffnungsreaktion und ähnelt dem von Stilben. Durch eine lichtinduzierte, konrotatorische Zyklisierung des Hexatriens wird die gewinkelte, offene Form in eine planare, farbige Form überführt. Dieser Vorgang ist als einziger

unter den hier genannten Photoschaltern thermisch irreversibel. In Kapitel III.2.3 wird genauer auf die Entwicklung und Eigenschaften der Diarylethen-Photoschalter eingegangen.

Die hier beschriebenen photochromen Eigenschaften von Photoschaltern machen sie zu einem wichtigen Werkzeug, um biologische Systeme reversibel und nicht-invasiv zu steuern. Dabei steht in dieser Arbeit vor allem die Anwendung in Nukleinsäuren im Vordergrund. Um die Bedeutung photoschaltbarer DNA hervorzuheben, sollen im Folgenden einige ausgewählte Beispiele beschrieben und erläutert werden.

2.2 Photoschaltbare DNA

Unter allen Photoschaltern wurden Azobenzole am genauesten untersucht und besitzen die größte Anwendungsbreite.^[167] Da sie synthetisch leicht zugänglich sind, mit hohen photochromen Ausbeuten und schnell in die farbige Form überführt werden können und relativ stabil sind, werden sie zur Lösung vielfältiger Problemstellungen verwendet.^[179] Neben der Anwendung in Peptiden, wie zum Beispiel bei der Beeinflussung der Proteinfaltung,^[180] können sie auch zur räumlich und zeitlich aufgelösten Steuerung der Hybridisierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Dabei kann das jeweilige Oligomer an verschiedenen Positionen mit einem photochromen Molekül modifiziert werden.

Es gibt die Möglichkeit, Azobenzole oder Stilbene als nicht-nukleotidische Linker in das Phosphatrückgrat eines selbstkomplementären DNA-Oligomers einzubringen. Dadurch erhält man schaltbare DNA-Haarnadelstrukturen.^[181-185] Liegt dabei der Photoschalter in der *trans*-Form vor, weisen die Duplexe ungewöhnlich hohe Schmelztemperaturen auf. Wird in die *cis*-Form geschaltet, destabilisiert sich die Haarnadel. Das kann zu Schmelztemperaturunterschieden von über 20 °C führen. Diese Tatsache ist entgegen der Vorstellung, dass die gewinkelte Anordnung in der *cis*-Form ein geeigneteres Haarnadelrückgrat bilden sollte und damit theoretisch die benachbarten Stränge in eine geeignete Konformation zwingt, die eine Haarnadelstruktur stabilisiert. Der Grund für diese nicht-intuitiven Ergebnisse sind die unterschiedlichen Stärken der π - π -Wechselwirkungen der beiden Isomere. Die jeweilige *cis*-Form kann auf Grund der Verdrillung der aromatischen Reste (bis 50°) schlechter unpolare Wechselwirkungen mit den benachbarten Basen ausbilden. Zusätzlich ist die gewinkelte Form zu kurz als dass sie als stabile Schlaufenstruktur

für die Haarnadel dienen kann. Die *trans*-Form hingegen kann mit ihrer planaren Struktur ausgesprochen gute π - π -Wechselwirkungen mit den benachbarten Basen ausbilden und dient so als hydrophobe Endmodifikation zur Stabilisierung. Dies kann aber auch dazu führen, dass ausgesprochen stabile Konformationen gebildet werden, sodass der Chromophor nicht mehr in die *cis*-Form geschaltet werden kann. Dies limitiert die Anwendung dieser photoschaltbaren Haarnadeln.

Eine weitere Möglichkeit zur Steuerung der Hybridisierung von DNA-Doppelsträngen ist die Modifikation eines Nukleotids. *Gupta* und seine Mitarbeiter^[186] brachten eine Azobenzol-Einheit durch eine postsynthetische Alkylierungsreaktion an Thiophosphat-modifizierte Oligomere an. Dabei konnten sie nicht nur Schmelztemperaturunterschiede zwischen *cis*- und *trans*-Isomer, sondern auch für unterschiedliche *S*- und *R*-Konfigurationen des Thiophosphats beobachten. Dabei lieferte eine *trans-R*-Kombination generell höhere Schmelztemperaturen als die entsprechende *cis-S*-Kombination.

Trotz der vielen Möglichkeiten, DNA zu modifizieren, ist immer noch der Einbau eines phosphoramiditmodifizierten Photoschalters als Nukleosidersatz durch Standardfestphasensynthese das Mittel der Wahl.^[187] Neben Spiropyranen, die allerdings vergleichsweise geringen Einfluss auf die DNA-Struktur haben^[188-189] oder ihre photochromen Eigenschaften in der DNA-Umgebung verlieren,^[190] nutzt man auch hier vor allem Azobenzole. Der geringe Aufwand für synthetische Modifikationen und ihr großer Einfluss auf Strukturänderungen in DNA machen sie so zu einem vielseitigen Werkzeug. Die ersten Arbeiten hierzu machten *Asanuma* und *Komiyama et al.*^[191-192] Sie bauten einen Azobenzol-Photoschalter über einen kurzen diastereomeren Linker in DNA-Stränge ein (s. Abbildung 42, links). Die Diastereomere konnten mittels *Reversed-Phase*-HPLC getrennt werden und zeigten bei Bestrahlung mit UV-Licht dasselbe Verhalten. **5-*dia-trans*** stabilisiert den Duplex um 8.9 °C bzw. 5.2 °C im Vergleich zu **5-*dia-cis***. Durch NMR-Messungen in Lösung konnte gezeigt werden, dass die *trans*-Form in den Basenstapel interkaliert und über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierend wirkt. Bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht oder thermisch, kann dieser Vorgang rückgängig gemacht werden und ist damit komplett reversibel. Mit diesem System gelang es die Bildung von Triplex-Strukturen,^[193-194] DNA-Polymerase-Aktivitäten^[157] und die Substratbindung bei RNA-spaltenden DNAzymen^[195-196] reversibel zu steuern.

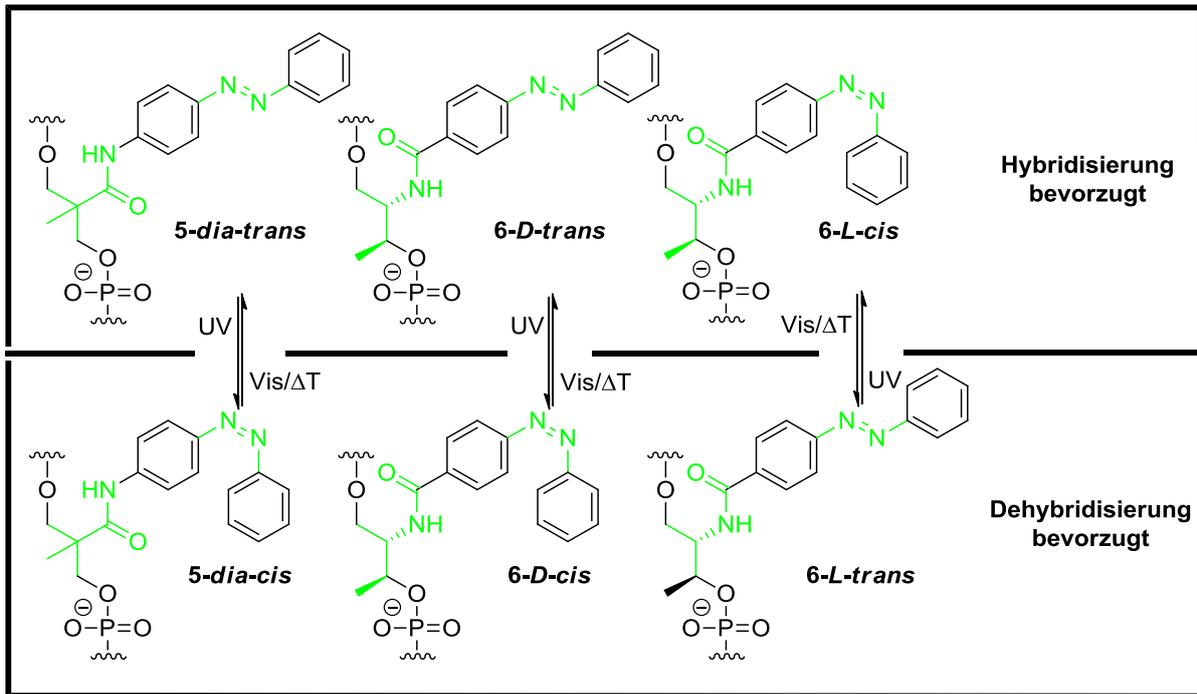


Abbildung 42: Einfluss der verschiedenen Isomere und Konfigurationen (jeweils grün hervorgehoben) von Azobenzol-Nukleotidsurrogaten auf die Duplexstabilität.

Für die Modifikation mit nur einem Photoschalter ist der kurze, diastereomere Amidlinker sehr gut geeignet, da eine Trennung der Isomere durch *Reversed-Phase*-HPLC möglich ist. Manche Problemstellungen verlangen allerdings den Einbau von mehreren photochromen Molekülen in einen DNA-Strang. Damit erhöht sich die Zahl der zu trennenden Isomere exponentiell und ist für praktische Anwendungen nicht mehr geeignet. Daher entwickelten *Asanuma*, *Komiyama* und ihre Mitarbeiter^[197-198] einen Threoninol-Linker, der ausgehend von chiralem Startmaterial enantiomerenrein synthetisiert werden kann und dessen Struktur ähnlich zu dem ersten Linker Design ist. Dadurch konnten sie durch automatisierte Festphasensynthese bis zu 10 Azobenzol-Einheiten in ein Oligomer einbauen, ohne dass der Duplex stark destabilisiert wurde. Durch diesen Mehrfacheinbau gelang es, sehr große Schmelztemperaturunterschiede beim reversiblen Schalten von *cis* zu *trans* und umgekehrt zu erreichen.^[199] Des Weiteren untersuchten sie auch den Einfluss der Konfiguration des Linkers auf die Wechselwirkung von Photoschalter und DNA (s. Abbildung 42, mitte und rechts).^[200] Zum einen bildet **6-D** grundsätzlich stabilere Duplexe aus als **6-L**. Zum anderen zeigt **6-L** als einziger bisher publizierte Azobenzol-Photoschalter einen umgekehrten Einfluss auf die Hybridisierung. Im Gegensatz zum *D*-Isomer destabilisiert die *trans*-Form den Duplex, wohingegen bei Bestrahlung mit UV-Licht die gebildete *cis*-Form stabilisierend wirkt. Durch molekulare Modellierung konnte dieses inverse Verhalten erklärt werden. **6-L-cis**

liegt außerhalb des Doppelstrangs und ragt dort in die kleine Furche. **6-L-trans** hingegen interkaliert in den Duplex und stört dort die lokale Helixstruktur, wodurch der Strang destabilisiert wird. Dadurch könnte prinzipiell durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge Hybridisierung und gleichzeitig Dehybridisierung ausgelöst werden, was die Dimensionen der Photokontrolle um einen Faktor erhöhen würde.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse entwickelte die Gruppe um *Asanuma* eine lichtgetriebene Nanomaschine (s. Abbildung 43).^[150] Sie synthetisierten einen Templatstrang, der an den Enden mit Pyren (**Py**) und (6-Fluorescein-6-carboxyamido)hexanoat (**FAM**) versehen und mit einem kurzen unmodifizierten Gegenstrang hybridisiert wurde (Domäne 1). Die überstehenden Enden wurden mit zwei DNA-Strängen hybridisiert, die an den Enden Fluoreszenzlöscher tragen (Anthraquinon und 4-Dimethylaminobenzol-4'-carbonsäure), so dass die Fluoreszenz von **Py** und **FAM** durch die räumliche Nähe zu diesen im Doppelstrang gelöscht wird. Zusätzlich wurden jeweils 5 Bausteine zweier unterschiedlicher Azobenzol-Photoschalter über den *D*-Threoninol-Linker in diese Einzelstränge eingebaut.

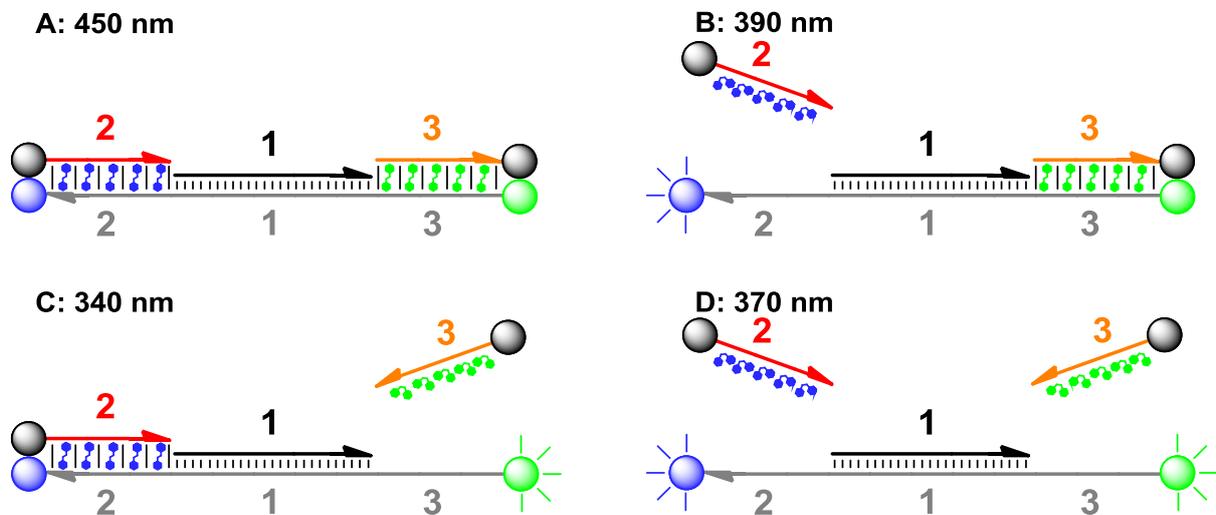


Abbildung 43: Lichtgetriebene Nanomaschine von *Asanuma et al.*^[150]

Diese lassen sich bei Bestrahlung mit 340 nm (blau) und 390 nm (grün) jeweils selektiv und bei 370 nm gleichzeitig in die *cis*-Form schalten. Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 450 nm werden beide Schalter wieder in die *trans*-Form geschaltet. Wie oben erläutert, stabilisiert die *cis*-Form den Duplex, wohingegen die *trans*-Form destabilisierend wirkt. Dadurch lässt sich diese Nanomaschine zwischen 4 verschiedenen Zuständen bei Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlängen schalten. Mit 450 nm liegen alle Schalter in der *trans*-Form vor und die Domänen 2

Photoschalter zur reversiblen Steuerung von DNA

und 3 sind hybridisiert (**A**), wobei die Fluoreszenz von **Py** und **FAM** gelöscht wird. Bei Belichtung mit 390 nm schaltet der Photoschalter in Domäne 2 in die destabilisierende *cis*-Form, Domäne 2 dehybridisiert und die blaue **Py**-Fluoreszenz kann detektiert werden (**B**). Dasselbe geschieht mit Domäne 3 bei Belichtung mit 340 nm, wobei hier Fluorescein grün emittiert (**C**). Bestrahlt man die Nanomaschine mit einer Wellenlänge von 370 nm können beide Photoschalter in die *cis*-Form geschaltet werden, die Domänen 2 und 3 dehybridisieren gleichzeitig und man erhält eine Mischung aus der grünen **FAM**- und der blauen **Py**-Fluoreszenz (**D**). Es kann in bis zu 5 Zyklen zwischen den einzelnen Zuständen stabil geschaltet werden.

Dieses Beispiel zeigt ganz klar die Leistungsfähigkeit molekularer Photoschalter zum Einsatz in lichtgetriebenen Nanomaschinen. Allerdings gibt es hier auch einige Limitierungen. Zum einen ist, wie in Kapitel II.3 beschrieben, eine Fluorophor/Fluoreszenzlöscher-Kombination zur Detektion von Hybridisierungsvorgängen nicht ideal. Zum anderen mussten auf Grund des Designs alle Experimente bei 47.5 °C durchgeführt werden. In Hinblick auf die thermische Reisoomerisierung von Azobenzolen führt das zu ungewolltem Schalten zwischen den einzelnen Zuständen. Außerdem lagen die photochromen Ausbeuten durchgehend unter 70%. Das bedeutet, dass es immer zu einer Mischung der jeweiligen Zustände kommt.

Diese Nachteile können durch die Verwendung von wellenlängenverschiebenden DNA-Sonden (wie zum Beispiel **TO** und **TR**) und thermisch irreversiblen Photoschaltern mit hohen photochromen Ausbeuten verhindert werden.

Eine Klasse von photochromen Molekülen, die diese Voraussetzungen erfüllen, sind die Diarylethene. Auf Grund der zentralen Bedeutung für diese Arbeit, werden im Folgenden deren Entwicklung und Eigenschaften anhand einiger Beispiele beschrieben.

2.3 Entwicklung der Diarylethene und bisherige Anwendungen in DNA

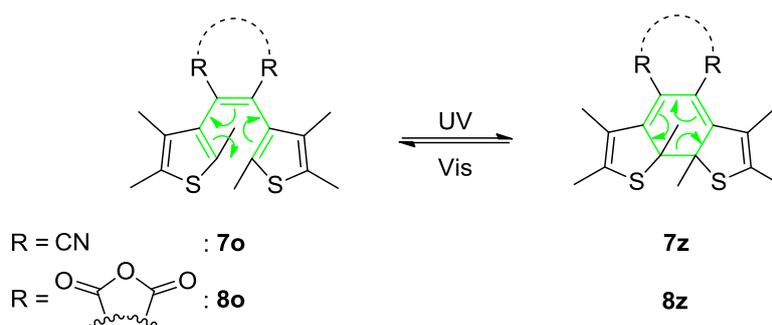
In Kapitel III.2.1 wurde gezeigt, dass zur Anwendung in Oligonukleotiden vor allem Photoschalter, deren Photochromie auf einer *cis-trans*-Isomerisierung basieren, verwendet werden. Unter diesen hat allerdings die Klasse der Stilbene den großen Nachteil, dass sie unter oxidativen Bedingungen unter formeller Abspaltung von elementarem Wasserstoff irreversibel zu Phenanthren reagieren. Außerdem zeigen alle bisher beschriebenen Photoschalter thermische Reversibilität, wodurch deren

Anwendungsspektrum stark eingeschränkt ist. Daher wurden in der Vergangenheit verschiedene Möglichkeiten untersucht, stabile und thermisch irreversibel schaltende, photochrome Moleküle herzustellen.

Ein naheliegender Schritt, um die oxidative Zersetzung von 2,6-Dihydrophenanthren zu verhindern ist die Einführung von Alkylgruppen in der 2- und 6-Position.^[201] Dadurch wird auch in Anwesenheit von Sauerstoff die Eliminierungsreaktion unterdrückt und es kann reversibel über einen Ringschluss-/Ringöffnungsmechanismus zwischen *cis*-Stilben und 2,6-Dihydrophenanthren geschaltet werden. Letzteres ist planar und besitzt ein größeres, konjugiertes π -Elektronensystem, sodass dessen Absorptionsmaximum in den sichtbaren Teil des Spektrums verschoben ist. Allerdings ist die thermische Stabilität von 2,6-Dihydrophenanthren mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1.5$ min sehr gering und schaltet bei RT schnell in die *cis*-Form des Stilbens zurück. Außerdem steht der Ringschluss bei Anregung von *cis*-Stilben in Konkurrenz mit der Reisomerisierung zu *trans*-Stilben. Durch beide Effekte sind die photochromen Ausbeuten sehr gering und der Photoschalter kann in Hinblick auf die Steuerung von biologischen Systemen und Nanomaschinen nicht verwendet werden.

Bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts beschäftigten sich *Kellogg et al.* mit der photochemischen Kondensation aromatischer Ringsysteme. Im Zuge dessen fanden sie heraus, dass thienylsubstituierte Diarylethene in Abwesenheit von Licht und Sauerstoff 12-15 h stabil bleiben. Auf Basis dieser Beobachtungen entwickelten *Irie* und seine Mitarbeiter thermisch irreversible, photochrome Systeme (s. Schema 2).^[201] Sie synthetisierten Dithienylethen-Photoschalter, die an der jeweiligen 2- und 6-Position mit Methylgruppen substituiert sind, um eine oxidative Zersetzung zu verhindern. Des Weiteren wurde die Ethen-Einheit mit zwei Cyaniden (**7**) bzw. Maleinsäureanhydrid (**8**) substituiert. Dadurch wird zum einen das Absorptionsmaximum bathochrom verschoben. Zum anderen wird so eine *trans*-Isomerisierung verhindert. Die jeweiligen geschlossenen Formen **7z** und **8z** sind im Dunklen über mindestens 3 Monate bei 80 °C stabil. Bei Belichtung mit sichtbarem Licht kommt es sofort zur Zykloreversion und man erhält die offenen Formen **7o** und **8o**.

Photoschalter zur reversiblen Steuerung von DNA



Schema 2: Erste thermisch irreversible Diarylethen-Photoschalter von Irie et al.^[201]

Daraufhin konnten im Weiteren verschiedene Diarylethene synthetisiert und charakterisiert werden, die zum Beispiel Thiophen-^[202] Furan-^[203] Indol-^[204] Selenophen-^[205] oder Thiazoleinheiten^[206] beinhalten. Auch viele unsymmetrische Photoschalter, die mit zwei verschiedenen Arylresten substituiert sind wurden bereits beschrieben.^[207-209] Dabei zeigte sich, dass nicht alle geschlossenen Formen dieser Diarylethene thermisch stabil sind. Die geschlossenen Formen von pyrrol-, indol- oder phenylsubstituierten Photoschaltern werden bei 80 °C, mit Halbwertszeiten im Bereich von Minuten, wieder geöffnet, wobei Diarylethene, die furan-, thiophen-, selenophen- oder thiazolsubstituiert sind teilweise bis über 90 d stabil bleiben.^[205, 210] Es liegt nahe, dass diese Diskrepanzen auf die unterschiedlichen Stabilisierungsenergien der Aromaten zurückzuführen sind. Um dies zu belegen, wurden semiempirische Berechnung an Stilben und verschiedenen heteroaromatsubstituierten Diarylethenen durchgeführt (s. Abbildung 44).^[173] Nach den *Woodward-Hoffmann*-Regeln für 1,3,5-Hexatrien ist eine konrotatorische Zyklisierung photochemisch und eine disrotatorische Zyklisierung thermisch erlaubt. Bei einer Zyklisierung aus dem Grundzustand müssen für Diarylethen-Photoschalter Energiebarrieren (ΔE_Z) von bis zu 42 kcal/mol überwunden werden. Deswegen ist eine thermische Zyklisierung, obwohl von den Orbitalsymmetrien erlaubt, praktisch nicht zu beobachten. Für die angeregten S_1 -Zustände von offener und geschlossener Form liegen die Energiebarrieren wesentlich niedriger. Daher findet eine Zyklisierung nur photochemisch statt.

Die Energiebarrieren für den umgekehrten Prozess (ΔE_{ZR}), die Zyklereversion aus dem Grundzustand, hängen direkt mit dem Grundzustandsenergieunterschieden von offener zu geschlossener Form zusammen. Sind diese hoch, wird ΔE_{ZR} klein und ein thermisches Öffnen des Schalters ist schnell. Sind diese klein, ist ΔE_{ZR} hoch, so dass eine thermische Zyklereversion praktisch nicht zu beobachten ist.

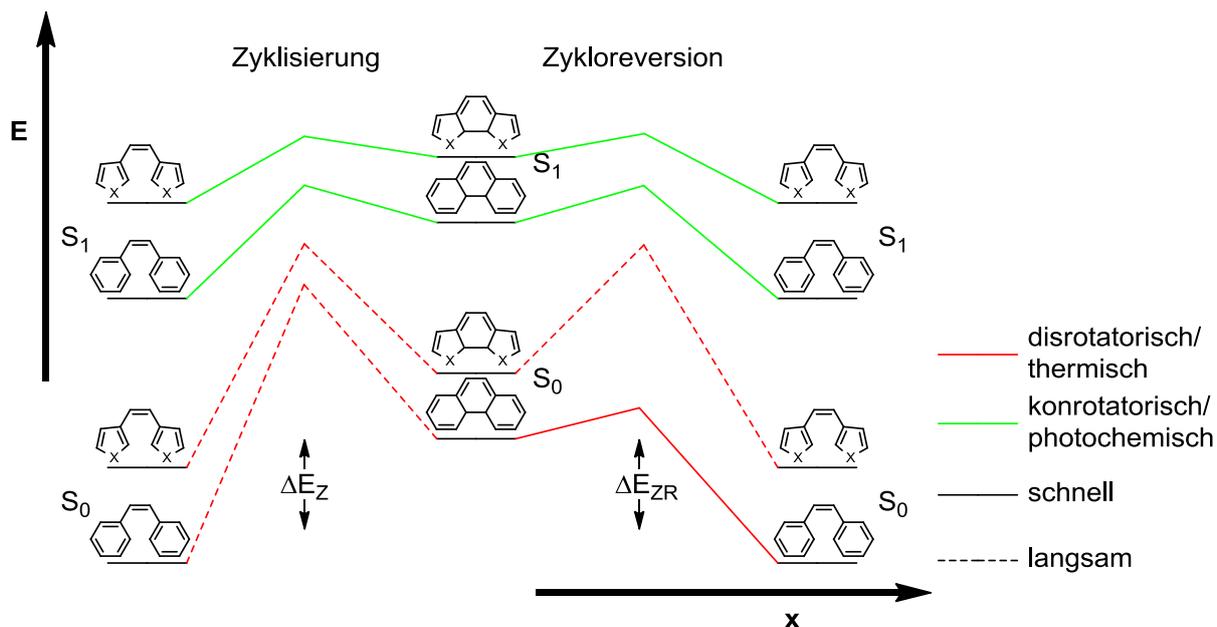


Abbildung 44: Vereinfachte Darstellung der Energie-Reaktionsweg-Diagramme für Stilben und heteroaromatensubstituierte Diarylethene bei Zyklisierung und Zykloreversion.

Für ein konrotatorisches Öffnen der Schalter liegen bei allen Aromaten die Energiebarrieren niedrig, sodass eine photochemische Zykloreversion schnell stattfindet. ΔE_{ZR} korreliert mit den aromatischen Stabilisierungsenergien der jeweiligen Aromaten. Diese sind für Furan, Thiophen, Selenophen und Thiazol klein und bei Phenyl, Pyrol Indol groß. Damit ergibt sich insgesamt ein stimmiges Bild. Diarylethene mit stabilen Aromaten schalten thermisch reversibel. Bei Diarylethenen, die mit eher weniger stabilen Aromaten substituiert sind, findet ein thermisches Öffnen des Schalters quasi nicht statt.

Diese Faustregel gilt allerdings nur für unsubstituierte Photoschalter. Elektronenziehende Substituenten an der Etheneinheit schwächen die geknüpfte C-C-Bindung, bei Bildung der geschlossenen Form und ermöglichen damit ein thermisches Öffnen.^[211-212] Dasselbe gilt für sperrige Substituenten an der 2- und 6-Position.^[213]

Ein weiterer Parameter, der für das Design eines Diarylethen-Photoschalters bedacht werden muss, ist die Anzahl der Zyklen, in denen noch stabil geschaltet werden kann. Während der Ringschluss- und Ringöffnungsreaktion können ungewollte Nebenreaktionen die photochrome Ausbeute verringern. Bei unsubstituierten Thienyl-Photoschaltern kann durch die Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff ein Endoperoxid entstehen oder Ringumlagerungen stattfinden.^[214] Das kann durch Alkylsubstituenten an der 4-Position des Thienyls oder durch die Verwendung von Benzothiophen umgangen werden, da beide Nebenreaktionen so unterdrückt

Photoschalter zur reversiblen Steuerung von DNA

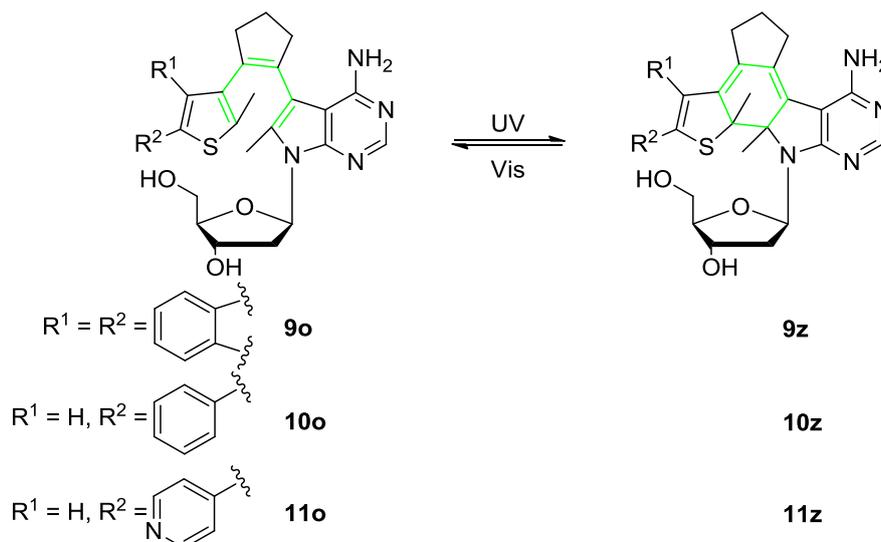
werden.^[215-216] Dadurch kann innerhalb von bis zu 10^4 Zyklen stabil geschaltet werden.

Durch diese enorme Stabilität über viele Schaltzyklen hinweg wurden Diarylethen-Photoschalter in logischen Schaltungen^[217] und zur molekularen Datenspeicherung^[218] eingesetzt. Auch im biologischen Bereichen, wie die Synthese schaltbarer Peptide^[219], deren reversible Bindung an DNA^[220] und die Steuerung der Enzymaktivität^[153], konnten Diarylethen-Photoschalter zur photoinduzierten Strukturänderung angewendet werden.

Die Beeinflussung der Stabilität und Struktur von DNA ist, wie in Kapitel III.2.2 beschrieben, grundlegend für die Entwicklung lichtgetriebener Nanomaschinen. Trotz dieser Tatsachen gibt es in der Literatur aber nur wenige Beispiele, die sich mit Diarylethenen in Zusammenhang mit DNA beschäftigen. Einen ersten nicht-kovalenten Ansatz hierzu machten *Feringa et al.*^[160] Sie synthetisierten einen ammoniumsubstituierten Dithienylethen-Photoschalter. Dieser ist auf Grund der positiv geladenen Seitenkette über einen weiten pH-Bereich wasserlöslich, wobei seine photochromen Eigenschaften erhalten bleiben. Die offene Form des Schalters bindet sich durch elektrostatische Wechselwirkungen an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA. Bei Belichtung mit nahem UV-Licht entsteht trotz der Aggregation die geschlossene Form. Im CD-Spektrum zeigte sich nach der Belichtung ein Signal im sichtbaren Wellenlängenbereich, in dem die geschlossene Form des Photoschalters ihr Absorptionsmaximum besitzt, und eine Reduzierung des Signals des Oligonukleotids. Dies deutet darauf hin, dass zum einen die DNA die Struktur des Schalters und auch der Schalter die Konformation der DNA beeinflusst. Um einen Hinweis auf die Art der Wechselwirkungen zwischen DNA und Schalter zu bekommen, wurden pH-abhängige Messungen durchgeführt. Bei steigendem pH-Wert verschwindet das CD-Signal und das Spektrum ähnelt wieder dem des reinen Oligonukleotids. Dies deutet sehr stark darauf hin, dass durch Deprotonierung der Ammoniumreste am Schalter die elektrostatischen Wechselwirkungen unterbrochen werden und somit keine Aggregation mehr stattfindet. Des Weiteren wurde der Einfluss der Sequenz auf die Bindung des Schalters untersucht. Durch Titrationsmessungen konnten die jeweiligen Bindungskonstanten berechnet werden und es zeigte sich, dass eine höhere Affinität zu AT-Sequenzen als zu GC-Sequenzen besteht. *Feringa* und seine Mitarbeiter führten das auf die höhere Ladungsdichte in reinen AT-Oligomeren zurück. Außerdem konnten signifikante Unterschiede zwischen den

beiden Oligonukleotiden in den CD-Spektren im Bereich der Absorption des geschlossenen Schalters festgestellt werden. Dadurch kann angenommen werden, dass die Art der Strukturbeeinflussung jeweils unterschiedlich ist. Eine genaue Aufklärung der Struktur und damit des Einflusses des Photoschalters auf die DNA-Konformation könnte hier bessere Einsicht in das System bringen. Schließlich wurden die Strukturvariationen bei mehreren Schaltzyklen durch Verfolgung des CD-Signals bestimmt. Eine reversible Konformationsänderung konnte auch noch nach 4 Schaltzyklen beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen einen ersten Schritt in Richtung der reversiblen Steuerung der Stabilität und Struktur von Nukleinsäuren durch Diarylethen-Photoschalter.

Einen kovalenten Ansatz verfolgt die Gruppe um *Jäschke*.^[221] Über eine Suzuki-Kreuzkupplung konnten sie verschiedene Thiophenderivate an 7-Deaza-2'-desoxyadenosin kuppeln. So erhielten sie drei verschiedene Diarylethen-Photoschalter, die Adenin als Aryl Einheit beinhalten (s. Schema 3).



Schema 3: 7-Deaza-2'-desoxyadenosin abgeleitete Diarylethen-Photoschalter von *Jäschke et al.*^[221]

Die photochromen Eigenschaften aller Photoschalter entsprechen denen der Diarylethene. Sie zeigen schnelle Isomerisierung, hohe photochrome Ausbeuten und stabiles, thermisch irreversibles Schalten. Durch die verschiedenen Substituenten, konnten die jeweiligen optischen Eigenschaften variiert werden. **10z** und **11z** zeigen jeweils rotverschobene Absorptionen im sichtbaren Teil des Spektrums und erreichen höhere photochrome Ausbeuten als **9z**. Außerdem kann für **11z** zusätzlich durch Zugabe von TFA eine bathochrome Verschiebung von 68 nm durch reversible Protonierung der Pyridin-Einheit erreicht werden.

Photoschalter zur reversiblen Steuerung von DNA

Der Vorteil dieses Designs ist die direkte Beteiligung der Nukleobase am Schaltvorgang. Es könnten durch das Schließen deren Basenpaarungseigenschaften in Oligonukleotiden einmal durch Änderung der Nukleosidkonformation von der natürlichen anti- in eine syn-Stellung oder durch direkte elektronische Kopplung beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang untersuchten *Jäschke et al.* die Basenpaarung von **9o – 11o** mit Thymidin über die Verschiebung des T-NH-Protons. Es zeigte sich für alle artifiziellen Nukleoside eine deutliche Verschiebung des Signals, was auf die Bildung von Basenpaaren mit Thymidin hinweist. Allerdings wurden diese Messungen nur an den offenen Monomeren und in organischen Lösemitteln durchgeführt. Es kann bezweifelt werden, dass diese Ergebnisse direkt auf eine mögliche Steuerung von Oligonukleotiden übertragbar sind.

In weiteren Arbeiten wurden außerdem die entsprechenden Uridin- und Cytosinderivate dieser Photoschalter hergestellt.^[158] Ausgehend von den kommerziell erhältlichen, iodierten Nukleobasen kann, wie oben, über eine Suzuki-Kupplung die Diarylethen-Einheit hergestellt werden. Dadurch muss auf eine der Methylgruppen im Ringschlussbereich verzichtet werden. Es zeigte sich allerdings, dass eine irreversible Oxidation trotzdem nicht stattfindet. Offensichtlich genügt nur die Schützung einer der Positionen durch eine Alkylgruppe. Des Weiteren zeigte die geschlossene Form des dC-Derivats eine geringe thermische Stabilität. Der nächste Schritt wäre hier die Umsetzung der Nukleoside zum DMTr-geschützten Phosphoramidit und der Einbau in DNA über die Standardfestphasensynthese. Dies war aber offensichtlich nicht möglich. So wurde der Weg über eine postsynthetische Suzuki-Kupplung an 5-ioddesoxyuridinmodifizierte Oligomere gewählt. Bemerkenswerterweise konnte so die DNA mit guten Ausbeuten (bis 35%) mit einer Diarylethen-Einheit versehen werden. Belichtungsexperimente mit der photoschaltermodifizierten DNA zeigten, dass auch in der DNA-Umgebung stabil geschaltet werden kann. Allerdings verschlechterten sich die optischen Eigenschaften enorm. Die photochrome Ausbeute und der Extinktionskoeffizient der geschlossenen Form verringern sich in DNA, obwohl mit 366 nm eine selektive Anregung neben der DNA-Absorption möglich sein sollte. Des Weiteren konnte kein Einfluss auf die Duplexstabilität (Schmelztemperaturen) oder die DNA-Struktur (CD-Spektren) festgestellt werden. *Maeda* und *Spada*^[222-223] zeigten bereits, dass eine Modifikation von Nukleotiden direkt an der Base durch photochrome Moleküle eine Steuerung der DNA-Konformation ermöglicht. Daher sind die Ergebnisse von

Jäschke und seinen Mitarbeitern kein prinzipielles, sondern ein spezielles Problem des individuellen Designs der Photoschalter.

Hier konnte dargelegt werden, dass es trotz des großen Potentials der Diarylethene nur wenige Arbeiten im Zusammenhang mit DNA gibt. Nicht-kovalente Experimente von *Feringa* zeigten, dass eine Strukturbeeinflussung möglich ist. Doch trotz der guten Ansätze von *Jäschke* konnte bisher kein kovalentes System in DNA beschrieben werden, das eine Konformationsänderung beim Schalten verursachen kann. Daher beschäftigt sich der folgende Teil dieser Arbeit mit dem Design und der Synthese von nukleosidischen Diarylethen-Photoschaltern. Diese sollen zuerst auf ihre photochromen Eigenschaften hin untersucht und dann in Oligonukleotide eingebaut werden.

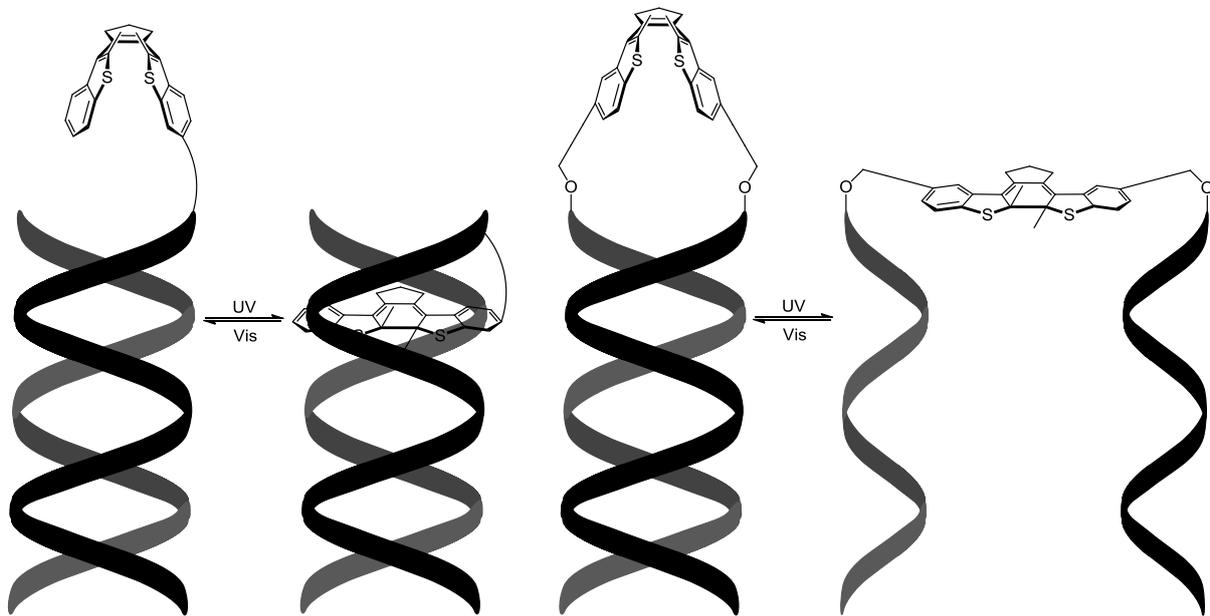


Abbildung 45: Mögliche Ansätze zur Strukturbeeinflussung von DNA durch kovalent gebundene Diarylethen-Photoschalter.

3 Nukleosidische Diarylethen-Photoschalter

Für das Design von Diarylethen-Photoschaltern müssen, wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, mehrere Faktoren beachtet werden. Es sollte die photochrome Einheit stabil und reversibel in mehreren Zyklen geschaltet werden können. Eine Cyclopenteneinheit als Brücke zwischen den Arylresten ist nicht elektronenziehend und kann nicht in die *trans*-Form isomerisieren. Methylreste an der 2- und 6-Position des Schalters verhindern eine oxidative Zersetzung haben aber auch keinen großen sterischen Anspruch, sodass eine Destabilisierung der gebildeten Bindung beim Ringschluss verhindert werden kann. Der Arylrest sollte zum einen eine geringe aromatische Stabilisierungsenergie besitzen, um eine thermische Reversibilität ausschließen zu können. Zum anderen sollte die jeweilige 4-Position alkylsubstituiert sein, um Nebenreaktionen während des Schaltvorgangs zu verhindern. Derivate des Benzothiophens sind dazu gut geeignet, vor allem weil durch das erweiterte π -Elektronensystem im Vergleich zum Thiophen eine bathochrome Verschiebung von Absorption und gegebenenfalls auch der Fluoreszenz erreicht werden kann. Ein Bis(2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopenten (**12**) als Grundgerüst erfüllt alle genannten Kriterien (s. Abbildung 46).

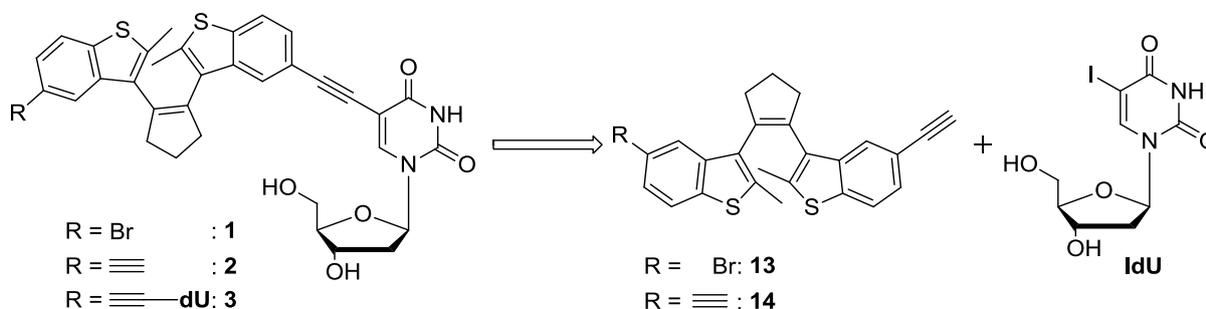


Abbildung 46: Design und Synthesepfad für nukleosidische Diarylethen-Photoschalter.

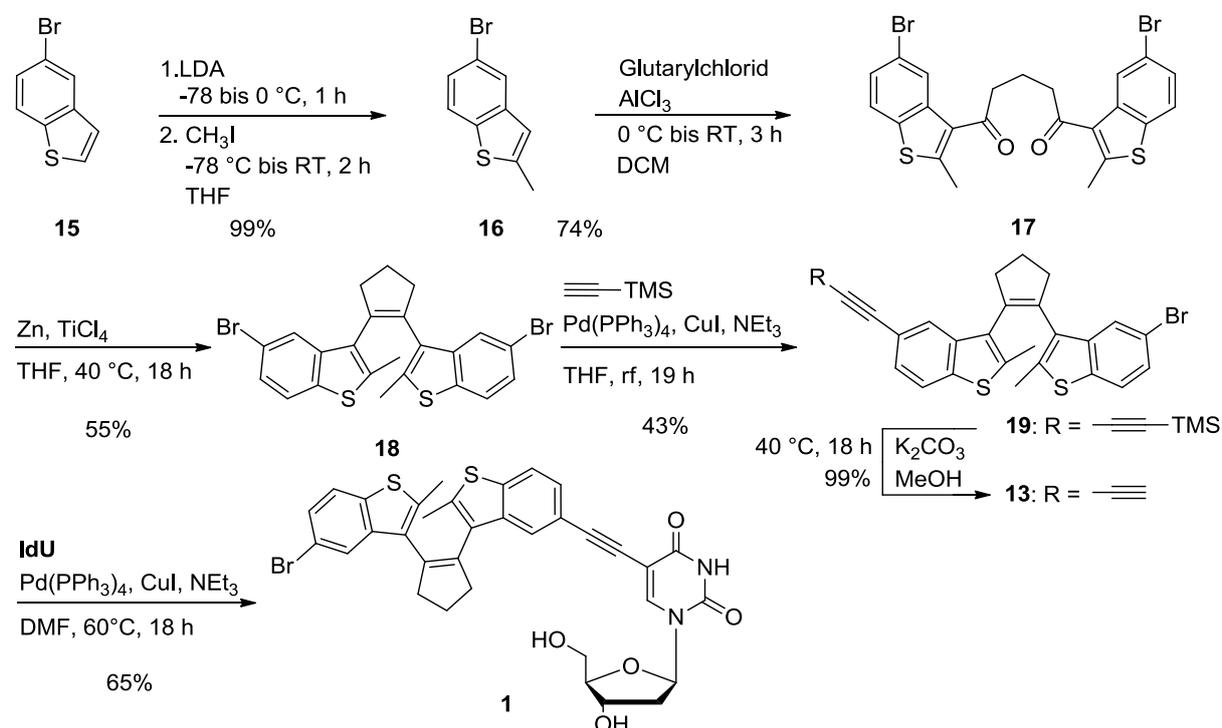
Dieses muss zusätzlich so modifiziert werden, dass ein Einbau in DNA möglich ist. Es wurde bereits beschrieben, dass künstliche Bausteine, die an der 5-Position von 2'-Desoxyuridin (**dU**) angebracht werden, in die große Furche der DNA-Helix ragen können. Dadurch kommt es zu intensiven Wechselwirkungen zwischen DNA und Chromophor, ohne deren Stabilität stark zu erniedrigen.^[224] Das ist, wie oben gezeigt, entscheidend für die reversible Steuerung der Struktur und Konformation von Nucleinsäuren durch Photoschalter. Wird diese Anknüpfung über eine Acetylenbrücke vorgenommen, kann zusätzlich eine elektronische Kopplung

zwischen Chromophor und Base erreicht werden.^[225] Daher wird im Folgenden die Synthese zweier alkinmodifizierter Diarylethen-Photoschalter (**13** und **14**) und deren Kupplung an 5-Iod-2'-desoxyuridin (**IdU**) zu drei verschiedenen nukleosidischen Photoschaltern (**1**, **2** und **3**) beschrieben.^[226-227] Dabei soll die freie Alkingruppe von **2** die Möglichkeit einer postsynthetischen Modifikation der Photoschalter-DNA offen lassen. Das symmetrische Nukleosid **3** kann als schaltbare Brücke zwischen zwei DNA-Doppelsträngen dienen.

3.1 Synthese

Die hier verwendete Syntheseroute wurde 1998 relativ zeitgleich von *Feringa*^[228] und *Fan*^[229] beschrieben. Ein Thiophenderivat, das je nach Problemstellung mit verschiedenen Substituenten modifiziert sein kann, wird zuerst durch eine *Friedel-Crafts*-Acylierung mit Glutarylchlorid zum symmetrischen Diketon umgesetzt. Der Ringschluss zu Cyclopenten erfolgt mittels *McMurry*-Kupplung und ergibt das Diarylethen-Grundgerüst. Die großen Vorteile dieser Methode sind hohe Ausbeuten, eine kurze Syntheseroute und günstige Ausgangsmaterialien.

Die Synthese des nukleosidischen Photoschalters **1** geht von kommerziell erhältlichen 5-Brombenzo[*b*]thiophen (**15**) aus (s. Schema 4).^[226] Der Bromsubstituent wird für die spätere Sonogashira-Kupplung benötigt. **15** konnte mit nahezu quantitativer Ausbeute zum Methylderivat **16** und anschließend mit Glutarylchlorid zum dementsprechenden Diketon **17** umgesetzt werden. Als Lösungsmittel wurde hier DCM gewählt, da es als ungiftige Alternative zu CS₂ oder Nitrobenzol verwendet werden kann und trotzdem gute Ausbeuten im Vergleich zur Literatur liefert.^[230]



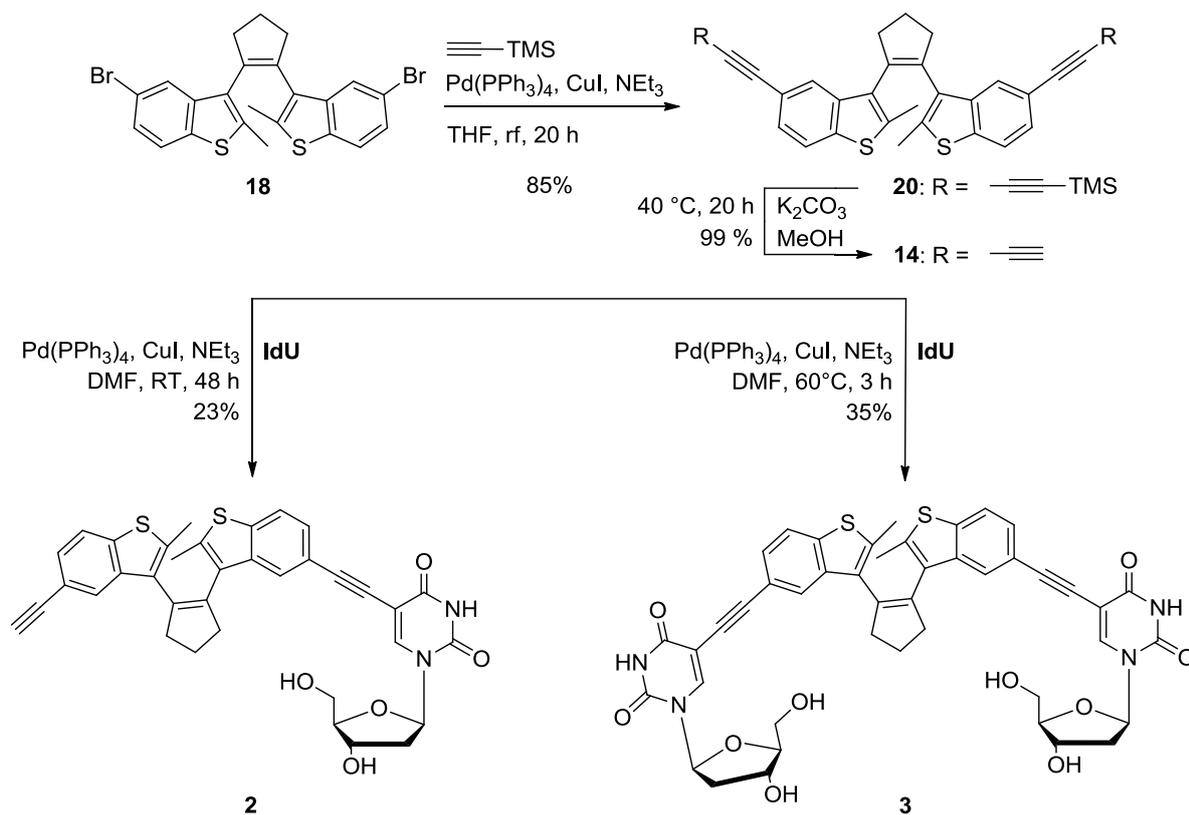
Schema 4: Synthese des nukleosidischen Photoschalters **1**.

Der Ringschluss zu **18** konnte durch *in situ* hergestelltes Ti(0) in einer *McMurry*-Kupplung erreicht werden. Die Ausbeute ist hierbei moderat, da relativ niedrige Reaktionstemperaturen gewählt werden mussten, um eine Debromierung zu verhindern. Zum anderen konnte die intermolekulare Kupplung zum

Hauptnebenprodukt zwar durch höhere Verdünnung der Reaktionsmischung verringert, aber nicht ganz verhindert werden.

Die Diarylethen-Einheit sollte über einen Acetylenlinker an den Zucker geknüpft werden. Dazu wurde **18** in einer Sonogashira-Kupplung zum alkinmodifizierten Photoschalter **19** umgesetzt. Die Monoselektivität wurde durch schrittweise Zugabe des $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ als Katalysator und Trimethylsilylacetylen gewährleistet. Nach quantitativer Entschützung des Alkins im Basischen wurde **13** in einer weiteren Sonogashira-Kupplung an **IdU** gekuppelt und es konnte so der nukleosidische Photoschalter **1** mit 65% Ausbeute erhalten werden.

Zur Synthese von **2** und **3** musste das Photoschaltergrundgerüst **18** mit zwei Alkinfunktionen versehen werden (s. Schema 5).^[227] Die Ausbeuten zur Herstellung von **20** waren wesentlich höher als die des monosubstituierten **19**, da hier bis zu 10 eq an Trimethylsilylacetylen verwendet werden konnten.



Schema 5: Synthese der nukleosidischen Photoschalter **2** und **3**.

Nach Entschützung der Dreifachbindungen zum doppelt alkinsubstituierten Diarylethen **14** konnte in einer einfachen Sonogashira-Kupplung das Nucleosid **2** bei RT mit einer Ausbeute von 23% erhalten werden. Eine Reaktionszeit von 48 h konnte vollen Umsatz sicherstellen. Bei der Synthese von **3** wurde die Reaktionstemperatur

auf 60 °C erhöht und die Reaktionszeit auf 3 h verkürzt. Dies war auf Grund der Reaktion an beiden Alkylgruppen möglich.

Vor der Synthese der jeweiligen DMTr-geschützten Phosphoramidite mussten zunächst die photochromen Eigenschaften der einzelnen nukleosidischen Photoschalter bestimmt werden, um die Eignung zum Einbau in DNA zu untersuchen. Dies wird im Folgenden beschrieben.

3.2 Photochrome Eigenschaften

Für reproduzierbare Ergebnisse ist es bei Belichtungen jeglicher Art entscheidend, eine wellenlängenselektive Anregung unter immer gleichen Bedingungen (Lichtintensität, Geometrie der Belichtungsapparatur) zu gewährleisten. Die Belichtung mit einer Hand-UV-Lampe, wie sie zum Beispiel *Jäschke et al.*^[158, 221] verwendeten, ist dazu nicht geeignet. Daher wurde für die folgenden Schaltexperimente eine 75 W Xe-Gasentladungslampe als Lichtquelle gewählt (s. Abbildung 47). Die Vorteile liegen hier in der relativ hohen, konstanten Lichtintensität über ein breites Spektrum an Wellenlängen (ca. 180 nm – 600 nm).

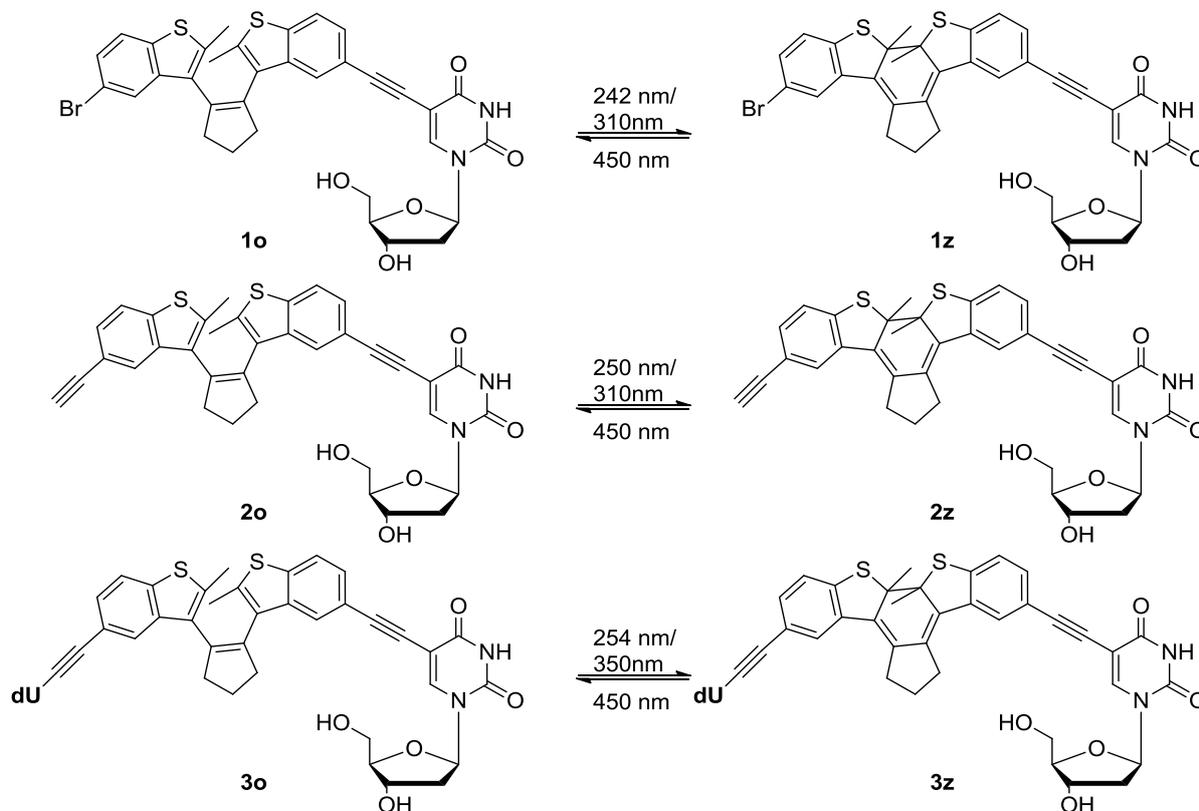


Abbildung 47: Apparatur zur Belichtung der nukleosidischen Photoschalter mit Lichtquelle (links) und Monochromator (rechts).

Um eine wellenlängenselektive Anregung zu gewährleisten, wurde das Licht durch einen Monochromator gefiltert (s.a. Kapitel III.7.4). Dieser konnte über eine spezielle Software gesteuert und die jeweilige Wellenlänge auf 0.1 nm genau eingestellt werden. Zusätzlich sind alle Komponenten der Apparatur auf einer gemeinsamen Platte verschraubt, so dass auch eine definierte Geometrie während den Belichtungen eingehalten werden kann. Die Experimente fanden außerdem in einem verdunkelten Abzug weitestgehend unter Lichtausschluss statt.

Das Absorptionsspektrum von **1o** zeigt ein Maximum bei 242 nm und eine Schulter bei 310 nm (s. Abbildung 48).^[226-227] Im Vergleich zum unsubstituierten Grundgerüst **12o** sind diese jeweils bathochrom verschoben, wobei der Effekt bei der Schulter (280 nm bei **12o**) größer ist als beim Absorptionsmaximum (238 nm bei **12o**,

s. Kapitel III.7.4, Abbildung 63 und Abbildung 64). Dies deutet darauf hin, dass die Absorption bei 310 nm aus dem ausgedehnten, konjugierten π -System von Benzothiophen- und Uracileinheit herrührt. Eine Belichtung von **1o** bei 242 nm führt zu einem Anstieg der Absorption bei 450 nm. Das ist auf die Bildung der geschlossenen Form zurückzuführen. Nach 30 min kommt es zu keiner Absorptionsänderung mehr und der photostationäre Zustand ist erreicht (**1z**). Bei Belichtung mit 450 nm sinkt diese Absorption innerhalb weniger Minuten wieder zu ihrem Anfangswert ab. Die Farbe der Lösung wechselt während der Belichtung von farblos zu gelb und wieder zu farblos.



Schema 6: Belichtungswellenlängen und Strukturänderungen bei den Schaltexperimenten von 1, 2 und 3; je links die offenen und je rechts die geschlossenen Formen.

Ein thermisches Öffnen wurde bei keinem der hier aufgeführten Photoschalter beobachtet. Vergleicht man dieses Verhalten mit dem von **12** bei Bestrahlung mit 238 nm und 450 nm erkennt man, dass die photochromen Eigenschaften auch nach Kupplung an das Nucleosid erhalten bleiben. Die optischen Eigenschaften von **2** sind sehr ähnlich zu denen von **1**. Wird bei dem leicht bathochrom verschobenen Absorptionsmaximum (250 nm) belichtet, bildet sich die gelbe, geschlossene Form. Diese kann wieder in die offene Form bei Belichtung mit 450 nm zurückgeführt werden.

Nukleosidische Diarylethen-Photoschalter

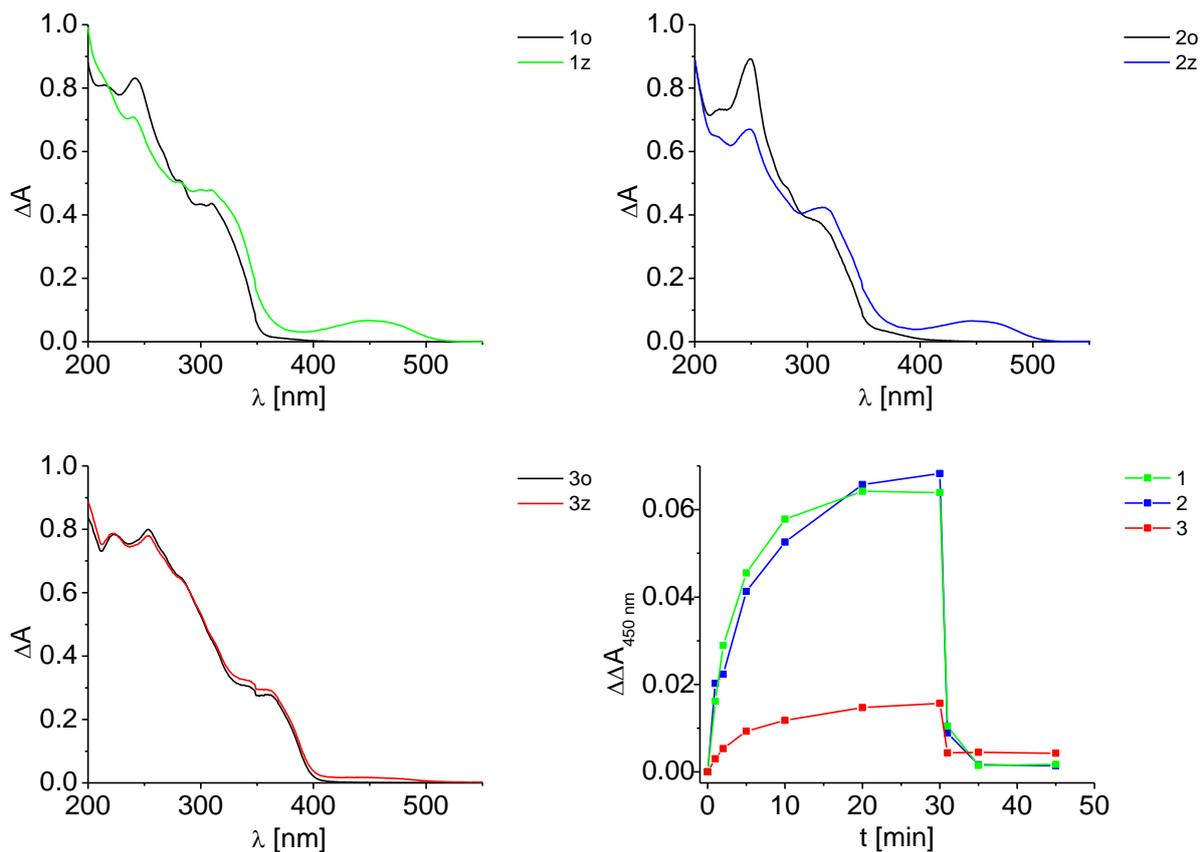


Abbildung 48: Absorptionsspektren der jeweiligen offenen (o) und photostationären Zustände (z) nach 30 min Belichtung von 1 ($\lambda_z = 242 \text{ nm}$, oben links), 2 ($\lambda_z = 250 \text{ nm}$, oben rechts) und 3 ($\lambda_z = 254 \text{ nm}$, unten links); zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung bei 450 nm der drei Belichtungen ($\lambda_o = 450 \text{ nm}$, unten rechts).

Der dritte nukleosidische Photoschalter **3** hat, im Vergleich zu **1** und **2**, dramatisch veränderte photochrome Eigenschaften. Die offene Form **3o** besitzt ein Absorptionsmaximum bei 254 nm und eine Schulter bei 350 nm. Bei Belichtung im Maximum wird zwar die geschlossene Form gebildet, aber zu wesentlich weniger Anteilen als bei **1** und **2**. Auch ein quantitatives Öffnen bei Belichtung mit 450 nm ist nicht möglich.

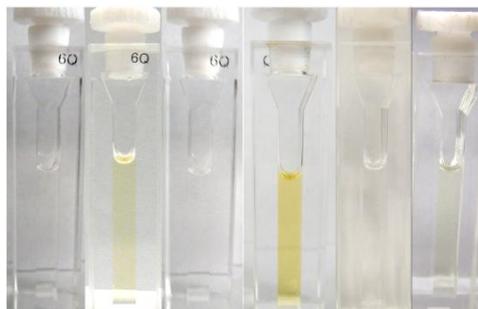


Abbildung 49: Bilder der Lösungen vor (je links) und nach (je rechts) Belichtung im Absorptionsmaximum von 1, 2 und 3 (von links nach rechts).

Die unterschiedlichen photochromen Eigenschaften werden besonders deutlich, wenn man die jeweilige Absorptionsänderung bei 450 nm gegen die Belichtungszeit

aufträgt (s. Abbildung 48). Offensichtlich führt ein Anbringen einer zweiten 2'-Desoxyuridineinheit an den Photoschalter zum Einbrechen der photochromen Ausbeuten und dessen Stabilität. Diese Unterschiede zwischen den photochromen Eigenschaften der einzelnen Schalter sind auch mit bloßen Auge zu erkennen (s. Abbildung 49).

Um dies mit Zahlen zu untermauern, wurden die jeweiligen photostationären Lösungen beim Schließen und Öffnen durch *Reversed-Phase-HPLC* analysiert (s. Kapitel III.7.5, Tabelle 13). Dabei wurde jeweils beim isosbestischen Punkt, der bei allen Belichtungen vorhanden war (s. Kapitel III.7.5, Abbildung 65 und Abbildung 66), detektiert, damit die Peakflächen direkt miteinander verglichen werden konnten. Außerdem wurde die HPLC isokratisch betrieben, um eine konstante Grundlinie und somit reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. **1** besitzt mit 35% eine zum unsubstituierten Photoschalter **12** (37%) vergleichbare photochrome Ausbeute. **2** kann mit einer höheren Ausbeute von 53% in die geschlossene Form geschaltet werden. Die Ausbeute beim Öffnen beider Schalter ist nahezu quantitativ. Bringt man eine zweite 2'-Desoxyuridineinheit an den Photoschalter an, sinkt die photochrome Ausbeute beim Schließen auf unter 5% ab (**3**). Außerdem lässt sich der Schalter nicht mehr vollständig öffnen (89%).

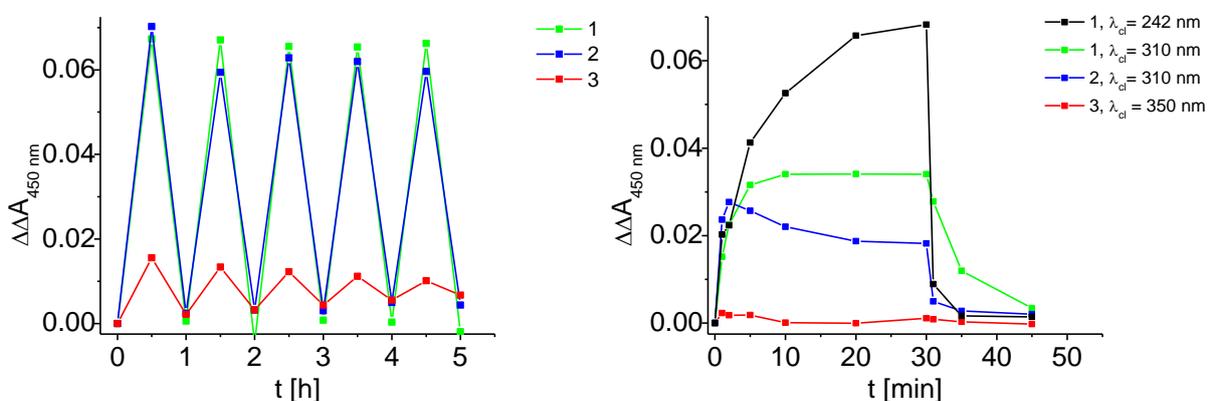


Abbildung 50: Stabilitätsmessung von **1** ($\lambda_z = 242 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$), **2** ($\lambda_z = 250 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$) und **3** ($\lambda_z = 254 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$) über mehrere Schaltzyklen hinweg (links) und zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung bei 450 nm bei Belichtung von **1** ($\lambda_z = 310 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$), **2** ($\lambda_z = 310 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$) und **3** ($\lambda_z = 350 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$) (rechts).

Des Weiteren kann die Stabilität eines Schalters durch Öffnen und Schließen in mehreren Zyklen bestimmt werden, indem man die jeweiligen Absorptionsunterschiede bei 450 nm gegen die Belichtungszeit mit jeweils wechselnden Wellenlängen aufträgt (s. Abbildung 50). **1** und **2** schalten über 5 Belichtungszyklen hinweg stabil. Bei **3** ist zu erkennen, dass der Absorptionsunterschied mit jedem Zyklus sinkt. Es kann demnach nicht stabil

geschaltet werden. Möglicherweise ist dieses Verhalten auf eine Ladungstrennung des angeregten Zustands zwischen dem relativ elektronenarmen Uracil und des Benzothiophens zurückzuführen, was schließlich zur Zersetzung des Schalters führt. Derartige Ladungstrennungen wurden bereits bei 5-modifizierten **dU** beobachtet.^[231]

Für die Anwendung von photochromen Molekülen in DNA ist es des Weiteren entscheidend, eine selektive Anregung des Schalters außerhalb der DNA-Absorption bei 260 nm zu gewährleisten. Bei direkter Belichtung der DNA-Basen kann es zu irreversiblen Schäden kommen, wie zum Beispiel zu einem 6-4-Photoschaden oder einer [2+2]-Zykloaddition zwischen zwei Thymidinen.^[232-235] Außerdem würde die photochrome Ausbeute durch den Filtereffekt der DNA bei Anregung unter 300 nm absinken. Aus diesem Grund wurde für alle nukleosidischen Photoschalter getestet, ob ein stabiles und effektives Schalten bei einer Wellenlänge über 300 nm möglich ist. Rechts in Abbildung 50 ist die zeitliche Absorptionsänderung bei 450 nm während der Belichtung mit 310 nm (**1**, **2**) und 350 nm (**3**) aufgetragen. Für **3** ist keine nennenswerte Absorptionsänderung bei 450 nm zu erkennen. Außerdem sinkt die Absorption der offenen Form unspezifisch ab. Ein ähnliches Verhalten zeigt **2**. Es schaltet zwar zuerst in die geschlossene Form, doch bei weiterer Belichtung sinkt die Absorption bei 450 nm und auch die des Edukts wieder unspezifisch ab. Das Verhalten beider Photoschalter kann durch Zersetzung der Moleküle erklärt werden. Einzig **1** lässt sich bei Belichtung mit 310 nm stabil und reversibel in die geschlossene Form überführen. Die photochrome Ausbeute ist dabei geringer als bei Belichtung mit 242 nm (20%), was auf den geringeren Extinktionskoeffizienten bei 310 nm zurückzuführen ist.

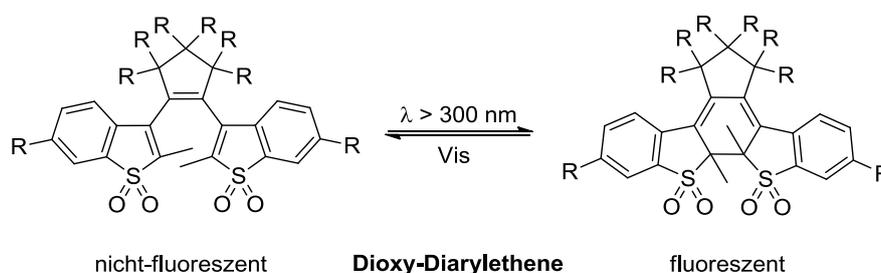
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle drei nukleosidischen Photoschalter bei Belichtung im Absorptionsmaximum in die jeweilige geschlossene Form überführt werden können. **3** zeigt dabei die geringste Ausbeute und degradiert über mehrere Schaltzyklen hinweg. Das photochrome Verhalten und die Ausbeute entsprechen bei **1** und **2** dem des Referenzschalters **12**. Somit konnte gezeigt werden, dass die einfache Kupplung von Diarylethen-Photoschaltern an **dU** möglich ist und die optischen Eigenschaften erhalten bleiben. Bei den Belichtungsexperimenten mit Wellenlängen über 300 nm zeigte sich, dass allein **1** stabil und reversibel geschaltet werden kann. Damit ist dieser Photoschalter als einziger für den Einbau und die Anwendung in DNA geeignet.

Während den oben beschriebenen Schaltexperimenten wurden auch Fluoreszenzspektren aufgenommen. Diese ergaben, dass alle geschlossenen Formen bei Anregung im sichtbaren (450 nm) keine Fluoreszenz zeigen ($\phi_z < 2.1\%$). Nur **3o** (Anregung bei 254 nm) zeigte mit $\phi_z = 12.7\%$ eine nennenswerte Emission, kann allerdings in DNA-Umgebung nicht stabil geschaltet werden. Das wurde auf die Ladungstrennung zwischen Diarylethen und Uracil zurückgeführt. Eine stabile und thermisch irreversible, photoschaltbare Fluoreszenzsonde in DNA konnte bisher noch nicht beschrieben werden, ist aber in Hinblick auf analytische und biologische Problemstellung interessant. Daher wird im Folgenden die Entwicklung eines fluoreszenten, schaltbaren Chromophors eingegangen, wobei sich, wegen der möglichen Destabilisierung, hier auf nicht-nukleosidische Photoschalter beschränkt wird.

4 Fluoreszente Diarylethen-Photoschalter

Eine Möglichkeit Fluoreszenz zu schalten, ist die Kombination eines nicht-fluoreszenten Diarylethens mit einem fluoreszenten Farbstoff.^[236-238] Wird der Schalter geschlossen, kommt es durch Energietransfer- oder Elektronentransferprozesse zur Löschung der Emission des Fluorophors. Durch das reversible Schalten des Diarylethens, kann so auch die Fluoreszenz des Farbstoffs reversibel geschaltet werden. Der große Nachteil dieser Methode sind die oft niedrigen Farbkontraste zwischen offener und geschlossener Form. Außerdem wären so zwei Modifikationen in DNA nötig.

Es wurden in der Vergangenheit bereits intrinsisch fluoreszente Diarylethen-Photoschalter beschrieben (s. Schema 7).^[239-240] Sie basieren auf den Sulfonsäurederivaten dem Grundgerüst von **12**.

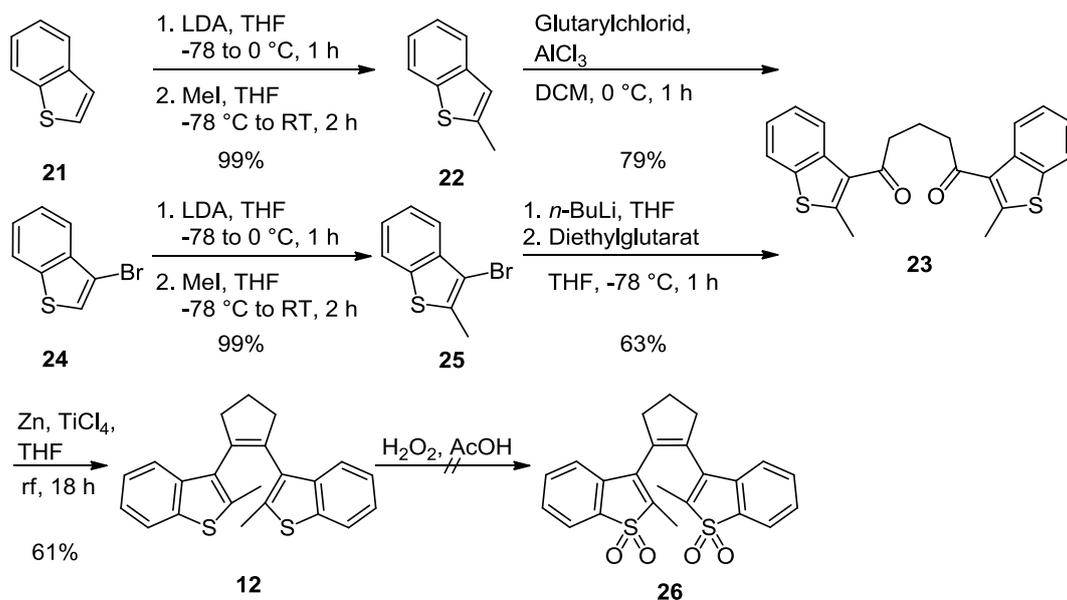


Schema 7: Sulfonsäurederivate von 12 als Design für intrinsisch fluoreszente, schaltbare Diarylethen-Photoschalter.

In der offenen Form sind diese nicht fluoreszent. Bei Bestrahlung mit UV-Licht wird in die geschlossene Form geschaltet und bei Anregung im Sichtbaren kommt es zur Emission. Durch weitere Modifikationen des Benzothiophens mit verschiedenen Aromaten konnte das π -Elektronensystem erweitert und dadurch sehr hohe Quantenausbeuten und photochrome Ausbeuten (jeweils bis über 90%) erreicht werden.^[241] Dieser Ansatz ist ideal für die kovalente Inkorporation und Anwendung als schaltbare, fluoreszente Sonde in DNA. Daher wird nun auf die Synthese eines Dioxy-Diarylethens eingegangen, das mit zwei Hydroxybenzylgruppen modifiziert ist, damit ein Einbau in DNA durch Standardfestphasensynthese möglich wird.

4.1 Synthese

Zur Synthese von **12** wird, wie in Kapitel III.3.1 bei der Synthese von **18** beschrieben, vorgegangen. Als kommerziell erhältliches Ausgangsmaterial muss hier unsubstituiertes Benzo[*b*]thiophen (**21**) verwendet werden, da ein Bromsubstituent durch die spätere Oxidation des Thiophenrings abgespalten wird (s. Schema 8). Durch Methylierung (**22**) und doppelter *Friedel-Crafts*-Acylierung konnte so das Diketon **23** in ähnlich guten Ausbeuten wie **17** erhalten werden. Alternativ kann **23** auch mittels Substitutionsreaktion von Diethylglutarat durch lithiiertes **25** erhalten werden, da hier im Gegensatz zur Synthese von **17** kein Brom in der 5-Position stört. Daher kann auch bei der anschließenden McMurry-Kupplung das Reaktionsgemisch bis auf Rückflusstemperatur erhitzt werden. Durch die erhöhte Temperatur wird, wegen des höheren Gewichts der Entropie in der Gibbs-Helmholtz-Gleichung, weniger des intermolekularen Hauptnebenprodukts zu Gunsten von **12** gebildet.



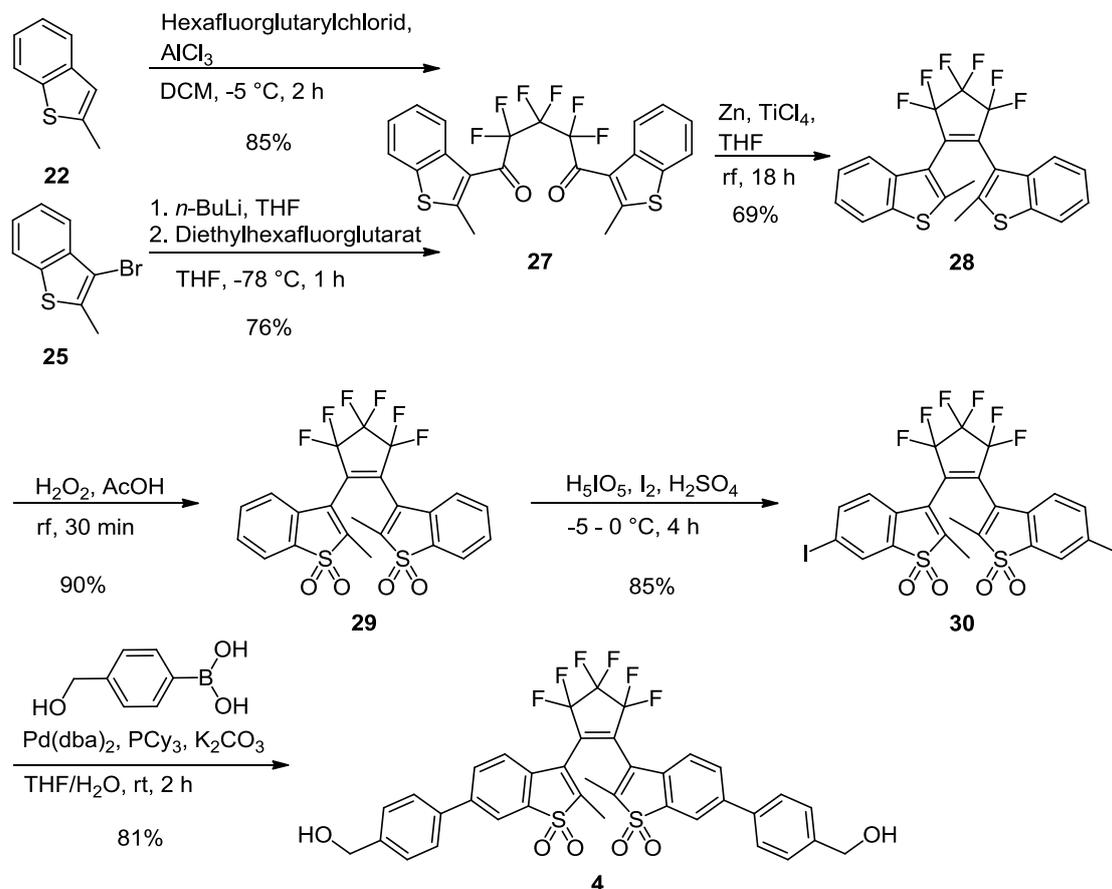
Schema 8: Fehlgeschlagener Syntheserversuch von Dioxo-Diarylethen **26**.

Anschließend sollte **12** zum entsprechenden Dioxy-Derivat mit H₂O₂ in siedender Essigsäure oxidiert werden. Unter diesen Bedingungen konnte aber nur ein Gemisch aus am Cyclopentenring oxidierten Derivaten von **26** erhalten werden. Auch durch mildere Reaktionsbedingungen, wie geringere Temperatur, kürzere Reaktionszeit oder mCPBA als Oxidationsmittel, konnte das Produkt nicht sauber und mit praktikabler Ausbeute erhalten werden. Daher wurde im Folgenden ein perfluorierter Cyclopentenring verwendet. Dieser bietet, neben der Möglichkeit die Thiopheneinheiten selektiv zu oxidieren, auch noch weitere Vorteile.

Diarylethene mit einem Cyclopentenring als zentrale Einheit weisen zwei primäre Konformationen auf.^[201] Eine gewinkelte, in denen die Arylreste parallel zueinander stehen, und eine nahezu planare mit einer antiparallelen Anordnung der Arylreste. Der konrotatorische, photochemische Ringschluss kann nur aus der antiparallelen Konformation erfolgen. Daher hängt die Schaltquantenausbeute stark vom Gleichgewicht zwischen paralleler und anti-paralleler Form ab. Dieses kann einmal durch sterisch anspruchsvolle Substituenten am Arylrest (wie zum Beispiel bei Dioxythiophenen oder durch Isopropylreste in der 2- und 6-Position) oder durch Variation der Briefumschlagkonformation des zentralen Cyclopentenrings in Richtung der antiparallelen Form verschoben werden. Ein perfluorierter Cyclopentenring beeinflusst die Konformation des Schalters derart, dass das Gleichgewicht hin zur eigentlich energetisch ungünstigeren, antiparallelen Konformation verschoben wird.^[215] Daher besitzen Diarylperfluorocyclopentene höhere Schaltquantenausbeuten als die entsprechend nicht fluorierten Derivate (s.a. Kapitel III.4.2).

Für die Synthese dieser perfluorierten Photoschalter wurde 1992 von *Irie et al.*^[215] eine Substitutionsreaktion von Perfluorocyclopenten durch lithiierte Thiophenderivate vorgeschlagen. Dadurch können symmetrische Photoschalter in einer Stufe synthetisiert werden. Perfluorocyclopenten ist allerdings bei RT leicht flüchtig (Siedepunkt von 27 °C). Zusätzlich ist dieses Edukt mit 500 €/g sehr teuer. Daher scheint eine zweistufige Synthese, wie sie bereits oben beschrieben wurde, sinnvoller. Dazu wurde **25** mit *n*-BuLi in die lithiierte Spezies überführt und mit Diethylhexafluorglutarat in einer Substitutionsreaktion zu **27** umgesetzt (s. Schema 9). Dies gelang mit guter Ausbeute (76%) und wurde auch bereits von *Feringa* und seinen Mitarbeitern beschrieben.^[242] Jene zeigten des Weiteren, dass eine *Friedel-Crafts*-Acylierung mit Hexafluorglutarylchlorid, wie sie für die Synthese von **17** und **23** verwendet wurde, auf Grund des Elektronenzugs der Fluorsubstituenten und der damit stark erhöhten Reaktivität des Säurechlorids nicht möglich ist. Allerdings konnte durch eine niedrige Reaktionstemperatur von -5 °C, einer längeren Reaktionszeit und ansonsten gleichen Bedingungen wie zur Synthese von **23** ebenfalls **27** mit einer Ausbeute von 85% erhalten werden. Nach dem Ringschluss, konnte **28** nun mit H₂O₂ in siedender Essigsäure mit guten Ausbeuten zum oxidierten Photoschalter **29** umgesetzt werden (90%). Da auf die Bromsubstituenten im Startmaterial verzichtet werden musste, sollte der

Photoschalter noch weiter modifiziert werden, um die spätere Suzuki-Kupplung zu ermöglichen.



Schema 9: Synthese des nicht-nukleosidischen Diarylethen-Photoschalters 4.

Durch *in situ* erzeugte I^+ -Ionen gelang eine doppelte Iodierung von **29**. Diese können im stark Sauren und in der Kälte durch Oxidation von elementarem Iod mit Periodsäure hergestellt werden und sind in der Lage, auch sehr elektronenarme Aromaten, wie Dioxybenzothiophen, in einer elektrophilen, aromatischen Substitutionsreaktion zu modifizieren. Auf Grund der dirigierenden Wirkung des Sulfonsäurederivats fand die Substitution dabei in der 6-Position des Benzothiophens statt. Durch die nachfolgende Suzuki-Kupplung mit kommerziell erhältlicher 4-(Hydroxymethyl)phenylboronsäure konnte in einer Reaktionszeit von 2 h, bei RT und mit guter Ausbeute (81%) **4** erhalten werden. Vor der Synthese des DNA-Bausteins müssen allerdings, wie schon bei den nukleosidischen Photoschaltern, die photochromen Eigenschaften des Monomers bestimmt werden, um die Eignung zum Einbau in DNA zu untersuchen.

4.2 Photochrome Eigenschaften

Das Absorptionsspektrum von **4o** zeigt ein Maximum bei 251 nm und zwei weniger intensive Banden bei 298 nm und 340 nm (s. Abbildung 52). Diese Banden sind im Vergleich zu denen des perfluorierten Grundgerüst **28** (224 nm, 257 nm, 320 nm, s. Kapitel III.7.4, Abbildung 63 und Abbildung 64) bathochrom verschoben. Dies ist einerseits auf den Elektronenzug der Sulfonsäuregruppen und andererseits auf das erweiterte π -Elektronensystem durch die Phenylsubstituenten zurückzuführen. Im vorherigen Kapitel wurde bereits erläutert, dass für die Anwendung in DNA eine Anregung über 300 nm außerhalb der DNA-Absorption gewährleistet sein muss. Das ist hier gegeben. Bei 365 nm besitzt **4** einen Extinktionskoeffizienten von $9.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Das macht es möglich, für die folgenden Belichtungen LEDs einzusetzen. Diese sind ab einer Emissionswellenlänge von 365 nm und höher kommerziell erhältlich und haben bestimmte Vorteile gegenüber einer Xe-Gasentladungslampe (s.a. Kapitel III.7.4). Hochleistungs-LEDs emittieren mit einer sehr hohen, konstanten Lichtintensität, wobei die Wellenlänge genau definiert ist (hier: $365 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ und $448 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$).

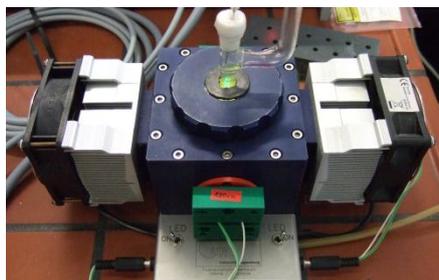
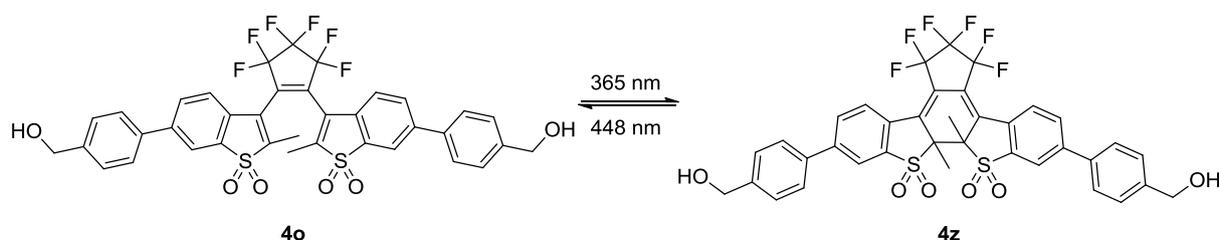


Abbildung 51: Belichtungsreaktor zum Betrieb von Hochleistungs-LEDs.

Daher wurden für alle folgenden Schaltexperimente Hochleistungs-LEDs (365 nm und 448 nm) verwendet, die in einem Belichtungsreaktor (s. Abbildung 51) betrieben wurden. Die Küvette mit der Probelösung kann hier unter Lichtausschluss und bei definierter Temperatur (20 °C) belichtet werden.



Schema 10: Belichtungswellenlänge und Strukturänderung beim Schaltexperiment von **4**; links die offene und rechts die geschlossene Form.

Belichtet man **4o** mit einer Wellenlänge von 365 nm, sinkt dessen Absorption ab. Gleichzeitig entsteht eine neue Bande bei 448 nm. Diese ist auf die Entstehung der farbigen, geschlossenen Form **4z** zurückzuführen (s. Schema 10 und Abbildung 52). Der photostationäre Zustand ist in weniger als 1 min erreicht und auch bei weiterer Belichtung bleibt die Absorption bei 448 nm konstant.

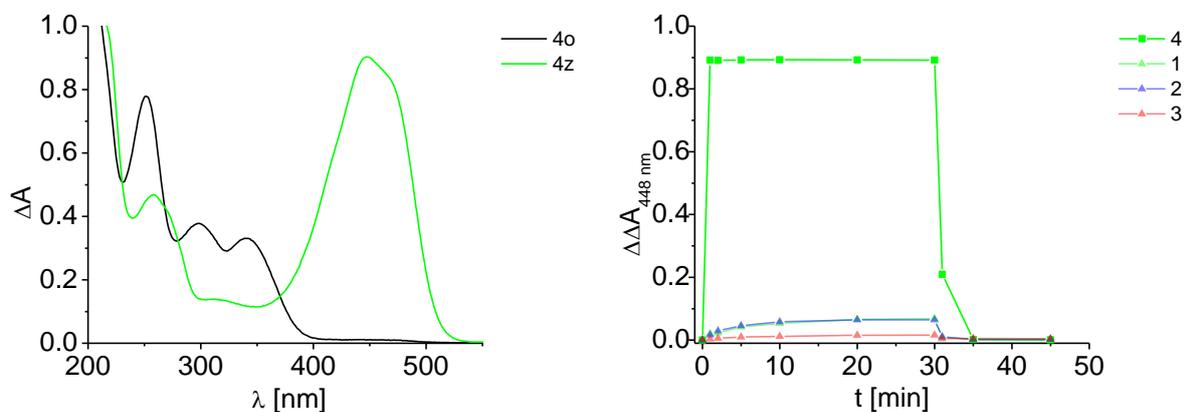


Abbildung 52: Absorptionsspektren der offenen Form (**4o**) und des photostationären Zustands (**4z**) nach 30 min Belichtung ($\lambda_z = 365$ nm) (links); zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung bei 448 nm bei Belichtung von **4** ($\lambda_o = 448$ nm) und Vergleich zu **1**, **2** und **3** (rechts).

Wird die geschlossene Form mit Licht der Wellenlänge 448 nm bestrahlt, wird sie wieder in die offene Spezies überführt und die Absorption bei 448 nm sinkt bis zu ihrem Anfangswert ab. Die photochromen Ausbeuten dieses Schaltexperiments wurden, wie oben beschrieben, durch HPLC-Analyse bestimmt (isosbestischer Punkt bei 369 nm). Für das Schließen liegt diese mit 95% weit über denen der nukleosidischen Photoschalter. Das Grundgerüst **28** besitzt mit 60% ebenfalls höhere photochrome Ausbeuten. Das ist auf den günstigen Einfluss des Perfluorcyclopentenrings und (für **4**) der sterisch anspruchsvollen Sulfonsäuregruppen auf die Schalterkonformation hin zur antiparallelen Anordnung zurückzuführen. Die Ausbeute beim Öffnen liegt mit 95% leicht unter den quantitativen Ausbeuten von **1**, **2**, **3**, **12** und **28**. Durch das erweiterte π -Elektronensystem wird die aromatische Stabilisierung von **4z** größer und dadurch sinkt die Schaltquantenausbeute für die Zykloreversion.^[243] Das größere π -System hat andererseits den Vorteil, dass der Extinktionskoeffizient von **4z** bei 448 nm ($44.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wesentlich höher ist als der der nukleosidischen Photoschalter bei jeweils 450 nm (s. Kapitel III.7.4, Tabelle 12).

Zusätzlich zu den Absorptionen wurden Fluoreszenzspektren während den Schaltexperimenten aufgenommen. Bei Anregung mit 448 nm zeigt der offene Schalter **4o** kaum Fluoreszenz (s. Abbildung 53). Die geschlossene Form **4z**

Fluoreszente Diarylethen-Photoschalter

hingegen emittiert intensiv gelb bei einer Wellenlänge von 550 nm ($\phi_z = 26.3\%$). Dabei kommt es zu einem 55fachen Anstieg der Fluoreszenz beim Schließen des Schalters.

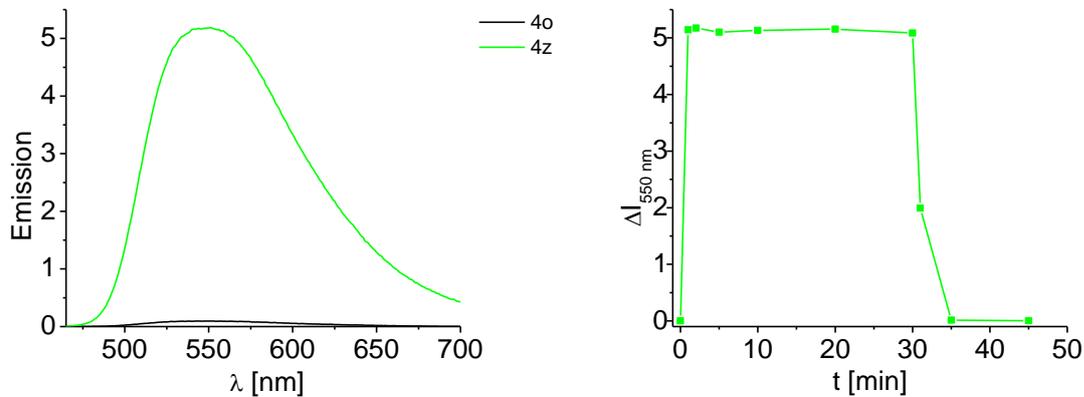


Abbildung 53: Fluoreszenzspektren der offenen (o) und des photostationären Zustands (z) nach 30 min Belichtung von **4** ($\lambda_z = 365$ nm) (links); zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzänderung bei 550 nm bei Belichtung von **4** ($\lambda_o = 448$ nm).

Durch Belichtung im sichtbaren Bereich des Spektrums öffnet sich der Schalter und die Fluoreszenzintensität sinkt wieder auf den Anfangswert ab. Dieser starke Kontrast, nicht nur in der Emission sondern auch in der Absorption, ist auch mit bloßem Auge zu erkennen (s. Abbildung 54)

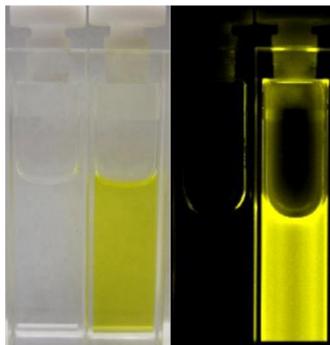


Abbildung 54: Bilder der Lösungen von **4**, vor (je links) und nach (je rechts) Belichtung mit 365 nm; Realbilder (links) und Fluoreszenz aufgenommen mit einem Fluoreszenzbildgeber bei Anregung bei 448 nm.

Belichtet man **4** über mehrere Zyklen hinweg, abwechselnd mit 365 nm und 448 nm, ändert sich der Unterschied in der Fluoreszenzintensität nicht (s. Abbildung 55). Auch der Absorptionsunterschied bei 448 nm bleibt bei bis zu 5 Zyklen konstant (s. Kapitel III.7.4, Abbildung 68). Dies zeigt klar, dass ein stabiles Schalten der Fluoreszenz mit **4** möglich ist.

Für Anwendungen in der Bioanalytik oder der molekularen Zellbildgebung müssen potente Fluoreszenzfarbstoffe zusätzlich auch bei längerer Bestrahlung mit der Anregungswellenlänge stabil bleiben.^[244-245] Um die Photostabilität für diesen

Schalter zu bestimmen, wurde **4z** mit 448 nm und gleichzeitig mit 365 nm belichtet. Die zweite Wellenlänge verhindert ein Öffnen des Schalters während des Experiments. Dies ist möglich, da der Ringschluss wesentlich schneller abläuft, als die Zykloreversion, so dass **4** während der Photostabilitätsmessung immer im geschlossenen, photostationären Zustand vorliegt. Trägt man die gemessene Fluoreszenzintensität bei 550 nm gegen die Belichtungszeit auf, ergibt sich ein monoexponentieller Zusammenhang mit einer Halbwertszeit von 5.8 h (s. Abbildung 55).

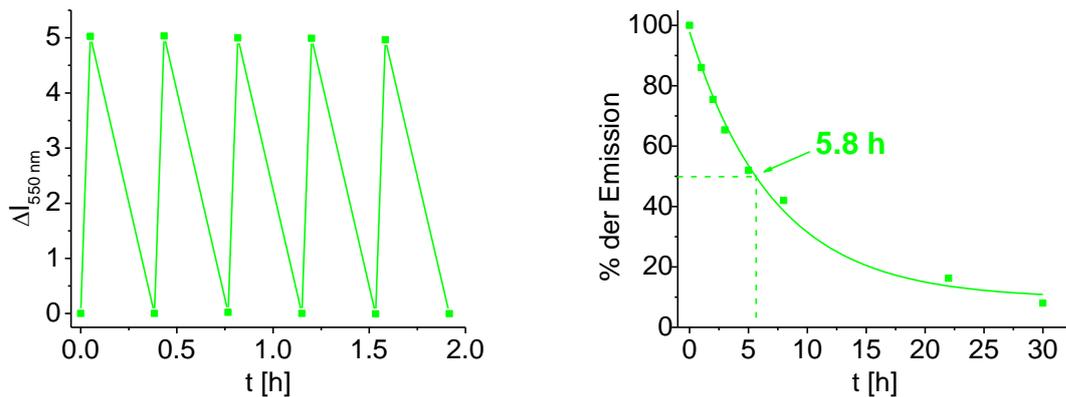


Abbildung 55: Stabilitätsmessung von **4** ($\lambda_z = 365$ nm, $\lambda_o = 448$ nm) über mehrere Schaltzyklen hinweg (links) und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzänderung bei 550 nm bei Belichtung von **4** mit 365 nm und 448 nm (rechts).

Dieser Wert ist vergleichbar mit besonders photostabilen, fluoreszenten Cyaninfarbstoffen.^[244] Somit wird **4** auch bei längeren Belichtungszeiten nicht gebleicht. Des Weiteren besitzt **4z** durch die Kombination aus hohem Extinktionskoeffizienten und hoher Fluoreszenzquantenausbeute eine teilweise mehr als doppelt so große Helligkeit ($11.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wie die oben genannten Fluorophore.

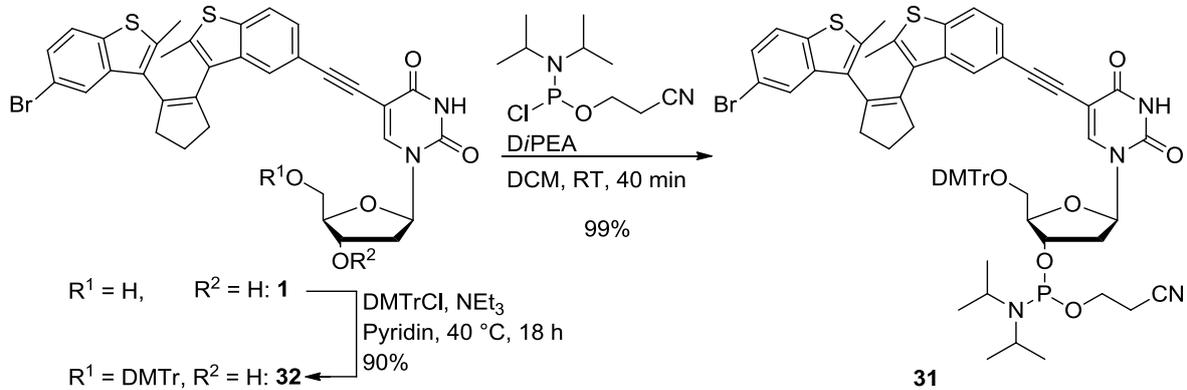
Insgesamt konnte gezeigt werden, dass **4**, durch den zentralen Perfluorocyclopentenring, die Sulfonsäuregruppen und das erweiterte π -System enorm gesteigerte photochrome Eigenschaften im Vergleich zu den nukleosidischen Photoschaltern besitzt. Vor allem die schaltbare Fluoreszenz in Kombination mit großer Helligkeit und Photostabilität machen **4** zu einem potenten Photoschalter und Fluorophor. Zum Einbau in DNA musste **4** allerdings noch weiter modifiziert werden.

5 Diarylethen-modifizierte DNA

In den Kapiteln III.3 und III.4 wurde die Synthese und Charakterisierung vier verschiedener Diarylethen-Photoschalter beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass nur der nukleosidische Photoschalter **1** und das fluoreszente Diarylethen **4** mit einer Wellenlänge über 300 nm stabil und reversibel geschaltet werden können. Damit sind diese Photoschalter vielversprechende Kandidaten, um in DNA eingebaut zu werden. Artificielle Funktionalitäten lassen sich über einen *Bottom-Up*-Ansatz in Oligonukleotide einbringen. Für diese Standardfestphasensynthese müssen die Photoschalter **1** und **4** jeweils noch zu den synthetischen DNA-Bausteinen umgesetzt werden.

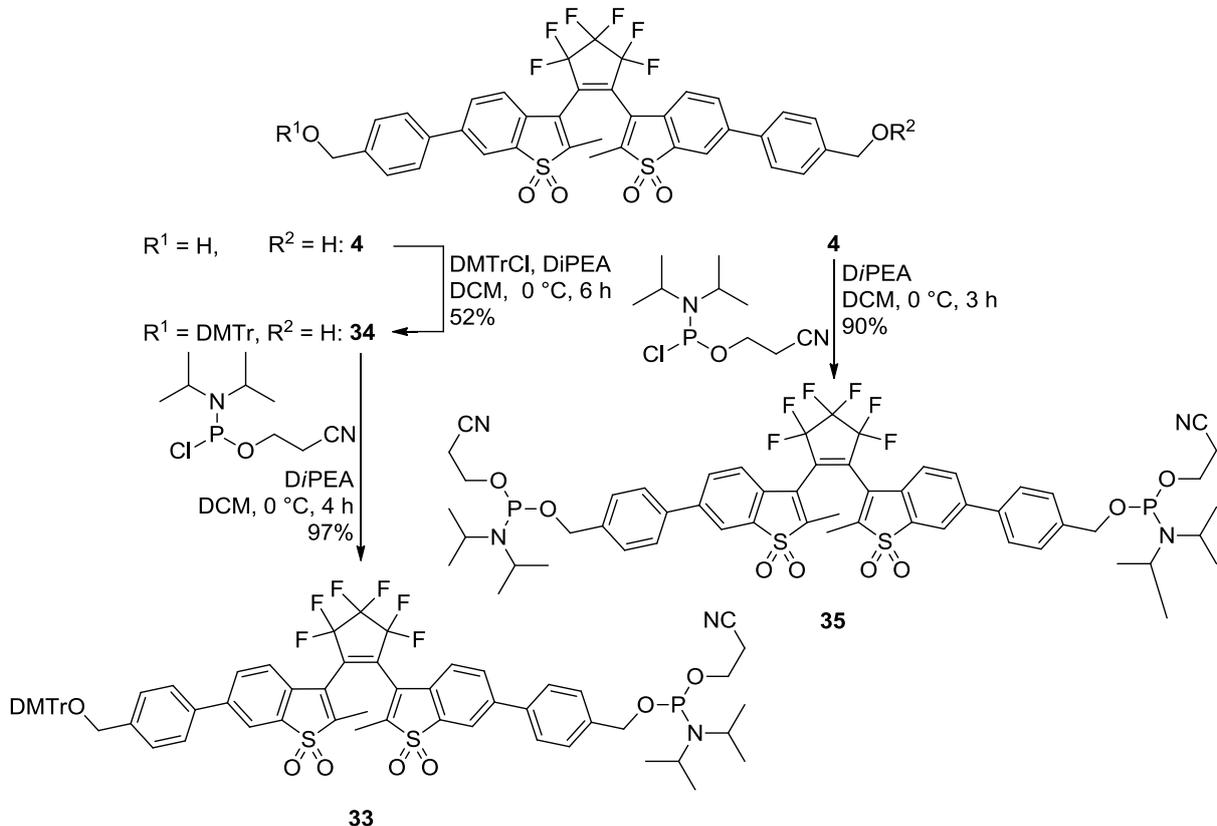
5.1 Synthese der DNA-Bausteine

Für die Synthese des DNA-Bausteins **31** musste die Standardprozedur abgeändert werden (s. Schema 11).^[226-227] Die Umsetzung zum DMTr-geschützten Zucker **32** kann nur bei erhöhter Temperatur (40 °C) erfolgen, da durch den sterischen Anspruch der 5-Modifikation eine Schützung bei RT nicht stattfindet.



Schema 11: Synthese des DNA-Bausteins **31**.

Die Synthese des entsprechenden Phosphoramidits **31** erfolgte im Basischen, bei RT mit einer nahezu quantitativen Ausbeute. Nach Lyophilisation aus Benzol wurde **31** als 0.1 M Lösung in MeCN direkt für die automatisierte DNA-Festphasensynthese eingesetzt.



Schema 12: Synthese der DNA-Bausteine **33** und **35**.

Diarylethen-modifizierte DNA

Um **4** in DNA einzubauen, wurden zwei verschiedene Varianten verfolgt (s. Schema 12). Zum einen konnte der standardmäßig verwendete, DMTr-geschützte Phosphoramiditbaustein **33** hergestellt werden. Die beiden dafür durchgeführten Reaktionen wurden auf 0 °C gekühlt. Dies war nötig, da für die DMTr-Schätzung eine Monoselektivität gewährleistet sein musste (**34**) und bei der Synthese des Phosphoramidits eine Zersetzung des Edukts bei RT beobachtet wurde (**33**). In der zweiten Variante wurde **4** direkt zum doppelten Phosphoramidit **35** umgesetzt. Da **4** symmetrisch ist und auch als terminale Funktionalität in Oligonukleotide eingebaut werden sollte, konnte dieser verkürzte Syntheseweg verfolgt werden. Auch hier wurde die Reaktionstemperatur, aus oben genanntem Grund, im Gegensatz zur Standardprozedur, auf 0 °C erniedrigt. Die beiden DNA-Bausteine wurden ebenfalls durch Lyophilisation aus Benzol getrocknet und danach direkt als 0.1 M Lösung in DCM für die DNA-Synthese verwendet. Es wurde DCM als Lösemittel gewählt, da in diesem die Löslichkeit der Phosphoramidite besser war als in dem standardmäßig verwendeten MeCN.

5.2 31-modifizierte DNA

Mit dem synthetisierten DNA-Baustein **31** konnten verschiedene Diarylethen-modifizierte DNA-Einzelstränge synthetisiert werden (s. Abbildung 56).^[226-227] Dabei wurde die Kupplungszeit und die Menge an verwendeten Phosphoramidit im Vergleich zu den natürlichen Basen erhöht, um einen effizienten Einbau zu ermöglichen (s. Kapitel III.7.2, Tabelle 8).

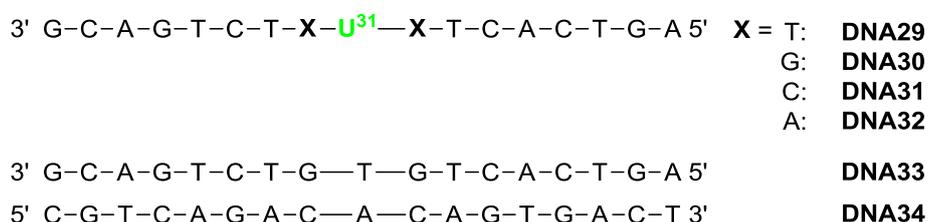


Abbildung 56: Sequenzen der mit **31** modifizierten DNA-Stränge **DNA29-DNA32** und der unmodifizierten Stränge **DNA33** und **DNA34**.

Die Sequenzen entsprechen denen im Arbeitskreis *Wagenknecht* zur Charakterisierung von Farbstoffen in DNA standardmäßig verwendeten Strängen. Der Photoschalter befindet sich in der Mitte der Sequenz. Diese variieren nur durch die umgebenden Basen neben der artifiziellen Modifikation. Bei allen Strängen wurde die DMTr-Schutzgruppe an der terminalen 5'-OH-Gruppe belassen, um eine

Reinigung durch *Reversed-Phase*-HPLC zu erleichtern. Nach Abspaltung von der festen Phase und Trennung des Produktstrangs von den Abbruchsträngen wurde diese durch Behandlung mit 80%iger Essigsäure in Wasser wieder entfernt (s. Kapitel III.7.2). Die unmodifizierten DNA-Stränge **DNA33** und **DNA34** sind kommerziell erhältlich.

Die Absorptionsspektren aller einzelsträngiger Oligonukleotide **DNA29 - DNA32** zeigen die typische DNA-Absorption bei 210 nm und 260 nm und zusätzlich die Absorption bei 310 nm, die der Diarylethen-Photoschalter Absorption zuzusprechen ist (s. Kapitel III.7.4, Abbildung 69). Die Belichtung mit 310 nm führt zu einem Anstieg der Absorption bei 450 nm. Dies zeigt ganz klar, dass der Schalter in die geschlossene Form überführt wird. Eine Bestrahlung mit 450 nm führt zur Zykloneversion und die Bande im Sichtbaren sinkt wieder ab. Besonders für **DNA30**, in deren Sequenz sich zwei Guanine neben der Photoschaltermodifikation befinden, ist dieses Ergebnis hervorzuheben. Es ist bekannt, dass Guanin oft photophysikalische Prozesse stört. Vor allem für Fluoreszenzlöschung ist dieser Effekt bereits gut untersucht worden.^[231, 246-247] Daher ist es bemerkenswert, dass nicht nur die photochromen Eigenschaften des Photoschalters in der DNA-Umgebung erhalten bleiben, sondern auch unabhängig von der Sequenz geschaltet werden kann. Diese Beobachtung ist wichtig für das DNA-Design in zukünftigen Anwendungen.

Die Untersuchungen am Doppelstrang sollen hier beispielhaft an **DNA30_34** beschrieben werden. Diese wurde durch Hybridisierung von **DNA30** und des unmodifizierten Gegenstrangs **DNA34** hergestellt. Das photochrome Verhalten ist sehr ähnlich zu den Einzelsträngen (s. Abbildung 57).

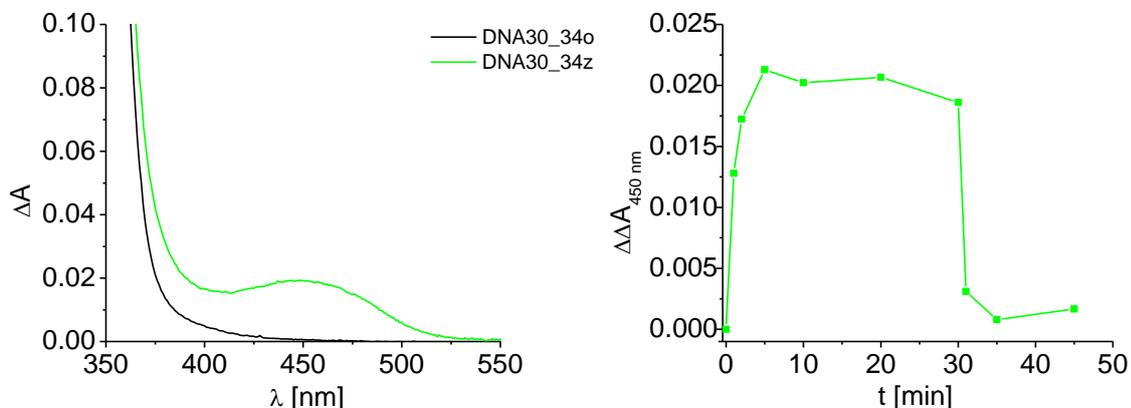


Abbildung 57: Absorptionsspektren der offenen Form (20 μM , DNA30_34o) und des photostationären Zustands (DNA30_34z) nach 30 min Belichtung ($\lambda_z = 310$ nm) (links); zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung bei 450 nm bei Belichtung von DNA30_34 (20 μM , $\lambda_o = 450$ nm, rechts).

Diarylethen-modifizierte DNA

Bei Bestrahlung mit 310 nm wird der Schalter geschlossen und die Bande bei 450 nm steigt. Dieser Vorgang ist reversibel und kann bei Belichtung mit einer Wellenlänge von 450 nm wieder rückgängig gemacht werden.

Die Absorptionsänderung bei 450 nm ist hier nur ungefähr halb so groß (ca. 0.018) wie beim nukleosidischen Photoschalter **1** (0.034). Dies hat zwei Gründe. Zum einen sinkt der Extinktionskoeffizient der geschlossenen Form des Diarylethens in der DNA-Umgebung von $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (**1**) auf $5.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (**DNA30_34**) ab. Der Extinktionskoeffizient eines Farbstoffs hängt, neben der Wellenlänge des Lichts und der Temperatur, auch von der Polarität des Lösungsmittels ab. *Wagenknecht et al.* konnten durch die kovalente Einführung einer solvatochromen Aminophthalimid-Sonde in DNA feststellen, dass die Polarität der DNA-Umgebung ungefähr der von Ethanol entspricht.^[248] Dadurch kann das Absinken des Extinktionskoeffizient bei Änderung der Umgebungspolarität von MeCN (Monomermessungen) zu DNA nachvollzogen werden. Zum anderen sinkt auch die photochrome Ausbeute von 20% (**1**, Belichtung mit 310 nm) auf 18% leicht ab. Dieser Unterschied ist nicht groß, kann aber ebenfalls durch die veränderte Polarität der Umgebung erklärt werden. *Irie et al.* zeigten bereits, dass die Schaltquantenausbeute von Diarylethenen mit steigender Lösungsmittelpolarität geringer wird.^[241] Nichtsdestotrotz kann die Änderung der Absorption auch mit bloßem Auge beobachtet werden (s. Abbildung 58).

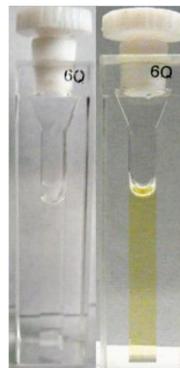


Abbildung 58: Bilder der Lösungen vor (links) und nach (rechts) Belichtung bei 310 nm von **DNA30_34**.

Auch für **DNA30_34** wurde die Stabilität während mehrmaligen Schließens und Öffnens der photochromen Modifikation untersucht. Links in Abbildung 59 sieht man die jeweilige Absorptionsänderung bei 450 nm. Diese bleibt, wie schon beim Monomer, bei bis zu 5 Schaltzyklen nahezu konstant. Damit ist **DNA30_34**, zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Teils der Arbeit,^[226-227] die erste durch kovalente Modifikation eines Diarylethen reversibel und stabil schaltbare DNA.

Über die optischen Eigenschaften hinaus wurde auch der Einfluss des Photoschalters auf die Stabilität der DNA untersucht. Dazu wurden Schmelztemperaturkurven aufgenommen (s. Abbildung 59, rechts). **DNA30_34o** zeigt eine Schmelztemperatur von 60.6 °C. Damit destabilisiert die offene Form des Diarylethens den Doppelstrang bezogen auf den Referenzduplex **DNA33_34** (68.0 °C). Diese Destabilisierung konnte bereits bei 5-Modifikationen von Uridin mit anderen, sterisch anspruchsvollen Farbstoffen beobachtet werden^[65, 249] und lässt darauf schließen, dass der Photoschalter Einfluss auf die DNA-Struktur nimmt.

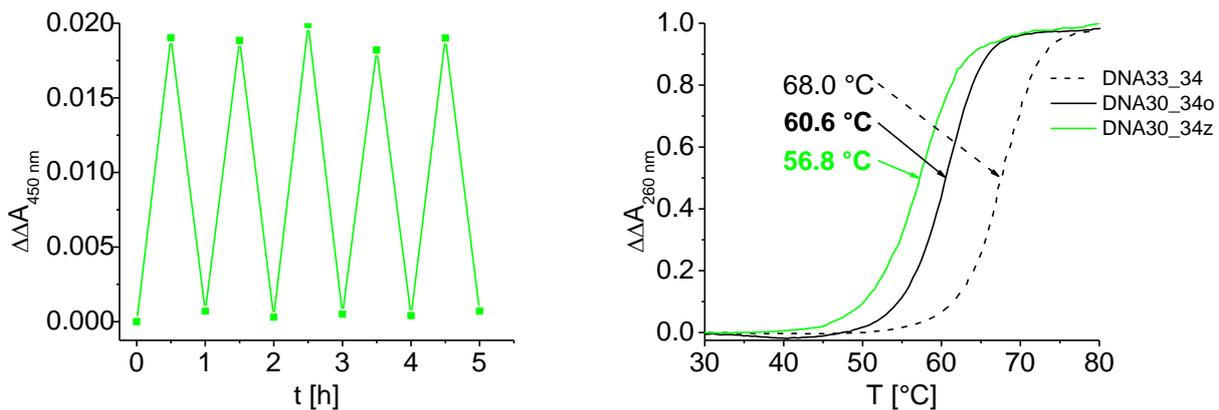


Abbildung 59: Stabilitätsmessung von **DNA30_34** (20 μM , $\lambda_z = 310\text{ nm}$, $\lambda_o = 450\text{ nm}$) über mehrere Schaltzyklen hinweg (links) und normierte Schmelztemperaturkurven von **DNA30_34o**, **DNA30_34z** und dem Referenzstrang **DNA33_34**.

Nach Belichtung mit 310 nm sinkt die Schmelztemperatur signifikant um 3.8 °C. Wahrscheinlich ist die planare geschlossene Form, im Gegensatz zur gewinkelten offenen Form, in der Lage, in den Basenstapel zu interkalieren, so wie es bereits bei den nicht kovalenten Experimenten von *Feringa* beschrieben wurde.^[160] Die Methylgruppen von **1z** stehen senkrecht zur Chromophorebene und können die Stapelung der DNA-Basen stören. So kommt es zur Destabilisierung von **DNA30_34z** im Vergleich zu **DNA30_34o**.

Es konnte hier gezeigt werden, dass der nukleosidische Photoschalter **1** durch die Standardfestphasensynthese in DNA eingebracht und dort auch stabil und reversibel geschaltet werden kann. Im Weiteren soll nun untersucht werden, ob durch die kovalente Modifikation von DNA mit dem Diarylethen-Photoschalter **4** auch die photochromen Eigenschaften von intrinsisch fluoreszenten Diarylethenen in Oligonukleotiden erhalten bleiben.

5.3 33- und 35-modifizierte DNA

Mit den beiden synthetischen DNA-Bausteinen konnten die DNA-Haarnadeln **DNA35** und **DNA36** (modifiziert mit **33**) und der terminal modifizierte Einzelstrang **DNA37** (modifiziert mit **35**) hergestellt werden. Dabei wurde die Kupplungszeit und die Menge an verwendetem Phosphoramidit im Vergleich zu den natürlichen Basen erhöht, um einen effizienten Einbau zu ermöglichen (s. Kapitel III.7.2, Tabelle 8). Nach Abspaltung von der festen Phase wurden die Oligonukleotide durch *Reversed-Phase*-HPLC gereinigt (s. Kapitel III.7.2).

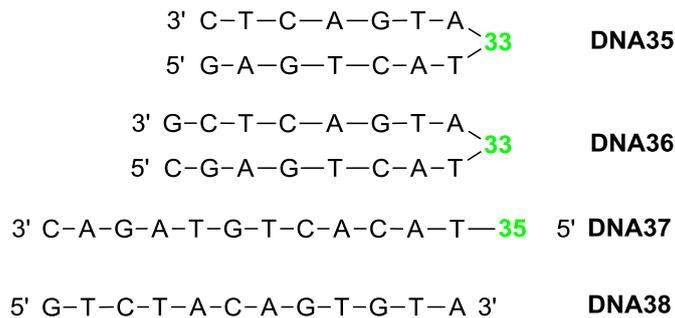


Abbildung 60: Sequenzen der mit **33** (**DNA35** und **DNA36**) und **35** (**DNA37**) modifizierten DNA-Stränge und des unmodifizierten Gegenstrangs **DNA38**.

Der Einbau als terminale Modifikation in **DNA37** wurde zur allgemeinen Untersuchung dieses Photoschalters in DNA als schaltbare, fluoreszente Sonde gewählt. Bei **DNA35** und **DNA36** wurde **33** in die Schlaufenregion eingebracht, um potentiell die Stabilität der DNA-Haarnadeln über den Konformationswechsel beim Öffnen und Schließen zu steuern. Die beiden Haarnadeln unterscheiden sich nur in der Länge der Stammsequenz, damit diese Strukturänderungen an unterschiedlich stabilen Haarnadeln untersucht werden können. Der unmodifizierte Gegenstrang **DNA38** ist kommerziell erhältlich.

Links in Abbildung 61 ist, repräsentativ für alle **33/35**-modifizierte Stränge, das Absorptionsspektrum von **DNA37_38** dargestellt. Neben der typischen DNA-Absorption bei 260 nm zeigt das Spektrum eine breite unstrukturierte Bande bei 340 nm. Diese ist auf die artifizielle Diarylethen-Modifikation zurückzuführen. Nach 30 min Belichtung von **DNA37_38** mit 365 nm ändert sich das Absorptionsspektrum kaum. Der Anstieg bei ca. 448 nm ist (nicht nur bei **DNA37_38**, sondern auch bei **DNA35** und **DNA36**, s. Kapitel III.7.4, Abbildung 70) sehr klein im Vergleich zum Monomer **4** (s. Abbildung 61, rechts). *Irie et al.* berichteten bereits, dass die Schaltquantenausbeuten von Dioxy-Diarylethenen mit steigender Polarität des Lösemittels sinken,^[241] doch ein derart dramatischer, lösemittelabhängiger Abfall konnte bisher nicht beobachtet werden. Außerdem konnte durch Messungen am

Monomer **4** in Puffer gezeigt werden, dass dort die photochromen Eigenschaften weitestgehend erhalten bleiben (s. Kapitel III.7.4, Abbildung 68).

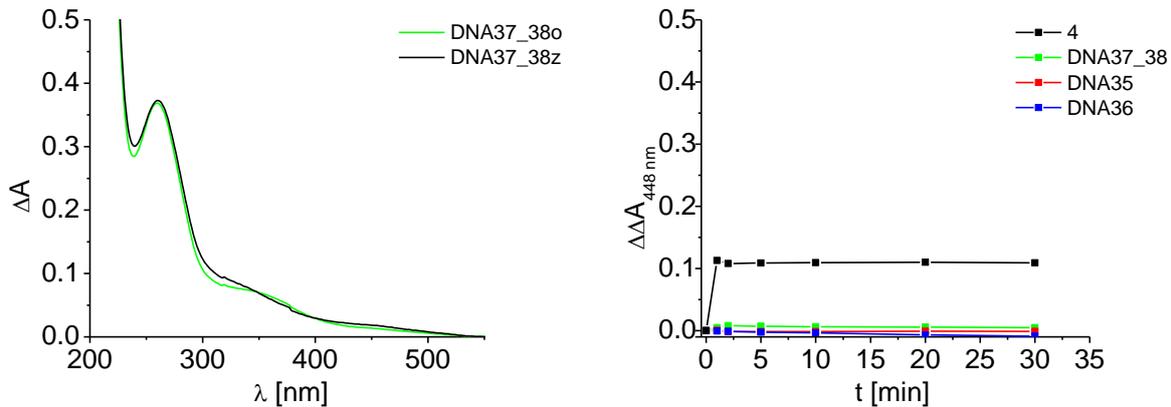


Abbildung 61: Absorptionsspektren der offenen Form (2.5 μM , DNA37_38o) und des photostationären Zustands (DNA37_38z) nach 30 min Belichtung von DNA37_38 ($\lambda_z = 365 \text{ nm}$) (links); zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung bei 448 nm bei Belichtung von DNA37_38, DNA35 und DNA36 im Vergleich zum Monomer 4 (2.5 μM) (rechts).

Um den Abfall der Schaltquantenausbeute zu erklären, gibt es zwei Ansätze. Ähnlich wie beim nukleosidischen Photoschalter **3**, könnte sich durch die Nähe zu den natürlichen DNA-Basen bei Anregung des Diarylethens ein ladungsgetrennter Zustand zwischen Schalter und Base bilden. Aus diesem kann keine Zyklisierung stattfinden und er relaxiert durch Ladungsrekombination. Dies wurde bereits für Azobenzole und Stilbene bei direkter Nachbarschaft eines GC-Paars in DNA beobachtet.^[182, 250] G besitzt unter allen natürlichen Basen das geringste Oxidationspotential ($E_{\text{ox}}(\text{G}/\text{G}^+) < E_{\text{ox}}(\text{A}/\text{A}^+) < E_{\text{ox}}(\text{C}/\text{C}^+) < E_{\text{ox}}(\text{T}/\text{T}^+)$)^[251]. Daher finden Ladungs- und Energietransferprozesse mit G in direkter Nachbarschaft bevorzugt statt. In den Sequenzen von **DNA37_38**, **DNA35** und **DNA36** befinden sich jeweils zwei AT-Paare zwischen der Diarylethen-Modifikation und dem nächsten GC-Paar. Da aber Ladungstransferprozesse in DNA über bis zu drei Basenpaaren erfolgen können,^[252-253] kann dies eine mögliche Erklärung für die schlechten, photochromen Eigenschaften des Photoschalters in DNA sein. Dagegen spricht, dass Elektronentransferprozesse in DNA im Bereich von 100 ps, mehreren Nanosekunden oder sogar bis hin zum Bereich von Mikrosekunden ablaufen.^[254] Das ist im Vergleich zur Zyklisierungsreaktion von Diarylethenen (1 ps – 10 ps)^[255-256] langsam und sollte eigentlich nicht in Konkurrenz mit dem Ringschluss stehen. Des Weiteren ist die Schaltquantenausbeute, wie in Kapitel III.2.3 bereits beschrieben, auch vom Gleichgewicht zwischen paralleler und antiparalleler Konformation des Photoschalters abhängig. Eine konrotatorische Zyklisierung kann nur aus der antiparallelen Konformation erfolgen. In verschiedenen Arbeiten wurde

zeigt, dass das Einbringen eines Diarylethens in starre Umgebungen, wie kovalent in Polymere^[257] oder nicht-kovalent im Inneren von Cyclodextrinen,^[258-260] dieses Gleichgewicht beeinflussen kann. Um zu untersuchen, in welcher Konformation der Photoschalter in den hier behandelten DNA-Strängen vorliegt, wurden die Absorptionen der einzelnen Konformere des Monomers mit der des Schalters in DNA verglichen. Obwohl parallele und antiparallele Anordnung der offenen Form bei Raumtemperatur schnell ineinander überführt werden können, ist deren Trennung durch *Reversed-Phase-HPLC* möglich.^[261] Die Absorptionsspektren konnten dadurch direkt zur jeweiligen Retentionszeit im Chromatogramm über den *Diodenarray*-Detektor der HPLC erhalten werden (s. Abbildung 62, links).

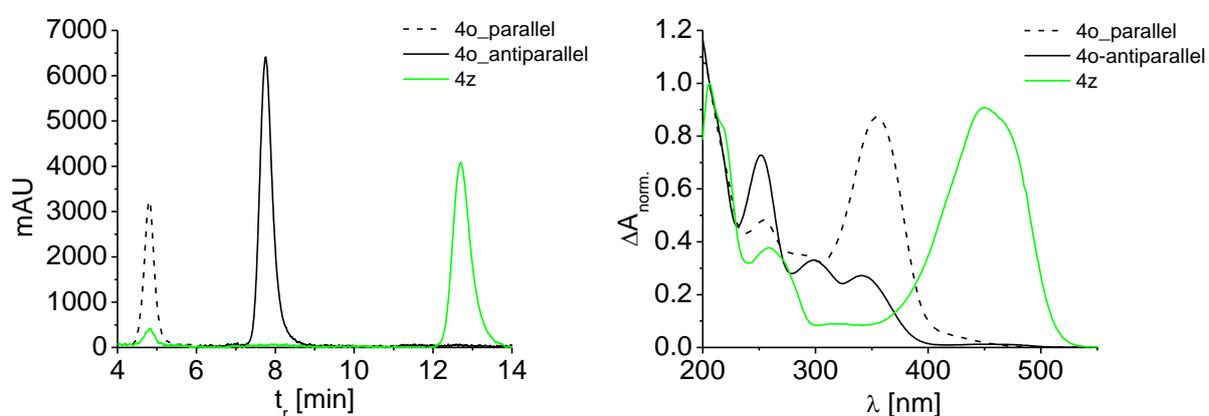


Abbildung 62: HPLC-Chromatogramm von **4** (20 μM) vor und nach 30 min Belichtung mit 365 nm (links); normierte Absorptionsspektren von **4** in der reinen offenen, parallelen und reinen, offenen, antiparallelen Konformation und von **4** in der reinen geschlossenen Form, aufgenommen mit dem *Diodenarray*-Detektor der HPLC (in H₂O/MeCN 40:60, rechts).

Das normierte Absorptionsspektrum von **4o_antiparallel** weist im Bereich zwischen 280 nm und 400 nm zwei Banden auf (s. Abbildung 62, rechts). **4o_parallel** hingegen zeigt, wie auch **DNA37_38** (s. Abbildung 61, links), dort nur eine breite, unstrukturierte Absorptionsbande. Dies ist zu mindestens ein Hinweis darauf, dass der Diarylethen-Photoschalter in DNA in der parallelen Konformation gebunden, und somit keine Zyklisierung möglich ist. Gegen diese Erklärung spricht wiederum, dass auch bei erhöhter Temperatur (50 °C und 70 °C), also oberhalb der Schmelztemperatur der jeweiligen DNA-Stränge (s. Kapitel III.7.3, Tabelle 11), kein Schließen des Photoschalters beobachtet werden kann, obwohl eine Änderung von der photochemisch inaktiven, parallelen Konformation in die antiparallele Konformation bei höheren Temperaturen schnell stattfinden sollte.

Möglicherweise ist auch eine Kombination aus beiden Erklärungsansätzen ein Grund für das Ausbleiben der Zyklisierung. Die DNA, als relativ starre Matrix, verlangsamt die Konformationsänderung des Schalters und dessen Zyklisierung auch bei höheren

Temperaturen, sodass Elektronentransferprozesse, trotz deren vergleichsweise geringen Geschwindigkeiten, stattfinden können und somit der angeregte Zustand durch Ladungsrekombination in den offenen Grundzustand zurückkehrt.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit wurden vier verschiedene Diarylethen-Photoschalter synthetisiert. Die drei nukleosidischen Photoschalter **1**, **2** und **3** konnten über eine Sonogashira Kupplung als zentralen Schritt an **dU** gebunden werden, um so den Einbau in DNA durch automatisierte Festphasensynthese zu ermöglichen. Die Gesamtausbeuten der jeweils sechsstufigen Synthesen lagen bei 11% (**1**), 8% (**2**) und 12% (**3**). Hier können, vor allem in Bezug auf die Sonogashira-Kupplungen, durch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen die Gesamtausbeuten noch gesteigert werden. **4** wurde mit einer sehr guten Gesamtausbeute von 36% ebenfalls in 6 Stufen auf zwei verschiedenen Wegen erhalten.

Durch absorptionsspektroskopische Methoden zeigte sich in verschiedenen Belichtungsexperimenten, dass nur **1** und **4** stabil und selektiv neben der DNA-eigenen Absorption geschaltet werden können. Die geschlossene Form von **4** war zusätzlich, durch die Wahl des Sulfonsäurederivats des Benzothiophens als Arylrest, intrinsisch fluoreszent.

Nach Umsetzung zu den jeweiligen DNA-Bausteinen **31**, **33** und **35** konnten die Photoschalter erfolgreich in DNA eingebaut werden. Trotz der herausragenden photochromen Eigenschaften des Monomers sind **33** und **35** in der DNA-Umgebung der gewählten Sequenzen nicht mehr effizient schaltbar. Möglicherweise steht die Zyklisierung in Konkurrenz mit Elektronentransferprozessen oder die DNA-Struktur stört das Schalten durch die selektive Stabilisierung der photochemisch nicht aktiven, parallelen Konformation des Diarylethens. Durch transiente Absorptionsspektroskopie oder NMR-Messungen könnten hier die genauen Hintergründe der gesunkenen photochromen Eigenschaften im Vergleich zum Monomer genauer untersucht werden. Des Weiteren wäre der Einbau des Schalters über einen azyklischen Linker eine Möglichkeit die nötige Flexibilität zu liefern, um ein reversibles Schalten von **4** in DNA zu ermöglichen.

Bemerkenswerterweise blieben im Gegensatz dazu die photochromen Eigenschaften von **31** in DNA erhalten und dessen Einfluss auf die Struktur des Doppelstrangs **DNA30_34** konnte durch die Änderung der Schmelztemperatur nachvollzogen werden. Dieses Ergebnis eröffnet den Weg für die Anwendung von Diarylethen-Photoschaltern in durch Licht schaltbare DNA-Nanostrukturen.

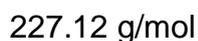
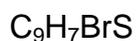
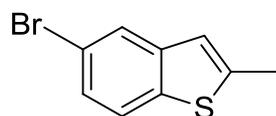
7 Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben zu Materialien und Methoden, die in diesem Teil der Arbeit verwendet wurden, sind in Kapitel V aufgeführt.

Zur Messung von Absorption und Fluoreszenz wurden, falls nicht anders erwähnt, für molekulare Photoschalter 20 μM Lösungen in MeCN und für modifizierte DNA 20 μM Lösungen in 10 mM NaP_i -Puffer und 250 mM NaCl verwendet. Bei Fluoreszenzspektren von **4** wurde der Photoschalter mit $\lambda_{\text{exc}} = 448 \text{ nm}$ angeregt. Dabei betrug die Spaltbreite der Anregung und Emission 2 nm.

7.1 Synthesevorschriften

5-Brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen (**16**)



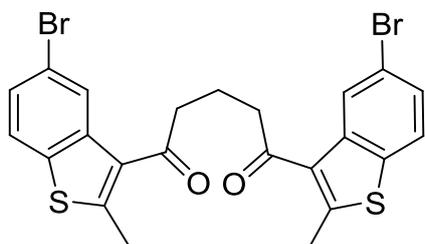
Es wurden 2.5 g Benzo[*b*]thiophen (11 mmol) unter Argonatmosphäre in 30 mL trockenem THF gelöst, auf -78°C abgekühlt und 8.8 mL einer 2 M Lithiumdiisopropylamid-Lösung in THF/Heptan/Ethylbenzol (17 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei 0°C gerührt. Danach wurde wieder auf -78°C abgekühlt und 1.1 mL Methyljodid (17 mmol) unter starkem Rühren hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 30 mL entionisiertes Wasser zugegeben. Das THF/Wasser Gemisch wurde mit 4 x 100 mL EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan) gereinigt. Es wurden 2.7 g (11 mmol, 99%) des Produktes **16** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.57$ (*n*-Hexan).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.78 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H-Ar), 7.59 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-Ar), 7.34 (dd, 1H, $J = 8.5, 1.9$ Hz, H-Ar), 6.90 (s, 1H, H-Ar), 2.59 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 143.1 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 142.2 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 138.4 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 126.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 125.3 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 121.0 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 118.2 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 16.3 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 228.0 (100) [M^+], 147.1 (24) [$(\text{M}-\text{CH}_3)^+$].

1,5-Bis(5-brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)pentan-1,5-dion (**17**)

550.33 g/mol

Es wurden 0.97 g **16** (4.3 mmol) und 0.27 mL Glutarylchlorid (2.1 mmol) unter Argonatmosphäre in 20 mL trockenem DCM gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Danach wurden 0.63 g AlCl_3 (4.7 mmol) portionsweise hinzugegeben und es wurde weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde wiederum auf 0 °C abgekühlt und 20 mL einer 1 M wässrigen HCl-Lösung langsam hinzuge tropft. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit 3 x 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:EE 10:1) gereinigt. Es wurden 0.90 g (1.6 mmol, 74%) des Produktes **17** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.31$ (*n*-Hexan:EE 10:1).

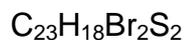
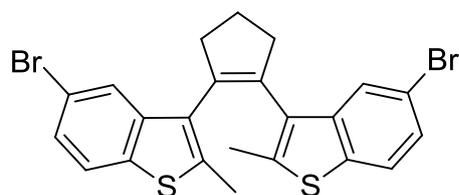
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.36 (d, 2H, $J = 1.8$ Hz, H-Ar), 7.57 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, H-Ar), 7.42 (dd, 2H, $J = 8.5, 1.8$ Hz, H-Ar), 3.06 (t, 4H, $J = 6.9$ Hz, CH_2), 2.77 (s, 6H, CH_3), 2.27 (qi, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 168.6 (CO), 146.1 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 142.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 140.5 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 136.5 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 127.2 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 125.0 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 118.8 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 28.6 (CH_2), 19.6 (CH_2), 15.3 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 549.9 (14) [M^+].

Experimenteller Teil

1,2-Bis(5-brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en (**18**)



Zu einer Suspension von 0.30 g Zinkstaub (4.6 mmol, stabilisiert, Korngröße < 63 μm) in 50 mL trockenem THF wurden schnell 0.26 mL TiCl_4 (2.3 mmol) unter Argonatmosphäre zugegeben. Die Suspension wurde auf 40 °C aufgeheizt und für 1 h gerührt. Danach wurden 0.63 g **17** (1.1 mmol) hinzugegeben und die Lösung weitere 18 h gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung auf 2 cm Silicagel aufgetragen und solange mit *n*-Hexan nachgewaschen bis sich das Eluat nicht mehr gelb färbte. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan) gereinigt. Es wurden 0.33 g (0.61 mmol, 55%) des Produktes **18** als weißer Feststoff erhalten.

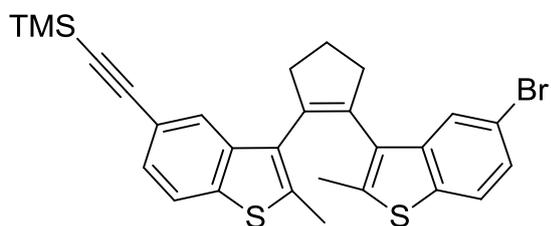
$R_f = 0.25$ (*n*-Hexan).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.64 (s, 2H, H-Ar), 7.46 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H-Ar), 7.24 (s, 2H, HAr), 3.02-2.88 (m, 4H, CH_2), 2.28 (qi, 2H, $J = 7.22$ Hz, CH_2), 2.12 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 140.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 137.0 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 136.8 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 129.72 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 126.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 125.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.3 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 118.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 37.8 (CH_2), 24.1 (CH_2), 15.2 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 517.9 (100) [M^+].

((3-(2-(5-Brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-5-yl)ethinyl)trimethylsilan (**19**)



$C_{28}H_{27}BrS_2Si$

535.63 g/mol

Es wurden 0.13 g **18** (0.30 mmol), 72 μ L Trimethylsilylacetylen (0.51 mmol), 41 μ L trockenes Triethylamin (0.51 mmol), 30 mg $Pd(PPh_3)_4$ (0.03 mmol) und 5 mg CuI (0.03 mmol) in 3.0 mL trockenem THF unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde entgast und für 19 h refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan) gereinigt. Es wurden 58 mg (0.11 mmol, 43%) des Produktes **19** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.26$ (*n*-Hexan).

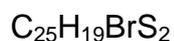
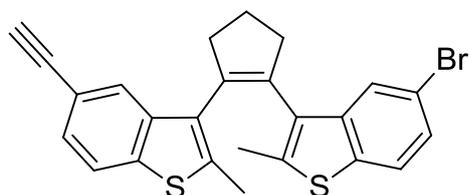
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.67 (s, 2H, H-Ar), 7.54 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 7.47 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.29 (s, 2H, H-Ar), 3.12-2.83 (m, 4H, CH_2), 2.28 (qi, 2H, $J = 7.8$ Hz, CH_2), 2.04 (s, 6H, CH_3), 0.29 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 139.1 ($C_{quart.}$), 138.6 ($C_{quart.}$), 137.3 ($C_{quart.}$), 136.7 ($C_{quart.}$), 127.1 ($C_{arom.}$), 126.4 ($C_{arom.}$), 125.9 ($C_{arom.}$), 125.1 ($C_{arom.}$), 123.3 ($C_{arom.}$), 121.9 ($C_{arom.}$), 118.0 ($C_{arom.}$), 105.9 ($C\equiv C$), 37.9 (CH_2), 29.9 ($C\equiv C$), 24.2 (CH_2), 15.3 (CH_3), 0.3 ($Si(CH_3)_3$).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 536.0 (100) [M^+].

Experimenteller Teil

5-Brom-3-(2-(5-ethynyl-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen (**13**)



Es wurden 35 mg **19** (0.07 mmol) in 3.0 mL trockenem MeOH gelöst und 27 mg K_2CO_3 (0.19 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 18 h bei 40 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das MeOH unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan) gereinigt. Es wurden 30 mg (0.07 mmol, 99%) des Produktes **13** als weißer Feststoff erhalten.

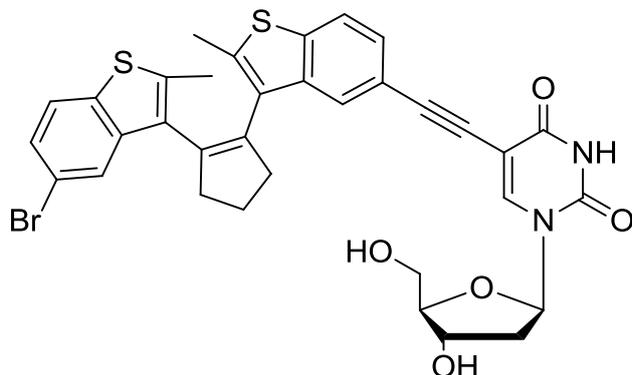
$R_f = 0.65$ (*n*-Hexan:EE 20:1)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.71 (s, 2H, H-Ar), 7.57 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.46 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-Ar), 7.28 (s, 1H, H-Ar), 3.07 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.01-2.84 (m, 4H, CH_2), 2.28 (qi, 2H, $J = 8.0$ Hz, CH_2), 2.02 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 146.8 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 139.2 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 137.2 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 136.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 126.9 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 126.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 125.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.3 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.0 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 118.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 117.6 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 76.5 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 37.8 (CH_2), 29.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 24.1 (CH_2), 15.2 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 461.9 (100) [M^+].

5-((3-(2-(5-Brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-5-yl)ethinyl)-2'-desoxyuridin (**1**)



$C_{34}H_{29}BrN_2O_5S_2$

689.64 g/mol

Es wurden 0.13 g **13** (0.27 mmol), 97 mg 5-Iod-2'-desoxyuridin (0.27 mmol), 45 μ L trockenes Triethylamin (0.54 mmol), 63 mg $Pd(PPh_3)_4$ (0.05 mmol) und 11 mg CuI (0.05 mmol) in 10 mL trockenem DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde entgast und für 18 h bei 40 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (DCM:MeOH 25:1) gereinigt. Es wurden 0.12 g (0.18 mmol, 65%) des Produktes **1** als gelber Schaum erhalten.

$R_f = 0.40$ (DCM:MeOH 10:1).

1H NMR (300 MHz, MeOD- d_4): δ (ppm) = 8.37 (s, 1H, NH), 7.72 (s, 2H, H-Ar), 7.68–7.58 (m, 1H, C=CH), 7.55 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 7.46 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, H-Ar), 7.29–6.95 (m, 2H, H-Ar), 6.26 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, 1'-H), 4.50–4.28 (m, 1H, 3'-H), 4.03–3.88 (m, 1H, 4'-H), 3.87–3.78 (m, 1H, 5'-H), 3.78–3.66 (m, 1H, 5'-H), 2.19–2.61 (m, 4H, CH₂), 2.48–2.00 (m, 9H, 2'-H, CH₂, CH₃), 1.95 (s, 1H, 2'-H).

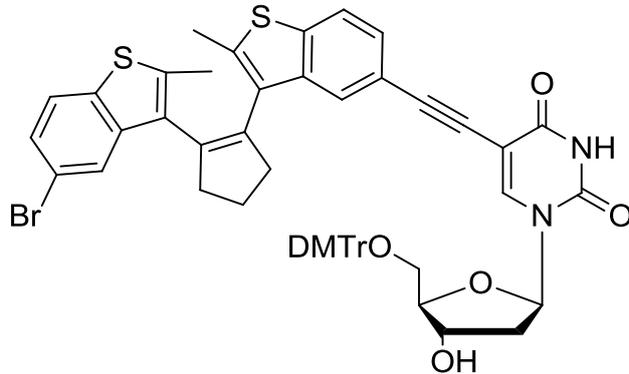
^{13}C NMR (75 MHz, MeOD- d_4): δ (ppm) = 151.2 (CO), 144.7 (C=C), 140.4 (CO.), 139.8 (C_{quart.}), 138.6 (C_{quart.}), 138.5 (C_{quart.}), 138.1 (C_{quart.}), 131.3 (C_{quart.}), 127.3 (C_{arom.}), 126.0 (C_{arom.}), 124.3 (C_{arom.}), 122.9 (C_{arom.}), 118.9 (C_{arom.}), 94.5 (C \equiv C), 89.2 (4'-C), 87.1 (1'-C), 72.1 (3'-C), 62.6 (5'-C), 41.8 (2'-C), 38.6 (CH₂), 25.0 (CH₂), 15.1 (CH₃).

MS (FAB): m/z (%) = 689.1 (6) [M⁺].

Experimenteller Teil

HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{34}H_{30}BrN_2O_5S_2$ $[(M+H)^+]$: 691.0759; gefunden $[(M+H)^+]$: 691.0766.

5-(((3-(2-(5-Brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-5-yl)ethinyl)-5'-O-(dimethoxytrityl))-2'-desoxyuridin (**32**)



$C_{55}H_{47}BrN_2O_7S_2$

992.00 g/mol

Es wurden 50 mg **1** (0.07 mmol), 37 mg Dimethoxytritylchlorid (0.11 mmol) und 10 μ L trockenes Triethylamin (0.12 mmol) in 2.0 mL trockenem Pyridin unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde für 18 h bei 40 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (DCM:MeOH 100:3 + 0.1% Triethylamin) gereinigt. Es wurden 62 mg (0.06 mmol, 90%) des Produktes **32** als gelber Schaum erhalten.

$R_f = 0.61$ (DCM:MeOH 10:1).

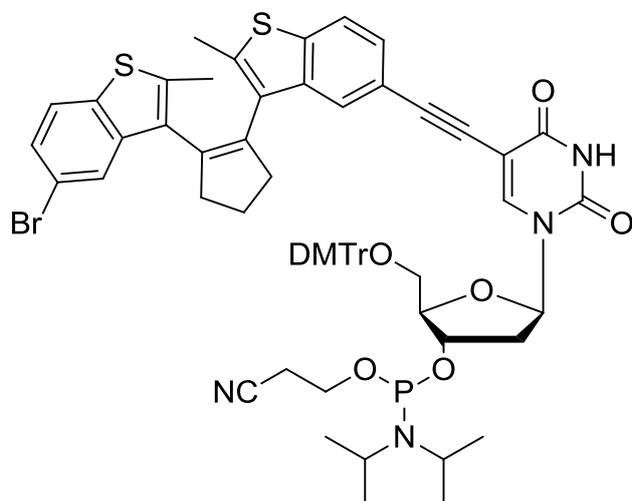
1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.05 (s, 1H, NH), 7.70 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-Arbt), 7.63 (s, 1H, C=CH), 7.43 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, H-Arbt), 7.37–7.18 (m, 8H, H-ArDMTr), 7.14 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-Arbt), 6.96–6.75 (m, 5H, H-ArDMTr), 6.16 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 4.34–4.26 (m, 1H, 3'-H), 3.98–3.93 (m, 1H, 4'-H), 3.80–3.66 (m, 2H, 5'-H), 3.61 (d, 6H, $J = 2.5$ Hz, CH₃, DMTr), 2.93–2.79 (m, 4H, CH₂), 2.37–2.06 (m, 9H, 2'-H, CH₂, CH₃), 2.03–1.95 (m, 1H, 2'-H).

^{13}C NMR (75 MHz, Aceton- d_6): δ (ppm) = 163.9 (C_{quart.}), 161.9 (C_{quart.}), 159.6 (C_{quart.}), 157.7 (C_{quart.}), 150.4 (CO), 146.0 (C_{quart.}), 143.1 (C=C), 140.3 (CO), 139.0 (C_{quart.}), 138.1 (C_{quart.}), 137.9 (C_{quart.}), 136.6 (C_{quart.}), 131.0 (C_{arom.}), 128.9 (C_{arom.}), 127.6 (C_{arom.}), 127.1 (C_{arom.}), 126.0 (C_{arom.}), 122.7 (C_{arom.}), 114.1 (C \equiv C), 87.7 (4'-C), 86.6 (1'-C), 64.8 (5'-C), 58.4 (3'-C), 55.4 (2'-C), 46.4 (5'-C), 41.9, 38.3 (CH₂), 24.4 (CH₂), 15.4 (CH₃), 8.9 (CH₃).

MS (ESI): m/z (%) = 1015.2 (4) [(M+Na)⁺].

Experimenteller Teil

5-(((3-(2-(5-Brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-5-yl)ethinyl)-3'-O-((2-cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphanyl)-5'-O-(dimethoxytrityl))-2'-desoxyuridin (**31**)



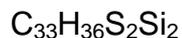
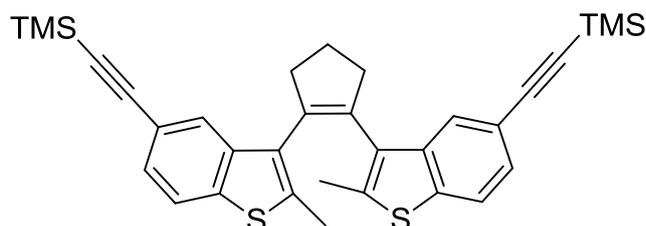
$C_{64}H_{64}BrN_4O_8PS_2$
1192.22 g/mol

Es wurden 62 mg **32** (0.06 mmol), 36 μ L Diisopropylethylamin (0.16 mmol) und 27 μ L 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid (0.16 mmol) in 3.0 mL trockenem DCM unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde für 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde durch FC (DCM:MeOH 100:4 + 0.1% Triethylamin) gereinigt und zusätzlich aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 74 mg (0.06 mmol, 99%) des Produktes **31** als gelber Feststoff erhalten.

$R_f = 0.85, 0.91$ (DCM:MeOH 25:1).

^{31}P NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 150.6 (P_{III}), 16.3 (P_V).

MS (MALDI): m/z (%) = 1191.3 (28) [M^+].

1,2-Bis(2-methyl-5-((trimethylsilyl)ethynyl)benzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en (**20**)

Es wurden 0.62 g **18** (1.2 mmol), 1.7 mL Trimethylsilylacetylen (11 mmol), 0.39 mL trockenes Triethylamin (4.8 mmol), 0.55 g Pd(PPh₃)₄ (0.48 mmol) und 91 mg CuI (0.48 mmol) in 11 mL trockenem THF unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde entgast und für 20 h refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:Toluol 100:1) gereinigt. Es wurden 0.56 g (1.0 mmol, 85%) des Produktes **20** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.20$ (*n*-Hexan).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.72 (s, 2H, H-Ar), 7.56 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H-Ar), 7.30 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-Ar), 3.20–2.80 (m, 4H, CH₂), 2.31 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 1.99 (s, 6H, CH₃), 0.30 (s, 18H, Si(CH₃)₃).

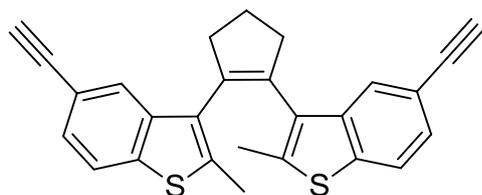
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 139.3 (C_{quart.}), 138.7 (C_{quart.}), 137.5 (C_{quart.}), 137.1 (C_{quart.}), 130.2 (C_{quart.}), 127.1 (C_{arom.}), 126.1 (C_{arom.}), 121.9 (C_{arom.}), 118.7 (C_{arom.}), 106.0 (C≡C), 37.9 (CH₂), 29.9 (C≡C), 24.3 (CH₂), 15.4 (CH₃), 0.3 (Si(CH₃)₃).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 552.2 (8) [M⁺].

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₃₃H₃₆S₂Si₂ [M⁺]: 552.1797; gefunden [M⁺]: 552.1794.

Experimenteller Teil

1,2-Bis(5-ethynyl-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en (**14**)



$C_{27}H_{20}S_2$
408.57 g/mol

Es wurden 0.41 g **20** (0.74 mmol) in 15 mL trockenem MeOH gelöst und 0.41 g K_2CO_3 (3.0 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 20 h bei 40 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:Toluol 10:1) gereinigt. Es wurden 0.30 g (0.73 mmol, 99%) des Produktes **14** als weißer Feststoff erhalten.

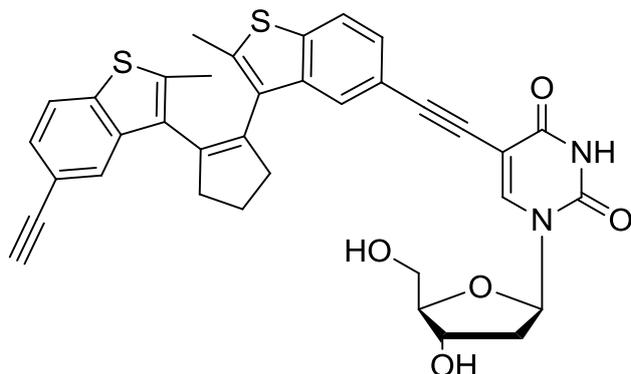
$R_f = 0.41$ (*n*-Hexan:Toluol 10:1).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.75 (s, 2H, H-Ar), 7.57 (s, 2H, H-Ar), 7.31 (s, 2H, H-Ar), 3.08 (s, 2H, $C\equiv CH$), 3.01–2.77 (m, 4H, CH_2), 2.28 (qi, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH_2), 1.96 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 139.3 ($C_{quart.}$), 138.9 ($C_{quart.}$), 137.1 ($C_{quart.}$), 130.0 ($C_{quart.}$), 128.5 ($C_{quart.}$), 126.8 ($C_{arom.}$), 126.4 ($C_{arom.}$), 122.0 ($C_{arom.}$), 117.6 ($C_{arom.}$), 76.4 ($C\equiv C$), 37.9 (CH_2), 29.9 ($C\equiv C$), 24.2 (CH_2), 15.2 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 408.1 (48) [M^+].

5-((3-(2-(5-ethynyl-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-5-yl)ethynyl)-2'-desoxyuridin (**2**)



$C_{36}H_{30}N_2O_5S_2$

634.76 g/mol

Es wurden 75 mg **14** (0.18 mmol), 65 mg 5-Iod-2'-desoxyuridin (0.18 mmol), 30 μ L trockenes Triethylamin (0.37 mmol), 42 mg $Pd(PPh_3)_4$ (0.04 mmol) und 7 mg CuI (0.04 mmol) in 7.0 mL trockenem DMF unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde entgast und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (DCM:MeOH 10:1) gereinigt. Es wurden 27 mg (0.04 mmol, 23%) des Produktes **2** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.53$ (DCM:MeOH 5:1).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.01 (s, 1H, NH), 7.82 (s, 1H, C=CH), 7.70 (s, 2H, H-Ar), 7.55 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H-Ar), 7.36 (s, 2H, H-Ar), 6.22 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, 1'-H), 4.62 (s, 1H, 3'-H), 4.16–4.02 (m, 1H, 4'-H), 4.00–3.85 (m, 2H, 5'-H), 3.08 (s, 1H, C \equiv CH), 3.02–2.72 (m, 4H, CH₂), 2.40 (s, 1H, 2'-H), 2.26 (s, 2H, CH₂), 2.05–1.79 (m, 7H, CH₃, 2'-H).

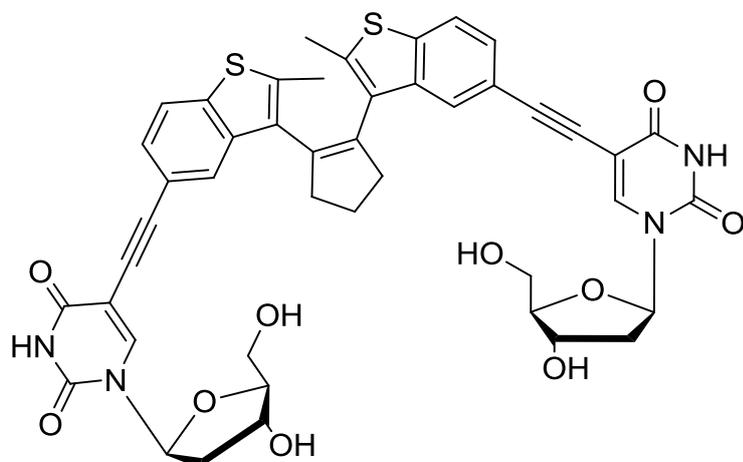
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 154.2, 142.7, 141.4, 140.1, 138.9, 138.6, 137.2, 130.0, 127.1, 127.0, 121.6, 118.0, 106.1, 90.4, 88.1, 77.3, 72.8, 64.0, 42.5, 38.5, 24.9, 15.0.

MS (MALDI): m/z (%) = 633.6 (5) [M^+].

HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{36}H_{31}N_2O_5S_2$ [$(M+H)^+$]: 635.1674; gefunden [$(M+H)^+$]: 635.1681.

Experimenteller Teil

1,2-Bis-((5-(2'-desoxyuridin-5-yl)ethynyl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en (3)



C₄₅H₄₀N₄O₁₀S₂

860.95 g/mol

Es wurden 81 mg **14** (0.20 mmol), 0.14 g 5-Iod-2'-desoxyuridin (0.40 mmol), 30 μ L trockenes Triethylamin (0.40 mmol), 46 mg Pd(PPh₃)₄ (0.04 mmol) und 8 mg CuI (0.04 mmol) in 7.0 mL trockenem DMF unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde entgast und für 3 h bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (DCM:MeOH 15:1) gereinigt. Es wurden 60 mg (0.07 mmol, 35%) des Produktes **3** als weißer Feststoff erhalten.

R_f = 0.55 (DCM:MeOH 10:1).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.87 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, NH), 7.97 (s, 2H, C=CH), 7.85 (d, 2H, J = 9.3 Hz, H-Ar), 7.80–7.52 (m, 4H, H-Ar), 6.31–6.02 (m, 2H, 1'-H), 5.31 (d, 2H, J = 10.7 Hz, 3'-H), 5.24–5.08 (m, 2H, 4'-H), 4.27 (s, 2H, 5'-H), 3.94–3.83 (m, 2H, 5'-H), 3.79–3.43 (m, 4H, CH₂), 3.17–3.13 (m, 2H, 2'-H), 3.00–2.67 (m, 10H, 2'-H, CH₂, CH₃).

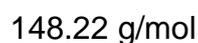
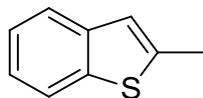
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 161.4, 153.9, 149.4, 137.5, 136.2, 130.3, 130.0, 129.6, 122.8, 120.1, 117.9, 117.6, 106.9, 99.5, 99.2, 98.3, 88.2, 87.6, 84.8, 70.1, 69.5, 60.9, 60.7, 45.6, 37.5, 29.0, 28.7, 23.4, 22.1, 15.0.

MS (FAB): m/z (%) = 883.4 (25) [(M+Na)⁺].

HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{45}H_{41}N_4O_{10}S_2$ $[(M+H)^+]$: 861.2264; gefunden $[(M+H)^+]$: 861.2282.

Experimenteller Teil

2-Methylbenzo[*b*]thiophen (**22**)



Es wurden 2.0 g Benzo[*b*]thiophen (15 mmol) unter Argonatmosphäre in 95 mL trockenem THF gelöst und auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Nun wurde unter starkem Rühren 9.1 mL einer 2 M Lithiumdiisopropylamid-Lösung in THF/Heptan/Ethylbenzol (16 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Danach wurde wiederum auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und 1.4 mL Methyljodid (22 mmol) unter starkem Rühren hinzugegeben. Die Lösung wurde weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 100 mL entionisiertes Wasser zugegeben. Das THF/Wasser Gemisch wurde mit 4 x 100 mL EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde durch FC (*n*-Hexan) gereinigt (nicht im Hochvakuum trocknen, **22** sublimiert bei Raumtemperatur). Es wurden 2.2 g (15 mmol, 99%) des Produktes **22** als weißer Feststoff erhalten.

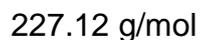
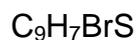
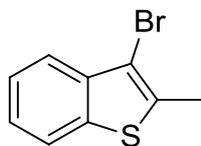
$R_f = 0.61$ (*n*-Hexan).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 7.85 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-Ar), 7.70 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-Ar), 7.35–7.20 (m, 2H, H-Ar), 7.16–7.04 (m, 1H, H-Ar), 2.60–2.52 (m, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 140.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 140.5 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 139.7 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 124.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.0 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 121.6 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 16.1 (CH_2).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 148.1 (100) [M^+].

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_8\text{S}$ [M^+]: 148.0347; gefunden [M^+]: 148.0355.

3-Brom-2-methylbenzo[*b*]thiophen (**25**)

Es wurden 1.2 mL 3-Brombenzo[*b*]thiophen (9.4 mmol) unter Argonatmosphäre in 60 mL trockenem THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. Nun wurde unter starkem Rühren 7.8 mL einer 2 M Lithiumdiisopropylamid-Lösung in THF/Heptan/Ethylbenzol (14 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0 °C gerührt. Danach wurde wiederum auf -78 °C gekühlt und 0.88 mL Methyljodid (14 mmol) unter starkem Rühren hinzugegeben. Die Lösung wurde weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 60 mL entionisiertes Wasser zugegeben. Das THF/Wasser Gemisch wurde mit 4 x 100 mL EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan) gereinigt. Es wurden 2.1 g (9.3 mmol, 99%) des Produktes **25** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.80$ (*n*-Hexan).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.96 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Ar), 7.65 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-Ar), 7.54–7.33 (m, 2H, H-Ar), 2.54 (s, 3H, CH₃).

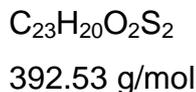
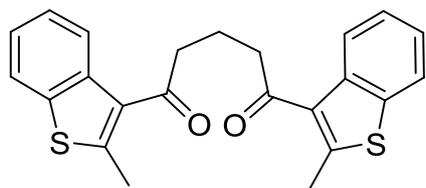
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 137.6 (C_{quart.}), 136.6 (C_{quart.}), 135.6 (C_{quart.}), 125.4 (C_{arom.}), 125.1 (C_{arom.}), 122.7 (C_{arom.}), 121.9 (C_{arom.}), 105.8 (C_{arom.}), 15.2 (CH₃).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 227.9 (70) [M⁺].

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₉H₇BrSK [(M+K)⁺]: 266.9063; gefunden [(M+K)⁺]: 266.8905.

Experimenteller Teil

1,5-Bis(2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)pentan-1,5-dion (**23**)



Methode A: Es wurden 2.1 g **22** (14 mmol) und 0.91 mL Glutarylchlorid (7.1 mmol) unter Argonatmosphäre in 70 mL trockenem DCM gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Danach wurden langsam 2.3 g Aluminiumchlorid (17 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0 °C gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 60 mL einer 1 M wässrigen HCl-Lösung langsam hinzuge tropft und danach auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit 3 x 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:EE 50:1) gereinigt. Es wurden 2.2 g (5.6 mmol, 79%) des Produktes **23** als weißer Feststoff erhalten.

Methode B: Es wurden 1.0 g **25** (4.4 mmol) in 20 mL trockenem THF gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Danach wurden 3.0 mL einer 1.6 M *n*-Buthyllithium-Lösung in *n*-Hexan (4.8 mmol) hinzuge tropft und 15 min rühren gelassen. Daraufhin wurden 0.41 mL Diethylglutarat (2.2 mmol) langsam hinzuge tropft und 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur aufgewärmt und mit 20 mL einer 1 M wässrigen HCl-Lösung versetzt. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit 3 x 30 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:EE 50:1) gereinigt. Es wurden 0.54 g (1.4 mmol, 63%) des Produktes **23** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.35$ (*n*-Hexan:EE 20:1).

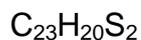
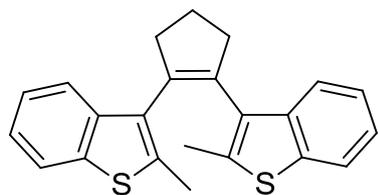
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.07 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-Ar), 7.72 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-Ar), 7.33 (dt, 4H, $J = 20.2, 7.0$ Hz, H-Ar), 3.07 (t, 4H, $J = 7.0$ Hz, CH_2), 2.72 (s, 6H, CH_3), 2.26 (qi, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 197.6 (CO), 146.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 137.3 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 136.4 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 132.0 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 124.2 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 120.7 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 41.7 (CH_2), 18.2 (CH_2), 15.8 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 392.1 (30) [M^+].

Experimenteller Teil

1,2-Bis(2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en (**12**)



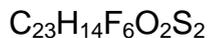
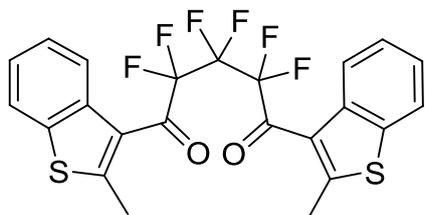
Zu einer Suspension von 2.3 g Zinkstaub (34 mmol, stabilisiert, Korngröße < 63 μm) in 90 mL trockenem THF wurden schnell 1.9 mL TiCl_4 (17 mmol) unter Argonatmosphäre zugegeben. Die Suspension wurde für 1 h refluxiert. Danach wurden 3.4 g **23** (8.7 mmol) hinzugegeben und die Lösung weitere 18 h refluxiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung auf 2 cm Silicagel aufgetragen und solange mit *n*-Hexan nachgewaschen bis sich das Eluat nicht mehr gelb färbte. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:Toluol 100:1) gereinigt. Es wurden 1.9 g (5.3 mmol, 61%) des Produktes **12** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.59$ (*n*-Hexan:Toluol 10:1).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.70 (dd, 2H, $J = 13.2, 8.2$ Hz, H-Ar), 7.59 (dd, 2H, $J = 16.8, 7.9$ Hz, H-Ar), 7.36–7.23 (m, 2H, H-Ar), 7.24–7.15 (m, 2H, H-Ar), 3.40–2.52 (m, 4H, CH_2), 2.25 (qi, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2), 2.10–1.62 (m, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 140.1 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 138.3 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 137.2 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 134.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 134.5 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 123.8 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.0 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 37.9 (CH_2), 24.3 (CH_2), 15.1 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 360.0 (100) [M^+].

Hexafluor-1,5-bis(2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl)pentan-1,5-dion (**27**)

500.48 g/mol

Methode A: Es wurden 5.6 g **22** (37 mmol) und 3.2 mL Hexafluorglutarylchlorid (18 mmol) unter Argonatmosphäre in 100 mL trockenem DCM gelöst und auf -5 °C abgekühlt. Danach wurden langsam 5.5 g Aluminiumchlorid (41 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 2 h bei -5 °C gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 100 mL einer 1 M wässrigen HCl-Lösung langsam hinzuge tropft und danach auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit 3 x 100 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:EE 50:1) gereinigt. Es wurden 8.00 g (16 mmol, 85%) des Produktes **27** als weißer Feststoff erhalten.

Methode B: Es wurden 3.3 g **25** (14 mmol) in 50 mL trockenem THF gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Danach wurden 9.9 mL einer 1.6 M *n*-Buthyllithium-Lösung in *n*-Hexan (15 mmol) hinzuge tropft und 15 min rühren gelassen. Daraufhin wurden 1.6 mL Diethylglutarat (7.2 mmol) langsam hinzuge tropft und 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur aufgewärmt und mit 50 mL einer 1 M wässrigen HCl-Lösung versetzt. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit 3 x 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:EE 50:1) gereinigt. Es wurden 2.7 g (5.5 mmol, 76%) des Produktes **27** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.23$ (*n*-Hexan:EE 50:1).

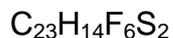
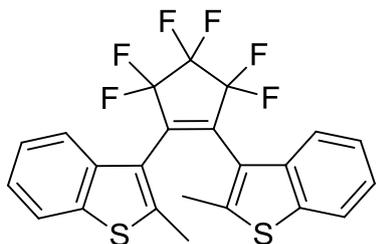
Experimenteller Teil

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 8.05–8.00 (m, 2H, H-Ar), 7.69–7.63 (m, 2H, H-Ar), 7.47–7.40 (m, 4H, H-Ar), 2.63 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 184.2 (CO), 152.8 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 136.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 136.8 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 126.7 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.8 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 125.3 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 123.4 (CF_2), 122.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 109.2 (CF_2), 15.6 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 499.9 (50) [M^+].

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{O}_2\text{S}_2$ [$(\text{M}+\text{H})^+$]: 501.0418; gefunden [$(\text{M}+\text{H})^+$]: 501.0429.

3,3'-(Hexafluorocyclopent-1-en-1,2-diyl)bis(2-methylbenzo[*b*]thiophen) (**28**)

Zu einer Suspension von 3.3 g Zinkstaub (50 mmol, stabilisiert, Korngröße < 63 μm) in 100 mL trockenem THF wurden schnell 2.8 mL TiCl_4 (25 mmol) unter Argonatmosphäre zugegeben. Die Suspension wurde für 1 h refluxiert. Danach wurden 6.3 g **27** (12 mmol) hinzugegeben und die Lösung weitere 20 h refluxiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung auf 2 cm Silicagel aufgetragen und solange mit *n*-Hexan nachgewaschen bis sich das Eluat nicht mehr gelb färbte. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan) gereinigt. Es wurden 4.1 g (8.7 mmol, 69%) des Produktes **28** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.29$ (*n*-Hexan).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 7.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.82 (dd, 1H $J = 5.5, 3.7$ Hz, H-Ar), 7.63 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-Ar), 7.61–7.58 (m, 1H, H-Ar), 7.46 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-Ar), 7.37 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-Ar), 7.25 (dd, 2H, $J = 6.1, 3.2$ Hz, H-Ar), 2.51 (s, 3H, CH_3), 2.27 (s, 3H, CH_3).

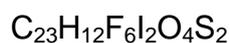
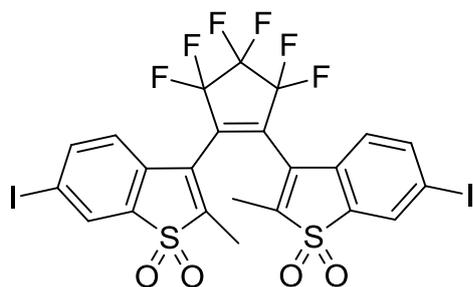
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 143.1 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 143.0 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 137.5 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.1 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 124.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 124.8 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 124.7 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 122.7 (CF_2), 122.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 121.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 117.9 (CF_2), 14.8 (CH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 468.0 (100) [M^+].

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{S}_2$ [$(\text{M}+\text{H})^+$]: 469.0519; gefunden [$(\text{M}+\text{H})^+$]: 469.0501.

Experimenteller Teil

3,3'-(Hexafluorocyclopent-1-en-1,2-diyl)bis(6-iod-2-methylbenzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid) (**30**)



784.27 g/mol

Es wurden 1.4 g **32** (3.1 mmol) in 80 mL siedender Essigsäure gelöst. Danach wurden 7.6 mL 50%ige, wässrige H₂O₂-Lösung (36 mmol) langsam hinzuge tropft und die Lösung 30 min lang refluxiert. Nun wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und langsam in 100 mL Eiswasser getropft. Der gefällte weiße Feststoff **29** wurde abzentrifugiert, dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und wieder in 20 mL MeCN aufgenommen. Die Lösung wurde mit 80 mL Benzol versetzt, lyophilisiert und über Nacht am Hochvakuum getrocknet.

0.95 g des oxidierten Zwischenprodukts **29** (1.8 mmol) wurden bei -5 °C in 10 mL konzentrierte Schwefelsäure gegeben und 15 min gerührt, sodass der Feststoff perfekt gelöst war. Nun wurden 0.51 g Periodsäure (2.2 mmol) und 1.0 g Iod (4.0 mmol) zugegeben. Die Farbe der Lösung färbte sich sofort lila und wurde 1 h bei -5 °C und danach eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch in 50 mL Eiswasser getropft, mit 4 x 50 mL EE extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 2 x 50 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 2 x 50 mL gesättigter NaSO₃-Lösung und 2 x 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:EE 20:1 – 10:1) gereinigt. Es wurden 1.2 g (1.5 mmol, 85%) des Produktes **30** als leuchtend gelber Feststoff erhalten.

$R_f = 0.32$ (*n*-Hexan:EE 10:1).

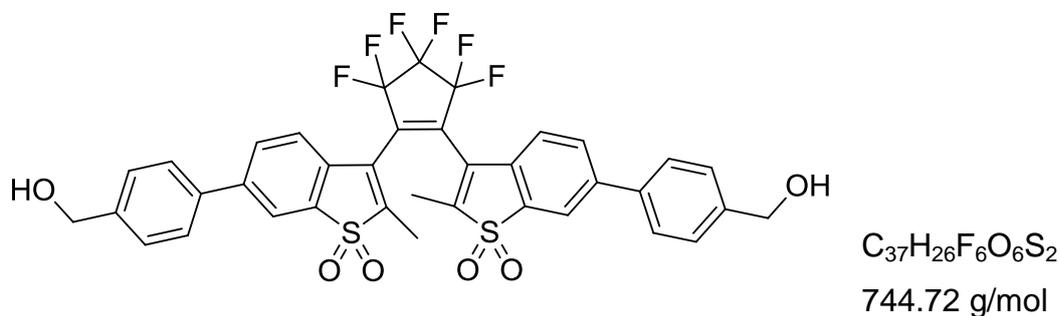
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.50 (s, 1H, H-Ar), 8.46 (s, 1H, H-Ar), 8.13 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Ar), 7.97 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz, H-Ar), 7.45 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-Ar), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-Ar), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.04 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 143.5, 143.2, 135.3, 131.1, 131.0, 128.3, 127.8, 125.2, 124.9, 122.5, 98.2, 8.3.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 783.5 (3) [M^+].

Experimenteller Teil

3,3'-(Hexafluorcyclopent-1-en-1,2-diyl)bis(6-(4-(hydroxymethyl)phenyl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid) (**4**)



Es wurden 0.64 g **30** (0.82 mmol) in 50 mL trockenem THF unter Argonatmosphäre gelöst und 0.37 g 4-(Hydroxymethyl)phenylboronsäure (2.5 mmol), 0.18 g Tricyclohexylphosphin (0.66 mmol) und 0.30 g Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) (0.33 mmol) hinzugegeben. Danach wurden 50 mL einer gesättigten K_2CO_3 -Lösung hinzugegeben und es wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 0.1 M HCl-Lösung neutralisiert und mit 5 x 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und durch FC (*n*-Hexan:EE 1:1 – 1:4) gereinigt. Es wurden 0.49 g (0.66 mmol, 81%) des Produktes **4** als leuchtend gelber Feststoff erhalten.

$R_f = 0.56$ (*n*-Hexan:EE 1:4).

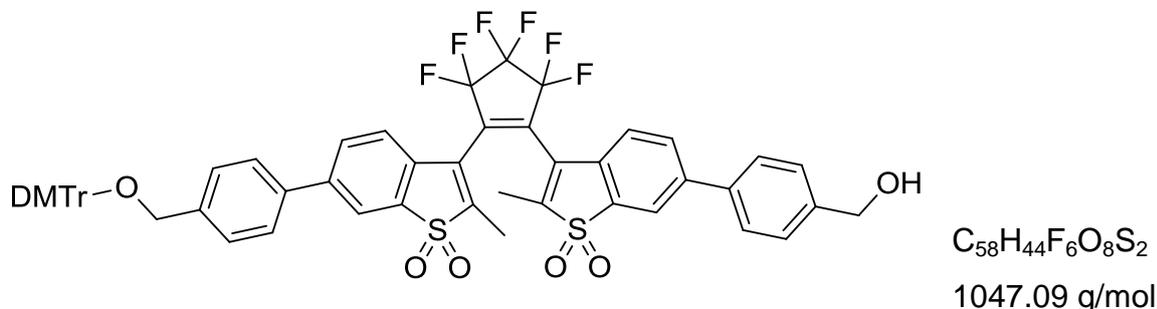
1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 8.41 (s, 1H, H-Ar), 8.35 (s, 1H, H-Ar), 8.08 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-Ar), 7.90 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-Ar), 7.79 (m, 3H, H-Ar), 7.70 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 7.62 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.45 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 7.39 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-Ar), 5.28 (dt, 2H, $J = 10.6, 5.7$ Hz, OH), 4.54 (dd, 4H, $J = 11.2, 5.6$ Hz, CH_2), 2.24 (s, 3H, CH_3), 2.15 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 143.9, 143.6, 143.4, 143.0, 135.5, 135.4, 135.1, 132.4, 132.2, 128.3, 127.1, 126.9, 126.8, 124.2, 123.9, 122.8, 120.8, 62.5, 8.5.

MS (FAB): m/z (%) = 744.9 (3) [M⁺].

Experimenteller Teil

6-(4-(*O*-(Dimethoxytrityl)hydroxymethyl)phenyl)-3-(hexafluor-2-(6-(4-(hydroxymethyl)phenyl)-2-methyl-1,1-dioxidbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid (**34**)



Es wurden 0.24 g **4** (0.32 mmol) in 20 mL trockenem DCM unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Danach wurden 108 μ L Diisopropylethylamin (0.64 mmol) und 0.22 g Dimethoxytritylchlorid (0.64 mmol) hinzugegeben und die Lösung bei 0 °C 6 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde direkt durch FC (*n*-Hexan:EE 2:1 – 1:1 + 0.1% NEt₃) gereinigt. Es wurden 174 mg (0.17 mmol, 52%) des Produktes **34** als orangener Feststoff erhalten.

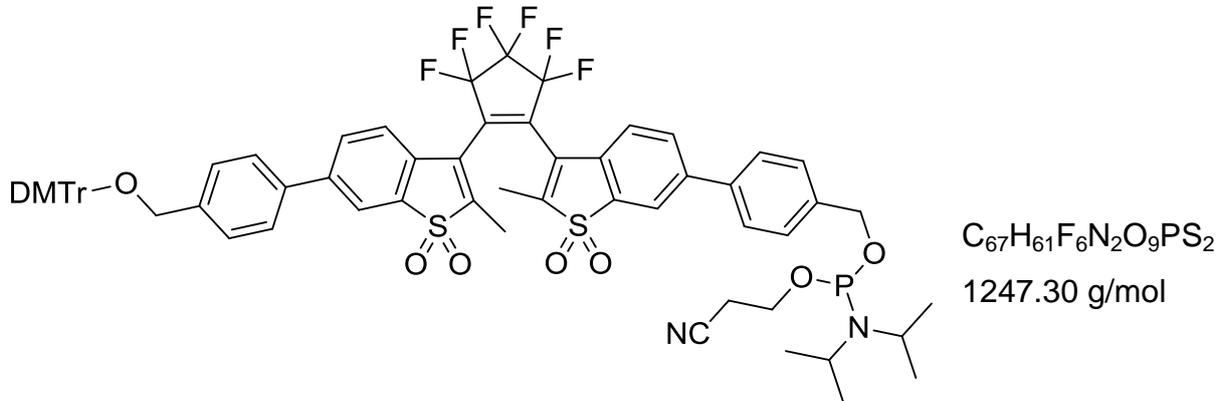
$R_f = 0.45$ (*n*-Hexan:EE 1:1).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.43 (s, 1H, H-Ar), 8.30 (s, 1H, H-Ar), 8.18 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H-Ar), 7.92 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H-Ar), 7.82 (m, 3H, H-Ar), 7.69 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-Ar), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-Ar), 7.43 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-Ar), 7.38 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-Ar), 7.31–7.11 (m, 8H, DMTr), 7.05–6.71 (m, 5H, DMTr), 5.30 (dt, 1H, *J* = 11.0, 5.5 Hz, OH), 4.54 (dd, 2H, *J* = 11.1, 5.7 Hz, CH₂), 4.37 (dd, 2H, *J* = 10.9, 5.7 Hz, CH₂), 3.42 (d, 6H, *J* = 2.1 Hz, CH₃, DMTr), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): 144.2, 142.9, 142.8, 142.7, 138.2, 135.2, 135.1, 135.4, 135.3, 133.1, 132.5, 132.2, 129.7, 128.0, 127.7, 127.5, 127.0, 126.8, 126.6, 124.6, 124.3, 124.1, 123.7, 122.1, 122.0, 120.8, 63.7, 61.2, 8.2.

MS (ESI): *m/z* (%) = 1049.3 (100) [M⁺].

6-(4-(O-(Dimethoxytrityl)hydroxymethyl)phenyl)-3-(hexafluor-2-(6-(4-(O-((2-cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphanyl)hydroxymethyl)phenyl)-2-methyl-1,1-dioxidbenzo[*b*]thiophen-3-yl)cyclopent-1-en-1-yl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid (**33**)



Es wurden 40 mg **34** (0.04 mmol), 9 μ L Diisopropylethylamin (0.06 mmol) und 10 μ L 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid (0.05 mmol) in 10 mL trockenem DCM unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde für 4 h bei 0 °C gerührt. Das Produkt wurde durch FC (*n*-Hexan:EE 2:1 + 0.1% NEt₃) gereinigt und zusätzlich aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 48 mg (0.04 mmol, 97%) des Produktes **33** als senffarbener Feststoff erhalten.

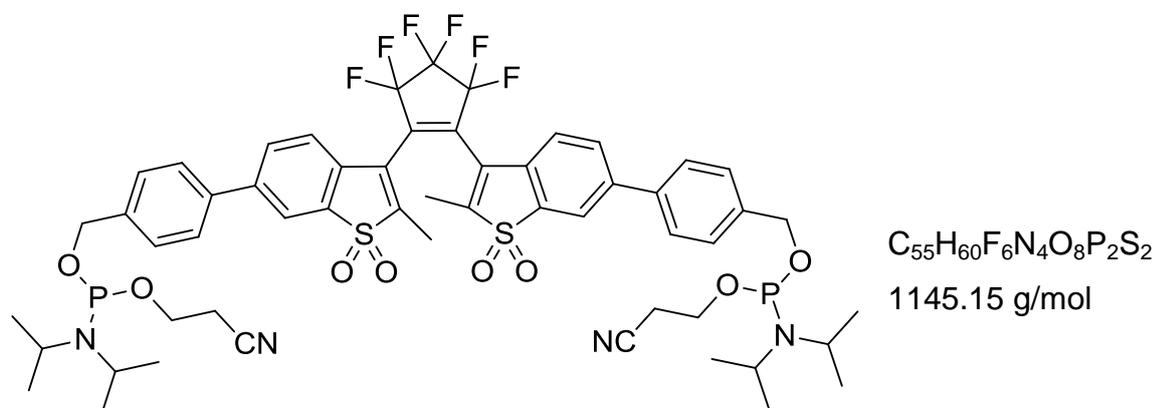
$R_f = 0.61$ (*n*-Hexan:EE 2:1).

^{31}P NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 148.0.

MS (ESI): m/z (%) = 1247.9 (100) [M^+].

Experimenteller Teil

3,3'-(Hexafluorocyclopent-1-en-1,2-diyl)bis(6-(4-((O-((2-cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphanyl)hydroxymethyl)phenyl)-2-methylbenzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid) (**35**)



Es wurden 54 mg **4** (0.05 mmol), 27 μ L Diisopropylethylamin (0.16 mmol) und 29 μ L 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid (0.13 mmol) in 10 mL trockenem DCM unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde für 3 h bei 0 °C gerührt. Das Produkt wurde durch FC (*n*-Hexan:EE 2:1 + 0.1% NEt_3) gereinigt und zusätzlich aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 52 mg (0.05 mmol, 90%) des Produktes **35** als brauner Feststoff erhalten.

$R_f = 0.73$ (*n*-Hexan:EE 2:1).

^{31}P NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 152.8.

MS (ESI): m/z (%) = 1146.3 (100) [M^+].

7.2 DNA-Synthese

Die Bausteine **31** und **33** und **35** wurden zur DNA-Synthese als 0.1 M (**31** in MeCN, **33** und **35** in DCM) eingesetzt. Um die Kupplungseffizienz des jeweiligen artifiziellen Bausteins zu erhöhen wurde das Kupplungsprotokoll im Vergleich zu den natürlich Basen (Kapitel V.2, Tabelle 14) verändert. Die genauen Syntheseprotokolle sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Modifiziertes Kupplungsprotokoll zum Einbau von 31 (oben) und 33/35 (unten) in DNA.

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit [s]
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	31 + Act	PULSE	6	150
18	31 + Act	PULSE	5	150
2	Act	PULSE	4	600
1	Wsh	PULSE	7	1050
1	Wsh	PULSE	8	0

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit [s]
\$ Coupling				
18	DCM	PULSE	40	0
2	Act	PULSE	5	0
19	33/35 + Act	PULSE	5	0
19	33/35 + Act	PULSE	5	600
2	Act	PULSE	5	600
18	DCM	PULSE	5	200
18	DCM	PULSE	40	0

Auch in diesem Teil der Arbeit wurden einige Oligonukleotide *DMTr-on* synthetisiert (s. Kapitel II.7.1).

Nach der DNA-Synthese und dem Abspalten vom CPG durch Behandlung mit 700 μ L konzentrierter Ammoniak-Lösung bei 55 °C für 18 h (**31**) oder bei RT für 24 h (**33** und **35**), wurden die Oligonukleotide durch *Reversed-Phase*-HPLC gereinigt (Kapitel V.2). Die zur analytischen und präparativen Trennung verwendeten Methoden sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Methoden zur Reinigung der Oligonukleotide durch *Reversed-Phase-HPLC*.

DNA	5'-DMTr-	Modifikation	Laufzeit [min]	Gradient [% von B]	T [°C]	Detektionswellenlängen
DNA29	<i>on</i>	31	45	0 - 40	RT	260 nm, 310 nm
DNA30	<i>on</i>	31	45	0 - 40	RT	260 nm, 310 nm
DNA31	<i>on</i>	31	45	0 - 40	RT	260 nm, 310 nm
DNA32	<i>on</i>	31	45	0 - 40	RT	260 nm, 310 nm
DNA35	<i>off</i>	33	45	0 – 50	40	260 nm, 340 nm, 448 nm
DNA36	<i>off</i>	33	45	0 - 50	40	260 nm, 340 nm, 448 nm
DNA37	<i>off</i>	35	45	0 - 50	40	260 nm, 340 nm, 448 nm

Schließlich wurde die terminale DMTr-Schutzgruppe der *DMTr-on* synthetisierten Stränge mit 80%iger Essigsäure abgespalten.

7.3 Charakterisierung der Oligonukleotide

Im Folgenden sind die Sequenzen der synthetisierten, modifizierten, sowie die der unmodifizierten, kommerziell erhältliche Oligonukleotide gezeigt, die in diesem Teil der Arbeit verwendet wurden.

DNA29	3'-GCA-GTC-TT 31 -TTC-ACT-GA-5'
DNA30	3'-GCA-GTC-TG 31 -GTC-ACT-GA-5'
DNA31	3'-GCA-GTC-TC 31 -CTC-ACT-GA-5'
DNA32	3'-GCA-GTC-TA 31 -ATC-ACT-GA-5'
DNA33	3'-GCA-GTC-TGT-GTC-ACT-GA-5'
DNA34	3'-TCA-GTG-ACA-CAG-ACT-GC-5'
DNA35	3'-CTC-AGT-A 33 T-ACT-GAG-5'
DNA36	3'-GCT-CAG-TA 33 -TAC-TGA-GC-5'
DNA37	3'-CAG-ATG-TCA-CAT- 35 -5'
DNA38	3'-ATG-TGA-CAT-CTG-5'

In Tabelle 10 sind die MS-Analytik und die molaren Extinktionskoeffizienten der modifizierten DNA-Stränge aufgelistet. Die zur Berechnung von ϵ_{260} nötigen Extinktionskoeffizienten der synthetisierten Bausteine bei $\lambda = 260$ nm wurden durch Absorptionsmessungen zu $56.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (1) und $33.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (4) bestimmt (Kapitel V.2, Formel 2).

Tabelle 10: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der 31, 33 und 35 modifizierten DNA-Stränge.

DNA	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
DNA29	5594.9	5597.7	203.1
DNA30	5644.9	5647.5	208.3
DNA31	5564.9	5566.7	200.4
DNA32	5612.9	5617.4	215.0
DNA37	4432.7	4435.0	153.7
DNA35	5065.8	5065.1	172.2
DNA36	5683.9	5688.3	189.3

Die Schmelztemperaturen T_M der hybridisierten Doppelstränge **DNA30_34** und **DNA37_38** und der Haarnadeln **DNA35** und **DNA36** wurden unter Standardbedingungen gemessen und sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Schmelztemperaturen der Diarylethen-modifizierten DNA-Stränge.

DNA	T_M [°C]	DNA	T_M [°C]
DNA30-34o	60.6	DNA35	55.0
DNA30-34z	56.8	DNA36	61.9
		DNA37_38	54.1

7.4 Belichtungsexperimente

Alle Belichtungsexperimente fanden in handelsüblichen 1 mL Quarzglas-Küvetten statt. Zur Analyse und Verfolgung der jeweiligen Belichtungen wurden in bestimmten Zeitintervallen Absorptions- und gegebenenfalls Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Experimenteller Teil

Für die Belichtung der Photoschalter **1**, **2**, **3** und **DNA30_34** wurde eine 75 W Xe-Gasentladungslampe der Firma *Oriel* verwendet. Um eine wellenlängenselektive Anregung zu gewährleisten, wurde das Licht durch einen Monochromator von *Corner Stone* gefiltert.

Schallexperimente mit **4** und **33/35**-modifizierter DNA wurde mit Hilfe eines Belichtungsreaktors durchgeführt. Dieser wurde unter anderem von *Michael Weinberger* entwickelt und von der feinmechanischen und elektronischen Abteilung der Universität Regensburg angefertigt.^[262] Neben der Steuerung wechselbarer Hochleistungs-LEDs (*Nichia*, 500 mA, 270 mW, $\lambda_{\max} = 365$ nm und 448 nm), kann damit die Temperatur über zwei Peltier-Elemente geregelt werden.

Bei Schallexperimenten wurden jeweils zwei LEDs gleicher Wellenlänge parallel verwendet. Um die Zusammensetzung der photostationären Lösung konstant zu halten, wurde zur Bestimmung der Photostabilität von **4** zwei LEDs verschiedener Wellenlängen eingesetzt.

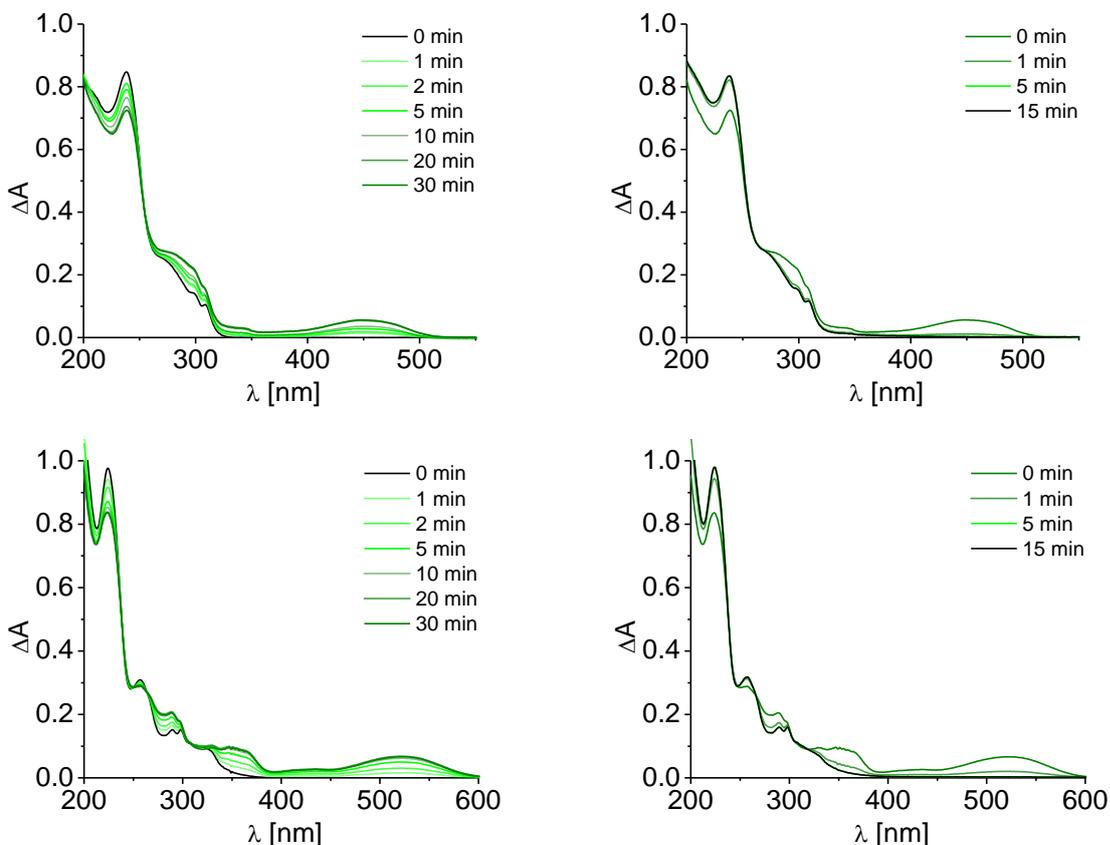


Abbildung 63: Absorptionsspektren aufgenommen während der Schließens (je links) und Öffnens (je rechts) von **12** ($\lambda_z = 238$ nm, $\lambda_o = 450$ nm, oben) und **28** ($\lambda_z = 224$ nm, $\lambda_o = 520$ nm, unten).

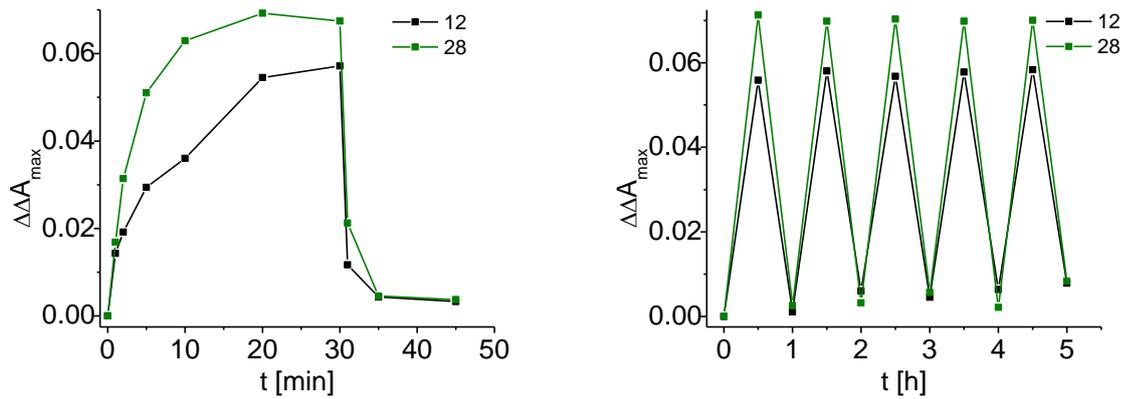


Abbildung 64: Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung am jeweiligen Absorptionsmaximum bei den Belichtungen von 12 ($\lambda_z = 238$ nm, $\lambda_o = 450$ nm) und 28 ($\lambda_z = 224$ nm, $\lambda_o = 520$ nm) (links) und bei abwechselnden Schalten zwischen offener und geschlossener Form (je 30 min).

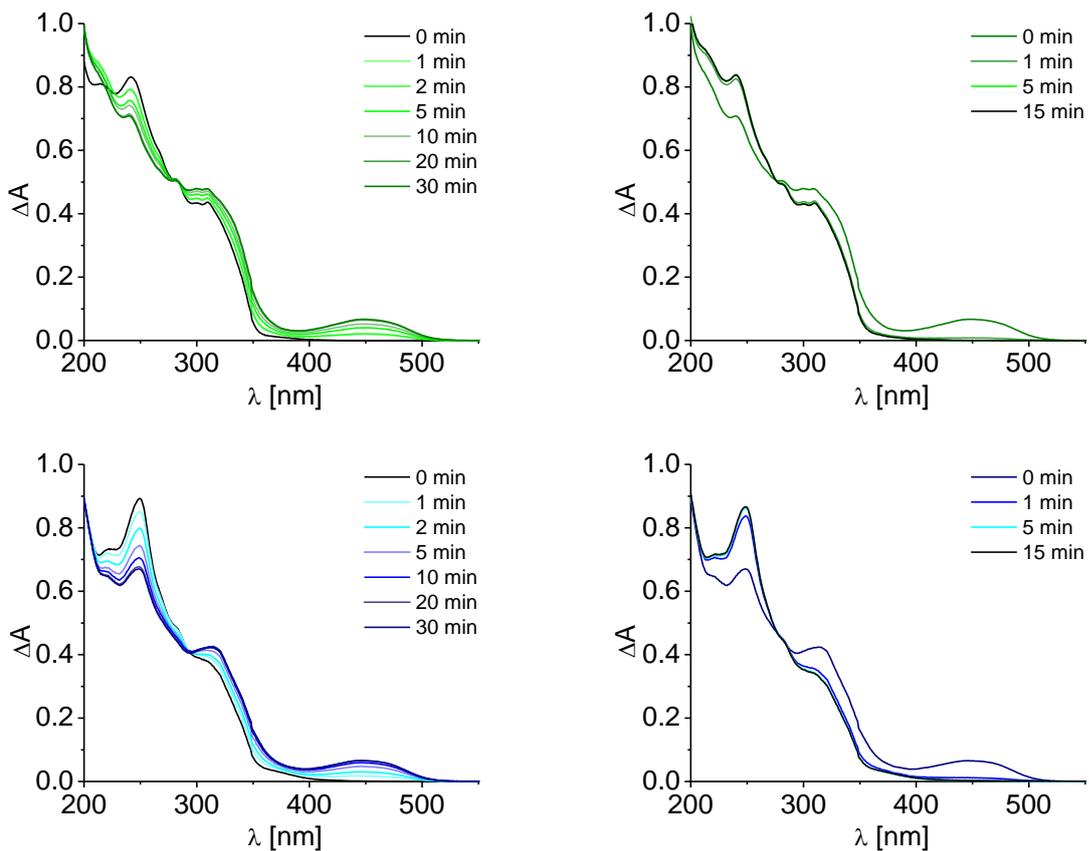


Abbildung 65: Absorptionsspektren aufgenommen während der Schließens (je links) und Öffnens (je rechts) von 1 ($\lambda_z = 242$ nm, $\lambda_o = 450$ nm, oben) und 2 ($\lambda_z = 250$ nm, $\lambda_o = 450$ nm, unten)

Experimenteller Teil

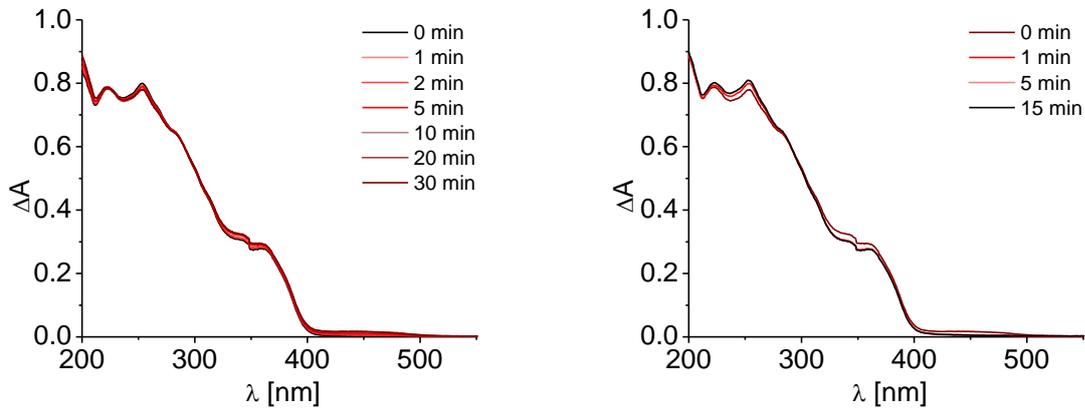


Abbildung 66: Absorptionsspektren aufgenommen während der Schließens (links) und Öffnens (rechts) von 3 ($\lambda_z = 254 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$).

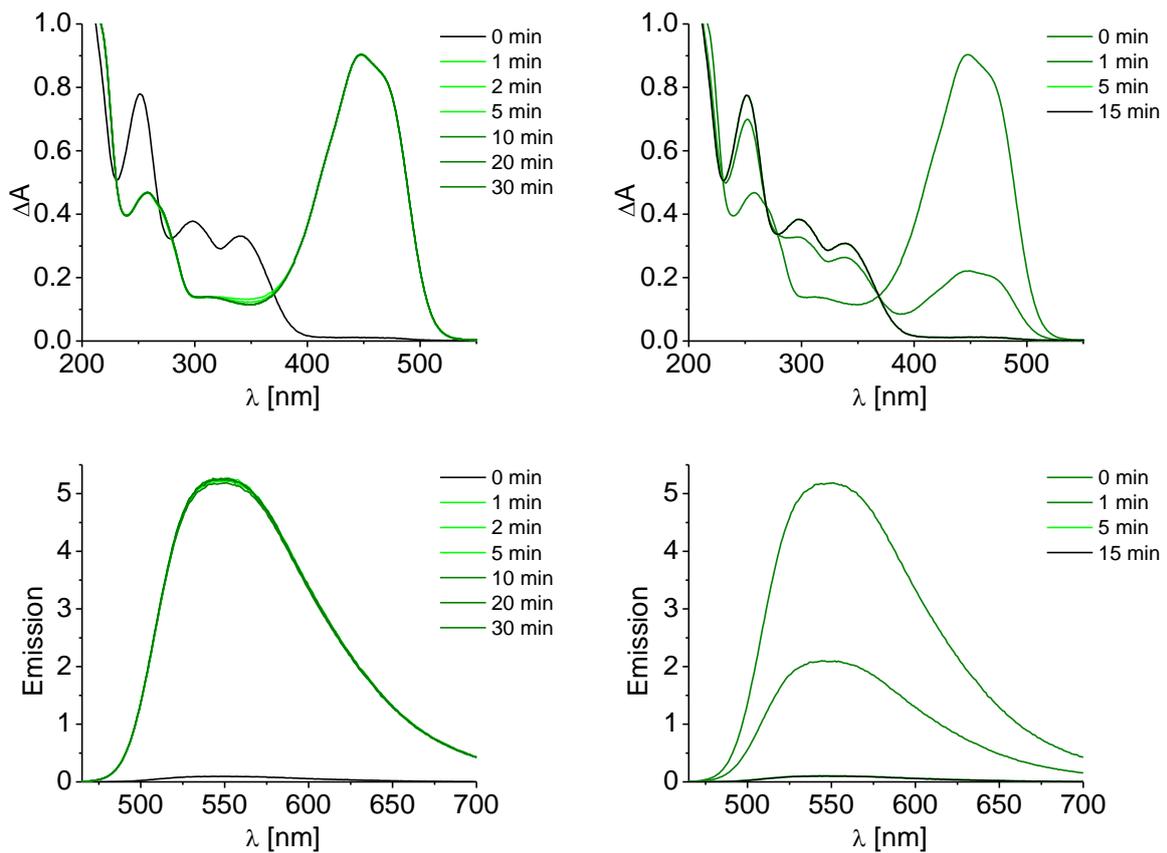


Abbildung 67: Absorptionsspektren (oben) und Fluoreszenzspektren (unten) aufgenommen während der Schließens (je links) und Öffnens (je rechts) von 4 ($\lambda_z = 365 \text{ nm}$, $\lambda_o = 448 \text{ nm}$).

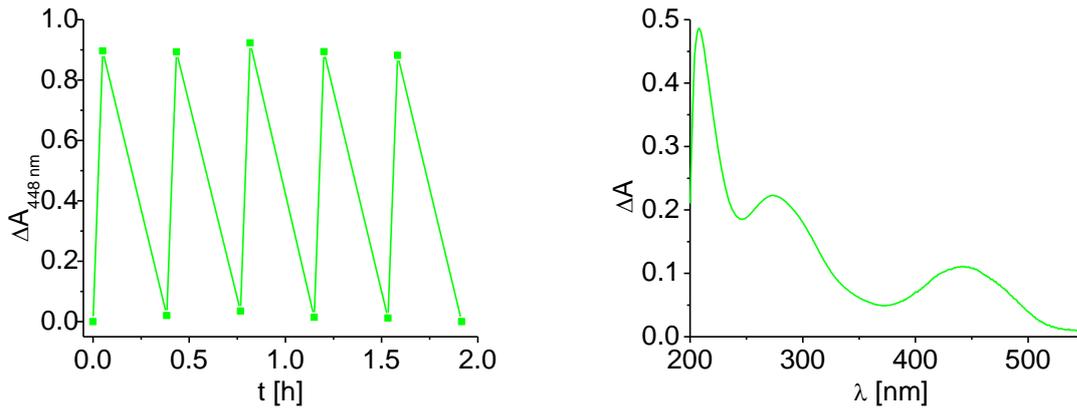


Abbildung 68: Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von 4 bei 448 nm bei abwechselnden Schalten zwischen offener und geschlossener Form (links) und 4z 12.5 μM in 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl nach 30 min Belichtung mit 365 nm (rechts).

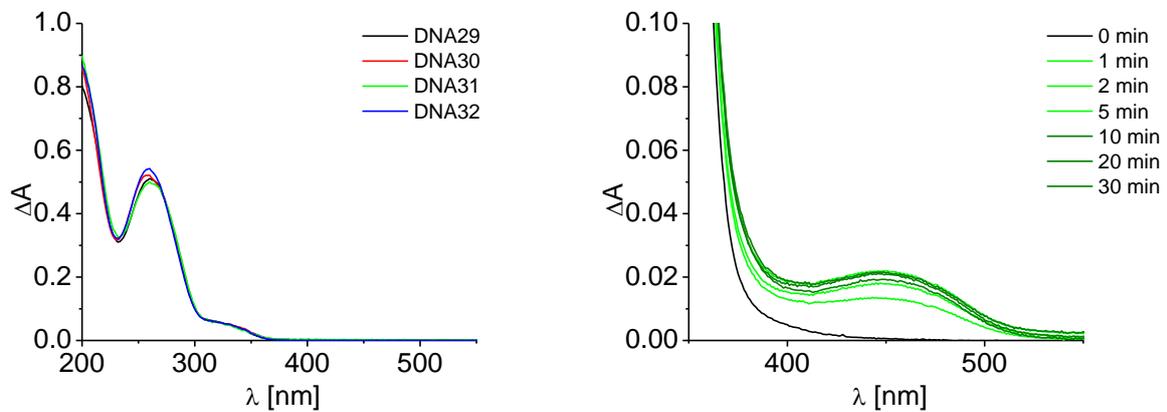


Abbildung 69: Absorptionsspektren von DNA29 – DNA32 (links) und Absorptionsspektren aufgenommen während des Schaltexperiments mit DNA30_34 (20 μM , $\lambda_z = 310 \text{ nm}$, $\lambda_o = 450 \text{ nm}$, rechts).

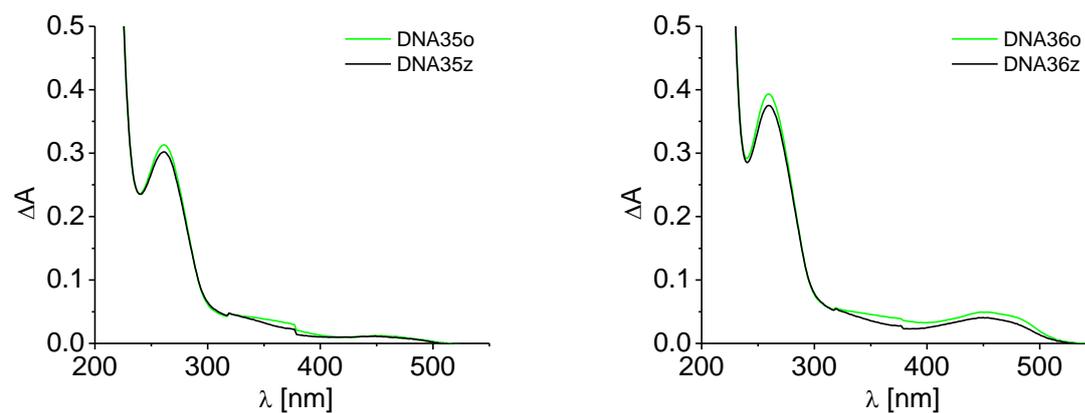


Abbildung 70: Absorptionsspektren der offenen Form (2.5 μM , DNA35o) und des photostationären Zustands (DNA35z) nach 30 min Belichtung von DNA35 ($\lambda_z = 365 \text{ nm}$) (links) und Absorptionsspektren der offenen Form (2.5 μM , DNA36o) und des photostationären Zustands (DNA36z) nach 30 min Belichtung von DNA36 ($\lambda_z = 365 \text{ nm}$) (rechts.)

Tabelle 12: Daten zu den photochromen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Photoschalter und DNA30_34

	ϵ_z [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	photochrome Ausbeute		ϕ_o [%]	ϕ_z [%]
		offen [%]	geschlossen [%]		
1	9.6	99	242 nm: 35 310 nm: 20	< 1	< 1
2	6.1	99	53	2.1	< 1
3	-	89	< 5	12.7	< 1
4	44.9	95	95	< 1	26.3
12	8.2	99	37	< 1	< 1
28	5.0	99	60	< 1	< 1
DNA30_34	5.8	99	18	< 1	< 1

7.5 Bestimmung der photochromen Ausbeute

Die Trennung und Quantifizierung von offener und geschlossener Form der Photoschalter **1**, **2**, **3**, **4**, **12**, **28**, und **DNA30_34** erfolgte durch *Reversed-Phase-HPLC* an einem *Shimadzu* HPLC System (Entgaser, Pumpeneinheit LC-10AT, Autosampler SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Hierfür wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm) verwendet. Diese wurde für molekulare Photoschalter mit dem jeweiligen H₂O/MeCN-Gemisch equilibriert und isokratisch betrieben. Für **DNA30_34** wurde ein Ammoniumacetatpuffer/MeCN-Gemisch mit Gradient verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die verwendeten HPLC-Methoden.

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Trennmethoden und Detektionswellenlängen zur Bestimmung der photochromen Ausbeute.

Verbindung	Laufzeit [min]	Laufmittel [% MeCN]	Detektionswellenlängen
1	15	60	242 nm, 284 nm, 450 nm
2	15	60	250 nm, 293 nm, 450 nm
3	30	40	254 nm, 286 nm, 450 nm
4	20	60	341 nm, 369 nm, 448 nm
12	20	75	238 nm, 254 nm, 450 nm
28	20	75	224 nm, 247 nm, 520 nm
DNA30_34	45	0-20	242 nm, 284 nm, 450 nm

IV. Zusammenfassung

Farbwechsel in DNA konnten in dieser Arbeit auf zwei verschiedenen Wegen verwirklicht werden. Zum einen wurde ein Fluoreszenzfarbwechsel von grün zu rot und umgekehrt durch Energietransferprozesse zwischen den beiden Cyaninfarbstoffen **TO** und **TR** dargestellt. Zum anderen konnte eine Änderung der Absorption von farblos hin zu gelb, während der Zyklisierung eines kovalent an DNA gebundenen Diarylethen-Photoschalters realisiert werden.

TO und **TR** - Strukturaufklärung und Anwendung in Strangaustauschprozessen

Um den Zusammenhang zwischen der Stabilität und der Struktur **TO**- und **TR**-modifizierter DNA sowie der Effizienz des Energietransfers zwischen diesen beiden Farbstoffen genauer zu untersuchen, wurden 4 verschiedene DNA-Haarnadeln synthetisiert. Diese unterscheiden sich in der Struktur der direkten Umgebung der Farbstoffmodifikationen (**ABS** vs. **A/T**) und der Schlaufenregion (**PEG** vs. **GAA**-Motiv). Diese Modifikationen erlauben eine weitreichende Variation der Stabilität der Haarnadeln.

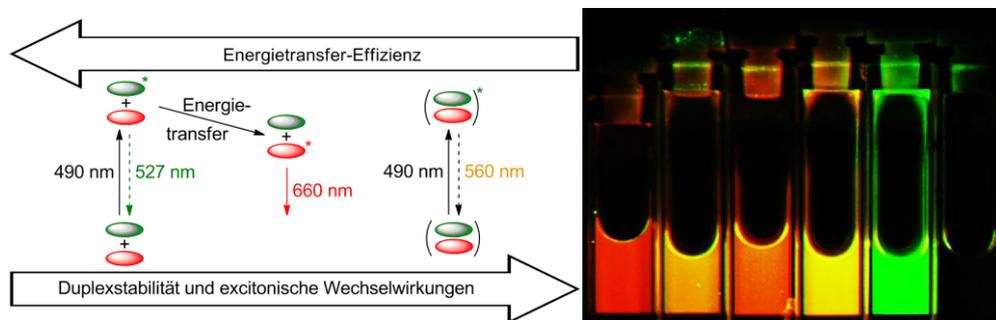


Abbildung 71: Energietransfer vs. excitonische Wechselwirkungen (links) und Fluoreszenzbilder der DNA-Haarnadeln (von links nach rechts) DNA6 - DNA9, DNA14 und DNA15 (rechts).

Durch absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Methoden und den Vergleich mit einfach- und unmodifizierten Haarnadeln, konnte ein direkter, linearer Zusammenhang zwischen dem R/G-Verhältnis und der thermischen Stabilität der Oligonukleotide ermittelt werden (s. Abbildung 71). Die strukturelle Flexibilität der weniger stabilen DNA-Stränge erlaubt intensive, excitonische Wechselwirkungen zwischen **TO** und **TR**. Diese stehen in Konkurrenz mit dem Energietransfer und äußern sich in einem niedrigen R/G-Verhältnis und einer geringen, excimerartigen Fluoreszenz. Durch genaue Analyse von Anregungsspektren der modifizierten Haarnadeln konnten diese excitonischen Wechselwirkungen eindeutig nachgewiesen

Zusammenfassung

werden. Das Wissen um diese Zusammenhänge ist entscheidend für die Entwicklung zukünftiger Fluoreszenzsonden auf Basis des Konzepts der „DNA/RNA *Traffic Lights*“.

Zusätzlich wurde für NMR-Messungen ein Strangdesign eines repräsentativen, mit **TO**- und **TR**-modifizierten Doppelstrangs entwickelt und dessen optimale Probenvorbereitung bestimmt. Dieser wurde in größerem Maßstab synthetisiert. Da erste Ergebnisse eine starke Aggregation der DNA-Doppelstränge nachwiesen, müssen hier die Messbedingungen noch verbessert werden.

Des Weiteren konnte ein System entwickelt werden, in dem **TO** und **TR** zur

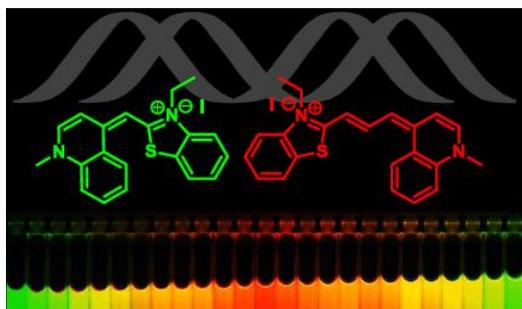


Abbildung 72: Schematische Darstellung der Struktur von **TO** und **TR** in DNA und der Verlauf des Fluoreszenzfarbwechsels, während zweier aufeinanderfolgender Strangaustauschprozesse.

Visualisierung von *Toehold*-basierten DNA-Strangaustauschexperimenten verwendet werden können. Über die Verfolgung des R/G-Verhältnisses während des Strangaustausches konnte dieser Prozess in Echtzeit verfolgt werden (s. Abbildung 72). Außerdem konnte, über die Analyse der finalen R/G-Verhältnisse bei variierenden *Toehold*-Längen und der Schmelztemperaturunterschiede

zwischen Templat- und Produktstrang, Vollständigkeit und Effizienz des Strangaustausches direkt bestimmt, erklärt und bewertet werden. Mit diesem Wissen war es möglich, zwei aufeinanderfolgende Strangaustauschprozesse zu verwirklichen. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für das Design und die Visualisierung komplexerer, auf DNA basierender, autonomer Nanomaschinen.

Diarylethen-Photoschalter in DNA

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und dem kovalenten Einbau von Diarylethen-Photoschaltern in DNA. Dafür wurden drei verschiedene nukleosidische Diarylethen-Photoschalter synthetisiert. Diese konnten über eine Sonogashira-Kupplung an **IdU** als zentralen Schritt und durchgehend guten Ausbeuten hergestellt werden. Des Weiteren wurde ein nicht-nukleosidischer Photoschalter **4** zum direkten Einbau in das DNA-Rückgrat auf zwei verschiedene Arten synthetisiert. Der Weg über eine doppelte *Friedel-Crafts*-Acylierung hin zum Grundgerüst **28** mit perfluoriertem Cyclopentenring wurde bisher noch nicht beschrieben und dient als Alternative zu bisherigen Syntheserouten. Durch

Methoden der Absorptionsspektroskopie stellte sich in verschiedenen Belichtungsexperimenten heraus, dass nur **1** und **4** neben der DNA-eigenen Absorption über 300 nm selektiv, stabil und reversibel geschaltet werden können.

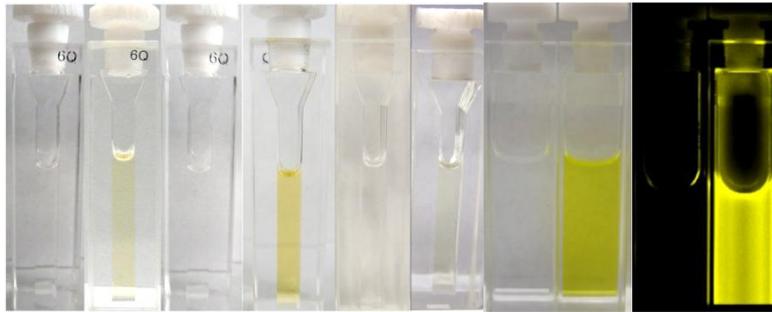


Abbildung 73: Bilder der Lösungen vor (je links) und nach (je rechts) Belichtung im Absorptionsmaximum von (von links nach rechts) 1 - 4 (bei 4 Absorption und Fluoreszenz).

Zusätzlich war die geschlossene Form von **4** intrinsisch fluoreszent. Nach Inkorporation der synthetisierten Bausteine in DNA stellte sich heraus, dass **4** in der DNA-Umgebung der gewählten Sequenzen nicht mehr effizient schaltbar war. Durch genauen Vergleich der optischen Eigenschaften von Monomer und Oligonukleotid konnte vermutet werden, dass die Zyklisierung in Konkurrenz mit Elektronentransferprozessen steht oder die DNA-Struktur das Schalten durch die selektive Stabilisierung der photochemisch nicht aktiven, parallelen Konformation des Diarylethens stört. Auch eine Kombination beider Effekte ist denkbar. Im Gegensatz

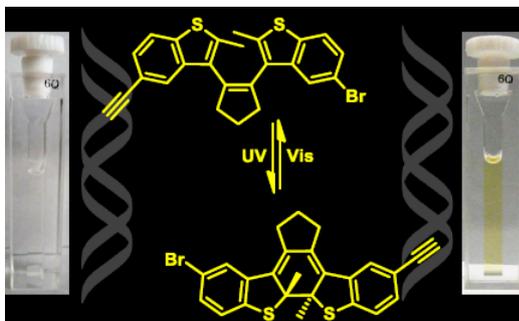


Abbildung 74: Schematische Darstellung der Strukturänderung von **31** in DNA während der Zyklisierung bei Bestrahlung mit UV-Licht und der Zykloreversion während der Bestrahlung mit sichtbarem Licht.

dazu blieben die photochromen Eigenschaften des nukleosidischen Photoschalters, unabhängig von der gewählten Sequenz, in DNA erhalten (s. Abbildung 74). Dessen Einfluss auf die Struktur des Doppelstrangs konnte durch die Änderung der Schmelztemperatur nachvollzogen werden. Damit ist **DNA30_34**, zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Teils der Arbeit, die erste durch kovalente Modifikation eines Diarylethen reversibel und stabil schaltbare DNA. Dies eröffnet den Weg für den Gebrauch von Diarylethenen als photochrome Einheit in DNA-basierten Architekturen und repräsentiert einen wichtigen Schritt für das Design und die Synthese photoaktiver Nanostrukturen und Materialien.

V. Materialien und Methoden

1 Organische Synthese

Reagenzien und Lösungsmittel

Die für die Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *TCl*, *ABCR*, *VWR*, *Merck* und *Alfa Aesar* bezogen. Die verwendete Qualität war mindestens „zur Synthese“. Alle verwendeten Lösungsmittel besitzen mindestens die Qualitätsstufe p.A. (*pro analysi*, lt. *für die Analyse*). Lösungsmittel wurden von *Acros Organics* bezogen und unter Ar aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Schutzgas

Die Reaktionen wurden gegebenenfalls zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Argonatmosphäre (Schweißargon 5.0, 99.999% Reinheit) durchgeführt.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* verwendet (60 F₂₅₄ Kieselgel, Schichtdicke 0.25 mm). Die optische Auswertung erfolgte über Fluoreszenzlösung bei $\lambda = 254$ nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Die chemische Auswertung DMTr-geschützter Substanzen und Nukleoside erfolgte durch Anfärben mit Schwefelsäure (3%) in Methanol und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftfön.

Flash-Säulenchromatographie (FC):

Als stationäre Phase wurde Kieselgel der Firma *Aldrich* (Korngröße 40-63 μm) verwendet. Die Säule wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[263] bei einem Überdruck von 0.5 bar chromatographiert. Die zu reinigende Substanz wurde entweder im Laufmittel gelöst, oder auf Kieselgel adsorbiert aufgetragen.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden an einem *Bruker Avance 300*, *Avance 400*, *Avance 600* oder *Avance DRX 500* am KIT, Institut für Organische Chemie, in deuterierten

Lösungsmitteln aufgenommen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalteten ca. 10 - 20 mg Substanz in 0.6 – 0.7 mL Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz diente das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels ($^1\text{H-NMR}$) bzw. das Lösungsmittelsignal ($^{13}\text{C-NMR}$):^[264]

Aceton- d_6 :	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.05$ ppm	$^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 29.84$ ppm
CDCl_3 :	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26$ ppm	$^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.16$ ppm
$\text{DMSO-}d_6$:	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.50$ ppm	$^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39.52$ ppm
$\text{MeOD-}d_4$:	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 3.31$ ppm	$^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 49.00$ ppm

Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizität der ^1H -Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), qi, (Quintett), dd (Dublett von Dublett), dt (Dublett von Triplet), m (Multiplet).

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren wurden durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie am KIT, Institut für Organische Chemie gemessen. Die Spektrometer werden nachfolgend kurz zusammengefasst:

EI/FAB: *Finnigan* MAT SSQ 710 A

HR ESI: *Agilent Technologies* 6230 TOF LC/MS

MALDI: Biflex-IV Spektrometer von *Bruker Daltonics*

Die Angabe der Peaks erfolgte im Masse zu Ladungsverhältnis m/z .

Optische Spektroskopie

Alle Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, in 1 mL fassenden Quarzglasvetten der Firma *Starna* mit einer Dicke von 1 cm, bei einer Temperatur von 20 °C, bei pH 7 und ständiger Spülung des Probenraums mit Druckluft. Für die Messungen wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) bzw. entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

UV/Vis-Absorptionsmessungen:

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden in einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit temperierbarem Küvettenhalter aufgenommen. Die Spektren wurden gegen die UV/Vis-Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: *SBW: 2.0 nm, Average time 0.1 s, Data interval 1.0, Light source change over 350 nm bzw. 390 nm.*

Fluoreszenzmessungen:

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* von *Jobin-Yvon* mit einem Peltier-Element *LFI-3751* von *Wavelength Electronics* zur Temperatursteuerung durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einer Toleranz von 0.1 °C. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: *Increment: 1.0 nm, Increment time: 0.2 s, Integration time 0.1 s.*

Quantenausbeute:

Quantenausbeuten wurden an einem *Quantaaurus QY C11347* in 5 mL fassenden Quarzglas-Küvetten der Firma *Hamamatsu* bestimmt.

2 Oligonukleotidsynthese

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese von modifizierten Oligonukleotiden erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* Syntheseautomaten von *Applied Biosystems*. Als Träger dienten CPGs mit 1 μmol Belegung (500 Å). Das Gerät wurde mit Argon (Schweißargon 5.0, 99.999% Reinheit) als Schutzgas betrieben. Die benötigten Reagenzien, CPG-Säulen und Phosphoramidite wurden von den Firmen *Glen Research* und *Proligo* bezogen.

Der Syntheseautomat fördert Flüssigkeiten aus Reservoirs in Pulsen von je 16 μL durch die CPG-Säulen. Er folgt dabei einem zuvor festgelegten Kupplungsprotokoll, das aus Einzelschritten besteht, 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 im Folgenden aufgeführt:

Dblk:	3% Dichloressigsäure in CH_2Cl_2
Wsh:	MeCN
Act:	0.45 M Tetrazol in MeCN
Caps:	Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und <i>N</i> -Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B)
Ox:	Iod in Wasser/THF/Pyridin

Die kommerziell erhältlichen Phosphoramidite der natürlichen DNA-Basen werden in abs. MeCN ($c = 0.067 \text{ M}$) gelöst. Für diese erfolgt der Einbau in Oligonukleotide nach einem Standardsyntheseprotokoll (Tabelle 14). Die 5'-terminale DMTr-Schutzgruppe kann hierbei abgespalten werden (*DMTr-off* Synthese) oder, um eine spätere Reinigung durch HPLC zu erleichtern, an der Hydroxylgruppe belassen werden (*DMTr-on* Synthese).

Tabelle 14: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Basen am Beispiel des Phosphoramidits von G.

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit [s]
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	G + Act	PULSE	6	0
18	G + Act	PULSE	1	8
2	Act	PULSE	4	32
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	12	0
12	Wsh A	PULSE	6	22
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

Aufarbeitung

Nach der DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen am Hochvakuum über Nacht getrocknet. Zur Abspaltung der DNA vom Trägermaterial und zur Entfernung der basenlabilen Schutzgruppen, wurden die Säulen mit einer Zange geöffnet und das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, mit 700 µL konz. Ammoniaklösung (> 25%, trace select, *Fluka*) versetzt und bei 45 °C für 24 h inkubiert. Nach der Reaktionszeit wurde die Lösung an einem Vakuumkonzentrator CMC-2 Alpha RVC der Firma *Christ* vom Ammoniak befreit (105 min, 34 °C, 100 mbar), das CPG-Granulat abzentrifugiert und dreimal mit je 200 µL Millipore-Wasser gewaschen. Danach wurde das restliche Wasser am Vakuumkonzentrator entfernt (3 h, 25 °C, 0.1 mbar).

Reinigung durch HPLC

Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgte durch *Reversed-Phase*-HPLC an einem *Shimadzu* HPLC System (Entgaser, Pumpeneinheit LC-10AT, Autosampler SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Für die analytische Chromatographie wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm) verwendet. Präparative Trennung erfolgte über eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 10 mm, 5 μ m). Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5, Laufmittel A) equilibriert und im Gradienten mit MeCN (Laufmittel B) eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min für analytische, bzw. 2.5 mL/min für präparative Methoden. Bei selbstkomplementären DNA-Sequenzen wurde teilweise die Säule mit einem Smartline Säulenthermostat der Firma *Knauer* zur Verbesserung der Trennleistung auf 40 °C geheizt. Zur Injektion auf die präparative Säule wurde das DNA-Gemisch in 200 μ L Milliporwasser aufgenommen.

Die Produkte der Chromatographie wurden in einzelnen Fraktionen in Eppendorf Reaktionsgefäßen (1.7 mL) gesammelt. Um die Identität und Sauberkeit der DNA festzustellen wurde von den aufgefangenen Fraktionen Massenspektren aufgenommen. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. *DMTr-off* synthetisierte DNA wurde in entionisiertem Wasser aufgenommen und als Stammlösung verwendet.

DMTr-on synthetisierte DNA wurde zur Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe mit je 200 μ L 80%iger Essigsäure versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde das Lösemittel im Vakuumkonzentrator (3 h, 25 °C, 0.1 mbar) abgezogen und die DNA wiederum mit 100 μ L Millipor-Wasser versetzt. Das dabei ausfallende DMTr wurde ab zentrifugiert und die überstehende DNA-Lösung entnommen.

Charakterisierung durch Massenspektrometrie

MALDI-Massenspektren von Oligonukleotiden wurden am KIT, Institut für Organische Chemie an einem Biflex-IV Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linear negativen Modus aufgenommen. Als Matrix diente entweder eine 2:1 Mischung aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (0.3 M in EtOH) und Diammoniumcitrat (0.1 M in Wasser) oder 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA, ges. Lösung in 50% MeCN) und Diammoniumcitrat (0.1 M in Wasser) im Volumenverhältnis 9:1.

Sublimationstrocknung

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

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde über das *Lambert-Beersche Gesetz* durch die Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ bestimmt.^[265] Der molare Extinktionskoeffizient ε_{260} des Oligonukleotids bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ in Wasser kann über folgende Formel 2 berechnet werden.

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

Formel 2: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten eines DNA-Strangs.

A:	Anzahl der Adeninbasen	$\varepsilon_A:$	$15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
G:	Anzahl der Guaninbasen	$\varepsilon_T:$	$8.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
T:	Anzahl der Thyminbasen	$\varepsilon_G:$	$11.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
C:	Anzahl der Cytosinbasen	$\varepsilon_C:$	$7.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Durch den Faktor 0.9 wird die Hypochromizität berücksichtigt. Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide muss der entsprechende Extinktionskoeffizient der Modifikation bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ addiert werden. Dieser wurde für **1** und **4** durch Messung der Absorption 3 verschiedener Konzentrationen von 3 unabhängigen Einwaagen bestimmt. Die so gemessenen Absorbanzen wurden gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Der Extinktionskoeffizient ergibt sich aus der Steigung der entstandenen Gerade.

Die Messung der Absorbanz der DNA zur Bestimmung der Konzentration erfolgte an einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäure- oder UV/Vis-Modus.

Unmodifizierte Oligonukleotide

Unmodifizierte Oligonukleotide wurden von *Metabion* bezogen und waren bereits HPLC gereinigt und lyophilisiert. Die Stoffmenge der gekauften Stränge lag bei $1.0 \mu\text{mol}$. Die DNA wurde vor ihrer Verwendung in entionisiertem Wasser aus einer

Oligonukleotidsynthese

Millipore-Entsalzungsanlage gelöst und ihre Konzentration wie oben beschrieben bestimmt.

Hybridisierung

Falls nicht anders beschrieben wurde der modifizierte Einzelstrang zusammen mit 1.0 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaPi) und 250 mM NaCl bei pH 7 für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Spektroskopie

Alle Messungen an Oligonukleotiden wurden an denselben Geräten wie bei den organischen Molekülen durchgeführt.

Die UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzmessungen aller DNA-Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 2.5 μ M mit 250 mM NaCl in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7.0 durchgeführt.

Schmelztemperaturmessungen

Die Schmelztemperaturmessungen erfolgten analog den UV/Vis-Absorptionsmessungen über einen Temperaturbereich von 10 °C – 90 °C. Die Temperatur am Start- bzw. Endpunkt wurde jeweils 10 min konstant gehalten. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min. Die Messdaten wurden in 0.5 °C Abständen erfasst. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes wurde die Absorptionsänderung bei $\lambda = 260$ nm mit der Temperaturänderung verfolgt (Wendepunkt). Die Kurve wurde sigmoidal angepasst und differenziert. Der Schmelzpunkt ist das Maximum der Ableitung.

VI. Literaturverzeichnis

- [1] R. Feynman, *Plenty of Room at the Bottom* **1959**, <http://www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html> (Stand: 20.05.14).
- [2] J. Wullweber, *Peripherie* **2006**, 26, 99-118.
- [3] Wikipedia, *Nanotechnologie*, **2014**, <http://de.wikipedia.org/wiki/Nanotechnologie> (Stand: 21.05.14).
- [4] D. M. Eigler, E. K. Schweizer, *Nature* **1990**, 344, 524-526.
- [5] KavliFoundation, *2010 Nanoscience Prize Explanatory Notes*, **2010**, <http://www.kavlifoundation.org/2010-nanoscience-prize-explanatory-notes> (Stand: 21.05.14).
- [6] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, 421, 427-431.
- [7] J. Bath, A. J. Turberfield, *Nature Nanotechn.* **2007**, 2, 275-284.
- [8] H. Liu, D. Liu, *Chem. Commun.* **2009**, 2625-2636.
- [9] J. Huang, X. Yang, X. He, K. Wang, J. Liu, H. Shi, Q. Wang, Q. Guo, D. He, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2014**, 53, 11-20.
- [10] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7373-7379.
- [11] Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1044-1056.
- [12] P. V. Chang, C. R. Bertozzi, *Chem. Comm.* **2012**, 48, 8864-8879.
- [13] B. A. Armitage, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 806-812.
- [14] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2579-2619.
- [15] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7268-7272.
- [16] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, 13, 1136-1138.
- [17] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 890-894.
- [18] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239-1248.
- [19] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, WILEY-VCH, **2002**.
- [20] G. G. Stokes, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1852**, 142, 463-562.
- [21] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 6, 55-75.
- [22] S. Laib, S. Seeger, *Journal of Fluorescence* **2004**, 14, 187-191.
- [23] J. H. Markus Sauer, Jörg Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, WILEY-VCH, **2011**.
- [24] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4562-4588.
- [25] P. R. Selvin, in *Methods in Enzymology*, Vol. 246 (Ed.: S. Kenneth), Academic Press, **1995**, pp. 300-334.
- [26] I. H. Stein, V. Schüller, P. Böhm, P. Tinnefeld, T. Liedl, *ChemPhysChem* **2011**, 12, 689-695.
- [27] J. R. Grunwell, J. L. Glass, T. D. Lacoste, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4295-4303.
- [28] K. Kikuchi, H. Takakusa, T. Nagano, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 407-415.
- [29] S. E. McDowell, J. M. Jun, N. G. Walter, *RNA* **2010**, 16, 2414-2426.
- [30] D. Shu, H. Zhang, R. Petrenko, J. Meller, P. Guo, *ACS Nano* **2010**, 4, 6843-6853.
- [31] D. M. J. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 507-517.

- [32] G. S. Bassi, N. E. Møllegaard, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3345-3354.
- [33] N. G. Walter, J. M. Burke, D. P. Millar, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, *6*, 544-549.
- [34] H. Fang, D. J. Clark, J. J. Hayes, *Nucl. Acids Res.* **2012**, *40*, 1475-1484.
- [35] A. Kienzler, R. Flehr, R. A. Kramer, S. r. Gehne, M. U. Kumke, W. Bannwarth, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1852-1863.
- [36] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10002-10003.
- [37] A. Iqbal, S. Arslan, B. Okumus, T. J. Wilson, G. Giraud, D. G. Norman, T. Ha, D. M. J. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11176-11181.
- [38] K. Börjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.
- [39] T. Kato, H. Kashida, H. Kishida, H. Yada, H. Okamoto, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 741-750.
- [40] M. Masuko, S. Ohuchi, K. Sode, H. Ohtani, A. Shimadzu, *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, e34.
- [41] H. Kashida, T. Takatsu, K. Sekiguchi, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2479-2486.
- [42] D. Lindegaard, A. S. Madsen, I. V. Astakhova, A. D. Malakhov, B. R. Babu, V. A. Korshun, J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 94-99.
- [43] M. E. Ostergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5771-5788.
- [44] M. A. Campbell, J. Wengel, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680-5689.
- [45] C. Dohno, K. Nakatani, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5718-5729.
- [46] P. Murat, Y. Singh, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5293-5307.
- [47] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856-870.
- [48] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062-2063.
- [49] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 865-868.
- [50] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.
- [51] I. Prokhorenko, I. Astakhova, K. Momynaliev, T. Zatsepin, V. Korshun, in *Single Nucleotide Polymorphisms*, Vol. 578 (Ed.: A. A. Komar), Humana Press, **2009**, pp. 209-222.
- [52] B. Juskowiak, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 171-180.
- [53] E. Rothenberg, T. Ha, in *Helicases*, Vol. 587 (Ed.: M. M. Abdelhaleem), Humana Press, **2010**, pp. 29-43.
- [54] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547-553.
- [55] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [56] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **1998**, *16*, 49-53.
- [57] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.
- [58] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526-528.
- [59] S. Jockusch, A. A. Marti, N. J. Turro, Z. Li, X. Li, J. Ju, N. Stevens, D. L. Akins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 493-498.
- [60] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 402-405.
- [61] A. A. Marti, S. Jockusch, Z. Li, J. Ju, N. J. Turro, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, e50.
- [62] X. Li, Z. Li, A. A. Marti, S. Jockusch, N. Stevens, D. L. Akins, N. J. Turro, J. Ju, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 896-902.
- [63] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9307-9310.
- [64] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897-1900.

- [65] S. Sezi, R. Varghese, T. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 173-176.
- [66] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3923-3933.
- [67] R. X.-F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. R. IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678.
- [68] C. Strässler, N. E. Davis, E. T. Kool, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 2160-2171.
- [69] J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12748-12749.
- [70] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590-11591.
- [71] A. Cuppoletti, Y. Cho, J.-S. Park, C. Strässler, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 528-534.
- [72] F. Samain, S. Ghosh, Y. N. Teo, E. T. Kool, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7025-7029.
- [73] F. Samain, N. Dai, E. T. Kool, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 174-183.
- [74] V. Singh, S. Wang, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6184-6191.
- [75] A. Dietrich, V. Buschmann, C. Müller, M. Sauer, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *82*, 211-231.
- [76] C. H. Lin, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 817-832.
- [77] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [78] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [79] Z. Li, T. M. Rana, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1122-1131.
- [80] M. R. Lares, J. J. Rossi, D. L. Ouellet, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 570-579.
- [81] D. M. Dykxhoorn, J. Lieberman, *Cell* **2006**, *126*, 231-235.
- [82] K. Raemdonck, K. Remaut, B. Lucas, N. Sanders, J. Demeester, S. C. D. Smedt, *Biochemistry* **2006**, *45*, 10614-10623.
- [83] A. Järve, J. Müller, I.-H. Kim, K. Rohr, C. MacLean, G. Fricker, U. Massing, F. Eberle, A. Dalpke, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, M. Helm, *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, e124.
- [84] S. Shin, H.-M. Kwon, K.-S. Yoon, D.-E. Kim, S. S. Hah, *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 2110-2113.
- [85] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1931-1934.
- [86] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2051-2060.
- [87] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [88] J. R. Carreon, K. M. Stewart, J. Kerry P. Mahon, S. Shin, S. O. Kelley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5182-5185.
- [89] N. Stewens, N. O'Connor, H. Vishwasrao, D. Samaroo, E. R. Kandel, D. L. Akins, C. M. Drain, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7182-7183.
- [90] S. Barrois, S. Worner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1126-1129.
- [91] I. Hirao, Y. Nishimura, Y.-i. Tagawa, K. Watanabe, K.-i. Miura, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 3891-3896.
- [92] S. Yoshizawa, G. Kawai, K. Watanabe, K.-i. Miura, I. Hirao, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4761-4767.
- [93] S. Rumney, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5635-5646.
- [94] W. Pils, R. Micura, *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, 1859-1863.
- [95] R. F. Khairutdinov, N. Serpone, *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 2602-2610.

- [96] L. D. Simon, K. H. Abramo, J. K. Sell, L. B. McGown, *Biospectroscopy* **1998**, *4*, 17-25.
- [97] G. Cosa, K. S. Focsaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee, J. C. Scaiano, *J. Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 585-599.
- [98] T. Sagawa, H. Tobata, H. Ihara, *Chem. Comm.* **2004**, 2090-2091.
- [99] A. Fürstenberg, M. D. Julliard, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7661-7669.
- [100] M. Kasha, *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55-70.
- [101] E. G. McRae, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 721-722.
- [102] S. R. Lynch, H. Liu, J. Gao, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14704-14711.
- [103] S. Patnaik, B. P. Cho, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1650-1652.
- [104] N. Escaja, I. Gomez-Pinto, J. Viladoms, E. Pedroso, C. Gonzalez, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4804-4810.
- [105] R. Carlson, *Nat Biotech* **2009**, *27*, 1091-1094.
- [106] J. SantaLucia, D. Hicks, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *33*, 415-440.
- [107] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 65-87.
- [108] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, *321*, 1795-1799.
- [109] W. M. Shih, C. Lin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 276-282.
- [110] F. Menacher, V. Stepanenko, F. Würthner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6683-6688.
- [111] Y. Lu, J. Liu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 580-588.
- [112] I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1153-1165.
- [113] P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nature Genetics* **1998**, *19*, 225-232.
- [114] C. S. Lee, R. W. Davis, N. Davidson, *J. Mol. Biol.* **1970**, *48*, 1-22.
- [115] C. M. Radding, K. L. Beattie, W. K. Holloman, R. C. Wiegand, *J. Mol. Biol.* **1977**, *116*, 825-839.
- [116] D. Y. Zhang, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17303-17314.
- [117] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605-608.
- [118] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144-146.
- [119] E. R. Kay, D. A. Leigh, F. Zerbetto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 72-191.
- [120] F. C. Simmel, B. Yurke, *Phys. Rev.* **2001**, *63*, 041913.
- [121] F. C. Simmel, B. Yurke, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 883-885.
- [122] Y. Tian, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11410-11411.
- [123] H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62-65.
- [124] L. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, H. Yan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4342-4346.
- [125] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*, 73-77.
- [126] J.-S. Shin, N. A. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10834-10835.
- [127] W. B. Sherman, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1801-1801.
- [128] P. Yin, H. M. T. Choi, C. R. Calvert, N. A. Pierce, *Nature* **2008**, *451*, 318-322.
- [129] T. Omabegho, R. Sha, N. C. Seeman, *Science* **2009**, *324*, 67-71.
- [130] S. J. Green, J. Bath, A. J. Turberfield, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 238101.
- [131] P. Yin, H. Yan, X. G. Daniell, A. J. Turberfield, J. H. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4906-4911.
- [132] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature* **2010**, *465*, 202-205.

- [133] K. Lund, A. J. Manzo, N. Dabby, N. Michelotti, A. Johnson-Buck, J. Nangreave, S. Taylor, R. Pei, M. N. Stojanovic, N. G. Walter, E. Winfree, H. Yan, *Nature* **2010**, *465*, 206-210.
- [134] S. Venkataraman, R. M. Dirks, P. W. K. Rothmund, E. Winfree, N. A. Pierce, *Nature Nanotechn.* **2007**, *2*, 490-494.
- [135] B. J. Yeh, W. A. Lim, *Nat. Chem. Bio.* **2007**, *3*, 521-525.
- [136] F. J. Isaacs, D. J. Dwyer, J. J. Collins, *Nature Biotechnol.* **2006**, *24*, 545-554.
- [137] M. N. Win, C. D. Smolke, *Science* **2008**, *322*, 456-460.
- [138] J. Kim, K. S. White, E. Winfree, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*.
- [139] Z. B. Simpson, T. L. Tsai, N. Nguyen, X. Chen, A. D. Ellington, *J. R. Soc. INTERFACE* **2009**, *6*, S523-S533.
- [140] A. P. de Silva, S. Uchiyama, *Nature Nanotechn.* **2007**, *2*, 399-410.
- [141] B. Chakraborty, R. Sha, N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17245-17249.
- [142] G. Seelig, D. Soloveichik, D. Y. Zhang, E. Winfree, *Science* **2006**, *314*, 1585-1588.
- [143] J. M. Picuri, B. M. Frezza, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9368-9377.
- [144] S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3085-3088.
- [145] N. Dave, J. Liu, *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 15694-15699.
- [146] D. Görl, X. Zhang, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6328-6348.
- [147] P. Gorostiza, E. Y. Isacoff, *Science* **2008**, *322*, 395-399.
- [148] T. Fehrentz, M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156-12182.
- [149] X. Liang, H. Nishioka, N. Takenaka, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 702-705.
- [150] H. Nishioka, X. Liang, T. Kato, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1165-1168.
- [151] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422-4437.
- [152] M. Erdélyi, A. Karlén, A. Gogoll, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 403-412.
- [153] B. Reisinger, N. Kuzmanovic, P. Löffler, R. Merkl, B. König, R. Sterner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 595-598.
- [154] H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 39-44.
- [155] H. Nishioka, X. Liang, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Comm.* **2007**, 4354-4356.
- [156] H. Nishioka, X. Liang, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2054-2062.
- [157] A. Yamazawa, X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2356-2357.
- [158] H. Cahová, A. Jäschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3186-3190.
- [159] M. Saito, Y. Yokoyama, Y. Yokoyama, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 806-807.
- [160] A. Mammana, G. T. Carroll, J. Areephong, B. L. Feringa, *J. Phys. Chem.* **2011**, *115*, 11581-11587.
- [161] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900-4921.
- [162] R. S. Liu, A. E. Asato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 259-263.
- [163] D. Shevela, L. O. Björn, Govindjee, in *Natural and Artificial Photosynthesis*, John Wiley & Sons Inc., **2013**, pp. 13-63.
- [164] C. Dugave, L. Demange, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475-2532.
- [165] M. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9433-9434.
- [166] M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685-1716.
- [167] F. Hamon, F. Djedaini-Pillard, F. Barbot, C. Len, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2538.

- [168] H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809-1825.
- [169] N. Nishimura, T. Sueyoshi, H. Yamanaka, E. Imai, S. Yamamoto, S. Hasegawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1381-1387.
- [170] P. Bortolus, S. Monti, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 648-652.
- [171] D. H. Waldeck, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415-436.
- [172] W.-G. Han, T. Lovell, T. Liu, L. Noodleman, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 167-178.
- [173] S. Nakamura, M. Irie, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 6136-6138.
- [174] R. M. Kellogg, M. B. Groen, H. Wynberg, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3093-3100.
- [175] V. I. Minkin, in *Molecular Switches*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**, pp. 37-80.
- [176] G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1741-1754.
- [177] B. S. Lukyanov, M. B. Lukyanova, *Chem Heterocycl Compd* **2005**, *41*, 281-311.
- [178] A. K. Chibisov, H. Görner, *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 4305-4312.
- [179] C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 868-878.
- [180] F. Zhang, A. Zarrine-Afsar, M. S. Al-Abdul-Wahid, R. S. Prosser, A. R. Davidson, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2283-2289.
- [181] R. L. Letsinger, T. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7323-7328.
- [182] F. D. Lewis, Y. Wu, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12165-12173.
- [183] K. Yamana, K. Kan, H. Nakano, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2977-2983.
- [184] Q. Wang, L. Yi, L. Liu, C. Zhou, Z. Xi, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5087-5089.
- [185] L. Wu, K. Koumoto, N. Sugimoto, *Chem. Comm.* **2009**, 1915-1917.
- [186] S. Patnaik, P. Kumar, B. S. Garg, R. P. Gandhi, K. C. Gupta, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7840-7849.
- [187] H. Kashida, X. Liang, H. Asanuma, *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1065-1084.
- [188] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Yoshida, T. Takarada, X. Liang, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2001**, *30*, 108-109.
- [189] C. Brieke, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 15726-15734.
- [190] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2010**, *9*, 1371-1376.
- [191] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393-2395.
- [192] X. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16408-16415.
- [193] H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, A. Yamazawa, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1316-1318.
- [194] X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1877-1883.
- [195] Y. Liu, D. Sen, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 887-892.
- [196] S. Keiper, J. S. Vyle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3306-3309.
- [197] H. Asanuma, T. Takarada, T. Yoshida, D. Tamaru, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2671-2673.
- [198] H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 203-212.
- [199] H. Asanuma, D. Matsunaga, M. Komiyama, *Nucl. Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 35-36.
- [200] X. Liang, N. Takenaka, H. Nishioka, H. Asanuma *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 553-560.
- [201] M. Irie, M. Mohri, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 803-808.
- [202] C. Zheng, S. Pu, J. Xu, M. Luo, D. Huang, L. Shen, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5437-5449.

- [203] T. Yamaguchi, M. Irie, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 4690-4694.
- [204] K. Yagi, M. Irie, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, *76*, 1625-1628.
- [205] Y. Nakayama, K. Hayashi, M. Irie, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2592-2596.
- [206] S. Pu, H. Li, G. Liu, W. Liu, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3575-3579.
- [207] Z. Sun, H. Li, G. Liu, C. Fan, S. Pu, *Dyes Pigm.* **2014**, *106*, 94-104.
- [208] V. Z. Shirinian, A. G. Lvov, M. M. Krayushkin, E. D. Lubuzh, B. V. Nabatov, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3440-3451.
- [209] Z. Sun, H. Li, S. Pu, G. Liu, B. Chen, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2471-2475.
- [210] K. Uchida, T. Matsuoka, K. Sayo, M. Iwamoto, S. Hayashi, M. Irie, *Chem. Lett.* **1999**, *28*, 835-836.
- [211] S. L. Gilat, S. H. Kawai, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 275-284.
- [212] S. L. Gilat, S. H. Kawai, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1439-1442.
- [213] K. Uchida, E. Tsuchida, Y. Aoi, S. Nakamura, M. Irie, *Chem. Lett.* **1999**, *28*, 63-64.
- [214] M. Irie, T. Lifka, K. Uchida, S. Kobatake, Y. Shindo, *Chem. Comm.* **1999**, 747-750.
- [215] M. Hanazawa, R. Sumiya, Y. Horikawa, M. Irie, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 206-207.
- [216] K. Uchida, Y. Nakayama, M. Irie, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1311-1315.
- [217] S. Pu, Z. Tong, G. Liu, R. Wang, *J. Mater. Chem.* **2013**, *1*, 4726-4739.
- [218] Q. Zhang, J. Li, L. Niu, Z. Chen, L. Yang, S. Zhang, L. Cao, F. Zhang, *Chin. Sci. Bull.* **2013**, *58*, 74-78.
- [219] K. Fujimoto, T. Maruyama, Y. Okada, T. Itou, M. Inouye, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6170-6175.
- [220] K. Fujimoto, M. Kajino, I. Sakaguchi, M. Inouye, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 9834-9840.
- [221] M. Singer, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8372-8377.
- [222] S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8839-8842.
- [223] S. Lena, P. Neviani, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3657-3660.
- [224] E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3372-3375.
- [225] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4221-4245.
- [226] S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2012**, *5*, 711-716.
- [227] S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 905-914.
- [228] L. N. Lucas, J. van Esch, R. M. Kellogg, B. L. Feringa, *Chem. Comm.* **1998**, 2313-2314.
- [229] Z.-N. Huang, B.-A. Xu, S. Jin, M.-G. Fan, *Synthesis* **1998**, *8*, 1092-1094.
- [230] M. M. Krayushkin, V. A. Migulin, V. N. Yarovenko, V. A. Barachevskii, L. G. Vorontsova, Z. A. Starikova, I. V. Zavarzin, V. N. Bulgakova, *Mendeleev Commun.* **2007**, *17*, 125-127.
- [231] T. Ehrenschwender, Y. Liang, A.-N. Unterreiner, H.-A. Wagenknecht, T. J. A. Wolf, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 1197-1204.
- [232] S. Kiontke, Y. Geisselbrecht, R. Pokorny, T. Carell, A. Batschauer, L.-O. Essen, *EMBO J.* **2011**, *30*, 4437-4449.
- [233] B. D. Zoltowski, A. T. Vaidya, D. Top, J. Widom, M. W. Young, B. R. Crane, *Nature* **2011**, *480*, 396-399.
- [234] H. Park, S. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866-1872.
- [235] H.-A. Wagenknecht, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 3197-3198.

- [236] M. Irie, T. Fukaminato, T. Sasaki, N. Tamai, T. Kawai, *Nature* **2002**, *420*, 759-760.
- [237] Y. C. Liang, A. S. Dvornikov, P. M. Rentzepis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8109-8112.
- [238] T. Fukaminato, T. Umemoto, Y. Iwata, S. Yokojima, M. Yoneyama, S. Nakamura, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5932-5938.
- [239] Y.-C. Jeong, S. I. Yang, K.-H. Ahn, E. Kim, *Chem. Comm.* **2005**, 2503-2505.
- [240] Y.-C. Jeong, S. I. Yang, E. Kim, K.-H. Ahn, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5855-5861.
- [241] K. Uno, H. Niikura, M. Morimoto, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13558-13564.
- [242] Linda N. Lucas, Jaap J. D. d. Jong, Jan H. v. Esch, Richard M. Kellogg, Ben L. Feringa, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 155-166.
- [243] M. Irie, T. Eriguchi, T. Takada, K. Uchida, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12263-12271.
- [244] P. R. Bohlander, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [245] M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Böhländer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1299-1302.
- [246] D.-S. Xiang, K. Zhai, L.-Z. Wang, *Analyst* **2013**, *138*, 5318-5324.
- [247] X. Fan, F. Lin, Y. Zhang, J. Zhao, H. Li, S. Yao, *New J. Chem.* **2012**, *36*, 2260-2265.
- [248] M. Weinberger, F. Berndt, R. Mahrwald, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2589-2599.
- [249] T. Ehrenschwender, A. Barth, H. Puchta, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 46-48.
- [250] F. D. Lewis, T. Wu, E. L. Burch, D. M. Bassani, J.-S. Yang, S. Schneider, W. Jaeger, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8785-8792.
- [251] C. Wanninger-Weiß, *Dissertation*, Universität Regensburg (Regensburg), **2008**.
- [252] U. Wenge, J. Wengel, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10026-10029.
- [253] J. D. Slinker, N. B. Muren, S. E. Renfrew, J. K. Barton, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 228-233.
- [254] T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *CHIMIA Int. J. Chem.* **2007**, *61*, 133-139.
- [255] H. Miyasaka, S. Araki, A. Tabata, T. Nobuto, N. Malaga, M. Irie, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *230*, 249-254.
- [256] N. Tamai, T. Saika, T. Shimidzu, M. Irie, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 4689-4692.
- [257] F. Stellacci, C. Bertarelli, F. Toscano, M. C. Gallazzi, G. Zotti, G. Zerbi, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 292-295.
- [258] M. Takeshita, M. Irie, *Chem. Comm.* **1997**, 2265-2266.
- [259] M. Takeshita, N. Kato, S. Kawachi, T. Imase, J. Watanabe, M. Irie, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9306-9313.
- [260] M. Takeshita, M. Irie, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1345-1348.
- [261] M. Walko, B. L. Feringa, *Chem. Comm.* **2007**, 1745-1747.
- [262] M. Weinberger, *Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie (Karlsruhe), **2012**.
- [263] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [264] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [265] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.

VII. Anhang

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

S. Barrois, Christoph Beyer, H.-A. Wagenknecht, „Covalent Modification of 2'-Deoxyuridine with two different Molecular Switches”, *Synlett* **2012**, 5, 711-716.

S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, „Diarylethene-modified nucleotides for switching optical properties in DNA”, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 905-914.

S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, „In-stem labelling allows visualization of DNA strand displacements by distinct fluorescent colour change”, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 3085-3088.

S. Barrois, S. Wörner, H.-A. Wagenknecht, “The role of duplex stability for wavelength-shifting fluorescent DNA probes: energy transfer vs. exciton interactions in DNA "traffic lights", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, 13, 1126-1129.

Internet TV Präsentation

Teile dieser Arbeit und die grundlegenden Arbeitsmethoden des AK Wagenknechts wurden in einer Videopräsentation veröffentlicht und durch das Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften produziert:

S. Barrois, P. Ensslen, H.-A. Wagenknecht, „Synthesis of DNA with optical functionalities”, *Beilstein TV* **2013**, <http://www.beilstein.tv/tvpost/synthesis-of-dna-with-optical-functionalities> (Stand 23.05.14).

Posterpräsentationen

S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, „Covalent modification of DNA with a Diarylethene Photoswitch and its photochromic properties”, *V. Nucleinsäurechemietreffen*, Frankfurt **2011**.

Anhang

S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, „In-stem labelling allows visualization of DNA strand displacements by distinct fluorescent colour change”, *International Symposium “Templates in Chemistry – Present and Future”*, Bonn **2013**.

S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, „In-stem labelling allows visualization of DNA strand displacements by distinct fluorescent colour change”, *VI. Nucleinsäurechemietreffen*, Greifswald **2013**.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Karlsruhe, den 24.07.14

Sebastian Barrois