

Untersuchung von photoinduziertem Elektronentransfer in modifizierter DNA und bioorthogonaler Diels-Alder-Konjugation

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. Effi Bätzner

aus Nagold, Baden-Württemberg

Karlsruhe, 2014

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Michael Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2014

*Dem Elektronentransfer himself
und vor allem meinen Lieben*

Danksagung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von April 2011 bis Oktober 2014 im Arbeitskreis von Professor Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Karlsruher Institut für Technologie angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden im Januar 2014 in der Arbeitsgruppe um Péter Kele an der Hungarian Academy of Sciences durchgeführt.

Ich bedanke mich im Besonderen bei meinem Doktorvater, Professor Hans-Achim Wagenknecht für die interessante Themenstellung und sehr gute Arbeitsatmosphäre, für eine stets offene Tür und gute Diskussionen, die Möglichkeit des Städtewechsels nach Karlsruhe und für die Möglichkeit meine Arbeit in Budapest zu erweitern.

Bedanken möchte ich mich im Speziellen auch bei

- Herrn Dr. Péter Kele vom Institut für Organische Chemie an der “Hungarian Academy of Sciences, Research Center for Natural Sciences” in Budapest, für die Möglichkeit an seinem Arbeitskreis mitzuwirken und an seiner Erfahrung teilzuhaben. Auch bei seinen Mitarbeitern Ádám, András, Balázs, Bianca, Gabor, Gergely, Levente und vor allem Orsolya bedanke ich mich für die Hilfe im Labor und für die sehr freundliche Aufnahme in Budapest.
- Privatdozent Dr. Andreas-Neil Unterreiner vom Institut für Physikalische Chemie des KITs für die gute Zusammenarbeit und für die Durchführung der transienten Absorptionsmessungen. Im Einzelnen bei Dr. Yu Liang und Caroline Schweigert für das Messen der Oligonukleotide, die Auswertung und das Füttern meinerseits mit Daten.
- Annette Hochgesandt für die riesige Menge an MALDI Massen die oft nicht leicht zu messen waren.
- Privatdozent Patrick Weis für die durchgeführten ESI-MS Massen sowie Angelika Kernert und Ingrid Rossnagel für das Messen der Substanz Massen.
- Dr. Andreas Rapp, Tanja Ohmer, Anne-Lena Emmerich und Pia Lang für das Messen meiner NMR Proben, sowie Richard von Budberg für das Reparieren zerbrochener Glasgeräte und sein sonniges Gemüt.
- Claudia Sommer für die Beantwortung unzähliger Fragen, das Helfen bei Organisatorischem und für die vielen guten Gespräche.
- Meinen Vertiefer- und Bachelorstudenten Nadine, Carolin, Valentin und zuletzt Tamina für das interessierte Mitarbeiten und die schöne Zeit.
- Barry, Alex und Philipp für das geduldige Korrekturlesen meiner Arbeit.

- Andreas und Tom für die Synthese von Glycal und einigen DNA Vergleichssträngen.
- Meinen Kollegen Stefanie Arndt, Dr. Sebastian Barrois, Peggy Bohländer, Andreas Dittmer, Dr. Thomas Ehrenschwender, Philipp Ensslen, Nadine Gaß, Annette Hochgesandt, Dr. Carolin Holzhauser, Marcus Merkel, Krisana Peewasan, Alexander Penner, Barbara Reiß, David Rombach, Dr. Moritz Rubner, Dr. Wolfgang Schmucker, Dr. Claudia Stubinitzky, Heidi Walter, Dr. Michael Weinberger, Dr. Christian Wellner, Dr. Ulrike Wenge und Martin Weiser für die gute Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre.
- Der alten Regensburg-Truppe: Sabrina, Tom und Caro für die gute Aufnahme in den Arbeitskreis am Anfang dieser Arbeit; Tom vor allem für hilfreiche fachliche Diskussionen und das nicht endende Interesse an sämtlichen Themengebieten.
- Philipp und Marcus für jede Menge Spaß, abseits der ernsten Themen und den perfekten Sommer.
- Barry, Philipp, Marcus und am Ende auch Christoph für die beste AK-Band der Welt.
- Steffay, dass sie für eine Zeit meine Lieblingsnachbarin war, Heidi für die fröhliche Stimmung, die sie an den Arbeitskreis gebracht hat und Nadine für ihre ständige Hilfsbereitschaft und das Organisationstalent.
- Sabrina, Barbara und Dave für die vielen sehr guten Gespräche und die damit einhergehende Unterstützung.
- Peggy für die etwas andere Art des Gesprächs.
- Barry für die an- und ausdauernde, unerschütterliche Freundschaft, die seit Beginn des Studiums nicht abgebrochen ist. Danke für jede Unterstützung, die Kraft und die wichtigen fachlichen-, wie persönlichen Gespräche. Du warst/bist eine riesen Hilfe.
- Meiner Familie, die mich emotional wie finanziell über die ganzen Jahre getragen und unterstützt hat. Danke für jede Aufheiterung, jedes positive Wort und jedes Wochenende mit euch in guten und schweren Zeiten.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Themenstellung	1
2.	Photoinduzierter Überschusselektronentransfer in DNA.....	3
2.1	Theorie und Einführung.....	3
2.1.1	Ladungstransfer Mechanismen in DNA.....	3
2.1.2	Oxidativer Elektronenlochtransfer	5
2.1.3	Überschusselektronentransfer Systeme	9
2.1.4	Triebkraft des EETs	11
2.1.5	Pyrenbasierte Elektronendonoren	13
2.1.6	EET Detektionsmethodik	15
2.2	Untersuchung von photoinduziertem Elektronentransfer in DNA über 8-Hydroxychinolin Basenpaare.....	23
2.2.1	Theorie.....	23
2.2.2	Systemaufbau und Strangdesign	29
2.2.3	Synthese der Oligonukleotide DNA1-14.....	31
2.2.4	Charakterisierung der Oligonukleotide	33
2.2.5	Ergebnisse der Belichtungen	39
2.2.6	Umstrukturierung des Elektronentransfer Systems.....	47
2.2.7	Synthese der Oligonukleotide 15-26'	49
2.2.8	Charakterisierung der Oligonukleotide	51
2.2.9	Belichtungen und PAGE	55
2.2.10	Transiente Absorptionsmessungen.....	61
2.2.11	Zusammenfassung.....	71
2.3	Untersuchung der optischen Detektion von EET	73
2.3.1	Hintergrund	73
2.3.2	Elektronenakzeptoren: Sulfonylindol Derivate	75
2.3.3	Vorversuche zu Elektronentransfersystemen	77

2.3.4	Elektronenakzeptoren in DNA	89
2.3.5	Belichtung von EET-Systemen in DNA.....	93
2.3.6	Zusammenfassung.....	103
3.	Bioorthogonale Konjugation von DNA durch Diels-Alder mit inversem Elektronenbedarf	105
3.1	Theorie und Einleitung	105
3.2	Systemaufbau.....	111
3.3	Synthese des tetrazinmodifizierten Nukleosids	113
3.4	DNA Synthese und Markierung.....	115
3.5	Ergebnisse.....	117
3.6	Zusammenfassung.....	119
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	121
5.	Experimenteller Teil.....	125
5.1	Reagenzien und Geräte	125
5.2	Synthesevorschriften.....	131
5.2.1	ET Akzeptoren	131
5.2.2	ET Donoren.....	143
5.2.3	HQ.....	147
5.2.4	Tetrazin.....	149
5.3	Oligonukleotide	153
5.3.1	Synthese der modifizierten Oligonukleotide.....	153
5.3.2	Reinigung modifizierten Oligonukleotide.....	160
5.3.3	Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide	161
5.4	Belichtungen.....	175
5.4.1	Belichtungen der Einzelmoleküle	175
5.4.2	Belichtung der modifizierten Oligonukleotide	177
6.	Literaturverzeichnis	181
7.	Appendix.....	189
7.1	Publikationen.....	189

7.2	Poster und Konferenzen.....	189
7.3	Auslandsaufenthalt	189
7.4	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

1PydU	5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin	DMTrCl	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
2PydU	5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
μL	Mikroliter	ds	doppelsträngig
A, dA	Adenin, 2'-Desoxyadenosin,	dU	2'-Desoxyuridin
abs.	absolut	E ₀₀	Singulett-Energie des HOMO- LUMO Übergangs
Ak	Akzeptor	EA	Elektronenakzeptor
APS	Ammoniumpersulfat	ED	Elektronendonator
BP	Basenpaar	EE	Ethylacetat
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin	EI	elektrische Ionisation
bzw.	beziehungsweise	em	Emission
C, dC	Cytosin, 2'-Desoxycytidin	E _{ox}	Oxidationspotential
ca.	circa	E _{ox*}	Oxidationspotential im angeregten Zustand
^{CP} C	N-4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin	E _{red}	Reduktionspotential
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>	ESI	Elektrosprayionisation
cU	2'-O-Propargyluridin	ET	Energietransfer
CuAAC	kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition	Et	Ethidiumbromid
CT	Ladungstransfer	EET	Überschuss Elektronentransfer
D	Donor	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
d	Schichtdicke	eq.	Äquivalent
DAP ²⁺	Diazapyrenium-dikation	ESA	<i>excited state absorption</i>
DansInd	1-Dansyl-1 <i>H</i> -indol	ESR	Elektronenspinresonanz
DC	Dünnschicht-chromatographie	ET	Elektronentransfer
DCM	Dichlormethan	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
DIMAP	N,N'-Dimethylaminopyren	exc	Anregung (<i>excitation</i>)
DIMAPdU	N,N'-Dimethylaminopyren-2'- desoxyuridin	F	Fragment
DMAN	Dimethylaminonaphtalin	FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
DIFO	Difluorocyclooctin	FC	<i>Flash</i> -Säulenchromatographie
DIPEA	Diisopropylethylamin	Flav	Flavin
DMSO	Dimethylsulfoxid	Fluo	6-Carboxyhexylfluoreszein
DMF	Dimethylformamid	FluoCO	COMBO mod. Fluoreszein
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl		

F _q	<i>fraction quench</i> (Fluoreszenzlöschung)	konz.	konzentriert
fs	Femtosekunde (10 ⁻¹⁵ s)	L	Liter
g	Gramm	LED	lichtemittierende Diode
G	Gibbs Energie (freie Enthalpie)	LNA	<i>Locked</i> Nukleinsäure
G, dG	Guanin, 2'-Desoxyguanosin	LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung	m	Multipllett
ges.	gesättigt	M	molar [mol/L]
GSB	<i>ground state bleaching</i>	MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
h	Stunde	max	Maximum
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital	mbar	Millibar
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)	MeCN	Acetonitril
HMDS	Hexamethyldisilazan	MeOH	Methanol
HQ	8-Hydroxychinolin-6-2'-desoxyribose	mg	Milligramm
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie (HR = <i>high resolution</i>)	MHz	Megahertz
HT	Elektronenloch-Transfer	min	Minute
Hz	Hertz	mL	Milliliter
IC	<i>internal conversion</i>	mM	millimolar
ISC	<i>inter system crossing</i>	mm	Millimeter
iEDDA	Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf	mmol	Millimol
Ind	Indol	mod.	modifiziert
int-Bkg	Gegen den Hintergrund korrigierte Fluoreszenz	MS	Massenspektrometrie
J	Kopplungskonstante	MV ²⁺ U	Methylvologen, an cU gebunden
K	Kelvin	<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
KoZ	Koordinationszahl	NaP _i	Natriumphosphatpuffer
		NEt ₃	Triethylamin
		NHE	Normalwasserstoffelektrode
		nm	Nanometer
		nmol	Nanomol
		NaOH	Natriumhydroxid
		Nda	Naphthalindiamin
		NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
		p.A.	analysenrein (<i>pro analysi</i>)

PA	Phosphoramidit	t	Triplett
PA-Cl	2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> -diisopropylchlorophosphoramidit	T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese	Temperatur	
PBS	NaCl/KCl/Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer	T _m	Schmelztemperatur der DNA [°C]
pH	pH-Wert	TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
PhSO ₂ Ind	1-Phenylsulfonyl-1 <i>H</i> -indol	TBE	Tris/Borsäure/EDTA
ppm	<i>parts per million</i>	TBAHFP	Tetrabutylammoniumfluoro-Phosphate
Ptz	Phenothiazin	TEBA	Benzyltriethylammoniumchlorid
PyInd	1-Pyrensulfonyl-1 <i>H</i> -indol	TEMED	Tetramethylethylendiamin
R _f	Retentionsfaktor	THF	Tetrahydrofuran
RNA	Ribonukleinsäure	TMS	Trimethylsilyl
RP	Reversed Phase	T [^] T	TT-Dimer
rpm	<i>rounds per minutes</i>	U	Uridin
R. T.	Raumtemperatur	ü. N.	über Nacht
s	Singulett, Sekunde	UV/Vis	Ultraviolettes- und sichtbares Lichtspektrum (190 – 800 nm)
Sde	Stilbendiethylether	UV	ultraviolett
SE	stimulierte Emission	Vergl.	Vergleich
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>	Vis	sichtbar (visible)
SF	Strangbruchfragment	V	Volt
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	zw.	zwischen
SPAAC	spannungsunterstützte Azid-Alkin Cycloaddition	z. Bsp.	zum Beispiel
ss	einzelsträngig		

Symbole

Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)	μ	mikro
β	Distanzabhängigkeitsparameter	τ	zeitliche Verzögerung
°C	Grad Celsius	τ _i	Zeitkonstante
δ	chemische Verschiebung	λ	Wellenlänge
Ω	Ohm		

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der IUPAC-IUB-Kommission² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden *kursiv* gedruckt.

¹ *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

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

1. Einleitung und Themenstellung

„In the years ahead, genes are going to be synthesized. The next step would be to learn to manipulate the information content of genes and to learn to insert them into and delete them from the genetic system. When in the distant future, all this comes to pass, the temptation to change our biology will be very strong.“ – H.G. Kohorona, 1968

Nachdem im Jahre 1952 *Pauling, Corey, Watson* und *Crick* die Struktur der DNA aufgeklärt hatten^[1-2], führte das Bestreben, DNA synthetisch herstellen zu können, zu zahlreichen Forschungsunternehmungen. Die erste erfolgreiche Synthese eines Dinukleotids mit einer 5'-3'-Phosphatverbindung wurde von *Michaelson* und *Todd* 1955 durchgeführt. *Khorona* publizierte dann 1968 einen Weg kurze Polydesoxynukleotide synthetisch darzustellen.^[3] Mit dieser Methode gelang es ihm und anderen, 1970 die DNA des kompletten Gens der damals bekannten Sequenz der Alanin-t-RNA aus Hefe darzustellen. Diese war für eine zellfreie Untersuchung der Protein-Synthese und des genetischen Codes von entscheidender Bedeutung.^[4] Jedoch war zu dieser Zeit mit den entsprechenden Mitteln die Synthese von Oligonukleotiden sehr zeitaufwändig und kompliziert. So dauerte es vier Jahre, um ein 21mer DNA-Duplex zu synthetisieren.^[5] Chemisch hergestellte DNA wurde jedoch dringend für die Erforschung der Sequenzierung, des Klonens von Genen, der Genexpression, der biophysikalischen Eigenschaften und Strukturen von Oligonukleotiden und Oligonukleotid-Peptid-Komplexen, der Chromosom-Aufklärung und der Mutagenese benötigt. Durch eine neue Synthesemethode, die auf Arbeiten von *Letsinger* basierte^[6], konnte *Caruthers* im Jahr 1981 erfolgreich 21mere in unter einem Tag synthetisieren.^[7-8] Diese DNA Synthesemethode ist heute noch generell als Phosphoramidit-Methode bekannt. 1985 konnte diese von *Caruthers* weiterentwickelte Vorgehensweise auch automatisiert werden, was ihren großen Erfolg erklärt. Mit einem DNA-Syntheseautomaten konnten nun hohe Ausbeuten an Oligonukleotiden erzielt und bis zu 200 Nukleotide in relativ kurzer Zeit aneinander gekuppelt werden.^[9] Der Aufbau des Syntheseautomaten und die gewählte Schutzgruppenchemie ermöglichte damit auch die Einbringung anderer Bausteine in die DNA. Dadurch ergaben sich immense Möglichkeiten für deren Modifikation. Mit der Wahl des richtigen artifiziellen oder natürlichen Nukleosids konnte DNA mit unterschiedlichsten Eigenschaften ausgestattet werden. Im einfachsten Fall war es möglich, eine gewünschte Sequenz herzustellen, jedoch konnten auch artifizielle Nukleoside mit fluoreszenten Eigenschaften, als Komplexbildner, als neuartige Basenpaare, als Katalysatoren oder mit unterschiedlichen Redox-Potentialen eingebracht werden. Damit konnte die DNA zu einem hoch interessanten Werkstoff mit variierbaren Eigenschaften gemacht werden.

Mit der Phosphoramidit-Methode sollten im ersten Teil dieser Arbeit artifizielle Nukleoside mit Elektronendonator- und Elektronenakzeptor-Eigenschaften in DNA eingebracht werden. Durch die Anregung des Elektronendonors mit Licht sollte der damit induzierte Elektronentransfer durch die DNA und mithilfe eines artifiziellen Basenpaares untersucht werden. Es standen die Detektionsmethodik sowie die Effizienz des Elektronentransfers im Vordergrund der Untersuchungen.

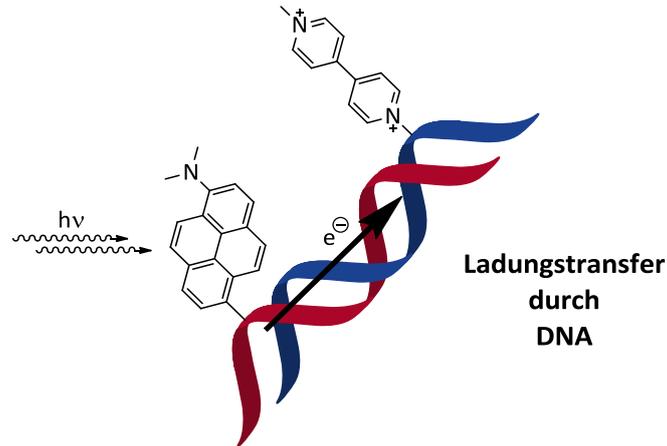


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ladungstransfers durch DNA, hier beispielhaft mit DIMAPdU als Elektronendonator und Methylviologen als Elektronenakzeptor.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine neue effektive Methode untersucht werden, DNA mit Farbstoffen zu markieren. Dazu sollte ein Tetrazin-Nukleosid synthetisiert und über die Phosphoramidit-Methode in DNA eingebaut werden. Anschließend sollte diese Modifikation durch eine Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) einen Farbstoff binden und somit die DNA markiert werden.

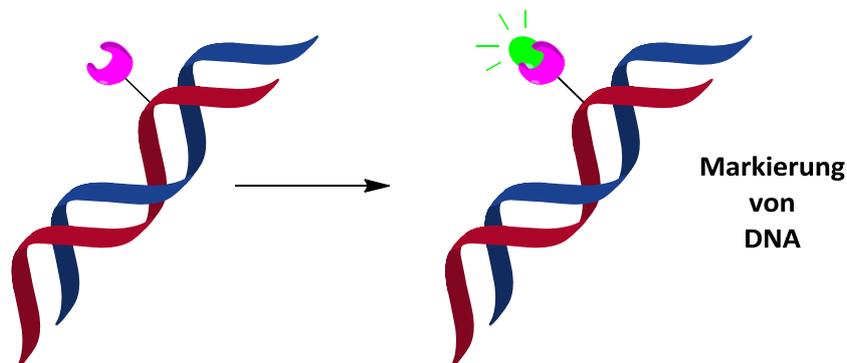


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Markierung von DNA mittels iEDDA.

2. Photoinduzierter Überschusselektronentransfer in DNA

2.1 Theorie und Einführung

Die DNA ist in ihrer ursprünglichen Form als Träger der Erbinformation von lebenden Organismen bekannt. Durch die spezifische Abfolge der natürlich vorkommenden Nukleotide Desoxyadenosin dA, Desoxyguanosin dG, Thymin T und Desoxycytidin dC können die Informationen, die zur Herstellung jedes Lebewesens benötigt werden, in dieser Sequenz gespeichert werden. Das Biopolymer ist aus zwei gegenläufigen DNA-Einzelsträngen aufgebaut, die eine rechtsgängige Doppelhelix in B-Konformation ausbilden. Die Nukleobasen stapeln sich im Inneren der Helix, vororganisiert von der Basenpaarung durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen A:T und G:C, während das geladene Phosphatdesoxyriboserückgrat nach außen zeigt. Der Abstand zwischen einem Basenpaar und dem nächsten entlang der helikalen Achse liegt bei 0.34 nm. Die um 36° zueinander verdrehten Nukleobasen generieren somit im Inneren der Helix ein gemeinsames und damit expandiertes π -System.^[2] Durch die unterschiedlichen Redoxpotentiale der Nukleobasen ist es möglich, positive und negative Ladungen, also Elektronenlöcher und Elektronen, durch die DNA zu transportieren. Diese Tatsache und die perfekt selbstassemblierte Struktur der DNA machen den Ladungstransport (*Charge Transfer*, CT) zu einem Interessengebiet für Physik, Chemie und Biologie. Doppelsträngige DNA dient dabei als empfindliche Signalsonde, die für die Konstruktion von Biosensoren im Nanomaßstab oder als enzymatisches Instrument genutzt werden kann, um Schäden in der DNA zu detektieren.^[10] Die biologische Relevanz dieses Themas beruht auf der Tatsache, dass die durch UV-A Strahlung induzierten Photoschäden in der DNA (T⁺T-Dimere, 4,6-Photoschaden) sowie die reduktive Reparatur dieser Schäden über Photolyasen wieder behoben werden können.^[11-15]

Untersuchungen zum Ladungstransfer oder Ladungsbewegungen in DNA werden an DNA Duplexen durchgeführt, da ein DNA Einzelstrang keinen Ladungstransfer über große Distanzen unterstützt. Dies wurde durch mehrere, sehr unterschiedliche Ansätze zur Detektion des CT beobachtet.^[16-23]

2.1.1 Ladungstransfer Mechanismen in DNA

Werden Ladungstransfer-Systeme in DNA Duplexen betrachtet, wird zwischen zwei grundsätzlichen Arten unterschieden: Der oxidative Elektronenloch Transfer (*hole transfer*, HT) und der reduktive Überschusselektronentransfer (*excess electron transfer*, EET).

Bei Ersterem bewegt sich ein Elektronenloch durch den Basenstapel bzw. ein Elektron in Richtung des injizierten Radikalkations. Da unter den natürlichen Nucleobasen dG und dA ein relativ geringes Oxidationspotential^[24] aufweisen, können sie durch die Bildung von intermediären $G^{\bullet+}$ und $A^{\bullet+}$ Radikalkationen als Lochleiter fungieren. Im Gegensatz dazu bewegen sich beim EET Elektronen vom Radikalanion zur nächsten Nucleobase durch den Basenstapel, womit sich T und dC mit relativ hohen Reduktionspotentialen als favorisierte Elektronentransporter eignen.^[25] Seidel *et al.* publizierten die folgenden Tendenzen der Reduktionspotentiale natürlicher Nucleobasen $E_{\text{Red}}(T/T^{\bullet-}) \approx E_{\text{Red}}(dU/dU^{\bullet-}) \approx E_{\text{Red}}(C/C^{\bullet-}) < E_{\text{Red}}(A/A^{\bullet-}) < E_{\text{Red}}(G/G^{\bullet-})$.^[26] Die gemessenen, absoluten Werte variieren sehr stark mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und der experimentellen Methode.^[27-28] Zusätzlich können als Monomer vorliegende DNA-Basen nicht direkt mit jenen in der DNA Helix verglichen werden, da ihre Potentiale im Basenstapel durch die Beeinflussung der Nachbarbasen variieren können.^[29-30]

In Abbildung 3 wird die Unterscheidung der beiden CT Prozesse auch durch die Betrachtung der Orbitalenergien ersichtlich. Bei einem HT wird nach dem Anregen des Donors ein HOMO-gesteuerter Prozess durchlaufen, in dem sich ein Elektron aus dem HOMO des Akzeptors zum angeregten Donor bewegt. Wird das Elektron aus dem LUMO des angeregten Donors an den Akzeptor abgegeben, also eine Überschussladung in den Basenstapel injiziert, handelt es sich um den LUMO gesteuerten EET.

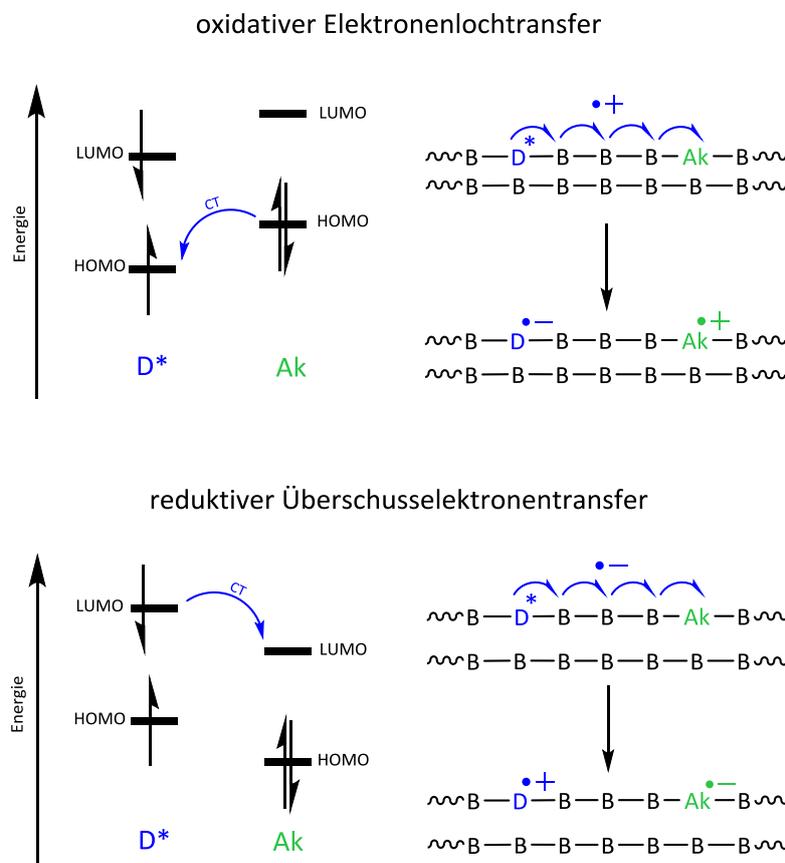


Abbildung 3: Energiediagramm und schematische Darstellung der Unterschiede von oxidativem Elektronenlochtransfer und reduktivem Überschusselektronentransfer (D = Donor, Ak = Akzeptor, CT = Ladungstransfer).

Während zum oxidativen Lochtransfer über Jahre viele Ergebnisse im Bereich der Detektionsmethodik, Distanz- und Sequenzabhängigkeit der Ladungsbewegung und des möglichen Transportmechanismus erbracht wurden,^[31-39] ist der reduktive Elektronentransfer erst in den letzten Jahren besser erforscht worden. Es konnten durch die ausgiebige Erforschung des HTs jedoch Erkenntnisse gewonnen werden, die auch für den EET später richtungsgebend waren.

2.1.2 Oxidativer Elektronenlochtransfer

Um den oxidativen Lochtransfer zu untersuchen, erfolgte in ersten Experimenten die Injektion des Elektronenlochs in den DNA Basenstapel unspezifisch durch Photosensibilatoren. Über die Annahme, dass in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors die Fluoreszenz des Donor gelöscht würde, konnten *Barton et al.* mit der Einführung von Ruthenium- zu Cobalt-, Chrom- oder Rhodim-Komplexen einen Elektronentransfer über lange Distanzen nachweisen. *Harriman et al.* und *Brun et al.* untersuchten das System Ethidiumbromid **Et** und *N,N'*-Dimethyl-2,7-diazapyreniumdichlorid **DAP²⁺** in Kalbthymus-DNA (Abbildung 4). Beide, Donor und Akzeptor interkalieren in die DNA und verteilen sich dort statistisch. Findet durch eine geringe Distanz zwischen **Et** und **DAP²⁺** ein Ladungstransfer statt, konnte dies durch den Fluoreszenzabfall des **Ets** deutlich machen.^[40]

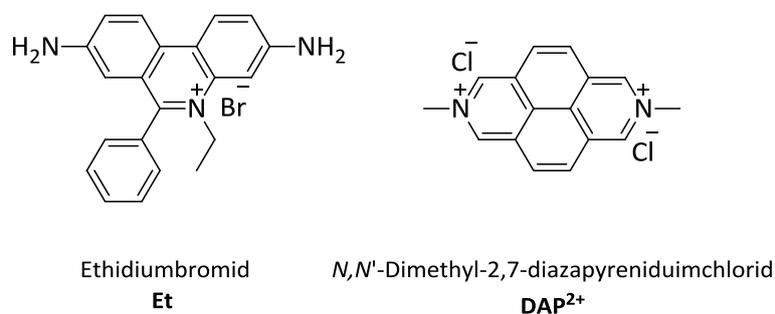


Abbildung 4: Ethidiumbromid **Et** und *N,N'*-Dimethyl-2,7-diazapyreniumchlorid **DAP²⁺**.

Durch verschiedene Experimente^[39, 41-43] konnte in den Anfängen eindeutig gezeigt werden, dass durch das Injizieren eines Elektronenlochs in G_0 (erstes Glied in einer Reihe von Guanin Basen) durch selektive Oxidation (G_0 gibt Elektron an angeregten Donor ab) ein Guanin Radikalkation $G_0^{\bullet+}$ gebildet wird, welches ein weiteres Elektron von einem benachbarten G_1 akzeptiert und damit eine Ladungsbewegung auslöst.^[25] Somit kann sich das Elektronenloch mit 200 nm^{-1} über Guanin Basen bewegen (Superaustausch). Die Effizienz dieses Transfers hängt dabei aber stark von der Sequenz des Oligonukleotids ab, was dem Bewegungsmechanismus zu Grunde liegt. Der Schlüsselschritt des Superaustauschs ist der Tunnelprozess des Elektrons von einem G zum nächsten.

Dies ist möglich, da das Potential der Brücke (DNA-Basenstapel zw. G_0 und G_1) energetisch höher liegt als das des Guanin-Radikalkations. Daher bleibt die Brücke unbesetzt und das Elektron kann zwischen den überlappenden Potentialen von Ladungsdonor und -akzeptor tunneln. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante des Ladungstransfers k_{CT} vom Abstand zwischen Ladungsdonor zu -akzeptor R_{DA} kann mit der Marcus-Theorie für adiabatischen Elektronentransfer beschrieben werden (Gleichung (1)).^[44]

$$k_{CT} = \frac{2\pi}{\hbar} \cdot \frac{V^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \cdot \exp\left(\frac{-\{\Delta G_{ET} + \lambda\}^2}{4\pi k_B T}\right) \quad (1)$$

k_{CT} = Geschwindigkeitskonstante des Superaustauschs

V^2 = Matricelement der elektronischen Kopplung zw. D und Ak

λ = Reorganisationsenergie

k_B = Boltzmannkonstante

T = Temperatur

ΔG_{ET} = Triebkraft des Ladungstransfers

Das Matricelement V für die elektronische Kopplung von Ladungsdonor und -akzeptor hängt exponentiell vom Abstand der beiden ab (Gleichung (2)):

$$V^2 = V_0^2 \cdot e^{-\beta R_{DA}} \quad (2)$$

V_0^2 = Maximalwert von V^2

β = Proportionalitätsfaktor

R_{DA} = Abstand D und Ak

Da die Geschwindigkeitskonstante des Superaustausches in DNA exponentiell mit dem steigenden Abstand zwischen Donor und Akzeptor abnimmt, ergibt sich eine Reichweite des HTs in DNA von maximal 10 Å (3 Basen). Der Proportionalitätsfaktor β gibt zusätzlich die Abhängigkeit von k_{CT} von der Energiedifferenz zwischen Donor und den DNA-Brücken-Orbitalen an (Gleichung (3)).

$$\beta = \frac{2}{R} \cdot \ln\left(\frac{\Delta_\epsilon}{2V} + \sqrt{1 + \frac{\Delta_\epsilon^2}{4V^2}}\right) \quad (3)$$

R = Abstand der benachbarten Untereinheiten

V = Kopplung zwischen benachbarten Untereinheiten

Δ_ϵ = Energiedifferenz zwischen Ladungsdonor und DNA-Stapel (Brücke)

So steigt der Proportionalitätsfaktor β mit einer größeren Energiedifferenz $\Delta\epsilon$ zwischen Donor und dem DNA-Basenstapel. Wird diese größer als die Kopplung V der beiden, wird die Wahrscheinlichkeit des Tunnelprozesses kleiner, was eine Ladungsinjektion in den DNA Basenstapel ermöglicht ($\beta \leq 0.2 - 0.3 \text{ \AA}$).^[45]

Wird die Distanz erweitert (Brücke: Basenpaare ≥ 3 zw. D und Ak), verändert sich der Mechanismus des Ladungstransfers in den von *Giese et al.* und *Jortner et al.* vorgeschlagenen *G-* oder *A-Hopping* Mechanismus.^[34, 43] Die energetischen Unterschiede sind in Abbildung 5 dargestellt.

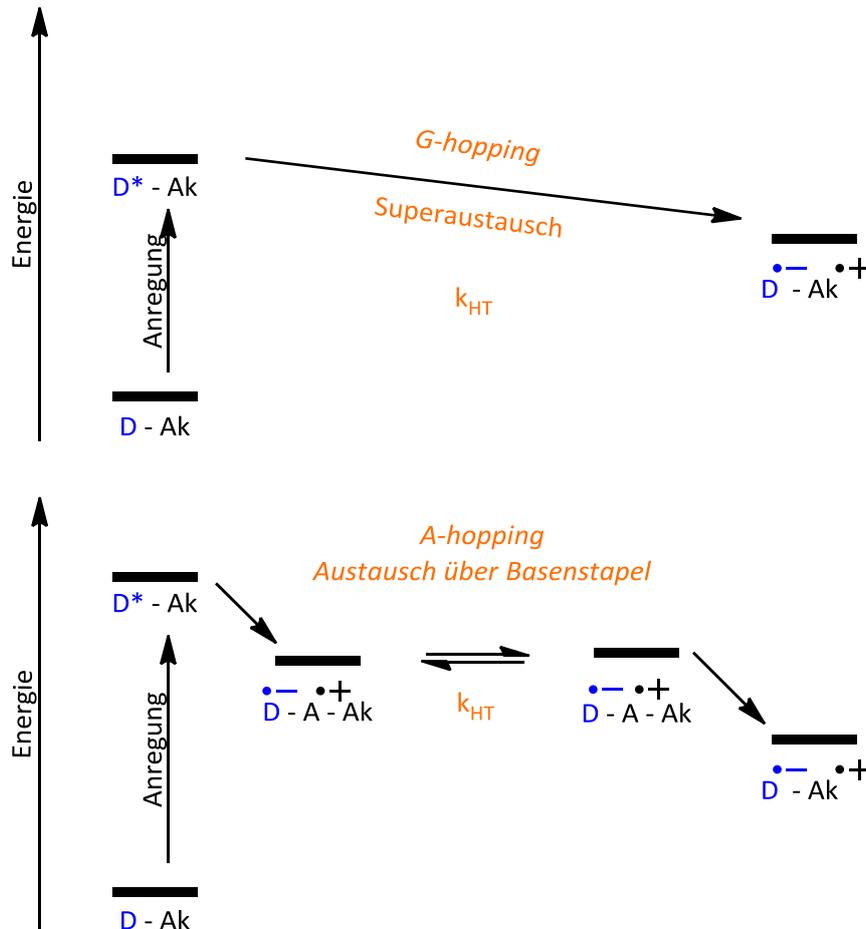


Abbildung 5: Energetisches Schema der zwei Ladungstransport-Mechanismen: Superaustausch und A-Hopping Mechanismus.

Da die Wahrscheinlichkeit einer thermisch induzierten Oxidation des Basenstapels durch Erweiterung der Brücke gleichgroß oder größer wird als die des Tunnel-Prozesses, bilden sich intermediäre Ladungsträger auf dem DNA-Basenstapel aus. Diese transportieren die induzierte Ladung schrittweise zum Elektronenakzeptor. Dadurch wird die Geschwindigkeitskonstante k_{CT} weitgehend distanzunabhängig, jedoch bleibt die Anzahl der *Hopping*-Schritte ein Faktor (Gleichung (4)).^[34, 46]

$$k_{CT} = P \cdot N^\eta \quad (4)$$

P = Wahrscheinlichkeit des *Hopping*-Schrittes

N = Anzahl der *opping*-Schritte

η = empirische Konstante ($1 \leq \eta \leq 2$)

8

Durch die oben dargestellten Mechanismen wird die starke Sequenzabhängigkeit des HTs deutlich. Welcher Mechanismus den Transport vorrangig steuert und in welchem Bereich die Geschwindigkeitskonstanten liegen, kann qualitativ durch drei Parameter ermittelt werden: Die Triebkraft ΔG_{ET} , die Energiedifferenz zwischen Donor und Basenstapel Δ_ϵ und den Donor-Akzeptor Abstand R_{DA} .^[47]

2.1.3 Überschusselektronentransfer Systeme

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Erkenntnissen über den Elektronenloch Transfer, ist über den Überschusselektronentransfer in DNA weniger bekannt.

Sevilla et al. konnten die ersten Erkenntnisse durch γ -Radiolyse bei 77 K von unspezifisch interkalierenden Elektronenakzeptoren (EA) wie Mitoxantron, Ethidiumbromid und 1,10-Phenanthrolin in einer Glasmatrix durch Elektronenspinresonanz-Messungen (ESR) gewinnen. Sie erhielten sogar erfolgreich einige Parameter von Elektron Tunnel-Prozessen in DNA, die mit denen des Lochtransfers vergleichbar waren ($\beta = 0.9 \text{ \AA}$).^[48-50] Da jedoch die gewählte Temperatur und die starre Matrix nicht der natürlichen Umgebung der DNA entsprechen, werden diese Ansätze hier nicht weiter thematisiert.

Neuere und gerichtete Ansätze wurden in den letzten Jahren verfolgt, bei denen die Elektroneninjektion und –aufnahme nicht unspezifisch erfolgte, sondern durch kovalent an DNA gebundene Elektronendonoren und –akzeptoren. Damit ist auch die Distanzabhängigkeit zu bestimmen. Obwohl bei tiefen Temperaturen Superaustausch- Ansätze gefunden wurden, postulieren *Giese et al.* einen *Hopping*-Mechanismus für den Elektronentransport in DNA. Es wird angenommen, dass die Ladung des Radikalanions sich über den DNA Basenstapel bewegt, jedoch sind beim EET alle Basen beteiligt, die Pyrimidin Basen bilden dabei intermediäre Ladungsträger T[•] und C[•].^[51]

So wurden als photoanregbare Elektronendonoren Chromophore wie Flavin^[52-53] (**Flav**), Naphthalindiamin^[54-55] (**Nda**), Stilbendiethylether^[56] (**Sde**), Phenothiazin^[57] (**Ptz**) und Pyren derivate^[58-59] (hier: 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin: **1PydU** und 5-(Pyren-2-yl)-2'-desoxyuridin: **2PydU**) kovalent, an eine bestimmte Position in der DNA eingebracht. Diese Donoren besitzen durch die chemische Struktur, bzw. die verschiedenen funktionellen Gruppen, unterschiedlich hohe Reduktionspotentiale (Abbildung 6). Während Flavin und Naphthalindiamin mit einem Reduktionspotential von -2.8 eV und -2.6 eV in der Lage sind alle natürlichen Basen zu reduzieren, können Stilbendiethylether, Phenothiazin und Pyrenderivate ihre Ladung gezielt an die Pyrimidin Basen C und T abgeben. Um nun das injizierte Überschusselektron zu detektieren, wurden drei unterschiedliche Akzeptoren entwickelt. Kinetische Elektronenfallen führen über eine chemische Reaktion des Elektrons zu einem, über Gelelektrophorese auslesbaren Strangbruch. Das von *Carell et al.* entwickelte T[•]T Dimer verbindet zwei Thymidine über einen Cyclobutanring. 5-Brom-2'-desoxyuridin **BrdU** spaltet bei Anwesenheit des Überschusselektrons ein Bromradikal ab und *N*-4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin ^{CP}C reagiert bei Reduktion über die Ringöffnung des Cyclopropyls weiter zu Cytidin und einem Aminderivat.

Dieses kann mit der Trennung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und der weiteren Bestimmung der Masse analysiert werden.

Das Potential von ${}^{\text{CP}}\text{C}$ unterscheidet sich nur gering von dem der natürlichen Basen (ungefähr $E_{\text{Red}} = -0.8 \text{ V}$ gegen NHE) und ist damit ebenso eine kinetische Elektronen Falle, jedoch mit schneller Reaktionszeit.^[60]

10

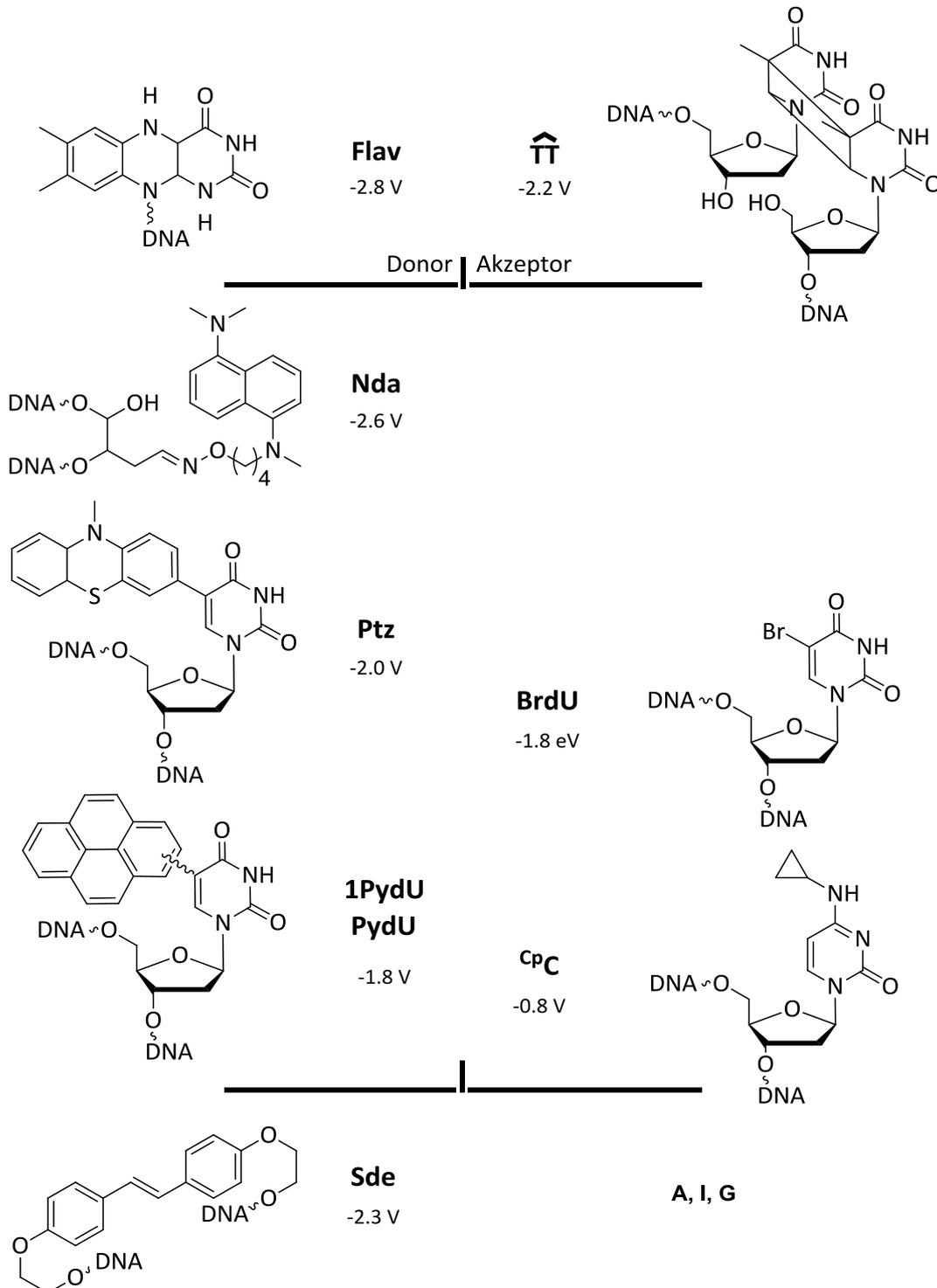


Abbildung 6: EET Systeme in DNA; Flavinderivat Flav / TT-Dimer $\text{T}^{\wedge}\text{T}$ ^[52-53], Naphthalindiamin Nda/ BrdU^[54-55], Phenothiazin Ptz/ BrdU^[57], 2-Pyren-desoxyuridin 2PydU/ BrdU^[58-59], Stilbendiether Sde / Basenstapel^[56], N-4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin ${}^{\text{CP}}\text{C}$.^[60]

2.1.4 Triebkraft des EETs

Nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit der Elektronenakzeptoren bei der Ladungsaufnahme ist bei einem EET-System von Bedeutung, sondern vor allem die Triebkraft des Ladungstransfers. Elektronendonator und -akzeptor sollten ein Potentialgefälle aufweisen, das den Ladungstransport vom angeregten Donor zum Akzeptor energetisch möglich macht. Um die Triebkraft eines CT-Systems abschätzen zu können, wird die Rehm-Weller-Gleichung verwendet (Gleichung (5)).^[61-62]

$$\Delta G_{CT} = e(E_{Ox} - E_{Red}) - E_{00} + C \quad (5)$$

ΔG_{CT} = Freie Enthalpie des Ladungstransfers (CT)

e = Elementarladung

E_{Ox} = Oxidationspotential des Grundzustands

E_{Red} = Reduktionspotential des Grundzustands

E_{00} = Singulett Energie des HOMO-LUMO-Übergangs

C = Änderung der Coulombenergie, hier näherungsweise $C = 0$

Um E_{00} , die Energie des HOMO-LUMO-Übergangs zu bestimmen, kann λ_{00} am Schnittpunkt von Absorptions- und Emissionsspektrum ermittelt und dann in Energie umgerechnet werden. E_{00} gibt die Energiedifferenz zwischen dem untersten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustands und dem untersten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands wieder. Das Potential des angeregten Zustands des Elektronendonors für einen oxidativen Lochtransfer kann mit Gleichung (6) berechnet werden.

$$E_{Red}^* = E_{Red}(Donor) + E_{00} \quad (6)$$

Das Potential des angeregten Donors in einem EET-System liefert Gleichung (7).

$$E_{Ox}^* = E_{Ox}(Donor) - E_{00} \quad (7)$$

Unter Verwendung beider Formeln, ergibt sich die Rehm-Weller Abschätzung für den oxidativen Lochtransfer wie folgt:

$$\Delta G_{HT} = e[E_{Ox}(Akzeptor) - E_{Red}^*(Donor)] \quad (8)$$

Die Abschätzung für den reduktiven Elektronentransfer ergibt sich mit Gleichung (9).

$$\Delta G_{ET} = e[E_{Ox}^*(Donor) - E_{Red}(Akzeptor)] \quad (9)$$

Ist das Potentialgefälle zwischen Elektronendonator und -akzeptor groß genug, also ΔG_{ET} negativ, ist ein erfolgreicher EET möglich.

2.1.5 Pyrenbasierte Elektronendonoren

Pyrenderivate als photoinduzierbare Donoren für den Elektronentransfer wurden in den letzten Jahren von vielen Arbeitsgruppen unterschiedlich genutzt. So publizierten *Kool et al.*^[63-66], *Woski et al.*^[67], *Berlin et al.*^[68], *Pedersen et al.*^[69] und *Netzel et al.*^[70-71] die in Abbildung 7 dargestellten nukleosidischen Pyrenderivate.

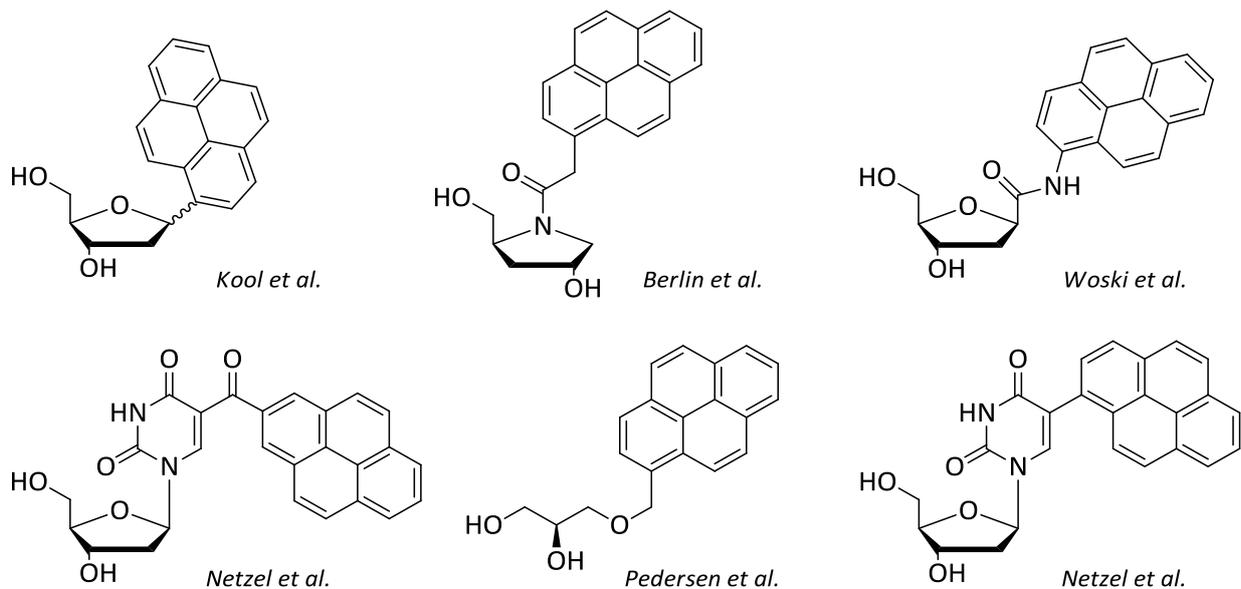


Abbildung 7: Darstellung artifizierender Pyren-Nukleoside in DNA von verschiedenen Arbeitsgruppen.

Wagenknecht et al. stellten die vier natürlichen Basen dA, dG, T und dC als Pyrenmodifikationen dar und charakterisierten sie.^[72-73] Pyren kann, je nach Anknüpfungsart an die DNA, als Elektronendonator oder -akzeptor wirken. Wird Pyren an die 5 bzw. 8-Position einer natürlichen Base eingebracht, können unterschiedliche Eigenschaften generiert werden. So findet bei der Anregung von 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin **1PydU** ein intramolekularer Elektronentransfer zwischen angeregtem Pyren Py^* und 2'-Desoxyuridin dU zu $Py^{*+}-dU^-$ statt. Die Triebkraft liegt hier bei ca. $\Delta G_{CT} = 0$ eV.^[74-75] Wohingegen bei der Anregung von 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin **PydG** ein intramolekularer Lochtransfer zwischen Pyren und Desoxyguanosin zu Py^*-dG^{*+} , mit einer ähnlich niedrigen Triebkraft von -0.05 eV stattfindet. Betrachtet man die Elektronendichte der 1- und der 2-Position im LUMO des Pyrens wird erkenntlich, dass die relativ hohe Elektronendichte der 1-Position eine Delokalisierung der Elektronen über 2'-Desoxyuridin verursacht. Das bedeutet, dass sowohl angeregtes Pyren Py^* als auch der ladungstrennte Zustand nebeneinander vorliegen, was zu einer strukturlosen, lösungsmittelabhängigen Fluoreszenz führt. Diese Zustände können als „gebundene“ Exciplexe betrachtet werden.^[71]

Diese Delokalisierung der Ladung wirkt stabilisierend und führt zu einer schlechteren Migration der Elektronen in der DNA.^[76] Dies lässt sich durch die Anknüpfung der Nukleobase an die elektronenärmere 2-Position des Pyrens unterbinden.

Bei 5-(Pyren-2-yl)-2'-desoxyuridin **2PydU** beschränken sich die LUMO-Orbitale nur auf das Pyren, damit konnte bei zeitaufgelösten, transienten Absorptionsmessungen kaum Exciplex Charakter bestimmt werden. Diese gute Ladungstrennung zwischen Pyren und Base macht **2PydU** zu einem vielversprechenden Elektronendonator.^[77] Das Oxidationspotential von Pyren liegt bei $E_{\text{ox}} = 1.5$ V gegen NHE. Mit einer Singulett-Energie von $E_{00} = 3.25$ eV^[78] kann nach Rehm-Weller (Kapitel 2.1.4, Gleichung (7)) das Potential des angeregten Zustands mit $E_{\text{ox}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{*\cdot+}) = -1.75$ V errechnet werden. Betrachtet man das von *Fiebig et al.* ermittelte Reduktionspotential von T, erhält man einen Wert von $E_{\text{Red}}(\text{T}/\text{T}^{\cdot-}) = -1.8$ V.^[79] Damit ergibt sich aber nur eine sehr geringe Triebkraft von $\Delta G_{\text{EET}} = -0.05$ eV für den intramolekularen Elektronentransfer von Pyren zu 2'-Desoxyuridin. Bei einem Oxidationspotential des angeregten Zustands von **2PydU** $E_{\text{ox}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{*\cdot+}) = -1.9$ V ergibt sich nach derselben Rechnung eine Triebkraft für den Ladungstransfer von **2PydU** zu T mit $\Delta G = 0$ eV. Das erschwert die Injektion der Ladung in den Basenstapel, was der Grund für das von *Wagenknecht et al.* weiterentwickelte *N,N'*-Dimethylaminopyren-2'-desoxyuridin **DIMAPdU** ist.

Tabelle 1: Übersicht der Redoxpotentiale von Pyren, 1PydU, 2PydU, DIMAP und DIMAPdU im Vergleich zum Reduktionspotential T (stellvertretend für den Basenstapel) gegen NHE.^[77] Formeln für Berechnungen siehe Kapitel 2.1.4.

	$E_{00}(\text{Py}) / [\text{eV}]$	$E_{\text{Ox}}(\text{Py}/\text{Py}^{*\cdot+}) / [\text{V}]$	$E_{\text{Ox}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{*\cdot+}) / [\text{V}]$	$E_{\text{Red}}(\text{T}/\text{T}^{\cdot-}) / [\text{V}]$
Pyren	3.3 ^[78]	1.5 ^[78]	-1.7	ca. -1.8 ^[79-80]
1PydU	3.3	1.6	-1.8	
2PydU	3.3	1.5	-1.8	
	$E_{00} / [\text{eV}]$	$E_{\text{Ox1}} / [\text{V}]$	$E_{\text{Ox1}}^* / [\text{V}]$	
DIMAP	3.1 ^[81]	0.9 ^[81]	-2.2	
DIMAPdU	3.1	0.9	-2.2	
	$E_{00} / [\text{eV}]$	$E_{\text{Red}} / [\text{V}]$	$E_{\text{Red}}^* / [\text{V}]$	$E_{\text{Ox}}(\text{G}/\text{G}^{*\cdot+}) / [\text{V}]$
DIMAPdU	3.1	2.1 ^[81]	1.0	1.3 ^[24]

Um die elektronische Kopplung zu erhalten, wurde in **2PydU** eine elektronenschiebende Dimethylamino-Funktionalität eingebracht. Sie erhöht die Elektronendichte im π -System des Pyrens und erniedrigt damit das Oxidationspotential des Elektronendonors zu $E_{\text{ox}}^* = -2.2$ V im Gegensatz zu **2PydU** mit $E_{\text{ox}}^* = -1.9$ V. Das ergibt eine Triebkraft für den Elektronentransfer auf Thymin von $\Delta G = -0.4$ eV.

Auch das Reduktionspotential von angeregtem **DIMAPdU** ist mit $E_{\text{Red}}^* = 1.0 \text{ V}$ günstig, so dass angeregtes **DIMAPdU** wahrscheinlich zu keinen oxidativen Schäden am G führt ($\Delta G = +0.3 \text{ eV}$). **DIMAPdU** wurde ebenfalls von *Wagenknecht et al.* charakterisiert. Hierbei konnte durch cyclovoltammetrische Messungen das Radikalkation, sowie das für den EET wichtige Radikalanion dargestellt werden. Auch wurde durch den Vergleich von **DIMAP** und **DIMAPdU** ersichtlich, dass nur eine sehr geringe elektronische Kopplung zwischen **DIMAP** und **dU** besteht. Bei zeitaufgelösten transienten Absorptionsmessungen konnte festgestellt werden, dass sich der angeregte Zustand **DIMAP*-dU** in einen ladungsgetrennten Zustand **DIMAP⁺-dU⁻** umwandelt, der innerhalb von $\tau = 50 \text{ ps}$ durch Ladungsrekombination zur Hälfte depopuliert vorliegt.^[81]

2.1.6 EET Detektionsmethodik

Es gibt zwei Ansätze, Ladungstransport durch einen DNA Doppelstrang zu untersuchen. Entweder kann die Leitfähigkeit der DNA als Einzelmolekül direkt über Messungen mit Goldnanopartikeln an der Spitze des elektrochemischen Rasterkraftmikroskops (EC-AFM) oder mit Rastertunnelmikroskopie (STM) über eine Gold-Spitze mit thiolmodifizierter DNA bestimmt werden. Ebenso möglich ist die Detektion über die kovalente Bindung an Kohlenstoff-Nanoröhren, bei denen die DNA den Stromkreis schließt. In diesen Fällen wurden elektrische Ströme zwischen 10 nA und 100 nA gemessen.^[16, 18, 82]

Daneben kann durch eine Reihe von spektroskopischen und biochemischen Methoden die Geschwindigkeit bzw. die relative Ausbeute von durch CT hervorgerufenen chemischen Reaktionen bewertet werden.^[10, 83] Viele Forschungsgruppen entscheiden sich für die zweite dieser Methoden und oxidieren, bzw. reduzieren DNA photochemisch oder photophysikalisch. Dazu werden passend zusammengestellte Ladungsdonoren und -akzeptoren eingesetzt, wie Metallinterkalatoren, Interkalatoren, organische Capmodifikationen und modifizierte Nukleobasen,^[83-84] die durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Ladung in den Basenstapel injizieren. Der Ladungstransport gilt als erfolgreich, wenn diese Ladung über den Basenstapel den ebenfalls integrierten Ladungsakzeptor erreicht und dort zu einem messbaren Signal führt. Meist wird versucht die Ladung durch eine irreversible Reaktion am Akzeptor zu binden. Bei dieser Art der CT-Darstellung laufen jedoch zwei gegenläufige Prozesse mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab. Die Geschwindigkeit der Ladungsrekombination (Elektronen Rücktransport, BET)^[85] und die der Reaktion des Akzeptors.^[85-88] Der Einfluss des BET auf die Geschwindigkeitskonstante hängt vom gewählten CT-System ab. Ist die Injektion der Ladung langsamer als der BET, kann auch nur dieser als Geschwindigkeitskonstante bestimmt werden.

Ebenso ist die Länge der DNA-Brücke entscheidend, da die Rekombination der Ladung stärker distanzabhängig ist als die Ladungstrennung, was an Acridinium / Phenothiazin- und Naphthalinimid / Phenothiazin-CT-Systemen untersucht wurde.^[89-92] Eine Möglichkeit, dies zu verhindern, ist die Coulombanziehung zu schwächen, indem man zweifach positiv geladene Elektronenakzeptoren, wie Methylviologen oder Diazapyrenium, verwendet. Nach erfolgtem Elektronentransfer sind dann sowohl Donor als auch Akzeptor einfach positiv geladen.

Im Zuge dieser Arbeit wurden reduktive Elektronentransfersysteme eingesetzt, die mit kinetischen Elektronenfallen und damit erfolgenden Strangbrüchen untersucht wurden. Die drei wichtigsten Elektronenfallen werden im Folgenden vorgestellt.

EET Detektion über den Elektronenakzeptor T^ΔT

Wird eine thyminreiche DNA-Sequenz mit UV-A Licht bestrahlt, kann es zu einem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer Schaden kommen, der durch Photolyasen wieder repariert werden kann. Der reduzierte, deprotonierte Flavinadenindinukleotid FADH⁻ Cofaktor dieses Enzyms gibt dabei ein Elektron an das Thymidin-Dimer ab, was zur Cycloreversion und damit zur Reparatur des photoinduzierten Schadens führt.^[93] An dieses System angelehnt entwarfen *Carell et al.* ein T^ΔT Dimer, welches nicht über das Phosphatrückgrat verbunden ist, somit trennt sich der Strang wenn das ankommende Elektron den Cyclobutanring mittels Cycloreversion öffnet. Auch der Elektronendonator dieses Systems, das FADH⁻, ist an den biologischen Reparaturmechanismus angelehnt. Das reduzierte und deprotonierte Flavin wird belichtet und injiziert damit ein Überschusselektron in den A:T Basenstapel, welches sich über den *Hopping*-Mechanismus auf den DNA-Basen zum Elektronenakzeptor bewegt und dort zum Strangbruch führt. Dieser Strangbruch ist auch über HPLC-Analyse verfolgbar.

Betrachtet man die Geschwindigkeit der T^ΔT Cycloreversion mit 556 ns⁻¹ scheint klar,^[94] dass die Cycloreversion als geschwindigkeitsbestimmender Schritt keine wirkliche Aussage über Geschwindigkeitskonstanten oder Sequenzabhängigkeiten des EETs zulässt. Jedoch wurde vermutet, dass nicht die Ringöffnung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, sondern ein langsamer endothermer Reduktionsprozess, welcher der Cycloreversion nachgeschaltet ist.^[95] *Hutter et al.* postulierten, dass sich die gemessene Kinetik von langsamen vibronischen und elektrischen Relaxationen des schon geöffneten Dimers herleitet.^[96] So wird eine relativ schnelle Cycloreversionsgeschwindigkeit^[97], mit 1.7·10⁹ s⁻¹^[98], 1.8·10⁹ s⁻¹^[99] oder 2·10⁷ s⁻¹^[100] angenommen. Hinzu kommt, dass das Elektron nach der Ringöffnung weiter transportiert werden kann und somit auch weitere T^ΔT-Dimere öffnen kann, was *Giese et al.* und *Carell et al.* herausfanden.^[101]

EET Detektion über Elektronenakzeptor BrdU

Die zweite chemische Sonde, **BrdU** führt nach Behandlung mit Piperidin ($pK_s = 11.24$, $25\text{ }^\circ\text{C}$, in $\text{H}_2\text{O}^{[102]}$) bei erhöhter Temperatur zu Strangbrüchen. Die Abspaltung des Bromradikals erfolgt hierbei mit 7 ns^{-1} sehr schnell^[103] und ist damit auch für distanzabhängige Messungen geeignet. Das Reduktionspotential von **BrdU** liegt bei $E_{\text{Red}} = -1.8\text{ V}$.^[104]

Sugiyama et al. beschäftigten sich mit der Analyse der Produkte und des Mechanismus von Strangbrüchen mit **BrdU** und fanden heraus, dass grundsätzlich 4 Abbauprodukte bei erfolgreichem Elektronentransfer entstehen (Abbildung 8). Das Ribonolacton A und die Erythrose B entstehen durch C1'-, bzw. C2'-H Abstraktion eines Uracil-5-yl-Radikals. Des Weiteren entsteht das C2'-hydroxylierte Produkt C und der oxidierte Ladungsdonor.

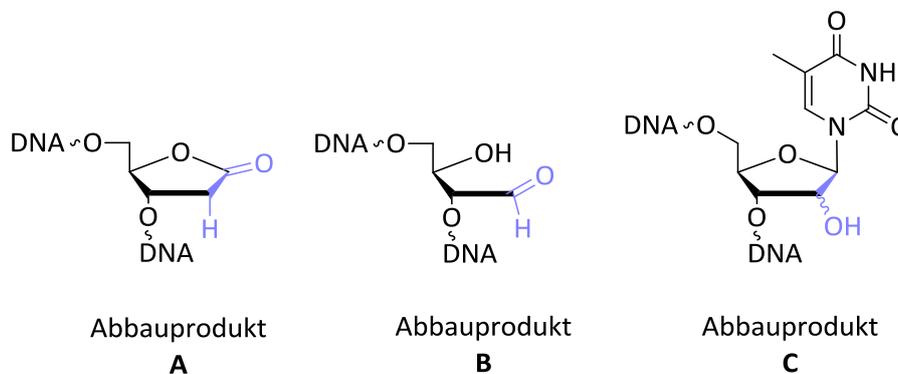


Abbildung 8: Abbauprodukte bei EET mit BrdU als Elektronenakzeptor in DNA.

Mechanistisch betrachtet gibt der Elektronendonator ED, in diesem Fall terminal gebundenes Pyren, das Elektron über den Basenstapel an den Elektronenakzeptor EA, das **BrdU**. Dieses spaltet Bromid ab, wobei das entstehende Uracil-5-yl Radikal entweder ein C1'- oder ein C2'-H der Nachbarbase in 5'-Richtung abstrahiert. In Abbildung 9 ist der weitere, kompetitive Mechanismus der Bildung von A oder B dargestellt. Das Verhältnis von entstehendem A und B wird durch die Distanz zwischen ED und EA bestimmt. Für C wurde noch kein Mechanismus vorgeschlagen, jedoch konnte durch Markierung mit H_2^{18}O nachgewiesen werden, dass ein Lochtransport von Py^{*+} an der Reaktion beteiligt ist.^[105] Alle drei Produkte sind basenlabil und führen mit der Behandlung von Piperidin zu Strangbrüchen, die über die Trennung via Gelelektrophorese detektiert werden können.

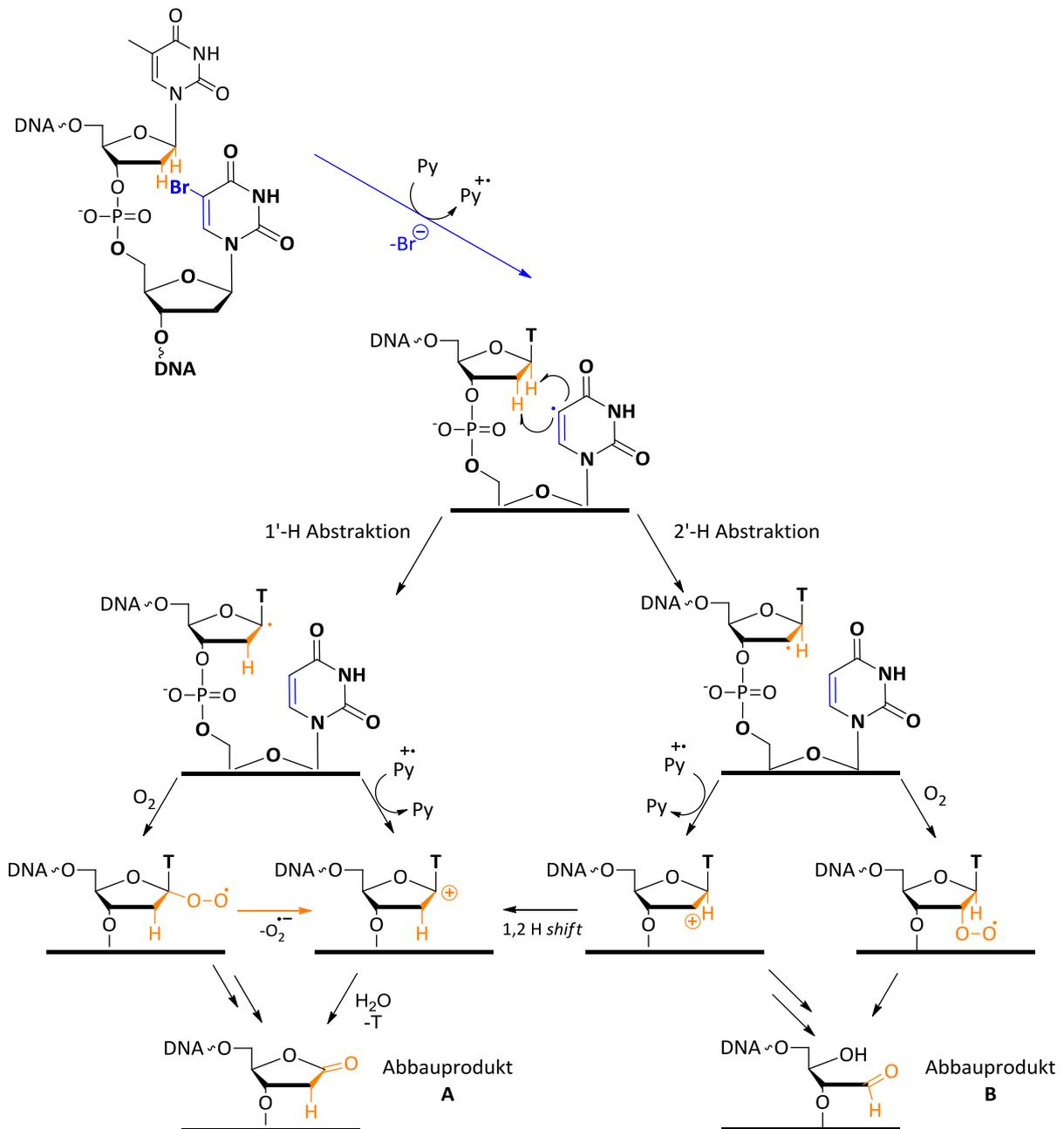
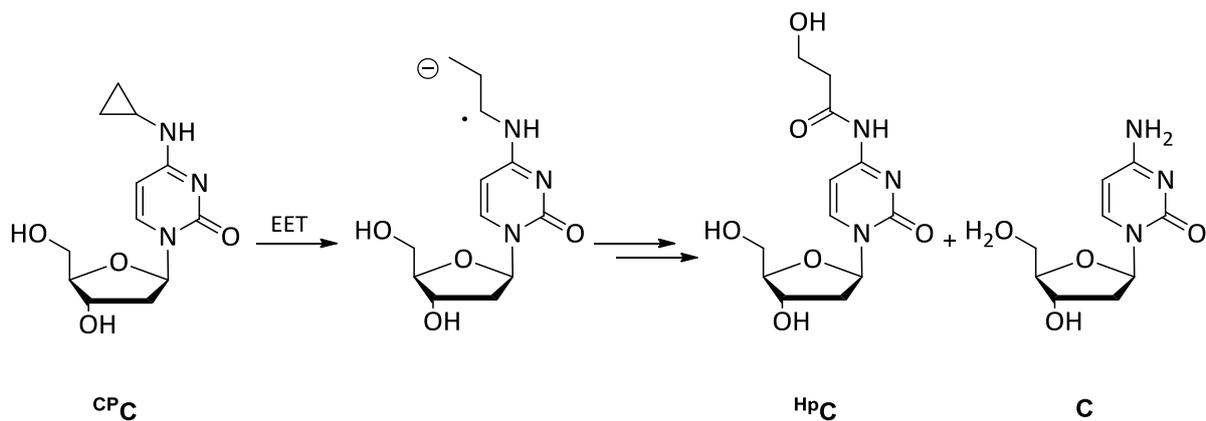


Abbildung 9: Mechanismus des Abbaus von BrdU als EA in EET-Systemen.

Doch auch bei **BrdU** als Elektronenakzeptor und Elektronenfalle hängt die detektierte Geschwindigkeit und die ermittelte EET-Distanz mit der irreversiblen Spaltungsreaktion zusammen. Bei Experimenten mit **BrdG** in G:C Sequenzen konnte die Distanzabhängigkeit im Gegensatz zu **BrdU** kaum aufgelöst werden, was zeigt, dass in diesem Fall die Elektronenaufnahme und die Debromierung in der gleichen Geschwindigkeitsgrößenordnung wie der EET stattfinden. **BrdA** und **BrdG** werden in A:T reichen Sequenzen hingegen langsamer debromiert als **BrdU**, was darauf hinweist, dass auch hier die Debromierung und nicht der EET Geschwindigkeitsbestimmend ist. So kann in diesen Experimenten ein Übertreten der Ladung über den EA stattfinden. Dieses Verhalten wurde auch für T⁺T Dimere berichtet.^[101, 106]

Noch genauer wurden die Spaltreaktionen von *Carell et al.* untersucht, in dem ein direkter Vergleich von **BrdU**, **BrdA**, **BrdG**, Thymidin und T^AT-Dimer durch ein Doppel-Duplex-System durchgeführt wurde. Es wird anhand ihrer Daten angenommen, dass die Geschwindigkeit des Überschusselektronentransfers entlang 4 A:T Basenpaaren langsamer als $1.4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (**BrdU**-Spaltung) und schneller als $1.8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ (T^AT-Dimer-Spaltung) ist.^[95]

Bei der Reduktion der dritten kinetischen Falle, dem *N*-4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin ^{CP}C, findet eine irreversible, schnelle Ringöffnung von 10^{11} s^{-1} statt.



Schema 1: *N*-4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin ^{CP}C reagiert durch Ringöffnung zu Cytidin C und ^{HP}C *N*,4-hydroxypropanoylcytidine

Die Trennung der unterschiedlichen Spezies sowie die Quantifizierung und Qualifizierung der Abbauprodukte über Massenspektrometrie, kann durch HPLC erreicht werden.^[60]

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine weitere Methode, den Elektronentransfer zu detektieren, ist eine gelelektrophoretische Trennung. Migriert ein Elektron von einem photoangeregten Elektronendonator zu einem strangbruchinduzierenden Elektronenakzeptor, wie die in Kapitel 2.1.6 beschriebenen Elektronenfallen T^AT oder **BrdU**, wird die DNA an dieser Stelle gespalten. Um den Anteil an Strangbrüchen im Vergleich mit den nicht gebrochenen Oligonukleotide zu erhalten, können Strangfragmente und Oligonukleotide über Polyacrylelektrophorese (PAGE) getrennt werden (Abbildung 10).

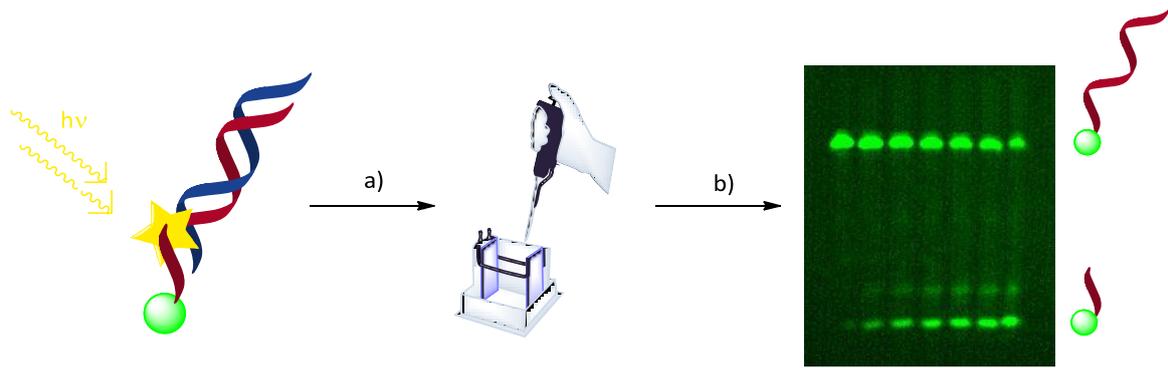


Abbildung 10: Polyacrylamid-Gelelektrophorese PAGE a) Lichtinduzierter EET mit Strangbruch des markierten DNA Strangs b) Trennung der Strangsfragmente von den intakten Oligonukleotiden und Auslesung der Gele über Fluoreszenzimager.

Um die Oligonukleotide auf dem Gel sichtbar zu machen, können radioaktive Markierungen genutzt werden, die über einen Bildgeber ausgelesen werden. Einfacher ist aber die Variante, die Oligonukleotide mit einem Fluorophor zu markieren, welches durch einen Fluoreszenz Bildgeber und dem Fluorophor entsprechenden Filtern die Gele auswertbar macht. Nach dem Auslesen der Gele können die Fluoreszenzintensität des ungebrochenen Oligonukleotids mit der, der Strangfragmente ins Verhältnis gesetzt werden und damit einen Einblick über die Effizienz des erfolgten Strangbruchs geben.

Fluoreszenzlöschung

Um einen Eindruck zu bekommen ob ein Elektronentransfer zwischen einem gewählten Donor und Akzeptor stattfinden kann, wird die Fluoreszenzlöschung des Donors in Anwesenheit des Akzeptors bestimmt. Durch die photoinduzierte Anregung des Donors kann intra- und intermolekular ein Ladungstransfer stattfinden. Dabei kommt es jeweils zur Bildung eines nichtstrahlenden ladungsgetrennten Zustands (Abbildung 11).

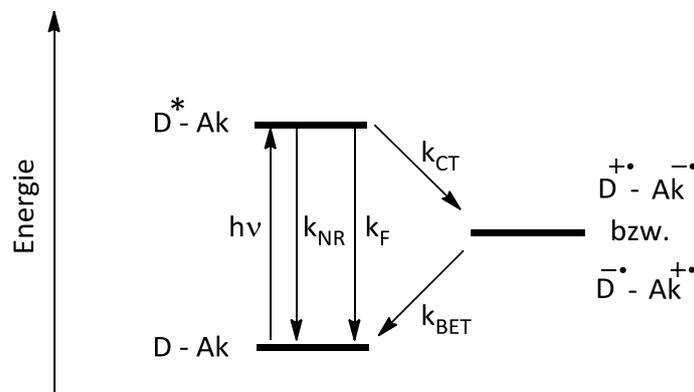


Abbildung 11: Fluoreszenzlöschung photoinduzierter CT Prozesse, mit k_F = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenzemission, k_{NR} Summe aller strahlungslosen Übergänge, k_{CT} Geschwindigkeitskonstante des Ladungstrfers, k_{BET} Geschwindigkeitskonstante der Ladungsrekombination.

Durch diesen zusätzlichen strahlungslosen Relaxationsweg nimmt die Fluoreszenzlebenszeit τ_F und die Quantenausbeute ϕ_F des Donor Fluorophors ab und es kommt zu einer Fluoreszenzlöschung. Ein Maß für diese Löschung gibt der F_q Wert an.

$$F_q = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (10)$$

Wobei F die Fluoreszenzintensität des Elektronendonors in An-, und F_0 in Abwesenheit des Akzeptors darstellt.

Durch die Geschwindigkeitskonstanten k_F , k_{BET} und k_{CT} kann die Änderung der Quantenausbeute wie in Gleichung (11) beschrieben, ausgedrückt werden, wobei ein großes k_{CT} auch eine starke Löschung verursacht.

$$\phi_F = \frac{k_F}{\sum k_F + k_{BET} + k_{CT}} \quad (11)$$

Um k_{CT} für ein bestimmtes System zu berechnen, müssen die Fluoreszenzlebenszeiten des fluoreszenten Ladungsdonors in Ab- (τ_{F_0}) und Anwesenheit (τ_F) des Akzeptors bestimmt werden:

$$k_{CT} = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F_0}} \quad (12)$$

Transiente Absorption

Um die Absorption kurzlebiger Spezies, wie einem angeregten Zustand messen zu können, wird transiente Absorptionsspektroskopie eingesetzt. Es können Absorptions- und Relaxationsprozesse zeitabhängig bis hin zu einer Auflösung im Femtosekundenbereich erfolgen. Apparativ regt ein kurzer Laserpuls (*pump*) einen Teil der Moleküle der Probe an (0.1 – bis mehrere 10 %^[107]), um anschließend mit einer zeitlichen Verzögerung τ mit dem Abfragepuls (*probe*) die Absorptionsänderung ΔA zu erfassen. Diese Absorptionsänderung wird aus der Differenz des Absorptionsspektrums der angeregten Probe und der Probe im Grundzustand berechnet. Nimmt man ΔA bei verschiedenen Verzögerungszeiten τ auf, so ist ΔA abhängig von τ und der Wellenlänge λ . $\Delta A(\tau, \lambda)$ enthält Informationen über dynamische Prozesse, die nach der Anregung ablaufen, wie z.Bsp. Lebenszeiten des angeregten Zustands, *inter system crossing* (ISC) oder Elektronen- oder Protonentransferprozesse.

Generell tragen drei verschiedene Beiträge zu einem transienten Absorptionsspektrum bei.^[107] Dazu gehören das Grundzustandsbleichen, die stimulierte Emission und die Absorption des angeregten Zustands oder der ladungstrennten Zustände. Beim Bleichen des Grundzustands wird durch die Anregung einiger Moleküle die Zahl der Moleküle im Grundzustand geringer.

Dies führt dazu, dass die Grundzustandsabsorption in der angeregten Probe geringer ist als in der nicht angeregten Probe. Man erhält also ein negatives Signal im transienten Absorptionsspektrum.

Für ein System mit zwei Zuständen sind die Einsteinkoeffizienten für Absorption aus dem Grundzustand und der stimulierten Emission aus dem angeregten Zustand identisch. Was bedeutet, dass es durch den Abfragepuls auch zu stimulierter Emission aus dem besetzten angeregten Zustand heraus kommt. Diese stimulierte Emission erhöht die Lichtintensität am Detektor und führt ebenfalls zu einem negativen Signal im transienten Absorptionsspektrum. Der dritte Faktor ist die Absorption des angeregten Zustands. Dabei werden die Moleküle durch den *probe*-Puls in einen angeregten Zustand überführt, wobei bestimmte Wellenlängen des Abfragepulses absorbiert werden. Dies führt dazu, dass weniger Licht am Detektor auftrifft, was ein positives Signal im ΔA -Spektrum bewirkt.

Bei der Produktabsorption eröffnen sich den angeregten Molekülen neue Reaktionswege. Diese können zu transienten oder langlebigen Zuständen, wie z.Bsp. Triplett-Zuständen oder ladungstrennten Zustände führen. Die Absorptionen dieser „Produkt-Zustände“ tragen ebenfalls durch ein positives Signal zum ΔA -Spektrum bei (näheres zum Aufbau in Kapitel 5.1).

2.2 Untersuchung von photoinduziertem Elektronentransfer in DNA über 8-Hydroxychinolin Basenpaare

2.2.1 Theorie

Die Leitfähigkeit der natürlich vorkommenden DNA wird kontrovers diskutiert. So gab es Messungen die zeigten, dass die DNA als elektronischer Leiter fungieren kann^[108], wohingegen bei anderen Messungen nur eine sehr schwache bis keine Leitfähigkeit nachweisen werden konnte ($1 - 1 \cdot 10^7 \text{ M}\Omega$, abh. vom verwendeten Messsystem^[16, 109]). Wieder andere bezeichnen DNA als Super-^[110] oder Halbleiter^[111]. Trotz der Diskrepanzen ist es bewiesenermaßen möglich bei natürlich Prozessen, wie der DNA Reparatur Elektronen über kurze Distanzen zu transportieren.^[38, 112-113] Der Transport von größeren Ladungsmengen über Distanzen von hunderten Basenpaaren findet aber nicht ohne Zerstörung der DNA statt. Dafür würde ein sehr geringer Ohmscher Widerstand benötigt^[114], dies macht die unmodifizierte DNA für die Anwendung z. Bsp. in der Nanotechnologie ungeeignet. Dennoch sind die sequenzabhängige und damit steuerbare Selbstanordnung und die Größenordnung der DNA gute Gründe, sie so zu modifizieren, dass der Ladungstransfer durch sie ermöglicht werden kann. Wegen der entstehenden Guaninschäden bei oxidativem Elektronenlochtransfer und der geringeren Geschwindigkeitskonstante ($k_{\text{HT}}: 10^4 - 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ^[42, 46, 115-118], $k_{\text{EET}}: 4 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ^[119]) ist der Überschusselektronentransfer EET für diese Untersuchungen wesentlich interessanter.

Die ersten Versuche der Weiterentwicklung schlossen die Tatsache mit ein, dass A-helikale Strukturen durch ihre geringere Ganghöhe der Helix und damit enger gepackten Nucleobasen im Vergleich zur normalen B-DNA eine bessere Matrix für den EET durch Oligonucleotide sein könnten. *Yamana et al.* zeigten auch, dass der Ladungstransfer in RNA (A-Form) effektiver ist als durch DNA.^[120] Jedoch macht die chemische Instabilität der RNA den Einsatz für die molekulare Elektronik unmöglich. *Wagenknecht et. al.* untersuchten den EET in *locked*-Nucleinsäuren LNA/DNA-Hybriden im Vergleich zu RNA/DNA-, 50 % LNA-50 % DNA/DNA- und DNA/DNA-Hybriden. Dazu wurde ein Elektronendonator, -akzeptor-Paar aus dem in Kapitel 2.1.5 besprochenen 5-(2-Pyrenyl)-2'-deoxyuridin **2PydU** ($E_{\text{Ox}}^* = -1.9 \text{ V}$) und dem Elektronenakzeptor 5-Brom-2'-desoxyuridin **BrdU** (Kapitel 2.1.6) gewählt (siehe Abbildung 12). Die Triebkraft dieses EET-Systems liegt mit dem Reduktionspotential von **BrdU** von -1.8 V bei ca. $\Delta G_{2\text{PydU}/\text{BrdU}} = -0.1 \text{ eV}$.

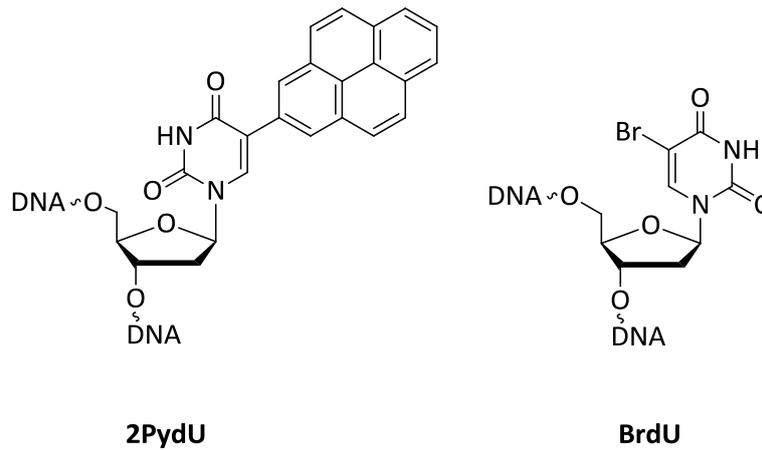


Abbildung 12: Elektronendonator, -akzeptor Paar: 2PydU und BrdU für Untersuchungen des Einflusses der Struktur der Duplexe auf den EET.^[121]

Die LNA wird mit einer Verbindung zwischen 2'-OH und 4'-C der Ribose in der C3'-endo Konformation gehalten. Dadurch kann auch die A-helikale Strukturausbildung bei der Hybridisierung mit einem DNA-Einzelstrang erfolgen. Obwohl der LNA/DNA-Hybrid der Struktur von RNA/DNA-Hybriden ähnelt, ist durch die Methylenbrücke der LNA das Rückgrat und damit der komplette Doppelstrang starrer. Es konnte ein starker Einfluss der unterschiedlichen Gegenstränge (LNA, 50 % LNA-50 % DNA, RNA und DNA) auf den erfolgenden EET gezeigt werden. Mit nur einem AT-Basenpaar zwischen Elektronendonator (ED) und Elektronenakzeptor (EA) war die EET-Effizienz, gemessen am verhältnismäßig erfolgten Strangbruch des LNA/DNA Hybrids, mit 76.5 % am besten (DNA/DNA: 44.6 %). Jedoch wies der Elektronentransfer durch den RNA/DNA Hybrid bis zu einer Distanz von 4 AT-Basenpaaren (AT-BP) immer noch eine Effizienz von 18.7 % auf (DNA/DNA: 4.7 %). Somit konnte gezeigt werden, dass der EET in DNA durch Veränderung der Flexibilität der Konformation und den für A-helikale Strukturen charakteristischen, dichter gepackten Basenstapel verändert und verbessert wurde.^[121]

Eine weitere Möglichkeit, den EET in DNA zu verbessern, ist die Veränderung der Nucleobasen. Künstliche Basen, wie schon einige in Kapitel 2.1.5 und 2.1.6 beschrieben wurden, werden auch für den EET als ED und EA genutzt. Ansonsten wurden artifizielle Nucleoside zur Untersuchung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Basenpaaren und der Stapelung dieser in der DNA eingesetzt.^[122-123] Andere wurden für die analytische Erkennung von Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNP) in die DNA eingebracht^[124] und es konnten auch komplette, synthetische Basenpaare entwickelt werden. Letztere haben die Möglichkeit miteinander, orthogonal zur Watson-Crick Basenpaarung eine Bindung im Basenstapel einzugehen.^[125]

Metallionen in der DNA

Ein weiterer Ansatz, die DNA-Eigenschaften zu verändern, erfolgte durch Metallionen im Basenstapel, was die elektrische Leitfähigkeit erhöhen und eventuelle andere interessante elektronische Effekte hervorrufen sollte.^[126] Gezielte Platzierung von Metallionen gelang in thymineichen Sequenzen mit der Zugabe von Quecksilber(II)-Salzen bei erhöhtem pH-Wert. Dabei bildete sich ein T-Hg-T Metallbasenpaar, wobei das Ion von den zwei deprotonierten N3-Positionen des Thymins koordiniert werden kann, wie in Abbildung 13 (oben) dargestellt.^[127-129] Entsprechend diesem Beispiel können Silber(I)-Salze in C-C Fehlpaarungen (deprotonierte N1-Position) eingebracht werden. Damit kann eine Basendiskriminierung von Silber- und Quecksilberionen erreicht werden.^[130]

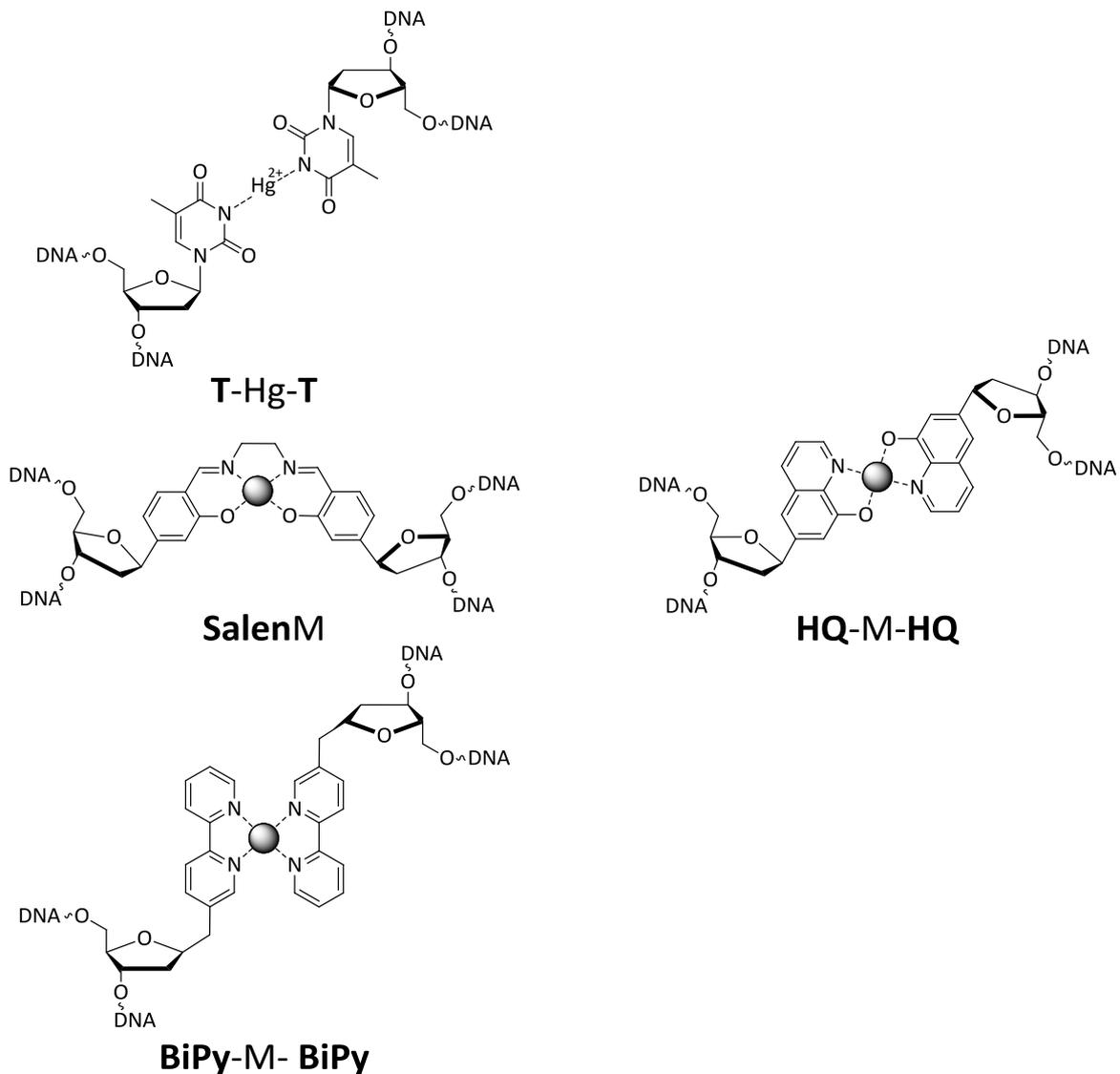


Abbildung 13: Metallionenvermittelte Basenpaare, oben: Quecksilber(II)-vermitteltes Thymidin Basenpaar T-Hg-T^[127-129], Mitte links: Salen-Metall-Basenpaar SalenM^[131-132], Mitte rechts: 8-Hydroxychinolin Basenpaar HQ-M-HQ^[133], unten: 2,2'-Bipyridin-Ligandoside BiPy-M-BiPy.^[134]

Die Kombination aus der Entwicklung neuer, artifizierlicher Basenpaare und der Inkorporation von Metallionen in die natürliche DNA erfolgte über die Entwicklung von sogenannten *Ligandosiden*. Diese artifiziiellen Nucleobasenbausteine können durch ausgewählte funktionelle Gruppen, die als Liganden wirken, vorwiegend Übergangsmetallionen linear oder quadratisch planar^[126] in der DNA komplexieren. Einige Vertreter dieser Kategorie sind in Abbildung 13 dargestellt.

8-Hydroxychinolin als Nucleosid (HQ)

26

Der in dieser Arbeit näher untersuchte Vertreter der Ligandoside, das 8-Hydroxychinolin C-Nucleosid, wurde so konzipiert, dass die hydrophoben Eigenschaften nicht auf Wasserstoffbrückenbindungen basierender, artifiziieller Basenpaare mit denen eines zweizähligen Liganden verknüpft wurden: Das aromatische System des 8-Hydroxychinolin **HQ-HQ**-Basenpaars ist ausgedehnt (Abbildung 17, rechts) und kann damit im DNA-Basenstapel durch starke π - π -Wechselwirkungen stabilisierend auf den Duplex wirken. Gleichzeitig kann mit der Bindung von Übergangsmetallionen durch das Basenpaar die Schmelztemperatur der DNA um bis zu 30 °C erhöht werden.^[133] Dabei entsteht der Komplex **HQ₂M**, der auch in der Absorption des entsprechenden Oligonucleotids zu sehen ist. Und selbst in der Abwesenheit von Metallionen, bilden die zwei **HQ**-Einheiten ein stabiles Basenpaar in der DNA ($\Delta T_{sp} = +1$ K im Vergleich zu einem AT-Basenpaar).^[135]

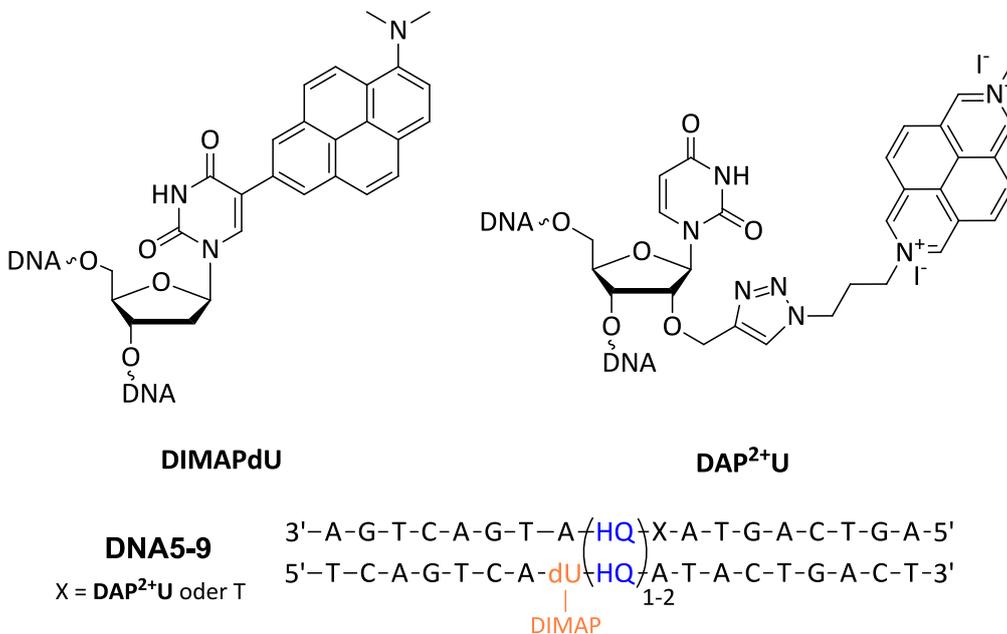


Abbildung 14: Elektronendonor, -akzeptor System DIMAPdU und DAP²⁺U für statische Fluoreszenzlöschungsexperimente an HQ-HQ-Basenpaaren (Abbildung 17, rechts).^[135]

Wagenknecht et. al. führten stationäre Fluoreszenzlöschungsexperimente mit dem **HQ-HQ**-Basenpaar in der DNA durch.

Die Fluoreszenz des in Kapitel 2.1.5 diskutierten *N,N'*-Dimethylaminopyren-2'-desoxyuridin **DIMAPdU** (ED) wurde in Ab- und Anwesenheit des von ihnen eingesetzten Elektronenakzeptors **DAP²⁺** gemessen (Abbildung 14). Die untersuchten Oligonukleotide beinhalten ein bis zwei **HQ-HQ**-Basenpaare zwischen ED und EA, welche für diesen intermolekularen EET in verschiedene Oligonukleotide inkorporiert wurden. Sie fanden heraus, dass die Fluoreszenz des Donors schon ohne die Anwesenheit des Akzeptors stark gelöscht wurde, daher wurde eine effiziente Ladungsinjektion in den DNA-Basenstapel angenommen. Wurden die Duplexe mit Cu^{2+} -Ionen versehen, stieg die Schmelztemperatur der Duplexe um ca. 20 K und eine für den **HQ₂Cu(II)**-Komplex charakteristische Absorptionsbande trat im Bereich um $\lambda_{\text{abs}} = 400 \text{ nm}$ auf. Die Fluoreszenz des ED wurde auch bei diesem Komplex ohne die Anwesenheit des EA sehr stark gelöscht. Da aus stationären Fluoreszenzmessungen nur die Löschungen durch die Ausbildung eines nicht-emittierenden ladungsgetrennten Zustands beobachtet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass photoangeregtes **DIMAPdU** seine Ladung in **HQ** injiziert. Weitere Aussagen können ohne andere analytische Messsysteme nicht sicher festgestellt werden.^[81]

Cyclovoltammetrische Messungen ergaben ein Reduktionspotential von 8-Hydroxychinolin mit $E_{\text{Red}} = -1.6 \text{ V}$ gegen Ferrocen, was mit einer Umrechnung^[125] auf $E_{\text{Red}} = -1.0 \text{ V}$ gegen NHE bestimmt werden kann (siehe Abbildung 15). Der **HQ₂Cu(II)** Komplex hingegen besitzt ein Reduktionspotential von $E_{\text{Red}} = -0.28 \text{ V}$ gegen NHE^[136-137]. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der Fluoreszenzlöschung überein: Die Triebkraft des Ladungstransfers von photoangeregtem **DIMAPdU** ($E_{\text{Ox1}^*} = -2.2 \text{ V}$) zu **HQ₂Cu(II)** ist größer als die für den Ladungstransport von **DIMAPdU** auf **HQ**. Also wird die Fluoreszenz des Donors auch stärker gelöscht.

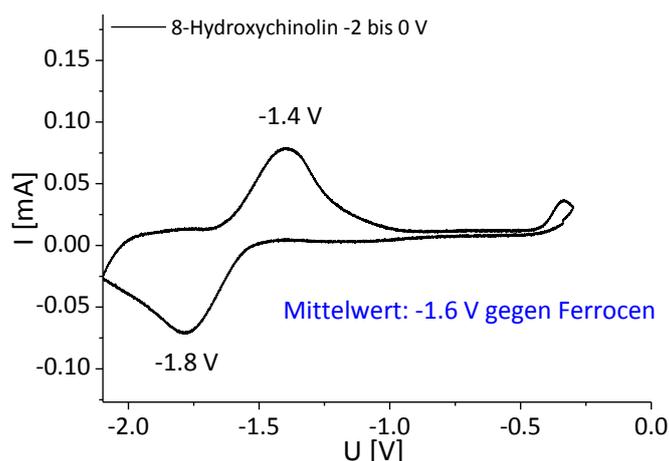


Abbildung 15: Cyclovoltammogramm von 8-Hydroxychinolin gegen Ferrocen, $-1.6 \text{ V} + 0.63 \text{ V}^{[138]} = -1.0 \text{ V}$ Reduktionspotential geg. NHE; 8-Hydroxychinolin in MeCN mit 100 mM TBAHFP Leitsalz, 200 mV/s Vorschubgeschwindigkeit.

Der mit **HQ** zweifach modifizierte Duplex wurde ebenfalls mit Cu^{2+} -Ionen versetzt. Durch ESR-Messungen konnte ein Cu-Cu-Abstand in der DNA von $4.2 \pm 0.1 \text{ \AA}$ ermittelt werden. Dieser ist etwas größer als der Abstand normaler DNA Basen (3.6 \AA).

2.2.2 Systemaufbau und Strangdesign

Die zwei in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Elektronentransfer Systeme sollten im Folgenden vereint werden. Das System **2PydU/BrdU** wurde als analytisches Mittel genutzt, um den Elektronentransfer über **HQ**-Basenpaare zu untersuchen. Wie in Kapitel 2.1.6 erwähnt, ist die stationäre Fluoreszenzlöschung nur ein Indiz auf erfolgenden Elektronentransfer. Daher wurden Strangbruchexperimente mit **BrdU** als Elektronenakzeptor und kinetische Elektronenfälle durchgeführt. Erfolgt der Elektronentransfer von **2PydU** (ED) zu **BrdU** (EA), bricht das belichtete Oligonukleotid an der in 5'-Richtung benachbarten Base des **BrdUs**. Das Verhältnis von intaktem Oligonukleotid zu den, durch den Strangbruch generierten Strangfragmenten gibt Aufschluss über die Effizienz des Strangbruchs. Zur Detektion der Oligonukleotide bzw. Strangfragmente über PAGE wurde bei der automatisierten Festphasensynthese die DNA am 5'-Ende mit Fluoreszein modifiziert (**Fluo**). Bei der 30-minütigen Belichtung der DNA Doppelstränge mit $\lambda = 365$ nm (LED) wurden nach bestimmten Zeiten Aliquote der DNA-Lösung entnommen. Über Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte bei diesen Proben der intakte Ausgangsstrang von den Strangfragmenten separiert werden. Durch das Fluoreszein konnten die Oligonukleotide bei $\lambda = 490 \pm 10$ nm detektiert werden (Kapitel 1.1.1). Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität des intakten Oligonukleotids zu der des Abbruchstrangs (Int-Bkg [%]) kann gegen die Belichtungszeit aufgetragen werden und den Elektronentransfer somit darstellen (Abbildung 16).

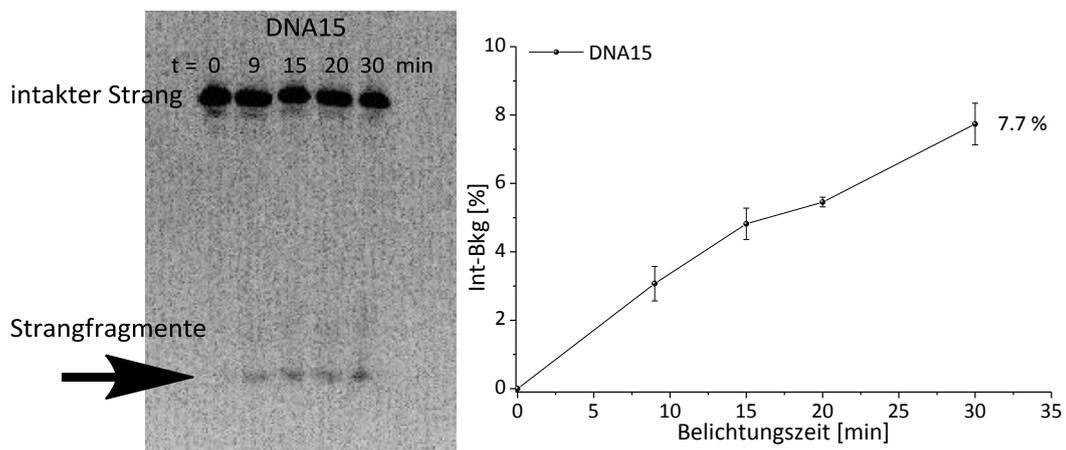


Abbildung 16: links: Polyacrylamid Gel einer doppelsträngigen DNA. Rechts: Datenpunkt = Entnommene Probe nach einer Belichtungszeit von $t = 0, 9, 15, 20, 30$ min, beispielhafte Auftragung des erfolgten Strangbruchs: Prozentualer Anteil der Strangfragmente gegen die Belichtungszeit aufgetragen.

Die in Kapitel 2.2.1 beschriebenen, für den EET interessanten Eigenschaften des 8-Hydroxychinolin-Nukleosids **HQ** sollten im Zuge dieser Arbeit näher untersucht werden. Dazu gehören die Bildung eines artifiziellen Basenpaars **HQ-HQ** sowie die Möglichkeit, Metallionen in der DNA zu komplexieren. Beides sollte Auswirkungen auf den Elektronentransfer haben. In welchem Maße soll im Folgenden diskutiert werden.

Es wurden **2PydU**- (ED), **HQ**- und **BrdU**-Modifikationen (EA) in 5' – 3' Richtung in einen Einzelstrang inkorporiert. Ein weiterer **HQ** Baustein wurde in den komplementären Gegenstrang zur Bildung des **HQ-HQ**-Basenpaares eingebracht (siehe Abbildung 17).

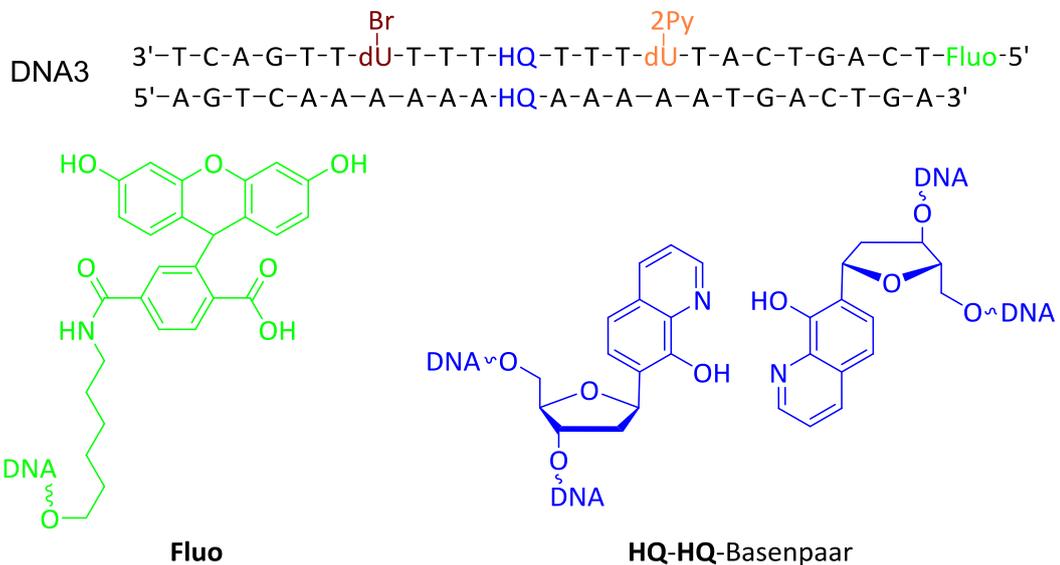


Abbildung 17: Strangdesign zur Untersuchung des EET über HQ-HQ-Basenpaare mit 2PydU als Elektronendonator und BrdU als Elektronenakzeptor (siehe Abbildung 12).

Da es sich in diesem System um reduktiven Elektronentransfer handelt, wurden AT-Basenpaare (AT-BP) zwischen ED und EA platziert, die in variierender Anzahl die Untersuchung der Abstandsabhängigkeit des EETs ermöglichen sollten.

Der in Abbildung 17 dargestellte Doppelstrang **DNA3** zeigt 7 Basenpaare zwischen ED und EA bzw. 3 AT-Basenpaare zwischen ED und **HQ** bzw. **HQ** und EA.

Die Wellenlänge der Anregung ergibt sich aus der Absorption des Elektronendonors **2PydU**. In Abbildung 18 ist die Absorption von **2PydU** und **HQ** in **DNA3** mit Maxima bei $\lambda_{\text{abs}} = 323$ nm und 339 nm sowie die Absorption von **HQ** ohne **2PydU** in **DNA6** (Abbildung 20) mit einer Bande bei $\lambda_{\text{abs}} = 320$ nm dargestellt. Eine selektive Anregung von **2PydU** ist demnach erst ab $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm möglich. Es wurden zwei verschiedene Lichtquellen getestet. Zum einen wurde die Anregung durch eine 200 W Xe/Hg Dampfampe mit einem $\lambda = 345$ nm *cutoff* Filter (WGK345) unter Rühren und Luftkühlung untersucht. Zum anderen wurden die Oligonukleotide mit 75 W LEDs mit einem Anregungsbereich von $\lambda = 365$ nm \pm 10 nm bei definierten 20 °C belichtet. Die Belichtung der Doppelstränge erfolgte in einer Quarkzuvette einmal mit der einen, dann mit der anderen Lichtquelle. Die Lösungen enthielten 1 μ M DNA, 10 eq. EDTA und 250 mM NaCl in 10 mM NaP_i -Puffer. Durch den Vergleich des Strangbruchs beider Belichtungen am Beispiel von **DNA3** ergab sich eine Verbesserung der detektierten Strangbruchfragmente durch die Belichtung mit der 365 nm-LED um das 1.95-fache (Abbildung 18, rechts) im Vergleich zur Xe/Hg-Lampe mit WGK345 nm.

Dies war nicht zu erwarten, da sowohl der Extinktionskoeffizient von **2PydU** als auch die Anregungsintensität der LED im Bereich zwischen $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ und 360 nm sehr gering sind.

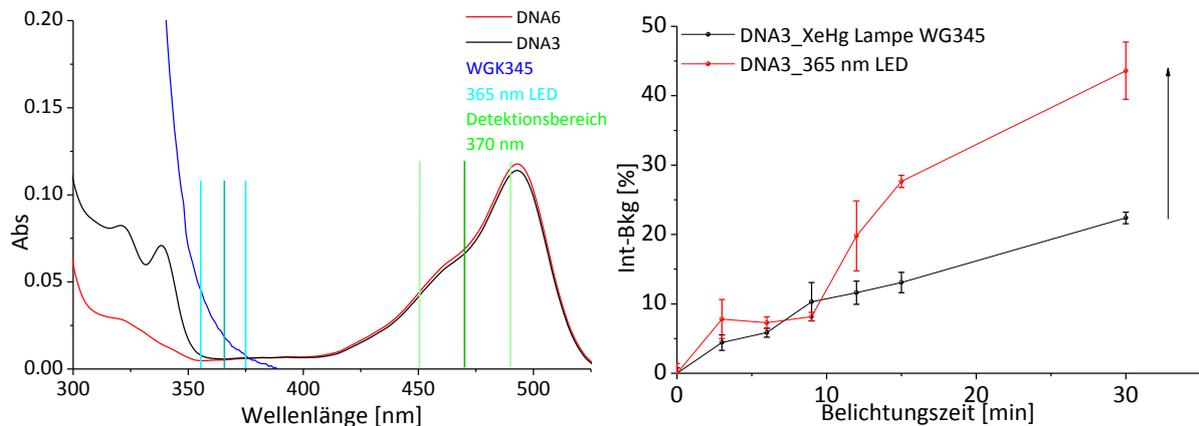


Abbildung 18: Absorptionsspektren der DNA Stränge DNA3 und DNA6 (2.5 μM in 10 mM Na_2P_i -Puffer und 250 mM NaCl), sowie der Wellenlängenbereich der 365 nm LED und die Absorption des WGK345 cutoff Filters. Rechts: Vergleich der Strangbruchmenge bei Belichtung mit Xe/Hg Lampe und WG345 und 365 nm LED.

Da das artifizielle **HQ-HQ**-Basenpaar Übergangsmetallionen komplexieren kann, sollte der EET mit und ohne Zusatz verschiedener Ionen untersucht werden, wobei erwartet wurde, dass durch **HQ-HQ**-Basenpaare der EET effizienter und über größere Distanzen erfolgen kann.

2.2.3 Synthese der Oligonukleotide DNA1-14

Synthese der artifiziellen Basen

Der Elektronenakzeptor 5-Brom-2'-desoxyuridin **BrdU** und die Fluoreszenzsonde 2-(3,6-Di-hydroxy-9H-xanthen-9-yl)-4-((6-hydroxyhexyl)carbamoyl)benzoesäure **Fluo** sind als Bausteine für die automatisierte Festphasensynthese kommerziell erhältlich.

Die Synthese des Elektronendonors 5-(Pyren-2-yl)-2'-desoxyuridin **2PydU** erfolgte bis zum 5'-Dimethoxytrityl (DMTr) geschützten Nukleosid **1** wie in der Literatur beschrieben.^[139] Bei der Reaktion von **1** zum Phosphoramidit-Baustein (PA) **2** wurde die wässrige durch eine säulenchromatographische Aufreinigung ersetzt. Das Reaktionsgemisch wurde nach einer Reaktionszeit von 4 h direkt auf die mit Kieselgel gepackte Chromatographie-Säule gegeben, innerhalb von maximal 10 min eluiert und das Produkt zu 58 % Ausbeute erhalten. Dadurch konnte die für die Reaktion benötigte Base Diisopropylethylamin (DIPEA) vollständig abgetrennt werden, was zu einer Verbesserung der Einbaueffizienz führt, da im Kupplungsschritt der automatisierten Festphasensynthese das benötigte Reagenz Tetrazol nicht durch basische Reste zersetzt wird.

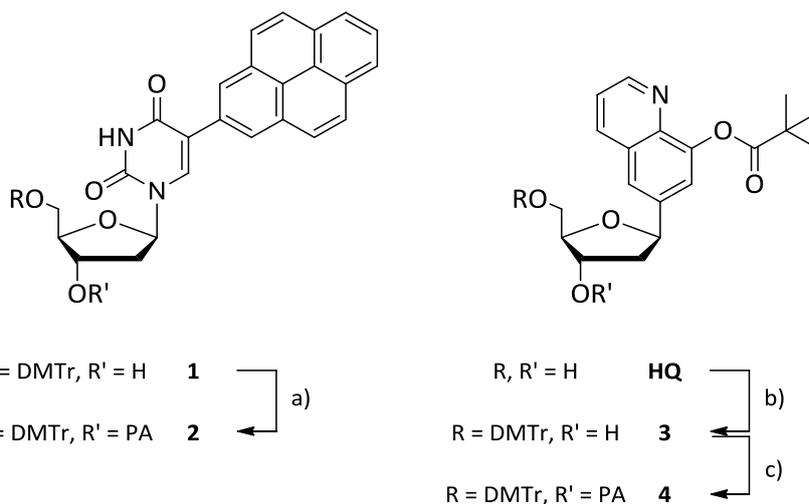


Abbildung 19: Synthese des 2PydU und HQ-Bausteins a) PA-Cl, DIPEA, DCM, 4 h, 58 % b) DMTr-Cl, Pyridin, 30 °C ü. N., 56 % c) PA-Cl, DIPEA, DCM, 2 h, 98 %.

Die Synthese des pivaloylgeschützten 8-Hydroxychinolin-C-Nukleosids **HQ** erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[135] Die DMTr-Schätzung an der 5'-Hydroxylgruppe der Riboseeinheit erfolgte mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) in abs. Pyridin über Nacht bei 30 °C in einer Ausbeute von 56 %. Die anschließende Phosphoramidit Reaktion wurde in abs. DCM mit DIPEA und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (PA-Cl) in 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung, wie für **2** beschrieben, wurde durchgeführt und der **HQ**-Baustein **4** mit 98 % Ausbeute erhalten (Abbildung 19). Die geringe Ausbeute von **2** im Vergleich zu **4** liegt an der unvollständigen Elution. **2** verblieb länger auf der stationären Phase als **4**, was zu einer Bandenverbreiterung und damit unvollständigen Elution des Phosphoramidits **2** führte.

Synthese der modifizierten Oligonukleotide

Die synthetisierten und gekauften DNA-Bausteine wurden für eine 0.1 M Lösung in absolutem Acetonitril aufgenommen. Die Kupplungsprotokolle der natürlichen Nucleobasen wurden für die artifizialen Bausteine in der Kupplungsdauer und der Menge der Phosphoramidit-Lösung geändert. Es wurden 144 µL 0.1 M **2PydU**-PA Lösung in 3.4 min, 128 µL **HQ**-PA Lösung in 20 min, 144 µL **BrdU**-PA Lösung in 2.8 min und 144 µL **Fluo**-PA Lösung in 5.1 min über das CPG gepumpt. Bei Oligonukleotiden mit einer Fluoreszein-Modifikation wurde der letzte Entschützungs-schritt wegen der nicht vorhandenen DMTr-Gruppe am **Fluo**-Baustein im Protokoll entfernt. Mit diesen veränderten Mengen konnten unterschiedlich gute Ausbeuten zwischen 7 und 37 % an zwei- bis sechsfach modifizierten Oligonukleotiden erreicht werden.

Für die Untersuchungen der Stabilität der DNA Duplexe wurden ihre Schmelztemperaturen T_m durch eine Änderung der Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ zwischen $10 - 90 \text{ °C}$ aufgenommen.

Die Schmelztemperaturen von **DNA1-3** liegen zwischen 57.3 °C und 58.4 °C , was zeigt, dass keine signifikante Stabilisierung oder Destabilisierung durch die unterschiedlichen Distanzen zwischen den Modifikationen stattfindet. Wird **DNA8** mit **DNA1** verglichen, kann eine leichte Destabilisierung des Duplexes durch das **HQ-HQ**-Basenpaar von 3.1 K gezeigt werden. Befindet sich nur eine **HQ**-Modifikation im Gegenstrang, wie bei **DNA7**, tritt diese Destabilisierung nicht auf.

Werden Übergangsmetallionen quadratisch planar im **HQ**-Basenpaar komplexiert, sollte sich die Schmelztemperatur erhöhen.^[133] Durch die Zugabe von 1.1 eq. CuCl_2 vor der Hybridisierung der Einzelstränge sollte dies bei **DNA1-3** überprüft werden. Die Schmelztemperaturen aller drei Duplexe steigen durch die Ausbildung des **HQ₂Cu^{II}**-Komplexes, jedoch nicht in gleichem Maße. Je größer die Distanz zwischen dem Komplex und der ED-, bzw. der EA-Modifikation wird, desto stärker wird der Duplex stabilisiert. So kann mit 3 AT-Basenpaaren zwischen ED bzw. EA und **HQ** bei **DNA3** die höchste Stabilisierung mit $+15.8 \text{ K}$ durch die Zugabe von Cu^{2+} -Ionen erreicht werden (Tabelle 2). Die Gründe hierfür werden in Zuge der spektroskopischen Charakterisierung noch erläutert.

Neben Cu^{2+} -Ionen sollten auch noch zwei weitere Metallionen im **HQ**-Komplex untersucht werden. Es wurde das d^8 -Übergangsmetallion Ni^{2+} eingesetzt, welches mit der Koordinationszahl $\text{KoZ} = 4$ ebenfalls quadratisch planare Komplexe ausbilden kann, sowie Fe^{3+} , welches mit $\text{KoZ} = 4$ eigentlich tetraedrische Komplexe ausbildet, und damit fraglich ist, ob der **HQ**-Komplex gebildet werden kann. Die Reduktionspotentiale von Cu^{2+} , Ni^{2+} und Fe^{3+} liegen bei $E_{\text{Red}} = +0.16 \text{ V}$, $+0.26 \text{ V}$ und $+0.77 \text{ V}$.^[140] Werden diese Ionen nun in **DNA3** inkorporiert, wird ersichtlich, dass der **HQ**-Komplex mit Ni^{2+} -Ionen den Doppelstrang zwar stabilisiert, aber mit $+8.6 \text{ K}$ nur wesentlich geringer als **HQ₂Cu^{II}**. Auch die Fe^{3+} -Ionen stabilisieren den Duplex mit $+6.2 \text{ K}$ nur gering.

Der Einfluss des Elektronendonors **2PydU** wird im Vergleich der Schmelztemperaturen von **DNA1** und **DNA4** bzw. **DNA3** und **DNA6** ersichtlich. Bei einer Distanz von nur einem AT-Basenpaar (AT-BP) ist die Destabilisierung des Duplexes aufgrund des Donors mit -2.4 K nur sehr gering, wobei durch eine größere Distanz von 3 AT-BP diese um das 1.5-fache auf -3.7 K steigt.

Um den **HQ₂M** Komplex spektroskopisch untersuchen zu können, wurden ebenfalls Cu^{2+} , Ni^{2+} und Fe^{3+} in die DNA eingeführt. Hierfür wurde **DNA4** genutzt, da die Extinktion der **HQ**-Modifikation energetisch der des ED ähnelt und daher in **DNA1** nur eine überlagerte Absorption gemessen werden könnte.

Der Schmelztemperaturunterschied von **DNA4** in Ab- und Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen zeigt mit +27.0 K eine sehr starke Stabilisierung des Doppelstrangs. Der $\text{HQ}_2\text{Ni}^{\text{II}}$ -Komplex stabilisiert noch um +7.8 K, wohingegen der Duplex mit Fe^{3+} nur noch um +2.8 K stabilisiert wird. Diese Tendenz zeigt sich in sehr ähnlichen Werten auch bei einer Distanz von 3 AT-BP zwischen **HQ** und EA in **DNA6**.

Tabelle 2: Schmelztemperaturen von 2.5 μM DNA1-3, 4,6-8 mit 10 eq. EDTA oder 1.1 eq. Cu^{2+} -, Ni^{2+} -, Fe^{3+} -Ionen.

DNA Doppelstrang	T_m [°C]	DNA Doppelstrang	T_m [°C]	ΔT_m [K]
DNA1(HQH)	58.4	DNA1_ Cu^{2+}	65.7	+7.3
DNA2	57.3	DNA2_ Cu^{2+}	68.3	+11.0
DNA3	57.4	DNA3_ Cu^{2+}	73.2	+15.8
		DNA3_ Ni^{2+}	63.6	+8.6
		DNA3_ Fe^{3+}	63.6	+6.2
DNA7(AHQ)	58.6			
DNA8(AT)	61.5			
DNA4	60.8	DNA4_ Cu^{2+}	87.8	+27.0
		DNA4_ Ni^{2+}	68.6	+7.8
		DNA4_ Fe^{3+}	63.6	+2.8
DNA6	61.1	DNA6_ Cu^{2+}	82.2	+21.1
		DNA6_ Ni^{2+}	68.8	+7.7
		DNA6_ Fe^{3+}	64.1	+3.0

Um die Auswirkungen des **HQ-HQ**-Basenpaares auf die Distanz des Elektronentransfers zu untersuchen, wurden Oligonukleotide mit mehreren **HQ**-Modifikationen synthetisiert. Da die beste Stabilisierung der DNA durch $\text{HQ}_2\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexe mit einem Abstand von 3 AT-Basenpaaren erfolgte, wurde dieser Abstand übernommen. Für **DNA9** wurde die Sequenz zwischen ED und EA um eine Einheit, bestehend aus 3 Thyminen und einer **HQ**-Modifikation, erweitert. Für **DNA10** wurden zwei dieser Einheiten in das Oligonukleotid eingebaut. Damit bewiesen werden kann, dass die Strangbrucheffizienz durch die **HQ**-Modifikationen erhöht wird, wurden ebenfalls Oligonukleotide ohne diese Modifikation synthetisiert (**DNA11-13**). Um zu überprüfen, ob Nebenreaktionen bei der

Belichtung von **DNA3** die Detektion des EETs beeinflussen, wurde auch ein Oligonukleotid ohne **BrdU** synthetisiert (**DNA14**, siehe Abbildung 21).

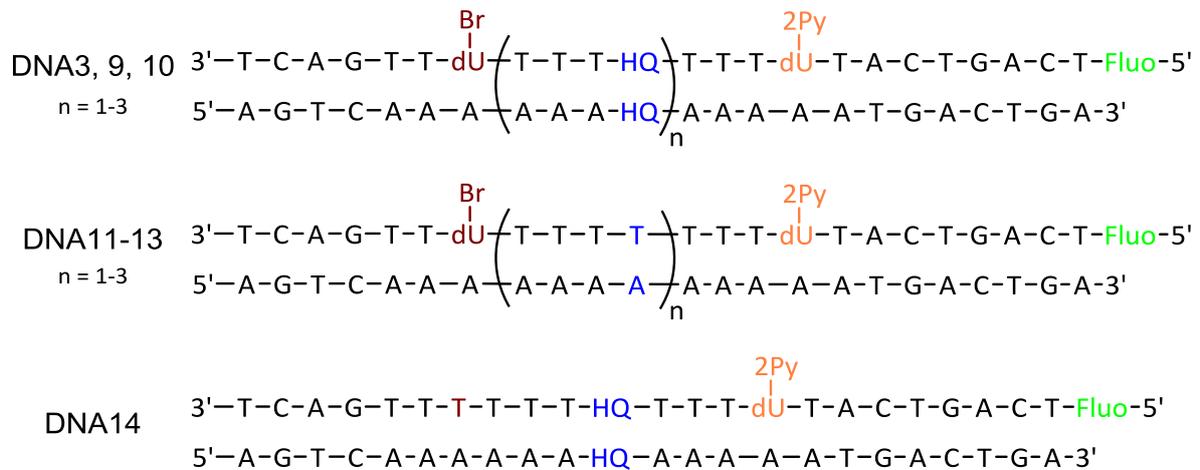


Abbildung 21: Strangdesign der Duplexe DNA9-14.

Beim Vergleich von **DNA11** mit **DNA3** wird der Einfluss des **HQ-HQ**-Basenpaars mit einer Destabilisierung von ca. -3 K bestätigt. Steigt die Anzahl der **HQ-HQ**-Basenpaare im Duplex, erhöht sich auch die Destabilisierung. Mit 2 Modifikationen ist **DNA9** um -7.4 K destabilisiert. Kommt eine dritte hinzu sinkt der Wert weiter auf -10.6 K (Tabelle 3).

Der Einfluss der **BrdU**-Modifikation auf den Duplex zeigt sich anhand des Vergleichs der Schmelztemperatur von **DNA3** und **DNA14**. Da es sich bei **BrdU** um eine natürliche Base mit einem Bromsubstituenten in 5-Position handelt, wird die Watson-Crick Basenpaarung des 2'-Desoxyuridins nicht gestört. Daher fällt auch die Destabilisierung des Doppelstrangs mit -1 K sehr gering aus (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Schmelztemperaturen von 2.5 µM DNA11-14 mit 10 eq. EDTA.

DNA Doppelstrang	T _m [°C]	DNA Doppelstrang	T _m [°C]	ΔT _m [K]
DNA11	60.3	DNA3	57.4	-2.9
DNA12	62.7	DNA9	55.3	-7.4
DNA13	64.3	DNA10	53.7	-10.6
DNA14	56.4			

Spektroskopische Charakterisierung

Das Absorptionsspektrum von **DNA1-3** und **DNA7** in Abbildung 22 links zeigt die Absorptionsmaxima der kanonischen Nukleobasen bei $\lambda_{\text{abs}} = 230 \text{ nm}$ und 260 nm sowie die Absorption der Fluoreszein-Modifikation zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 410 \text{ nm}$ und 525 nm mit einem Maximum bei $\lambda_{\text{abs}} = 493 \text{ nm}$. Bei der Absorption des **2PydU** Bausteins zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 300 \text{ nm}$ und 360 nm fällt auf, dass die Maxima des Elektronendonors je nach Distanz zur **HQ**-Modifikation in der Absorptionswellenlänge variieren. Liegt nur ein AT-BP zwischen den Modifikationen sind die Maxima um 6 nm bathochrom verschoben. Diese Unregelmäßigkeit wurde von *Wagenknecht et al.* schon beobachtet und mit der Wechselwirkung der **2PydU**-Modifikation mit deren Umgebung begründet. So liegt das Maximum des $S_0 - S_2$ Übergangs von **2PydU** in Nachbarschaft von Thyminen und Adenosin-Gegenbasen bei $\lambda_{\text{abs}} = 339 \text{ nm}$. Befinden sich jedoch Guanosine oder Cytidine in direkter Nachbarschaft, wird das Maximum zu $\lambda_{\text{abs}} = 345 \text{ nm}$ hin bathochrom verschoben.^[141]

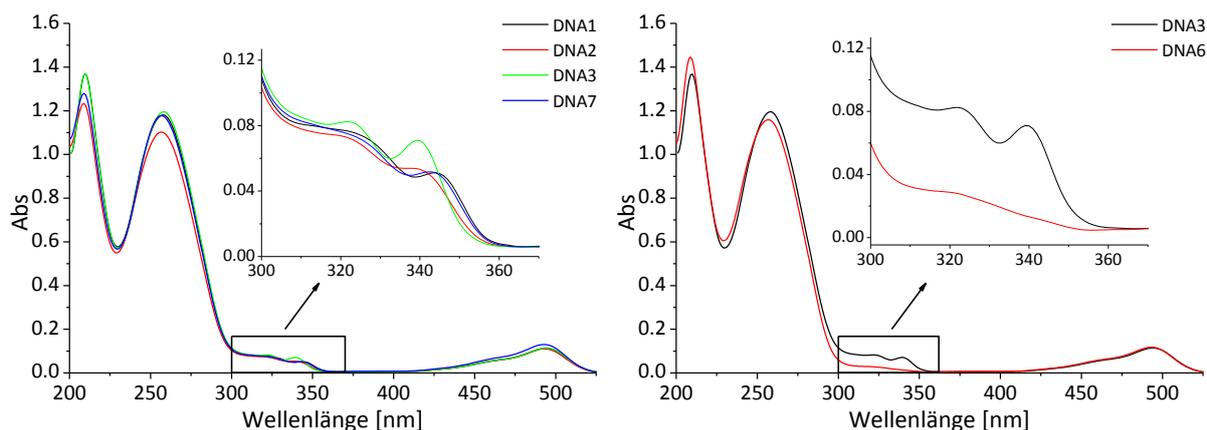


Abbildung 22: Absorptionsspektren von DNA1-3, 6 und 7, $2,5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA .

Diese Verschiebung ist auch bei **DNA1-3** zu beobachten. Je größer die Distanz zwischen **HQ** und dem Elektronendonor wird, desto weiter verschiebt sich das $\lambda_{\text{abs}} = 345 \text{ nm}$ Maximum hin zum Maximum bei $\lambda_{\text{abs}} = 339 \text{ nm}$. Dies lässt auf schwächer werdende Wechselwirkungen der **2PydU**-Modifikation mit **HQ** schließen. Erst ab einer Distanz von 3 AT-Basenpaaren zwischen den beiden Modifikationen kann von getrennten Systemen ausgegangen werden. Sogar mit nur einer **HQ**-Modifikation im Gegenstrang treten diese Wechselwirkungen auf, was durch den Vergleich der Absorptionsspektren von **DNA1** mit **DNA7** durch ein Maximum bei $\lambda_{\text{abs}} = 345 \text{ nm}$ gezeigt werden kann.

Diese Tatsache wird noch von den Untersuchungen der Schmelztemperaturen gestützt: Wechselwirken **2PydU** und **HQ** distanzabhängig miteinander, wird auch die Koordinationsfähigkeit des **HQ-HQ**-Basenpaars beeinflusst. Somit kann erst mit schwächer werdendem Einfluss der **2PydU**-Modifikation (zunehmende Distanz) das **HQ-HQ**-Basenpaar Komplexe mit Übergangsmetallionen eingehen. Dies zeigt sich in der ansteigenden Stabilisierung des entstehenden **HQ₂Cu^{II}**-Komplexes von nur +7.3 K bei **DNA1** über +11 K bei **DNA2** hin zu +15.8 K von **DNA3** (Tabelle 2). Auch der Vergleich der Schmelztemperatur von **DNA1** mit **DNA4**, jeweils mit **Cu²⁺**-Ionen, zeigt, dass in Abwesenheit von **2PydU** die Ionen besser koordiniert werden und damit eine bessere Stabilisierung des Doppelstrangs erfolgt (**DNA1_Cu²⁺**: +7.3 °C <-> **DNA4_Cu²⁺**: +27 °C). Die Absorptionsbande des **HQ-HQ**-Basenpaars konnte mit **DNA6** in Abbildung 22 (rechts) zu $\lambda_{\text{abs}} = 320$ nm bestimmt werden.

Um den Einfluss der Übergangsmetallionen im **HQ-HQ**-Basenpaar zu untersuchen, wurden Absorptionsspektren von **DNA4_M** mit jeweils 1.1 eq. **CuCl₂** (**DNA4_Cu²⁺**), **NiCl₂** (**DNA4_Ni²⁺**) oder **FeCl₃** (**DNA4_Fe³⁺**) aufgenommen und mit der Referenz **DNA4** (mit 10 eq. EDTA) verglichen. In Abbildung 23 links ist die Absorptionsbande des **HQ₂Cu^{II}**-Komplexes zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 350$ nm und 450 nm zu erkennen, was die Komplexierung der Kupfer(II) Spezies zeigt. Die Absorption von **DNA4** ändert sich bei der Zugabe von **Ni²⁺** oder **Fe³⁺** jedoch nicht, was darauf hindeutet, dass die Metalle nicht vollständig komplexiert vorliegen.

Die Absorptionsspektren von **DNA9-14** in Abbildung 23 rechts zeigen ab einer Distanz von 3 AT-BP (**DNA9** und **10, 14**) oder ohne **HQ**-Modifikation (**DNA11-13**) die fehlende Wechselwirkung von **2PydU** mit **HQ** durch eine Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 339$ nm.

Auffällig sind die ins hypsochrome verbreiterten Absorptionsmaxima der Duplexe bei $\lambda_{\text{abs}} = 260$ nm. Da dieses Phänomen bei **DNA9** und **DNA10** mit 2 und 3 **HQ**-Modifikationen auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass der **S₀-S₁** Übergang der **HQ**-Modifikation die Extinktion der modifizierten DNA in diesem Bereich verschiebt.

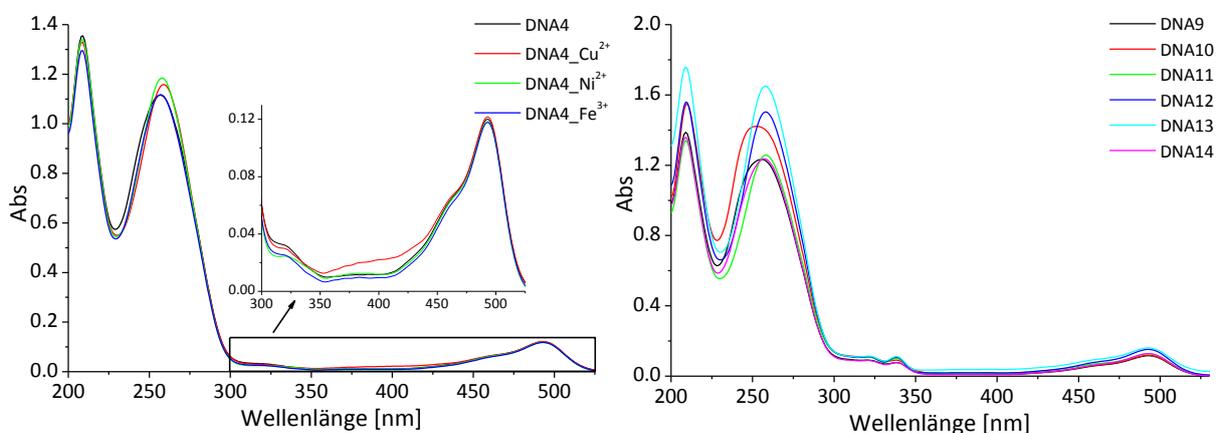


Abbildung 23: Absorptionsspektrum von 2.5 μM DNA; links: **DNA4** mit jeweils 10 eq. EDTA, 1.1 eq. **Cu²⁺**, 1.1 eq. **Ni²⁺** oder 1.1 eq. **Fe³⁺**; rechts: Duplexe mit 2 und 3 **HQ**-Modifikationen **DNA9** und **DNA10**, unmodifizierte Duplexe **DNA11-13** und den Doppelstrang **DNA14** ohne **BrdU**-Modifikation.

2.2.5 Ergebnisse der Belichtungen

Um den photoinduzierten Elektronentransfer von **2PydU** über das **HQ-HQ**-Basenpaar zu **BrdU** zu verfolgen, wurden Strangbruchexperimente mit den in Kapitel 2.2.2 besprochenen Oligonukleotiden durchgeführt. Dazu wurde, wenn nicht anders beschrieben, eine 1 μM Lösung der beiden DNA Einzelstränge mit entweder 10 eq. EDTA, 1.1 eq. Cu^{2+} , 1.1 eq. Ni^{2+} oder 1.1 eq. Fe^{3+} in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl hybridisiert. Anschließend wurden die Proben über 30 min mit einer $\lambda = 365$ nm LED belichtet. Nach bestimmten Zeitabständen wurden 20 μL der Lösung entnommen und mit jeweils 20 μL einer 20 % Piperidinlösung für 30 min bei 90 °C erhitzt, wobei der induzierte Strangbruch an der in 5'-benachbarten Base zum **BrdU** stattfinden sollte. Die Proben wurden getrocknet, im Ladepuffer aufgenommen und über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) getrennt. Die Fluoreszenzintensität des intakten Oligonukleotids wurde zu der, der gebrochenen Oligonukleotide ins Verhältnis gesetzt. Durch diesen prozentualen Strangbruch wird der untersuchte Elektronentransfer angezeigt.

In Abbildung 24 links ist dieser Strangbruch für die Belichtungen von **DNA1-3** aufgezeigt. Wie erwartet, zeigt der erfolgte Strangbruch eine gewisse Distanzabhängigkeit. Während **DNA1** mit einem Abstand von 3 Basenpaaren zwischen Elektronendonator und -akzeptor (THQT) einen Strangbruch von 56.3 % aufweist, liegt der von **DNA2** (5 Basenpaare TTHQTT) mit 42.2 % darunter. Bei **DNA3** mit einer Distanz von 7 Basenpaaren (TTTHQTTT) verringert sich die Strangbruchmenge noch einmal auf 33.1 %. Auffällig ist, dass ohne Belichtung bei $t = 0$ min schon induzierte Strangbrüche zu ca. 10 % auftreten. Dies wird später noch thematisiert (Ende von Kapitel 2.2.5).

Um nun zu untersuchen, ob der Elektronentransfer von **2PydU** über den $\text{HQ}_2\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplex zum **BrdU** effektiver verläuft als nur über das **HQ-HQ**-Basenpaar, wurde die Strangbrucheffizienz von **DNA3** mit der von **DNA3_Cu²⁺** verglichen. In Abbildung 24 rechts ist jedoch zu sehen, dass die Belichtungsdauer bei **DNA3_Cu²⁺** keinerlei Auswirkungen auf die Menge des induzierten Strangbruchs hat. Sogar vor der Belichtung treten Strangbrüche zu ca. 55 % auf. Durch die hohe und durch weitere Belichtung unveränderte Strangbruch Menge kann kein Elektronentransfer detektiert werden. Es liegt nahe, dass durch die Bildung des Komplexes in **DNA3_Cu²⁺** eine piperidinlabile Stelle in der DNA entsteht, die bei der Behandlung der Proben zu einer Zersetzung des Oligonukleotids führt. Der Grund für den fehlenden Anstieg mit andauernder Belichtung kann im Potential des Komplexes liegen. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, senkt die Komplexierung des Kupferions das Potential der **HQ**-Modifikation ($E_{\text{Red}}^{\text{HQ}} = -1.0$ V, $E_{\text{Red}}^{\text{HQ}_2\text{Cu}^{\text{II}}} = -0.28$ V), was eine Veränderung der Triebkraft des EET-Systems bedeutet. Diese Veränderung könnte den photoinduzierten Elektronentransfer zum Erliegen bringen.

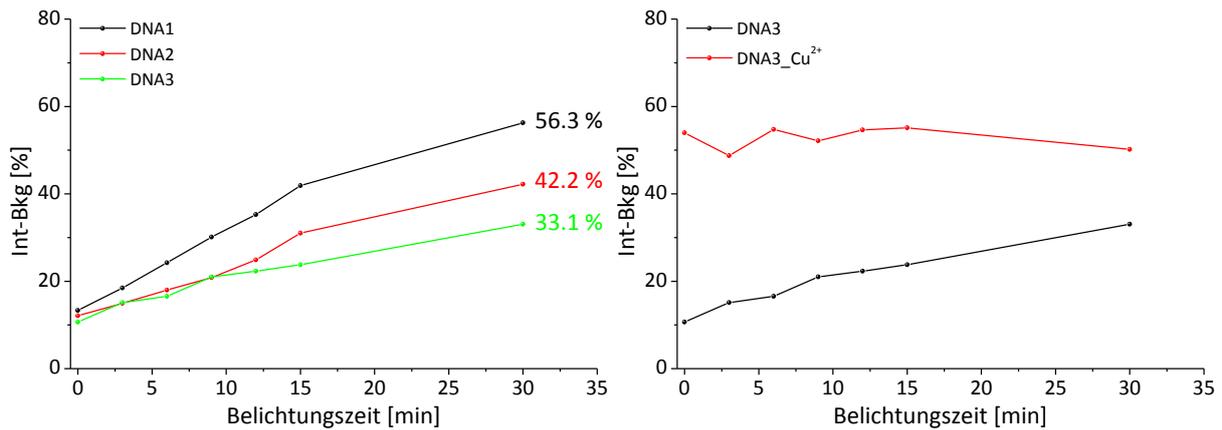


Abbildung 24: Strangbruchexperimente mit DNA1-3 (links) und rechts: DNA3 jeweils mit 10 eq. EDTA oder 1.1 eq. Cu²⁺-Ionen (Xe Lampe, WGK345, 10*10cm Gelkammer).

Es wurde daher überprüft ob nur der **HQ₂Cu²⁺** Komplex die Detektion des Elektronentransfers unterbindet. Dazu sollten Untersuchungen zu Ni²⁺- und Fe³⁺-Ionen im **HQ₂M**-Komplex unternommen werden.

In Abbildung 25 links sind die Strangbruchexperimente von **DNA3_M** mit unterschiedlichen Ionen im Vergleich zu **DNA3** dargestellt. Anhand der mit andauernder Belichtungszeit steigenden Menge an Strangbrüchen wird ersichtlich, dass sowohl Ni²⁺ als auch Fe³⁺ im **HQ-HQ**-Basenpaar den Strangbruch im Vergleich zu **DNA3** erhöhen. Der Wert der unbelichteten Probe bleibt bei ca. 10 % wie bei **DNA3**.

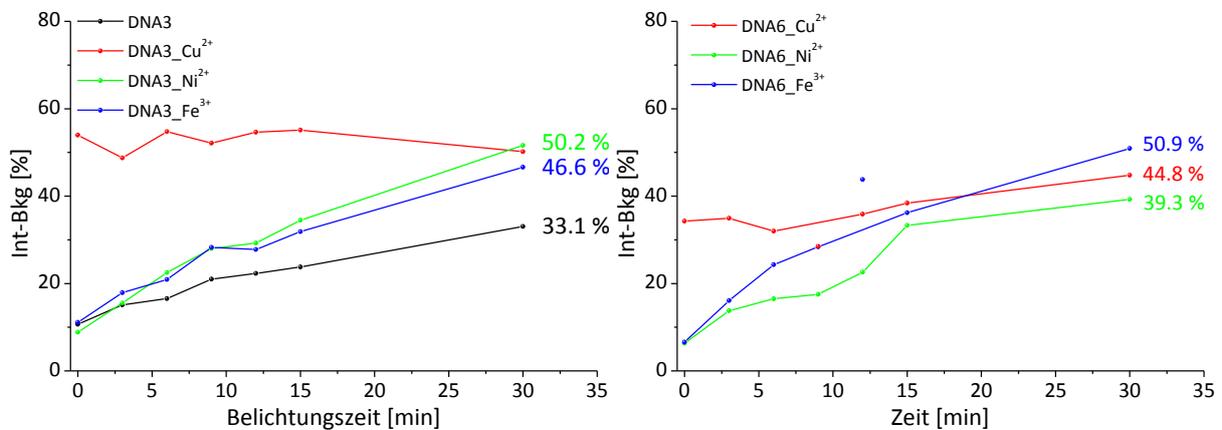


Abbildung 25: Strangbruchexperimente mit DNA3, sowie DNA6 mit Zusatz von 10 eq. EDTA oder 1.1 eq. Cu²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺-Ionen (Xe-Hq Lampe, WGK345, 10*10cm Gelkammer).

Es konnte gezeigt werden, dass der Nickel-Komplex mit 50.2 % effektiver Strangbrüche hervorruft als der Komplex der Fe³⁺-Ionen. Dies ist vereinbar mit den Schmelztemperaturunterschieden der beiden Duplexe (Tabelle 2), da dessen Stabilisierung besser durch Ni²⁺ als durch Fe³⁺ erfolgte.

Um sicher zu stellen, dass die detektierten Strangbrüche von photoinduziertem Elektronentransfer herrühren, wurde **DNA6** mit den drei unterschiedlichen Ionen belichtet. Hierbei sollten keine Strangbrüche induziert werden, da das Fehlen des Elektronendonors eine Elektronenmigration unmöglich machen sollte. Stattdessen zeigte sich jedoch, wie in Abbildung 25 rechts dargestellt, dass selbst ohne Elektronendonator Strangbrüche durch fortdauernde Belichtung induziert werden.

Bei der Bildung eines $\text{HQ}_2\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes bricht **DNA6_Cu²⁺** schon ohne Belichtung zu ca. 35 % wie bei **DNA3_Cu²⁺**. Der Vergleich von **DNA6_Fe³⁺** mit **DNA6_Ni²⁺** zeigt (im Gegensatz zu Abbildung 25 links) eine Verbesserung der Strangbruchmenge von Fe³⁺ (50.9 %) zu Ni²⁺ (39.3 %). Da jedoch überhaupt Strangbrüche bei der Belichtung von **DNA6** mit Metallionen detektiert werden können, wird deutlich, dass das System **2PydU/HQ₂M/BrdU** durch unselektive Strangbrüche nicht zur einwandfreien Detektion eines EET dienen kann. Wodurch diese Strangbrüche induziert werden, wird ebenfalls später diskutiert (Ende Kapitel 2.2.5).

Zwar kann in diesem System der EET durch die DNA nicht von einem Übergangsmetallionenvermittelten Basenpaar verbessert werden, jedoch ist generell der Einfluss dieses artifiziellen Basenpaars auf den EET von großem Interesse.

Es sollte daher untersucht werden, ob **HQ-HQ**-Basenpaare in der Lage sind, das Überschusselektron auch weiter als natürliche Basenpaare transportieren zu können. Dazu wurden **DNA9** mit 2 **HQ**-Modifikationen und **DNA10** mit 3 **HQ**-Modifikationen im Einzelstrang belichtet und mit den entsprechenden Oligonukleotiden ohne **HQ**-Modifikation **DNA12** und **DNA13** in Abbildung 26 dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der durch Photoanregung erfolgenden Strangbrüche zu erreichen, wurden diese Messwerte um den immer anfallenden Anfangswert korrigiert.

Bei der Belichtung von **DNA9** und **DNA10** werden im Bereich des Messfehlers gleiche Mengen an Strangbrüchen wie bei **DNA3** generiert. Der Vergleich mit **DNA11-13** zeigt den immensen Einfluss der **HQ**-Modifikation auf die Strangbrücheffizienz.

Ohne **HQ** findet so gut wie kein Strangbruch mehr statt (< 1.6 %), wohingegen in **DNA3**, **9** und **10** Strangbrüche von 40 % ± 1 % entstehen. Ungewöhnlich ist jedoch, dass keinerlei Distanzabhängigkeit der Strangbrüche gezeigt werden konnte. Der Grund hierfür wird ebenfalls später noch diskutiert (Ende Kapitel 2.2.5).

In der rechten Darstellung der Strangbruchexperimente in Abbildung 26 sind die Belichtungen der Oligonukleotide **DNA6** und **DNA14** dargestellt. Bei diesen Doppelsträngen ohne die **2PydU**-Modifikation bzw. **BrdU**-Modifikation dürfte kein, durch photoinduzierten EET generierter Strangbruch stattfinden. Mit einer Strangbrücheffizienz von 17.8 % bei **DNA6** ohne **2PydU** und einer noch weiter erhöhten Effizienz von 31.4 % ohne das eigentliche Strangbruchinstrument **BrdU**, stellt sich die Frage, wodurch und an welcher Stelle die synthetisierten Oligonukleotide brechen können. Da **DNA11** keine nennenswerten Strangbrüche aufweist, muss die Antwort mit der **HQ**-Modifikation zusammenhängen.

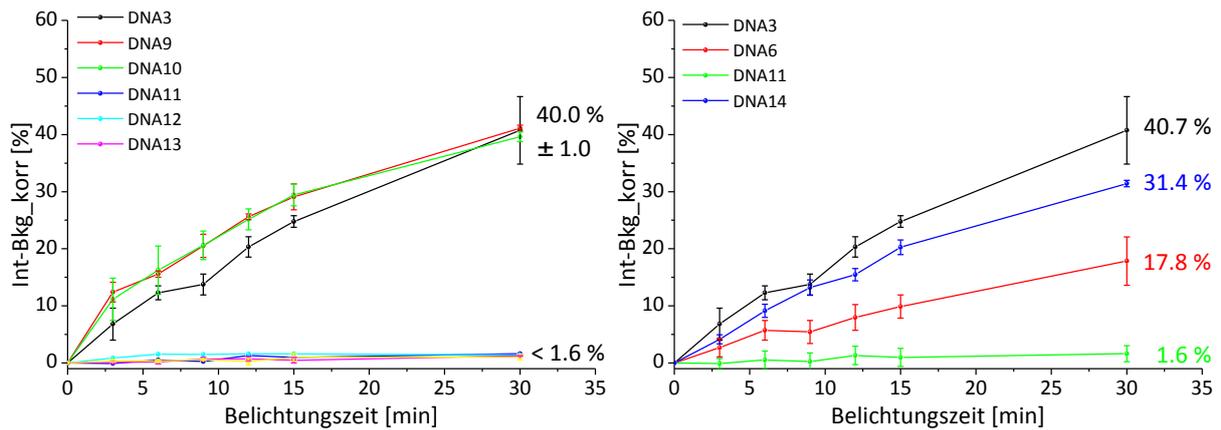


Abbildung 26: Strangbruchexperimente DNA3, 6, 11-14 gegen den Strangbruchwert bei $t = 0$ min Belichtung korrigiert.

Wurden **DNA3**, **DNA9** und **DNA10** ohne die in Abbildung 26 vorgenommene Korrektur dargestellt (Abbildung 27) konnte ein Zusammenhang des Strangbruchwertes ohne Belichtung ($t = 0$ min) mit der Anzahl der **HQ**-Modifikationen gezeigt werden. In **DNA3** (1**HQ**) liegt dieser Wert bei ca. 10 %, mit zwei und drei **HQ**-Modifikationen bei ca. 20 % und ca. 30 %.

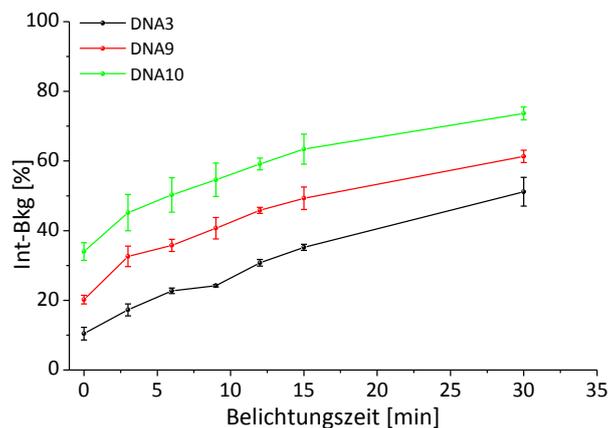


Abbildung 27: Strangbruchexperimente von DNA3, 9 und 10 ohne Korrektur.

Die Analyse der erfolgten Strangbrüche wurde über eine längere Laufzeit der denaturierenden PAGE (bessere Auftrennung der Strangfragmente) verbessert, um nachzuvollziehen, an welcher Stelle der Sequenz der Strangbruch tatsächlich stattfindet.

Auffällig bei der Betrachtung des Gels von **DNA3**, **9** und **DNA10** ist die steigende Anzahl an Strangbruchfragmenten mit der gleichfalls zunehmenden Anzahl an **HQ**-Modifikationen. Die Summe aller Strangfragment Fluoreszenzintensitäten ergibt den in Abbildung 26 links dargestellten, distanzunabhängigen Wert von $40 \% \pm 1 \%$. Werden sie jedoch separiert voneinander aufgetragen, zeigt sich, dass bei **DNA3**, **9** und **DNA10** nur an einer Stelle ein effektiver, photoinduzierter Strangbruch stattfindet (Abbildung 28, alle Spektren, grün, Strangbruchfragment 3, SF3). Würde bei der Belichtung der Strangbruch tatsächlich am dafür vorgesehenen **BrdU** stattfinden, wären die dadurch entstehenden Fragmente bei **DNA3**, **9** und **DNA10** unterschiedlich lang, was auf dem Polyacrylamid Gel durch unterschiedliche Retentionen zu sehen wäre.

Jedoch ist die Retention der photoinduzierten Fragmente von **DNA3**, **DNA9** und **DNA10** gleich, was auf eine gemeinsame Bruchstelle in der Sequenz hindeutet und damit nicht auf **BrdU**.

Auch die Bildung von Strangbruchfragment 1 (SF1), welches während der Belichtung von **DNA9** und **DNA10** ebenfalls leicht ansteigt, wird in Abbildung 28 dargestellt. Sämtliche anderen generierten Strangbruchfragmente (SF2, 4-10) zeigen keine Steigerung des Strangbruchs während der Belichtung und sind meistens schon vor der Belichtung, wahrscheinlich durch den Einfluss des Piperidins, zu sehen.

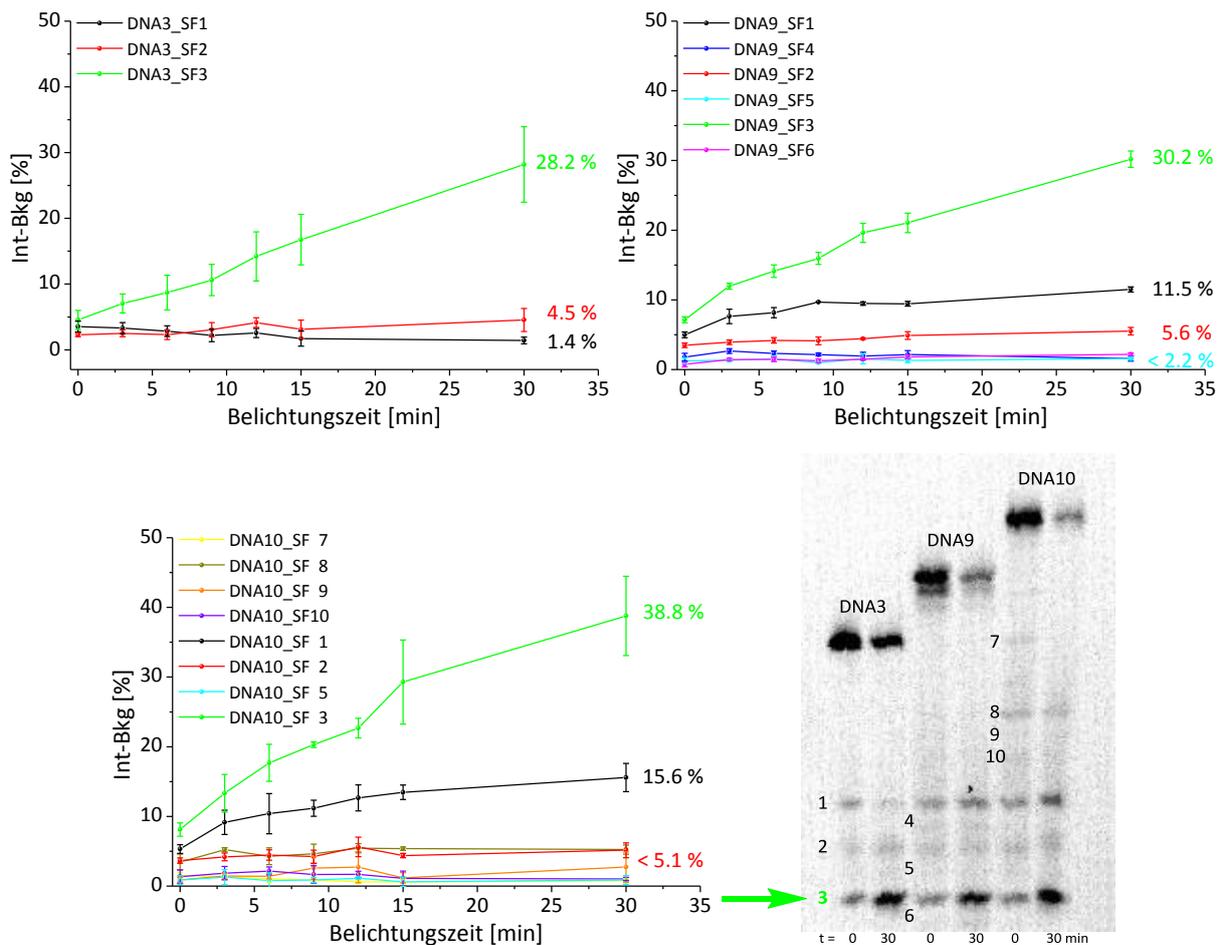


Abbildung 28: Strangbrüche von **DNA3**, **DNA9**, und **DNA10** separiert aufgetragen, sowie ein Polyacrylamid Gel der Belichtungen mit erklärender Beschriftung.

Um herauszufinden, um welches Strangfragment es sich bei SF3 handelt, wurden kommerziell erhältliche, Fluoreszein markierte DNA Fragmente (F) als Komigrationsstandard genutzt. Dazu wurden Proben von **DNA3**, **DNA9** und **DNA10** jeweils unbelichtet und nach 30 min Belichtungszeit in die Taschen des Polyacrylamid Gels gegeben, sowie die in Abbildung 29 dargestellten DNA Fragmente F1, F2, F3 und F4. Die Fragmente F3 und F4 stellen das Strangbruchfragment des **BrdU**-induzierten Strangbruchs dar, das Fragment F2 den Strangbruch der **HQ**-Modifikation am 5'-benachbarten Thymidin dar und das Fragment F1 den Strangbruch bei **2PydU** am Thymidin in 3'-Richtung.

Durch die spezifische Retention der DNA-Fragmente im Vergleich zu den Strangbruch-fragmenten kann die Position des photoinduzierten Strangbruchs ermittelt werden. Vergleiche der getrennten Fragmente auf dem Gel zeigen, dass der photoinduzierte Strangbruch mit der Retention von Fragment F1 übereinstimmt (Abbildung 29, Pfeil). Dies zeigt eindeutig, dass der Hauptanteil des photoinduzierten Strangbruchs nicht an der **BrdU**-Modifikation stattfindet, sondern am **HQ-HQ**-Basenpaar.

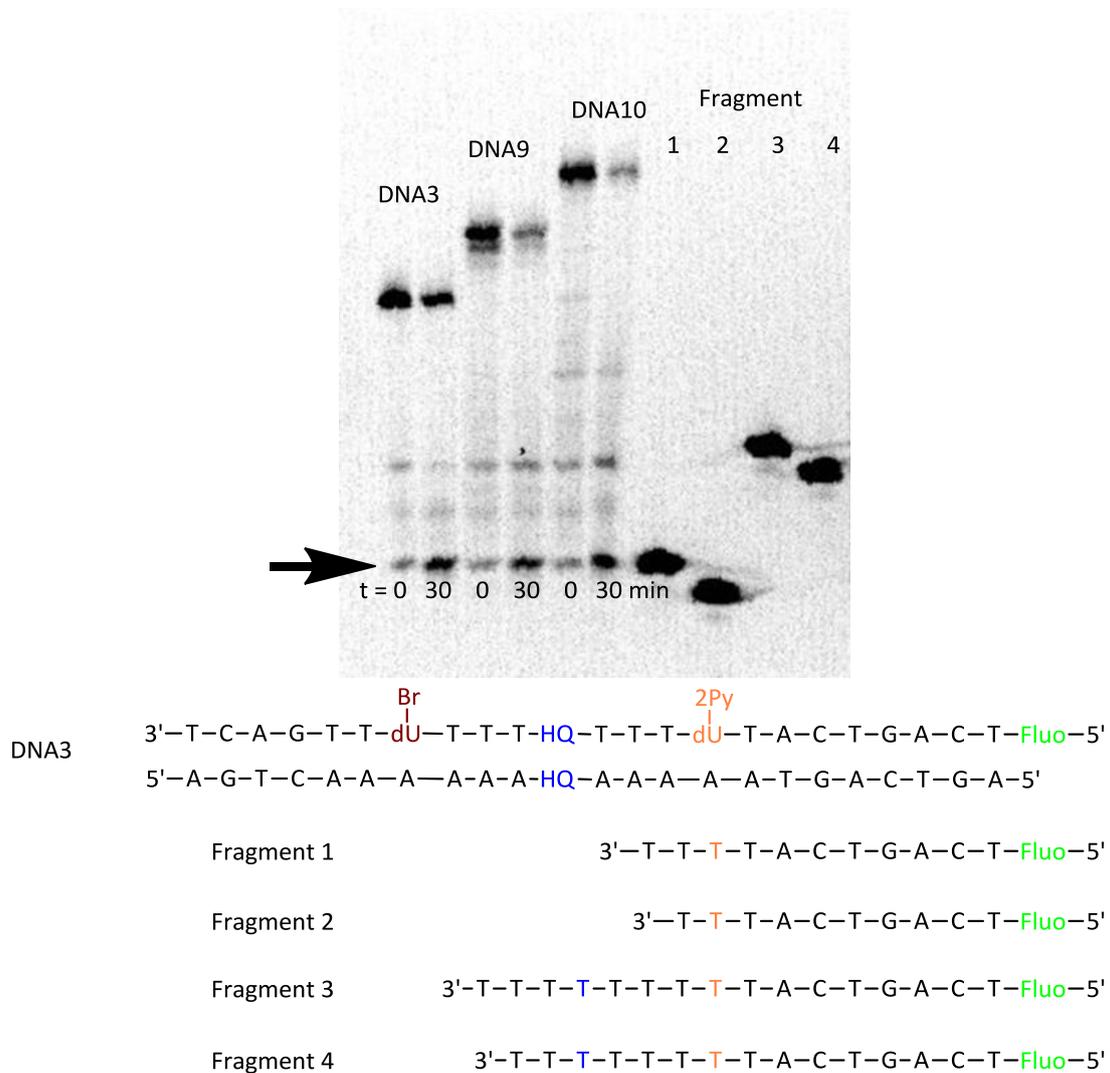


Abbildung 29: Strangbruchfragmentanalyse, Vergleich der Retentionen über PAGE.

Auch die Retentionen von Fragment F3 und F4 stimmen mit Strangbruchfragment SF1 überein. Somit treten auch Strangbrüche an der **BrdU**-Modifikation auf. Wird jedoch SF1 der Belichtung von **DNA3** betrachtet, fällt auf, dass der Strangbruch schon ohne Belichtung stattfindet und sogar mit der Belichtung der DNA verringert wird. Diese Fragmente entstehen wahrscheinlich piperidininduziert. Auch bei **DNA9** und **DNA10** weisen die unbelichteten Proben das SF1 auf, jedoch nimmt es über die Belichtungszeit in geringem Maße zu.

Der erhöhte Startgehalt von SF1 lässt sich auf die leichte Piperidin Instabilität des **BrdUs** zurückführen.

Durch eine Probenaufarbeitung ohne Piperidin konnte im Vergleich zur normalen Aufarbeitung gezeigt werden, dass SF1 nicht generiert wird. Die Zunahme dieses Fragments bei **DNA9** und **DNA10** könnte trotz der vom Hersteller angegebenen Anregungswellenlänge von $\lambda = 365 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ durch eine direkte Belichtung der **HQ**-Modifikation stattfinden. Es konnte im Zuge der basenfreien Probenaufarbeitung auch eine verminderte Bildung von SF3 festgestellt werden (ca. 10 %), was zeigt, dass auch das **HQ-HQ**-Basenpaar leicht instabil bei der Behandlung mit Piperidin bei 90 °C ist.

Somit kann die Tatsache eines hohen Startwertes an Strangbrüchen bei der Belichtung von **DNA3** mit 10 %, durch die Piperidinlabilität der **BrdU**- und **HQ**-Modifikation erklärt werden. Durch die Aufsummierung dieser vor der Belichtung auftretenden Strangbrüche wird der Startwert bei $t = 0 \text{ min}$ erhöht.

Da die **HQ**-Modifikation als Elektronenfalle und Strangbruch generierendes Modul in der DNA wirkt, konnten die weiter oben erwähnten, schwer erklärbaren Ergebnisse neu gedeutet werden:

Die Distanzabhängigkeit des Gesamtstrangbruchs von **DNA1-3**, die bei den Oligonukleotiden **DNA9** und **DNA10** im Vergleich zu **DNA3** nicht mehr auftraten, können wie folgt erklärt werden: Die Distanz zwischen **2PydU** und **HQ** variiert in den Oligonukleotiden **DNA1-3** von 1 AT-BP bis 3 AT-BP. In **DNA3**, **9** und **DNA10** ist dieser Abstand mit drei AT Basenpaaren immer gleichgroß, daher kann bei den addierten Strangbrüchen auch keine Distanzabhängigkeit gezeigt werden. Der Anstieg des Strangbruchfragments 3 von 23.6 % auf 30.7 % (**DNA3** → **DNA10** – gegen den Startwert korrigiert) wird in den nächsten Kapiteln ausführlicher untersucht und diskutiert.

Betrachtet man die Strangbrucheffizienz von **DNA14**, zeigt sich der reine EET von **2PydU** nach **HQ**. Vergleicht man diesen mit **DNA3** (Abbildung 26), zeigt sich, dass sich im Bereich des Fehlers der Messung nur ein sehr geringer Anteil des Strangbruchs durch eine zweite Triebkraft hervorgerufen wird. Denkbar ist, dass das Elektron, einmal an der **HQ**-Modifikation angekommen, durch das erhöhte Potential der **BrdU**-Modifikation auf der **HQ**-Modifikation bestehen bleibt und daher die Wahrscheinlichkeit eines Strangbruchs erhöht vorliegt.

An dem erfolgten Strangbruch in **DNA6** wird ersichtlich, dass auch die **HQ**-Modifikation angeregt wird und dadurch selbst 17.8 % Strangbrüche induziert.

Auch die ohne Belichtung erfolgenden Strangbrüche der **HQ₂Cu²⁺**-Komplexe in DNA werden durch das Verhalten der **HQ**-Modifikation in Piperidin erklärt. Wahrscheinlich tritt eine gesteigerte Basenlabilität des **HQ-HQ**-Basenpaars auf, sobald die zugegebenen **Cu²⁺**-Ionen komplett komplexiert vorliegen. Das zum **Cu²⁺**-Komplex gegenläufige Strangbruchverhalten des **Ni²⁺**- und des **Fe³⁺**-Komplexes kann eventuell darauf hindeuten, dass beide Metallionen nicht vollständig komplexiert in der DNA vorliegen, da Anfangsstrangbruchwerte wie bei **DNA3** zu sehen sind. Auch die geringere Stabilisierung der Doppelstränge (T_m) durch **Ni²⁺**- und **Fe³⁺**-Ionen spricht dafür.

2.2.6 Umstrukturierung des Elektronentransfer Systems

In Kapitel 2.2.6 konnten neue Erkenntnisse über das artifizielle Basenpaar **HQ-HQ** erarbeitet werden. Die Fähigkeit der Modifikation, bei Aufnahme eines Elektrons Strangbrüche zu induzieren, wurde aufgeklärt. Damit kann **HQ** als neue Elektronenfalle und als Sonde für die Detektion von reduktivem Elektronentransfer in DNA dienen. Die induzierten Strangbrüche finden auch ohne die Behandlung der belichteten Proben mit Piperidin bei erhöhten Temperaturen statt, was den Einsatz von basenlabilen Elektronendonoren oder anderer Modifikationen in der DNA neben der EET Detektion zulässt. Jedoch muss die selektive Anregung des Elektronendonors neben **HQ** sowie eine ausreichend hohe Triebkraft gewährleistet sein. Diese war im Detektionssystem **2PydU/HQ-HQ/BrdU** mit einer relativ hohen Triebkraft von **2PydU** zu **HQ** von $\Delta G_{\text{EET}} = -0.9$ eV durch die hohe Potentialbarriere von **HQ** zu **BrdU** stark gehindert.

Für die weiteren Untersuchungen des Elektronentransfers über **HQ-HQ**-Basenpaare wurde daher ein photoanregbarer Elektronendonor mit einem höheren Oxidationspotential im angeregten Zustand im Vergleich zu **2PydU** eingesetzt. Dieser sollte durch eine bathochrom verschobene Extinktion bei $\lambda > 350$ nm selektiv neben **HQ** angeregt werden können. Diese Anforderungen wurden von dem in Kapitel 2.2.1 schon teilweise vorgestellten Elektronendonor *N,N'*-Dimethylaminopyren-2'-desoxyuridin **DIMAPdU** erfüllt (Abbildung 30). Mit einem Potential von $E_{\text{Ox1}^*} = -2.2$ V ergibt sich eine Triebkraft zur **HQ**-Modifikation von $\Delta G_{\text{EET}} = -1.2$ eV.

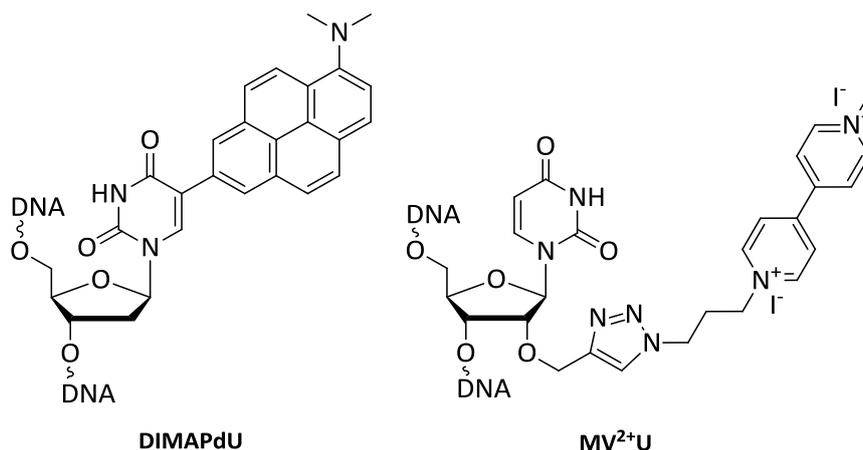


Abbildung 30: Neues Elektronendonor und -akzeptor Paar; *N,N'*-Dimethylaminopyren-2'-desoxyuridin **DIMAPdU** (ED) und Methylviologen-Uridin **MV²⁺U** (EA²⁺).

Auch das in Abbildung 31 dargestellte Absorptionsmaximum der **DIMAPdU**-Modifikation bei $\lambda_{\text{abs}} = 356$ nm lässt die Belichtung mit einer längerwellig emittierenden LED von $\lambda = 385$ nm zu, was die unerwünschte Anregung von **HQ** komplett verhindert.

Die Triebkraft zwischen **HQ** und dem Elektronenakzeptor sollte erhöht werden. Gleichzeitig wäre eine Extinktion bei $\lambda < 350$ nm von Vorteil, um dessen direkte Bestrahlung zu verhindern. Diese Anforderungen konnten von dem Elektronenakzeptor (EA²) Methylviologen **MV²⁺U** erfüllt werden. Mit einem Absorptionsbereich von $\lambda_{\text{abs}} < 350$ nm kann der EA² nicht durch die 385 nm LEDs angeregt werden (Abbildung 31, rechts). Auch das Reduktionspotential dieses Elektronenakzeptors $E_{\text{red}}(\text{MV}^{2+}/\text{MV}^{\bullet+}) = -0.3 \text{ V}^{[142]}$ generiert eine Triebkraft vom Elektronendonator **DIMAPdU** zu **MV²⁺U** von ca. $\Delta G_{\text{EET}} = -1.9 \text{ eV}$. Somit sollte die Migration des photoinduzierten Überschusselektrons über die **HQ**-Modifikation bis zum EA² ermöglicht werden.

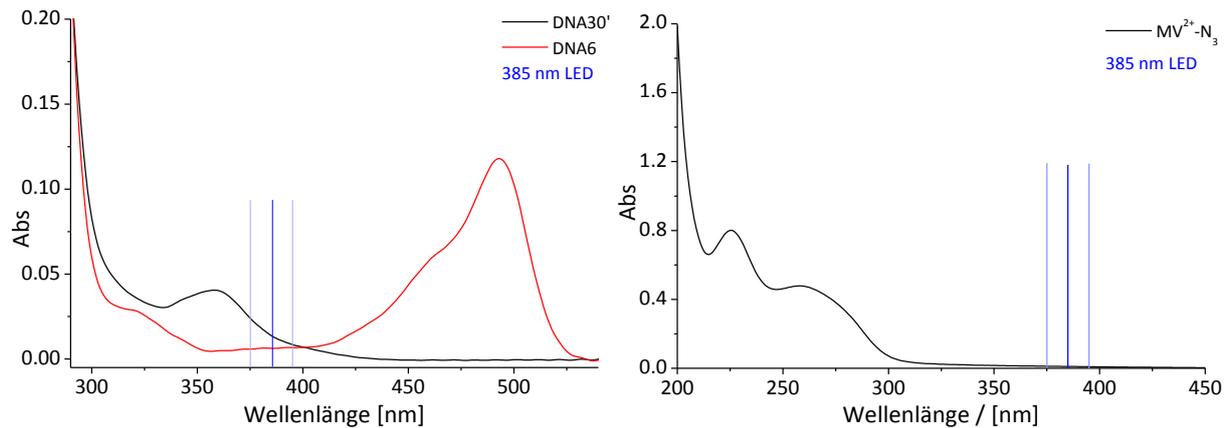


Abbildung 31: links: Absorptionsspektren von DNA30' (DIMAPdU modifiziert) und DNA6 (Fluo und HQ modifiziert), 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA, sowie der Anregungsbereich der zwei 385 nm LEDs (Anregungsbereich: $385 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ bis 10 % der Ausgangsintensität^[143]); rechts: Absorptionsspektrum von Methylviologen-Azid, 0.3 M in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA.

Bei spektroelektrochemischen Untersuchungen von **MV²⁺** (Diodid) durch *Wagenknecht et al.* konnte neben dem Abfall der Extinktion bei $\lambda_{\text{abs}} = 247$ nm ein Anstieg zweier Banden bei $\lambda_{\text{abs}} = 397$ nm und 603 nm, bei Bildung der **MV^{•+}**-Spezies durch Reduktion (siehe Abbildung 46, rechts) beobachtet werden.^[144] Dieses spektrale Verhalten kann für die Bestimmung von Elektronentransferraten bei Messungen der transienten Absorption genutzt werden.

Es sollten Strangbruchexperimente mit der **HQ**-Modifikation als Strangbruchstelle und Zwischenakzeptor durchgeführt werden. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob das **HQ-HQ**-Basenpaar in der Lage ist, Ladungen weiter über die DNA zu transportieren, da Anzeichen dafür in Kapitel 2.2.5 gefunden wurden.

2.2.7 Synthese der Oligonukleotide DNA15-26'

Synthese der artifiziiellen Basen

Die Synthese des Elektronendonors *N,N'*-Dimethylaminopyren-2'-desoxyuridin **DIMAPdU** erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[81] Bei der anschließenden Schützung der 5'-Hydroxylgruppe mit DMTr wurde das Lösungsmittel Pyridin gegen DCM ersetzt, was nach 14 h zu vollem Umsatz bei Raumtemperatur führte (im Gegensatz zu keinem Umsatz nach 2 d bei 30 °C in Pyridin). Im Folgenden wurde das Nukleosid **5** säulenchromatographisch aufgereinigt und mit 86 % Ausbeute erhalten. Um den Baustein für die DNA-Festphasensynthese zu modifizieren, wurde **5** mit PA-Cl in abs. DCM mit DIPEA umgesetzt. Es folgte eine schnelle Aufreinigung über Flashchromatographie, wobei **6** mit 83 % Ausbeute erhalten werden konnte.

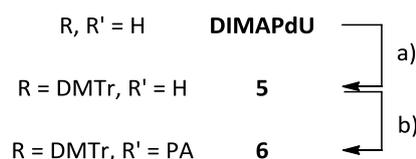
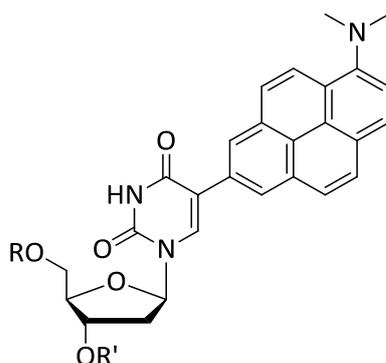


Abbildung 32: Synthese von **6**; a) DMTr-Cl, DIPEA, DCM, ü. N., R. T., 86 % b) PA-Cl, DIPEA, DCM, 2 h, R. T., 83 %.

Da der gewählte Elektronenakzeptor Methylviologen basenlabil^[145] ist, konnte er nicht über die Standard-Phosphoramidit-Methode in die DNA eingebracht werden. Durch eine Azidpropan-Funktionalität am Molekül konnte jedoch eine postsynthetische kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) nach *Huisgen*^[146] an einer alkinmodifizierten DNA (2'-*O*-Propargyluridin-Modifikation) erfolgen. Das Methylviologen-Azid (EA²) wurde wie in der Literatur beschrieben synthetisiert.^[144]

Synthese der modifizierten Oligonukleotide

Der synthetisierte DNA-Baustein **6** wurde als eine 0.1 M Lösung in absolutem Acetonitril aufgenommen. Es wurden 96 μ L 0.1 M einer **DIMAPdU**-PA Lösung in 8 min über das CPG gepumpt.

Das kommerziell erhältliche 2'-*O*-Propargyluridin-Phosphoramidit **cU**-PA wurde ebenfalls als 0.1 M Lösung in absolutem Acetonitril aufgenommen. Bei der DNA Synthese wurden 96 μ L einer 0.1 M **cU**-PA Lösung in 3.1 min über das CPG gepumpt. Mit diesen veränderten Mengen konnten effizient zwei- bis sechsfach modifizierte Oligonukleotide synthetisiert werden, mit Ausbeuten zwischen 7 und 37 %. Die mit **cU** modifizierten Oligonukleotide wurden nach der Abspaltung vom CPG postsynthetisch, wie in Kapitel 5.3.1 näher beschrieben, mit Methylviologen-Azid modifiziert (Abbildung 33).

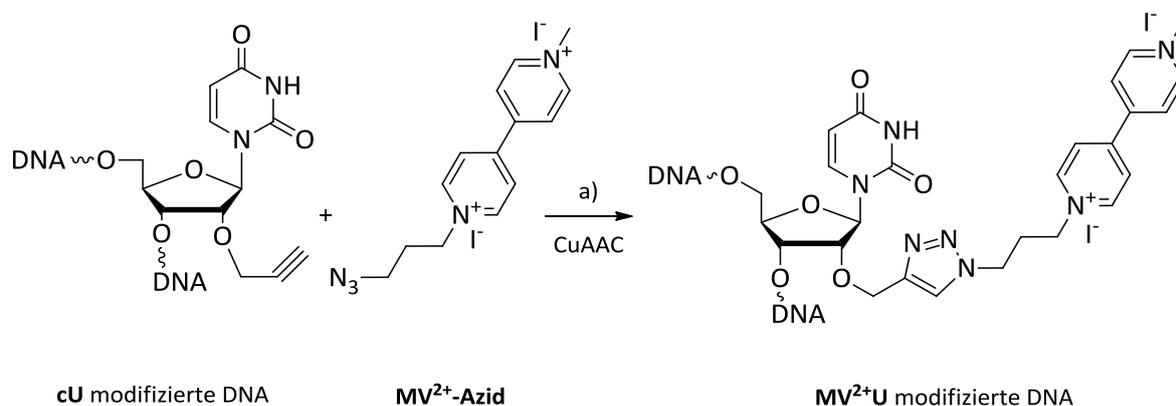


Abbildung 33: Postsynthetische CuAAC von Methylviologen-Azid mit **cU**-modifizierter DNA a) TBTA, Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, DMSO/tBuOH/H₂O, 8 h, R. T..

Für die Aufreinigung der basenlabilen, **MV²⁺U**-modifizierten Oligonukleotide wurde der Ammoniumacetatpuffer für die HPLC-Reinigung auf pH = 6.5 eingestellt.

Spektroskopische Charakterisierung

Bei der Betrachtung der Absorptionsspektren von **DNA15-17** (Abbildung 36 links) sind die typischen Extinktionen der natürlichen Nucleobasen bei $\lambda_{\text{abs}} = 230 \text{ nm}$ und 260 nm , neben der Extinktion der Fluoreszein-Modifikation bei $\lambda_{\text{abs}} = 420 \text{ nm}$ bis 525 nm zu sehen. Durch einen energieärmeren S_0-S_1 Übergang des Elektronendonors **DIMAPdU** bei $\lambda_{\text{abs}} = 357 \text{ nm}$, im Vergleich zu **2PydU**, ist die Extinktion des **HQ-HQ**-Basenpaar bei $\lambda_{\text{abs}} = 320 \text{ nm}$ erkennbar. Wird der Bereich zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 300 \text{ nm}$ und 400 nm näher betrachtet, fällt im Vergleich von **DNA15** mit **DNA6** (nur **HQ** und **Fluo** modifiziert) und **DNA30'** (nur **DIMAPdU** modifiziert) auf, dass sich die Extinktionen des **DIMAPdU** modifizierten Oligonukleotids mit dem des mit **HQ** modifizierten Oligonukleotid additiv verhalten. Damit entsteht eine Extinktion von **DNA15** mit einem Maximum von **HQ** bei 320 nm und **DIMAPdU** bei 356 nm (Abbildung 36, rechts). In dieser Konzentration konnten keine Wechselwirkungen zwischen dem ED und **HQ** in der Absorption festgestellt werden, obwohl die Distanz von 3 AT-BP bei **DNA15** unterschritten ist.

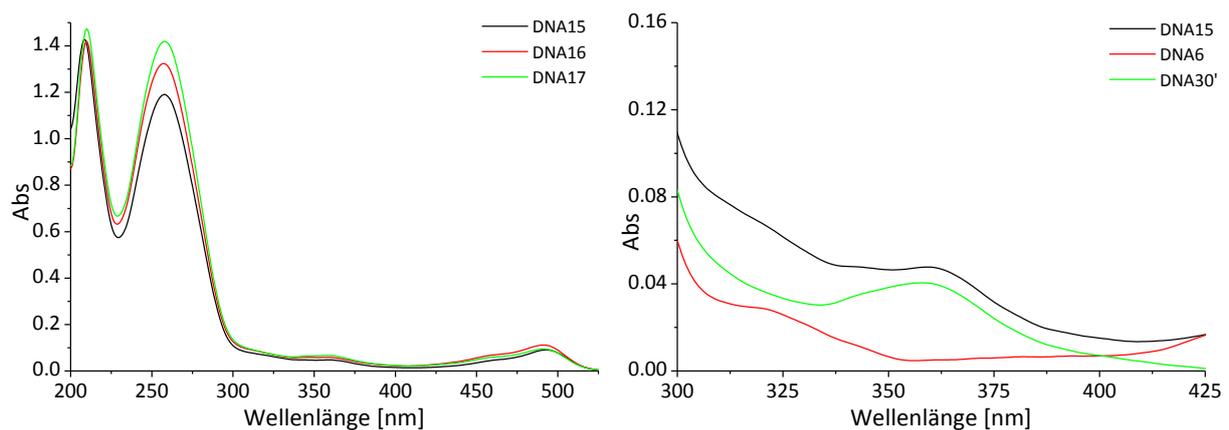


Abbildung 36: Absorptionsspektren links: $2.5 \mu\text{M}$ DNA15-17 in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl , rechts: Ausschnitt der Extinktionen von DNA15, DNA6 und DNA30'.

Die zusätzlich mit dem Elektronenakzeptor **MV²⁺U** modifizierten Duplexe **DNA18-20** zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Absorption, im Vergleich zu **DNA15-17** (Abbildung 37, links). Da die Extinktion von **MV²⁺U** im Bereich der Absorption der kanonischen DNA Basen liegt, ist sie im Spektrum überlagert und damit nicht neben den anderen Modifikationen zu erkennen.

In Abbildung 37 rechts dargestellt sind die Absorptionsspektren der mit mehreren **HQ**-Einheiten modifizierten Oligonukleotide **DNA21** und **DNA22**. Es fällt auf, dass die Absorption von **DNA22** im Bereich zwischen $\lambda = 300$ und 450 nm leicht erhöht vorliegt, was durch Aggregationen der **HQ**-Modifikation begründet werden könnte (siehe Kapitel 5.3.1).

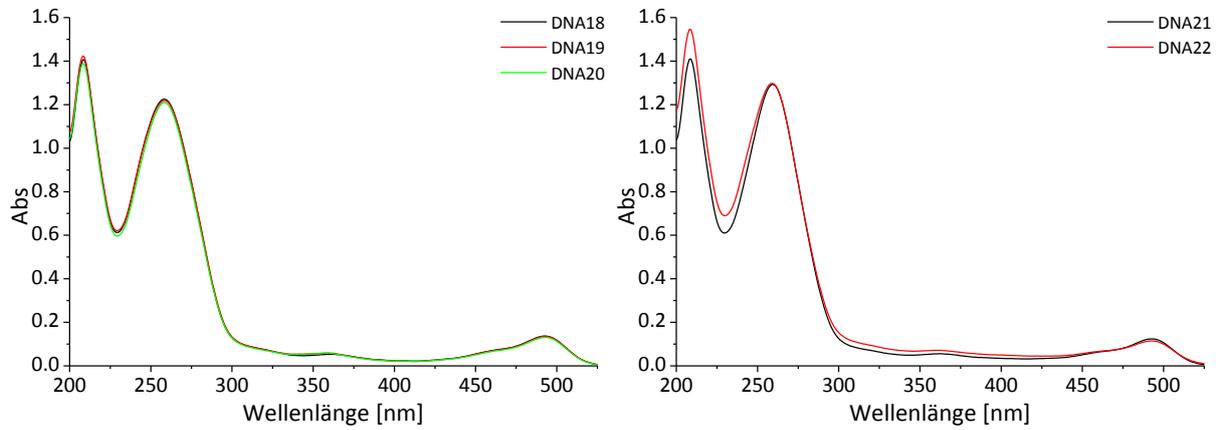


Abbildung 37: Absorptionsspektren links: DNA18-20, rechts DNA21 und DNA22, alle $2.5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer und 250 mM NaCl .

2.2.9 Belichtungen und PAGE

Um zu untersuchen, ob das Elektronentransfersystem, bestehend aus **DIMAPdU** (ED) und **HQ** (EA¹), durch photoinduzierten Ladungstransfer Strangbrüche generiert, wurden 1 μ M doppelsträngige DNA in 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA mit zwei 385 nm LEDs für 30 min belichtet. Nach bestimmten Belichtungszeiten wurden Aliquote entnommen, die nach Trocknung direkt im Ladepuffer gelöst und über PAGE getrennt wurden. Dadurch konnten die piperidininduzierten Strangbrüche verhindert werden.

In Abbildung 38 sind die Strangbruchexperimente von **DNA15-17** dargestellt. Bei einer Belichtungszeit von $t = 0$ min sind durch die basenfreie Aufarbeitung der Proben keinerlei Strangbrüche zu detektieren. Um dennoch alle Systeme auf die reale Menge des photoinduzierten Strangbruchs zu reduzieren, wurden alle folgenden Auftragungen, wie in Abbildung 38 links, um den Wert bei $t = 0$ min korrigiert.

In dieser Auftragung ist eine geringe Distanzabhängigkeit des erfolgenden Elektronentransfers ersichtlich. Mit 7.7 % Strangbrüchen bei einer Distanz von 2 AT-BP zwischen **DIMAPdU** und **HQ**-Modifikation erfolgen mehr Strangbrüche als bei **DNA16** und **DNA17** mit jeweils 5.2 ± 0.3 %. Dies könnte mit den postulierten Ladungsmigrationsmechanismen erklärt werden.

Bis zu einer Distanz von 3 Basenpaaren scheint der EET über einen Superaustausch Mechanismus (**DNA15**), bei größeren Distanzen über einen *Hopping*-Mechanismus (**DNA16-17**) zu erfolgen. Die unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten der Mechanismen könnten dabei die Strangbrücheffizienz beeinflussen (vgl. Kapitel 2.1.2 und 2.1.3).

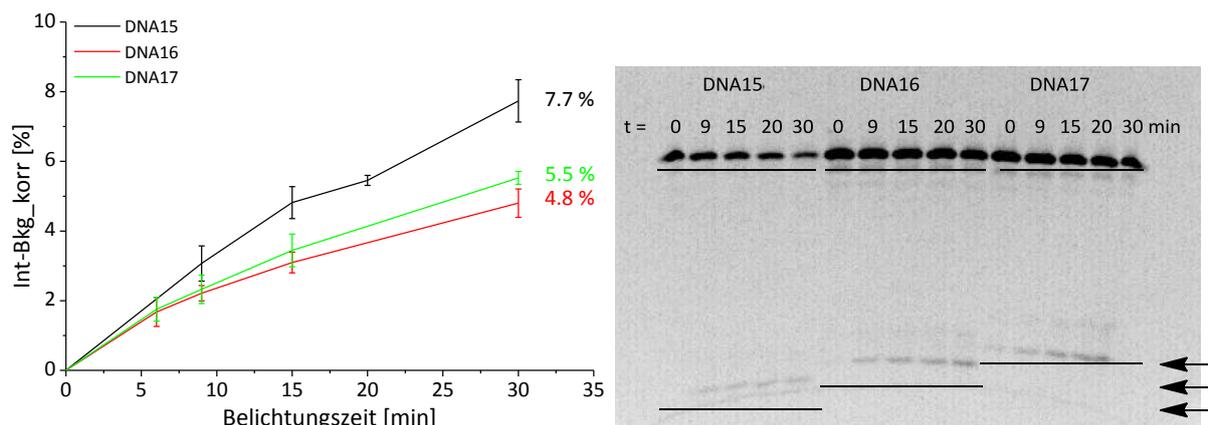


Abbildung 38: links: Strangbruchexperimente der Oligonukleotide DNA15-17, rechts: Polyacrylamid Gel der Strangbruchexperimente.

Auf dem in Abbildung 38 rechts dargestellten Polyacrylamid-Gel sind die von **DNA15-17** generierten Strangbruchfragmente zu erkennen (Pfeile). Die unterschiedliche Retention dieser Fragmente zeigt, dass der Strangbruch an unterschiedlichen Positionen der DNA-Sequenzen erfolgt sein muss. Dies bestätigt den Bruch an der **HQ**-Modifikation.

Um den Einfluss des zweiten Elektronenakzeptors $MV^{2+}U$ (EA^2) auf den Elektronentransfer und die Strangbrucheffizienz zu untersuchen, wurden die Strangbruchexperimente von **DNA15-17** (**DIMAPdU-HQ**) mit denen von **DNA18-20** (**DIMAPdU-HQ- $MV^{2+}U$**) verglichen. In Abbildung 42 sind diese dargestellt.

Die Strangbruchexperimente von **DNA15** und **DNA18** zeigen einen Abfall der Strangbruchmenge durch die Anwesenheit des Elektronenakzeptors $MV^{2+}U$ von 7.7 % auf 4.7 %. Der Vergleich von **DNA16** und **DNA19** zeigt eine sehr geringe Verbesserung und der Vergleich von **DNA17** mit **DNA20** sogar einen starken Anstieg der Strangbrüche von 5.5 % auf 8.6 %.

Diese Tendenzen können mit dem Zusammenwirken zweier unterschiedlicher Effekte erklärt werden: Durch das Einbringen eines zweiten Elektronenakzeptors $MV^{2+}U$ in das bestehende EET System aus **DIMAPdU** (ED) und **HQ** (EA^1) wird eine zweite Triebkraft zwischen **HQ** und $MV^{2+}U$ generiert. Das Reduktionspotential des EA^2 liegt bei $E_{Red} = -0.4$ V bei $\Delta G = -0.6$ eV (Abbildung 41). Diese Triebkraft sollte zu einer Migration der Überschussladung von **DIMAPdU** auf **HQ** weiter zu $MV^{2+}U$ führen. Da die Migration der Ladung in Anwesenheit des EA^2 nicht mehr auf der **HQ**-Modifikation endet, sollte dies zu einer Absenkung der Strangbrüche führen.

Der zweite Einfluss wäre der Potentialunterschied zwischen den natürlichen Basen und der **HQ**-Modifikation. Mit $E_{Red} = -1.0$ V liegt das Reduktionspotential von **HQ** unter den kleinsten dokumentierten Reduktionspotentialen der am EET als Ladungsträger beteiligten, kanonischen Base Thymidin ($E_{Red} = -1.1$ V^[27-28, 79]). Somit kann die Migration der Ladung durch eine steigende Anzahl von kanonischen Basen (Potentialbarriere) zwischen **HQ** und EA^2 gehindert werden. Durch die gehinderte Weiterbewegung sollten mehr Strangbrüche an der **HQ**-Modifikation erzeugt werden. Dies hat weniger Auswirkungen auf die Ladungsinjektion, da dessen Triebkraft, mit $\Delta G = -2.2$ eV sehr hoch ist (Abbildung 41). Auch der Elektronenrücktransport von der ersten **HQ**-Modifikation findet mit einer Triebkraft von $\Delta G_{BET} = -1.9$ eV ungehindert statt.

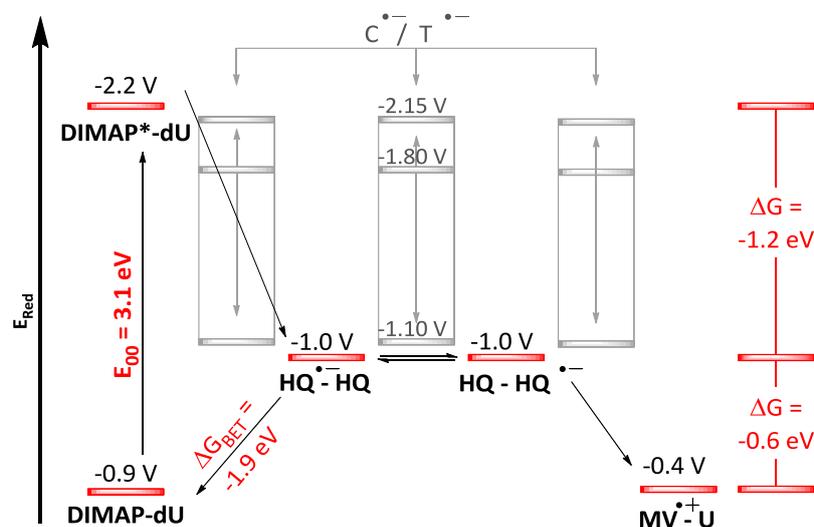


Abbildung 41: Potentialdiagramm des Elektronentransfer Systems.

In Abbildung 42 (links, oben) ist der Vergleich von **DNA15** mit **DNA18** (zusätzlicher EA²) dargestellt. Wie vermutet, erfolgen im System ohne EA² mit 7.7 % mehr Strangbrüche als in **DNA18** mit 4.7 %. Dies bestätigt die Vermutung, dass durch die Migration der überschüssigen Ladung zur **MV²⁺U**-Modifikation die Strangbrucheffizienz der **HQ**-Modifikation abnimmt. Die Strangbruchexperimente von **DNA16** und **DNA19** (rechts, oben) zeigen, dass der diskutierte Effekt der Potentialbarriere auf die Strangbrucheffizienz den der Migration ab einer gewissen Distanz zwischen **HQ** und **MV²⁺U** überlagern muss.

Diese Distanz ist mit 3 Basenpaaren bei **DNA19** erreicht, da mehr Strangbrüche in **DNA19** stattfinden (5.6 %) als in **DNA16**. Zwar wird die Strangbrucheffizienz besser, jedoch ist dies eher durch eine gehinderte Migration des Überschusselektrons zur **MV²⁺U**-Modifikation hin zu erklären. Beim Vergleich von **DNA17** mit **DNA20** zeigt sich die zu hohe Potentialbarriere von 4 Basenpaaren zwischen **HQ** und EA² durch eine stark erhöhte Strangbrucheffizienz von 8.6 % (im Gegensatz zu **DNA17** mit 5.5 %).

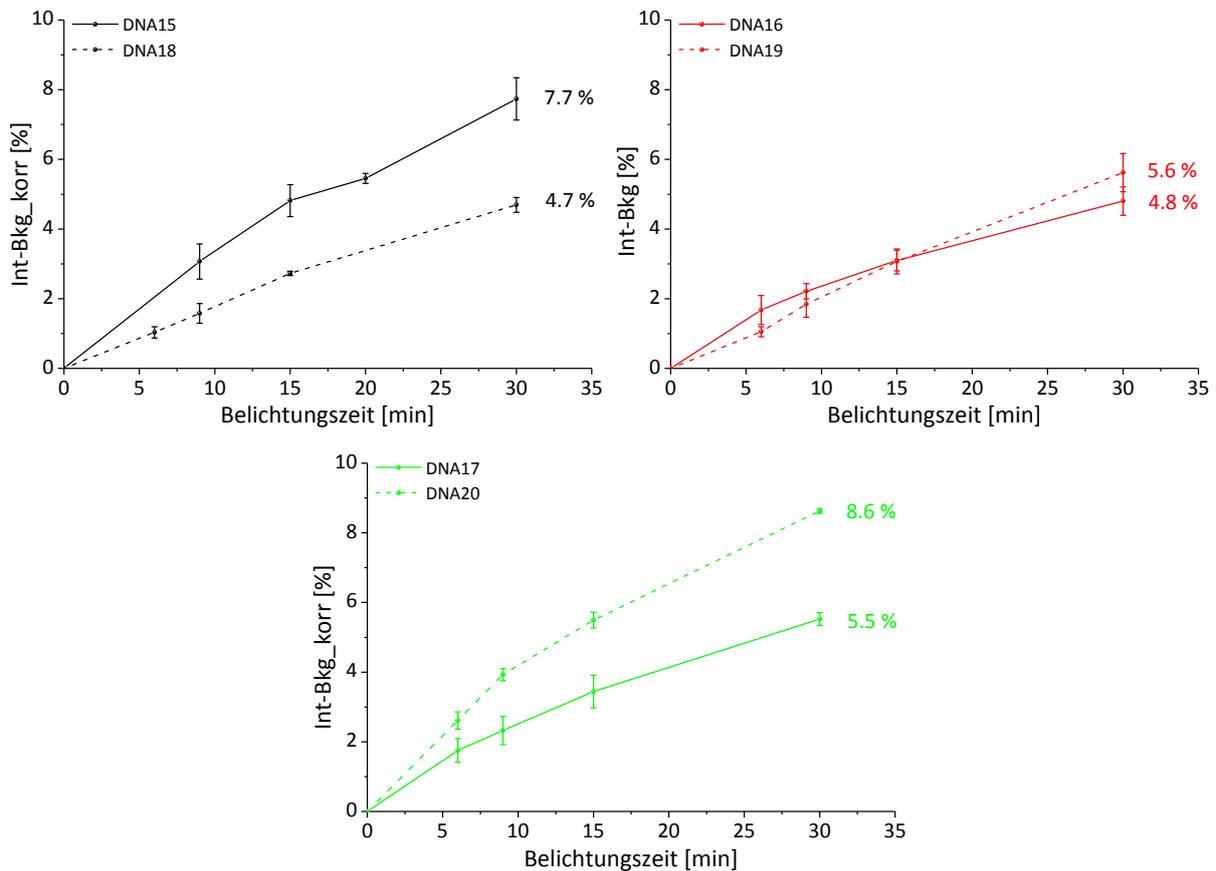


Abbildung 42: Vergleich der Strangbruchexperimente von DNA15-17 und DNA18-20, mit **MV²⁺U**.

Somit konnte gezeigt werden, dass der Elektronentransfer über ein **HQ-HQ**-Basenpaar durch das Einbringen eines stärkeren Elektronenakzeptors **MV²⁺U** stattfindet. Geht man von den beschriebenen Einwirkungen auf die Strangbrucheffizienz aus, ist der Elektronentransfer mit nur 2 AT Basenpaaren zwischen **HQ** und **MV²⁺U** am effektivsten.

Ist die Überschussladung nach der Injektion auf der **HQ**-Modifikation lokalisiert, könnte die Migration der Ladung auf eine weitere **HQ**-Modifikation möglich sein. Das Einbringen von nur 2 AT Basenpaaren zwischen den einzelnen **HQ**-Modifikationen müsste dies ermöglichen. Die **HQ**-Modifikation kann bei Ladungskontakt als Detektionssonde dienen, indem Strangbrüche generiert werden. Es sollte untersucht werden, ob mehrere **HQ**-Modifikationen in der Lage sind, die Ladung über weitere Strecken zu transportieren, wobei **HQ** als *Ladungssprungbrett* und Detektionssonde dienen sollte.

In Abbildung 43 sind die Strangbruchexperimente von **DNA21** mit zwei **HQ**-Modifikationen zw. ED und EA² und von **DNA22** mit drei **HQ**-Modifikationen dargestellt. Im linken Diagramm sind die Strangbrüche der ersten **HQ**-Modifikation in 5'-Richtung aufgezeigt, im rechten die Summe aller generierten Strangbruchfragmente der Duplexe.

Der Anstieg der Strangbrücheffizienz der ersten **HQ**-Modifikation von **DNA18** mit 4.7 %, über 7.1 % von **DNA21** zu **DNA22** mit 8.8 % lässt sich über die zunehmende Distanz zwischen dieser **HQ**-Modifikation und **MV²⁺U** erklären. In **DNA21** befinden sich 4 AT Basenpaare und eine weitere **HQ**-Modifikation zwischen dem ersten **HQ** und **MV²⁺U** dies erhöht die Potentialbarriere für die Ladungsmigration und erniedrigt die Triebkraft. Das könnte zu einer verminderten Migration der Ladung in Richtung des EA² führen und damit zu einer erhöhten Strangbrücheffizienz.

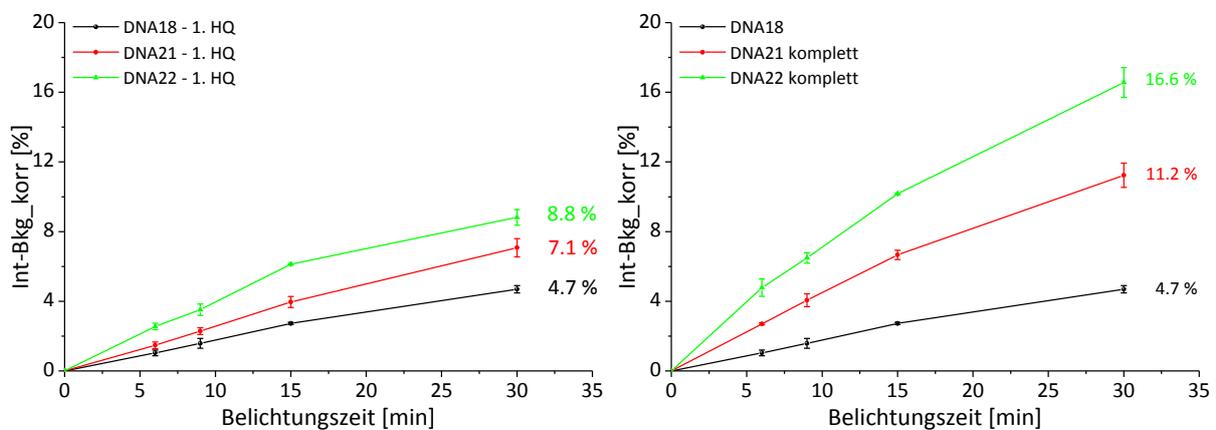


Abbildung 43: Strangbruchexperimente links: Strangbrüche von **DNA18** (1HQ), **DNA21** (2 HQ) und **DNA22** (3 HQ); rechts: Summe der Strangbrüche der drei Duplexe an der ersten **HQ**-Modifikation.

Die Summe aller generierten Strangbruchfragmente von **DNA18**, **DNA21** und **DNA22** zeigt in Abbildung 43 rechts einen weitaus höheren Anstieg der Strangbrüche. Bei **DNA21** steigen die Strangbrüche auf 11.2 % und bei **DNA22** sogar auf 16.6 %. Dies legt die Vermutung mehrerer auftretender Strangbruchfragmente nahe.

In Abbildung 44 ist das Polyacrylamid-Gel der Belichtungen von **DNA18**, **DNA21** und **DNA22** dargestellt. Wie vermutet, treten in **DNA21** zwei und in **DNA22** sogar drei signifikante Strangbruchfragmente auf. Dies entspricht der Anzahl der **HQ**-Modifikationen in den jeweiligen

Duplexen (Pfeile in der Abbildung). In diesem Gel wird ersichtlich, dass der Elektronentransfer nicht nur über zwei, sondern über 3 **HQ-HQ**-Basenpaar Strangbrüche generieren kann. Damit konnte der photoinduzierte Elektronentransfer über eine Distanz von 9 Basenpaaren, also ca. 30.6 Å nachgewiesen werden.

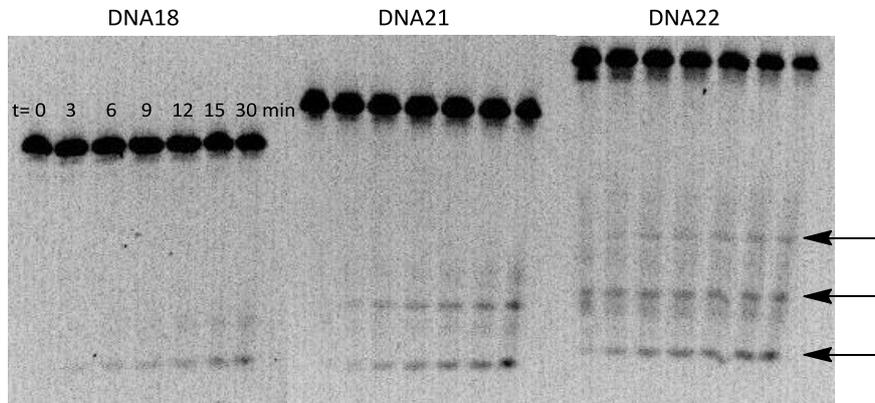
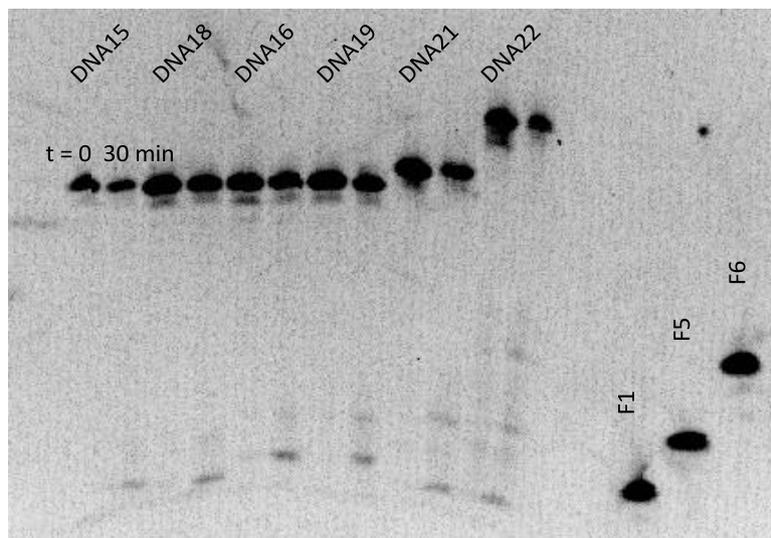


Abbildung 44: Polyacrylamid Gele der Belichtungen von DNA18 (links), DNA21 (mitte) und DNA22 (rechts).

Um zu überprüfen, ob die in **DNA21** und **DNA22** gebildeten Strangbruchfragmente auch mit den Retentionen der **HQ** Strangbruchfragmente übereinstimmen, wurden kommerziell erhältliche und mit **Fluo** markierte Oligonukleotide (**F1** = 1. **HQ** in 5' Richtung, **F5** = 2. **HQ**, **F6** = 3. **HQ**) als Komigrationsstandards eingesetzt. In Abbildung 45 ist zu sehen, dass die Retentionen der Fragmente weitestgehend übereinstimmen. Der induzierte Strangbruch findet demnach am 5' benachbarten Thymidin der **HQ**-Modifikation statt.



F1 3'-T-T-T-T-A-C-T-G-A-C-T-Fluo-5'

F5 3'-T-T-T-T-T-T-T-A-C-T-G-A-C-T-Fluo-5'

F6 3'-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-A-C-T-G-A-C-T-Fluo-5'

Abbildung 45: Polyacrylamid Gel von DNA15, DNA18, DNA16, DNA19, DNA21 und DNA22 jeweils bei t = 0 min und t = 30 min, Fragment 1, 5 und 6 als Komigrationsstandard.

2.2.10 Transiente Absorptionsmessungen

Die Untersuchungen des reduktiven Elektronentransfers über die strangbruchinduzierenden **HQ-HQ**-Basenpaare mittels PAGE geben eine qualitative Aussage über die Ladungsmigration. Jedoch kann die Dynamik der auftretenden Elektronentransferprozesse darüber nicht dargestellt werden. Daher wurden zeitaufgelöste Absorptionsspektren ausgewählter Oligonukleotide von der Arbeitsgruppe *Unterreiner* aufgenommen.

61

Eigenschaften der Modifikationen

Um Einsicht in die Absorptionen der angeregten Zustände zu bekommen, wurden die in Abbildung 46 abgebildeten spektroelektrochemischen (SEC) Spektren des Elektronendonors **DIMAPdU** (links) und des Elektronenakzeptors (**MV²⁺**-I, rechts) sowie der **HQ**-Modifikation in Abbildung 47 untersucht.

Im Spektrum des Elektronendonors (Abbildung 46, links) ist zu sehen, dass erst unter einem Potential von -2.0 V **DIMAP^{•-}** Radikalanionen entstehen, deren Absorption im Bereich von $\lambda = 450\text{ nm} - 600\text{ nm}$, sowie bei $\lambda = 750\text{ nm}$ liegen. Die Banden bei $\lambda = 310\text{ nm}$ und 365 nm nehmen ab.^[81] Methylviologen (Abbildung 46, rechts) bildet schon bei -150 mV das **MV^{•+}** Radikal aus, dessen Absorptionsbande zwischen $\lambda = 300\text{ nm}$ und 420 nm und zwischen $\lambda = 480\text{ nm}$ und 780 nm mit sinkendem Potential ansteigen. Somit könnte bei erfolgreichem Elektronentransfer von **DIMAPdU** auf **MV²⁺U** das Methylviologen-Radikalkation neben dem **DIMAP**-Radikalanion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 690\text{ nm}$ selektiv detektiert werden.

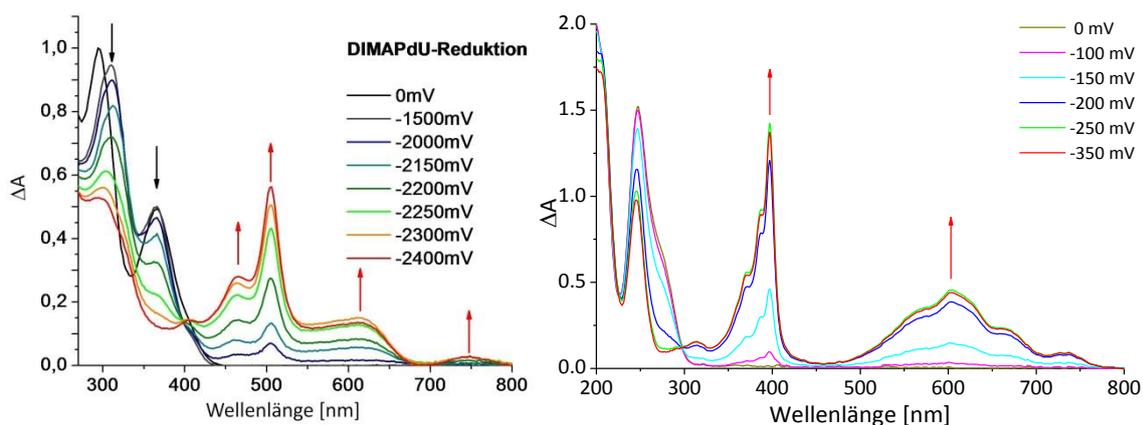


Abbildung 46: Spektroelektrochemische Absorptionsspektren, links: SEC Spektrum von DIMAPdU in DMF mit 150 mM TBAHFP,^[81] rechts: SEC Spektrum von 38 μM MV²⁺ in MeCN mit 150 mM TBAHFP.^[144]

Die spektroelektrochemischen Untersuchungen von 8-Hydroxychinolin in MeCN, THF, MeOH und DCM ergaben dieselben Banden bei der Reduktion. In Abbildung 47 sind die Messungen in MeCN exemplarisch dargestellt. Im geringer konzentrierten Spektrum links ist die Abnahme des Maximums bei $\lambda = 240$ nm und 260 nm ab einer Spannung von -1.5 mV zu beobachten. Im höher konzentrierten Spektrum rechts, ist die Zunahme der Absorption der $\text{HQ}^{\bullet-}$ -Radikalanionen deutlicher zu sehen. Ab einem Potential von -900 mV sinkt die Absorption von 8-Hydroxychinolin bei $\lambda = 310$ nm und es entstehen zwei neue Maxima bei $\lambda = 348$ nm und $\lambda = 400$ nm. Somit sollte auch durch den Elektronentransfer über das **HQ-HQ**-Basenpaar die spezifische Detektion des $\text{MV}^{\bullet+}$ -Radikalkations nicht gestört werden.

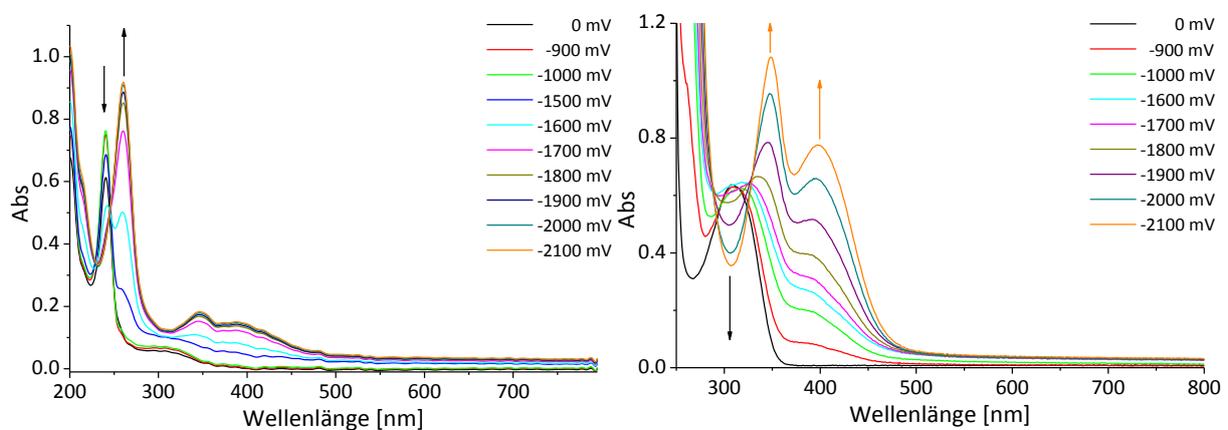


Abbildung 47: Spektroelektrochemische Spektren von 8-Hydroxychinolin, links: geringere Konzentration, um den Bereich von 200-300 nm zu untersuchen, rechts: höhere Konzentration, um den Bereich ab 250 nm näher zu untersuchen. Jeweils in MeCN mit 1 mM TBAHFP.

Strangdesign und -eigenschaften

Da jedoch die Absorptionsbande des **Fluo** Farbstoffs an den genutzten Oligonukleotiden das Signal stört, indem die gewünschten dynamischen Prozesse durch stimulierte Emission (siehe Kapitel 2.1.6) stark überlagert werden, wurden vier Duplexe ohne **Fluo**-Modifikation synthetisiert.

Dazu gehörten **DNA18'**, **DNA21'** und **DNA22'**. Um ausschließen zu können, dass die gemessenen Dynamiken von anderen Prozessen herrühren, wurden auch zwei Referenzstränge eingesetzt. Zum einen wurde **DNA25'** ohne eine MV^{2+}U -Modifikation synthetisiert und zum anderen wurde von *Thomas Ehenschwender* ein Oligonukleotid mit einer einzelnen **DIMAPdU**-Modifikation zur Verfügung gestellt (**DNA26'**). Deren Sequenzen sind in Abbildung 48 dargestellt.

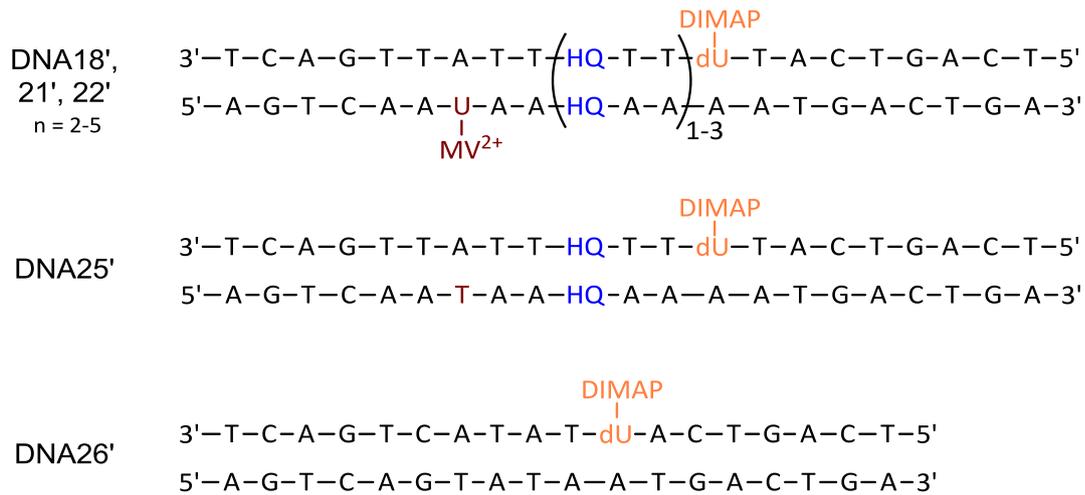


Abbildung 48: Sequenzen für die Untersuchung der dynamischen Prozesse in den jeweiligen Duplexen.

Um die beschriebenen Oligonukleotide zu charakterisieren, wurden deren Schmelztemperaturen und Absorptionsspektren aufgenommen (jeweils 2.5 μM in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA). Die in Tabelle 5 aufgelisteten Schmelztemperaturen von **DNA18'** und **DNA25'** zeigen erneut, dass die **MV²⁺U**-Modifikation den Duplex nicht destabilisiert. Auch die Stabilisierung von +1.6 K (**DNA18'** und **DNA21'**) und die von +3.1 K (**DNA21'** und **DNA22'**) durch die zusätzlichen **HQTT** Einheiten sind mit den Tendenzen der Oligonukleotide mit **Fluo**-Modifikation übereinstimmend.

Tabelle 5: Schmelztemperaturen von 2.5 μM **DNA18'**, **DNA25'**, **DNA21'**, **DNA22'** in 10 mM NaP_i Puffer mit 250 mM NaCl.

Oligonukleotid	Schmelztemperatur T_m [°C]	Oligonukleotid	Schmelztemperatur T_m [°C]
DNA18'	53.7	DNA21'	55.2
DNA25'	53.6	DNA22'	58.3

In Abbildung 49 links sind die Absorptionsspektren der Duplexe **DNA18'**, **DNA25'**, **DNA21'** und **DNA22'** dargestellt. Sie zeigen die Absorption des Elektronendonors **DIMAPdU** bei $\lambda_{\text{abs}} = 361$ nm sowie eine Bande zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 380$ nm und 450 nm. Diese steigt mit Zunahme der **HQ** Modifikationen im Oligonukleotid an, was trotz der Zugabe von 10 eq. EDTA auf einen **HQ₂M** Metallkomplex hinweist. Dies sollte jedoch die transienten Absorptionsmessungen nicht beeinflussen. Für diese wurde doppelsträngige DNA in einer weitaus höheren Konzentration, als für UV-Vis-Messungen üblich, benötigt. Dazu wurden **DNA18'**, **DNA21'**, **DNA22'**, **DNA25'** und **DNA26'** als 0.3 mM Lösung in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA hybridisiert, ihre Absorptionen sind in Abbildung 49 rechts dargestellt. Durch die erhöhte optische Dichte wird eine Abhängigkeit des Absorptionsmaximums von **DIMAPdU** in der DNA vom Abstand des

Elektronenakzeptors $MV^{2+}U$ erkennbar. Sind die beiden Modifikationen nur durch 5 Basenpaare (**DNA18'**) oder durch 8 Basenpaare (**DNA21'**) getrennt, sind zwei Maxima bei $\lambda_{abs} = 348$ nm und 362 nm zu erkennen. Bei der geringeren Distanz ist das Maximum bei $\lambda_{abs} = 348$ nm erhöht. Erweitert sich die Distanz erhöht sich der Anteil von $\lambda_{abs} = 362$ nm. Wird das Maximum von **DNA22'** mit dem von **DNA25'** verglichen, fällt auf, dass hier keine Verschiebungen von $\lambda_{abs} = 348$ nm ins Bathochrome stattfindet. Somit kann der Einfluss der $MV^{2+}U$ -Modifikation durch die Ausprägung der Schulter am **DIMAPdU** Maximums ($\lambda_{abs} = 348$ nm) bei $\lambda_{abs} = 362$ nm abgeschätzt werden. Je größer die Distanz zwischen ED und EA, desto unwahrscheinlicher wird auch ein Elektronentransfer zwischen den beiden Modifikationen (**DNA22'**).

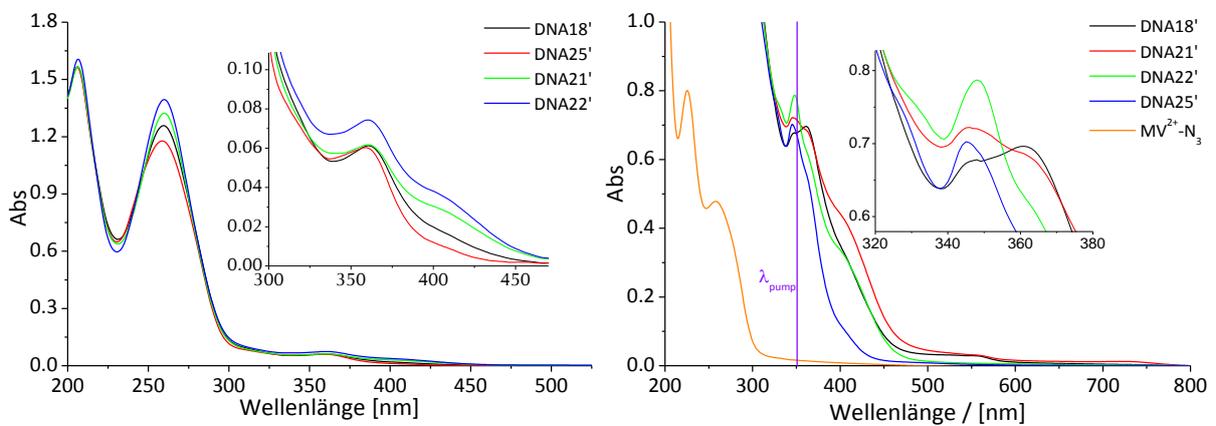


Abbildung 49: Absorptionsspektren links: DNA18', DNA25', DNA21' und DNA22', 2.5 μ M in 10 mM NaPi Puffer mit 250 mM NaCl, rechts: 0.3 mM DNA und 0.3 M $MV^{2+}-N_3$ in 10 mM NaPi Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA.

Pump-probe Messungen

Für die Messungen wurde ein Femtosekundenlaser-System verwendet.^[147] Das Prinzip der *pump-probe*-Methode ist die Anregung des Elektronentransfersystems mit einem Laserpuls. Die damit entstehenden ultraschnellen Prozesse werden mit einem zweiten Puls, der mit einer variablen Verspätung auf die Probe trifft, gemessen. Mit zwei gleichen Detektoren wird die Intensität des *probe*-Strahls vor (I_0) und nach der Probe (I) aufgenommen. Damit kann die relative Änderung der optischen Dichte (ΔOD , Gleichung (13)) mit und ohne *pump*-Puls angezeigt werden.

$$\Delta OD = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)_w - \log\left(\frac{I_0}{I}\right)_{w/o} \quad (13)$$

- Mit
- ΔOD Änderung der optischen Dichte
 - I_0 Intensität des Pulses vor der Probe
 - I Intensität des Pulses nach der Probe

Wird die Zeit der Verzögerung zwischen den Pulsen verändert, können die Absorption des angeregten Zustands (*excited state absorption*, ESA), die stimulierte Emission (SE) und Grundzustandsbleichen (*ground state bleaching*, GSB) der angeregten Probe oder eine Kombination dieser Effekte beobachtet werden. Mit Hilfe einer abfallenden Error-Funktion können Amplitude A_i und die Abklingzeit eines Prozesses τ_i erhalten werden (Gleichung (14)).^[147]

$$\Delta OD = \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{\sqrt{4 \ln 2} \cdot (t - t_0)}{\tau_p} \right) \right) \sum_{i=1}^N \left(A_i \exp \left(-\frac{t - t_0}{\tau_i} \right) \right) \quad (14)$$

mit:

ΔOD Änderung der optischen Dichte

t Zeit

A_i Amplitude; Maß für die Quantität des jeweiligen Prozesses

τ_i Abklingzeit des jeweiligen Prozesses

τ_p Zeitauflösung

Näheres zum Aufbau ist in Kapitel 5.1 beschrieben.

Auswertung

Für die Anregung des Elektronendonors **DIMAPdU** wurde eine Wellenlänge von $\lambda = 350$ nm ausgewählt (siehe Abbildung 49, rechts). Es konnte nicht direkt im Maximum angeregt werden, da die Summenfrequenzmodulation der Fundamentalwellenlänge des Lasers die Wellenlänge von $\lambda = 361$ nm nicht erzeugen kann. Als Abfragepuls wurden Wellenlängen von $\lambda = 480$ nm, 500 nm, 530 nm, 600 nm, 630 nm, 640 nm und 690 nm gewählt.

Um aussagekräftige Messwerte zu erhalten, wurde wie schon erwähnt die Konzentration der DNA von 2.5 μM auf 0.3 mM (in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA) erhöht. Damit sollte die optische Dichte von **DIMAPdU** bei $\lambda = 350$ nm bei $d = 0.1$ cm Schichtdicke über $\Delta OD \geq 0.5$ liegen.

Durch die Auswertung der mit den bi- und triexponentiellen Fit Funktionen erhaltenen Zeitkonstanten τ_i und relativen Amplituden A_i , wurde ersichtlich, dass sich die Ergebnisse in zwei Systeme gliedern.

Das erste dieser Systeme wird durch die Ergebnisse von **DNA18'** beschrieben. Dieser Duplex weist bei den Abfragewellenlängen $\lambda = 480$ nm, 500 nm, 530 nm und 690 nm eine Abklingzeit einer ultraschnellen Komponente von ca. $\tau_1 \sim 450$ fs auf, wohingegen **DNA25'**, **DNA21'** und **DNA22'** bei diesen Abfragewellenlängen keine ultraschnell abklingende Spezies zeigen ($\tau_1 > 1$ ps), wie beispielhaft in Abbildung 50 (*probe*: $\lambda = 480$ nm) dargestellt ist.

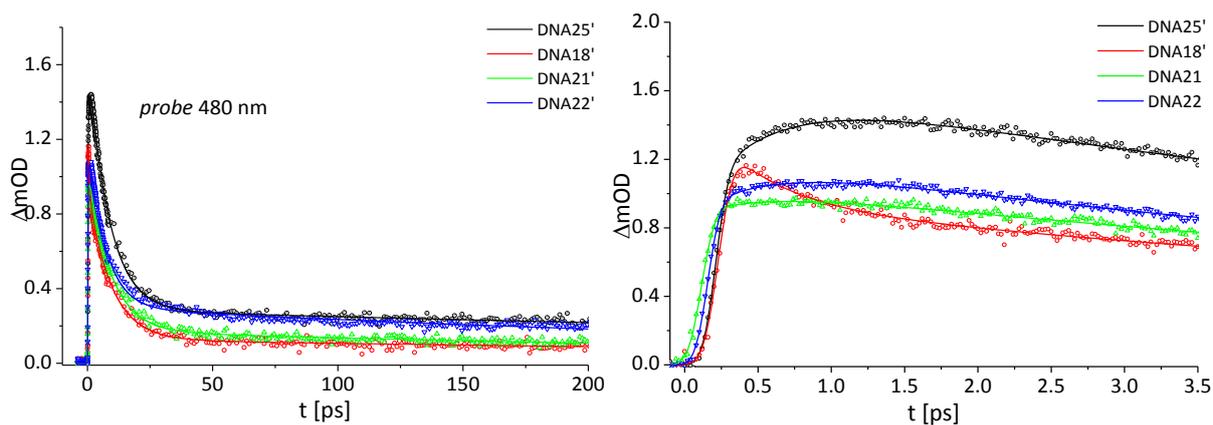


Abbildung 50: Transiente Absorptionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Abfragewellenlänge von $\lambda = 480$ nm. Links: Zeitbereich bis $\tau = 200$ ps, rechts: Zeitbereich bis $\tau = 3.5$ ps.

Durch *pump-probe* Experimente der Methylviologen-Spezies **7** (0.3 M in 10 mM NaP_i -Puffer mit 250 mM NaCl und 10 eq. EDTA) bei einer Anregung von $\lambda = 300$ nm und einer Abfrage bei 700 nm konnten vier Zeitkonstanten ermittelt werden. Diese lagen bei $\tau = 400$ fs, 1.5 ps, 20 ps sowie über 400 ps, was mit den Werten in der Literatur von Methylviologen gut übereinstimmt.^[148] Die gemessenen $\tau = 400$ fs stimmen ebenfalls relativ gut mit der ultraschnellen Zeitkonstante von **DNA18'** überein (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Zeitkonstanten und relative Amplituden für *puls-probe* Experiment bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Abfragewellenlänge von 480 nm.

Probe	τ_1 [fs]	ΣA_1	τ_2 [ps]	ΣA_2	τ_3 [ps]	ΣA_3
DNA18'	450 ± 31	0.28	9.2 ± 0.2	0.62	$\gg 200$	0.10
DNA21'	-	-	10.0 ± 0.1	0.84	$\gg 200$	0.16
DNA22'	-	-	8.3 ± 0.1	0.75	$\gg 200$	0.25
DNA25'	-	-	10.2 ± 0.2	0.83	$\gg 200$	0.17

Dies und die Tatsache, dass die Absorption des $\text{MV}^{*\cdot}$ -Radikalkations zwischen $\lambda = 450$ nm und 750 nm liegt, lassen die Deutung dieser ultraschnellen Spezies bei $\tau_1 \sim 450$ fs als reduktiven Elektronentransfer zwischen **DIMAPdU** und $\text{MV}^{2+\cdot}$ zu.

Das zweite System wird durch die erhaltenen Werte der Messungen bei einer Abfragewellenlänge von $\lambda = 600$ nm, 630 nm und 640 nm beschrieben. Bei diesen Wellenlängen zeigen **DNA25'**, **DNA21'** und **DNA22'**, neben **DNA18'** ebenfalls ultraschnelle Spezies. Dies ist in Abbildung 51 dargestellt. Um zu überprüfen, ob τ_1 aus dem gewählten Elektronentransfersystem entsteht oder nur durch Prozesse des angeregten Elektronendonors hervorgerufen wird, wurde die Dynamik des **DIMAPdU** modifizierten Doppelstrangs **DNA26'** ebenfalls gemessen. Aus den dargestellten Graphen wird

ersichtlich, dass **DNA26'** eine andere Dynamik im ultraschnellen Bereich aufweist als die restlichen Oligonukleotide.

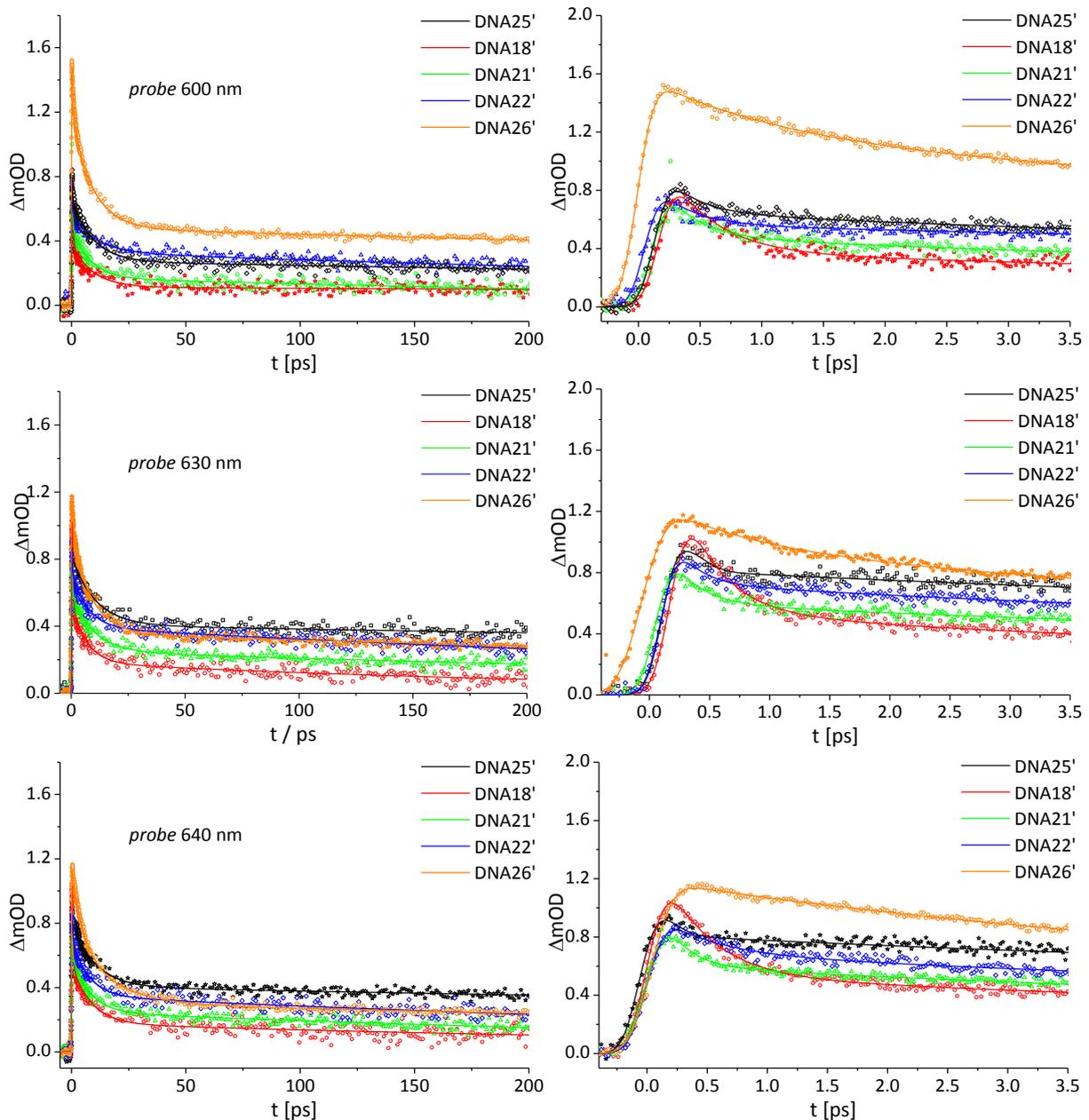


Abbildung 51: Pump-probe Experimente bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 350$ nm und einer Abfragewellenlänge von $\lambda = 600$ nm (oben), 630 nm (Mitte) und 640 nm (unten). Links: Zeitbereich bis $\tau = 200$ ps, rechts: Zeitbereich bis $\tau = 3.5$ ps.

Die in Tabelle 7 gezeigten Abklingzeiten τ_1 bestätigen, dass die ultraschnelle Komponente der vier anderen Duplexe in **DNA26'** mit $\tau_1 \geq 1$ ps nicht gebildet wird. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Abklingzeiten von **DNA25'** trotz fehlender **MV²⁺U**-Modifikation in derselben Größenordnung wie die von **DNA18' – DNA22'** liegen. Damit kann dieser ultraschnelle Prozess nur noch auf einen Elektronentransfer zwischen **DIMAPdU** und der ersten **HQ**-Modifikation zurückgeführt werden. Das dadurch gebildete **HQ^{•-}**-Radikalanion absorbiert demnach in einem Wellenlängenbereich von

$\lambda = 600$ nm bis 640 nm, was laut SEC Spektren (Abbildung 47) nicht der Fall ist. Die nur in der DNA auftretende Absorption der $HQ^{\bullet-}$ -Radikalanionen könnte durch die Ausbildung von H-Brücken der **HQ-HQ**-Basenpaare und der Anordnung des Basenpaars im relativ steifen DNA-Gerüst erklärt werden. Dies konnte jedoch nicht in einer Lösung nachgewiesen werden, da dort die erforderliche Struktur der **HQ-HQ**-Basenpaare nicht darstellbar ist.

Tabelle 7: Zeitkonstanten und relative Amplituden für puls-probe Experiment bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Abfragewellenlänge von 480 nm.

68

	Probe	τ_0 [fs]	τ_1 [fs]	ΣA_1	τ_2 [ps]	ΣA_2	τ_3 [ps]	ΣA_3
probe 600 nm	DNA18'	172	392 ± 29	0.63	9.2 ± 0.8	0.26	>> 200	0.11
	DNA21'	160	263 ± 38	0.47	7.7 ± 0.5	0.34	>> 200	0.19
	DNA22'	161	288 ± 45	0.37	10.3 ± 0.9	0.26	>> 200	0.37
	DNA25'	160	264 ± 38	0.34	9.3 ± 0.4	0.38	>> 200	0.28
	DNA26'	181	1049 ± 58-	0.26	9.0 ± 0.3	0.44	>>200	0.30
probe 630 nm	DNA18'	189	327 ± 20	0.63	6.5 ± 0.4	0.25	>> 200	0.13
	DNA21'	171	239 ± 30	0.44	9.4 ± 0.5	0.32	>> 200	0.23
	DNA22'	168	195 ± 35	0.37	6.8 ± 0.3	0.29	>> 200	0.34
	DNA25'	186	81 ± 5	0.57	10.5 ± 0.5	0.22	>> 200	0.22
	DNA26'	265	886 ± 87	0.25	8.8 ± 0.4	0.47	>>200	0.28
probe 640 nm	DNA18'	207	389 ± 21	0.63	8.4 ± 0.5	0.25	>> 200	0.12
	DNA21'	196	186 ± 25	0.51	7.5 ± 0.3	0.29	>> 200	0.20
	DNA22'	199	142 ± 14	0.30	7.4 ± 0.5	0.35	>> 200	0.35
	DNA25'	176	102 ± 28	0.49	10.0 ± 0.4	0.26	>> 200	0.26
	DNA26'	234	1000 ± 52	0.01	8.7 ± 0.2	0.69	>> 200	0.30

Ebenfalls muss der Extinktionskoeffizient des $HQ^{\bullet-}$ -Radikalanions größer sein, als der des $MV^{\bullet+}$ -Radikalkations, da der Elektronentransferprozess zwischen **DIMAPdU** und $MV^{2+}U$ von dem zwischen **DIMAPdU** und **HQ** überlagert wird.

Betrachtet man diese zwei Elektronentransferprozesse, sind sie abhängig von zwei Faktoren: Der Distanz zwischen ED und EA und der zusätzlichen Triebkraft von $MV^{2+}U$. Diese Faktoren wurden

schon in den Strangbruchexperimenten gezeigt. Durch die relativen Amplituden in Tabelle 7 können die Beobachtungen von Strangbruchexperimenten und *pump-probe* Beobachtungen belegt werden. So nimmt die Effektivität des Elektronentransfers in Anwesenheit einer zusätzlichen Triebkraft durch **MV²⁺U** zu. Während der EET bei der Anregung von **DNA25'** mit nur 34 % stattfindet, erhöht **MV²⁺U** in **DNA18'** diesen auf 63 % bei einer Abfragewellenlänge von $\lambda = 600$ nm. Bei 630 nm und 640 nm ist dieser Effekt ebenfalls erkenntlich, jedoch nicht so signifikant.

Wird die Distanz zwischen ED und EA vergrößert, sinkt auch die Amplitude. Bei 5 Basenpaaren zwischen ED und EA ist der Elektronentransfer mit 63 % am effektivsten, jedoch sinkt er durch weitere 3 Basenpaare (**DNA21'**) auf 47 % und noch weiter (**DNA22'**) auf 37 %. Dies ist nicht nur bei der *probe*-Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm zu beobachten, sondern ebenfalls bei $\lambda = 630$ nm und 640 nm.

Da die Amplitude von **DNA22'** mit 37 % der von **DNA25'** mit 34 % gleicht, kann davon ausgegangen werden, dass der Elektronentransfer in **DNA22'** fast ausschließlich aus der Ladungstrennung zwischen **DIMAPdU** und **HQ** resultiert und die Triebkraft bis zu **MV²⁺U**, wegen der großen Distanz, zu gering ist.

Somit kann festgehalten werden, dass der reduktive Elektronentransfer als ultraschnell abklingende Spezies durch die *pump-probe* Experimente untersucht werden konnte. Bei einer *probe*-Wellenlänge von $\lambda = 480$ nm, 500 nm, 530 nm und 690 nm kann dieser von **DIMAPdU** zu **MV²⁺U** verfolgt werden, wobei der EET von **DIMAPdU** zu **HQ** diesen bei Abfragewellenlängen von $\lambda = 600$ nm, 630 nm und 640 nm durch die Bildung eines farbigen HQ-Radikalanions überlagert. Ebenfalls konnten unterschiedliche Faktoren auf die Effektivität des EET durch die relativen Amplituden untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Elektronentransfer über 5 Basen (1 **HQ**) am effektivsten stattfindet und bei 11 Basen (3 **HQ**) schwächer auftritt.

2.2.11 Zusammenfassung

Durch die Untersuchungen des Elektronentransfersystems **2PydU/HQ/BrdU** konnte gezeigt werden, dass Elektronentransfer über das artifizielle **HQ-HQ**-Basenpaar zu induzierten Strangbrüchen führt.

Dies macht die **HQ**-Modifikation mit einem Reduktionspotential von $E_{\text{Red}} = -1.0 \text{ V}$ zu einem perfekten Elektronenakzeptor und einer Elektronentransersonde, die bei Kontakt mit einer Überschussladung Strangbrüche induziert. Um dies besser untersuchen zu können, wurden neue Elektronentransfersysteme aufgebaut, mit **DIMAPdU** als photoanregbarem Elektronendonator, dem **HQ-HQ**-Basenpaar als Zwischenakzeptor und Bruchstelle sowie einem weiteren Elektronenakzeptor, der die Triebkraft über das **HQ-HQ**-Basenpaar erhöhen soll.

Die Untersuchung der Distanzabhängigkeit des EET zwischen **DIMAPdU**- und **HQ**-Modifikation ergaben, dass ab einer Distanz von 2 Basen zwischen ED und EA keine Distanzabhängigkeit mehr messbar ist. Mit den Vergleichen der Strangbruchraten des Systems **DIMAPdU/HQ/MV²⁺U** (ebenfalls 2-4 Basenpaare zw. ED und EA^{1/2}) konnte der Einfluss des zweiten Elektronenakzeptors auf den EET und den induzierten Strangbruch gezeigt werden. Bei einer Distanz von 5 Basenpaaren zwischen ED und EA² wird der Elektronentransfer bei dem Oligonukleotiden mit **MV²⁺U** über **HQ** effektiver. Es finden daher weniger Strangbrüche statt. Dies konnte auch durch die relative Amplitude der *pump-probe*-Experimente der Oligonukleotide (ohne **Fluo**) bestätigt werden. Je länger die Distanz zwischen den Modifikationen wird, desto größer wird die Potentialbarriere der natürlichen Basen, was zu einer Blockade der Migration der Ladung über die **HQ**-Modifikationen und damit zu uneffektiverem EET und mehr Strangbrüchen führt. Auch dies konnte durch die Abnahme der relativen Amplituden durch *pump-probe*-Experimente bestätigt werden. Diese zeigen durch die Zeitkonstanten und durch die Absorption des MV^{•+}-Radikalkations, dass ein Elektronentransfer über 5 Basenpaare (1 **HQ** in **DNA18**, über ca. 17 Å) stattfindet. Über die Strangbruchexperimente konnte ein Elektronentransfer über 9 Basenpaare (Bruch am 3. **HQ** in **DNA22**, über ca. 30.6 Å) nachgewiesen werden. Vergleiche mit ähnlich modifizierten DNA-Systemen für photoinduzierten Elektronentransfer zeigen, dass *Barton et al.* eine Distanz von 17-36 Å^[149] nachweisen konnten, *Carell et al.* 24 Å^[52], *Majima et al.* 100 Å^[150] und *Rokita et al.* 3.4 – 10.2 Å.^[54] Somit liegt die Distanz des hier untersuchten EET-Systems in einer ähnlichen Größenordnung wie die von *Barton et al.* und *Carell et al.*, erreicht jedoch nicht die von *Majima et al.* gemessene Distanz.

2.3 Untersuchung der optischen Detektion von EET

2.3.1 Hintergrund

Zusätzlich zu den in Kapitel 2.2 beschriebenen und in dieser Arbeit genutzten Detektionsmethoden für den Überschusselektronentransfer, sollte ein anderer Ansatz der Detektion verfolgt werden.

Sulfonyl-Schutzgruppen für Amine finden in der organischen Chemie wegen ihrer hohen Stabilität Anwendung. Jedoch war bislang die Abspaltung der Schutzgruppe nur unter extremen Bedingungen, wie die Verwendung von starken Basen^[151-152] oder Säuren^[153] möglich. Neuere Untersuchungen der Abspaltung mit Magnesium und Metallkomplexen von *Hoffmann* ergaben, dass es sich bei dieser und anderer, reduktiver Entschützungen um Elektronentransfer-Prozesse handeln sollte.^[154] *Padwa et al.* fanden auch einen Weg, die Schutzgruppe durch eine photoinduzierte Reaktion mit Triethylamin abzuspalten.^[155] Diese Erkenntnisse über den Abspaltmechanismus machen die Sulfonyl-Schutzgruppe zu einem vielversprechenden Instrument für die Detektion des Überschusselektronentransfers. Unterschiedlich substituierte Sulfonylindole könnten als Elektronenfallen dienen, indem sie durch die Reduktion des zu detektierenden Elektrons die Schutzgruppe abspalten.^[156] Jedoch wären nicht nur die entstehenden chemischen Produkte dieser Reaktion detektierbar, wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, sondern es wäre ebenso denkbar die abgespaltene Sulfonyl-Schutzgruppe durch spektroskopische Methoden zu detektieren. Dies hätte den Vorteil einer apparativ weniger anspruchsvollen Verfolgung des Elektronentransfers. Ein geeignetes Amin für die Inkorporation in die DNA stellt Indol dar. *Wagenknecht et al.* untersuchten unterschiedliche Indol Derivate in DNA.^[157-158] Das Indol des Tryptophans ist mit einem Oxidationspotential von $E_{\text{Ox}}(\text{Trp}/\text{Trp}^{\bullet+}) = 1.0 \text{ V}^{[24]}$ in der Lage, Elektronen in G zu injizieren, was nach einer Deprotonierung zu einem ungeladenen Indolradikal in der DNA führt. Diese Elektronenlocheigenschaften des Indols wurden von *Wagenknecht et al.* und *Barton et al.* beschrieben.^[59, 159-162] Wird Indol (Ind) jedoch am Stickstoff über eine Phenylsulfonyl Schutzgruppe geschützt, entsteht eine Verbindung mit einem Reduktionspotential von ungefähr $E_{\text{Red}}(\text{PhSO}_2\text{Ind}/\text{PhSO}_2\text{Ind}^{\bullet-}) = -1.8 \text{ V}^{[156]}$. Damit sollte das sulfonylgeschützte Indol als Elektronenakzeptor eingesetzt werden können und bei Reduktion durch das Überschusselektron die Schutzgruppe abspalten, wie in Abbildung 52 dargestellt.

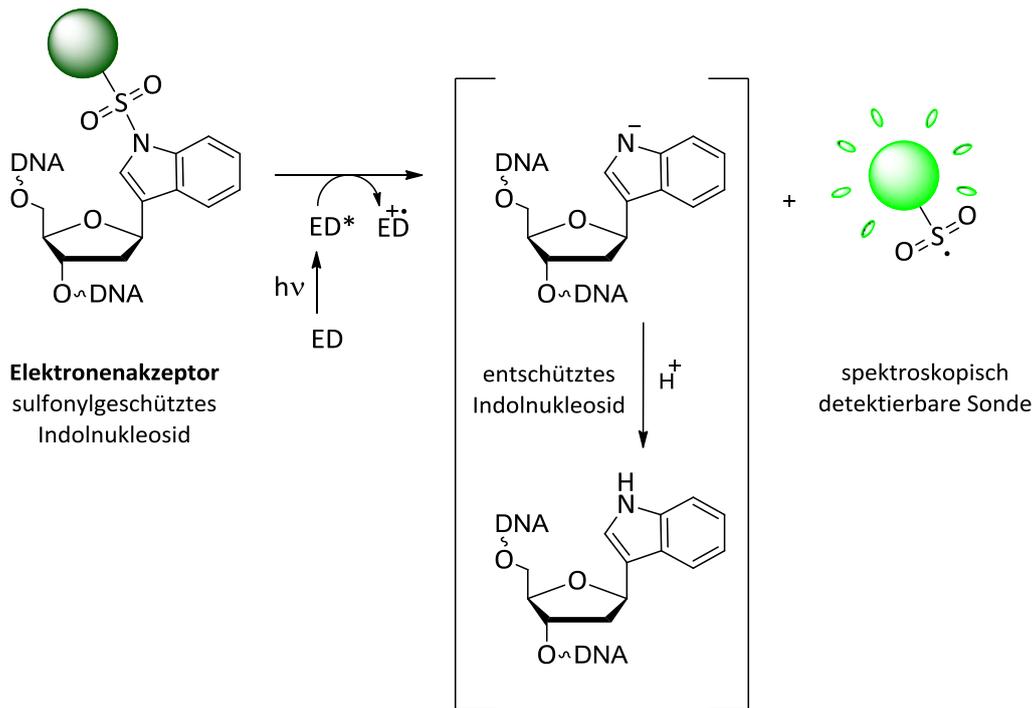


Abbildung 52: Zu untersuchendes System für die optische Detektion des EETs: Sulfonylgeschütztes Indolnucleosid in DNA wird durch angeregten Elektronendonator = ED reduziert. Die Sonde spaltet sich vom Oligonucleotid ab und kann neben dem Indolnucleosid detektiert werden.

Es besteht die Möglichkeit der Modifikation der Sulfonyl Schutzgruppe, um nach erfolgtem EET längerwellig anregbare Sonden detektieren zu können. Im Zuge dieser Arbeit wurden drei verschiedene Sulfonyl-Schutzgruppen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften für Indol synthetisiert. Die Bedingungen der reduktiven Abspaltung der Schutzgruppen wurden im Vorfeld mit den Einzelmolekülen in Lösung untersucht, um das beste Elektronendonator (ED) - Elektronenakzeptor (EA) System in DNA zu inkorporieren und um den EET und dessen Detektion zu untersuchen.

2.3.2 Elektronenakzeptoren: Sulfonylindol Derivate

Der erste Vertreter der Sulfonyl-Schutzgruppen der untersucht werden sollte ist 1-Phenylsulfonyl-1*H*-Indol **PhSO₂Ind**. Da mit der voraussichtlich erfolgenden Abspaltung der Phenylsulfonyl-Schutzgruppe durch ein Überschusselektron aber keine Absorption oder Emission im sichtbaren Bereich erfolgen würde, wurden weitere sulfonylische Schutzgruppen am Indol eingesetzt, wie 1-Dansyl-1*H*-indol **DansInd** und 1-Pyrensulfonyl-1*H*-indol **PyInd**. Die Detektion der Schutzgruppe im sichtbaren Bereich des Lichts ist wichtig, da die kanonischen Basen der DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ absorbieren. Dieses Absorptionsmaximum würde die Absorption eines kleineren, konjugierten Systems, wie in diesem Fall das Phenylsulfonyl-Molekül völlig überlagern und damit die Detektion des Elektronentransfers unmöglich machen. Überlegungen, das konjugierte Elektronensystem der sulfonylischen Schutzgruppe zu erweitern, führten zur Dansyl-Schutzgruppe. Sie wurde wegen ihrer geringen Größe, der starken Fluoreszenz in apolaren Medien und der Absorption im sichtbaren Bereich gewählt. Ebenso verringert sich die Fluoreszenzintensität und Lebenszeit der Dansylgruppe im polaren Medium. Dies sollte einen Abfall der Fluoreszenzintensität bedeuten, sobald die Schutzgruppe durch Abspaltung den unpolaren DNA Basenstapel verlässt und im polaren Lösungsmittel optisch detektiert wird.^{[163]-[164]} Um das konjugierte System noch weiter zu expandieren und damit den Anregungsbereich der potentiellen Detektionsgruppe in den Bereich des sichtbaren Lichts zu verschieben, wurde ebenso 1-Pyrensulfonyl als Schutzgruppe untersucht.

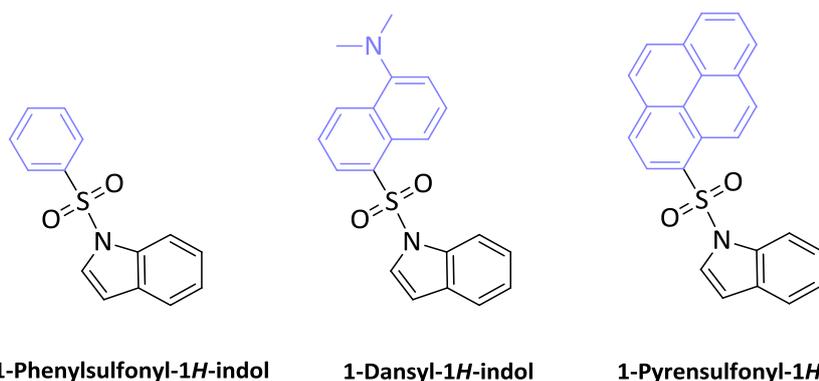


Abbildung 53: Unterschiedliche Sulfonyl Schutzgruppen: 1-Phenylsulfonyl-1*H*-indol, 1-Dansyl-1*H*-indol und 1-Pyrenylsulfonyl-1*H*-indol wurden untersucht.

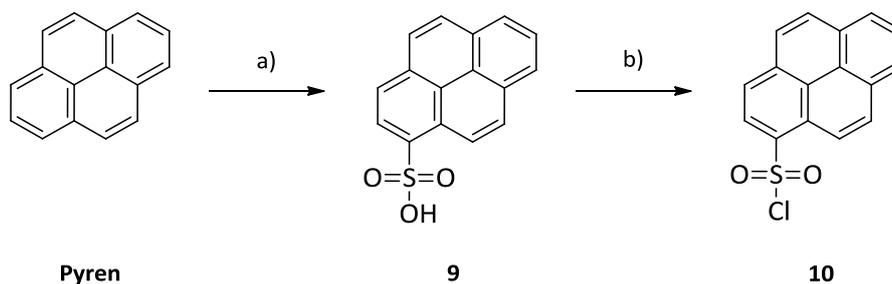
1-Phenylsulfonyl-1*H*-indol ist kommerziell erhältlich, daher sind im Folgenden die Synthesen von 1-Dansyl-1*H*-indol und 1-Pyrenylsulfonyl-1*H*-indol beschrieben.

Synthese der Elektronenakzeptoren 1-Dansyl-1H-indol und 1-Pyrensulfonyl-1H-indol

Dansylchlorid **8** wurde kommerziell erworben.

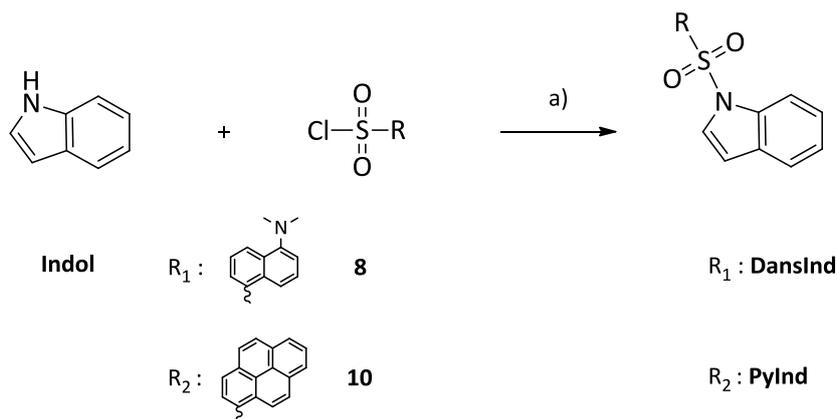
Pyren wurde zuerst in Nitrobenzol gelöst und durch die Zugabe konzentrierter Schwefelsäure, wurde die Sulfonsäure **9** als Feststoff präzipitiert. Dieser wurde in 1 M HCl Lösung umkristallisiert und mit 24 % Ausbeute erhalten.

Die Sulfonsäure **9** wurde mit Phosphorpentachlorid vermengt und anschließend auf 60 °C über Nacht erwärmt. Das Sulfonsäurechlorid **10** konnte mit einer Ausbeute von 11 % erhalten werden (Schema 2).



Schema 2: Syntheschema von Pyren-1-sulfonsäurechlorid **10** a) H_2SO_4 , NO_2Ph , R. T., 24 % b) PCl_5 , 60 °C, ü. N., 11 %.

Die jeweiligen Schutzgruppen am Indol-Stickstoff wurden durch die Reaktion des Säurechlorids mit Indol eingebracht. Dansylchlorid **8** wurde entsprechend wie Pyrensulfonylchlorid **10** (Schema 3) mit Indol, TEBA und NaOH als Base in DCM gelöst und über Nacht gerührt. Die Ausbeuten variierten zwischen 54 % (**DansInd**) und 45 % (**PyInd**). Die geringe Ausbeute lässt sich durch den nicht vollständigen Umsatz und die damit erschwerte chromatographische Reinigung erklären.



Schema 3: Syntheschema der Indol Schützung a) TEBA, NaOH, CH_2Cl_2 , R. T., ü. N., R_1 : 54%, R_2 : 45 %.

Die dargestellten Elektronenakzeptoren **DansInd** und **PyInd** wurden für die nachfolgenden Vorversuche eingesetzt.

2.3.3 Vorversuche zu Elektronentransfersystemen

Um ein geeignetes Elektronendonator/-akzeptor System für die Inkorporation in DNA zu finden sowie die Abspaltbedingungen der Schutzgruppe des Elektronenakzeptors aufzuklären, wurden Vorversuche mit den in Kapitel 2.3.2 dargestellten sulfonylischen Akzeptoren in Anwesenheit des Elektronendonors 1-(*N,N*-Dimethylamino)-pyren **DIMAP** durchgeführt. Mit einem Oxidationspotential im angeregten Zustand von $E_{\text{Ox1}^*}(\text{DIMAP}^*/\text{DIMAP}^{**}) = -2.2 \text{ V}$ gegen $\text{NHE}^{[81]}$, bietet sich **DIMAP** als Elektronendonator für die Indolderivate an ($E_{\text{Red}}(\text{RSO}_2\text{Ind}/\text{RSO}_2\text{Ind}^{\cdot-}) < \text{ca. } -1.9 \text{ V}$ gegen $\text{NHE}^{[165-166]}$). Für den EA **PhSO₂Ind** wurde ein Potential von $E_{\text{Red}}(\text{PhSO}_2\text{Ind}/\text{PhSO}_2\text{Ind}^{\cdot-}) = -1.9 \text{ V}$ bestimmt.

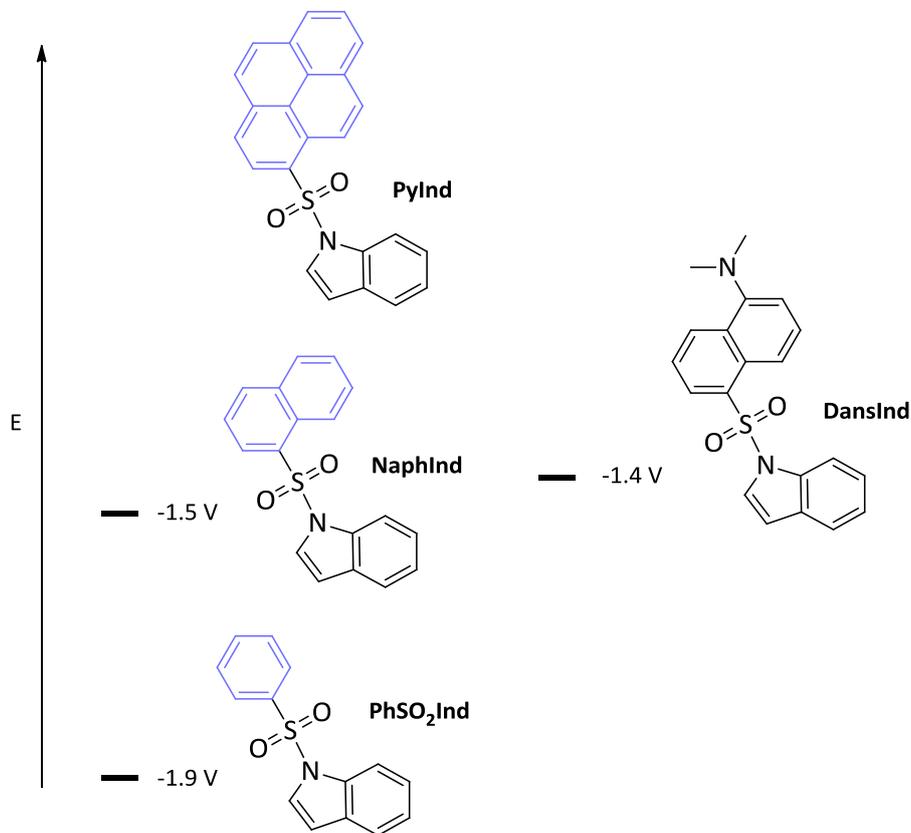


Abbildung 54: Potentialschema der verschiedenen Elektronenakzeptoren.

Dahingegen wurde das Reduktionspotential von **DansInd** durch das erweiterte π -System sowie den elektronenschiebenden Dimethylamino-Substituenten, mit einem Wert von -1.4 V bestimmt. Dies erhöht die Triebkraft nach Rehm-Weller (Gleichung (9)) von $\Delta G_{\text{DIMAP}/\text{PhSO}_2\text{Ind}} = -0.3 \text{ eV}$ auf $\Delta G_{\text{DIMAP}/\text{DansInd}} = -0.8 \text{ eV}$. Für das Reduktionspotential von **PyInd** kann angenommen werden, dass es unter dem Wert für 1-Naphthalensulfonylindol **NaphInd** liegt da sich das Reduktionspotential von **PhSO₂Ind** zu **NaphInd**, mit der Expansion des π -Systems von $E_{\text{Red}}(\text{PhSO}_2\text{Ind}/\text{PhSO}_2\text{Ind}^{\cdot-}) = -1.9 \text{ V}$ auf $E_{\text{Red}}(\text{NaphInd}/\text{NaphInd}^{\cdot-}) = -1.5 \text{ V}$ verringert.^[166] Die unterschiedlichen Potentiale wurden in Abbildung 54 dargestellt.

Für die Vorversuche wurden **DIMAP** und die Sulfonylindol-Derivate **PhSO₂Ind**, **DansInd** und **PyInd**, wenn nicht anders beschrieben in Acetonitril gelöst, und der Donor mit unterschiedlichen Lichtquellen angeregt. Der erfolgte Elektronentransfer bzw. die damit einhergehende Entschützung wurde mittels GCMS und Absorptions- bzw. Emissionsmessungen verfolgt. Alle durchgeführten Belichtungen sind in Kapitel 5.4.1 genau beschrieben.

DIMAP und PhSO₂Ind

78

Die in Abbildung 55 dargestellten spektralen Eigenschaften des Elektronendonors **DIMAP**^[81] und des Elektronenakzeptors **PhSO₂Ind** in Acetonitril zeigen die Möglichkeit der selektiven Anregung von **DIMAP** im Bereich zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 320$ nm und 400 nm neben **PhSO₂Ind**. Wird **DIMAP** im Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm (S_0 - S_2 -Übergang) angeregt, emittiert der ED mit $\lambda_{\text{em}} = 437$ nm. Die Fluoreszenz von **PhSO₂Ind** bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm wird bei einem Maximum von $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm detektiert.

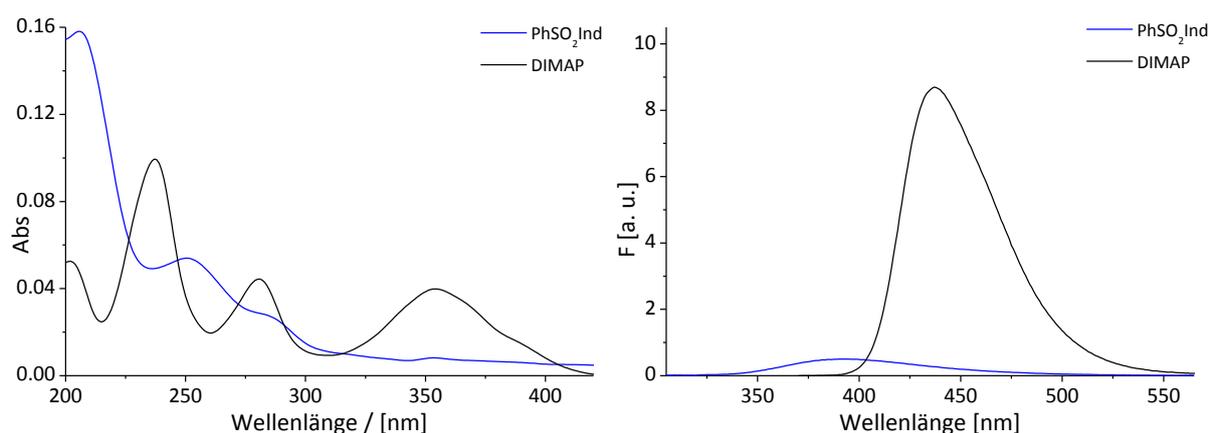


Abbildung 55: links: Absorptionsspektren von PhSO₂Ind und DIMAP, jeweils 2,5 μM in MeCN, rechts: Emissionsspektren von PhSO₂Ind 2,5 μM in MeCN und DIMAP 2,5 μM in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, Slits 4.

Um den Donor bei $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm anregen zu können, wurden mehrere Lichtquellen verwendet: Eine 75 W Xe Lampe mit einem 345 nm *cutoff* Filter und für die spätere Quantifizierung der Belichtungen ein System aus zwei 365 nm LEDs (Kapitel 5.4.1), in dem auch die Temperatur konstant gehalten werden konnte.

Um einschätzen zu können, ob der Elektronentransfer zwischen **DIMAP** und **PhSO₂Ind** in Lösung stattfindet, wurden Fluoreszenzlöschungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde die Fluoreszenz des Donors in Ab- (F_0) und Anwesenheit (F) unterschiedlicher Akzeptor-Konzentrationen gemessen und der mit der Anwesenheit des EA einhergehende Abfall der Fluoreszenz bestimmt. Mit einer Auftragung nach Stern-Vollmer:

$$\frac{F_0}{F} - 1 = K_{SV} \cdot c(\text{PhSO}_2\text{Ind})$$

ergibt sich für die in Abbildung 56 dargestellten, gelöschten Fluoreszenzen von **DIMAP** eine Stern-Vollmer Konstante von $K_{SV} = 26.9 \text{ mM}^{-1}$.

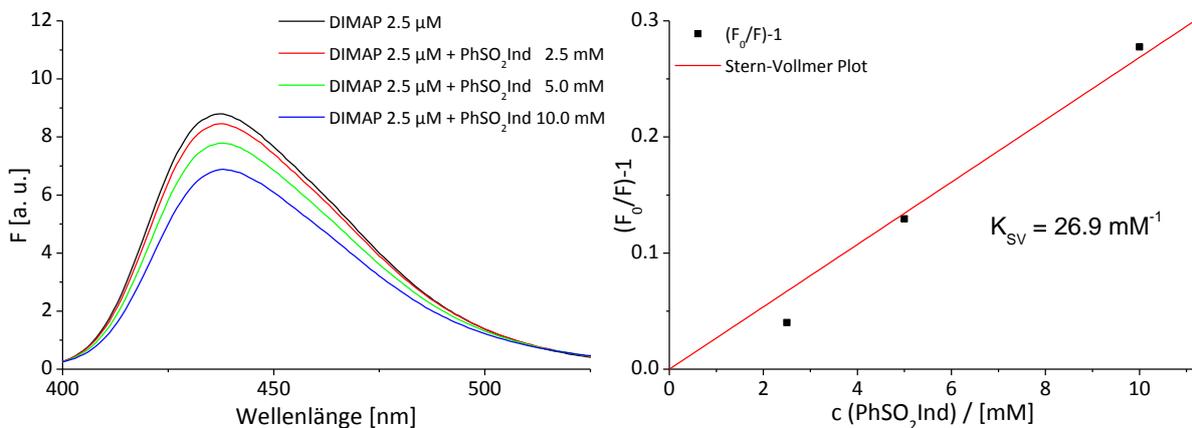


Abbildung 56: links: Fluoreszenzabnahme durch Zugabe unterschiedlich hoher Akzeptor Konzentrationen, $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, Slits 4; rechts: 2.5 µM Indol, PhSO₂Ind und DIMAP, $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$, Slits 4.

Im einfachsten untersuchten System wurden ED und EA in Acetonitril gelöst, in einer Küvette belichtet (Belichtung 1, Tabelle 33). Nach unterschiedlichen Zeitabständen wurde eine Probe für die GCMS-Analyse entnommen und die Absorption bzw. die Emission der Belichtung zum Zeitpunkt $t = x \text{ min}$ gemessen. Bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ sollte bei stattfindendem Elektronentransfer die Indolfluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$ ansteigen. Um den Elektronendonator während der Belichtung zu untersuchen, wurde auch ein Emissionsspektrum bei $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ aufgenommen. Die Ab- oder Zunahme der Fluoreszenz des Donors bei $\lambda_{\text{em}} = 438 \text{ nm}$ gibt einen Hinweis, ob der ED während der Belichtung zersetzt wird. Jedoch ergab die spektroskopische Auswertung, sowie die Analyse von Belichtung 1 (Tabelle 33) durch GCMS, dass in diesem System kein Indol generiert wird und damit auch kein Elektronentransfer stattfindet. Nach 120 min Belichtungszeit sind lediglich noch Anteile des EA vorhanden, jedoch kein ED, was auf keinen Umsatz hinweist. Bei der spektroskopischen Verfolgung des Donors während der Belichtung sinkt das Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{em}} = 438 \text{ nm}$ sowie das Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{abs}} = 355 \text{ nm}$ (Abbildung 57). Dies legt die Vermutung nahe, dass der ED nach der Elektronenabgabe nicht wieder regeneriert werden kann, er damit aus dem Elektronentransfersystem ausscheidet und die Abspaltung der Schutzgruppe unterbunden wird.

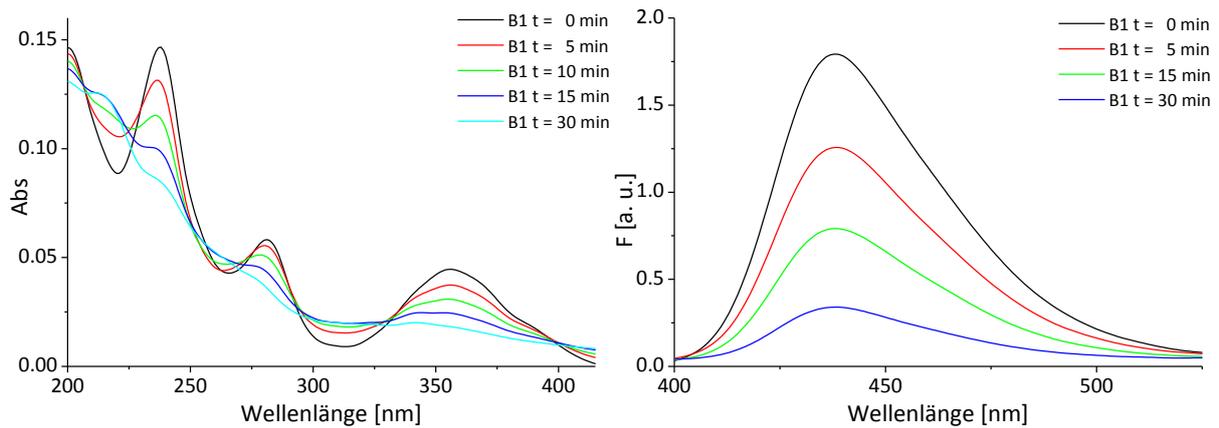


Abbildung 57: Belichtung 1; links: Absorptionsspektrum; rechts: entsprechendes Fluoreszenzspektrum (2.5 μM DIMAP/PhSO₂Ind in MeCN, 75 W Xe-Lampe 345 nm cutoff, $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, Slits 2).

Um den ED während der Belichtung wiederherstellen zu können, wurden dem System sogenannte Opfermoleküle zugefügt. Elektronenreiche Amine wie Triethylamin NEt_3 und Triethanolamin $\text{N}(\text{EtOH})_3$, sollten den oxidierten ED wie in Abbildung 58 dargestellt, durch die Wiederaufnahme eines Elektrons regenerieren.

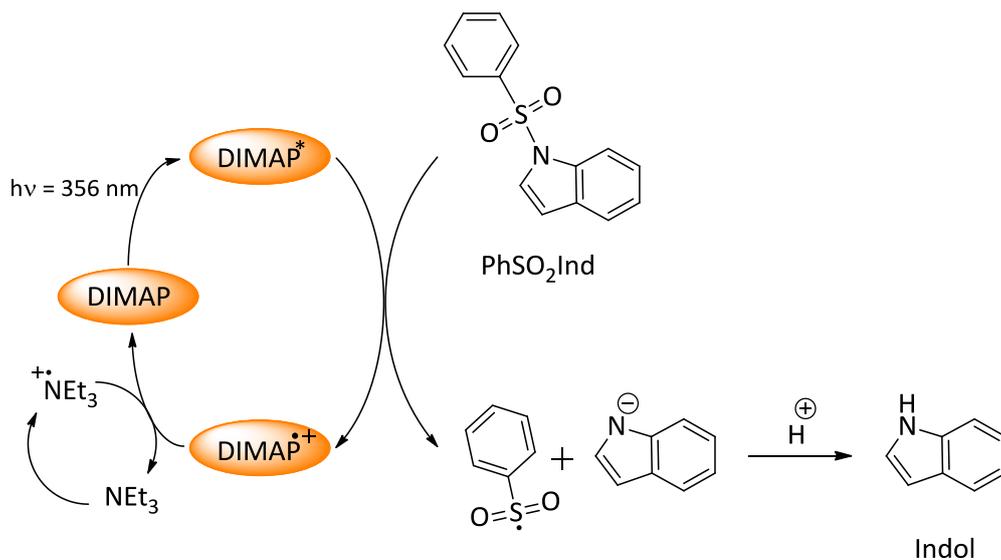


Abbildung 58: Vorgeschlagerener Mechanismus für die Regeneration des Elektronendonors DIMAP nach der Elektronenabgabe, durch Triethylamin.^[167]

Das Elektronentransfersystem wurde in Gegenwart von 200 eq. NEt_3 (Belichtung 2, Tabelle 33) bzw. $\text{N}(\text{EtOH})_3$ (Belichtung 3) getestet. Nach der Belichtung dieser Systeme wurde bei den GCMS Messungen die Masse des Reaktionsprodukts Indol von $M = 117$ g/mol detektiert. Es konnten keine Edukte mehr nachgewiesen werden, was den vollständigen Umsatz des Systems belegt. Durch die Quantifizierung über GC-FID konnten Indol-Ausbeuten für die Belichtung 2 von 77 % (+ NEt_3) und für die Belichtung 3 von 78 % (+ $\text{N}(\text{EtOH})_3$) bestimmt werden. Damit zeigt sich, dass die Wirkung der beiden Opfermoleküle auf das EET-System vergleichbar ist.

Für die spektroskopische Detektion des Elektronentransfers wurde im System **DIMAP/PhSO₂Ind/N(EtOH)₃** der Anstieg der Fluoreszenz des Produktes Indol gewählt. Mit einer Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ ist die Detektion von Indol für die Untersuchung des Konzeptes gut neben **DIMAP** und **PhSO₂Ind** zu bestimmen, da es zu keiner Überlagerung der Absorptionsmaxima kommt. In Abbildung 59 sind die Emissionen der einzelnen Komponenten des ET-Systems bei dieser Anregung dargestellt. Wie dort zu erkennen ist, sollte bei einem erfolgreichen Elektronentransfer die Emission des EA bei $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$ sinken, wobei die Emission des Produkts bei $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$ ansteigen sollte. In der DNA ist diese Detektion nicht möglich, da die Absorption der natürlichen Nukleobasen die Absorption des Indols überlagern würde.

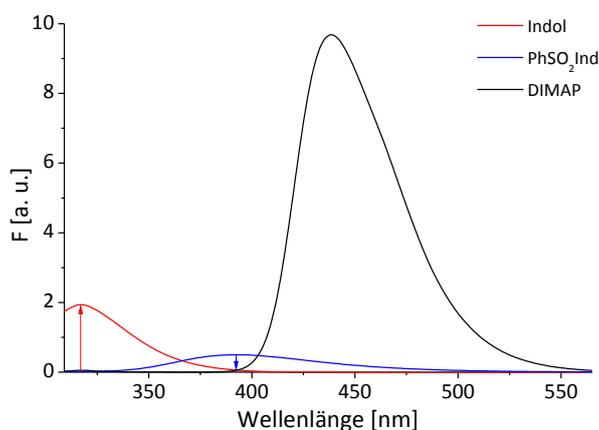


Abbildung 59: 2.5 μM DIMAP, PhSO₂Ind und Indol in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$, Slits 4.

Für die optische Verfolgung von Belichtung 3 (Tabelle 33) wurden daher **DIMAP** und **PhSO₂Ind** in MeCN sowie 200 eq. N(EtOH)₃ für 120 min bei 20 °C belichtet. In Abbildung 60 wird (im links dargestellten Spektrum) die Emission der Belichtung bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ im zeitlichen Verlauf der Belichtung gezeigt. Durch das Ansteigen der Emissionsbande bei $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$ wird ersichtlich, dass die Entschützung des EA stattfindet und das dadurch gebildete Indol emittiert. Dies ist auch durch die Abnahme der Akzeptor-Emission bei $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$ zu sehen. Nach 60 min Belichtungszeit endet die Indol-Bildung. Das Emissionsspektrum des ED (rechts in Abbildung 60) bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, zeigt, dass die zugeführten Opfermoleküle **DIMAP** regenerieren, da sich die Spezies auch nach einer Belichtungszeit von 120 min nur sehr wenig verringert (im Vergleich zu Belichtung 1, Abbildung 57). Diese Indizien wurden durch GCMS Messungen verifiziert. Bei diesen konnte auch vollständiger Umsatz des EA erreicht werden sowie eine Ausbeute von ca. 78 % (Belichtung 3, Tabelle 33).

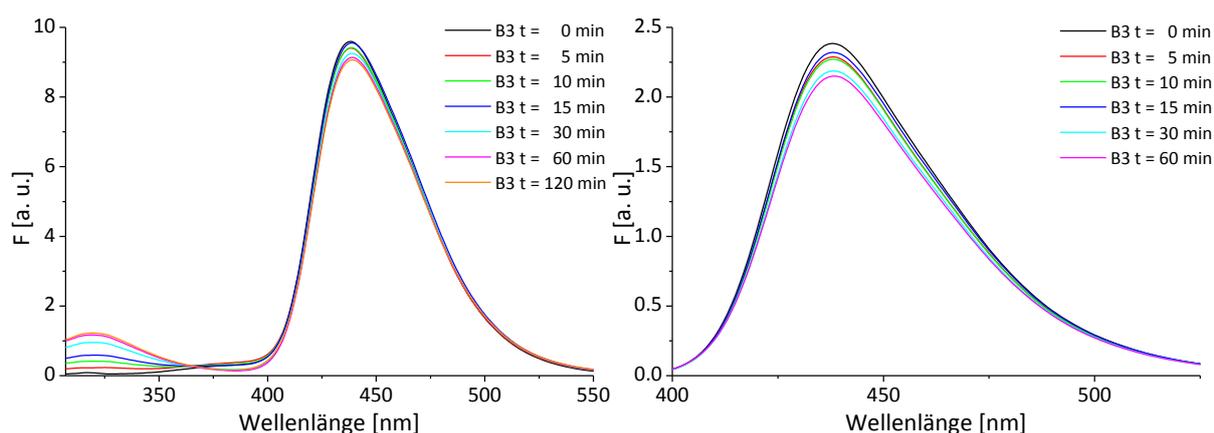
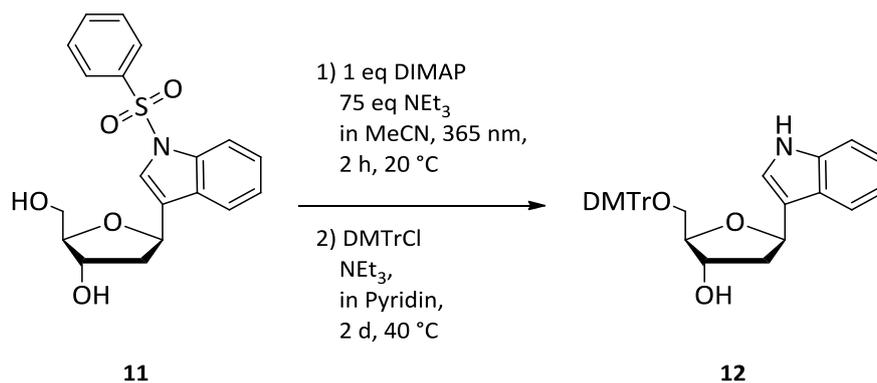


Abbildung 60: Links: Emission, $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$, Slits 4, rechts: Emission ED, $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, Slits 2. Aus Belichtung 3: 12.5 mM DIMAP und PhSO₂Ind und 200 eq. N(EtOH)₃, 75 W Xe-Lampe, 345 nm cutoff Filter, Proben für UV/VIS auf 2.5 μM verdünnt.

Um zu überprüfen, ob die Abspaltung der Schutzgruppe nicht durch die direkte Bestrahlung von PhSO₂Ind zustande kommt, wurde bei Belichtung 4 und B5 der ED nicht eingesetzt. Damit wurden 2 mM PhSO₂Ind mit jeweils 200 eq. NEt₃ und N(EtOH)₃ belichtet. Die GCMS Messungen ergaben jedoch keinen Umsatz. Ebenso sollte untersucht werden, ob DIMAP auch in substöchiometrischem Einsatz die Reaktion katalysiert. So wurden für Belichtung 6 und B7 jeweils 2mM PhSO₂Ind und 200 eq. NEt₃ einmal nur mit einem Äquivalent und einmal mit 0.2 eq. DIMAP versetzt und belichtet. Neben vollständigem Umsatz konnte bei Belichtung 6 eine Ausbeute von 87 % erreicht werden, die höher liegt als die der Reaktion mit substöchiometrisch zugegebenem DIMAP. Werden hingegen nur 0.2 eq. des ED genutzt, kommt es zu keinem vollständigen Umsatz mit nur 30 % Ausbeute, siehe Tabelle 33.

Es sollte auch in einem präparativen Ansatz untersucht werden, ob die Entschützung der Amine von Sulfonylen mit lichtinduziertem Elektronentransfer den Einsatz starker Basen oder Säuren ersetzen könnte. Dazu wurden 100 mg 1-Phenylsulfonylindol-Nukleosid **11** mit 75 eq. NEt₃ und 1 eq. DIMAP in Acetonitril für 2 h mit einer 365 nm LED bei 20 °C belichtet. Der Umsatz der Reaktion war bereits durch Dünnschichtchromatographie ersichtlich, da jedoch die Aufreinigung dieses Schrittes nicht zum gewünschten Produkt führte, wurde direkt nach der lichtinduzierten Reaktion das Nukleosid an der 5'-OH-Gruppe DMTr geschützt (Schema 4). Anschließend verlief die Reinigung über FC mit einer Ausbeute von 49 %.



Schema 4: Präparativer Ansatz der Entschützung von PhSO₂Ind-Spezies, 49 % in 2 Schritten aus **11**.

Es konnte so ein weiteres C-Nukleosid **12** generiert werden, in diesem Fall ein Elektronenlochakzeptor, der mit der Anbringung der zuvor dargestellten Sulfonyl-Schutzgruppen einen in seinen Eigenschaften sehr variablen Elektronenakzeptor darstellt. Ebenso könnte das Nukleosid **12** nach einer weiteren synthetischen Stufe zum Phosphoramidit, in die DNA eingebaut werden und dort als Lochakzeptor fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Sulfonylschutzgruppe über einen Elektronentransfer ohne die Nutzung starker Säuren oder Basen abgespalten werden konnte.

DIMAP und DansInd

Entsprechend der Entschützung von **PhSO₂Ind** wurde die Desulfonylierung von **DansInd** (EA) mit dem Elektronendonator **DIMAP** untersucht. In Abbildung 61 wurde im linken Spektrum die Absorption von **DansInd** und **DIMAP** dargestellt. Es fällt auf, dass **DansInd** nicht wie **PhSO₂Ind** selektiv neben **DIMAP** angeregt werden kann, jedoch ist der Extinktionskoeffizient bei $\lambda_{\text{abs}} = 355 \text{ nm}$ wesentlich geringer als der des ED. Im rechts davon dargestellten Emissionsspektrum von ED und EA ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz von **DansInd** mit einem Maximum von $\lambda_{\text{exc}} = 577 \text{ nm}$ gut neben **DIMAP** ($\lambda_{\text{em}} = 438 \text{ nm}$) detektierbar ist.

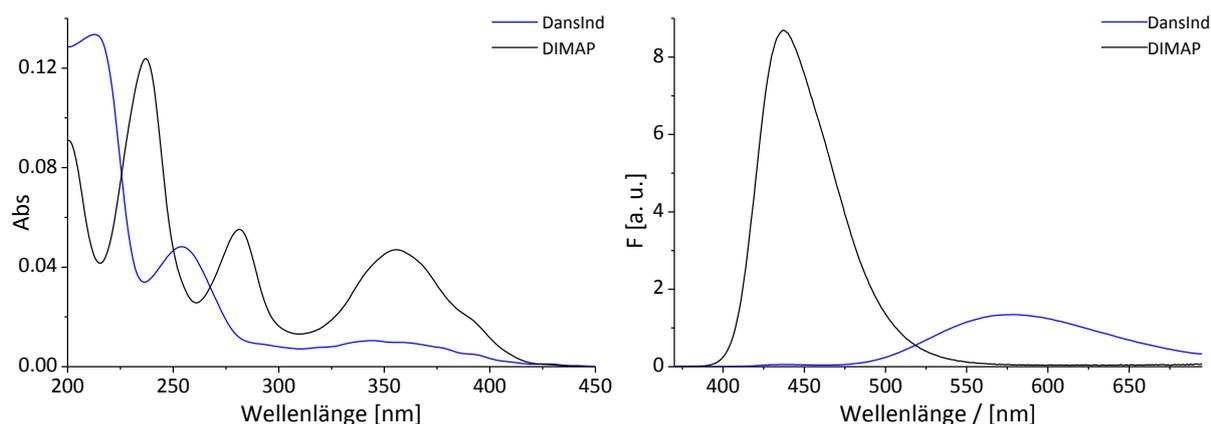


Abbildung 61: links: Absorptionsspektrum von 2.5 μM DIMAP und DansInd in MeCN, rechts: Emissionsspektrum von 2.5 μM DIMAP und DansInd in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, Slits 4.

Für Belichtung 8 (Tabelle 33) wurden **DIMAP** und **DansInd** mit 200 eq. $\text{N}(\text{EtOH})_3$ für 120 min belichtet. Diese wurde ebenfalls mittels GCMS und spektroskopisch über UV/Vis-Messungen charakterisiert. Der Elektronenakzeptor **DansInd** konnte mit der verwendeten GCMS-Methode nicht detektiert werden, daher konnte auch der Umsatz der Reaktion nicht bestimmt werden. Nach einer Belichtungszeit von 120 min konnte die Masse des erwarteten Produkts Indol aber trotzdem qualitativ nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine weitere Spezies mit einer Masse von $M = 171.1 \text{ g/mol}$ detektiert werden, was der Masse von *N,N*-Dimethylaminonaphthalin **DMAN**, der abgespaltenen Schutzgruppe des **DansInds**, entspricht (Abbildung 62).

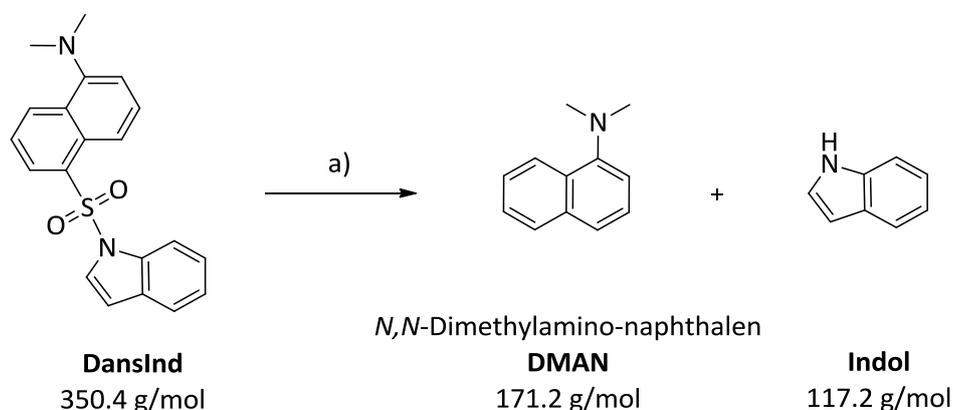


Abbildung 62: Belichtung 8 von DansInd mit nachgewiesenen Produkten (GC-MS) a) 2 mM DIMAP/DansInd, 200 eq. $\text{N}(\text{EtOH})_3$, 2*365 nm LED, 120 min, 20 °C.

Da bei der Belichtung mit $\lambda = 365 \text{ nm}$ LEDs auch der Elektronenakzeptor selbst angeregt wird, wurde untersucht, ob die Entschützung auch ohne Elektronendonator stattfindet. Es wurden 2 mM **DansInd** mit 200 eq. $\text{N}(\text{EtOH})_3$ in MeCN für 120 min belichtet. Die Untersuchung der Reaktion mittels GCMS ergab, dass auch ohne den Elektronendonator kleine Mengen an Indol gebildet werden, jedoch konnte **DMAN** bei dieser Belichtung nicht detektiert werden. Das in Abbildung 63 links dargestellte Absorptionsspektrum von **DMAN** weist ein Maximum bei $\lambda_{\text{abs}} = 316 \text{ nm}$ auf, was im Gegensatz zu **DIMAP** und **DansInd** blauverschoben ist. Damit könnte der Anstieg der Absorption in diesem Bereich als Detektion für den erfolgreichen Elektronentransfer dienen.

Auch die Fluoreszenz von DMAN bei $\lambda_{em} = 415$ nm sollte als Anstieg einer Schulter neben DIMAP ($\lambda_{em} = 438$ nm) erkennbar sein (Abbildung 63, rechts).

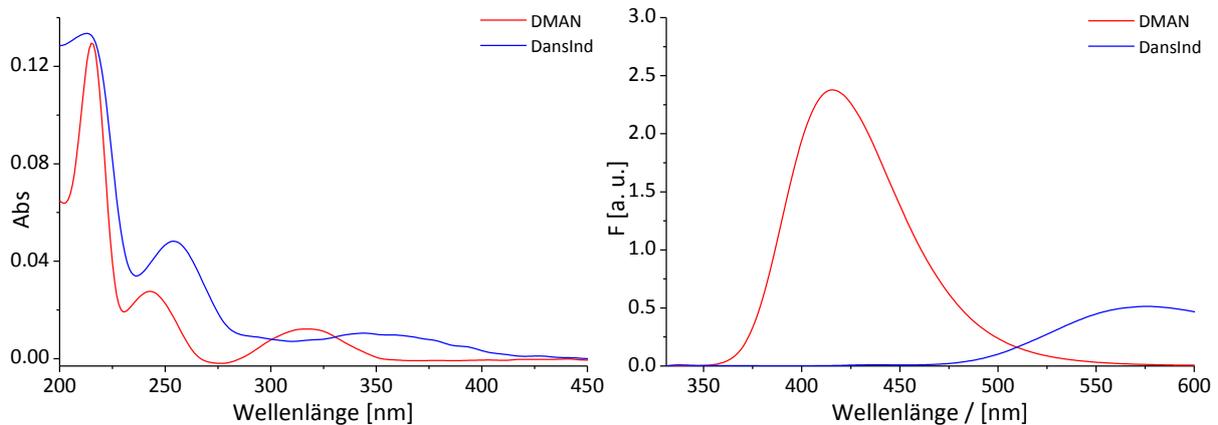


Abbildung 63: Vergleich der Absorption und Emission von DansInd und DMAN, links: 2.5 µM DMAN und DansInd in MeCN, rechts: Emission von 2.5 µM DansInd und DMAN bei $\lambda_{exc} = 316$ nm Anregung, Slits4.

Bei der spektroskopischen Untersuchung von Belichtung 8 konnte im Absorptionsspektrum, in Abbildung 64 links dargestellt, jedoch kein Anstieg der **DMAN**-Absorption bei $\lambda_{abs} = 316$ nm festgestellt werden. Jedoch wurde ersichtlich, dass die Absorptionsbande bei $\lambda_{abs} = 355$ nm nach 30 min Belichtungszeit verschwindet, was bedeutet, dass der ED **DIMAP** keine weiteren Elektronen mehr abzugeben vermag und damit die Reaktion zum Erliegen kommt. Auch die Zugabe von Opfermolekülen verhindert dies nicht. Die sensitivere Emissionsmessung (Abbildung 64 rechts) zeigt den vollständigen Abbau des ED durch die Abnahme der Fluoreszenz bei $\lambda_{em} = 438$ nm. Nach 30 min Belichtungszeit ist die Emission von **DansInd** noch bei $\lambda_{em} = 577$ nm zu beobachten, jedoch ist nach 60 min auch der EA nicht mehr vorhanden, obwohl kein **DIMAP** mehr an der Reaktion beteiligt ist. Da kein Anstieg der Emissionsbande bei $\lambda_{em} = 415$ nm zu erkennen ist, wird davon ausgegangen, dass sich **DansInd** im Verlauf der restlichen Belichtung zersetzt.

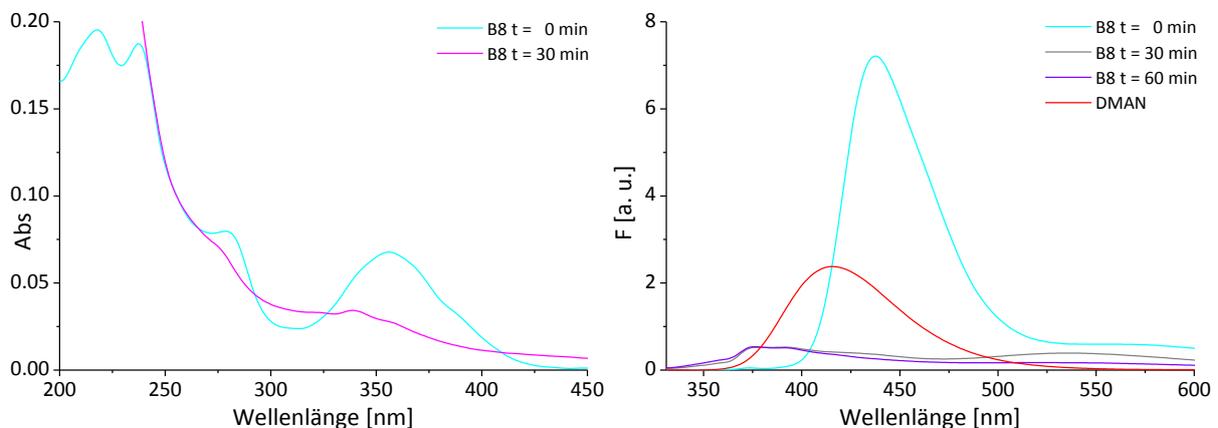


Abbildung 64: Belichtung 8; 2.5 µM DIMAP/DansInd mit 200 eq. $N(EtOH)_3$ in MeCN, 2·365 nm LEDs, 60 min, 20 °C. Links: Absorptionsspektrum im zeitlichen Verlauf, rechts: Emissionsspektrum der Belichtung, Anregung bei 316 nm, Slits 4.

Durch die spektrale Auswertung wird klar, dass selbst im Falle einer Reaktion mit massenspektrometrisch nachgewiesenen Produkten, diese nicht immer auch über UV/Vis Messungen detektiert werden können. Die Zersetzung der Produkte durch das Anregungslicht oder radikalische Folgereaktionen könnten der Grund hierfür sein.

DIMAP und PyInd

86

Um einen besseren Einblick in das neue Elektronentransfersystem zu bekommen, wurden zuerst die spektralen Eigenschaften von **DIMAP** (ED) und 1-*N*-Pyrensulfonylindol **PyInd** (EA) betrachtet.

Die im Absorptionsspektrum von **PyInd** (Abbildung 65 links, blau) dargestellte Absorptionsbande bei $\lambda_{\text{abs}} = 353 \text{ nm}$ ($S_0 - S_2$ Übergang) hat im Vergleich zu Pyren die vibronische Feinstruktur fast vollständig verloren. Wie bei **DIMAP** bilden sich auch hier ladungsgetrennte Zustände, die neben den angeregten Zuständen vorliegen. Im Vorfeld war auffällig, dass zwischen sulfonylgebundenem Dimethylaminonaphthalen im **DansInd** und dem freien Dimethylaminonaphthalen **DMAN** ein großer spektraler Unterschied existiert. So ist das Absorptionsmaximum von **DansInd** bei $\lambda_{\text{abs}} = 355 \text{ nm}$ um 39 nm im Vergleich zu **DMAN** bathochrom verschoben. Die Betrachtung von Benzol^[168] und **PhSO₂Ind** zeigt ebenso eine Rotverschiebung um ungefähr 35 nm durch die Sulfonylindol-Einheit. Die Emissionsspektren weisen dadurch ebenso bathochrom verschobene Fluoreszenzmaxima auf. Hier liegt der Unterschied bei 112 nm zwischen Benzol/**PhSO₂Ind** und bei 161 nm zwischen **DMAN/DansInd**. Werden jedoch die spektralen Daten von Pyren mit **PyInd** verglichen, fällt auf, dass die Emissionsmaxima von **PyInd** (Abbildung 65, rechts) bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ direkt auf denen des Pyrens liegen. Sie liegen bei $\lambda_{\text{em}} = 382 \text{ nm}$, 399 nm und 420 nm. Das und die Tatsache, dass das Absorptionsmaximum von Pyren bei $\lambda_{\text{abs}} = 340 \text{ nm}$ nur um ca. 10 nm im Gegensatz zu **PyInd** verschoben ist, könnte ein Indiz für ein elektronisch schwächer gekoppeltes System zwischen Indol und Pyren sein. Dies wäre ein Indiz für eine schnelle Ladungsinjektion (Vergl. Kapitel 2.1.5: **1PydU** vs. **2PydU**). Die breite Fluoreszenzbande bei ca. $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ weist auf eine Excimerbildung der **PyInd** Moleküle hin.^[169]

Wird der Extinktionskoeffizient von **PyInd** in Abbildung 65 mit dem von DIMAP verglichen, wird ersichtlich, dass bei einer Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ vor allem der Elektronenakzeptor selbst angeregt wird.

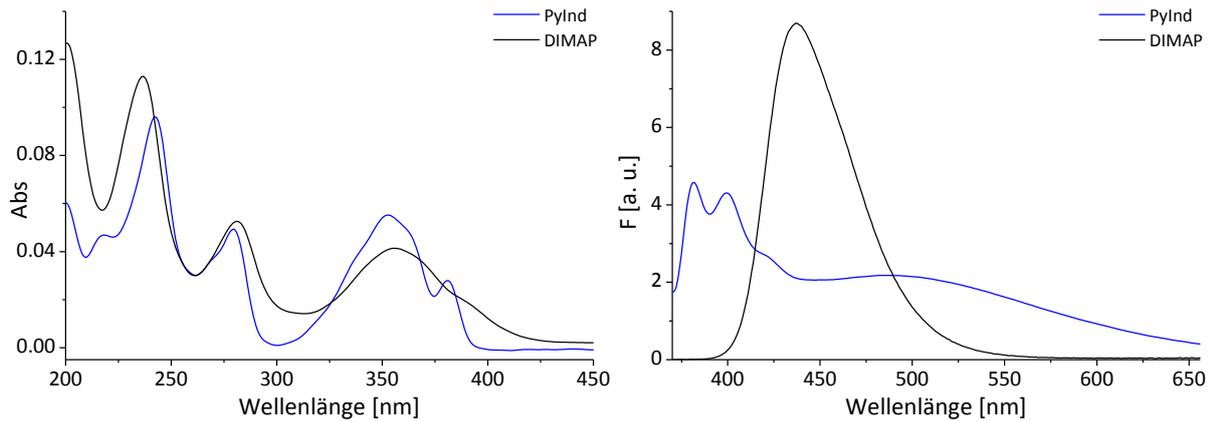


Abbildung 65: Absorption (links) und Emission (rechts, $\lambda_{exc} = 355$ nm, Slits 4) von DIMAP und PyInd, 2.5 μ M in MeCN.

Bei der Belichtung von **DIMAP** und **PyInd** 2.5 μ M in MeCN für 2 h (Belichtung 9), kann beobachtet werden, dass die Reaktion nach dem ersten Messpunkt $t = 30$ min stagniert. Die Absorption nach 30 min zeigt wieder eine Feinaufspaltung beim $S_0 - S_2$ Übergang, sowie bei $S_0 - S_3$. Diese Maxima entsprechen denen von Pyren. Die Emission der Belichtung bei $\lambda_{exc} = 355$ nm Anregung zeigt eine fast vollständige Zersetzung des EDs nach 30 min, geringe Anteile zeigen sich in der Schulter bei $\lambda_{em} = 438$ nm.

Jedoch kann auch eine erfolgreiche Entschützung vermutet werden, da in Abbildung 66 (rechts) das dargestellte Fluoreszenzspektrum einen Anstieg bei $\lambda_{em} = 382$ nm zeigt. Da **PyInd** und Pyren die gleichen Emissionsmaxima besitzen, kann nur mit den Fluoreszenzintensität bei $t = 0$ min und nach einer Belichtungszeit von 30 min argumentiert werden, nicht aber mit einer gewünschten Verschiebung der Maxima. Die Fluoreszenz von Pyren könnte in Anwesenheit von Indol vermindert vorliegen und durch die erfolgte Abspaltung von Indol wieder zunehmen. Jedoch könnte dies auch durch die unselektive Belichtung des Akzeptors selbst geschehen. Nach einer Belichtungszeit von 30 min nimmt die Fluoreszenz von **PyInd** weiter ab, was eine Zerstörung des EA durch das Anregungslicht vermuten lässt.

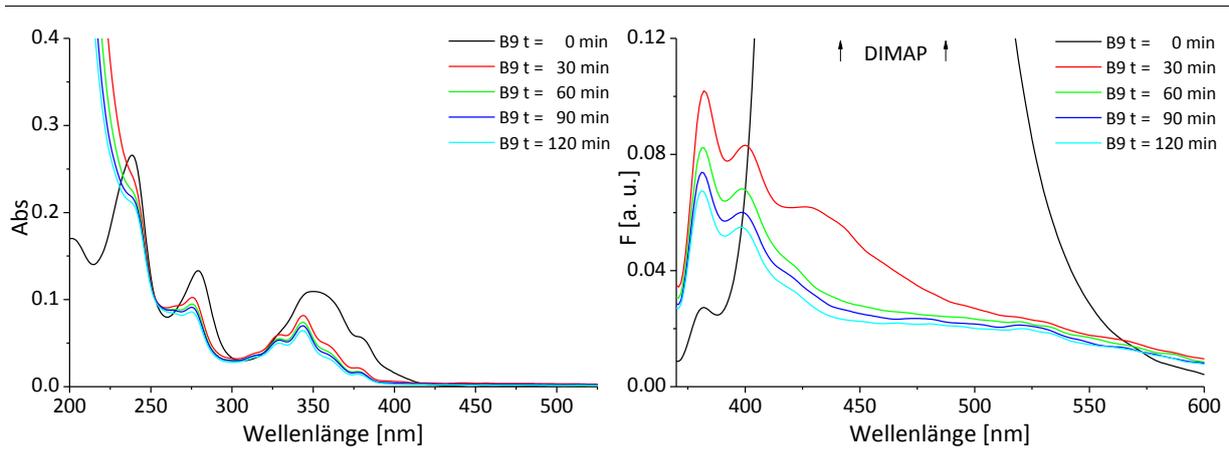


Abbildung 66: Belichtung 9: 2.5 μ M DIMAP und PyInd in MeCN, 2·365 nm LED, 120 min, 20 °C. Absorption- (links) und Emissionsspektren (rechts, 355 nm, Slits 2)

Bei der Analyse der Belichtung durch GCMS konnte weder **PyInd** vor der Bestrahlung noch Indol oder Pyren nach der Bestrahlung nachgewiesen werden.

Zwar wäre im Fall dieses ET-Systems aus **PyInd** und **DIMAP** eine optische Detektion möglich, jedoch konnte kein massenspektrometrischer Beweis der erfolgreichen Abspaltung erbracht werden.

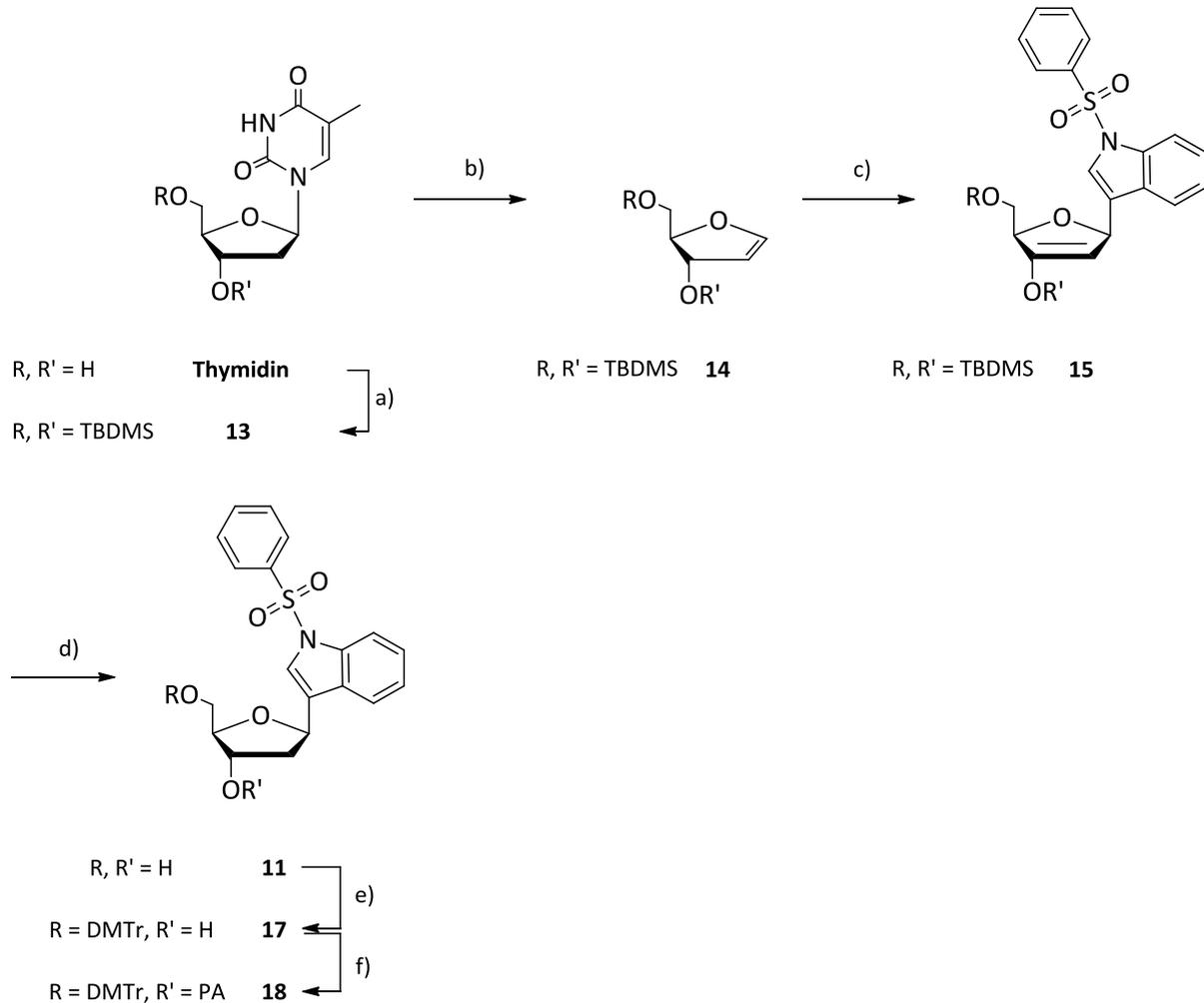
2.3.4 Elektronenakzeptoren in DNA

Die in Kapitel 2.3.3 durchgeführten Vorversuche von 1-Phenylsulfonyl-1*H*-indol **PhSO₂Ind**, 1-Dansyl-1*H*-indol **DansInd** und 1-Pyrensulfonyl-1*H*-indol **PyInd** mit **DIMAP** ergaben, dass die Systeme **PhSO₂Ind/DIMAP** und **DansInd/DIMAP** erfolgreich einen photoinduzierten Elektronentransfer durchführen, der durch die Masse des entstehenden Indols nachgewiesen werden konnte. Daher sollten Phenylsulfonylindol als C-Nukleosid und Dansylsulfonylindol über einen azyklischen Linker in DNA eingebracht werden. Im Folgenden wird die Synthese der Funktionalisierung für die automatisierte Festphasensynthese der beiden Bausteine beschrieben.

1-Phenylsulfonyl-1*H*-Indol Nukleosid **11**

Für die Synthese des C-nukleosidischen Elektronenakzeptorbausteins 1-Phenylsulfonyl-1*H*-indol Nukleosid **11** wurde zuerst kommerziell erhältliches Thymidin an den 5'- und 3'-Hydroxyfunktionalitäten mittels *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) und Imidazol in DMF bei Raumtemperatur über Nacht geschützt (Schema 5). Durch die säulenchromatographische Aufreinigung konnte das Produkt **13** nie als Feststoff erhalten werden. Jedoch konnte **13** nach Abschluss der Reaktion durch Extraktion der gebildeten Wasser-DMF-Phase mit Hexan zu 99 % erhalten werden. Anschließend folgte eine Eliminierungsreaktion der Thymin-Base durch Hexamethyldisilazan (HMDS) bei 150 °C über 5 h. Das zweifach TBDMS-geschützte Glykal **14** konnte durch FC gereinigt und mit 60 % erhalten werden. Durch die Abschirmung der TBDMS-Schutzgruppen konnte eine β -selektive Heck-Kupplung durchgeführt werden. 1-Phenylsulfonyl-1*H*-indol als 3-Bromspezies wurde durch eine C-C-Bindung mit dem Glykal **14** verbunden. Als geeignete Reaktionspartner erwiesen sich [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) als Katalysator, Triethylamin als Base, ein Lösungsmittelgemisch aus THF/Acetonitril 1/2 und eine Reaktionstemperatur von 90 °C. Durch die Optimierung dieser Parameter und durch den Transfer der Reaktion vom Kolben in ein geschlossenes Vial-System konnte die Ausbeute der Heck-Kupplung auf 62 % verbessert werden. Bei der Reaktion mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium Pd(PPh₃)₄ als Katalysator und Triethylamin in THF bei 90 °C konnten nur 30 % des gewünschten β -C-Nukleosids **15** erhalten werden. Anschließend wurden die beiden TBDMS-Schutzgruppen mittels Triethylamin-trihydrofluorid HF*NEt₃ in THF bei 0 °C – Raumtemperatur entfernt, da bei Nutzung von Tetrabutylammoniumfluorid TBAF als Standard-Fluoridquelle das Edukt **15** in nur 2 h fast vollständig zersetzt wurde (Verfolgung über DC).

Die ohne weitere Aufreinigung folgende Reduktion mit Natrium-triacetoxiborhydrid $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ in einem Essigsäure/Acetonitril 2/1 Gemisch für 1 h bei 0 °C führte zu 71 % des 1-Phenylsulfonyl-1*H*-indol Nukleosids **11**. Dies erfolgt ebenfalls selektiv durch die Vororganisation des Bors an das 5'-OH (Schema 5).



Schema 5: a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, R. T., ü. N. 99 % b) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 h, 150 °C, 60 % c) 3-Brom-1-Phenylsulfonyl-1*H*-indol, $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$, NEt_3 , THF/MeCN 1/2, 90 °C, ü. N., 62 % d₁) $\text{NEt}_3 \cdot \text{HF}$, THF, 0°C – R. T., ü. N. d₂) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, HOAc/MeCN 2/1, 0 °C, 1 h e) DMTrCl, abs. Pyridin, 40 °C, ü. N., 61 % f) PA-Cl, DIPEA, R. T., 30 min, >99 %.

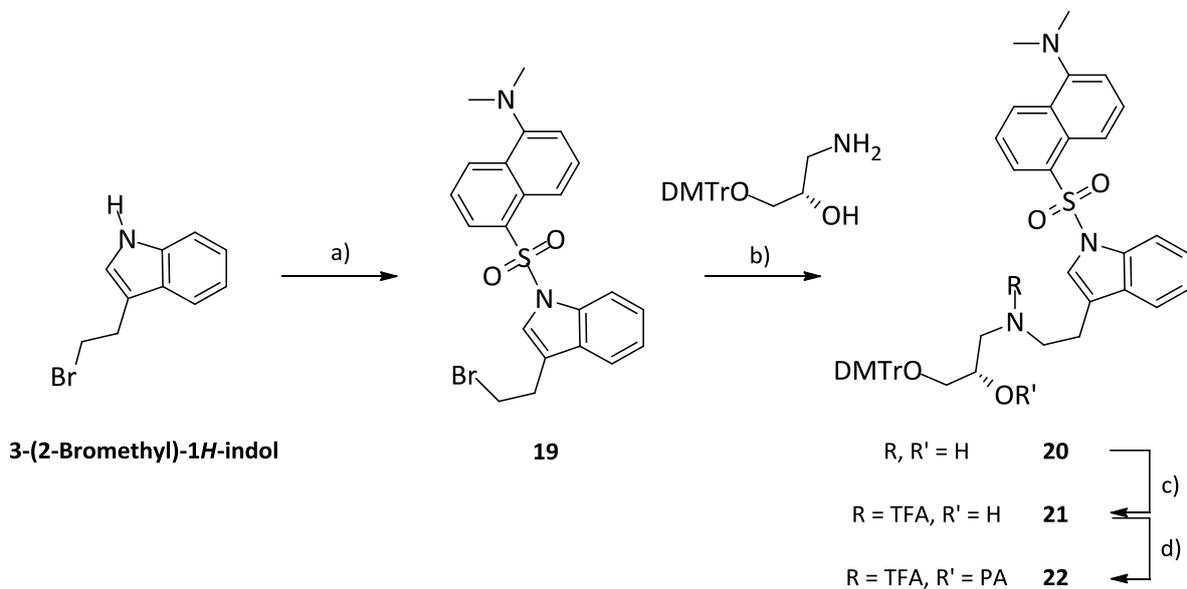
Um den Baustein für die DNA-Synthese weiter zu funktionalisieren, wurde die 5'-Hydroxygruppe mittels 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid DMTr-Cl in trockenem Pyridin über Nacht bei 40 °C geschützt, was mit einer Ausbeute von 61 % erfolgte. Das so erhaltene DMTr-geschützte Nukleosid **17** wurde mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-chlorophosphor-amidit PA-Cl und Diisopropylethylamin DIPEA bei Raumtemperatur in 30 min weiter umgesetzt. Durch rasche säulenchromatographische Aufreinigung konnte der für die automatisierte Festphasensynthese präparierte Phenylsulfonylindolbaustein **18** zu >99 % erhalten werden.

Der Einbau von **18** erfolgte, wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, über ein verändertes Standardprotokoll der automatisierten Festphasensynthese. Die Kupplungskonditionen wurden auf 112 μL einer 1 mM Lösung von **18** in MeCN erhöht, welche über einen Zeitraum von 1.60 min über das aktivierte CPG gepumpt wurden. Dadurch konnte der synthetische Baustein so effizient wie eine natürlich Base (Tritylmonitor: ca. 85 % von T) in die DNA eingebracht werden.

Dansyl-1H-Indol mit azyklischem Linker

Da die β -selektive Heckkupplung von Glycal **14** zum C-Nukleosid **15** sehr stark von den elektronischen Eigenschaften des Aglycons abhängig ist und damit ein Katalysator-, Lösungsmittel-, Liganden- und Reaktionstemperatur-Screening für die erfolgreiche Durchführung nötig geworden wäre, wurde versucht das Dansylindol über einen schnelleren Weg in die DNA einzubringen.

Ausgehend von 3-(2-Bromethyl)-1H-indol wurde mit Dansylchlorid und TEBA im Basischen zu **19** umgesetzt, wie schon in Kapitel 2.3.2 besprochen (Schema 6). Anschließend wurde ein in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelter und von *Andreas Dittmer* synthetisierter, azyklischer Linker durch eine nukleophile Substitution eingeführt. Der Linker besteht aus einem Dialkohol, der die Riboseinheit substituiert und damit in das DNA Rückgrat eingeführt werden kann, sowie einer Aminogruppe, die als Nukleophil fungiert. Die Reaktion verlief über 4 Tage und erfolgte mit 77 % zu **20**.



Schema 6: a) TEBA, NaOH, Dansylchlorid, DCM, R. T., ü. N., 89 % b) DIPEA, DMF, R.T., 4 d, 77 % c) Pyridin, Trifluoressigsäureanhydrid, R. T., 10 min d) PA-Cl, DIPEA, R. T., DCM, 0 °C, 30 min, 45 %.

Um bei der nötigen Phosphoramiditreaktion das Amin als Nukleophil zu unterdrücken, wurde dieses mittels Trifluoressigsäureanhydrid TFA geschützt. Da die Überprüfung der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie nach 10 min kein Edukt mehr zeigte und Trifluoressigsäureanhydrid sowie die entstehende Trifluoressigsäure im Vakuum mit dem Lösungsmittel entfernt werden können, wurde keine weitere Reinigung der Rohsubstanz und auch keine Ausbeutebestimmung vorgenommen. Um die Phosphoramiditfunktionalität in **21** einzubringen, wurde dieses in DCM gelöst und mit DIPEA und PA-Cl umgesetzt. Eine anschließende, schnelle säulenchromatographische Aufreinigung ergab das Produkt **22** zu 45 %.

92

Für die automatisierte DNA-Festphasen-Synthese wurden die Kupplungskonditionen wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, auf 160 μ L einer 1 mM Lösung von **22** in MeCN erhöht, welche über einen Zeitraum von 17.7 min über das aktivierte CPG gepumpt wurden. Jedoch konnte **22** nur mäßig gut eingebaut werden (Tritylmonitor: ca. 10 % zu T).

2.3.5 Belichtung von EET-Systemen in DNA

Um die in Kapitel 2.3.3 untersuchten Elektronendonator/Elektronenakzeptor Systeme in DNA untersuchen zu können, wurden die in Kapitel 2.3.4 dargestellten Elektronenakzeptoren in DNA eingebaut. Diese Oligonukleotide wurden mit Elektronendonator **DIMAPdU** modifizierten Oligonukleotiden hybridisiert. Die in diesem Kapitel genutzten **DIMAPdU** modifizierten Oligonukleotide (Abbildung 67) wurden von *Thomas Ehrenschwender* im Zuge seiner Doktorarbeit synthetisiert.^[81] Die hybridisierten Doppelstränge wurden über 120 min bestrahlt um den photoinduzierten Elektronentransfer zwischen ED und EA in der DNA optisch zu untersuchen.

DIMAPdU und 11

Die Phenylsulfonylindol modifizierten Einzelstränge **DNA27a** (Abbildung 67) wurden schon im Zuge der vorangehenden Masterarbeit synthetisiert und charakterisiert. In dieser Arbeit wurde auch die Fluoreszenzlöschung des Donors in Anwesenheit unterschiedlicher Akzeptor-Konzentrationen bestimmt, die der einzelnen Moleküle in Lösung (**DIMAP/PhSO₂Ind**) sowie die der Nukleoside im DNA Doppelstrang (**DIMAPdU/EB4**). Die Fluoreszenz des allein mit **DIMAPdU** modifizierten Doppelstrangs wurde, mit der des doppelt modifizierten (ED und EA) verglichen und die Fluoreszenzlöschung des Donors errechnet. Um eine Distanzabhängigkeit des EETs zu zeigen, wurden die Doppelstränge mit 3 unterschiedlichen Distanzen, von einer bis drei Basenpaaren (AT und GC) zwischen Donor und Akzeptor, wie in Abbildung 67 dargestellt, konzipiert. Elektronendonator und -akzeptor liegen nicht im gleichen Oligonukleotid vor, der Elektronentransfer soll somit intermolekular erfolgen.

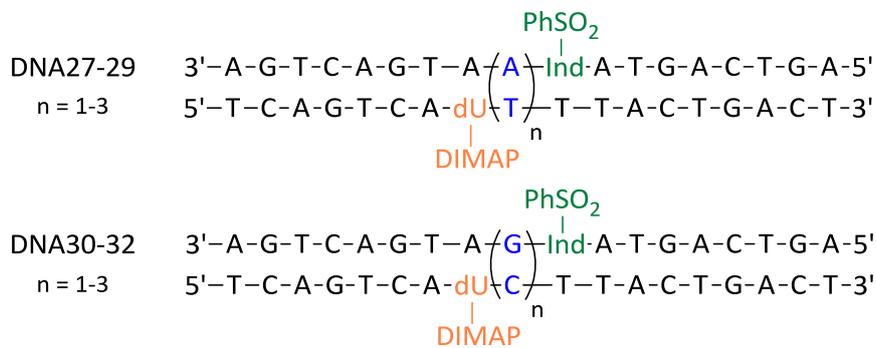
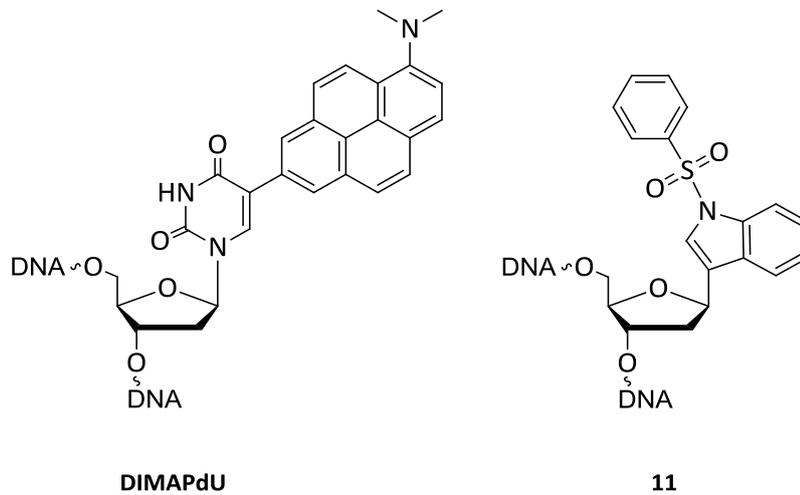


Abbildung 67: Phenylsulfonylindol 16 modifizierte- und DIMAPdU modifizierte Oligonukleotide DNA27-32.

Die gemessenen Löschwerte betragen $F_q = 8 - 30\%$ und der Doppelstrang mit dem höchsten Löschwert wurde für die im Folgenden beschriebene Untersuchung des photoinduzierten Elektronentransfers und dessen optische Darstellung verwendet.

Die Fluoreszenz von **DIMAPdU** ist in **DNA30-32** durch die GC-Basenpaare in direkter Nachbarschaft im Vergleich zu Oligonukleotiden mit AT-Basenpaaren leicht abgesenkt. Dennoch erzielt der in Abbildung 67 dargestellte Doppelstrang **DNA30** einen Fluoreszenzlöschwert F_q von 30 %, im Vergleich zu dem Oligonukleotid mit AT-Basenpaar zwischen ED und EA **DNA27** von 8 %.^[170]

In Abbildung 68 (rechts) ist die Fluoreszenz des nur mit ED modifizierten Doppelstrangs **DNA30'** und die des doppelmodifizierten Doppelstrangs **DNA30** abgebildet. Hieraus wird der in Kapitel 2.1.6 beschriebene Fluoreszenzlöschwert errechnet. Links in Abbildung 68 ist das Absorptionsspektrum des mit Elektronenakzeptor modifizierten Einzelstrangs **DNA30a** zu sehen, im Vergleich zu dem ebenfalls einfach modifizierten Doppelstrang **DNA30''**. Der Unterschied zwischen EA-modifiziertem Oligonukleotid **DNA30''** und doppelmodifiziertem **DNA30** wird durch die Absorption von **DIMAPdU** bei $\lambda_{abs} = 355\text{ nm}$ ersichtlich.

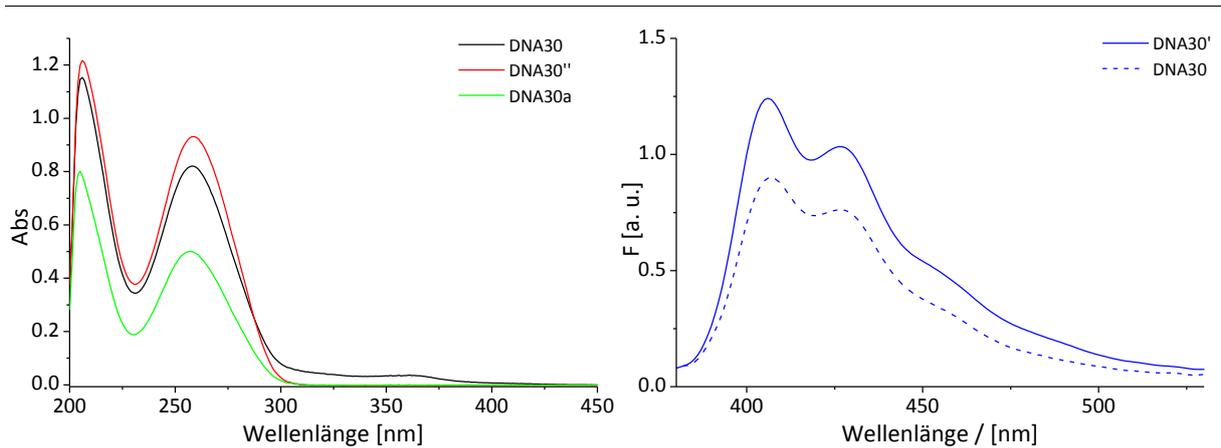


Abbildung 68: links: Absorptionsspektren des Einzelstrangs DNA30a und der Duplexe DNA30 und DNA30'', rechts: Emissionsspektren von DNA30 und DNA30' ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$).

Für die Belichtung der DNA wurden 2.5 μM ED modifizierter Einzelstrang **DNA30b** mit EA modifiziertem Einzelstrang **DNA30a** hybridisiert und für 120 min mit einer 75 W Xe-Lampe und einem *cutoff* Filter von 345 nm bestrahlt. Während der Belichtung wurden Aliquote nach bestimmten Belichtungszeiten entnommen, um den Elektronentransfer massenspektrometrisch oder über andere analytische Methoden verfolgen zu können. Ebenso wurde nach den gleichen Zeitabständen auch Emissionsspektren der Lösung aufgenommen, einmal bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$, um die Bildung von Indol eventuell verfolgen zu können, und bei $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, um die Fluoreszenz des Donors, **DIMAPdU** zu verfolgen.

In Abbildung 69 links ist die Emission des Donors während der DNA-Belichtung bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ dargestellt. Sie steigt bis zu einer Belichtungszeit von 60 min an, anschließend sinkt sie wieder. Dies deutet darauf hin, dass bis zu einer Stunde Belichtungszeit die Konzentration des Elektronenakzeptors verringert wird und damit die gelöschte Fluoreszenz des Donors wieder ansteigt. Dies würde bedeuten, dass der Elektronentransfer stattfindet und der Elektronenakzeptor durch die damit einhergehende Oxidation die Schutzgruppe abspaltet und damit zu einem Elektronenlochdonor wird. Der anschließende Abfall der Fluoreszenz von **DIMAPdU** deutet auf dessen Zersetzung durch die Bestrahlung hin. Es kann in diesem Spektrum jedoch kein Hinweis auf die Bildung von Indol gefunden werden. Wird bei der Messung **DIMAPdU** mit $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ angeregt (Abbildung 69, rechts), steigt die Fluoreszenz nur bis zu einer Belichtungszeit von 5 min an und sinkt dann erneut, was im Widerspruch zu der eben besprochenen Emission steht. Mit dem Abfall der Fluoreszenz von **DIMAPdU** steigt jedoch auch eine Bande bei $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ an, die auf Photoabbauprodukte schließen lässt. Auch die Diskrepanz der **DIMAPdU** Fluoreszenzen bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen könnte ein Hinweis auf diese sein.

Es besteht die Möglichkeit, dass das Fluoreszenzmaximum dieser Abbauprodukte nah an dem des **DIMAPdU** liegt und damit, durch den Anstieg bei deren Bildung, den zeitlich verlängerten Fluoreszenzanstieg von **DIMAPdU** erklären würde, der erst abbricht, wenn der ED mit den Abbauprodukten zersetzt wird.

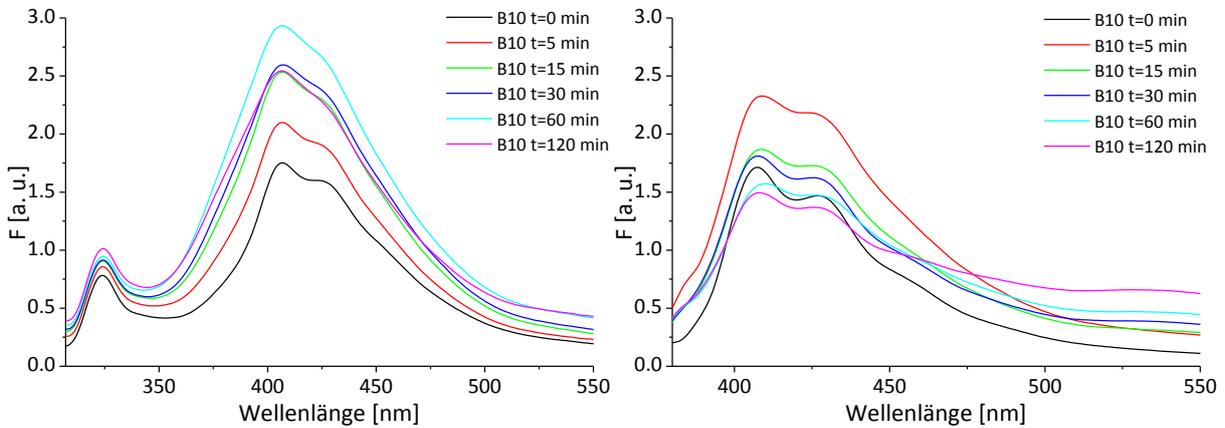


Abbildung 69: Emissionsspektren der Belichtung 10 von DNA30: Links: 290 nm Anregung, Slits 7 rechts: 355 nm Anregung, Slits 9.

Da die optische Verfolgung des Elektronentransfers von **DNA30** nicht ohne weitere Analytik aussagekräftig bewertet werden kann, wurden die entnommenen Aliquote über eine analytische HPLC-Trennung auf die neu gebildete Spezies überprüft. In Abbildung 70 links ist zu erkennen, dass beide Oligonukleotide, **DNA30a** und **DNA30b**, innerhalb von 5 min Belichtungszeit fast vollständig abgebaut vorliegen und mit weiterer Belichtung nur weiter zersetzt werden. In Abbildung 70 rechts ist dafür der Anstieg der neu gebildeten Fraktionen ersichtlich. Diese werden ebenfalls innerhalb der ersten 5 min Belichtungszeit gebildet und werden mit weiterer Bestrahlung wieder zersetzt.

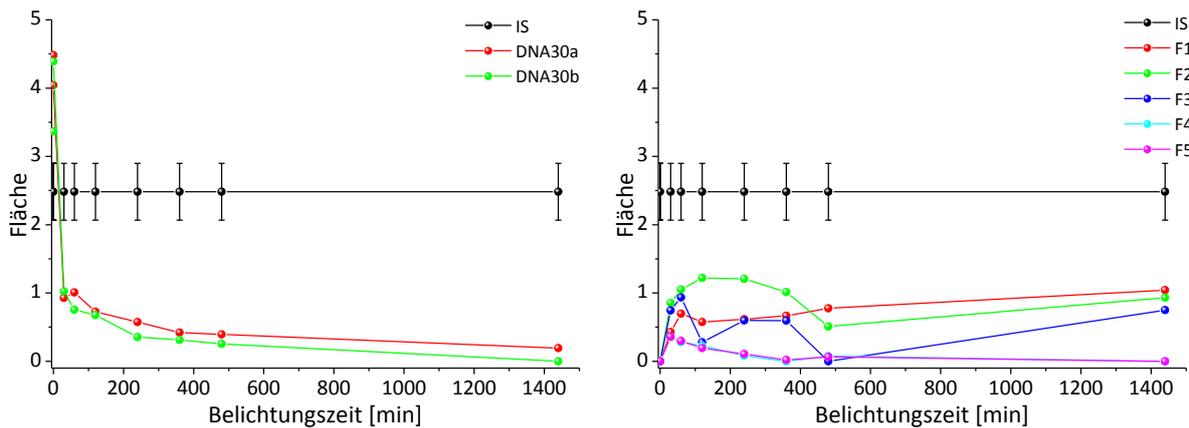


Abbildung 70: Analyse von Belichtung 10 von DNA30 über HPLC; links: Fläche des Donor modifizierten- und des Akzeptor modifizierten DNA-Strangs; rechts: Neu generierte Spezies, bei 260 nm Absorption, mit einem internen Standard IS.

Die große Anzahl der neu gebildeten Spezies weist jedoch darauf hin, dass nicht nur die Schutzgruppe am Elektronenakzeptor abgespalten wurde, sondern noch andere Prozesse durch die Migration der photoinduzierten Ladung stattgefunden haben müssen. Denkbar wäre, dass durch die Abspaltung der Schutzgruppe radikalische Spezies an den Basen vor und nach der Modifikation Strangbrüche induzieren könnten.

Mit der optischen Verfolgung und der Analyse über die HPLC wurden zwei Indizien gefunden, dass der Elektronentransfer innerhalb der ersten 5 min stattfindet.

Dennoch sind beide Interpretationen ohne einen eindeutigen analytischen Nachweis, wie eine Masse des entschützten Oligonukleotids oder die gelelektrophoretische Trennung des geschützten vom entschützten Oligonukleotid nicht korrekt zu deuten. Um diesen zu erbringen, wurden diese weiteren analytische Methoden zur Detektion des entschützten Oligonukleotids eingesetzt. Unter anderem wurde von *Anna Barth* versucht, die Belichtungsmischung über Gelelektrophorese aufzutrennen (12 % TBE, 4 °C, 250 V, Silberfärbung, DNA30 t = 0–120 min, jeweils 5 µL aus 2.5 µM Lösung in den Taschen). Zu erwarten wäre eine sich zusätzlich bildende Bande, die mit andauernder Belichtungszeit intensiver wird und bei t = 0 min noch nicht vorhanden ist (Indol-Oligonukleotid). Leider konnte dies nicht bestätigt werden, was wahrscheinlich an dem nur sehr geringen Massen- und Größenunterschied und einer damit einhergehenden schlechten Trennung von noch vorhandenem Doppelstrang mit Schutzgruppe und schon entschütztem Doppelstrang liegt. Auch massenspektrometrische Untersuchungen der belichteten DNA-Mischung ergaben kein Ergebnis (Elektronenstoß-Ionisation EI, Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation MALDI, Elektrospray-Ionisation ESI, *fast atom bombardement* FAB-Ionisierung). Da wahrscheinlich Doppelstränge mit den genutzten MS-Methoden nicht detektierbar waren, wurde die Probe mit 25 eq. Harnstoff auf 90 °C erhitzt und abgekühlt. Es wurde auch versucht die Oligonukleotide in DMSO zu lösen um zu verhindern, dass die Einzelstränge hybridisieren. Die Proben wurden auch auf 90 °C erhitzt und anschließend sehr schnell abgekühlt jedoch konnte bei allen diesen Versuchen trotzdem die richtige Masse nicht detektiert werden.

Damit ist das Elektronentransfersystem, bestehend aus **DIMAPdU** und **11** als spektroskopisches Nachweisinstrument in DNA schlecht geeignet. Zwar findet den Indizien folgend, eine Abspaltung der Schutzgruppe statt, doch konnte diese mit den hier diskutierten Methoden nicht zweifelsfrei detektiert werden.

DIMAPdU und 20

Da die Detektion des entschützten Indol-Oligonukleotids aus dem Belichtungsgemisch im vorangegangenen Experiment mit **DIMAPdU** und **16** durch die gewählten Methoden nicht möglich war, sollte im Elektronentransfersystem aus **DIMAPdU** und **20** die Detektion der abgespaltenen Schutzgruppe erfolgen, da Dansyl, bzw. **DMAN** als Abgangsgruppe, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, gut neben **20** detektierbar ist. So wurde, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, **20** in die, in Abbildung 71 gezeigte DNA Sequenz eingebracht und mit **DIMAPdU** modifizierten Gegensträngen hybridisiert. Die Sequenz der EA modifizierten Oligonukleotide entspricht der **11** modifizierten Oligonukleotide mit einem bis drei AT-Basenpaaren zwischen Elektronendonor und -akzeptor.

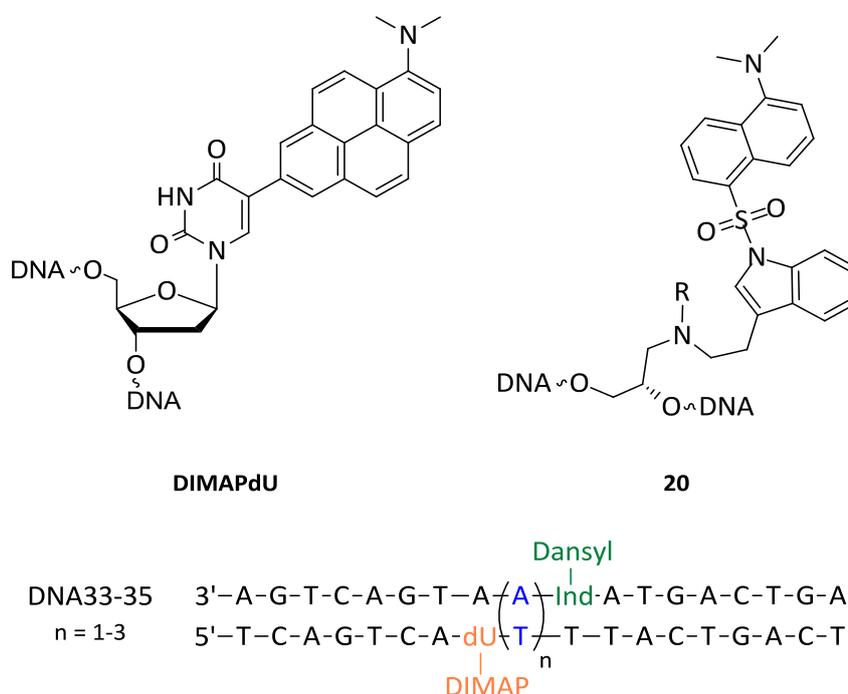


Abbildung 71: Elektronentransfersystem aus DIMAPdU ED und 20 (EA), darunter: Sequenz der synthetisierten, mit 20 modifizierten Oligonukleotide, sowie die DIMAPdU modifizierten Gegenstränge.

Für die Charakterisierung der Oligonukleotide wurden jeweils unmodifizierte, einfach EA modifizierte, einfach ED modifizierte und mit EA und ED zweifachmodifizierte Doppelstränge hybridisiert und deren Absorptionen und Emissionen gemessen. Das Absorptionsspektrum in Abbildung 72 links zeigt beim Vergleich von **DNA33''''** (unmodifiziert) und **DNA33'** (einfach mit EA mod.) die Absorption von **20** bei $\lambda_{\text{abs}} = 340$ nm. Damit ist dieses Maximum um 15 nm im Vergleich zum Baustein außerhalb der DNA hypsochrom verschoben (siehe Kapitel 2.3.3). Dies weist auf eine Interkalation des Akzeptors in den Basenstapel hin. Der zweifachmodifizierte Doppelstrang **DNA33** zeigt im Vergleich zu einfach **DIMAPdU** modifiziertem **DNA33''** noch eine um den EA erweiterte Extinktion zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 300$ und 360 nm. In Abbildung 72 rechts zu sehen sind die

Emissionsspektren der Doppelstränge bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 358 \text{ nm}$. Wie zu erwarten, liegen bei einfach ED modifiziertem Doppelstrang **DNA33''**, die **DIMAPdU** Emissionsmaxima bei $\lambda_{\text{em}} = 406, 427 \text{ nm}$ und eine Schulter bei 452 nm . Im einfach EA modifizierten Doppelstrang **DNA33'** liegt das Emissionsmaximum von **20** bei $\lambda_{\text{em}} = 574 \text{ nm}$. Wird es mit dem doppelt modifizierten Doppelstrang **DNA33** verglichen, zeigt sich, dass der Einfluss des ED im Oligonukleotid diese Emissionsbande um ca. 6 nm hypsochrom verschiebt. Die Emission von **DNA33'** weist zusätzlich strukturiertere Banden bei $\lambda_{\text{em}} = 375, 393 \text{ und } 419 \text{ nm}$ auf.

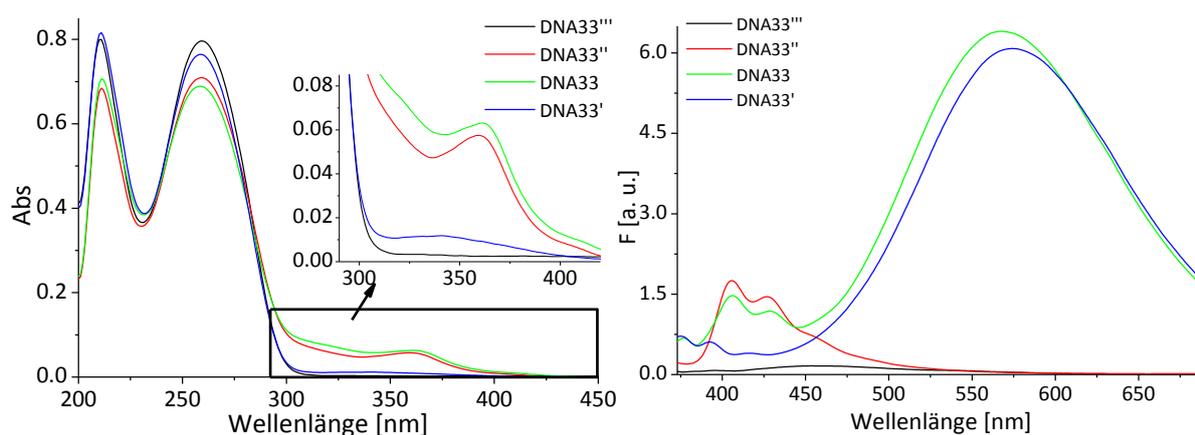


Abbildung 72: links: Absorptionsspektren DNA33-33''' rechts: die entsprechenden Emissionsspektren bei $\lambda_{\text{exc}} = 357 \text{ nm}$, slits 9.

Wird die Emission des EA im Doppelstrang (**DNA33'**) mit der des doppelt modifizierten Oligonukleotids (**DNA33** – 1 AT zw. ED und EA) verglichen (Abbildung 73, rechts), fällt auf, dass die Emission des Akzeptors bei $\lambda_{\text{em}} = 574 \text{ nm}$ in Anwesenheit des Donors zu $\lambda_{\text{em}} = 567 \text{ nm}$ um 7 nm hypsochrom verschoben ist und die Intensität leicht ansteigt. Wird die Distanz zwischen ED und EA länger, also 2 AT Basenpaare als Abstandhalter, wird die Verschiebung von $\lambda_{\text{em}} = 574 \text{ nm}$ nach $\lambda_{\text{em}} = 569 \text{ nm}$ mit 5 nm geringer. Bei einem Abstand von 3 AT Basenpaaren, steigt die Fluoreszenz zwar noch an, es findet aber kaum noch eine Verschiebung des Maximums statt ($\lambda_{\text{em}} = 576 \text{ nm}$ nach $\lambda_{\text{em}} = 574 \text{ nm}$). Dies deutet darauf hin, dass bis zu einem Abstand von 2 AT-Basenpaaren der Elektronenakzeptor mit dem Elektronendonator wechselwirkt (hypsochrome Verschiebung). Ab 3 Basenpaaren wird der Einfluss wegen der größeren Distanz sehr gering.

Um einen Eindruck zu bekommen, ob der Elektronentransfer zwischen **DIMAPdU** und **20** in DNA stattfinden könnte, wurde die Fluoreszenz des Donors in DNA (**DNA33''-35''**) mit der des Donors in Anwesenheit des Akzeptors (**DNA33-35**; 1-3 AT- BP zw. ED und EA) verglichen (Abbildung 73, links). Da die Fluoreszenz des EA die des ED im Bereich von $425 - 525 \text{ nm}$ überlagert, konnten keine F_q -Werte nach Gleichung (10) bestimmt, sondern nur Abschätzungen vorgenommen werden. Die

Abnahme der **DIMAPdU** Fluoreszenz von **DNA33''** zu **DNA33** (1 AT-BP zw. ED und EA) ist im Emissionsspektrum deutlich zu erkennen. Dies steht im Gegensatz zu der Fluoreszenzabnahme bei einer Distanz von zwei AT Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor. Die Emission von **DNA34''** nimmt im Vergleich zu **DNA34** so gut wie nicht ab. Die Interpretation dieser Daten lässt die Vermutung zu, dass bei nur einem AT Basenpaar zwischen Donor und Akzeptor Elektronentransfer grundsätzlich stattfinden könnte, wohingegen bei zwei oder drei Basenpaaren die Distanz zwischen ihnen wohl zu groß wird. Wird jedoch Der Doppelstrang mit einer Distanz von 3 Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor betrachtet, steigt die **DIMAPdU** Fluoreszenz in Gegenwart des EA sogar an und die Fluoreszenz von **20** wird bathochrom verschoben.

100

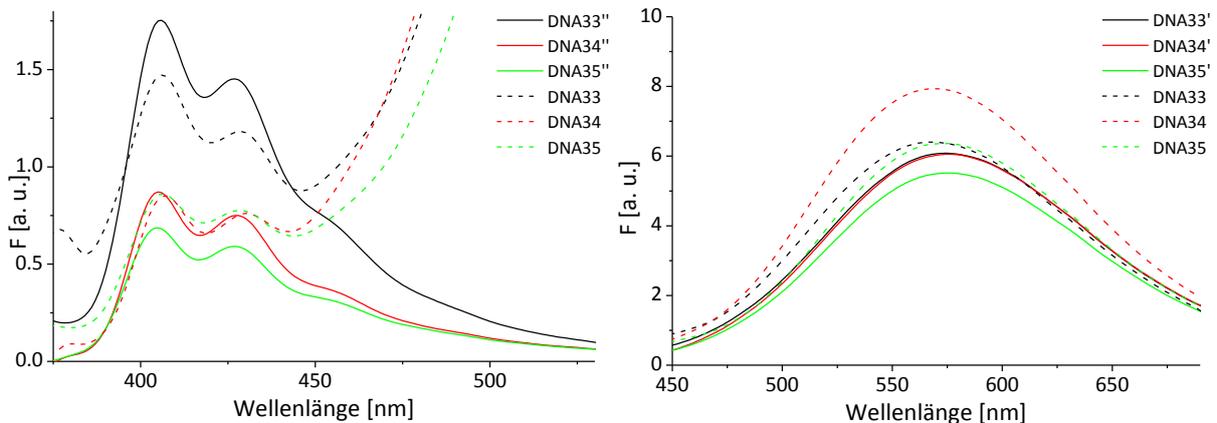


Abbildung 73: links: Emissionsspektrum von DIMAPdU mod. Doppelstrang DNA33''-35'' und doppelmod. Strängen DNA33-35, mit jeweils 1-3 AT-BP zw. ED und EA, rechts: Emissionsspektren von mit 20 mod. Doppelsträngen DNA33'-35' und doppel mod. Strängen DNA33-35 ($\lambda_{exc} = 357$ nm, Slits 9).

Da bei **DNA33** eine Fluoreszenzlöschung des Donors stattfindet, wurde dieses Oligonukleotid für spektroskopische Untersuchungen am photoinduzierten Elektronentransfer gewählt.

Es wurden $2.5 \mu\text{M}$ **DNA33** mit 250 mM NaCl in 10 mM NaP_i -Puffer vorgelegt und mit einer 75 W Xe-Lampe und einem 345 nm *cutoff* Filter, für 120 min bestrahlt. Nach unterschiedlichen Belichtungszeiten, wurden die Absorption und die Emission in der Belichtungsküvette gemessen.

Im Absorptionsspektrum dieser Belichtung (Abbildung 74, links) kann die Absorption von **DIMAPdU** bei $\lambda_{abs} = 355 \text{ nm}$ verfolgt werden. Sie sinkt innerhalb der ersten 5 min ab und bleibt dann, im Rahmen des Messfehlers, nahezu konstant. Das deutet darauf hin, dass der Elektronendonator nach 120 min noch intakt ist und nur der Beitrag des EA zur Extinktion bei 355 nm in den ersten 5 min sinkt. Jedoch konnte keinerlei Anstieg der erwünschten, abgespaltenen Schutzgruppe, dem **DMAN** bei $\lambda_{abs} = 316 \text{ nm}$ detektiert werden. Das Emissionsspektrum der Belichtung ($\lambda_{exc} = 357 \text{ nm}$) zeigt einen Anstieg der Fluoreszenz von **20** bei $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$ und eine gleichzeitige hypsochrome Verschiebung um 16 nm . Im folgenden Zeitverlauf fällt dieses Maximum mit einer bathochromen Verschiebung unter die Intensität des Anfangswerts. Diese Tatsache lässt sich mit strukturellen Änderungen zwischen ED und EA erklären. Die letztendliche Abnahme der Fluoreszenzintensität des

EA kann entweder durch die gewollte Entschützung oder durch den Photoabbau durch die direkte Bestrahlung erklärt werden.

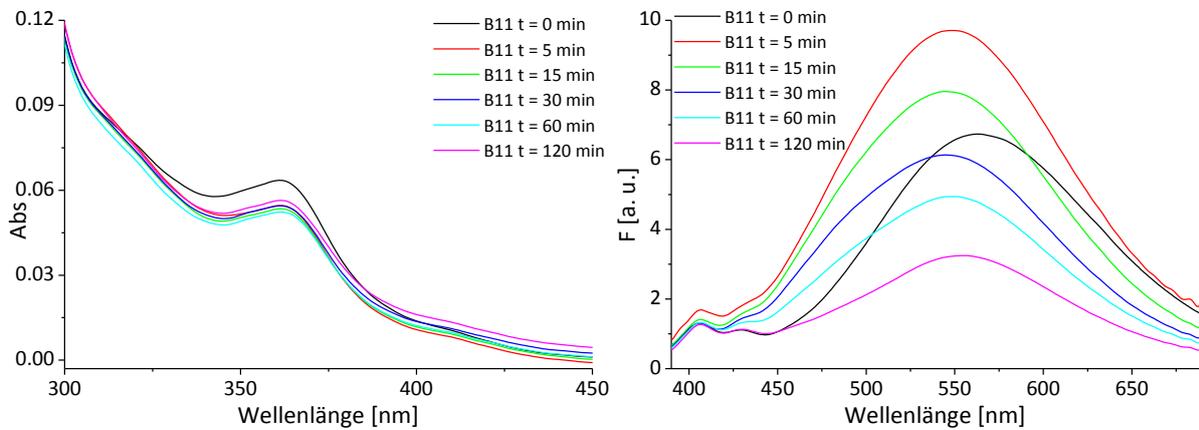


Abbildung 74: Belichtung 11 von DNA33, links: Absorptionsspektren, rechts: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 357 \text{ nm}$, Slits 9) im zeitlichen Verlauf der Belichtung, 75 W Xe Lampe, 2 h, R. T.

Somit wären Indizien für die erfolgreiche Entschützung gegeben, jedoch könnte bei **20** auch durch die unselektive Anregung entschütztes Produkt entstanden sein oder andere Prozesse den Elektronentransfer gestört haben, die zu ähnlichen Ergebnissen führen. Der tatsächliche Beweis über Massenspektrometrie oder Gelelektrophorese konnte auch bei den mit **20** modifizierten Oligonukleotiden nicht erbracht werden.

2.3.6 Zusammenfassung

Im Zuge dieses Teils der Arbeit sollte untersucht werden, ob die literaturbekannte, oxidative Entschützung von Sulfonylindolen als Werkzeug zur optischen Darstellung von photoinduziertem Elektronentransfer dienen kann. Es wurden drei Systeme in Lösung und zwei in der DNA getestet, wobei die Sulfonylindole die Elektronenakzeptoren des EET-Systems darstellten und ein Opfermolekül (NEt_3 oder $\text{N}(\text{EtOH})_3$) zur Regeneration des Donors benötigt wurde. Das System **DIMAP/PhSO₂Ind** in Lösung zeigte durch einen Anstieg der Emission bei 317 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm) das durch den erfolgreichen Elektronentransfer generierte Indol, welches auch über GC-MS nachgewiesen werden konnte. Dieses System wurde auch für eine erfolgreiche, präparative Darstellung von Indolnukleosid **12** angewandt.

Im System **DansInd/DIMAP** konnte durch die Bestrahlung des ED Produkt nachgewiesen werden. Auch Teile der Schutzgruppe (**DMAN**) konnten über GCMS detektiert werden. Jedoch konnte der ED nicht selektiv neben **DansInd** angeregt und die abgespaltene Schutzgruppe optisch nicht detektiert werden. Der dritte Elektronenakzeptor führte zum System **DIMAP/PyInd**, wobei hier die selektive Anregung des Elektronendonors durch den höheren Extinktionskoeffizienten des Akzeptors unmöglich wurde. Trotz der Direktbestrahlung und der gleichzeitigen Anregung des ED konnte keine Umsetzung zum Indol nachgewiesen werden. Da die Systeme **DIMAP/PhSO₂Ind** und **DIMAP/DansInd** in Lösung erfolgreich photoinduzierten Elektronentransfer durchführten, wurden sie für EET Systeme in die DNA eingebracht. Der Elektronenakzeptor **PhSO₂Ind** wurde hierfür als C-Nukleosid **11** und **DansInd** mit einem azyclischen Linker **20** als Bausteine für die DNA-Festphasensynthese hergestellt. Das System **DIMAPdU/11** zeigte optisch den Anstieg der Donorfluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 438$ nm ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm), was auf den Rückgang des EAs hindeutet. Des Weiteren konnte über eine HPLC Analyse gezeigt werden, dass nach 5 min Belichtungszeit neue DNA-Fractionen entstanden und die ED- und EA Oligonukleotide abgebaut wurden. Jedoch konnte kein analytisch eindeutiger Beweis der Abspaltung erbracht werden. Auch mit dem System **DIMAPdU/20** in DNA konnten optisch keine eindeutigen Indizien für einen funktionierenden EET gefunden werden, die Analyse über Massenspektrometrie schlug ebenfalls fehl.

Ein denkbarer weiterer Ansatz für die optischen Untersuchungen des EET wäre eine Sulfonylschutzgruppe, die am Indolnukleosid angebracht, die selektive Anregung des Elektronendonors zulassen und bei Abspaltung ein eindeutig zuordenbares optisches Signal generieren würde. Auch denkbar wäre ein System mit erfolgreichem Signalanstieg: Mit einer am Indol gebundenen Sulfonylschutzgruppe sollte das Molekül in der DNA gelöscht vorliegen. Bei einem erfolgreichen EET sollte dann die Emission durch die Abspaltung der Schutzgruppe (Löscher) wieder ansteigen.

3. Bioorthogonale Konjugation von DNA durch Diels-Alder mit inversem Elektronenbedarf

3.1 Theorie und Einleitung

Für die Modifikation von Biomolekülen wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue Methoden entwickelt und verwendet. Die wichtigste Anforderung an die Konjugationsreaktion eines Biomoleküls mit einem Farbstoff ist deren Orthogonalität und Chemoselektivität. Die bindungsbildenden Modifikationen müssen hoch selektiv miteinander reagieren. Gleichzeitig sollte die Reaktion vor allem schnell ablaufen, wenige Nebenprodukte erzeugen und für biologische Systeme nicht toxisch sein.

105

Konjugationsmethoden

Saxon und *Bertozzi* entwickelten auf Basis der Staudinger-Ligation eine chemoselektive Reaktion von Aziden mit Phosphinen. Bei dieser Reaktion wird nach der Hydrolyse eine stabile Amid-Bindung generiert (Abbildung 75). Es konnten damit Fluoreszein-Modifikationen auf Zelloberflächen aufgebracht werden in dem azidmodifizierte Zelloberflächen mit biotinylierten Phosphinen zur Reaktion gebracht und anschließend mit Fluoreszein/isothiocyanat-Avidin gebunden wurden.^[171] Da Azidfunktionalitäten nicht in Biomolekülen vorkommen, ist diese Reaktion orthogonal und damit auch sehr effektiv. Jedoch ist sie mit ca. $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ relativ langsam und wird auch durch die Oxidationsempfindlichkeit der Phosphin-Funktionalität eingeschränkt.^[171-173]

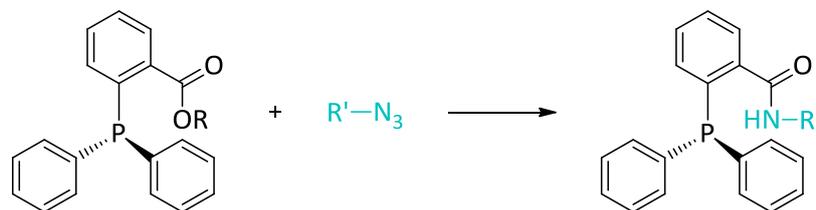


Abbildung 75: Staudinger-Bertozzi-Ligation: Reaktion von Phosphin- mit Azidmodifikation.

Die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) von *Huisgen* sollte die mangelnde Geschwindigkeit der besprochenen Staudinger-Ligation verbessern, ohne an Orthogonalität zu verlieren. Die Reaktion findet zwischen einer Azid-Funktionalität und einem terminalen Alkin unter Ausbildung eines Triazols mit einem Kupfer(I)-Katalysator mit sehr hohen Geschwindigkeiten (bis $1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) bei Raumtemperatur statt (Abbildung 76).

Sie wurde als eine „Click“-Reaktion nach *Sharpless* charakterisiert.^[174] Die Reaktion kann sogar über einen weiten pH-Wert Bereich genutzt werden. Jedoch ist das verwendete Kupfer(I) zytotoxisch. Daher kann die CuAAC nicht in lebenden Organismen eingesetzt werden. Auch die Quantenausbeute fluoreszenter Proteine wird durch den Gebrauch des Katalysators beeinflusst.^[175-176]

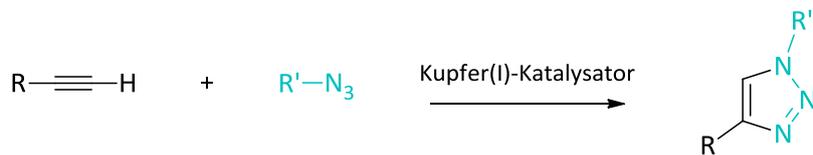


Abbildung 76: CuAAC: Reaktion eines terminalen Alkins mit einer Azid-Funktionalität unter Kupfer(I)-Katalyse.

Bertozzi et al. fanden eine Alternative zur kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition. Sie nutzten gespannte Ringsysteme an der Alkinfunktionalität, um sie reaktiver zu machen. Jedoch sank dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit (ca. $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Bei dieser spannungsunterstützten Cycloaddition (SPAAC) reagieren symmetrische Cyclooctine mit Aziden zu Tetrazolen (Abbildung 77).^[172, 177]

Um die Geschwindigkeit dieser Reaktion zu erhöhen, wurde das Cyclooctin modifiziert, dies wird im Folgenden noch näher beschrieben.

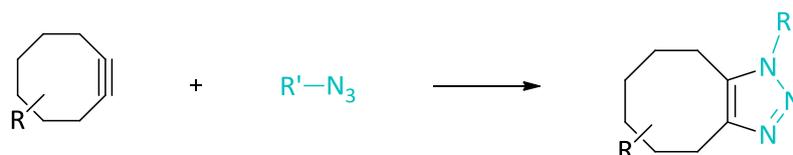


Abbildung 77: SPAAC: Reaktion eines Cyclooctins mit einer Azid-Funktionalität.

Fox et al. und *Weissleder et al.* fanden eine weitere katalysatorfreie Konjugationsreaktion mit den eben besprochenen, gespannten Cyclooctinen und den bis dahin nur zur Herstellung von Pyridazinen bekannten Tetrazinen.^[178-179] In diesem Teil der Arbeit liegt das Augenmerk auf dieser Ligationsmethode.

Die $\text{LUMO}_{\text{Dien}}$ -kontrollierte Reaktion verläuft nach einem [4+2]-Diels-Alder Cycloadditionsmechanismus mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA, auch: Carboni-Lindsey Reaktion^[180]).^[178-179, 181-182] Der erste Schritt, die konzertierte [4+2]-Cycloaddition, ist der Geschwindigkeitsbestimmende in dieser Reaktion zweiter Ordnung. Es entsteht dabei ein gespannter Bicyclus, der durch die Abgabe von molekularem Stickstoff und anschließender Oxidation Pyridazin als Produkt bildet. Ist das Dienophil ein Alkin, entsteht das Pyridazin-Produkt direkt nach der Stickstoffabspaltung (Abbildung 78). Die Reihe der von *Fox* und *Weissleder* entwickelten Reaktionen erfolgte mit 1,2,4,5-Tetrazinen und den Dienophilen Norbornen, Cyclooctin, Cyclopropen und trans-Cycloocten.

Sie zeigten alle unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten, die weit über denen der SPAAC-Reaktionen lagen ($2000\text{-}22000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [182]). Dies ermöglichte erfolgreiche Experimente an lebenden Zellen *in vitro* [183] und *in vivo*. [184-185] Die Reaktionsgeschwindigkeit kann durch die Reaktivität des Cyclooctinderivats und durch die Reaktivität und Stabilität des Tetrazins beeinflusst werden.

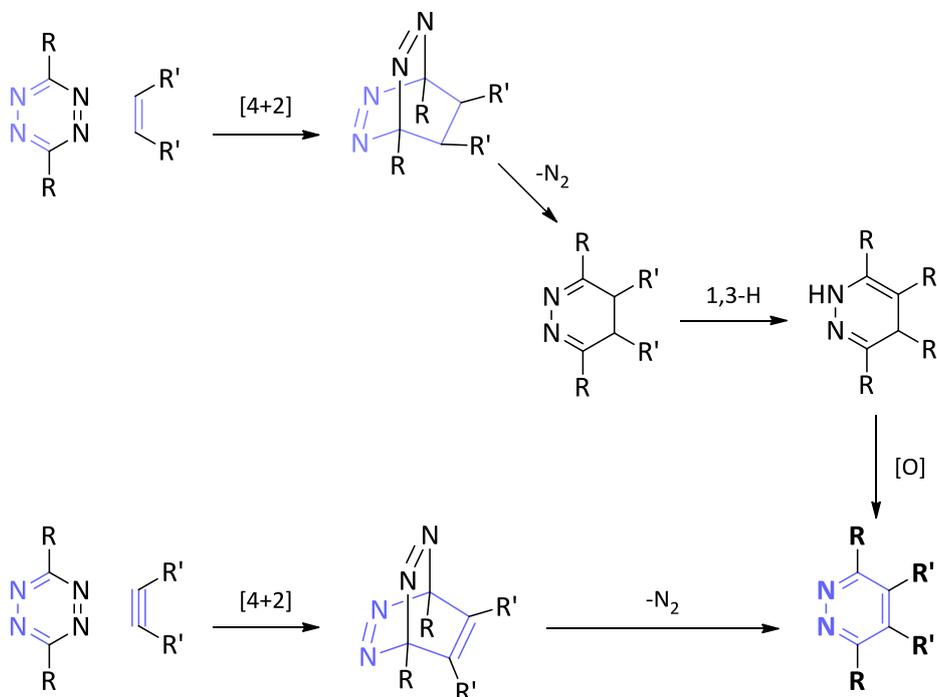


Abbildung 78: [4+2] iEDDA: Reaktion von Alkenen und gespannten Alkinen mit 1,2,4,5-Tetrazin.

Weiterentwicklung der Cyclooctin-Derivate für iEDDA

Sauer *et al.* untersuchten die Kinetik der [4+2]-Cycloaddition von 1,2,4,5-Tetrazin mit einer Reihe verschiedener Alkene und Alkine, wobei sich Cyclooctin als das reaktivste Dienophil herausstellte. [186]

Die Reaktivität des Cyclooctins für eine SPAAC- oder iEDDA-Reaktion kann durch zwei unterschiedliche Ansätze beeinflusst werden. Zum einen wird die Reaktivität durch die Senkung der LUMO-Energie, was durch elektronenziehende Gruppen erreicht wird (Difluoro-Substituenten, in α -Position zum Alkin wie z. Bsp. in Difluorocyclooctin **DIFO** [187] oder Difluorobenzocyclooctin **DIFBO** [188]) und zum anderen durch die Erhöhung der Ringspannung, was durch aromatische Systeme am Ring erreicht wird (wie z. Bsp. in Dibenzocyclooctin **DIBA** [189] oder Biarylazacyclooctinon **BARAC** [190], Strukturen siehe Abbildung 79), verbessert.

Um ein stabiles Cyclooctin-Derivat mit guten Reaktionsgeschwindigkeiten zu erhalten, konzentrierten sich *Kele et al.* auf die Weiterentwicklung von monobenzoylierten Cyclooctinen. Sie erarbeiteten 2-Methoxycarbonyl-5,6,9,10-tetrahydro-7,8-dehydro-benzocyclooctin (**COMBO**), welches eine erhöhte Ringspannung durch die Benzol-Modifikation an der 5,6-Position aufweist. Ebenfalls ist eine Carbonsäuregruppe in das Molekül eingebracht, was die Modifikation mit Farbstoffen ermöglicht. Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung in den wesentlich langsameren SPAAC-Reaktionen zeigt, dass **COMBO** in einem ähnlichen Geschwindigkeitsbereich wie DIFBO, als höchster Wert unter BARAC (Abbildung 79) liegt und damit sehr reaktiv ist.^[191] Die geringe Größe und die Abwesenheit von Fluorsubstituenten (geringere Lipophilie) machen **COMBO** ebenfalls zu einem interessanten Vertreter der Cyclooctinderivate.

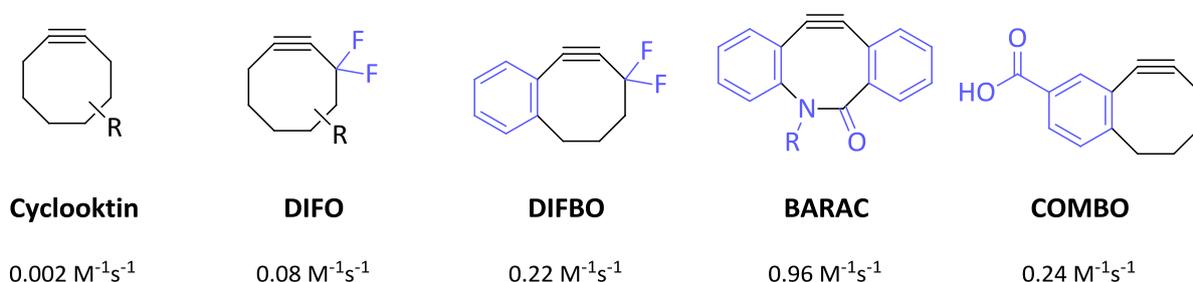


Abbildung 79: Struktur von Cyclooctinderivaten für SPAAC mit den Geschwindigkeitskonstanten 2ter Ordnung k_2 [M⁻¹s⁻¹] der Reaktion mit Benzylazid in MeCN.^[188, 191]

Weiterentwicklung der Tetrazin-Derivate für iEDDA

Tetrazine sind durch ihren starken Elektronenmangel-Charakter, die Möglichkeit reversibel reduziert zu werden und die mitunter auftretende Fluoreszenz bekannt. Durch diese Eigenschaften fanden auf Tetrazin basierte Materialien Anwendung in Sensoren, Displays, hochenergetischen Materialien (Sprengstoff), in der Koordinations-Chemie, der Heterocyclen-Synthese, der Vollsynthese sowie als Comonomere in alternierenden Donor-Akzeptor Copolymeren für die Photovoltaik.^[192-194]

Die Reaktivität von 1,2,4,5-Tetrazinen gegenüber Cyclooctinen für die iEDDA-Reaktion kann durch Substituenten in 3- und 6-Position verändert werden. Die Stabilität im wässrigen Medium bzw. im basischen Milieu ist ebenfalls von ihnen abhängig. So kann durch elektronenschiebende Substituenten der nukleophile Angriff von Wasser und die damit einhergehende Stickstoffabspaltung und Zersetzung des Tetrazins verringert werden. Mit elektronenziehenden Substituenten wird die Reaktivität des Tetrazins erhöht, auch z. Bsp. gegenüber dem Angriff von Wasser. Es entsteht daher durch die Wahl der Substituenten ein Gleichgewicht zwischen Reaktivität und Stabilität: Reaktive Tetrazine sind instabiler, stabile dagegen unreaktiver.^[195]

Generell gilt, dass elektronenziehende Gruppen in 3- und 6 Position das LUMO des Diens absenken, sich damit der Abstand zwischen $\text{HOMO}_{\text{Dienophil}}$ und $\text{LUMO}_{\text{Dien}}$ verringert und damit eine Beschleunigung der Reaktion stattfindet. Elektronenschiebende Gruppen dagegen bewirken eine Verlangsamung der Reaktion. In Abbildung 80 ist eine Auswahl an unsymmetrisch substituierten Tetrazinen mit sinkender Reaktivität dargestellt. Es wird der Zusammenhang von elektronenziehenden bzw. -schiebenden Substituenten aufgezeigt.

Auch sterische Effekte der Substituenten haben einen Einfluss. So senkt z. Bsp. die Ringspannung in Dienophilen die Aktivierungsenergie der iEDDA-Reaktion, da die Energie für die Umformung des Übergangszustands durch den Ring im Gegensatz zu freien Alkinen geringer ist. Große Substituenten an Tetrazin und Dienophil erhöhen diese Energie jedoch.^[196]

Die Synthese von unsymmetrisch substituierten Tetrazinen erfolgt dabei meistens durch aromatische Nitrile, die mit Hydrazin oder Formamidinacetat umgesetzt werden.^[193] Vor kurzem gelang es, durch einen metallkatalysierten Mikrowellen-Ansatz auch aliphatische Nitrile zu Tetrazinen umzusetzen.^[197]

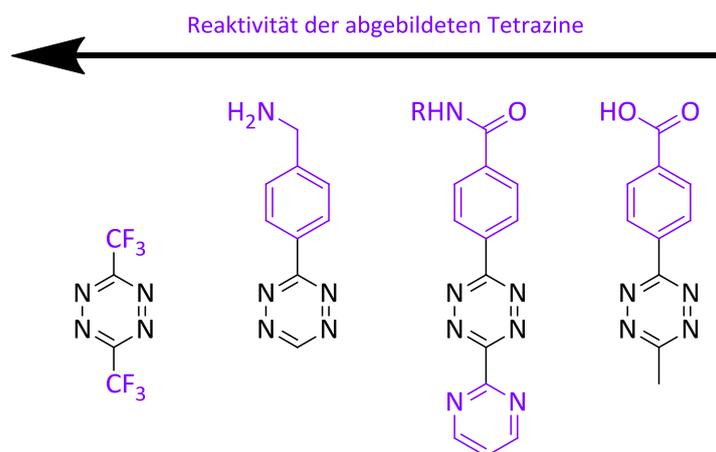


Abbildung 80: Substituenteneffekte auf die Reaktivität einiger 1,2,4,5-Tetrazin-Verbindungen.^[198]

In den meisten Anwendungen werden Cyclooctin-Derivate oder Tetrazin-Derivate durch Carbonylfunktionalitäten auf Oberflächen immobilisiert und anschließend erst konjugiert.^[198]

Wagenknecht et al. synthetisierten ein Tetrazin-Triphosphat, welches enzymatisch direkt in die DNA eingebracht werden konnte (Abbildung 81). Dadurch war es möglich, DNA als Biopolymer mit einem COMBO-modifizierten Rhodamin der Arbeitsgruppe *Kele* zu markieren. Höchstwahrscheinlich verhinderte die Instabilität des gewählten Tetrazins jedoch, dass sich das gewünschte Konjugationsprodukt komplett umsetzte. Dies könnte an den Reaktionsbedingungen der Primerverlängerung liegen, was einen anderen Ansatz der Inkorporation von Tetrazin in DNA erfordern würde.^[141]

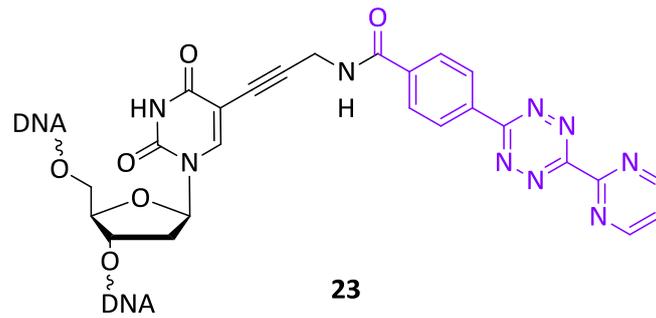


Abbildung 81: Von Wagenknecht *et al.* als Triphosphat in DNA inkorporiertes Tetrazin 23.

110

Im Zuge dieser Arbeit sollte ein stabileres, sehr reaktives Tetrazin über einen anderen Weg in DNA inkorporiert werden. Anschließend sollte über eine iEDDA-Reaktion diese DNA mit einem **COMBO**-modifizierten Farbstoff markiert werden.

3.2 Systemaufbau

Es sollte ein Tetrazinbaustein in DNA eingebracht werden, um die Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) für die Modifikation von DNA zu nutzen. Bei der enzymatischen Inkorporation der Tetrazinfunktionalität wurde diese entweder bei der Aufarbeitung oder bei der Reaktion mit dem **COMBO**-modifizierten Farbstoff teilweise zersetzt. Dies kann durch die starke Instabilität von Tetrazinen gegenüber Basen geschehen. Es wurde ein stabileres Tetrazin gewählt. Da *N*-(6-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)butyramid eine Halbwertszeit von 300 h (*Kele et al.*) in PBS-Puffer aufweist, wurde das entsprechende 3-Methyl-6-(6-nikotinsäure)-1,2,4,5-tetrazin **24** ausgewählt. Es sollte zum einen die Bedingungen bei einem enzymatischen Einbau in die DNA überdauern und zum anderen die Möglichkeit einer unterschiedlichen Einbaumethode bieten.

Im Zuge dieser Arbeit sollte der Einbau des Tetrazins über die Standard-DNA-Festphasensynthese durchgeführt werden. Die Synthese des Triphosphats und dessen enzymatischer Einbau in die DNA wird an anderer Stelle noch erfolgen.

Für den Einbau über die DNA-Festphasensynthese wird das Tetrazin **24** als Phosphoramiditbaustein **27** benötigt (Abbildung 80)

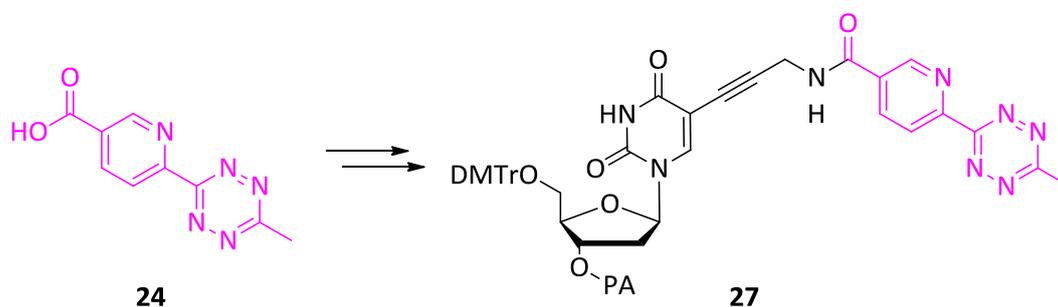


Abbildung 82: 3-Methyl-6-(6-nikotinsäure)-1,2,4,5-tetrazin **24** und der entsprechende Phosphoramiditbaustein **27**.

Da die Abspaltung der Schutzgruppen und der DNA vom CPG nach der DNA-Festphasensynthese jedoch unter erhöhter Temperatur in Ammoniak stattfindet, würde dies die Tetrazin-Funktionalität nach erfolgtem Einbau wieder zersetzen. Reagiert Tetrazin mit einem cyclootkinmodifizierten Farbstoff, entsteht das entsprechende Pyridazin-Derivat anstelle der basenlabilen Tetrazin-Funktionalität. Dieses ist bei den genannten Abspalt- und Entschützungsbedingungen der DNA stabil. Daher sollte der Tetrazin-Baustein für die automatisierte DNA Festphasensynthese hergestellt werden. Dieser sollte im Folgenden in die DNA eingebaut werden. Anschließend sollte die DNA auf der festen Phase mit einem aus der Arbeitsgruppe *Kele* synthetisierten Fluoreszein-**COMBO** Derivat über die in Kapitel 3.1 besprochene iEDDA Reaktion markiert und die Eigenschaften der entstandenen DNA untersucht werden (Abbildung 83).

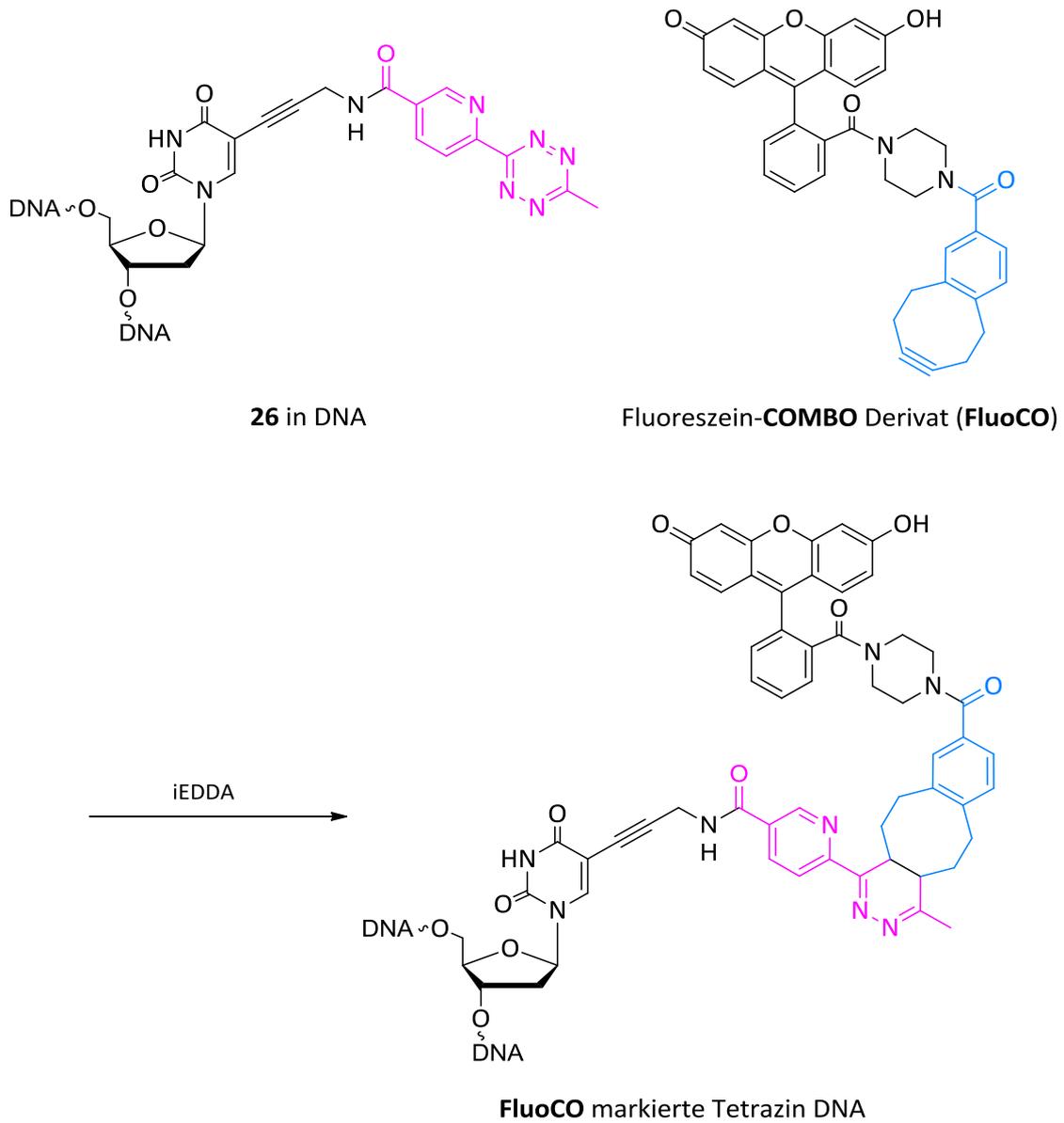


Abbildung 83: Fluoreszenzmarkierungssystem mit tetrazinmodifizierter DNA und COMBO modifiziertem Fluoreszein.

zusätzlichen 0.1 eq. HOBt zu HBTU und der beschriebenen Trocknung der Reaktionspartner, konnte die Ausbeute von 32 % auf 65 % gesteigert werden. Anschließend wurde der DMTr-geschützte Tetrazinbaustein **26** in DCM gelöst und mit PA-Cl zum Phosphoramidit umgesetzt. Da das rasche Eluieren von **27** bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung durch die starke Wechselwirkung der Substanz mit der festen Phase erschwert war, wurde der DNA Baustein mit 89 % Ausbeute erhalten.

Dieses Protokoll ermöglicht potentiell die Markierung mit mehreren, unterschiedlichen Farbstoffen in einem Strang, da jede eingebaute Tetrazin-Modifikation direkt vor der weiteren Strang-Synthese markiert werden kann.

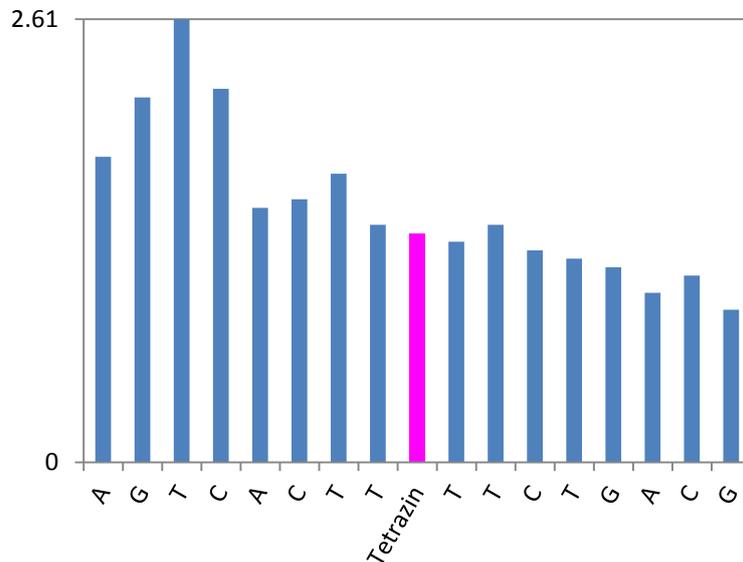


Abbildung 85: Tritylmonitor des Einbaus von 27 in DNA.

Wie erwartet, konnte die DNA im Anschluss, ohne die Modifikation zu zersetzen, basisch entschützt und vom CPG abgespalten werden. Die anschließende Reinigung der Oligonukleotide durch HPLC erfolgte über das Absorptionsmaximum des Fluoreszeins bei $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$. Eine quantitative Aussage über die Effizienz des Einbaus des Tetrazin-Nukleosids lässt die direkte Folgereaktion mit **FluoCO** nicht zu, daher kann auch die Ausbeute der iEDDA Reaktion nicht eingeschätzt werden. Jedoch wurden trotz der kurzen Reaktionszeit von nur 1 min und einem Einsatz von nur 0.2 eq. **FluoCO** mit dem ersten Protokoll 3.2 nmol (1.6 % Ausbeute, wäre die DNA Syntheseeffizienz sowie die iEDDA-Effizienz bei 100 %; 0.2 μmol) **FluoCO**-modifizierte DNA erhalten. Der Tritylmonitor in Abbildung 85 weist auf eine sehr gute Einbaueffizienz des Tetrazin-Bausteins in DNA hin.

3.5 Ergebnisse

Tetrazin 24

Für die Charakterisierung des synthetisierten Tetrazins **24** wurden Absorptionsspektren aufgenommen und der Extinktionskoeffizient bestimmt. In Abbildung 86 rechts ist das Absorptionsspektrum von **24** dargestellt. Das Absorptionsmaximum des $n \rightarrow \pi^*$ Übergangs liegt bei $\lambda_{\text{abs}} = 519 \text{ nm}$. Durch die Bestimmung der Absorptionswerte bei $\lambda_{\text{abs}} = 519 \text{ nm}$ von drei unterschiedlichen Konzentrationen, konnte der molare Extinktionskoeffizient auf $\epsilon_{519} = 0.25 \text{ mM/cm}$ bestimmt werden (Abbildung 86, links).

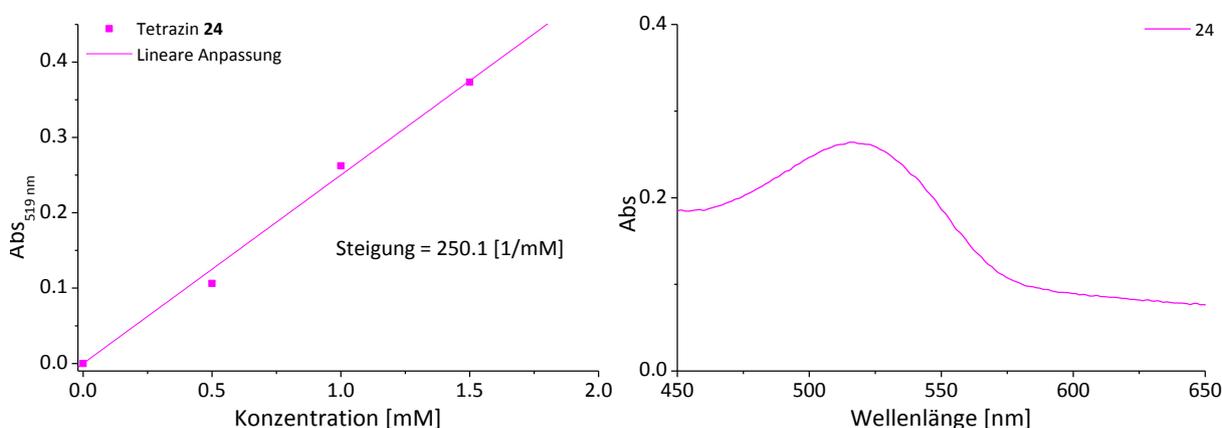


Abbildung 86: links: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von 24 in DMSO/PBS-Puffer; rechts: Absorption von 24, 1 mM in DMSO/PBS-Puffer.

Mit FluoCO markierte DNA

Auch die mit **FluoCO** modifizierte DNA wurde optisch charakterisiert. Dazu wurden Absorption und Emission des hybridisierten Doppelstrangs mit denen des Einzelstrangs verglichen. In Abbildung 87 links sind die Absorptionsspektren dargestellt. Diese zeigen einen großen Unterschied in der Absorption des **FluoCO** Farbstoffs zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 420 - 520 \text{ nm}$. Ein Unterschied lässt sich bei den Emissionsspektren durch eine Schulter bei $\lambda = 560 \text{ nm}$ neben dem Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{em}} = 523 \text{ nm}$ ebenfalls feststellen.

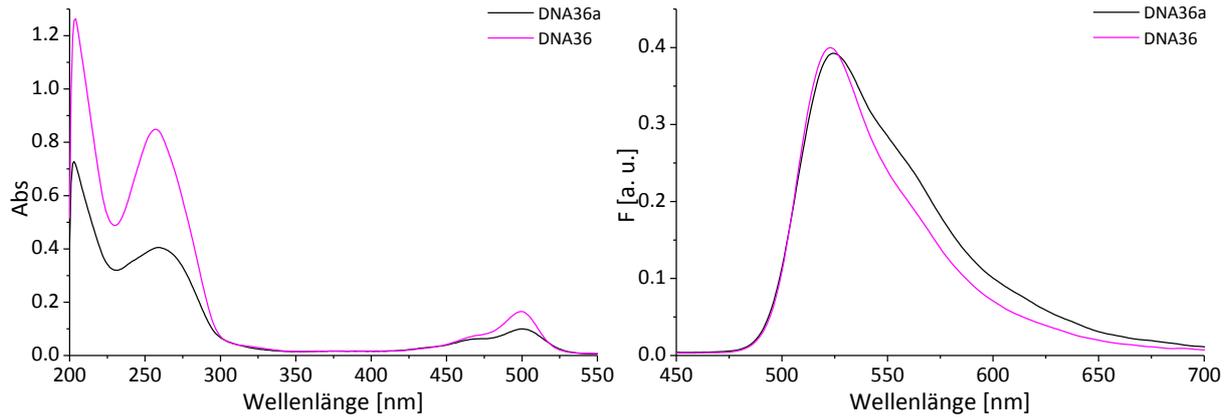


Abbildung 87: Links: Absorptionsspektren des Einzel- und Doppelstrangs DNA36a und DNA36, rechts: Entsprechende Emissionsspektren bei $\lambda_{exc} = 385 \text{ nm}$, Slits 3. Jeweils $2.5 \mu\text{M}$ DNA Lösung in 10 mM NaP_i Puffer mit 250 mM NaCl .

Die Extinktion von **FluoCO** bei $\lambda_{abs} = 500 \text{ nm}$ im Einzelstrang liegt geringer vor als die des Doppelstrangs. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Fluoreszenzfarbstoff in den ungeordneten Einzelsträngen durch Wechselwirkungen oder Aggregation mit der Umgebung einen verminderten Extinktionskoeffizienten aufweist. Dies wird durch die Ausbildung des geordneten Doppelstrangs aufgehoben, wodurch auch der Extinktionskoeffizient wieder steigt. Die Schulter bei $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$ im Emissionsspektrum zeigt die Fluoreszenz des gebildeten Aggregats. Auch hier kann man eine Abnahme dieser Fluoreszenz mit der Ausbildung des Doppelstrangs sehen.

3.6 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurde ein Tetrazin-Nukleosid synthetisiert und über die automatisierte Festphasensynthese in DNA eingebracht. Anschließend konnte auf der festen Phase die Tetrazin-modifizierte DNA durch eine Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) mit einem COMBO-modifizierten Fluoreszein-Farbstoff der Arbeitsgruppe *Kele*, markiert werden. Die Abspaltung und Entschützung der markierten DNA erfolgte im Anschluss, trotz basischer Bedingungen erfolgreich. Die Wechselwirkungen des Farbstoffs mit der DNA konnten durch die Ausbildung der Doppelhelix aufgehoben werden. Durch die Anordnung des Farbstoffs mit der DNA konnte der Extinktionskoeffizient von Fluoreszein wieder gesteigert werden.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des photoinduzierten Überschusselektronentransfers in modifizierten Oligonukleotiden.

Das Elektronentransfersystem **2PydU** (ED) und **BrdU** (EA) wurde mit dem artifiziellen **HQ-HQ**-Basenpaar in DNA inkorporiert. Durch die Anregung des Donors über LEDs konnte ein Elektronentransfer über die Bildung von Abbruchsträngen festgestellt werden. Dieser erfolgte jedoch nicht am dafür vorgesehenen **BrdU**. Durch den Vergleich mit entsprechend langen Strangfragmenten konnte gezeigt werden, dass das **HQ-HQ**-Basenpaar die überschüssige Ladung mit einer bestimmten Lebenszeit aufnimmt und Strangbrüche induziert. Dies konnte auch durch die entsprechenden Potentiale und die damit resultierende Triebkraft des Systems **2PydU/HQ** unterstützt werden.

Anhand dieser Erkenntnis wurde ein neues Elektronentransfersystem konzipiert. Als Elektronendonator wurde **DIMAPdU** gewählt, da die Anregung im höheren Wellenlängenbereich erfolgt und das Oxidationspotential im angeregten Zustand sogar noch um 0.3 V höher liegt als das der **2PydU** Modifikation. Der Sequenz in 5'-Richtung folgend wurde das **HQ-HQ**-Basenpaar mit unterschiedlichen Abständen zum Donor eingebaut. Mit einer Triebkraft von $\Delta G = -1.2$ eV konnte ein Elektronentransfer von **DIMAPdU** zu **HQ** durch die auftretenden Strangbrüche an der **HQ**-Modifikation nachgewiesen werden. Auch über transiente Absorptionsmessungen konnte der reduktive Elektronentransfer als ein ultraschnell abklingender Prozess mit einigen 100 fs charakterisiert werden.

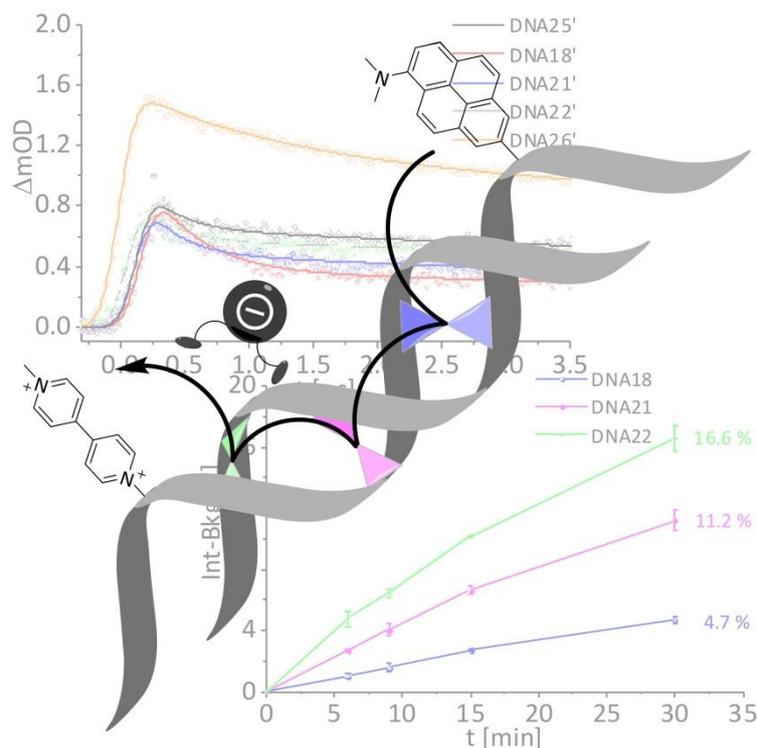


Abbildung 88: Schematische Darstellung des erfolgreich gemessenen Elektronentransfers.

Die Triebkraft über das **HQ-HQ**-Basenpaar wurde durch den Einsatz eines weiteren Elektronenakzeptors in 5'-Richtung erhöht. Die **MV²⁺U**-Modifikation mit einem Reduktionspotential von $E_{\text{Red}} = -0.4 \text{ V}$ erhöht die Effektivität des EETs über das **HQ-HQ**-Basenpaar von 34 % auf 63 %, was durch die relativen Amplituden der transienten Absorptionsmessung nachgewiesen wurde. Auch die entsprechenden Strangbruchexperimente zeigen dies. Durch eine erhöhte EET-Effizienz nimmt die Strangbrucheffizienz am **HQ-HQ**-Basenpaar ab.

Des Weiteren konnte erstmals durch die Inkorporation von mehreren **HQ-HQ**-Basenpaaren hintereinander die Elektronentransfer-Distanz auf 9 Basenpaare (Bruch am 3. **HQ** in **DNA22**, über ca. 30.6 \AA) erweitert werden. Dabei wirkt die **HQ**-Modifikation als Ladungstransporter und durch die induzierten Strangbrüche gleichzeitig als Detektionsinstrument. Dies konnte über die ansteigende Strangbruchmenge von der ersten **HQ**-Modifikation bis zur dritten anschaulich gemacht werden. Auch über die transiente Absorption konnten diese ultraschnellen Prozesse dargestellt werden.

Es konnte demnach ein neues photoinduziertes Elektronentransfersystem in DNA eingebracht werden, das über artifizielle **HQ-HQ**-Basenpaare, Ladung über sehr weite Distanzen transportieren kann. Der Einsatz **HQ**-modifizierter DNA in der molekularen Elektronik ist wegen der gleichzeitigen Strangbruchfähigkeit von **HQ** nicht möglich, jedoch könnte ein System mit den richtigen Potentialen DNA zu einem Leiter machen.

Auch der Versuch der weniger invasiven, optischen Detektion des Elektronentransfers wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Aufnahme eines Elektrons von Sulfonylindol-Derivaten (EA) führt zu einer Abspaltung der Sulfonylgruppe. Die Produkte können im Folgenden spektroskopisch und über MS nachgewiesen werden. Der photoinduzierte EET sollte zwischen dem Elektronendonator **DIMAP** und **PhSO₂Ind**, **DansInd** und **PyInd** in Lösung erfolgen. Es konnte die ansteigende Emission der Indolspesies von **PhSO₂Ind** nach erfolgter Abspaltung detektiert werden. Diese Belichtung führte im präparativen Ansatz sogar zu dem synthetisch schwer zugänglichen Indol-C-Nukleosid. Jedoch konnte ein evtl. erfolgter EET in DNA der inkorporierten Akzeptoren **11** und **20** weder spektroskopisch, noch über MS eindeutig nachgewiesen werden. Eine stabilere, im wässrigen Medium lösliche und fluoreszente Schutzgruppe, die in Anwesenheit von Indol mit gelöschter Fluoreszenz vorliegt, könnte den spektroskopischen Nachweis möglich machen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein Tetrazin-Nukleosid erfolgreich synthetisiert und in DNA-inkorporiert. Anschließend konnte über die Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf ein **COMBO**-modifiziertes Fluoreszein-Derivat an diese DNA auf der festen Phase angebracht werden. Damit ist eine neue, effektive Möglichkeit der bioorthogonalen Modifikation von DNA gegeben.

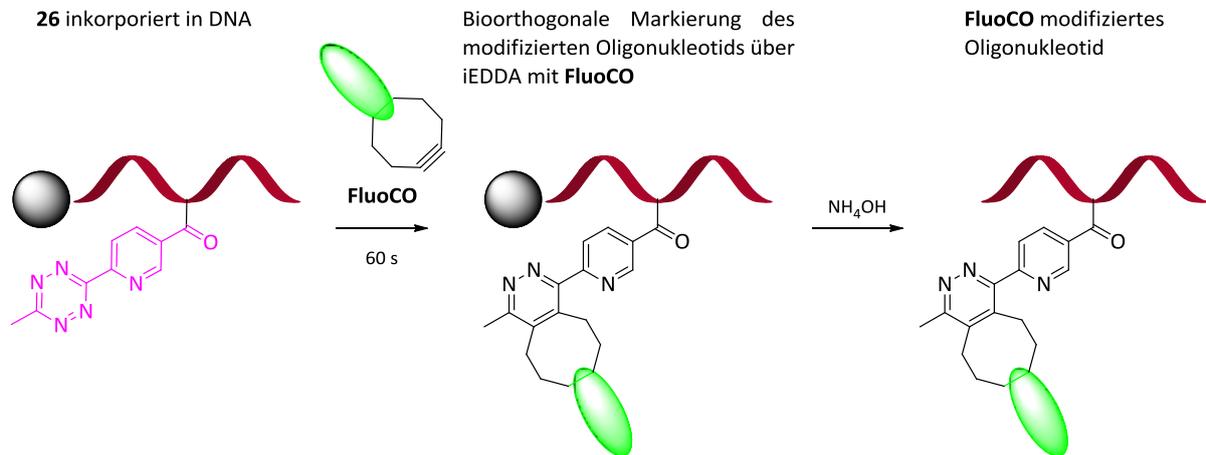


Abbildung 89: Darstellung der Markierung von tetrazinmodifizierter DNA.

5. Experimenteller Teil

5.1 Reagenzien und Geräte

Die bei der Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck*, *Sigma Aldrich* und *ABCR* bezogen.

Lösungsmittel

Bei Synthesen verwendete Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe p.A. (pro analysi). Wenn in Reaktionen trockene Lösungsmittel verwendet wurden, wurden diese ebenfalls von einer der oben genannten Firmen in der Qualitätsstufe p.A. bezogen und unter Argon entnommen. Für die Säulenchromatographie wurden technische Lösungsmittel verwendet, außer für die Aufreinigungen von Phosphoramidit-Stufen, dafür wurde ebenfalls Lösungsmittel der Qualitätsstufe p.A. verwendet. Deuterierte Lösungsmittel für NMR Messungen wurden von der Firma *Deutero GmbH* bezogen.

Gas

Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden unter Argon Atmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,996 % Reinheit) durchgeführt. Für die Reaktionen unter Feuchtigkeitsausschluss wurden die benötigten Glasgeräte vor Gebrauch mithilfe des Hochvakuums ausgeheizt.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* verwendet. Die Beschichtung bestand aus 60 F254 Kieselgel mit einer Schichtdicke von 0.25 mm. Die optische Auswertung erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Die chemische Auswertung der Substanzen erfolgte durch Anfärben mittels Anisaldehyd Reagenz (0.5 mL Anisaldehyd, 10 mL konz. Essigsäure, 5 mL konz. Schwefelsäure und 85 mL Methanol), Schwefelsäure in Methanol (3 %) oder mit einer KMnO_4 -Lösung (40 g K_2CO_3 , 6 g KMnO_4 , 600 mL H_2O und 5 mL 10 % NaOH Lösung). Zum Erwärmen diente ein Heißluftfön.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 A der Firma *Acros* mit einer Korngröße von 35-70 μm . Die Säulen wurden nass gepackt und nach dem von W. C. Still beschriebenen Verfahren^[202] mit Überdruck (Druckluft) betrieben. Die zu reinigende Substanz wurde entweder in der mobilen Phase gelöst oder aufgeschlämmt.

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Aufreinigung der synthetisierten Oligonukleotide wurde ein HPLC-System der Firma *Shimadzu* verwendet (Entgaser, Pumpeneinheit *LC-10AT*, Autosampler *SIL-10AD*, Diodenarraydetektor *SPD-M10A*, Steuereinheit *SCL-10A*, Steuersoftware *Class-VP*). Die analytische Trennung erfolgte hierbei über eine *Supercosil LC 318* Säule (25 cm x 4.6 mm), die präparative Trennung über eine *Supercosil LC 318* Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm Porengröße). Zur Herstellung der Laufmittel wurde Acetonitril (*LiChrosolv, Merck*) und entionisiertes Wasser aus einer Millipore-Entsalzungsanlage *Direct-Q 5* verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B). Bei Oligonukleotiden mit Methylviologen Modifikation wurde der pH-Wert des 50 mM Ammoniumacetatpuffers auf 6 eingestellt (bei 20 % Laufmittel B in Laufmittel A: pH-Wert von 6.2). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min für analytische Methoden und 2.5 mL/min für präparative Methoden. Zur Detektion der einzelsträngigen DNA wurde die Absorption der charakteristischen Modifikationen oder der unmodifizierten DNA mittels eines DAD aufgenommen:

Tabelle 8: Detektionswellenlängen des DAD der verschiedenen Modifikationen im Einzelstrang.

$\lambda_{\text{Detektion}}$	Modifikation
260 nm	unmod. Oligonukleotide
290 nm	1-Phenylsulfonylindol
280 nm	Methylviologen
310 nm	Hydroxychinolin
355 nm	Dimethylaminopyren
490 nm	Fluoreszein

Lyophilisation

Zur Sublimationstrocknung wurde eine *Alpha 1- 2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage von *Christ* benutzt, nachdem die zu trocknenden wässrigen Lösungen im flüssigen Stickstoff eingefroren wurden.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909* Syntheseautomat der Firma Applied Biosystems. Das Gerät wurde mit Argon als Schutzgas betrieben. Als Träger dienten mit CPG gepackte Säulen (1 µmol Belegung (500 Å)) von *Proligo Reagents*. Weitere Chemikalien für die Festphasensynthese stammen von *Applied Biosystems (ABI)*.

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren der DNA-Einzelstränge wurden von Annette Hochgesandt mit folgendem Gerät aufgenommen:

Maldi-TOF-MS: *BIFLEX-IV* Spektrometer von Bruker Daltonics

Die DNA Einzelstränge mit nur einer oder keiner Hydroxychinolin Modifizierung konnten in einer Matrix von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (0.3 M in EtOH) und Diammoniumcitrat (0.1 M in H₂O) im Verhältnis 2:1 gemessen werden. Für Oligonukleotide mit mind. 2 Hydroxychinolin Modifikationen musste eine Matrix von 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA, ges. Lösung in 50 % MeCN) und Diammoniumcitrat (0.1 M in H₂O) im Volumenverhältnis 9:1 eingesetzt werden.

Die Massenspektren der restlichen Substanzen wurden an folgenden Geräten durch die zentrale Analytik des Karlsruher Institut für Technologie aufgenommen:

ESI-MS: *Agilent 6230 TOF LC/MS*

ESI-MS: *Varian MS 1200-L*.

Die Angaben erfolgen in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln an den Spektrometern Avance 300 der Firma *Bruker* gemessen. Die gelösten Proben befanden sich in Probenröhrchen mit einem Außendurchmesser von 5 mm und beinhalteten ca. 10 – 20 mg Substanz in 0.7 mL deuteriertem Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS) als Nullpunkt. Als Referenz diente im ¹H-Spektrum das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels bzw. im ¹³C-Spektrum das Lösungsmittelsignal. Die Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben.

Hybridisierung

Der jeweilige Einzelstrang wurde zusammen mit 1.2 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i, pH = 7) mit 250 mM NaCl für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu Hydroxychinolin modifizierter DNA wurden zusätzliche Reagenzien gegeben, die ebenfalls mit den Oligonukleotiden hybridisiert wurden: 10 eq. EDTA oder 1.1 eq. Metallsalz oder 25 eq. KWK-Tripeptid.

Optische Spektroskopie

Alle Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, in Quarzglas-Küvetten von *Starna* mit einer Dicke von 1 cm, bei einer Temperatur von 20 °C.

Absorptionsspektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden in einem *Cary 100 Bio* der Firma Varian mit Temperatureinheit gemessen. Die Spektren wurden gegen die Absorption des Lösungsmittels hintergrundkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: SBW: 2.0 nm, Average time 0.1 s, Data interval 1.0, Light source change over 350 nm.

Messungen zur Schmelzpunktbestimmung erfolgten analog über einen Temperaturbereich von 10 – 90 °C. Die Temperatur am Start- bzw. Endpunkt wurde jeweils 2 min konstant gehalten. Die Heiz- bzw. Kühl Rate betrug 0.7 °C/min.

128

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax-3 Fluorimeter von *Jobin-Yvon* mit einem Peltier-Element LFI-3751 zur Temperatursteuerung von Wavelength Electronics durchgeführt. Die Spektren wurden basislinienkorrigiert aufgenommen.

Folgende Messparameter wurden verwendet: Increment: 1.0 nm, Increment time: 0.2 s.

Spektroelektrochemie (SEC)

Für die SEC-Messungen wurde eine spezielle Zelle aus Calciumfluorid-Platten mit einer Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Als Arbeitselektrode diente ein Platinnetz. Die entsprechende Gegen- bzw. Referenzelektrode bestand aus Platin bzw. Silber. Die Messungen wurden in einem Varian Cary 50 mit speziellem Probenhalter in trockenen Lösungsmitteln und mit TBAHFP als Leitsalz durchgeführt. Es wurden die Absorptionsänderungen bei steigendem Potential aufgezeichnet. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (Cubepot) erzeugt, der mit der Software Mastercontrol angesteuert werden konnte. Die Potentiale wurden nicht gegen einen internen Standard kalibriert und sind daher keine absoluten Werte.

Belichtungsapparaturen

Als Lichtquelle wurde ein, von der zentralen feinmechanischen und elektronischen Werkstatt des Fachbereichs Chemie an der Universität Regensburg produzierter Belichtungsreaktor (*FRITZ*) verwendet. Zwei Hochleistungs-UV-LEDs der Firma *Nichia* mit einem großen Abstrahlwinkel von ca. 120° bestrahlen die größtmögliche Fläche einer 1 cm breiten Quarzküvette, diese kann über 2 Peltier Elemente im Reaktor gekühlt werden.

Da so wenig modifizierte DNA wie möglich genutzt werden sollte, wurde das maximale Volumen der belichteten DNA-Lösungen in Wasser auf 0.6 mL beschränkt, was das Anheben der Küvette durch einen Platzhalter mit einer Höhe von 1 cm erforderte, dadurch konnten die Lösungen jedoch nicht mehr gerührt werden. Anstelle des Rührens wurde die Lösung der Küvette vor jeder

Probenentnahme für 3 s geschüttelt. Es wurden bei 20 °C über 30 min jeweils Proben von 20 µL entnommen. Die Wellenlänge der 2 verwendeten LEDs wurde den Absorptionsmaxima der jeweiligen Elektronendonoren angepasst und mit 500 mA betrieben:

2PydU: 2 * λ_{\max} = 365 nm LED, *Nichia* (NCSU033B)

DIMAPdU: 2 * λ_{\max} = 385 nm LED, *Nichia* (NCSU034B)

Ebenso wurde eine 200 W Hg/Xe Lampe (*Oriel Instruments*) mit einem luftgekühltem 345 nm *cutoff* Filter (WG 345, 3.0 mm, *Schott*) genutzt um Oligonukleotide zu belichten, sowie eine 75 W Xenon Gasentladungslampe der Firma *Oriel* mitvorgeschaltetem *cutoff* Filter WG 345.

Gelelektrophorese

Die hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgele wurden in einer *Sequi-Gen GT* Sequencing Cell (21 x 40 cm) mit einem *PowerPac HV* von *Bio-Rad* bei 50 °C für 1.5 h und 75 W durchgeführt. Die Gele enthielten 12 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 8.3 M Harnstoff, 2 mM EDTA pH 8.0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure. Als Puffer diente TBE (8.3 M Harnstoff, 2 mM EDTA pH 8.0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure).

Des Weiteren wurden Polyacrylamidgele in einer Mini-PROTEAN® Tetra Cell (10 x 10 cm) bei RT für 45 min bei 200 V und 40 mA durchgeführt.

Fluoreszenzimager

Die Polyacrylamidgele wurden durch einen Fluoreszenzimager *Stella 8300* von *Raytest* ausgelesen. Die Anregung von Fluoreszein erfolgte von oben mit einer LED mit Anregungsfilter: 470 ± 20 nm. Die Emission wurde mit einer auf -20 °C gekühlten CCD-Kamera detektiert, wobei ein entsprechender Emissionsfilter (535 ± 20 nm) verwendet wurde. Alle Polyacrylamidgele wurden mit 1 min Belichtungszeit mit dem größtmöglichen Abstand (Stage 4) aufgenommen. Die Auswertung dieser Bilder erfolgte mit der *Aida Image Analyzer v.450* Auswertesoftware von *Raytest*. Für die Quantifizierung wurde der *1D Multi Labeling Modus* verwendet.

Transiente Absorptionsmessung

Für die Messungen wurde ein Femtosekunden- Ti/Saphir-Lasersystem (CPA 2210, Clark-MXR) mit einer Wellenlänge von 775 nm und einer Pulsenergie von bis zu 2 mJ verwendet.^[147] Dabei wird der verstärkte Laserstrahl mit einer Wiederholungsrate von 1 kHz in zwei gleiche Teile aufgespalten (NOPA – *non-collinear optical parametric amplifier*). Ein NOPA dient der Summenfrequenzerzeugung (SFG, 340 nm). Dies erfolgt mittels eines Summenfrequenzmischprozesses der

Fundamentalwellenlänge des Lasers von 775 nm. Die Pulsdauer beträgt 150 fs (Halbwertsbreite). Durch den zweiten NOPA wird die *probe*-Wellenlänge erzeugt. Die *pump*-Energie liegt bei 0.9 μJ , die des *probe*-Strahls mit 0-2 μJ weit darunter. Die Polarisation des probe-Pulses wurde mit einem $\lambda/2$ -Plättchen (Alphas) auf den magischen Winkel von 54.7 $^\circ$ eingestellt.

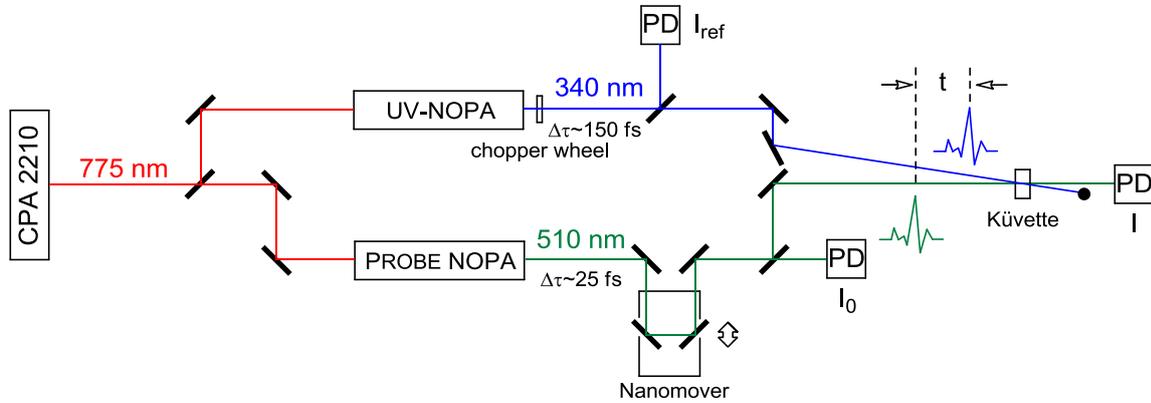
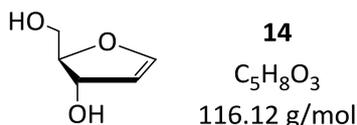


Abbildung 90: Schematische Darstellung des Aufbaus der transienten Absorptionsmessung.^[147, 203]

5.2 Synthesevorschriften

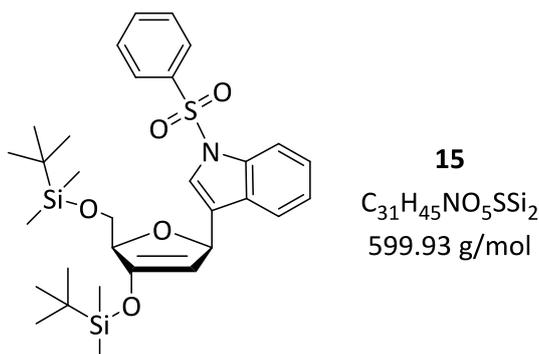
5.2.1 ET Akzeptoren

Die Synthese von 1,4-Anhydro-2-deoxy-D-erythro-pent-1-enitol **14** erfolgte wie in der vorangehenden Masterarbeit beschrieben.



131

Synthese von 3-((2R,5R)-4-(Tert-butyltrimethylsilyloxy)-5-((tert-butyltrimethylsilyloxy)methyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl)-1-(phenylsulfonyl)-1H-indol **15**.



In einem 5 mL Reaktionsgefäß wurden 148 mg [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) (203 µmol, 0.1 eq.) in 1.5 mL THF und 2.5 mL MeCN 30 min mit Argon gespült. Anschließend wurden 700 mg Glycal (2.03 mmol, 1 eq.) zugegeben und die Lösung erneut mit Argon gespült. 1.02 g 3-Brom-1-phenylsulfonylindol (3.05 mmol, 1.5 eq.) und 281 µL Triethylamin (2.03 mmol, 1 eq.) wurden zugegeben und das Gefäß drucksicher verschlossen. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei 90 °C gerührt, unter Argon Atmosphäre geöffnet, erneute 297 mg Pd(dppf)₂Cl₂ (406 µmol, 0.2 eq.) des Katalysators zugegeben und anschließend wieder über Nacht bei 90°C gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, H/EE 4/1) um 754 mg (1.25 mmol, 62 %) des gelben Öls zu erhalten.

DC (SiO₂, PE/EE 4/1)

β-Anomer : R_f = 0.70

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS)

δ_{H} : -0.09, -0.04, 0.22, 0.24 (4*3 H, 4*s, Si-Me), 0.82, 0.96 (2*9 H, 2*s, Si-tBu), 3.69 (1 H, dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, 5'-H_a), 3.89 (1 H, dd, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, 5'-H_b), 4.61 (1 H, m, 4'-H), 4.91 (1 H, t, $J = 1.7$ Hz, 2'-H), 5.94 (1 H, dd, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz, 1'H), 7.22 (1 H, dt, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, Ind-3-H), 7.30 (1H, dt, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, Ind-4-H), 7.43 (2 H, m, Ph-SO₂-2H und 4-H), 7.51 (1 H, s, Ind-1-H), 7.52 (1 H, m, Ph-SO₂-3-H), 7.68 (1 H, "d", $J_1 = 7.77$ Hz, Ind-2-H), 7.87 (2 H, m, Ph-SO₂-1-H und 5-H), 7.96 (1 H, d, $J_1 = 8.3$ Hz, Ind-5-H).

2D-NMR (CDCl₃)

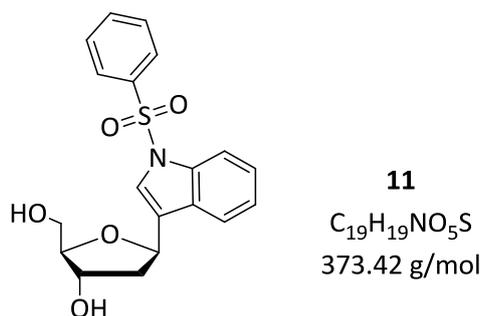
COSY

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃)

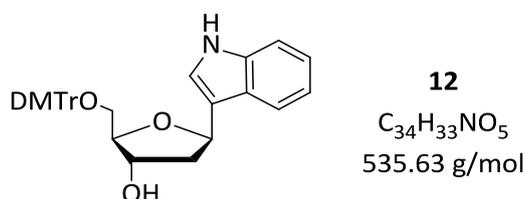
δ_{C} : -5.5, -5.4, -4.9, -4.8 (4* Si-CH₃), 1.0 (1'-C), 18.1, 18.5 (2*SiCR₃), 25.6, 26.0 (2*3*CH₃ SG), 65.0 (5'-C), 77.4 (4'-C), 84.2 (3'-C), 100.0 (2'-C), 113.5 (Ind 2-C), 120.6, 123.1, 123.7, 124.7 (Ind 4-C, 5-C, 6-C, 7-C), 125.0 (Ind 3-C), 126.8 (SO₂-Ph 3-C und 5-C), 129.2 (SO₂-Ph 2-C und 6-C), 129.4 (Ind 9-C), 133.7, 135.5 (Ind 8-C), 138.4 (SO₂-Ph 1-C).

CI-MS (NH₃)m/z (%): 600.4 (100) [MH⁺]

Die Synthese von 1,4-Anhydro-2-deoxy-D-erythro-pent-1-enitol **11** erfolgte wie in der vorangehenden Masterarbeit beschrieben.



Synthese von (2R,3R,5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(1H-indol-3-yl)tetrahydrofuran-3-ol **12**.



In einer Quarzküvette mit Rührfisch wurden 100 mg (268 μ mol, 1.0 eq.) 1-Phenylsulfonyl-geschütztes Indolnukleosid **11** in 1.20 mL Acetonitril gelöst und mit 1.80 mL (20.1 mmol, 75.0 eq.) NEt_3 versehen. Anschließend wurden 65.7 mg (268 μ mol, 1.0 eq.) des Elektronendonors N,N-Dimethylaminopyren (Kapitel 5.2.2) zur Lösung gegeben und diese 2 h lang bei 25 °C belichtet (365 nm LED, 20 °C).

Die Entschützung konnte mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt werden (DCM/MeOH 10/1, $R_f = 0.35$). Nach der Belichtung wurde das Rohprodukt vom Lösungsmittel befreit und der Belichtungsrückstand in 1.5 mL trockenem Pyridin gelöst. Es wurden 40 μ L (536 μ mol, 1.0 eq.) NEt_3 zugegeben, sowie 118 mg (349 μ mol, 1.3 eq.) DMTrCl. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 40 °C gerührt. Weitere 40 μ L NEt_3 und 118 mg DMTrCl wurden zugegeben und erneut über Nacht bei 40 °C gerührt.

Das Lösungsmittel wurde entfernt und das verbliebene Pyridin aus Benzol lyophilisiert. Das getrocknete Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (SiO_2 , DCM/Aceton 25/1 + 1 % NEt_3) gereinigt und der beige Feststoff mit 49 % Ausbeute erhalten.

DC (SiO₂, DCM/Aceton 25/1)

R_f = 0.60

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25 °C, TMS)

δ_H: . 10.96 (s, 1H, NH), 7.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, arom. H), 7.33 (m, 11H, arom. Hs), 7.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, arom. H), 6.84 (m, 5H, arom. Hs), 5.31 (dd, *J* = 9.9, 5.0 Hz, 1H, 1'H), 5.10 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, 3'OH), 4.22 (m, 1H3'H), 3.92 (m, 1H, 4'H), 3.71 (s, 6H, DMTr-CH₃), 3.08 (m, 2H, 5'Hs), 2.24 (m, 1H, 2'Ha), 2.06 (m, 1H, 2'Hb).

2D-NMR (CDCl₃)

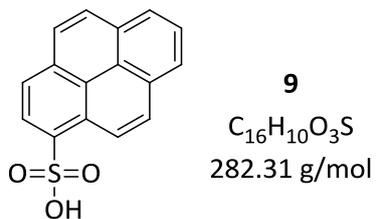
COSY, NOESY

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃)

δ_C:. 157.9, 157.7, 144.9,
136.8, 137.0, 135.7, 135.5, 134.5, 129.8, 129.6, 128.8, 127.6, 127.5,
127.3, 126.6, 124.3, 123.2, 113.0, 112.7, 85.2, 85.1, 73.0, 68.6, 64.1,
56.5, 54.92, 29.5 ppm.^[158]

FAB-MS

m/z (%): 535.1 (5) [M⁺]

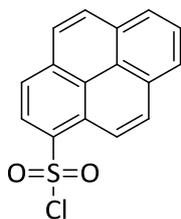
Synthese von 1-Pyren sulfonsäure **9**.

Zu einer Lösung von 3.00 g Pyren (14.8 mmol, 1.0 eq.) in 12 mL Nitrobenzol, wurden langsam 2.38 mL konzentrierte Schwefelsäure (44.50 mmol, 3 eq.) gegeben, wobei ein grünelber Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abgesaugt, mit Benzol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der erhaltene Feststoff wurde in Wasser gelöst und durch Zugabe konzentrierter HCl wieder ausgefällt. Zur Reinigung wurde in heißer, wässriger HCl umkristallisiert und das Produkt mit 29 % erhalten.

135

MS (EI)

m/z (%): 282.1 (4.2%) [M]

Synthese von 1-Pyren sulfonsäurechlorid **10**.

10
 $C_{16}H_9ClO_2S$
300.76 g/mol

136

Zu einem Puder zerriebene 1.00 g 1-Pyren sulfonsäure **9** (3.54 mmol, 1.0 eq.) wurde unter Eiskühlung mit 1.20 g Phosphorpentachlorid (4.27 mmol, 1.20 eq.) verrieben. Um die Reaktion zu vervollständigen wurde die Feststoffmischung auf 60 °C über Nacht unter Feuchtigkeitsausschluss erhitzt.

Anschließend wurden 13 mL Eiswasser in die Reaktion gegeben. Nach der vorsichtigen Neutralisierung mit ca. 2 g Natriumcarbonat wurde das Produkt mit 4 x 10 mL Diethylether extrahiert.

Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , EE) und mit 11 % erhalten.

DC (SiO_2 , EE)

$R_f = 0.66$

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 25 °C, TMS)

δ_H : 9.11 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 8.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.49 – 8.11 (m, 6H).

2D-NMR ($CDCl_3$)

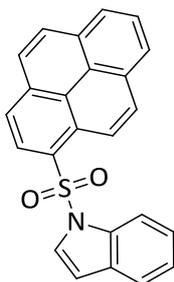
COSY

^{13}C -NMR (75MHz,)

δ_C : 132.0, 131.7, 128.2, 128.1, 127.5, 127.1, 126.4, 123.9, 122.6.

MS (EI)

m/z (%): 300.1 (41.2 %) [M]

Synthese von 1-(1-Pyrenyl-sulfonyl)-1H-indol **PyInd**.**PyInd**

$C_{24}H_{15}NO_2S$
381.45 g/mol

137

Zu einer Mischung aus 35 mg Indol (299 μ mol, 1.0 eq.), 6.8 mg Benzyltriethyl-ammoniumchlorid TEBA (29.9 μ mol, 0.1 eq.) und 20.9 mg NaOH (523 μ mol, 1.75 eq.) in 5 mL DCM wurden 98.8 mg 1-Pyrenylsulfonsäurechlorid **10** (329 μ mol, 1.1 eq.) gegeben, und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

10 mL DCM und 10 mL H₂O wurden zur Mischung gegeben und die organische Phase abgetrennt. Anschließend wurde sie zweimal mit Wasser und einmal mit konz NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. **PyInd** wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, erst DCM, dann H/EE 10/1) gereinigt und mit 45% erhalten.

DC (SiO₂, H/EE 10/1)

$R_f = 0.36$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, TMS)

δ_H : 9.00 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.48 (m, 5H), 8.25 (m, 3H), 7.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H).

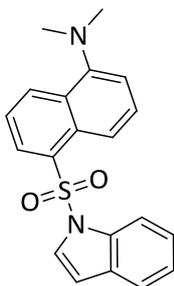
2D-NMR (DMSO-*d*₆)

COSY

MS (EI)

m/z (%): 381.0 (100) [M]

Synthese von 15-(1H-Indol-1-ylsulfonyl)-N,N-dimethylnaphthalen-1-amin **DansInd**.



DansInd

$C_{20}H_{18}N_2O_2S$
350.43 g/mol

138

Zu einer Mischung aus 150 mg Indol (1.28 mmol, 1.0 eq.), 29.2 mg Benzyltriethyl-ammoniumchlorid (128 μ mol, 0.1 eq.) und 89.6 mg zerriebene NaOH-Plätzchen (2.24 mmol, 1.75 eq.) in 10 mL DCM, wurden 414 mg Dansylchlorid (1.54 mmol, 1.2 eq.) gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

Anschließend wurden 40 mL Wasser und DCM zugegeben und die organische Phase von der wässrigen abgetrennt. Es wurde mit 2 x 20 mL Wasser und 1 x 20 mL konzentrierter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , H/EE 4/1) und zu 54 % erhalten.

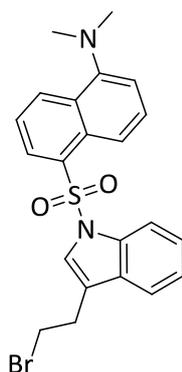
DC (SiO_2 , H/EE 4/1)

$R_f = 0.4$

1H -NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, 25 °C, TMS)

δ_H : 8.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.10 (dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.51 (m, 3H), 7.20 (m, 3H), 6.68 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 2.83 (s, 6H).

Synthese von 5-(3-(2-Bromethyl)-1H-indol-1-ylsulfonyl)-N,N-dimethylnaphthalen-1-amin **19**.



19

$C_{22}H_{21}BrN_2O_2S$

457.38 g/mol

139

In einem trockenen, Argon gefluteten Kolben wurde eine Mischung aus 150 mg 3-(2-Bromoethylindol) (669 μ mol, 1.0 eq.), 15.3 mg TEBA (66.9 μ mol, 0.1 eq.) und 70.0 mg NaOH (1.75 mmol, 1.75 eq.) in 10 mL DCM gelöst und anschließend 216 mg Dansylchlorid (803 μ mol, 1.2 eq.) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurden 40 mL DCM und Wasser zu der beendeten Reaktion gegeben, die organische Phase abgetrennt und mit 2 x 20 mL Wasser und 1 x 20 mL konzentrierter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel entfernt. Zur Aufreinigung wurde das Produkt durch Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , H/EE 4/1) und zu 89 % erhalten.

DC (SiO_2 , H/EE 4/1)

$R_f = 0.43$

1H -NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, 25 °C, TMS)

δ_H : 8.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 6.98 (m, 1H), 3.63 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.83 (s, 6H).

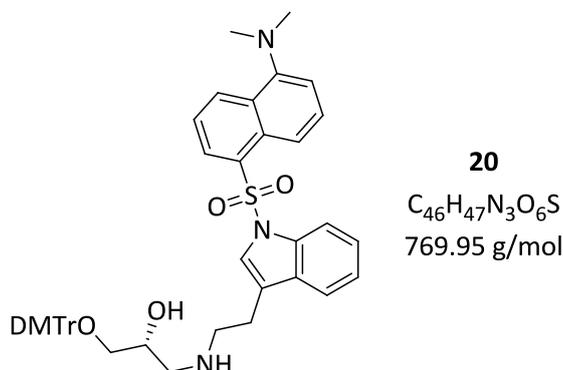
2D-NMR (Chloroform-*d*)

COSY

^{13}C -NMR (75MHz, Chloroform-*d*)

δ_C : 131.64 , 129.89 , 129.63 , 129.19 , 128.75 , 124.72 , 124.38 , 123.12 , 122.99 , 122.33 , 119.85 , 119.06 , 118.74 , 118.48 , 118.25 , 115.67 , 113.59, 45.39 (2 x CH_3), 31.32 (CH_2), 28.70 (CH_2).

Synthese von (R)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-3-(2-(1-(5-(dimethylamino)naphthalen-1-ylsulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethylamino)propan-2-ol **20**.



140

Es wurden 180 mg 1-Dansylsulfonyl-N-indol-3-ethylbromid **19** (412 μ mol, 1.0 eq.) in 10 mL abs. DMF gelöst und mit 143 μ L DIPEA (823 μ mol, 2.0 eq.) versetzt. Nach Zugabe von 178 mg (S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)phenyl-methoxy]-propan-2-ol (453 mol, 1.1 eq.) wurde der Ansatz 2 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurden weitere 71.7 μ L DIPEA (412 μ mol, 1.0 eq.) und 64.8 mg (S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)phenyl-methoxy]-propan-2-ol (165 μ mol, 0.4 eq.) zugegeben und erneut über einen Zeitraum von 3 Tagen gerührt.

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt über Flashchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 100/3 + 0.1 % Pyridin) und mit 77 % erhalten.

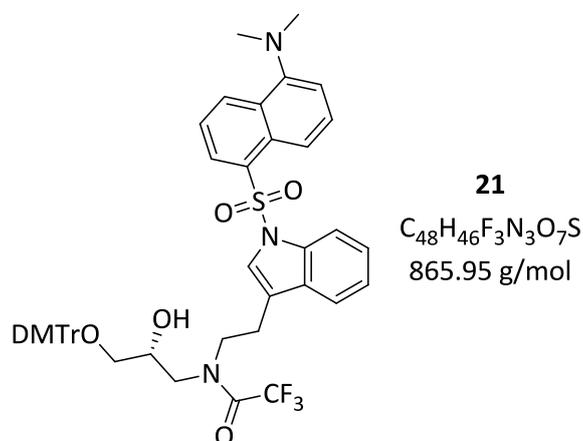
DC (SiO₂, DCM/MeOH 100/3)

R_f = 0.09

¹H-NMR (300 MHz, Methanol-d₄, 25 °C, TMS)

δ_{H} : 8.53 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.31 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.95 (s, 2H), 7.79 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.41 (m, 3H), 7.40 (m, 11H), 6.82 (m, 5H), 3.71 (s, 2H), 3.29 (s, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 2.76 (s, 3H).

Synthese von (R)-N-(3-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-N-(2-(1-(5-(dimethylamino)naphthalen-1-ylsulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoroacetamid **21**.



In absolutem DCM wurden 119 mg 1-Dansylsulfonyl-N-indol-3-((S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxyphenyl)phenyl-methoxy]-propan-2-ol **20** (155 μ mol, 1.0 eq.) gelöst, mit 2 mL trockenem Pyridin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus 96.7 μ L Trifluoressigsäureanhydrid (695 μ mol, 4.5 eq.) in DCM wurde innerhalb von 5 min zugetropft und anschließend für 30 min bei 0 °C gerührt, dann erneut bei Raumtemperatur 30 min.

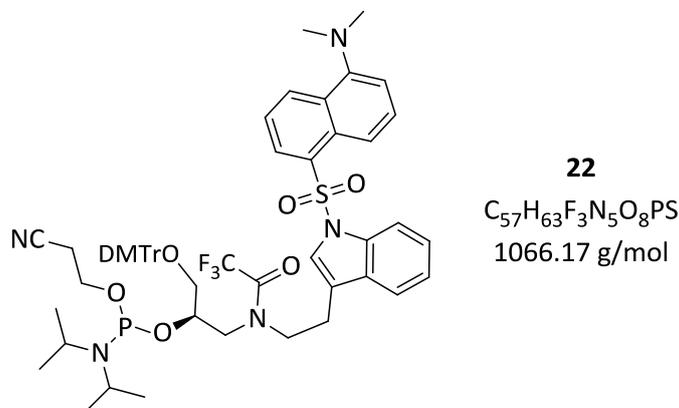
Die Mischung wurde mit 2 x 25 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, anschließend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel erneut unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde nicht weiter aufgereinigt und die Ausbeute als ≥ 99 % angenommen.

DC (SiO₂, DCM/MeOH 100/3)

R_f = 0.33

Synthese von (R)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-3-(N-(2-(1-((5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoroacetamido)propan-2-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidit **22**.

142



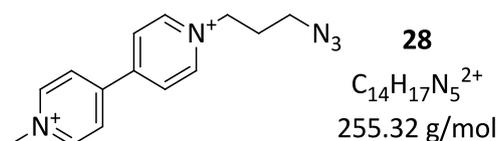
In 10 mL absolutem DCM wurden 130 mg (R)-N-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-N-(2-(1-((5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoroacetamid **21** (150 µmol, 1 eq.) gelöst und mit 65.5 µL trockenem DIPEA (375 µmol, 2.5 eq.) versetzt. Es wurden 77.0 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchloro-phosphoramidit (345 µmol, 2.3 eq.) zugegeben und die Mischung bei RT 5 h gerührt.

Anschließend wurde die Reaktionsmischung direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM/Aceton 50/1 + 0.1 % NEt₃) und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in wenig Benzol aufgenommen und lyophilisiert. Das Phosphoramidit EB38 konnte zu 51 % erhalten werden.

DC (SiO₂, DCM/Aceton 50/1)

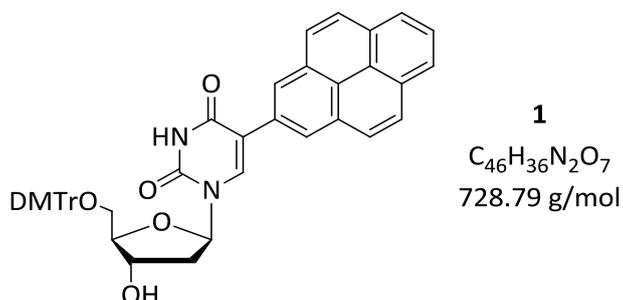
$$R_f = 0.48$$

Die Synthese von 1-(3-azidopropyl)-1'-methyl-4,4'-bipyridine-1,1'-dium **28** erfolgte wie in der Literatur angegeben.^[204]

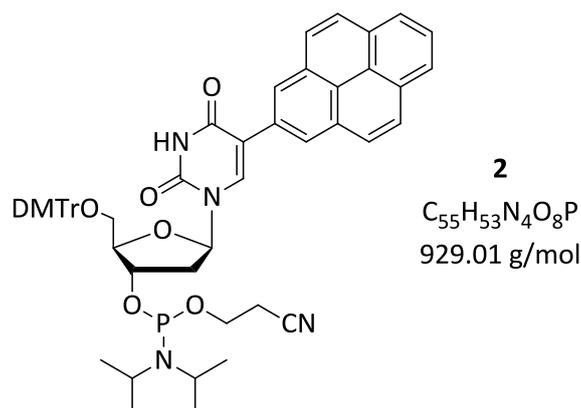


5.2.2 ET Donoren

Die Synthese von 1-((2R,4R,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-5-(pyren-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione **1** erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[139]



Synthese von (2R,3R,5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(2,4-dioxo-5-(pyren-2-yl)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl 2-cyanoethyl diisopropylphosphoramidit **2**



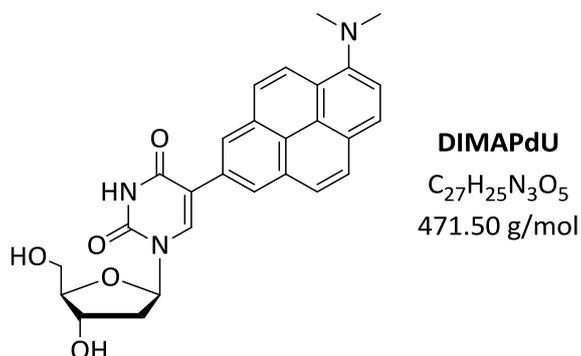
Unter Argon wurden 110 mg **1** (150 µmol, 1.0 eq.) in 5 mL abs. DCM gelöst und mit 97 µL DIPEA (541 µmol, 5.6 eq.) und 67 µL PA-Cl (301 µmol, 2.0 eq.) versetzt.

Nach 4 Stunden rühren bei R.T. wurde das Rohprodukt direkt über Flashchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/Aceton 10/1 + 0.1 % NEt₃). Anschließend wurde das Produkt aus Benzol lyophilisiert und mit einer Ausbeute von 58 % erhalten.

DC (SiO₂, DCM/Aceton 10/1)

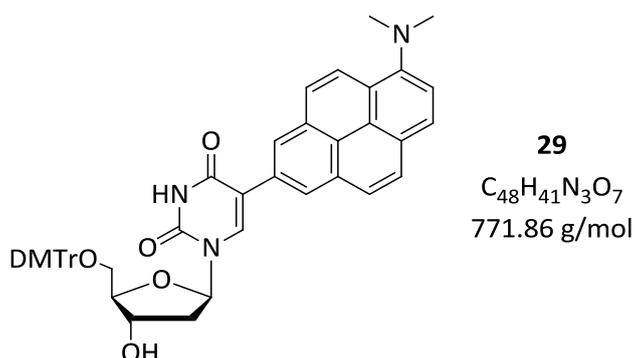
Doppelspot: R_f = 0.73, 0.63

Die Synthese von 5-(6-(dimethylamino)pyren-2-yl)-1-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione **DIMAPdU** erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[81]



144

Die Synthese von 1-((2R,4R,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-5-(6-(dimethylamino)pyren-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dion **29**

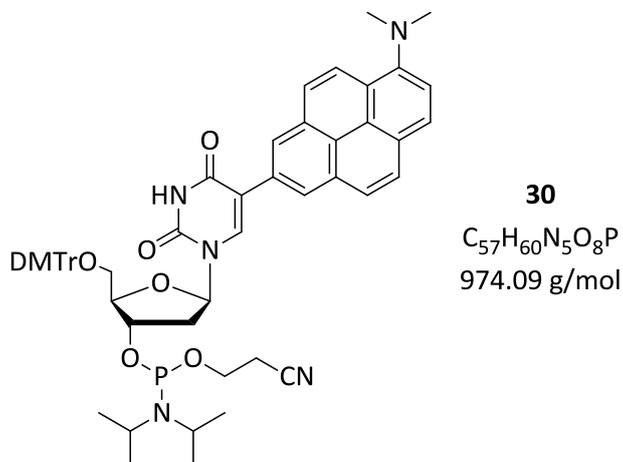


In einem trockenen 50 mL Kolben wurden unter Argon 544 mg **DIMAPdU** (1.15 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL absolutem DCM gelöst. Anschließend wurden 294 μ L DIPEA (1.73 mmol, 1.5 eq.) und 398 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.18 mmol, 1.05 eq.) zugegeben und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Um die Reaktion zu stoppen, wurden 10 mL MeOH zugegeben und anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (SiO_2 , DCM/Aceton 10/1 + 0.1 % NEt_3) und zu 86 % erhalten.

Die analytischen Daten stimmten mit den Daten der Literatur überein.^[81]

Synthese von (2R,3R,5R)-2-((Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(5-(6-(dimethylamino)pyren-2-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl 2-cyanoethyl diisopropylphosphoramidit **30**.



Unter Argon wurden 70 mg 1-((2R,4R,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-5-(6-(dimethylamino)pyren-2-yl)pyrimidine-2,4(1H, 3H)-dion **29** (90.5 μmol , 1.0 eq.) in 5 mL abs. DCM gelöst. Es wurden 32 μL DIPEA (181 μmol , 2.0 eq.) und 30 μL 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (136 μmol , 1.5 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde die Lösung direkt über Flashchromatographie gereinigt (SiO_2 , DCM/Aceton 8/1 + 0.1 % NEt_3). Das Produkt konnte mit 83 % erhalten werden.

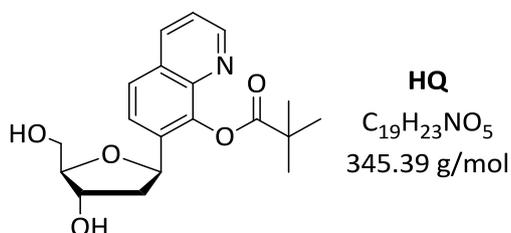
DC (SiO_2 , DCM/Aceton 8/1)

Doppelspot: $R_f = 0.68, 0.55$

Die analytischen Daten stimmten mit den Daten der Literatur überein.^[81]

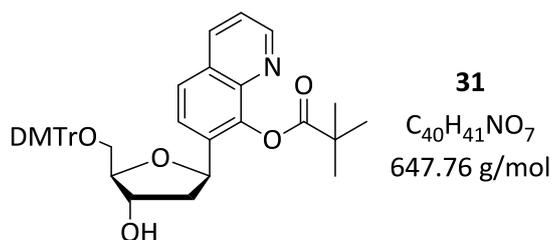
5.2.3 HQ

Die Synthese von 7-((2R,4R,5R)-4-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)quinolin-8-yl pivalat **HQ** erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[135]



147

Synthese von 7-((2R,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxy-2,5-dihydrofuran-2-yl)quinolin-8-yl pivalat **31**.

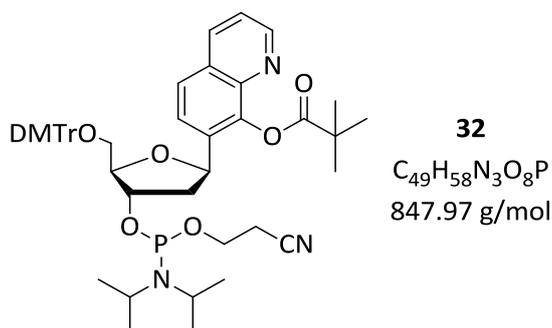


In 10 mL abs. Pyridin wurden 275 mg 7-((2R,4R,5R)-4-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)quinolin-8-yl pivalat **HQ** (796 μ mol, 1.0 eq.) gelöst und mit 350 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.04 mmol, 1.3 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 30 °C gerührt.

Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt über Flashchromatographie (SiO_2 , DCM/Aceton 25/1 + 0.1 % NEt_3) gereinigt. **31** konnte mit 56 % als farbloser, schaumiger Feststoff erhalten werden.

Die analytischen Daten stimmten mit den Daten der Literatur überein.^[135]

Synthese von 7-((2R,4R,5R)-5-((Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinooxy)tetrahydrofuran-2-yl)quinolin-8-yl pivalat **32**.



148

Unter Argonatmosphäre wurden 155 mg 7-((2R,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)-methoxy)methyl)-4-hydroxy-2,5-dihydrofuran-2-yl)quinolin-8-yl pivalat **31** (239 μ mol, 1.0 eq.) in abs. CH₂Cl₂ gelöst. Es wurden 85.9 μ L DIPEA (478 μ mol, 2.0 eq.) und 80.1 μ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (359 μ mol, 1.5 eq.) zugegeben und 2 h bei RT gerührt.

Das Produkt wurde direkt säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/Aceton 25/1 + 0.1 % NEt₃) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde **32** zu 98 % als farbloser Feststoff erhalten und aus Benzol lyophilisiert.

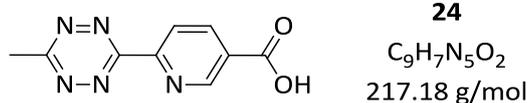
DC (SiO₂, DCM/Aceton, 25/1)

R_f = 0.88, 0.80

Die analytischen Daten stimmten mit den Daten der Literatur überein. ^[135]

5.2.4 Tetrazin

Synthese von 6-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)nikotinsäure **24**.



149

Es wurden 743 μ L Triethylorthoacetat (4.05 mmol, 1 eq.) zu 600 mg 6-Cyanonikotinsäure (4.05 mmol, 1 eq.) gegeben und für 10 min gerührt. Anschließend wurden 2.37 mL 64 % Hydrazin in H₂O (40.5 mmol, 10 eq.) zu der Mischung gegeben und für 1.5 h bei 100 °C offen gerührt.

Eine Mischung aus 1.40 g Natriumnitrit (20.2 mmol, 5 eq.) in 5 mL Wasser wurde auf die Mischung gegeben, 15 min lang gerührt und mit 1 M HCl-Lösung wurde ein pH Wert von 3 eingestellt. Das Rohprodukt konnte durch Extraktion mit 3 x 50 mL EE erhalten werden und anschließend durch Säulenchromatographie mit 19 % gereinigt werden (SiO₂, DCM/MeOH 10/1).

DC (SiO₂, DCM/MeOH 10/1)

$$R_f = 0.2$$

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 25 °C, TMS)

δ : 13.93 (s, 1H), 9.33 (dd, J = 2.1, 1.0 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 0.8, 8.2 Hz, 1H), 8.56 (dd, J = 2.1, 8.2 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H).

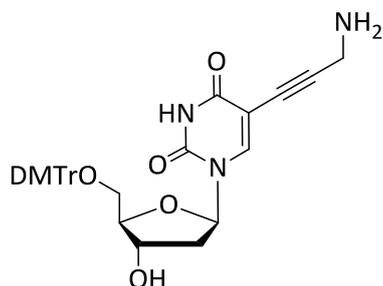
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆)

δ_c : 167.73, 165.81, 162.87, 153.32, 150.94, 138.65, 123.64, 48.62, 21.06.

HR-ESI-MS

m/z (ber): 240.0492 [M], m/z (gef): 240.0484 [M]

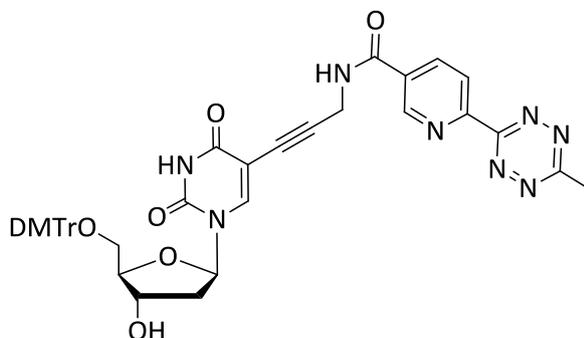
Die Synthese von 5-(3-aminoprop-1-yn-1-yl)-1-((2R,4S,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione **25** erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[200-201]



25
 $C_{33}H_{33}N_3O_7$
 583.63 g/mol

150

Synthese von N-(3-(1-((2R,4S,5R)-5-(O-dimethoxytrityl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)prop-2-yn-1-yl)-6-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)nikotinamide **26**.



26
 $C_{42}H_{38}N_8O_8$
 782.80 g/mol

In einem Rundkolben wurden 56 mg **24** (0.26 mmol, 1 eq.), 107 mg HBTU (0.28 mmol, 1.1 eq.) und 3.94 mg HOBt (0.03 mmol, 0.1 eq.) über Nacht unter Vakuum getrocknet, sowie 150 mg **25** (0.26 mmol, 1 eq.) in einem separaten Kolben. Die Mischung aus **24**, HBTU und HOBt wurde in 5 mL trockenem DMF gelöst und für 15 min gerührt. Anschließend wurden 60 μ L DIPEA (0.35 mmol, 1.35 eq.) zugegeben und für erneute 15 min gerührt. **25** wurde ebenfalls in 2 mL trockenem DMF gelöst und zur aktivierten Säuremischung gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei R. T. gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt (N_2 -Rotationsverdampfer, 40 °C) und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 30/1+ 0.1 % DIPEA) und damit **26** zu 65 % erhalten.

DC (SiO₂, DCM/MeOH 15/1)

$R_f = 0.3$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25 °C, TMS)

δ : 11.70 (s, 1H, UridinNH), 9.38 (t, J = 5.0 Hz, 1H, PeptidNH), 9.28 (m, 1H, Tetrazin), 8.61 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Tetrazin), 8.49 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Tetrazin), 7.94 (s, 1H, Uridin DB), 7.30 (m, 9H,

DMTr), 6.89 (m, 4H, DMTr), 6.10 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, 1'H), 5.34 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.27 (m, 1H, 3'H), 4.22 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH₂), 3.92 (m, 1H, 4'H), 3.72 (s, 6H, 2*CH₃), 3.25 (m, 2H, 5'Ha+b), 3.06 (s, 3H, 1*CH₃), 2.25 (m, 2H, 2'Ha+b).

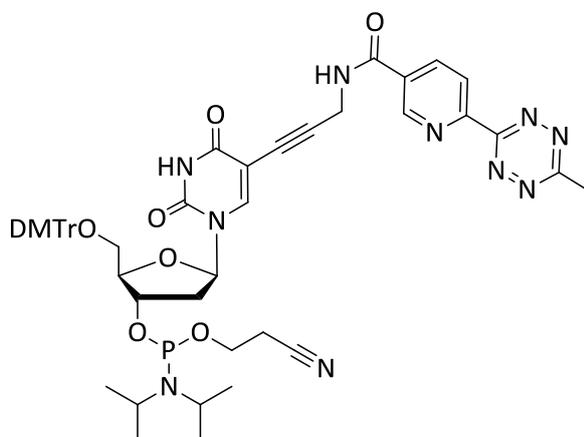
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆)

δ_c : 167.75, 163.88, 162.89, 161.68, 158.11, 152.35, 149.39, 149.28, 144.84, 143.51, 136.85, 135.72, 135.24, 131.17, 129.82, 129.68, 128.38, 127.98, 127.58, 123.45, 113.30, 98.27, 89.15, 85.89, 85.12, 74.48, 70.52, 63.82, 55.07, 53.62, 45.80, 41.89, 29.50, 21.08, 18.14, 16.79, 12.57, 8.71.

HR-FAB-MS

m/z (ber): 783.2884 [M], m/z (gef): 783.2885 [M]

Synthese von (2R,3S,5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(5-(3-(6-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)nikotinamido)prop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidit **27**.

**27**

$C_{51}H_{55}N_{10}O_9P$
983.02 g/mol

152

Es wurden unter Argon- Atmosphäre 80 mg **26** (0.102 mmol, 1 eq.) in 2 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst und 36.7 μL DIPEA (200 μmol , 2 eq.) zugegeben. Anschließend wurden 34.2 μL 2-Cyanoethyl-*N,N*diisopropylchlorophosphoramidit (153 μL , 1.5 eq.) zugegeben und 1.5 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über eine, mit durch 0.1 % DIPEA passiviertem Kieselgel gefüllte Säule aufgereinigt (SiO_2 , CH_2Cl_2 /Aceton 3/2 + 0.1 % DIPEA. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde **27** als pinkfarbener Feststoff erhalten und aus Benzol lyophilisiert (89 %).

DC (SiO_2 , DCM/Aceton 3/2)

$R_f = 0.8$

^{31}P -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$, 25 °C, TMS)

δ : 150.07, 149.67.

HR-FAB-MS

m/z (ber): 983.3964 [M], m/z (gef): 983.3962 [M]

5.3 Oligonukleotide

5.3.1 Synthese der modifizierten Oligonukleotide

Allgemein

Zur Synthese der modifizierten Oligonukleotide wurde ein *PerSeptive Expedite 8909* Syntheseautomat der Firma Applied Biosystems verwendet (Phosphoramidit-Methode). Die kommerziell erhältlichen, natürlichen DNA-Bausteine wurden in Acetonitril (amidit diluent) aufgenommen und als 0.067 M Lösung in den Automaten eingespeist.

Die artifiziellen Nucleoside wurden in Acetonitril (amidite diluent) gelöst und als 0.1 M Lösung in den Syntheseautomaten eingebracht. Es wurden je nach Modifikation unterschiedliche Syntheseprotokolle genutzt, welche die Pulsung (1 Puls = 16 µL) der unterschiedlichen Reagenzien, sowie deren Verweildauer auf den CPG-Säulen (in Sekunden) steuerte. Das Standardprotokoll wurde nur in den unten genannten Zeilen geändert.

5'-Dimethoxytrityl-5-bromo-2'-deoxyuridine,3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphor-amidit, sowie 6-(3',6'-Dipivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)-hexyl-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit wurden zu 100 µmol bei *Glen Research* erworben und als 0.1 M Lösung in MeCN in die Synthese eingebracht. Weitere Reagenzien für die automatisierte DNA-Synthese sind:

Dbk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan

Wsh: Acetonitril

Act: 0.45 M Tetrazol in Acetonitril

Caps: Acetanhydrid in THF / Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF / Pyridin (Cap B)

Ox: Iod in Wasser / THF / Pyridin

Direkter Einbau von artifiziellen Bausteinen

Für den Einbau der synthetisch hergestellten, modifizierten Nucleotide wurde ein für den Einbau von natürlichen Nucleotiden geschriebenes Protokoll ver­geändert. Durch Verlängerung der Kupplungszeiten oder Erhöhen der Menge der zu kuppelnden Substanzen, konnten bessere Ausbeuten an modifiziertem Oligonucleotid erreicht werden. Das folgende Standardprotokoll wird zum Beispiel beim Einbau von 2'-Desoxyadenosin befolgt:

Experimenteller Teil

Tabelle 9: Standardprotokoll für den Einbau von dA in ein Oligonukleotid, der blau hervorgehobene Bereich wurde für den Einbau der unterschiedlichen artifiziellen Nukleoside verändert.

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	<i>A + Act</i>	<i>PULSE</i>	<i>5</i>	<i>0</i>
18	<i>A + Act</i>	<i>PULSE</i>	<i>2</i>	<i>16</i>
2	<i>Act</i>	<i>PULSE</i>	<i>3</i>	<i>24</i>
1	<i>Wsh</i>	<i>PULSE</i>	<i>7</i>	<i>56</i>
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Die Bausteine **2 (2PydU)**, **22 (Dansylindol)**, **27 (Tetrazin)**, **30 (DIMAPdU)** und **32 (HQ)** wurden synthetisch für diese Arbeit hergestellt, wobei **cU**, **BrdU** und **Fluo** zu 100 µmol als Phosphoramidite bei *GlenResearch* erworben wurden. Die Kupplungsprotokolle wurden für die unten dargestellten artifiziellen Nukleoside wie folgt im Kupplungsschritt geändert:

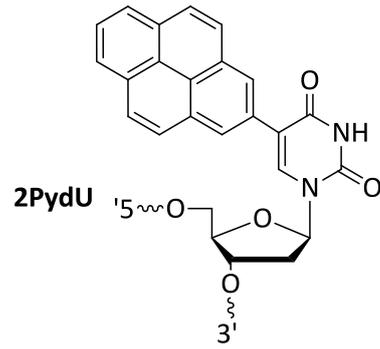
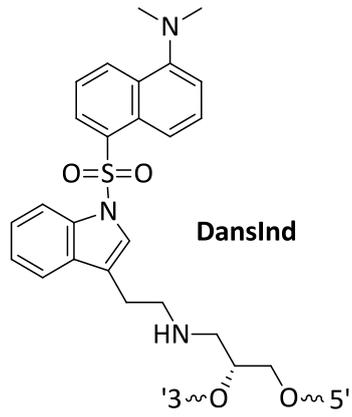


Tabelle 10: Änderung des Kupplungsschritts für DansInd- 22 und 2PydU-Phosphoramiditbaustein 2.

Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]	Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]
22 + Act	5	0	2 + Act	6	0
22 + Act	5	500	2 + Act	3	48
Act	5	500	Act	4	70
wash	7	60	wash	7	88

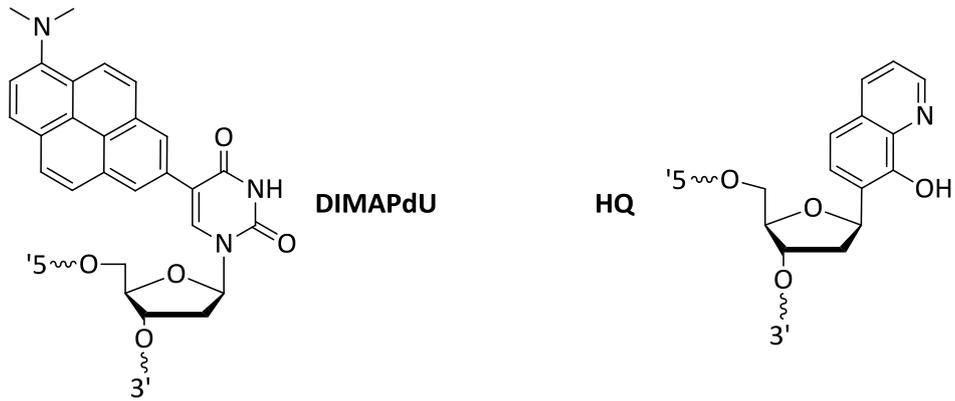


Tabelle 11: Änderung des Kupplungsschritts für DIMAPdU- 30 und HQ-Phosphoramiditbaustein 32.

Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]	Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]
30 + Act	5	0	32 + Act	5	0
30 + Act	3	120	32 + Act	3	120
Act	4	180	Act	4	600
wash	7	180	wash	7	480

Erworbene Nucleoside:

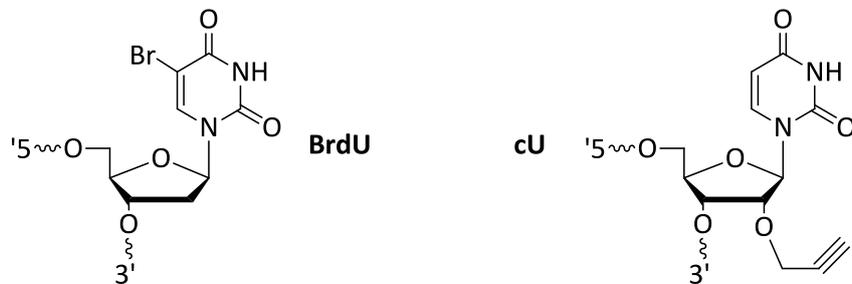


Tabelle 12: Änderung des Kupplungsschritts für BrdU- und cU-Phosphoramiditbaustein.

Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]	Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]
BrdU-PA + Act	5	0	cU-PA + Act	5	0
BrdU-PA + Act	4	24	cU-PA + Act	4	65
Act	4	56	Act	6	65
wash	7	88	wash	7	56

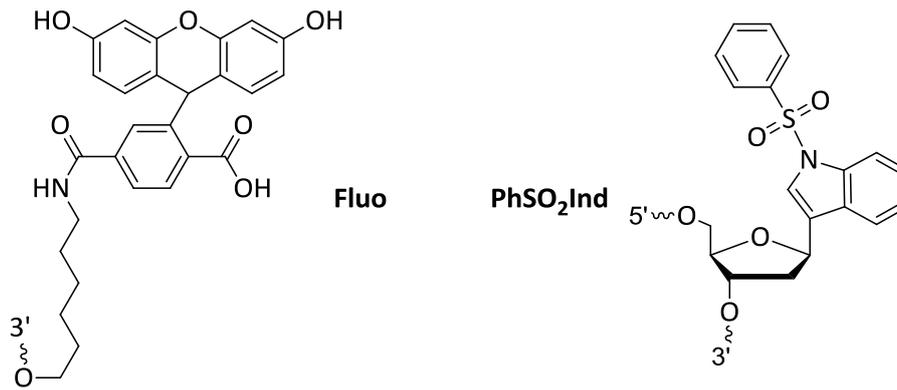


Tabelle 13: Änderung des Kupplungsschritts für Fluo- und PhSO₂Ind Phosphoramiditbaustein.

Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]	Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]
Fluo-PA + Act	5	0	PhSO ₂ Ind-PA + Act	6	0
Fluo-PA + Act	4	100	PhSO ₂ Ind-PA + Act	1	8
Act	5	150	Act	4	32
wash	7	56	wash	7	56

Bei den 5'-fluoreszeinmodifizierten Oligonukleotiden wurde die letzte Tritylschutzung nicht durchgeführt, da sich an dem erworbenen Baustein keine Schutzgruppe befindet (*DMTr-on*). Bei den restlichen Oligonukleotiden wurden am Ende der Synthese die 5'-terminale DMT-Schutzgruppe an der Hydroxylgruppe abgespalten (*DMTr-off*).

Die folgende Tetrazin-Modifikation wurde zuerst wie in Tabelle 14 links dargestellt und über ein verändertes Kupplungsprotokoll in die DNA eingebracht. Im darauffolgenden *Capping*-Schritt wurde der Cyclooctin modifizierte Farbstoff **FluoCOMBO** über die CPG-Säule gepumpt, was mit der eingebauten Tetrazin-Modifikation zu einer Reaktion und damit Bindung des Fluoreszeins führte. Das Protokoll wurde auch für diesen Schritt geändert.

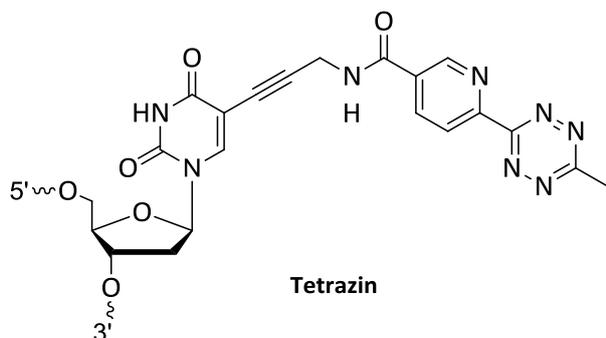
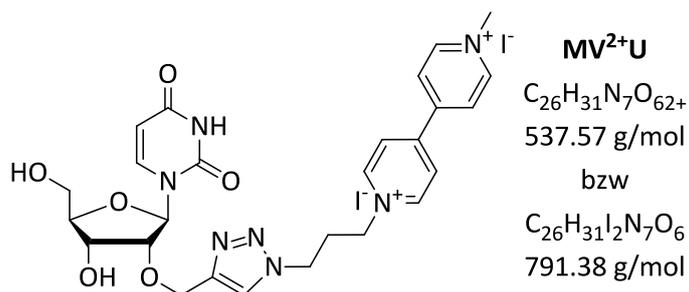


Tabelle 14: Änderung des Kupplungsschritts für Tetrazin-Phosphoramiditbaustein 27, mit anschließender iEDDA-Reaktion auf der CPG Säule mit FluoCOMBO (rechts).

Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]	Funktion	Menge [click a 16 µL]	Dauer [s für Menge]
27 + Act	5	0	Caps	7	0
27 + Act	4	24	Wsh A	30	0
Act	5	56	FluoCO	25	60
wash	7	88	Wsh A	120	0

Die aus dem Syntheseautomaten entnommenen CPG-Säulen wurden am Vakuum über Nacht getrocknet. Danach wurde eine der beiden Metallhülsen entfernt und das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß geschüttet. Es wurden 0.7 mL konz. Ammoniaklösung (>25 %, *trace select, Fluka*) zugegeben und die Suspension bei 40 °C, 16 Stunden lang erhitzt. Dadurch konnte die DNA vom CPG abgetrennt und die Schutzgruppen abgespalten werden. Die Suspensionen wurden zentrifugiert, der Überstand separiert und das Granulat mit 2*300 µL und 1*200 µL HPLC-Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden lyophilisiert und entweder in 200 µL HPLC-Wasser, bzw. bei Oligonukleotiden mit Hydroxychinolin Modifizierung in 200 µL 5 mM EDTA-Lösung gelöst und in ein HPLC-Vial für die präparative Trennung überführt, oder getrocknet für die postsynthetische Modifizierung weiterverwendet.

Postsynthetische Modifizierung: 1,3-dipolare Cycloaddition



Für die postsynthetische Modifikation mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition wurden nach der Abspaltung vom CPG die Lyophilisate mit je 34 μ L (3.4 μ mol) TBTA Lösung (100 mM in DMSO/tBuOH 3/1), 114 μ L (1.14 μ mol) einer Lösung des Azids **28** (10 mM in DMSO/tBuOH 3/1) und 75 μ L HPLC Wasser versetzt und solange geschüttelt bis sich alles löste (Ultraschall). Der Kupfer-Katalysator wurde gelöst und 27 μ L (2.70 μ mol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/tBuOH 3/1) wurde zur DNA Lösung gegeben und gründlich gemischt. Anschließend wurden die Lösungen 8 h bei RT geschüttelt.

Es wurden 150 μ L einer 5 mM EDTA-Lösung zugegeben und die Mischung in ein *Falcon Tube* überführt. Des weiteren wurden 450 μ L einer 300 μ M NaOAc-Lösung und 3 mL EtOH zur Fällung zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei -30 °C gelagert, das Präzipitat am nächsten Tag durch Zentrifugieren (15 min, 13000 rpm) erhalten und zweimal mit 1 mL 80 % EtOH gewaschen. Das erhaltene DNA Pellet wurde in 200 μ L HPLC-Wasser, bzw. die Hydroxychinolin modifizierten Oligonukleotide in 200 μ L 5 mM EDTA Lösung gelöst und direkt über HPLC gereinigt.

5.3.2 Reinigung modifizierten Oligonukleotide

Nach oben beschriebener Aufarbeitung, bzw. Weiterer Funktionalisierung wurden die Oligonukleotide wie folgt über HPLC gereinigt

HPLC

Vor der präparativen Trennung der Oligonukleotide [Supercosil LC 318 Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm Porengröße), Gradient 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B), 2.5 mL/min] wurde, um den Laufmittelgradienten zu überprüfen und die Retentionszeit abzuschätzen, eine analytische Trennung [Supercosil LC 318 Säule (25 cm x 4.6 mm), Gradient 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B), 1 mL/min] vorangestellt. Dabei wurden 5 µL der in 200 µL Wasser oder 5 mM EDTA-Lösung gelösten Oligonukleotide mit 15 µL HPLC-Wasser verdünnt und getrennt.

War diese Trennung zufriedenstellend, wurden die restlichen 195 µL der verunreinigten DNA-Lösungen mit folgenden Gradienten getrennt:

Tabelle 15: Laufmittelgradienten, Trennungszeit und detektierte Wellenlängen der Trennungen der Oligonukleotide über die HPLC.

Oligonukleotid (a = höher modif. ON)	Laufmittel B (MeCN) in A (50 mM NH ₄ OAc- Puffer, pH = 6, bzw 6.5)	Zeit	Detektierte Wellenlängen
DNA27a-32a	0-20 %	45 min	260, 290 nm
DNA1a-3a	0-20 %	45 min	260, 345, 490 nm
DNA9a,10a	0-15 %	90 min	260, 345, 490 nm
DNA4a, 11a-14a	0-20 %	45 min	260, 290, 490 nm
DNA1b-3b, 9b, 10b	0-20 %	45 min	260, 290, 310 nm
DNA15a-20a	0-20 %	45 min	260, 365, 490 nm
DNA21a, 22a	0-15 %	90 min	260, 365, 490 nm
DNA15b-22b	0-20 %	90 min	260, 290, 310 nm
DNA27b-32b	Synthese und Reinigung: <i>Thomas Ehrenschwender</i>		
DNA3b, 9b, 10b	von <i>Metabion</i> bezogen		

5.3.3 Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide

Nach der Trennung der Oligonukleotide über HPLC, wurden die Massen der synthetisierten Oligonukleotide mittels eines MALDI-ToF Analysesystems gemessen (siehe 4.1).

Elektronentransfersystem DIMAPdU – PhSO₂Ind

PhSO₂Ind modifizierte Oligonukleotide

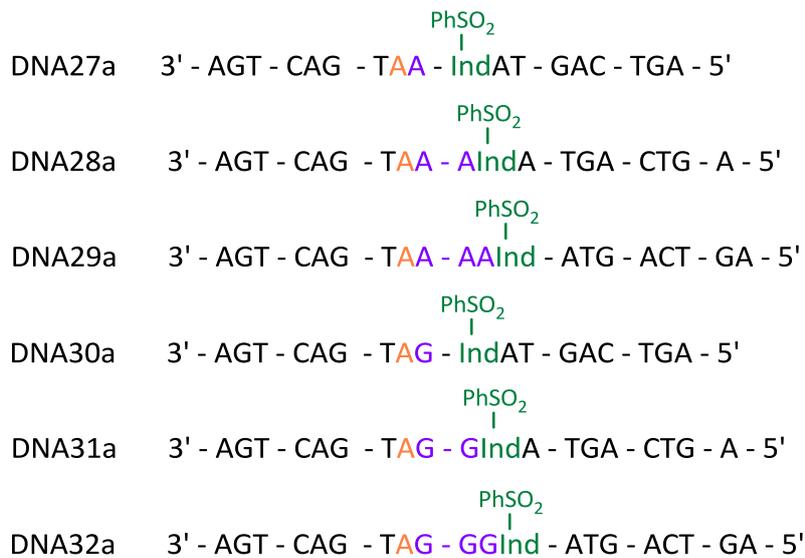
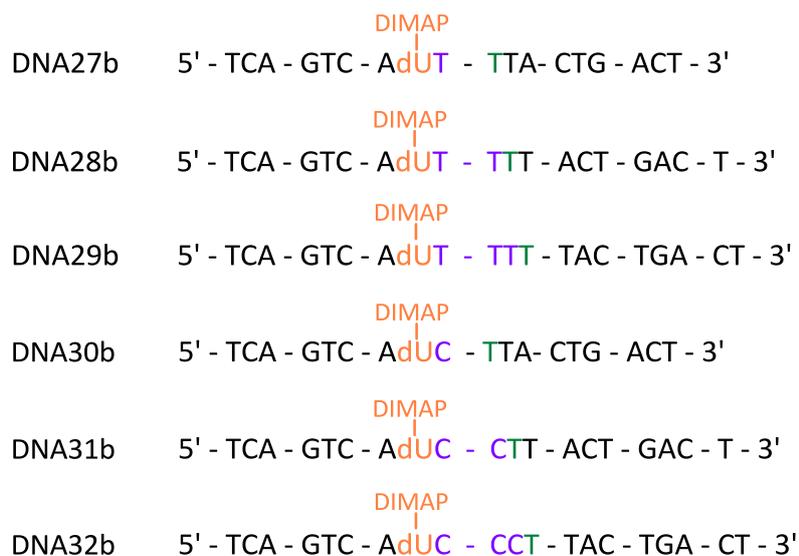


Tabelle 16: Oligonukleotide DNA27a-32a: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA27a	5675	5675.0	192.0
DNA28a	5988	5986.0	205.9
DNA29a	6301	6300.0	219.8
DNA30a	5691	5690.0	188.7
DNA31a	6020	6019.0	199.2
DNA32a	6349	6349.0	209.8

DIMAPdU modifizierte Oligonukleotide



162

Tabelle 17: Oligonukleotide DNA27b-32b: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA27b	5666	5666.6	190.8
DNA28b	5970	5970.5	198.7
DNA29b	6274	6273.9	206.6
DNA30b	5651	6547.6	189.5
DNA31b	5940	5939.2	196.0
DNA32b	6229	6228.5	202.6

Unmodifizierte Oligonukleotide und Gegenstränge (ohne **DIMAPdU**, bzw. ohne **PhSO₂Ind**)

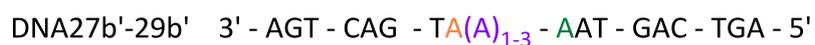
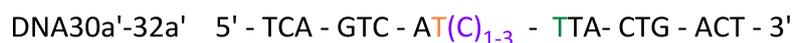
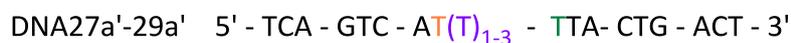


Tabelle 18: Oligonukleotide DNA27a'-32a' und DNA27b'-32b': Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	<i>berechnete Masse [Da]</i>	<i>gefundene Masse [Da]</i>	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
<i>DNA27a'</i>	5437	bezogen von Metabion	166.1
<i>DNA28a'</i>	5741		174.1
<i>DNA29a'</i>	6045		182.0
<i>DNA30a'</i>	5422		164.8
<i>DNA31a'</i>	5711		171.4
<i>DNA32a'</i>	6000		177.9
<i>DNA27b'</i>	5553		197.8
<i>DNA28b'</i>	5866		211.7
<i>DNA29b'</i>	6179		225.5
<i>DNA30b'</i>	5569		194.5
<i>DNA31b'</i>	5898		205.0
<i>DNA32b'</i>	6227		215.6

Internes Standard-Oligonukleotid für die HPLC-Untersuchungen

Tabelle 19: Oligonukleotid IS: Masse und entsprechender Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	<i>berechnete Masse [Da]</i>	<i>gefundene Masse [Da]</i>	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
<i>IS</i>	3374	bezogen von Metabion	121.3

Elektronentransfersystem DIMAPdU – Dansylindol

DansInd modifizierte Oligonukleotide

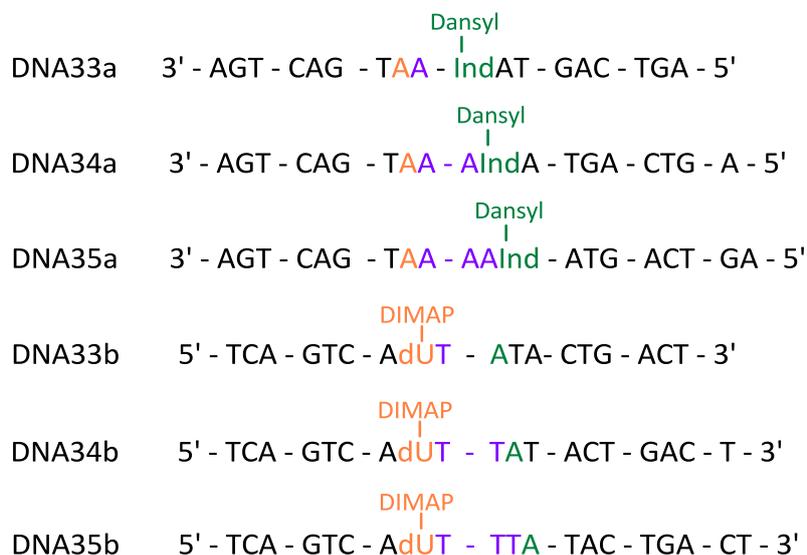


Tabelle 20: Oligonukleotide DNA33-35: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA33a	5769	5768.8	201.3
DNA34a	6082	6084.7	215.1
DNA35a	6395	6393.0	229.0
DNA33b	5675	1892.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1418.5 [M-4H ⁺] ⁴⁻	200.3
DNA34b	5979	1991.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1494.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	208.3
DNA35b	6283	2095.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1570.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	216.2

Unmodifizierte Oligonukleotide

DNA33a' 3' - AGT - CAG - TAA - AAT - GAC - TGA - 5'

DNA34a' 3' - AGT - CAG - TAA - AAA - TGA - CTG - A - 5'

DNA35a' 3' - AGT - CAG - TAA - AAA - ATG - ACT - GA - 5'

DNA33b' 5' - TCA - GTC - ATT - ATA - CTG - ACT - 3'

DNA34b' 5' - TCA - GTC - ATT - TAT - ACT - GAC - T - 3'

DNA35b' 5' - TCA - GTC - ATT - TTA - TAC - TGA - CT - 3'

Tabelle 21: Oligonukleotide DNA33''-35''': Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA33a'	5544	bezogen von Metabion	191.9
DNA34a'	5857		205.7
DNA35a'	6170		219.6
DNA33b'	5446		172.1
DNA34b'	5750		180.0
DNA35b'	6054		187.9

Elektronentransfersystem 2PydU – HQ – BrdU

Oligonukleotide mit 4 - 6 Modifikationen, jeweils **BrdU** (EA), **2PydU** (ED), **Fluo** (Detektion) und 1 – 3

HQ Bausteine:



166

Tabelle 22: Oligonukleotide DNA1-3, 9 und 10: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
DNA1a	7771	7774.0	218.9
DNA2a	7771	7771.8	218.9
DNA3a	7771	7772.1	218.9
DNA9a	9007	8998.6	244.0
DNA10a	10243	10240.2	269.1

Oligonukleotide zur Negativprobe: DNA1– 3 ohne **2PydU** und ohne **HQ**, sowie DNA3 ohne **BrdU**:



Tabelle 23: Oligonukleotide DNA4a-6a, 11a-14a; Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA4a	7586	7587.9	210.1
DNA5a	7586	7587.3	210.1
DNA6a	7586	7587.5	210.1
DNA14a	7753	7748.0	225.5
DNA11a	8969	8966.0	257.1
DNA12a	10186	10182.1	288.8
DNA13a	7707	7704.0	222.2

Gegenstränge zu DNA1-14:

DNA1b 5' - AGT - CAA - AAA - AAA - HQAA - ATG - ACT - GA - 3'

DNA2b 5' - AGT - CAA - AAA - AAHQ - AAA - ATG - ACT - GA - 3'

DNA3b 5' - AGT - CAA - AAA - AHQA - AAA - ATG - ACT - GA - 3'

DNA9b 5' - AGT - CAA - AAA - AHQA - AAHQ - AAA - AAT - GAC - TGA - 3'

DNA10b 5' - AGT - CAA - AAA - AHQA - AAHQ - AAA - HQAA - AAA - TGA - CTG - A - 3'

DNA1b' 5' - AGT - CAA - AAA - AAA - AAA - ATG - ACT - GA - 3'

DNA9b' 5' - AGT - CAA - AAA - AAA - AAA - AAA - AAT - GAC - TGA - 3'

DNA10b' 5' - AGT - CAA - AAA - AAA - AAA - AAA - AAA - AAA - TGA - CTG - A - 3'

168

Tabelle 24: Oligonukleotide DNA1b-3b, 9b, 10b, 1b', 9b', 10b': Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [$mM^{-1}cm^{-1}$]
DNA1b	7121	7125.0	263.9
DNA2b	7121	7124.2	263.9
DNA3b	7121	7120.7	263.9
DNA9b	8384	8383.8	306.8
DNA10b	7767	7769.0	349.7
DNA1b'	7115	Bezogen von Metabion	276.4
DNA9b'	8367		331.8
DNA10b'	9620		387.3

Vergleichsstrangbruchfragmente

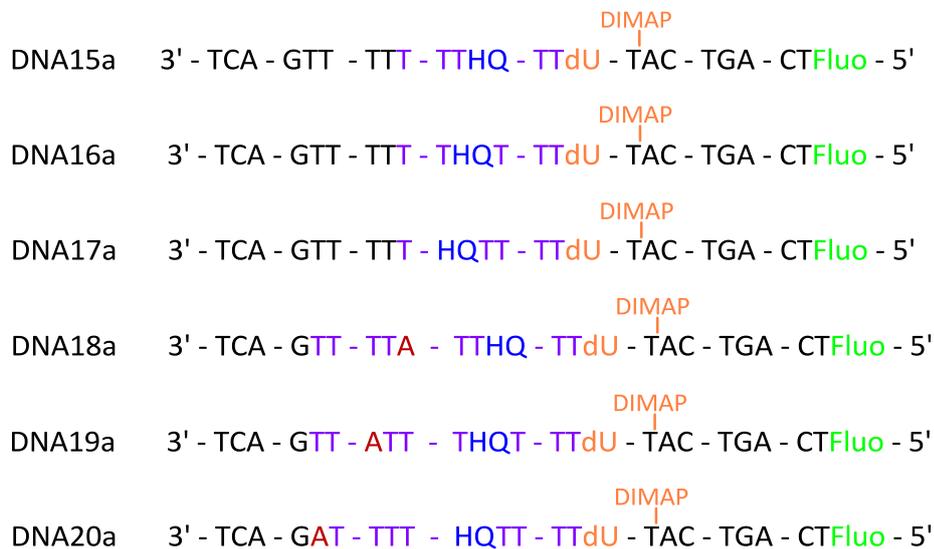
- F1 3' - TTT - TAC - TGA - CTFluo - 5'
- F2 3' - TT - TAC - TGA - CTFluo - 5'
- F3 3' - TT - TTT - TTT - TAC - TGA - CTFluo - 5'
- F4 3' - T - TTT - TTT - TAC - TGA - CTFluo - 5'
- F5 3' - TTT - TTT - TAC - TGA - CTFluo - 5'
- F6 3' - TTT - TTT - TTT - TAC - TGA - CTFluo - 5'

Tabelle 25: Fluoreszenzmodifizierte Oligonukleotid-Fragmente: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
F1	3835	Bezogen von Metabion	117.7
F2	3531		109.8
F3	5356		157.3
F4	5052		149.4
F5	4748		155.0
F6	5660		183.0

Elektronentransfersystem DIMAPdU – HQ – MV²⁺U

Distanzabhängigkeit, 1 – 4 natürliche Nukleobasen zwischen **DIMAPdU** (ED) und **HQ** (EA), ebenso modifiziert mit **Fluo** (Detektion).



170

Tabelle 26: Oligonukleotide DNA15a-20a: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA15a	7750	7748.3	238.1
DNA16a	7750	7748.9	238.1
DNA17a	7750	7748.9	238.1
DNA18a	7759	7758.8	244.0
DNA19a	7759	7759.4	244.0
DNA20a	7759	7760.0	244.0

Weitere Distanzen, durch Expansion des Mittelsteils von **DNA18a** durch 1 – 2 **HQTT**-Einheiten:



Tabelle 27: Oligonukleotide DNA21a und 22a: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA21a	8082	8082.2	245.3
DNA22a	9014	9013.1	262.5

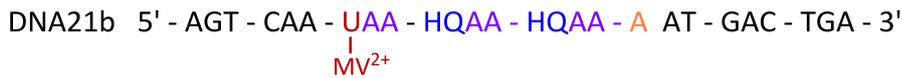
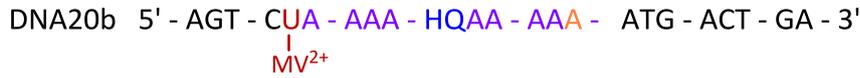
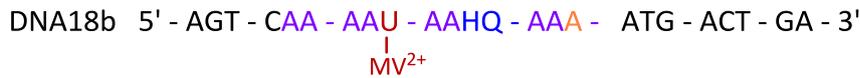
Gegenstränge ohne **MV²⁺U**-Modifikation:



Tabelle 28: Oligonukleotide DNA15b' u 17b' (16b' = DNA3b'): Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA15b'	7120	7121.1	263.9
DNA17b'	7120	7121.4	263.9

Gegenstränge mit **MV²⁺U**-Modifikation (EA_2):



172

Tabelle 29: Oligonukleotide DNA18b-22b: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA18b	7407	7408.4	280.7
DNA19b	7407	7408.2	280.7
DNA20b	7407	7407.8	280.7
DNA21b	7730	7730.9	282.1
DNA22b	8680	8678.7	311.1

Oligonukleotide für die Messung der transienten Absorption



Tabelle 30: Oligonukleotide DNA18'a, 21'a, 22'a und 25'a: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA18'a	7220.3	7223.7	225.2
DNA21'a	7543.3	7548.2	214.4
DNA22'a	8474.5	8479.1	243.7
DNA25'a	7112.3	7114.1	257.9

Analyse der Reinheit durch PAGE der Einzelstränge

Um auszuschließen, dass der Absorptionsanstieg von **DNA22** durch Verunreinigungen der fluoreszeinmarkierten Oligonukleotide erfolgt, wurden die Einzelstränge nach der HPLC Reinigung über eine PAGE getrennt und ausgewertet. Die häufigste Verunreinigung bei der Festphasensynthese sind die Abbruchstränge n-1 bzw. n-2 mit einer zum Einzelstrang sehr ähnlichen Retention. Jedoch ist in Abbildung 91 zu erkennen, dass **DNA22a** nur 0.5 % dieser Abbruchstränge aufweist. Lediglich **DNA16a** und **DNA17a** weisen eine etwas stärkere Verunreinigung bis zu 6.3 % auf. Die Analyse der Reinheit über PAGE ist in diesem Fall notwendig, da sich ab zwei **HQ**-Modifikationen in einem Oligonukleotid Aggregate bilden, die trotz korrekter Masse, bei der Trennung über HPLC in mehrere Signale aufspalten und damit die Reinheitsbestimmung erschwert wird.

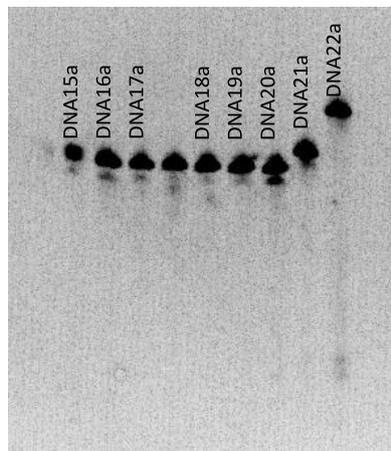


Abbildung 91: Polyacrylamid Gel der synthetisierten Einzelstränge.

Oligonukleotide mit Tetrazin-Modifikation

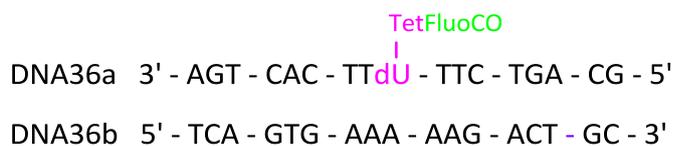


Tabelle 31: Oligonukleotide DNA36: Masse und entsprechende Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	$\epsilon_{260} [mM^{-1}cm^{-1}]$
DNA36a	5941.2	5945.7	165.8
DNA36b	5224.9	Bezogen von Metabion	182.6

Bestimmung der Konzentrationen

Die Messung der Absorbanz zur Bestimmung der Konzentration erfolgte an einem ND-1000 Spektrophotometer der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäure-Modus. Die Bestimmung der Konzentration der erhaltenen, gereinigten Oligonukleotide erfolgte aus dem *Lambert-Beerschen Gesetz* über die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$.^[205]

Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten Oligonukleotids in Wasser kann wie folgt errechnet werden:

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

A, G, C und T stehen für die Anzahl der natürlichen Nukleoside im ON

$\epsilon_{A, G, C, T}$ stehen für deren molare Extinktionskoeffizienten bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$

Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität der DNA

Werden nun die modifizierten Nukleoside in das Oligonukleotid eingebracht, werden sie mit dem entsprechenden Summanden in der Formel berücksichtigt.

Tabelle 32: Auflistung der molaren Extinktionskoeffizienten der verwendeten Nukleoside.

natürliche Nukleoside	$\epsilon_{260} / [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	modifizierte Nukleoside	$\epsilon_{260} / [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
A	15.4	PhSO ₂ Ind	9.0
G	11.7	DansylInd	19.2
C	7.3	DIMAPdU	36.2
T	8.8	2PydU	18.6
		BrdU	5.1
		HQ	1.5
		MV ²⁺ U	34.1
		Fluo ¹	20.9

¹ 6-(3',6'-dipivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)-hexyl-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite (Glen Research, 100 μmol) und Fluoreszein-piperazin-COMBO (Kele *et al.*)

Hybridisierung

Der meistmodifizierte Einzelstrang wurde zusammen mit 1.2 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i) mit 250 mM NaCl in einem Eppendorf Reaktionsgefäß für 10 min auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und die Lösung im noch heißen Heizblock langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (ca.4 h).

5.4 Belichtungen

5.4.1 Belichtungen der Einzelmoleküle

Die für die Vorversuche in Kapitel 2.3.3 durchgeführten Belichtungen sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Es wurden unterschiedliche Lichtquellen (siehe Kapitel 5.1, Belichtungsapparaturen) sowie Konzentrationen an Elektronendonator und –akzeptor genutzt.

Tabelle 33: Übersicht über die, für die Vorversuche durchgeführten Belichtungen. ED und EA liegen, wenn nicht anders beschrieben 2 mM in MeCN vor. Die Belichtungen wurden entweder mit einer 75 W Xe-Lampe mit 345 nm *cutoff* Filter, oder mit 2·365 nm LEDs bei 20 °C durchgeführt. Die Ausbeuten wurden über den Vergleich der integrierten Flächen (GC-FID) der Spezies mit einer Indol-Eichgeraden bestimmt. Sowie die belichteten DNA-Stränge DNA30 und DNA33.

Bel.	ED	EA	Opfermolekül	c _{EA/ED}	Lichtquelle	t	Analytik
1	DIMAP	PhSO ₂ Ind	-	2.5 μM	75 W Xe	2 h	UV/Vis
	DIMAP	PhSO ₂ Ind	-	2 mM	LED 365 nm	2 h	GCMS
2	DIMAP	PhSO ₂ Ind	200 eq. NEt ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GCMS
3	DIMAP	PhSO ₂ Ind	200 eq. N(EtOH) ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GCMS
	DIMAP	PhSO ₂ Ind	200 eq. N(EtOH) ₃	2.5 μM	75 W Xe	2 h	UV/Vis
4	-	PhSO ₂ Ind	200 eq. NEt ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GCMS
5	-	PhSO ₂ Ind	200 eq. N(EtOH) ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GCMS
6	1mM DIMAP	PhSO ₂ Ind	200 eq. NEt ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GCMS
7	0.2mM DIMAP	PhSO ₂ Ind	200 eq. NEt ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GCMS
8	DIMAP	DansInd	200 eq. N(EtOH) ₃	2.5 μM	LED 365 nm	2 h	UV-Vis
	DIMAP	DansInd	200 eq. N(EtOH) ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GC-MS
		DansInd	200 eq. N(EtOH) ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GC-MS
9	DIMAP	PyInd	200 eq. N(EtOH) ₃	2.5 μM	LED 365 nm	2 h	UV-Vis
	DIMAP	PyInd	200 eq. N(EtOH) ₃	2 mM	LED 365 nm	2 h	GC-MS
10		DNA30		2.5 μM	LED 365 nm	2 h	UV-Vis
11		DNA33		2.5 μM	LED 365 nm	2 h	UV-Vis

Durch GC-MS Messungen von unterschiedlichen Indol-Konzentrationen und deren Korrelation mit der gemessenen Fläche, kann anhand des GC-MS-FID eine Eichgerade für die Produktkonzentration erstellt werden.

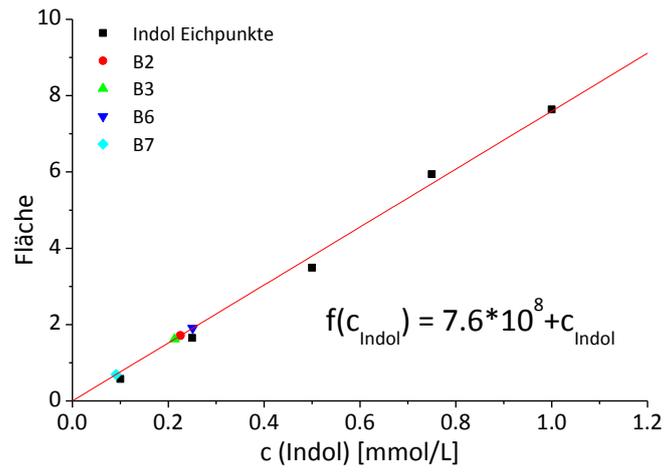


Abbildung 92: Indol-Eichgerade für Belichtung B2, B3, B6 und B7.

5.4.2 Belichtung der modifizierten Oligonukleotide

Belichtungen der indolmodifizierten Oligonukleotide

Um den Elektronentransfer durch Abspaltung einer VIS-detektierbaren Schutzgruppe zu untersuchen, wurden 2.5 μM der hybridisierten Oligonukleotide in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i) mit 250 mM NaCl mit einer Hg-Dampflampe mit einem *cutoff* Filter von 345 nm belichtet. Die Belichtung wurde zu bestimmten Zeiten (s.u.) unterbrochen um die Absorption und die Emission bei einer bestimmten Anregungswellenlänge (s.u.) zu messen.

Tabelle 34: Belichtungsbedingungen für DNA30 und DNA33.

Oligonukleotid Duplex	Belichtung	Zeit [min]	Probe [μL]	Probenahme	UV/Vis	Massenanalyse	PAGE
DNA30	Hg-Dampflampe <i>cutoff</i> 345 nm	120	2.5	t = 0, 5, 15, 30, 60, 120 min	290 nm / Slit7 355 nm / Slit9	j	j
DNA33	Hg-Dampflampe <i>cutoff</i> 345 nm	120	2.5	t = 0, 5, 15, 30, 60, 120 min	Absorption 290 nm / Slit7 355 nm / Slit9	n	n

Des Weiteren wurde eine Analyse über die HPLC durchgeführt. Zur Belichtung der 10 μM hybridisierten Oligonukleotide in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i) mit 250 mM NaCl wurden 2 365 nm LEDs genutzt. Die Belichtung fand bei 25 °C statt und es wurde nach den unten genannten Zeiten eine Probe von jeweils 50 μL entnommen. Diese wurde vom Lösungsmittel entfernt, mit dem internen Standard versehen und in einem Volumen von 20 μL in ein HPLC Vial überführt.

Tabelle 35: HPLC-Auswertung von belichtetem DNA30-Duplex mit internem Standard.

	M [g/mol]	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	Anzahl Basen	n [mol]	$C_{\text{ssim Vial}}$ [mM]	C_{ss} [mM]
DNA30a	5691	18.9	18	5E-10	0.025	0.178
DNA30b	5651	18.9	18	5E-10	0.025	0.152
IS	3374	12.1	11	5E-10	0.025	0.233

Die unten genannten Proben wurden mit einem HPLC-Gradienten von 0 – 10 % Acetonitril in 50 mM Ammoniumacetat Puffer über 90 min getrennt. Die Auswertung erfolgte über die Flächen der Peaks der Einzelstränge.

Tabelle 36: Pipettierschema für die HPLC-Auswertung der Belichtung von DNA30.

Probe	V _{HPLC Vial} [μL]	V _{is} [μL]	V _{DNA30a} [μL]	V _{DNA30b} [μL]	V _{H2O} [μL]
1	20	2.15			17.9
2	20	2.15	2.81		15.0
3	20	2.15		3.30	14.6
4	20	2.15	Lyophilisierte 50μL aus 10μM Lsg t= 0 min		17.9
5	20	2.15	Lyophilisierte 50μL aus 10μM Lsg t= 30 min		17.9
6	20	2.15	Lyophilisierte 50μL aus 10μM Lsg t= 60 min		17.9
7	20	2.15	Lyophilisierte 50μL aus 10μM Lsg t=120 min		17.9
8	20	2.15	Lyophilisierte 50μL aus 10μM Lsg t=240 min		17.9
9	20	2.15	Lyophilisierte 50μL aus 10μM Lsg t=360 min		17.9
10	20	2.15	Lyophilisierte 50μL aus 10μM Lsg t=480 min		17.9

Belichtungen für die Bestimmung der Abbruchstränge via PAGE

Die Belichtungen der Elektronentransfer-Oligonukleotide **DNA1-24, 30, 33** erfolgten in einer 1 cm Quarzküvette von *Starna*. Diese wurde mit einer 1 μM Lösung der hybridisierten Oligonukleotide in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i) mit 250 mM NaCl gefüllt. Anschließend wurde die Lösung bei 25 °C im oben benannten Belichtungsreaktor mit entweder 2 x 385 nm LEDs oder 2 x 365 nm LEDs jeweils für 30 min belichtet. Nach t = 0, 3, 6, 9, 12, 15 und 30 min wurde die Belichtung gestoppt, die Küvette für 3 s geschüttelt und anschließend eine Probe von 20 μL entfernt. Anschließend wurde die Belichtung fortgesetzt.

Die jeweiligen Proben wurden, im Fall von **BrdU**-modifizierten Oligonukleotiden mit 20 μL 20 % Piperidin-Lösung versetzt und 30 min bei 90 °C erhitzt, bevor sie in einer Zentrifuge im Vakuum von den Lösungsmitteln befreit wurden. Nicht mit **BrdU** modifizierte Oligonukleotide wurden ohne Piperidin Zugabe vom Wasser befreit.

Die getrockneten Proben wurden in 20 μL des Ladepuffers (80 % Formamid, 20 mM EDTA, 0.02 % Xylen Cyanol FF, 2.5 % Ficoll in H₂O) gelöst und konnten so in die Taschen der 20 % Polyacrylamidgele eingetragen werden.

Tabelle 37: Auflistung der Belichtungsexperimente für PAGE.

Oligonukleotid	Temp. / [°C]	Entnahmezeiten / [min]	$\lambda_{\text{Emission}}$ / [nm]	+ Pip.	PAGE Maße
DNA1-6, 11 jeweils EDTA, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}	RT	t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30	Hg-Lampe 345 nm <i>cutoff</i>	j	10 x 10 cm
DNA3, 6, 10-14	25 °C	t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30	2*365 nm LED	j	10 x 10 cm
DNA3, 9, 10 + DNA3-14 0, 30 min 1 Gel	25 °C	t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30	2*365 nm LED	j	21 x 40 cm
DNA15-17	25 °C	t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30	1*385 nm LED	j + n	21 x 40 cm
DNA 18-20, 21+22	25 °C	t = 0, 6, 9, 15, 30	2*385 nm LED	n	alle auf 21 x 40 cm

Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für die in Kapitel 4.1 besprochenen Polyacrylamidgele, wurden für die 21 x 40 cm Gelkammer 15.5 mL Rotiphoresegel (23.75 % Acrylamid, 1.25 % Methylen-bis-acrylamid und 50 % Harnstoff 8.3 M), 13.7 mL 8.3 M Urea, 3.2 mL 8.3 M Urea in 10x TBE-Puffer, 13 μL TEMED gemischt und mit 288 μL 10 % APS-Lösung in Wasser versehen. Die Mischung wurde mittels einer Spritze mit Siliconschlauch aufgenommen und zwischen die Glasplatten injiziert (Spacerhöhe 0.4 mm). Der Kamm wurde eingesetzt und das Gel wurde 20 min bis zur vollständigen Polymerisation ruhen gelassen. Anschließend wurde die Kammer in das Pufferreservoir gestellt, mit Puffer befüllt und der Kamm entfernt. Die Taschen wurden mit Puffer gespült und das Gel mit 45 W innerhalb von 30 min auf 45 °C aufgeheizt. Die Taschen wurden erneut gespült, mit 5 μL Oligonukleotid im Ladepuffer (s. o.) befüllt und die Gelelektrophorese der Oligonukleotide für 1.5 h bei 45 W und 50 °C durchgeführt.

Die 10 x 10 cm Kammer wurde mit derselben Gelmischung gefüllt, jedoch mit einer 1 mL Pipette (Spacerhöhe 1.0 mm). Nach 20 min Aushärtezeit wurden die Pufferreservoirs gefüllt und die 5 μ L Oligonukleotid im Ladepuffer nach dem Spülen der Taschen in diese eingetragen. Anschließend wurde die Zelle für 50 min mit 40 mA und 200 V betrieben.

Die Gele wurden auf das dafür vorgesehene Metall Tablett des Fluoreszenzimagers Stella 8300 von Raytest übertragen und auf Ebene 4 fokussiert. Anschließend wurde mit einer Öffnung der Blende von 8.5 mit 1 min Belichtungszeit die Emission des Fluoreszeins bei einer Anregung von 490 ± 10 nm aufgenommen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1953**, *39*, 84-97.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [3] H. G. Khorana, in *Pure and Applied Chemistry, Vol. 17*, **1968**, p. 349.
- [4] K. L. Agarwal, H. Buchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. Rajbhandary, J. H. Van De Sande, V. Sgaramella, H. Weber, T. Yamada, *Nature* **1970**, *227*, 27-34.
- [5] D. V. Goeddel, D. G. Yansura, M. H. Caruthers, *Biochemistry* **1977**, *16*, 1765-1772.
- [6] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655-3661.
- [7] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191.
- [8] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [9] M. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281-285.
- [10] J. Genereux, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1642-1662.
- [11] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.
- [12] B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171-1200.
- [13] T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2491-2494.
- [14] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2-9.
- [15] J.-S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76-82.
- [16] X. Guo, A. A. Gorodetsky, J. Hone, J. K. Barton, C. Nuckolls, *Nature Nanotechnol.* **2008**, *3*, 163-167.
- [17] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5896-5900.
- [18] H. Cohen, C. Nogues, R. Naaman, D. Porath, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 11589-11593.
- [19] E. M. Boon, D. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1096-1100.
- [20] T. L. Pittman, W. Miao, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 16999-17004.
- [21] T. Melvin, S. Botchway, A. W. Parker, P. O'Neill, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 653-654.
- [22] H. Cohen, C. Nogues, D. Ullien, S. Daube, R. Naaman, D. Porath, *Faraday Discuss.* **2006**, *131*, 367-376.
- [23] D. M. Ceres, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14964-14965.
- [24] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.
- [25] K. Siriwong, A. A. Voityuk, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci* **2012**, *2*, 780-794.
- [26] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 5541-5553.
- [27] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.
- [28] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701-4709.
- [29] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063-7068.
- [30] A. A. Voityuk, N. Rösch, M. Bixon, J. Jortner, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9740-9745.
- [31] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10046-10055.
- [32] B. Giese, M. Spichy, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 195-198.
- [33] M. Bixon, J. Jortner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12556-12567.

- [34] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759-12765.
- [35] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673-676.
- [36] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 159-170.
- [37] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253-260.
- [38] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025-1029.
- [39] M. E. Núñez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85-97.
- [40] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656-3660.
- [41] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, *382*, 731-735.
- [42] P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8353-8358.
- [43] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950-12955.
- [44] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322.
- [45] Y. A. Berlin, F. C. Grozema, L. D. A. Siebbeles, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 10988-11000.
- [46] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51-53.
- [47] A. A. Voityuk, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12202-12207.
- [48] A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128-1136.
- [49] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10406-10411.
- [50] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2755-2762.
- [51] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51-70.
- [52] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwöglger, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1763-1766.
- [53] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1842-1844.
- [54] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480-11481.
- [55] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839-1842.
- [56] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280-11281.
- [57] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871-1876.
- [58] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877-4883.
- [59] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1637-1639.
- [60] W. Lu, D. A. Vicic, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7970-7980.
- [61] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5529-5541.
- [62] A. Weller, in *Zeitschrift für Physikalische Chemie, Vol. 133*, **1982**, p. 93.
- [63] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990-1009.
- [64] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 936-943.
- [65] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590-11591.

- [66] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2213-2222.
- [67] J. Frazer, S. M. Horner, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1279-1282.
- [68] I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, A. A. Petrov, S. V. Gontarev, Y. A. Berlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2081-2084.
- [69] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2090-2097.
- [70] T. L. Netzel, K. Nafisi, J. Headrick, B. E. Eaton, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17948-17955.
- [71] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119-9128.
- [72] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691.
- [73] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.
- [74] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2978-2980.
- [75] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 706-712.
- [76] A. Trifonov, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *409*, 277-280.
- [77] C. Wanninger-Weiß, Dissertation, Universität Regensburg, **2008**.
- [78] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865-3877.
- [79] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781-788.
- [80] H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- [81] T. Ehrenschwender, Dissertation, Universität Regensburg, **2011**.
- [82] Xu, Zhang, Li, Tao, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1105-1108.
- [83] G. B. Schuster, *Vol. 236, 237*, Springer, New York, **2004**.
- [84] H.-A. Wagenknecht, in *Charge Transfer in DNA* (Ed.: H.-A. Wagenknecht), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, pp. 1-25.
- [85] T. T. Williams, C. Dohno, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8148-8158.
- [86] E. Furrer, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3623-3632.
- [87] J. C. Genereux, K. E. Augustyn, M. L. Davis, F. Shao, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15150-15156.
- [88] A. Joy, A. K. Ghosh, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5346-5347.
- [89] K. Kawai, T. Takada, T. Nagai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *125*, 16198-16199.
- [90] K. Kawai, Y. Osakada, M. Fujitsuka, T. Majima, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3721-3726.
- [91] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6842-6843.
- [92] K. Kawai, Y. Osakada, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2144-2149.
- [93] T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2491-2494.
- [94] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8557-8558.
- [95] D. Fazio, C. Trindler, K. Heil, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 206-212.
- [96] F. Masson, T. Laino, U. Rothlisberger, J. Hutter, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 400-410.
- [97] A. Espagne, M. Byrdin, A. P. M. Eker, K. Brettel, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1777-1780.
- [98] MacFarlane, R. J. Stanley, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8558-8568.
- [99] Y.-T. Kao, C. Saxena, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 16128-16132.

- [100] C. Chatgililoglu, M. Guerra, P. Kaloudis, C. Houee-Levin, J.-L. Marignier, V. N. Swaminathan, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8979-8984.
- [101] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848-1851.
- [102] E. A. Castro, C. Saavedra, J. G. Santos, M. I. Umaña, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 5401-5407.
- [103] E. Rivera, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3966-3971.
- [104] L. N. K. V. P. Kadysh, V. L. Romyantseva, V. L. Efimova, J. P., *Strandish, Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1992**, 1404-1408.
- [105] R. Tashiro, A. Ohtsuki, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14361-14363.
- [106] A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 318-321.
- [107] R. Berera, R. van Grondelle, J. M. Kennis, *Photosynth. Res.* **2009**, *101*, 105-118.
- [108] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407-410.
- [109] R. Mas-Ballesté, O. Castillo, P. J. Sanz Miguel, D. Olea, J. Gómez-Herrero, F. Zamora, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2009*, 2885-2896.
- [110] A. Y. Kasumov, M. Kociak, S. Gueron, B. Reulet, V. T. Volkov, D. V. Klinov, H. Bouchiat, *Science* **2001**, *291*, 280-282.
- [111] D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635-638.
- [112] S. Breeger, M. v. Meltzer, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6469-6477.
- [113] B. Elias, J. C. Genereux, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 9067-9070.
- [114] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779-3783.
- [115] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1125-1129.
- [116] S. M. M. Conron, A. K. Thazhathveetil, M. R. Wasielewski, A. L. Burin, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14388-14390.
- [117] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014-6019.
- [118] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 791-800.
- [119] M. J. Park, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15320-15323.
- [120] T. Takada, Y. Otsuka, M. Nakamura, K. Yamana, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6881-6884.
- [121] U. Wenge, J. Wengel, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10026-10029.
- [122] F. Seela, Y. He, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *68*, 367-377.
- [123] S. A. Benner, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 784-797.
- [124] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4820-4827.
- [125] A. T. Krueger, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 242-248.
- [126] G. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226-6236.
- [127] S. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2238-2245.
- [128] S. Katz, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects* **1963**, *68*, 240-253.
- [129] E. Buncel, C. Boone, H. Joly, R. Kumar, A. R. Norris, *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *25*, 61-73.
- [130] D. A. Megger, J. Müller, *Nucleosides, Nucleotides, Nucl. Acids* **2010**, *29*, 27-38.
- [131] G. H. Clever, K. Polborn, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7204-7208.
- [132] G. H. Clever, Y. Sörtl, H. Burks, W. Spahl, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8708-8718.

- [133] L. Zhang, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 74-75.
- [134] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375-3376.
- [135] T. Ehrenschwender, W. Schmucker, C. Wellner, T. Augenstein, P. Carl, J. Harmer, F. Breher, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12547-12552.
- [136] C. M. G. Van Den Berg, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1986**, *215*, 111-121.
- [137] F. Garay, V. Solis, M. Lovrić, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *478*, 17-24.
- [138] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97-102.
- [139] C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64-71.
- [140] A. J. Bard, Parsons, R., Jordan, J., *Standard Potentials In Aqueous Solution*, CRC Press, **1985**.
- [141] U. Wenge, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2012**.
- [142] A. Harriman, G. R. Millward, P. Neta, M. C. Richoux, J. M. Thomas, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 1286-1290.
- [143] Nichia, **2014**.
- [144] C. Prunkl, Dissertation, Universität Regensburg, **2009**.
- [145] S. T. Gaballah, T. L. Netzel, *Nucleosides, Nucleotides, Nucl. Acids* **2002**, *21*, 681-694.
- [146] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *2*, 565-598.
- [147] Y. Lang, Karlsruhe Institut für Technologie, **2013**.
- [148] J. Peon, X. Tan, J. D. Hoerner, C. Xia, Y. F. Luk, B. Kohler, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 5768-5777.
- [149] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861-9870.
- [150] T. Takada, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14002-14006.
- [151] J. J. Maresh, L.-A. Giddings, A. Friedrich, E. A. Loris, S. Panjekar, B. L. Trout, J. Stöckigt, B. Peters, S. E. O'Connor, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *130*, 710-723.
- [152] C. Chaulet, C. Croix, J. Basset, M.-D. Pujol, M.-C. Viaud-Massuard, *Synlett* **2010**, *2010*, 1481-1484.
- [153] S. Searles, S. Nukina, *Chem. Rev.* **1959**, *59*, 1077-1103.
- [154] R. W. Hoffmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 6277-6279.
- [155] X. Hong, J. M. Mejia-Oneto, S. France, A. Padwa, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2409-2412.
- [156] J. Barbaric, Universität Regensburg, **2008**.
- [157] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051-1054.
- [158] J. Barbaric, C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 364-370.
- [159] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1-7.
- [160] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5483-5491.
- [161] S. R. Rajski, S. Kumar, R. J. Roberts, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5615-5616.
- [162] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4400-4407.
- [163] M. F. Bailey, E. H. Thompson, D. P. Millar, *Methods (San Diego, Calif.)* **2001**, *25*, 62-77.
- [164] A. Misra, S. Mishra, K. Misra, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 638-646.
- [165] M. Uchiyama, Y. Matsumoto, S. Nakamura, T. Ohwada, N. Kobayashi, N. Yamashita, A. Matsumiya, T. Sakamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8755-8759.

- [166] B. Nyasse, L. Grehn, H. L. S. Maia, L. S. Monteiro, U. Ragnarsson, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 7135-7139.
- [167] A. Penner, E. Bätzner, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2012**, *23*, 2803-2807.
- [168] J. Assmann, R. v. Benten, A. Charvat, B. Abel, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 1904-1913.
- [169] J. Liu, Y. Fang, C.-L. Chen, *Langmuir* **2008**, *24*, 1853-1857.
- [170] E. Bätzner, Masterarbeit, Universität Regensburg, **2011**.
- [171] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [172] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6699.
- [173] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [174] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [175] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570-14576.
- [176] V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [177] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [178] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [179] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [180] R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [181] J. Yang, J. Seckute, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476-7479.
- [182] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chem. Comm.* **2012**, *48*, 1736-1738.
- [183] N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013-7016.
- [184] N. K. Devaraj, G. M. Thurber, E. J. Keliher, B. Marinelli, R. Weissleder, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 4762-4767.
- [185] R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375-3378.
- [186] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2885-2896.
- [187] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, L. Anderson, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [188] E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799-11805.
- [189] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [190] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [191] B. R. Varga, M. Kallay, K. Hegyi, S. Beni, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 822-828.
- [192] R. A. A. Foster, M. C. Willis, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 63-76.
- [193] G. Clavier, P. Audebert, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3299-3314.
- [194] Z. Li, J. Ding, *Macrom. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 2260-2267.
- [195] T. Kämpchen, W. Massa, W. Overheu, R. Schmidt, G. Seitz, *Chemische Berichte* **1982**, *115*, 683-694.
- [196] Y. Liang, J. L. Mackey, S. A. Lopez, F. Liu, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17904-17907.

- [197] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 920-922.
- [198] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
- [199] M. M. Heravi, M. Bakavoli, M. Rahimizadeh, G. Rajabzadeh, M. Ghassemzadeh, *Russ J Org Chem* **2008**, *44*, 1233-1234.
- [200] J. A. Brazier, T. Shibata, J. Townsley, B. F. Taylor, E. Frary, N. H. Williams, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 1362-1371.
- [201] T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Vol. US 2013/0231473A1*, **2013**.
- [202] S. Lee, Y. You, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *2014* **2014**, *5*, 1463-1474.
- [203] C. Wellner, Dissertation, Karlsruhe Institut für Technologie, **2014**.
- [204] G. P. H. Dietz, M. Bähr, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *27*, 85-131.
- [205] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.

7. Appendix

7.1 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

C. Stubinitzky, G. B. Csérep, E. Bätzner, P. Kele, H.-A. Wagenknecht; „2'-Deoxyuridine conjugated with a reactive monobenzocyclooctyne as a DNA building block for copper-free click-type postsynthetic modification of DNA“; *Chemical Communications*, first online published **30. Jul 2014**.

A. Penner, E. Bätzner, H.-A. Wagenknecht; “Chemical Photocatalysis with 1-(*N,N*-Dimethylamino)pyrene“; *Synlett* **2012**; 23(19); 2803-2807.

7.2 Poster und Konferenzen

Effi Bätzner und Hans-Achim Wagenknecht, “1-(Phenylsulfonyl)-indole-C-nucleoside as an electron acceptor in DNA” (Poster), *V. Nukleinsäurechemie-Treffen*, September 2011 in Frankfurt.

Effi Bätzner, Thomas Ehrenschwender, Wolfgang Schmucker, Christian Wellner, Timo Augenstein, Patrick Carl, Jeffrey Harmer, Frank Breher and Hans-Achim Wagenknecht, “Development of a metal ion-mediated base pair for electron transfer in DNA” (Poster), *International Symposium “Templates in Chemistry – Present and Future”*, Mai 2013 in Bonn.

Effi Bätzner und Hans-Achim Wagenknecht, “Development of photoinduced electron transfer in DNA across HQ-HQ base pairs” (Poster), *VI. Nukleinsäurechemie-Treffen*, September 2013 in Greifswald.

7.3 Auslandsaufenthalt

Januar 2014 – Februar 2014

Aufenthalt in Budapest, Ungarn bei der Arbeitsgruppe um Péter Kele an der *Hungarian Academy of Sciences* zur Synthese.

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 10.11.2014

Effi Bätzner