

„DNA/RNA Traffic Lights 2.0“

Entwicklung von wellenlängenverschiebenden DNA- und RNA-Sonden unter Verwendung von „Click“-Modifikationen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Institut für Technologie (KIT)



genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Heidi-Kristin Walter

aus Radolfzell am Bodensee

Karlsruhe, 2016

KIT-Dekan:	Prof. Dr. Willem Klopper
Referent:	Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Korreferent:	Prof. Dr. Ute Schepers
Tag der mündlichen Prüfung:	16.12.2016

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2013 bis Dezember 2016 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden von März 2016 bis Juni 2016 an der Kansai University in Osaka in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Akinori Kuzuya durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung, die wissenschaftliche Freiheit und sehr gute Arbeitsatmosphäre. Weiterhin möchte ich mich für die Unterstützung bei meinem Forschungsaufenthalt in Japan und der Realisierung eigener Ideen bedanken.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- dem *Graduiertenkolleg 2039* für die wissenschaftlichen Möglichkeiten, die es mir geboten hat und vor allem für finanzielle Unterstützung.
- Prof. Dr. Ute Schepers (*Institut für Toxikologie und Genetik, KIT*) für die interessante Zusammenarbeit und die kleine Einführung in die Welt der chemischen Biologie. Des Weiteren möchte ich mich bei ihrer Mitarbeiterin Bettina Olshausen bedanken, die mich tatkräftig bei der Durchführung der Zellexperimente sowie fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unterstützt hat und so manches Kapitel meiner Arbeit mit Last-Minute-Zellbildern gerettet hat.
- Prof. Dr. Akinori Kuzuya (*Department of Chemistry and Material Engineering, Kansai University, Osaka, Japan*) für den Einblick in die Kunst des DNA-Origami Faltens und seiner wissenschaftlichen Unterstützung während meines Aufenthalts in seinem Labor.
- dem *Karlsruher House of Young Scientists (KHYS)* für die finanzielle Unterstützung meines dreimonatigen Forschungsaufenthalts an der *Kansai University* in Osaka (Japan).

- Jens Bauer aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Christof Niemeyer (*Institut für Biologische Grenzflächen 1, KIT*) für die riesengroße Hilfe bei der Anfertigung der AFM-Aufnahmen.
- Claudia Sommer für ihre Unterstützung bei jeglichen organisatorischen und verwaltungstechnischen Anliegen und die vielen netten Gespräche.
- Annette Hochgesand für das geduldige Messen der unzähligen MALDI-Massen, die es ihr nicht immer leichtgemacht haben.
- Dr. Andreas Rapp und seinen Mitarbeitern aus der NMR-Abteilung für das Messen der NMR-Proben.
- Dr. Norbert Foitzik und seinen Mitarbeiterinnen Ingrid Roßnagel und Angelika Möslle für die Anfertigung der Massen- und IR-Spektren.
- meinen Arbeitskollegen Linda Antusch, Stefanie Arndt, Dr. Sebastian Barrois, Dr. Effi Bätzner, Christoph Bickmann, Andrea Bijeljanin, Dr. Peggy Bohländer, Benjamin Chaouis, Andreas Dittmer, Larissa Doll, Dr. Philipp Ensslen, Yannic Fritz, Nadine Gaß, Sergej Hermann, Robert Hofsäß, Benjamin Lehmann, Dr. Marcus Merkel, Leonora Nurcaj, Krisana „Jack“ Peewasan, Dr. Alexander Penner, Damian Ploschik, Barbara Reiß, Ulrike Reisacher, David Rombach, Tamina Schneider, Christian Schwechheimer, Dr. Sabrina Sezi, Jeannine Steinmeyer, Dr. Claudia Stubinitzky, Nathalie Wagener, Dr. Martin Weiser, Dr. Christian Wellner und Samantha Wörner für die gute Zusammenarbeit, die tolle Arbeitsatmosphäre und eine einzigartige vor allem unvergessliche Zeit im AKW.
- meinen Bachelor- und Vertiefenstudenten Florian, Larissa, Mila, Knut und Celine für die engagierte Mitarbeit bei diversen Projekten.
- Jeannine, Robert und Janni für das Korrekturlesen der Arbeit.
- Steffie, meiner Schabernack- und Zermürbe-Komplizin, für das Aushecken und Durchführen vieler genialer Pläne und vor allem für die Unterstützung während dem Schreiben der Arbeit.
- Effi für die vielen sehr guten Gespräche, ihre Unterstützung und ihre Freundschaft.

- Jeannine für die frühmorgendlichen Kaffeepausen und ihr offenes Ohr zu jeder Zeit.
- Nadine, die mir beigebracht hat wie man richtig Weinschorle trinkt und für ihre immer fröhliche Art.
- Barry, Marcus und Philipp, die mir schon in meiner ersten Woche im AKW gezeigt haben, wann Feiern auf dem AK-Balkon zu enden haben.
- Robert und Christian für eine unvergessliche Zeit im L-Labor. „Ich bin ein Albatross!“

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben und immer an ihre „kleine Lokomotive“ geglaubt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Themenstellung	1
2	Theoretischer Hintergrund	5
2.1	Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer	5
2.2	Energietransfer-Systeme in der Bioanalytik.....	10
2.2.1	Wellenlängenverschiebende Nukleinsäure-Sonden	11
2.2.2	„DNA/RNA Traffic Lights“	13
2.2.3	Neue photostabile Cyaninfarbstoffe für wellenlängenverschiebende Nukleinsäure-Sonden	16
2.3	Postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren	19
2.3.1	„Click“-Chemie	20
3	Neuer arabinokonfigurierter 2'-„Click“-Baustein	25
3.1	Synthese des cAraU -Bausteins.....	27
3.2	Synthese der Cyanin-Styryl-Farbstoffe D3 und A4	29
3.3	cAraU in DNA.....	31
3.3.1	Charakterisierung der einfach markierten Einzel- und Doppelstränge.....	33
3.3.2	Charakterisierung der Energietransfer-Sonden	39
3.3.3	<i>in vivo</i> Experimente ausgewählter Energietransfer-Paare.....	48
4	Wellenlängenverschiebende siRNA-Sonden zur Genregulierung	53
4.1	Einführung	53
4.2	Synthese und Charakterisierung der Energietransfer-siRNA-Sonden.....	56
4.3	<i>in vivo</i> Experimente	70
5	Wellenlängenverschiebende Aptasensoren	73
5.1	Einführung und Vorarbeiten.....	73
5.2	Neues Konzept.....	78

5.2.1	Doppelsträngige (geteilte) Aptamere.....	78
5.2.2	Einzelsträngige Aptamere.....	86
6	DNA-Origami-Zangen	93
6.1	Einführung	93
6.2	Synthese und Charakterisierung funktionalisierter DNA-Origami-Zangen	97
6.2.1	Strangaustausch-Experimente.....	97
6.2.2	ATP-bindende DNA-Origami-Zangen	104
7	Zusammenfassung.....	117
8	Experimenteller Teil	121
8.1	Materialien und Methoden	121
8.2	Synthesevorschriften.....	128
8.2.1	„Click“-Bausteine cL und cAraU	128
8.2.2	Azidmodifizierte Farbstoffe D3 und A4	134
8.3	Oligonukleotide	142
8.3.1	Synthese modifizierter DNA	142
8.3.2	Synthese mehrfach modifizierter DNA mit <i>ultramild</i> Monomeren	148
8.3.3	Synthese modifizierter RNA.....	150
8.3.4	HPLC-Methoden	154
8.3.5	Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide	157
8.4	Regulierung der GFP Expression mittels siRNA.....	165
8.4.1	Zellkultur	165
8.4.2	Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie.....	166
8.5	DNA-Origami-Zangen	167
8.5.1	Hybridisierung und Aufreinigung der DNA-Origami-Zangen	167
8.5.2	Charakterisierung der DNA-Origami-Zangen	167

8.5.3	Sequenzen der <i>DNA-Origami-Zangen</i>	169
8.6	Zusätzliche Spektren und Daten.....	177
8.6.1	cAraU -Energietransfer-DNA	177
8.6.2	Wellenlängenverschiebende Aptasensoren.....	181
8.6.3	<i>DNA-Origami-Zangen</i>	184
9	Literaturverzeichnis	185
10	Anhang	195

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	cL	Prop-2-yn-1-yl-(<i>R</i>)-(2,4-dihydroxybutyl)carbamat
μL	Mikroliter	Cl	Chlorid
μM	Mikromolar	cm	Zentimeter
A	Akzeptor	CPG	<i>controlled pore glass</i>
a	Arabino	cU	2'- <i>O</i> -Progaryluridin
a. u.	willkürliche Einheit (<i>arbitrary units</i>)	CuAAC	kupfer(I)katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
abs	Absorption	D	Donor
abs.	absolut	Da	Dalton
Ad	Adenosin	dA	2'-Desoxyadenosin
AMP	Adenosinmonophosphat	DAD	Diodenarraydetektor
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>	DC	Dünnschichtchromatographie
Apt	Aptamer	dC	2'-Desoxycytidin
AraU	1-β-D-Arabinofuranosyluracil	DCM	Dichlormethan
ATP	Adenosintriphosphat	dG	2'-Desoxyguanosin
BEMP	<i>tert</i> -Butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-diazaphosphorin	DIPEA	Diisopropylethylamin
bp	Basenpaare	DMF	Dimethylformamid
bzw.	beziehungsweise	DMSO	Dimethylsulfoxid
ca.	circa	DMTr	Dimethoxytrityl
cAraU	2'- <i>O</i> -Progaryl-arabinouridin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i>	ds	doppelsträngig
		dsRNA	doppelsträngige RNA

Abkürzungsverzeichnis

dT	2'-Desoxythymidin	HR	hochauflösend (<i>high resolution</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	I	Intensität
EE	Essigsäureethylester	IC	<i>internal conversion</i>
EI	Elektronenstoßionisation	ISC	<i>inter system crossing</i>
eq	Äquivalente	<i>J</i>	Kopplungskonstante
ESI	Elektronensprayionisation	konz.	konzentriert
ET	Energietransfer	Lsg.	Lösung
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)	M	molar
EtOH	Ethanol	m	Multipllett
exc	Anregung (<i>excitation</i>)	MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>		
FC	<i>Flash</i> Chromatographie	MeCN	Acetonitril
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer- Mikroskopie (fluorescence lifetime imaging microscopy)	MeOH	Methanol
		mg	Milligramm
		MHz	Megahertz
FRET	Fluoreszenzresonanzenergie- transfer	min	Minute
		miRNA	<i>micro</i> RNA
G	Guanosin	mL	Milliliter
GFP	grün fluoreszierendes Protein	mM	millimolar
GTP	Guanosintriphosphat	mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
h	Stunde	MS	Massenspektroskopie
HeLa	Henrietta Lacks	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
HPA	Hydroxypicolinsäure		
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>	NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
		NaH	Natriumhydrid

NaOH	Natriumhydroxid	RLC	<i>RISC loading complex</i>
NaP _i	anorganischer Natriumphosphatpuffer	RNA	Ribonukleinsäure
NEt ₃	Triethylamin	RNAi	RNA-Interferenz
NEt ₃ *HF	Triethylamintrihydrofluorid	RP	Umkehrphase (<i>reserved phase</i>)
NH ₃	Ammoniak	rpm	<i>rounds per minute</i>
nm	Nanometer	RT	Raumtemperatur
nmol	Nanomol	rU	Uridin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>	s	Sekunde
nt	Nukleotide	s.	siehe
p.a.	pro analysi	SA	Strang austausch
PA	2-Cyanoethyl-diisopropylchloro- phosphoramidit	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
pH	pH-Wert	t	Triplett
pmol	Picomol	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
ppm	<i>parts per million</i>	THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
quant.	quantitativ	THF	Tetrahydrofuran
r	Ribo	T _m	Schmelztemperatur
rA	Adenosin	TO	Thiazolorange
rC	Cytidin	TR	Thiazolrot
R _f	Retentionsfaktor	UV	Ultraviolett
rG	Guanosin	vgl.	vergleiche
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	vis	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts (<i>visible</i>)
		YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung	λ_{exc}	Anregungswellenlänge
ϵ_{260}	Extinktionskoeffizient bei 260 nm	τ	Lebenszeit
		ϕ_{F}	Fluoreszenzquantenausbeute
λ_{em}	Emissionswellenlänge		

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

[a] *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

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

1 Motivation und Themenstellung

„Eine grün leuchtende Revolution“,^[1] „Grün für das Leben“,^[2] „Die Männer, die Schweine zum Leuchten brachten“^[3] sind nur einige der Schlagzeilen, die 2008 nach der Vergabe des Nobelpreises für Chemie in vielen deutschen Zeitungen und Magazinen zu lesen waren. Die Forscher *Osamu Shimomura*, *Martin Chalfie* und *Roger Y. Tsien* erhielten den Nobelpreis für ihre Entdeckung und Entwicklung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). GFP wurde erstmalig von *Osamu Shimomura* im Jahr 1962 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert^[4] und hat sich bis heute, mehr als 50 Jahre nach seiner Entdeckung, zu einem der wichtigsten Werkzeuge in den aktuellen Biowissenschaften entwickelt.^[5,6]

1992 gelang es *Prasher et al.* die cDNA (engl.: *complementary DNA*) des GFP-Gens zu klonieren,^[7] woraufhin 1994 GFP erstmals erfolgreich durch *Chalfie et al.* in einem lebenden Organismus exprimiert wurde.^[8] Diese Errungenschaften begründeten die Verwendung von GFP als proteinbasierter Marker und revolutionierten das Gebiet der Zellbiologie.^[9]

Ein Einsatzbereich von GFP ist die Markierung von Proteinen, um diese innerhalb der Zelle lokalisieren zu können. Der australische Forscher *Brendan Crabb* modifizierte beispielsweise Proteine eines Malariaparasiten und konnte somit den cotranslationalen Proteintransport über die Membran des Parasiten ins Cytosol der Wirtszelle beobachten und die dafür verantwortliche Exportmaschine identifizieren.^[10] GFP wird ebenfalls in gentechnisch manipulierte, fluoreszente Biosensoren integriert, um dynamische Änderungen bei der Signaltransduktion zu beobachten.^[11]

Ein weiteres wichtiges Werkzeug der Biowissenschaften ist die Untersuchung von biologischen Vorgängen mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET). Aufgrund der Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz können strukturelle Änderungen innerhalb biologischer Systeme einfach bestimmt werden. Ein weitaus größerer Vorteil ist das Auslesen der Ergebnisse durch das Auftreten einer für den FRET charakteristischen Emissionswellenlänge und die damit verbundene hohe Sensitivität. Bei der Verwendung von nur einer Emissionswellenlänge werden aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen der Sonden mit Zellbestandteilen falsche Resultate erhalten.

GFP kann durch Kombination mit einem seiner Derivate, beispielsweise dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP), ebenfalls für FRET-Experimente genutzt werden.^[12,13] Der Nachteil von GFP und seinen andersfarbigen Vertretern sind deren Größe verglichen mit den zu untersuchenden biologischen Systemen. Diese Systeme können durch die Markierung mit einem vergleichbar großen Molekül in ihrer Funktionalität beeinflusst werden, weshalb vermehrt auf kleine organische Moleküle zurückgegriffen wird.

An diesem Punkt knüpft die Forschung dieser Arbeit an. Basierend auf dem bereits bekannten Konzept der „Traffic Lights“, einem Energietransfer-System bestehend aus den zwei Cyanin-Farbstoffen Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR), sollte eine Weiterentwicklung bzw. Optimierung erfolgen. Diese beinhaltet die Verwendung einer neuen Generation photostabiler Cyanin-Stryryl-Farbstoffen und die Markierung der fluoreszenten Sonden mittels postsynthetischer kupfer(I)katalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden (CuAAC), besser bekannt als „Click“-Reaktion.

Zur Erweiterung des Repertoires der „Click“-Modifikationen, sollte das Arabino-Analogon (**cAraU**) des kommerziell erhältlichen 2'-O-Propargyluridin (**cU**) synthetisiert und dessen Auswirkungen auf die optischen Eigenschaften ausgewählter Fluorophore innerhalb der DNA untersucht werden.

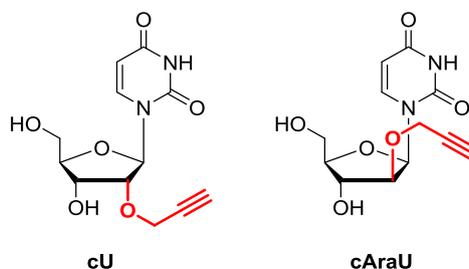


Abbildung 1: Strukturen der „Click“-Bausteine 2'-O-Propargyluridin (**cU**, links) und 2'-O-Propargylarabinouridin (**cAraU**, rechts). Die strukturellen Unterschiede sind in rot hervorgehoben.

Der neue **cAraU**-Baustein sollte zusammen mit zwei weiteren „Click“-Bausteinen in bioanalytischen Anwendungen Verwendung finden. Dazu gehören zum einen die wellenlängenverschiebende Fluoreszenzmarkierung von siRNA zu Genregulierung und adenosinsensitiver und -selektiver Aptasensoren. Zusammen mit photostabilen Fluorophoren sollten so bioanalytische Sonden mit verbesserten optischen Eigenschaften entwickelt werden, die zur *in vivo* Bildgebung in Echtzeit mittels Fluoreszenzmikroskopie und Einzelmolekülspektroskopie genutzt werden können.

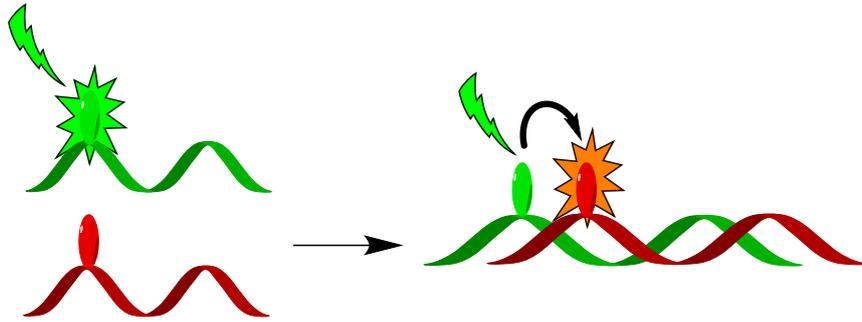


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prinzips der wellenlängenverschiebenden Sonden.

Im letzten Teil der Arbeit sollte eine wellenlängenverschiebende DNA-Origami-Struktur hergestellt werden, die in der Lage ist die Bindung eines Zielmoleküls, in diesem Fall ATP, durch eine Konformationsänderung sowie einen Wechsel der Fluoreszenzfarbe anzuzeigen.

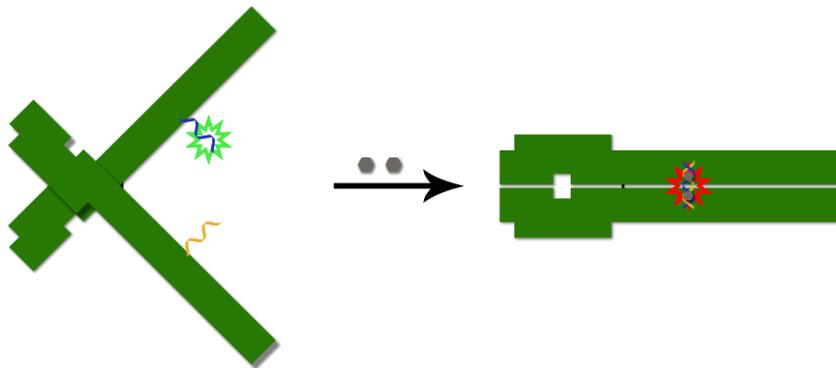


Abbildung 3: Prinzip der Konformationsänderung sowie Wechsel der Fluoreszenzfarbe durch Bindung eines Zielmoleküls in einer DNA-Origami-Struktur (grün).

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer

Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Wird ein Molekül durch Absorption eines Photons aus seinem Grundzustand (S_0) in einen energetisch angeregten Zustand (S_1) angehoben, so ist es in der Lage, die aufgenommene Energie über verschiedene Prozesse, unter anderem in Form von Strahlung, wieder abzugeben. Dieser Prozess wird allgemein als Photolumineszenz bezeichnet und unterscheidet sich, je nach Multiplizität des angeregten Zustands, in Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Fluoreszenz bezeichnet den Übergang aus dem Singulett-Zustand (S_1) in den Grundzustand. Das heißt die Elektronen im angeregten Zustand besitzen die gleiche Spinmultiplizität wie der Grundzustand, sodass der Übergang von S_1 nach S_0 spinerlaubt ist und damit schnell ($\approx 10^{-8}$ s)^[14] abläuft. Phosphoreszenz hingegen beschreibt den Übergang aus dem Triplett-Zustand (T_1) zurück in den Grundzustand, wobei der angeregte Zustand T_1 hierbei eine unterschiedliche Spinmultiplizität besitzt. Der Übergang von T_1 nach S_0 ist somit spinverboten und äußert sich in Phosphoreszenz-Lebenszeiten im Bereich von mehreren Millisekunden bis Sekunden.

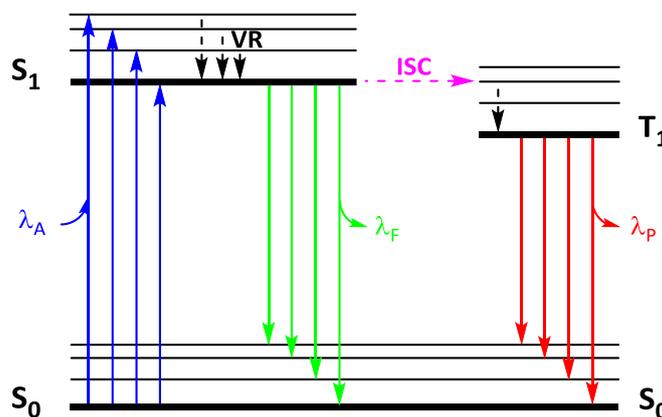


Abbildung 4: Jablonski-Diagramm. λ_A : Absorptionswellenlänge, λ_F : Fluoreszenzwellenlänge, λ_P : Phosphoreszenzwellenlänge, VR: Schwingungsrelaxation, ISC: *Intersystem Crossing* (Singulett-Triplett-Übergang), S: Singulett-Zustand, T: Triplett-Zustand.

Im sogenannten *Jablonski*-Diagramm werden diese Prozesse veranschaulicht (s. Abbildung 4). Es zeigt neben den strahlenden Übergängen (Fluoreszenz & Phosphoreszenz) auch strahlungslose Prozesse. Die Anregung eines Fluorophors erfolgt in der Regel in einen höher gelegenen Schwingungszustand des S_1 . Die Relaxation in Form von Lichtemission zurück in den Grundzustand S_0 erfolgt jedoch aufgrund von Energieverlust durch Molekülschwingungen und Zusammenstößen mit dem Lösungsmittel aus dem niedrigsten, Schwingungszustand. Dieser strahlungslose Übergang wird als Schwingungsrelaxation (*VR – vibrational relaxation*) bezeichnet ($\approx 10^{-12}$ s)^[14] und führt zu der von *Kasha* aufgestellten Regel, die besagt, dass die Wellenlänge der Fluoreszenz (λ_F) unabhängig von der Absorptionswellenlänge (λ_A) ist.^[14,15] Der Übergang zurück in den Grundzustand verläuft ebenfalls in höhere Schwingungszustände, was zur Folge hat, dass sich Absorptions- und Fluoreszenzspektrum spiegelbildlich zueinander verhalten. Die Differenz zwischen Fluoreszenz- und Absorptionsmaximum, die aufgrund von Relaxationsprozessen zustande kommt, wird als *Stokes*-Verschiebung bezeichnet.^[16]

Ein weiterer strahlungsloser Prozess ist das *Intersystem Crossing* (ISC). Dieser Prozess beschreibt den Übergang zwischen zwei isoenergetischen Schwingungszuständen verschiedener Spinmultiplizität. Einfacher ausgedrückt, der Übergang vom angeregten Singulett- zum Triplett-Zustand (T_1). Auch hier wird durch Schwingungsrelaxation der niedrigste Schwingungszustand erreicht.

Fluoreszenzquantenausbeute und -lebenszeit

Zu den wichtigsten Kenngrößen eines Fluorophores gehören seine Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F und seine Fluoreszenzlebenszeit τ .

Die Quantenausbeute ϕ_F beschreibt den Quotient aus emittierten und absorbierten Photonen,^[14] genauer gesagt den Anteil an strahlenden Prozessen an der Gesamtrelexation (s. I) .

$$\Phi_F = \frac{k_{em}}{k_{em} + k_{ns}} \quad (I)$$

ϕ_F : Fluoreszenzquantenausbeute

k_{em} : Geschwindigkeitskonstante des fluoreszenten Zerfalls

k_{ns} : Geschwindigkeitskonstante der strahlungslosen Prozesse

Die Fluoreszenzlebenszeit τ ist definiert als die Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verbringt, bevor es wieder in den Grundzustand zurückkehrt.^[14] Sie wird mathematisch als reziproker Wert der Geschwindigkeitskonstanten der Emission beschrieben.

$$\tau = \frac{1}{k_{\text{em}}} \quad (\text{II})$$

τ : Fluoreszenzlebenszeit

k_{em} : Geschwindigkeitskonstante des fluoreszenten Zerfalls

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) beschreibt den, von Förster erstmals im Jahr 1946 beschriebenen, strahlungslosen Energietransfer (ET) zwischen einem Donor-Molekül (D) im angeregten Zustand und einem Akzeptor-Molekül (A) im Grundzustand.^[14,17,18] Oft wird dieses elektrodynamische Phänomen auch nach seinem Entdecker als Förster-Resonanz-Energietransfer bezeichnet. Der Energietransfer kann auftreten, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Nur dann haben einige Übergänge des Donors die gleiche Energie wie die entsprechenden Übergänge des Akzeptors (s. Abbildung 5). Die Energieübertragung erfolgt hierbei ohne die Emission eines Photons, sondern strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen.

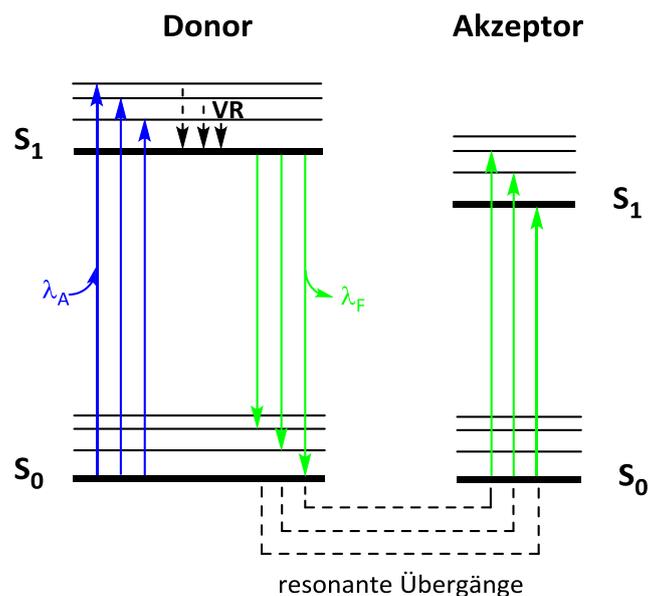


Abbildung 5: Vereinfachtes *Jablonski*-Diagramm zur Veranschaulichung der resonanten Übergänge beim Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer.

Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers k_{FRET} lässt sich wie folgt beschreiben:^[19]

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

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

k_{FRET} :	Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers
τ_{D} :	Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
R_0 :	Förster-Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz)
r :	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
κ^2 :	Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor
Φ_{D} :	Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$J(\lambda)$:	spektrales Überlappungsintegral
n :	Brechungsindex des Mediums zwischen den Chromophoren

Aus der Formel für die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers k_{FRET} wird deutlich, dass neben der Quantenausbeute Φ_{F} und der Fluoreszenzlebenszeit des Donors τ_{D} drei weitere Größen essentiell für einen effizienten Energietransfer sind. Hierzu gehören das spektrale Überlappungsintegral ($J(\lambda) \neq 0$), die relative Orientierung der Donor- und Akzeptor-Übergangsdipolmomente, sowie der Abstand der beiden Chromophore.

Eine wichtiger Wert zur Beschreibung eines Energietransfers ist die FRET-Effizienz E . Diese wird definiert durch den Quotienten aus der Anzahl der vom Donor auf den Akzeptor übertragenen Lichtquanten und der Anzahl der durch den Donor absorbierten Lichtquanten und wird durch folgende Formel mathematisch beschrieben:^[14,19]

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

Die obige Gleichung zeigt, dass auch die FRET-Effizienz sehr stark abhängig vom Abstand der Chromophore zueinander ist.

Die FRET-Effizienz kann mit Hilfe der Quantenausbeute des Donors in Anwesenheit (ϕ_{DA}) und in Abwesenheit (ϕ_D) des Akzeptors mit folgender Formel berechnet werden:

$$E = 1 - \frac{\phi_{DA}}{\phi_D} \quad (V)$$

ϕ_{DA} : Quantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

ϕ_D : Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

Eine weitere Methode zur Berechnung der FRET-Effizienz ist die Messung der Fluoreszenzlebenszeit des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptors. Diese bietet den Vorteil, dass Fehler aufgrund von Konzentrationsschwankungen keinen Einfluss haben, da die Fluoreszenzlebenszeiten unabhängig von der Fluorophor-Konzentration sind. Probleme bereiten jedoch Fluorophore, die mehr als eine Fluoreszenzlebenszeit besitzen.^[20]

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (VI)$$

τ_{DA} : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

τ_D : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

2.2 Energietransfer-Systeme in der Bioanalytik

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, besteht eine sehr starke Abstands- und Orientierungsabhängigkeit der FRET-Effizienz (E ist proportional zu r^{-6}). Diese Tatsache kann ausgenutzt werden, um die Struktur und Abstände innerhalb von Makromolekülen, wie Proteinen oder Oligonukleotiden, genauer zu untersuchen (10 – 100 Å). Die FRET-Technik wird daher auch gerne als „molekulares“ bzw. „spektroskopisches Lineal“ bezeichnet.^[21,22] Aufgrund ihrer hohen Sensitivität gegenüber Strukturänderungen im Nanometer-Bereich erfahren FRET-Systeme Anwendung in der Echtzeit-Spektroskopie von Proteinfaltungen *in vivo*,^[23] der Beobachtungen von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen *in vitro* ^[21] sowie der Charakterisierung der Hybridisierung von DNA-Origamis.^[24]

Energietransfer-Sonden werden nicht nur zur Bestimmung von Abständen genutzt, sondern auch in der Biosensorik, der Nukleinsäure-Analytik und bei der Visualisierung zellulärer Bestandteile. Großes Augenmerk liegt hierbei auf der Aufnahme von DNA und RNA in die Zelle und ihrem anschließenden Abbau. Häufig wird dabei auf sequenzspezifische Hybridisierungssonden zurückgegriffen, die in der Lage sein sollten, auch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) zu detektieren.^[25] Hierfür werden oft sogenannte „Light-up“-Sonden verwendet, die sensitiv auf Hybridisierung mit einer starken Erhöhung der Fluoreszenzintensität reagieren.^[26] Es ergeben sich jedoch Probleme bei der Detektion, da die Sonden mit nur einem Fluorophor ausgestattet sind und es aufgrund der Autofluoreszenz von Zellbestandteilen und durch unspezifische Hybridisierung zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen kommen kann.

Eine Weiterentwicklung ist die Verwendung eines Fluorophores in Verbindung mit einem Fluoreszenzlöcher, die jeweils endständig an DNA-Haarnadelstrukturen, sogenannten *Molecular Beacons* (MB), angebracht werden.^[27,28] Die Schleifenregion trägt die komplementäre Zielsequenz, sodass bei erfolgreicher Detektion der MB geöffnet wird. Fluorophor und Löcher entfernen sich dadurch voneinander und die Fluoreszenz steigt an. Nachteilig ist hier jedoch ebenfalls das Auslesen der Ergebnisse über die Detektion der Intensitäten von nur einer Fluoreszenzwellenlänge.

2.2.1 Wellenlängenverschiebende Nukleinsäure-Sonden

Um die Probleme der Detektion mittels einer einzigen Fluoreszenzwellenlänge zu umgehen, wurden Nukleinsäure-Sonden entwickelt, die nicht auf dem Prinzip der Fluoreszenzlöschung, sondern auf der Verschiebung der Emissionswellenlänge basieren. Ein Beispiel dafür sind Sonden, deren Detektionswellenlänge aufgrund von Excimer-Fluoreszenz bzw. excimerartiger Fluoreszenz verschoben wird.^[26,29–31] Pyren-Pyren-Excimere sind ein sehr beliebtes System, da diese im Vergleich zur reinen Pyren-Emission eine Verschiebung von ungefähr 120 nm aufweisen (s. Abbildung 6).^[26]

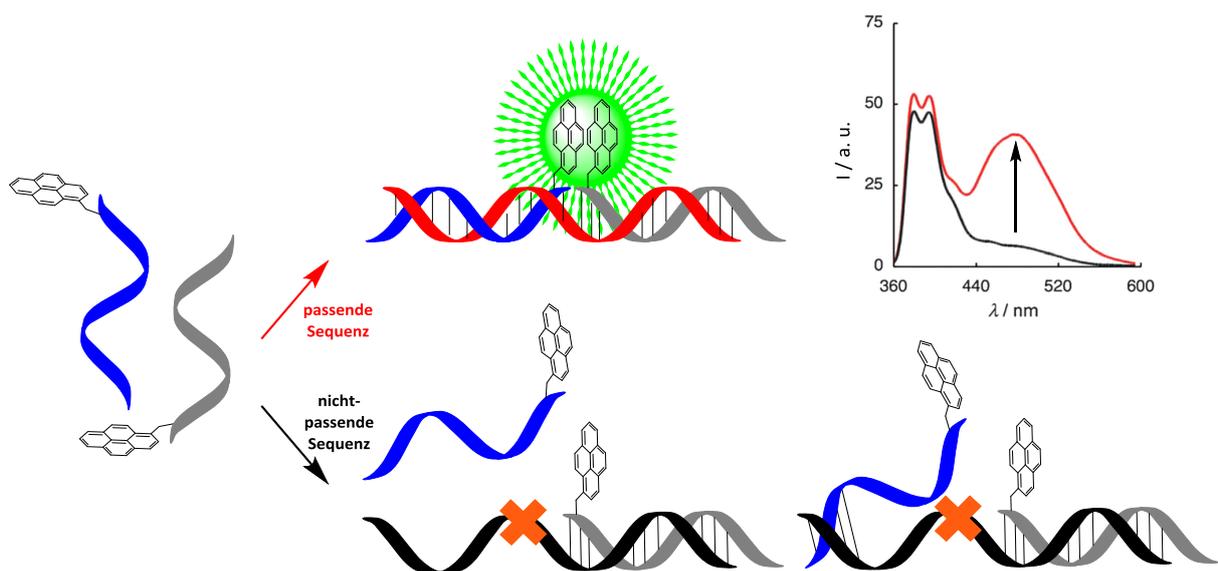


Abbildung 6: Prinzip der SNP-Diskriminierung durch excimerbildende Pyren-Sonden.^[26]

Tyagi und Kramer veröffentlichten im Jahr 2000 erstmals MBs, die zwei Fluorophore enthalten und prägten damit den Begriff der wellenlängenverschiebenden *Molecular Beacons* (s. Abbildung 7).^[32] Sie synthetisierten Haarnadelstrukturen, die am 5'-Ende ein Sammel-Fluorophor (**S**; grün) sowie weiter entfernt davon ein Emitter-Fluorophor (**E**; rot) besitzen und am 3'-Ende einen Fluoreszenzlöcher (**Q**; grau) tragen. **S** ist so platziert, dass es sich im geschlossenen MB direkt neben **Q** befindet, wodurch bei Abwesenheit der Zielsequenz ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal detektiert wird. Bei Zugabe der Zielsequenz öffnet sich der MB, **S** entfernt sich von **Q** und der Energietransfer von **S** nach **E** kann stattfinden. Durch die große Verschiebung des Emissionsmaximums in wellenlängenverschiebenden Sonden kann Hintergrundrauschen, verursacht durch Autofluoreszenz von Zellkompartimenten, sowie das

Anregungslicht effektiver herausgefiltert werden. Dies resultiert in sensitiveren und verlässlicheren Ergebnissen.

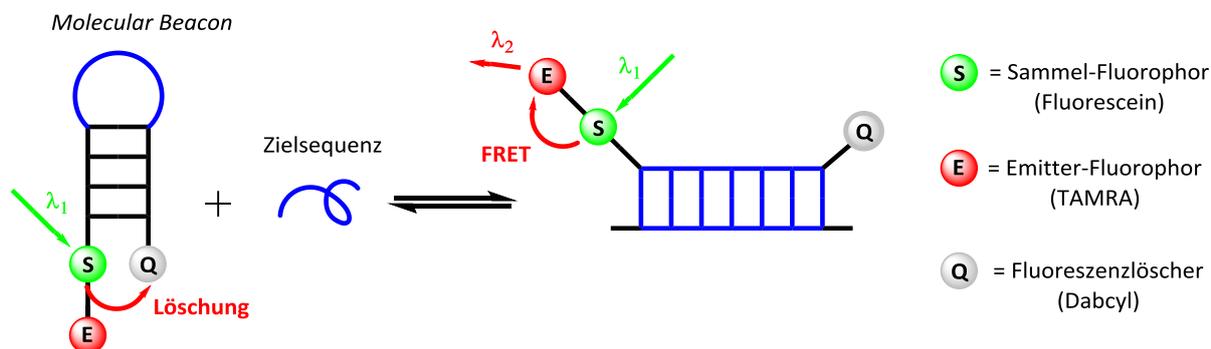


Abbildung 7: Prinzip der wellenlängenverschiebenden MBs von Tyagi und Kramer.^[32]

Die Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelte ein weiteres Beispiel von wellenlängenverschiebenden DNA-Sonden, die sogenannte „white light emitting DNA“ (WED).^[33] Die Chromophore Pyren (**PydU**) und Nilrot (**NRdU**) wurden dabei über Ethinyl-Brücken an die 5-Position von 2'-Desoxyuridinen geknüpft und anschließend in DNA eingebracht (s. Abbildung 8). **PydU** und **NRdU** wurden direkt nebeneinander platziert, um eine optimale Wechselwirkung der beiden Chromophore zu erzielen. Bei Anregung von **PydU** im DNA-Einzelstrang ($\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$) kommt es zu einem effizienten Energietransfer auf **NRdU** ($k_{FRET} = 5.24 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$). Die Pyren-Fluoreszenz wird um 92 % ihres Ursprungswerts gelöscht und die rote Nilrot-Fluoreszenz bei 655 nm überwiegt. Durch die Hybridisierung der Sonde mit dem komplementären Gegenstrang werden die Chromophore helikal zueinander verdreht, sodass die veränderte Orientierung der Übergangsdipolmomente zu einer Senkung der FRET-Effizienz um 83 % führt ($k_{FRET} = 1.69 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$). Das Verhältnis aus **PydU**- und **NRdU**-Fluoreszenz ergibt dabei eine weiße Emission. Die Emissionsfarbe des Systems lässt sich ebenfalls thermisch reversibel steuern. Durch Erhitzen der Probe wird die Doppelhelix aufgebrochen und die Nilrot-Fluoreszenz wiederhergestellt.

Die Fluorophore Pyren und Nilrot wurden ebenfalls in diagonaler Orientierung zueinander in *Molecular Beacons*^[34] integriert und deren optisches Verhalten in Kombination mit acpcPNA ((2S)-Aminocyclopentan-(1S)-carbonsäure Peptidnukleinsäure) untersucht.^[35]

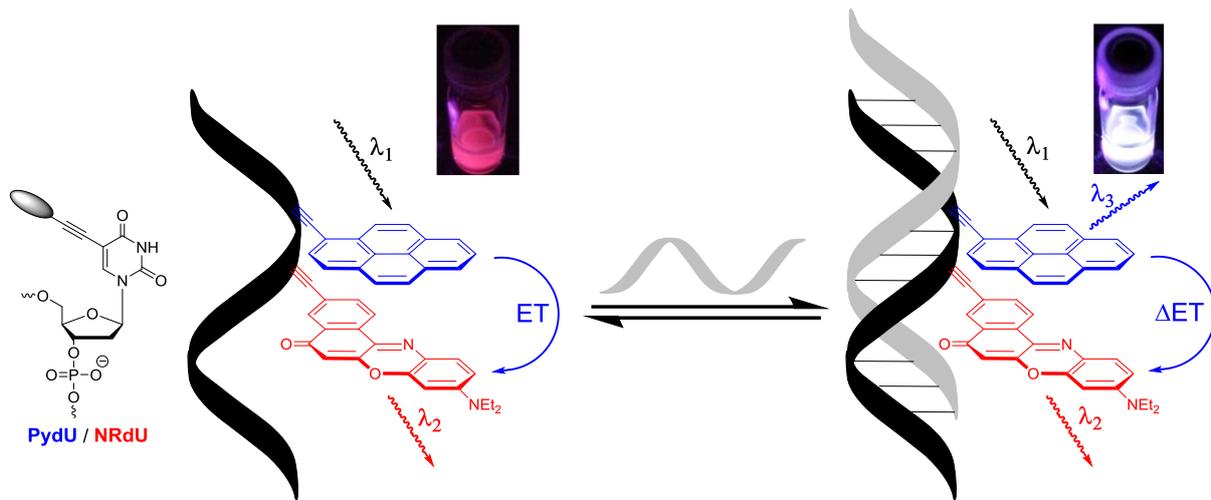


Abbildung 8: links: Strukturen von pyren- (**PydU**) und nitro-modifizierten (**NRdU**) Nucleosiden in DNA. rechts: Prinzip der „white light emitting DNA“ (WLED).^[33] Abbildung entnommen aus [36].

2.2.2 „DNA/RNA Traffic Lights“

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, besitzen die endogenen Substanzen einer Zelle eine Eigenfluoreszenz, die die Bildgebung in lebendem Gewebe erschwert. Deshalb ist es von äußerster Wichtigkeit, Fluoreszenzsonden zu entwickeln, die über 400 nm angeregt werden können. Des Weiteren sind große Stokes-Verschiebungen von Vorteil, da dadurch die Hintergrundfluoreszenz der Zelle sowie das Anregungslicht besser herausgefiltert werden können.

Die Cyanin-Farbstoffe Thiazolorange (**TO**) und Thiazolrot (**TR**) bilden zusammen ein sehr potentes Energietransfer-Paar, welches die oben genannten Kriterien erfüllt.^[37] **TO** (Donor-Fluorophor) und **TR** (Akzeptor-Fluorophor) zeigen dabei einen Wechsel ihrer Emissionsfarbe von grün (**TO**) nach rot (**TR**), weshalb sie in der Literatur auch als „Traffic Lights“ und in Oligonucleotiden als „DNA/RNA Traffic Lights“ bezeichnet werden (s. Abbildung 9).^[38–40]

TO und **TR** wurden als Basen-Surrogat über einen azyklischen (*S*)-2-Amino-1,3-propandiol-Linker in DNA eingebaut. Das Fehlen der Zucker-Gerüste und der Basen soll eine Interkalation der beiden Farbstoffe ermöglichen.^[40] Die beiden Fluorophore sind in der Lage aufgrund von π - π -Wechselwirkungen Grundzustands-Dimere zu bilden, die die Destabilisierung durch das Fehlen zweier Basenpaare ausgleichen können ($\Delta T_m = -2$ °C im Vergleich zum unmodifizierten Doppelstrang).

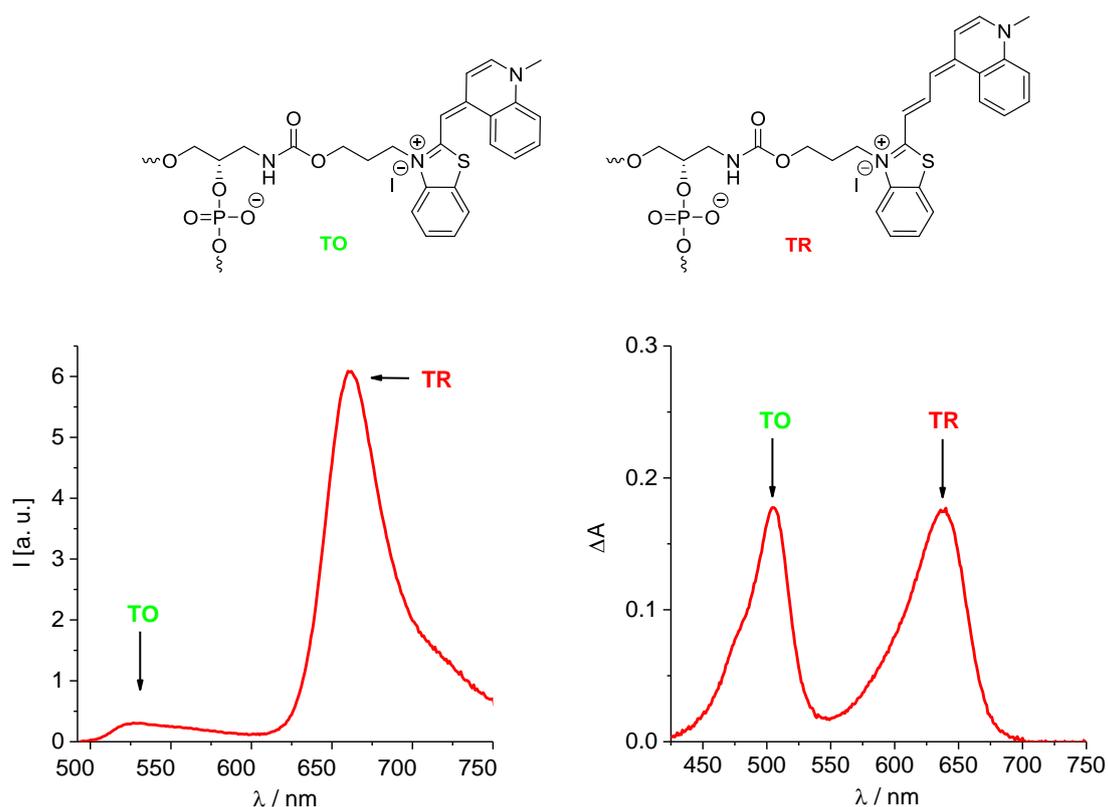


Abbildung 9: Oben: Strukturen von Thiazolorange (**TO**) und Thiazolrot (**TR**) angeknüpft an einen azyklischen Linker. Unten: repräsentative Fluoreszenz- (links) und Absorptionsspektren (rechts) eines DNA-Doppelstrangs mit **TO** und **TR** als Energietransfer-Paar.

Die Einflüsse von Orientierung, Umgebung und Abstand der Fluorophore wurden von *Wagenknecht et al.* ausführlich untersucht.^[38,41] Dadurch konnte eine Optimierung des Rot-zu-Grün(R/G)-Verhältnisses von 6 : 1 auf 20 : 1 erzielt werden.^[38,40] Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass excitonische Wechselwirkungen zwischen **TO** und **TR** einen großen Einfluss auf den Energietransfer nehmen und mit diesem konkurrieren. Werden **TO-TR**-Grundzustands-Dimere angeregt, so können diese keinen ET eingehen, da ein effizienter ET eine selektive und selektive Anregung des Donor-Fluorophors voraussetzt.

Anwendungen in der Bioanalytik

Die „DNA/RNA Traffic Lights“ sind ein sehr gutes Werkzeug für bioanalytische Anwendungen. Zur Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen wurden **TO** und **TR** von *Wagenknecht et al.* in diagonaler Orientierung in die Stamm-Region von *Molecular Beacons* integriert. Verglichen mit einem herkömmlichen, literaturbekannten FRET-System, bestehend aus Fluorescein und Rhodamin, konnte der sogenannte Verstärkungsfaktor f ,^[42] das Verhältnis

aus dem Fluoreszenzverhältnis I_D/I_A in geöffnetem und geschlossenem Zustand ($[I_D/I_A]_{\text{geöffnet}} : [I_D/I_A]_{\text{geschlossen}}$), von 3.9 auf 34 gesteigert werden.^[40,43]

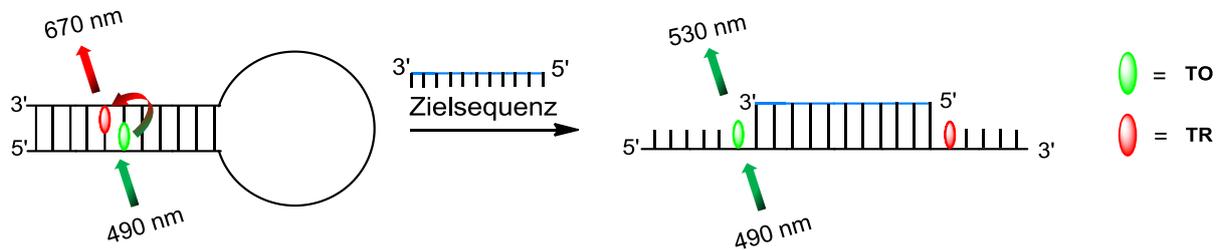


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines *Molecular Beacons* mit **TO** und **TR** in der Stamm-Region. Links: geschlossener MB. Rechts: geöffneter MB nach Zugabe der Zielsequenz. Abbildung aus [44].

Eine weitere bioanalytische Anwendung ist die Verwendung von **TO** und **TR** im adenosinbindenden Aptamer.^[38,40,45] Das ET-Paar wurde als Basensurrogate in zwei nur teilweise komplementäre DNA-Einzelstränge eingebaut, die nur nach Zugabe des Zielmoleküls Adenosin eine Duplex-Struktur ausbilden können (s. Abbildung 11).

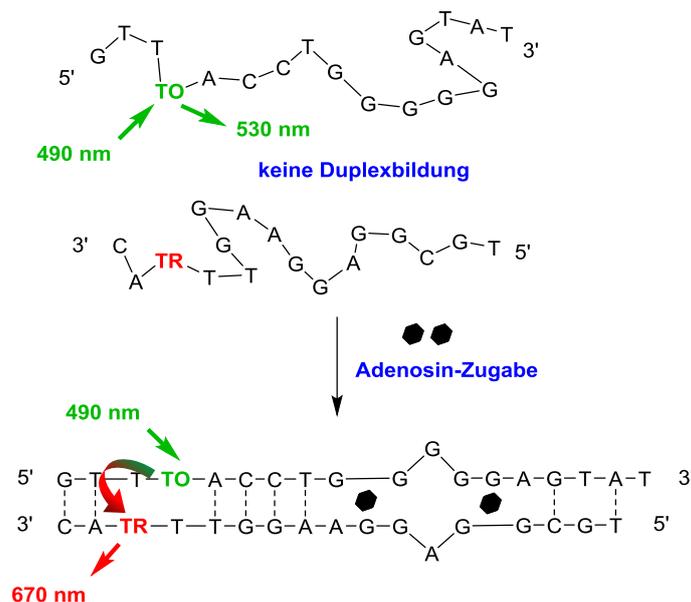


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines adenosinbindenden Aptasensors mit **TO** und **TR** als Energietransfer-Paar.

Nach Zugabe von Adenosin befinden sich **TO** und **TR** somit in räumlicher Nähe und können einen Energietransfer eingehen. Das heißt die Detektion des Zielmoleküls wird durch eine rote Fluoreszenz angezeigt (I_D/I_A 1 : 4.8). Ist kein Adenosin vorhanden, so zeigt der Aptasensor fast ausschließlich die grüne Fluoreszenz des Donors (I_D/I_A 1 : 0.6; $f = 8.06$).

Das adenosinbindende Aptamer ist ebenfalls Gegenstand dieser Dissertation, weshalb seine Struktur und Funktionsweise in Kapitel 5.1 noch einmal genauer beschrieben wird.

Ein letztes Beispiel für den Einsatz der „*Traffic Lights*“ in bioanalytischen Anwendungen ist die Übertragung des Konzepts auf RNA („*RNA Traffic Lights*“), genauer gesagt auf sogenannte *small interfering RNA* (siRNA).^[39,40] siRNAs sind kurze 21 Basen lange RNA-Duplexe, die spezifisch an eine mRNA binden und dadurch deren Funktion und die Produktion des darauf codierten Proteins unterbinden.^[46,47] **TO** und **TR** wurden als Basensurrogate in die für die Regulation des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) spezifische RNA-Sequenz integriert. Die wellenlängenverschiebenden siRNAs wurden anschließend in CHO-K1-Zellen transfiziert und ihr Verhalten innerhalb der Zelle und ihre Fähigkeit zur GFP-Regulation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.^[39]

Die Verwendung von Energietransfer-Paaren in siRNAs zur bildgebenden Nachverfolgung der Genregulation ist ebenfalls Bestandteil dieser Doktorarbeit. In Kapitel 4 wird deshalb das Funktionsprinzip von siRNAs sowie die Verwendung von ET-Paaren in siRNAs ausführlicher behandelt.

2.2.3 Neue photostabile Cyaninfarbstoffe für wellenlängenverschiebende Nukleinsäure-Sonden

Molekulare Bildgebung in Zellen ist ein stetig wachsendes Gebiet der heutigen Forschung.^[48] Vor allem die Echtzeit-Verfolgung von Biomolekülen in ihrer natürlichen Umgebung innerhalb der Zelle steht dabei im Mittelpunkt. Neue hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie-Methoden leisten einen großen Beitrag bei der Aufklärung von Zellprozessen.^[49,50] Die größte Herausforderung stellt jedoch der Entwurf und die Synthese von geeigneten, hellen und insbesondere photostabilen Farbstoffen für die molekulare Bildgebung dar.^[51,52]

Die zuvor vorgestellten „*DNA/RNA Traffic Lights*“ besitzen nur sehr kleine Fluoreszenz-Halbwertszeiten $t_{1/2}$ (**TO** = 32 min; **TR** = 7 min) und damit auch nur eine sehr geringe Photostabilität.^[53] Diese Tatsache macht die Beobachtung der bereits beschriebenen Sonden mittels Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie praktisch unmöglich. *Wagenknecht et al.* haben sich diesem Problem angenommen und ein großes Spektrum an photostabilen Cyaninfarbstoffen synthetisiert, deren Fluoreszenz-Halbwertszeiten zwischen 11 und 636 min liegen.^[54] Diese

Farbstoffe besitzen Azid-Funktionen, die eine postsynthetische Modifikation alkinmodifizierter DNA-Stränge mittels kupfer(I)katalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition, allgemein auch als „Click“-Reaktion bekannt, ermöglichen. Diese Art der postsynthetischen Markierung bietet einige Vorteile gegenüber dem Einbau der Farbstoffe während der Oligonukleotid-Synthese, wie für **TO** und **TR** beschrieben. Dies sind zum einen der Verzicht auf die zeitaufwändige Synthese der Phosphoramidit-Bausteine sowie deren lange Kupplungszeiten während der Festphasen-Synthese und zum anderen die Erhöhung der Ausbeuten an fluoreszenzmarkierter DNA. Die Donor- und Akzeptor-markierten DNA-Stränge wurden miteinander kombiniert und lieferten Energietransfer-Paare mit herausragenden optischen Eigenschaften und Kontrastverhältnissen von bis zu 133 : 1.^[53,55]

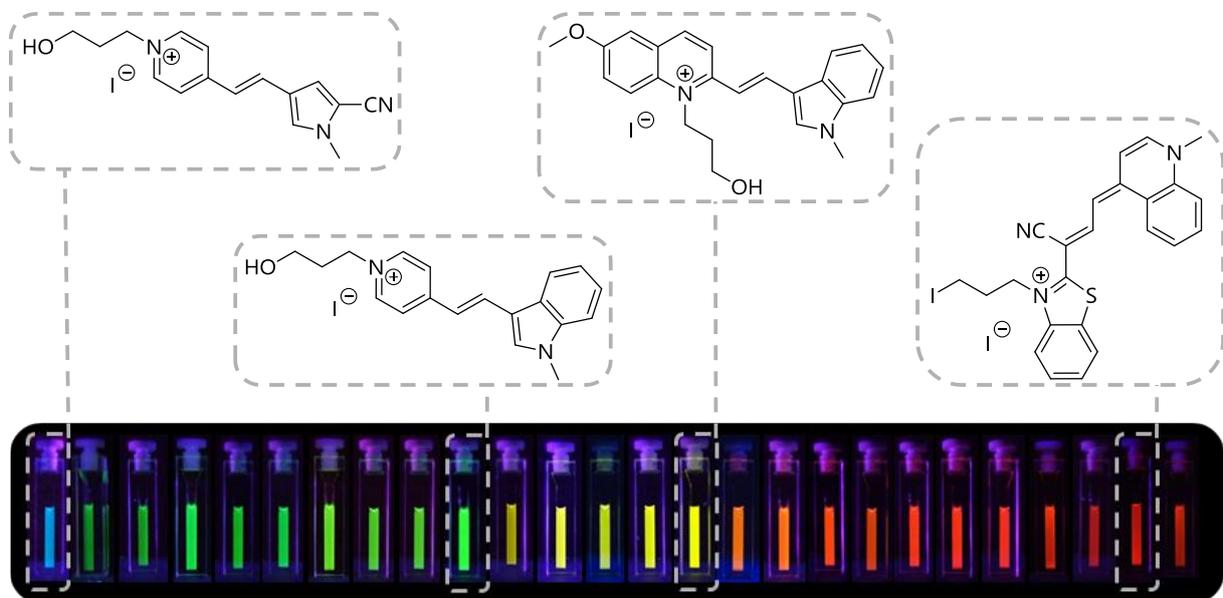


Abbildung 12: oben: Ausgewählte Strukturen der von *Wagenknecht et al.* synthetisierten photostabilen Cyaninfarbstoffe; unten: Fluoreszenzfarben der entwickelten Farbstoffe. Abbildung entnommen aus [55].

Die postsynthetische Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden mittels kupfer(I)-katalysierter „Click“-Reaktion limitiert die Anwendungen nicht nur auf einfach modifizierte Sonden. Wird die „Click“-Reaktion auf der festen Phase durchgeführt, kann die Oligonukleotid-Festphasensynthese anschließend fortgesetzt werden, wodurch auch mehrfach modifizierte Oligonukleotide synthetisch zugänglich sind. Somit ist es möglich, zwei azidfunktionalisierte Farbstoffe in wellenlängenverschiebende *Molecular Beacons* zu integrieren. Dies wurde erfolgreich im Arbeitskreis *Wagenknecht* durchgeführt. Sie knüpften zwei ET-Paare mit unterschiedlichen Farbwechseln (blau/gelb & grün/rot) an *MBs* und waren damit in der Lage, zwei unterschiedliche RNA-Sequenzen (miRNA-21 & miRNA-31) simultan zu detektieren.^[56]

miRNA-21 und miRNA-31 sind kurze nicht-codierende RNAs, die vor allem in kolorektalen Karzinomen (Darmkrebs) überexprimiert werden und deshalb von großem wissenschaftlichen Interesse sind.^[57] *Wagenknecht et al.* untersuchten das Verhalten der *MBs in vivo* und konnten die beiden miRNAs erfolgreich nebeneinander in Krebszellen detektieren und lokalisieren.^[56]

2.3 Postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren

Eine ortsspezifische Markierung, speziell die Fluoreszenzmarkierung, ist unentbehrlich bei der Synthese von Nukleinsäuren für bioanalytische und diagnostische Anwendungen sowie der molekularen Bildgebung. Viele der kommerziell erhältlichen Fluorophore können während der DNA-Synthese eingeführt werden. Hierfür muss der Fluoreszenzfarbstoff als Phosphoramidit-Baustein zugänglich sein, den harschen Bedingungen des DNA-Synthese und -Aufarbeitung standhalten und ausreichend hohe Ausbeute an fluoreszenzmarkierter DNA bzw. RNA liefern.^[58] Viele organische Fluorophore tolerieren jedoch keine sauren oder basischen Bedingungen, weshalb auf postsynthetische Anknüpfungsmethoden zurückgegriffen werden muss.

Bei der postsynthetischen Modifikation von Oligonukleotiden wird während der Synthese eine reaktive Gruppe eingebaut, an die, nach der Abspaltung von der festen Phase, das Fluorophor geknüpft wird. Postsynthetische Reaktionen müssen jedoch gewisse Bedingungen erfüllen. Sie müssen spezifisch und bioorthogonal ablaufen und vor allem unter milden Bedingungen durchführbar sein. Die immer wachsende Nachfrage an speziell für gewisse Anwendungen designten Sonden führte dazu, dass in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielzahl an postsynthetischen Markierungs-Methoden entwickelt und in der Nukleinsäurechemie etabliert wurden. Hierzu zählen unter anderem die Reaktion von Thiolen mit Maleimid-Funktionen oder aktivierten Disulfiden, die Verknüpfung von *N*-Hydroxysuccinimid-Estern mit nukleophilen Aminen oder die Markierung mittels [4+2]-Cycloadditionen (Diels-Alder-Reaktion). Abbildung 13 zeigt eine kleine Übersicht über die heutzutage gängigsten Methoden.^[58]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verwendeten Fluoreszenz-Sonden ausschließlich mittels kupfer(I)katalysierter „Click“-Reaktion markiert. Deshalb wird diese im nachfolgenden Kapitel ausführlicher betrachtet.

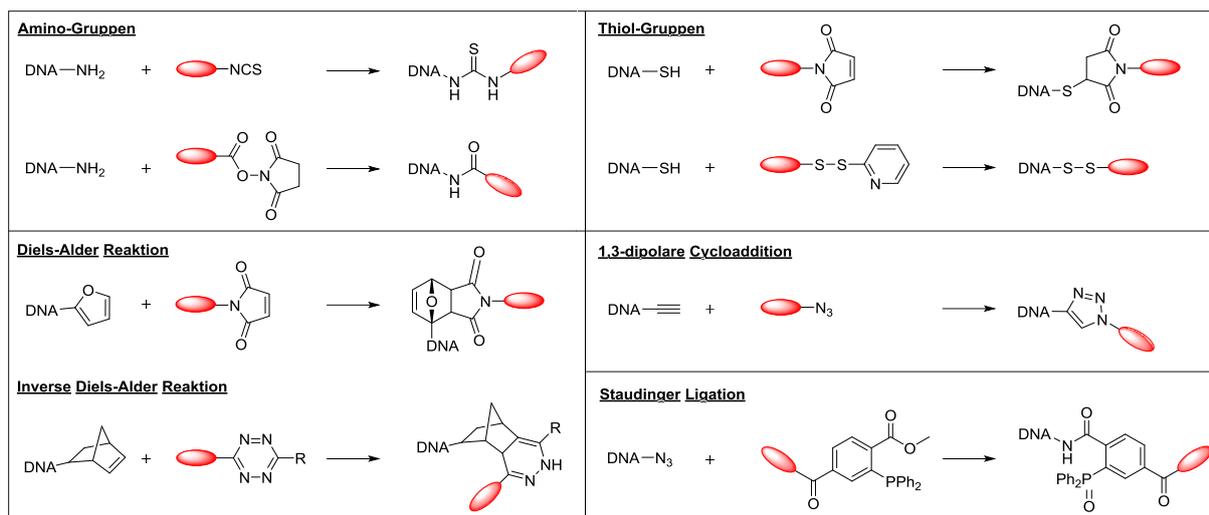


Abbildung 13: Überblick über einige Methoden zur postsynthetischen Modifizierung von DNA. [58,59]

2.3.1 „Click“-Chemie

Der Begriff der „Click“-Chemie wurde im Jahr 2001 von *Sharpless* im Zuge seiner Forschung auf dem Gebiet der 1,3-dipolaren Cycloadditionen geprägt.^[60] In diesem Begriff vereint er Reaktionen, die nach dem Baukastenprinzip mit verschiedenen Bausteinen kombiniert werden können, einen weiten Anwendungsbereich umfassen, sehr hohe Ausbeuten besitzen, stereospezifisch ablaufen und vor allem nur wenig bzw. unschädliche Nebenprodukte generieren, die leicht vom Produkt abtrennbar sind. Im Weiteren sollten die Reaktionen unter milden (im wässrigen Medium, neutraler pH, Raumtemperatur) und nicht-empfindlichen (nicht hydrolyse- und oxidations-empfindlich) Reaktionsbedingungen durchgeführt werden können.

Der Prototyp einer solchen „Click“-Reaktion ist die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen, die bereits Ende der 1950er von *Huisgen* als vielversprechende Reaktion beschrieben wurde. Jedoch erst durch die von *Sharpless*^[61] und *Meldal*^[62] erstmals beschriebenen kupfer(I)katalysierten Variante werden die oben aufgeführten Kriterien für eine „Click“-Reaktion erfüllt. Die Reaktion ist dadurch bei Raumtemperatur durchführbar und liefert ausschließlich das 1,4-substituierte Produkt.

Der Mechanismus der kupfer(I)katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen (CuAAC) wurde sehr ausführlich untersucht und kann vereinfacht, wie in Abbildung 14 zu sehen, dargestellt werden. Dieser beginnt mit der Koordination der Kupfer(I)-Spezies an die

20|

Dreifachbindung des terminalen Alkins (s. Abbildung 14 oben links), was zur Schwächung der C-H-Bindung führt. Anschließend ist eine zweite Kupfer(I)-Spezies in der Lage das terminale Alkin zu deprotonieren. Das gebildete Kupferacetylid wird daraufhin vom Azid koordiniert und bildet über eine 6-gliedrige Zwischenstufe und nachfolgender Hydrolyse das gewünschte 1,2,3-Triazol.

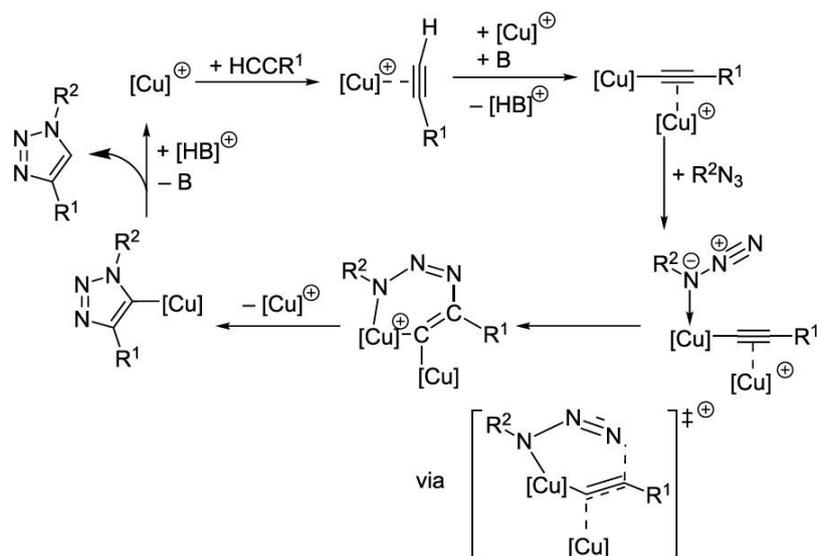


Abbildung 14: Postulierter Mechanismus der kupfer(I)katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition (CuAAC) basierend auf DFT-Rechnungen der Arbeitsgruppe *Fokin* und *Straub*.^[63,64]

Azid- sowie Alkin-Funktionen sind im Organismus nicht vorhanden und sind daher ausgezeichnet für die bioorthogonale Modifizierung von Biomolekülen geeignet. Darüber hinaus sind die gebildeten Triazole unter physiologischen Bedingungen extrem stabil und nicht toxisch.^[65] Die Anwendung der CuAAC zur Markierung von Oligonukleotiden war jedoch zunächst nicht möglich, da Kupfer(I) bekannt dafür ist DNA und RNA zu oxidieren und Strangbrüche zu induzieren.^[66] Abhilfe schaffte hierbei die Verwendung von chelatisierenden Liganden wie beispielsweise TBTA (Tris(benzyltriazolylmethyl)amin; s. Abbildung 15 links) oder dessen besser wasserlösliche Variante THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin; s. Abbildung 15 rechts). TBTA ist in der Lage, das Kupfer(I)-Ion komplett abzuschirmen und lässt dadurch keine freie Bindungsstelle für destabilisierende Wechselwirkungen.^[67] Zusätzlich erhöht der chelatisierende Ligand aufgrund der koordinierenden Stickstoffe die Elektronendichte des Metalls und beschleunigt dadurch die Reaktion.^[67]

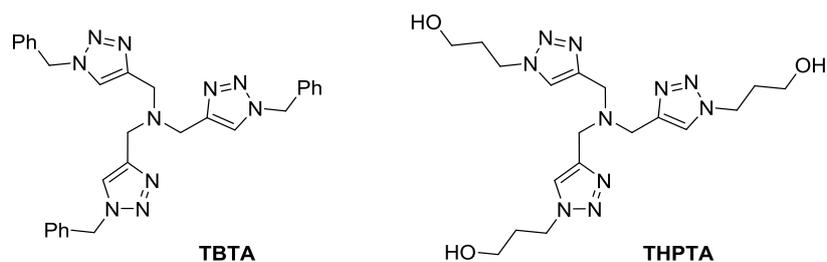


Abbildung 15: Chelatisierende Liganden zur Stabilisierung der Kupfer(I)-Spezies und Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der CuAAC. Links: Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA). Rechts: Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA).

Die kupfer(I)katalysierte „Click“-Reaktion ist eine der wichtigsten Methoden zur postsynthetischen Modifikation von Nucleinsäuren, weshalb eine Vielzahl an alkinfunktionalisierten Bausteinen für die Oligonucleotid-Synthese entwickelt wurden.

Carell et al. synthetisierten alkinmodifizierte 2'-Desoxyuridine, die eine ortsspezifische Markierung innerhalb eines Oligonucleotids ermöglichen. Sie synthetisierten die dazugehörigen Phosphoramidite und integrierten die Alkin-Bausteine mittels Festphasen-Synthese in DNA.^[68] Sie variierten die Länge der Linker zwischen Farbstoff und DNA, um eine sterische Hinderung während der „Click“-Reaktion zu umgehen (s. Abbildung 16 **1a** & **1b**). Außerdem konnten sie zeigen, dass die von ihnen entwickelten alkinfunktionalisierten Nucleoside auch von Polymerasen toleriert werden und mittels PCR in DNA eingebaut werden können.^[69]

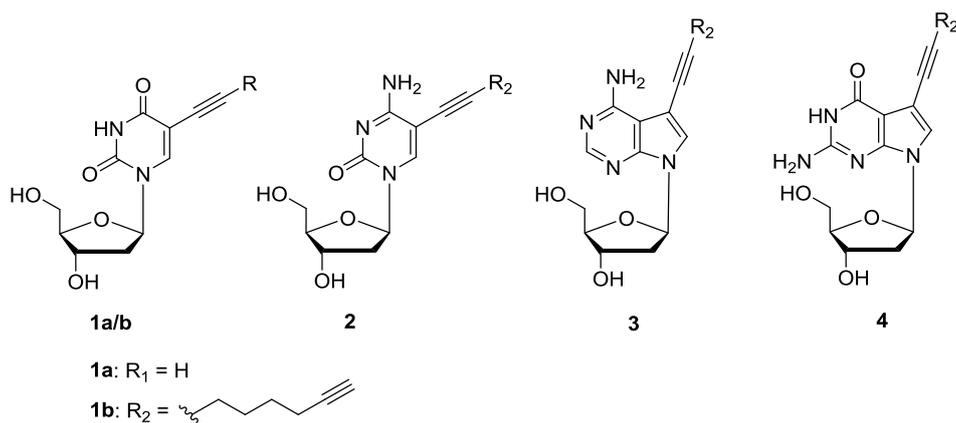


Abbildung 16: Alkin-modifizierte Nucleoside der Arbeitsgruppen *Carell*^[69] (**1a** & **1b**) und *Seela*^[70] (**2**, **3** & **4**) für die postsynthetische „Click“-Reaktion an DNA.

Die Arbeitsgruppe *Seela* lieferte ebenfalls einen großen Beitrag bei der Entwicklung von „Click“-Nukleosiden. Sie vervollständigten das genetische Alphabet durch die Synthese der alkinfunktionalisierten Nukleoside **2**, **3** und **4**.^[70]

Die Modifizierung der DNA an den Basen führt oft zur Destabilisierung des DNA-Duplexes, da aufgrund des angeknüpften Chromophors die Basenpaarung erschwert wird. *Wagenknecht et al.* verwendeten deshalb Nukleoside, die die Alkin-Funktion an der 2'-Position des Zuckers tragen.^[53,71,72] Dies bringt den Vorteil, dass die Basenpaarung erhalten bleibt und sich die Farbstoffe innerhalb der großen Furche ausrichten können. Dies ermöglicht für FRET-Anwendungen eine optimale Ausrichtung der Donor- und Akzeptorfluorophore. In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* werden ebenfalls azyklische Alkin-Linker (**cL**), basierend auf (*S*)-2-Amino-1,3-propandiol, eingesetzt, die eine Fluoreszenzmarkierung innerhalb eines Oligonukleotids ermöglichen. Das Fehlen des Nukleosids soll, wie bereits zuvor für **TO** und **TR** berichtet, eine Interkalation der Fluorophore ermöglichen.^[71,73]

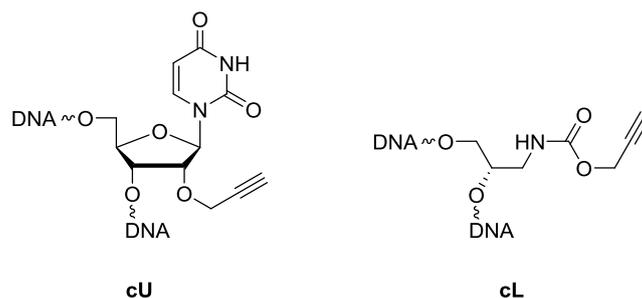


Abbildung 17: Alkin-funktionalisierte Oligonukleotid-Bausteine. rechts: 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**); links: azyklischer, alkin-funktionalisierter (*S*)-2-Amino-1,3-propandiol-Linker (**cL**).

Einfachmarkierung von Oligonukleotiden kann mit Hilfe der „Click“-Reaktion einfach bewerkstelligt werden. Heutzutage werden jedoch vermehrt Fluoreszenzsonden benötigt, die zwei oder sogar mehr Farbstoffe tragen. Um dies realisieren zu können, muss in der Regel auf orthogonale Konjugations-Methoden zurückgegriffen werden. *Carell et al.* entwickelten ein Konzept aus mehreren unterschiedlich geschützten Alkinen, die sequenziell entschützt und direkt darauf mit einem Azid „geclickt“ werden können.^[74] Mit diesem Ansatz ist es möglich, bis zu drei unterschiedliche Marker in einen DNA-Strang zu integrieren.

Eine anhaltende Debatte in der heutigen Forschung ist die Verwendung von Kupfer im Zusammenhang mit Zellexperimenten. Kupfer hat aufgrund seiner Fähigkeit, die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies zu katalysieren, eine hohe Toxizität, inhibiert die Zellteilung und

verursacht Zelltod.^[75–79] *Finn et al.* konnten jedoch zeigen, dass durch die Komplexierung des Kupfers durch TBTA die Fluoreszenzmarkierung mittels kupfer(I)katalysierter „Click“-Reaktion möglich ist und kein Sterben der Zellen erfolgt.^[79] Trotzdem liegt ein großes Augenmerk auf der Entwicklung neuartiger kupferfreier Konjugations-Methoden. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die ringspannungsgesteuerte Variante der Azid-Alkin-Cycloaddition. Inspiriert von *Wittig* und *Krebs*, die bereits 1961 von der „explosionsartigen“ Reaktion von Cyclooctin mit Phenylazid berichteten,^[80] entwickelten *Bertozzi et al.* eine kupferfreie Variante der „Click“-Reaktion, in der die hohe Ringspannung des Cyclooctins für den Antrieb der Reaktion ausgenutzt wird.^[75,81] Weitere Vertreter der metallfreien Biokonjugations-Methoden^[75,82] sind die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf^[83] und die sogenannte „Photoclick“-Reaktion zwischen substituierten Tetrazolen und elektronenarmen Doppelbindungen.^[84]

Kupferfreie Varianten sind optimal geeignet, um bestimmte Bestandteile innerhalb einer Zelle sichtbar zu machen. Sollen jedoch Fluoreszenzsonden eingesetzt werden, die FRET-Systeme enthalten, so bringen die kupferfreien Methoden einige Nachteile mit sich.

Einige der vorgestellten Methoden, wie zum Beispiel die ringspannungsgesteuerte Cycloaddition mit Cyclooctin, verlaufen nicht regioselektiv, sodass zwei unterschiedliche Isomere entstehen können, die sich während eines Energietransfers unterschiedlich verhalten. Im schlechtesten Fall ist eines der beiden Regioisomere aufgrund der Orientierung des Fluorophores überhaupt nicht in der Lage einen Energietransfer einzugehen. Ein weiteres Problem stellt die Größe der Anknüpfungsstellen dar. In der Regel sind dies große Ringsysteme, die die Geometrie und sogar die Funktion und Aktivität des betrachteten Biomoleküls beeinträchtigen können. All diese Gründe machen die CuAAC weiterhin zu einer der beliebtesten Markierungsmethoden für die Synthese von Fluoreszenzsonden.

3 Neuer arabinokonfigurierter 2'-„Click“-Baustein

Die Effizienz eines Energietransfers ist, wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, von vielen Faktoren abhängig. Hierbei sind vor allem der Abstand und die Orientierung der beiden Fluorophore zueinander von großer Bedeutung.^[14] Durch die Wahl eines geeigneten Bausteins können Abstand und Orientierung wesentlich beeinflusst und optimiert werden.

Wie zuvor in Kapitel 2.3.1 dargestellt, existiert bereits eine Vielzahl an alkinmodifizierten Bausteinen für die postsynthetische „Click“-Modifizierung von Oligonukleotiden. Das in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* etablierte und kommerziell erhältliche 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**; Abbildung 18) wurde bisher für die Untersuchung von Energietransferpaaren verwendet (s. Kapitel 2.3.1). Die Anknüpfung an der 2'-Position der Ribose führt zu einer Platzierung des Fluorophors in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix (s. Abbildung 19).^[71,72,85,86]

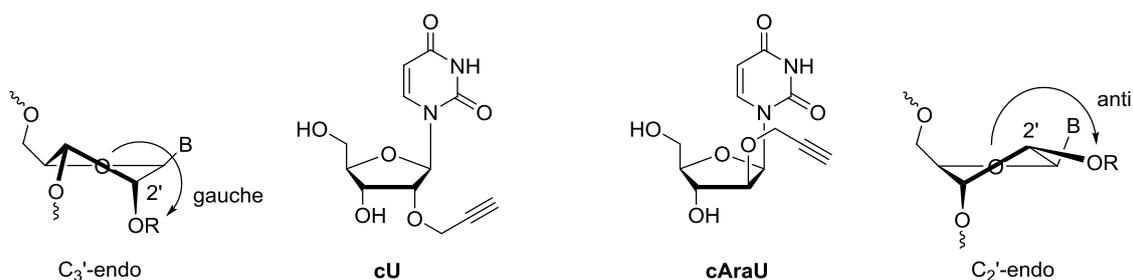


Abbildung 18: Struktur von 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**) und 2'-*O*-Propargyl-arabino-uridin (**cAraU**), sowie die jeweils zugehörige C₃'-endo- und C₂'-endo-Konformation des Ribo- und Arabino-Furanoside.

Bei Betrachtung der dreidimensionalen Struktur einer DNA-Doppelhelix fällt jedoch auf, dass die Positionierung eines Fluorophores in der großen Furche durch die Inversion der Propargyl-Funktion an der 2'-Position des Zuckers ermöglicht werden kann (s. Abbildung 19).^[87] Die große Furche bietet weitaus mehr Platz, wodurch eine optimale Orientierung der Farbstoffe erreicht werden kann und damit auch deren optische Eigenschaften optimiert werden. Ein weiterer Unterschied zwischen Ribo- und Arabino-Konfiguration ist deren Zucker-Konformation. Die Ribose liegt in der C₃'-endo Form vor und ist somit RNA-ähnlich, wohingegen Arabinose eine C₂'-endo Form einnimmt, die der Konformation eines DNA-Zuckers entspricht.^[85,88] Diese wird zusätzlich aufgrund der Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoff-Brücke zwischen dem C₅'-Sauerstoff und der C₂'-Hydroxyl-Gruppe in ihrer Konformation fixiert (s. Abbildung 19; gepunktete Linie).

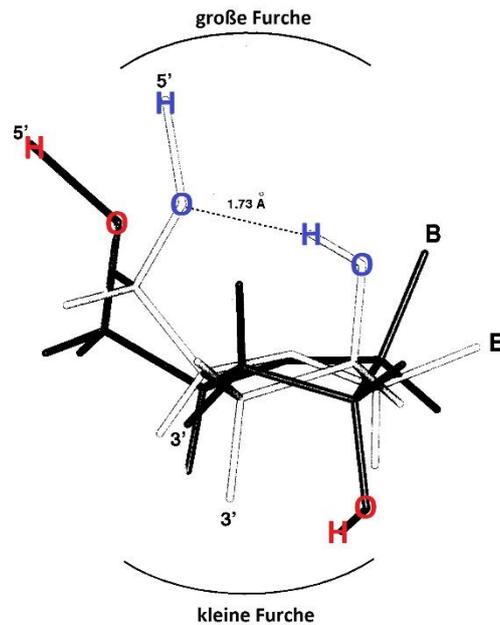
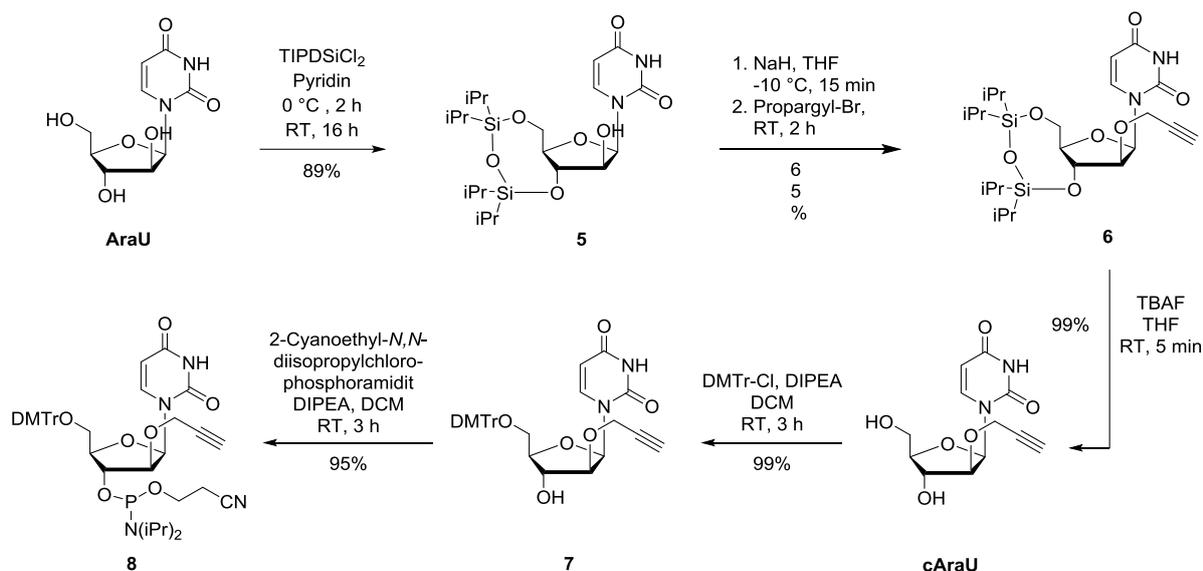


Abbildung 19: Vergleich von Ribo- (schwarz) und Arabino-Konformation (weiß), Andeutung der großen und kleinen Furche sowie der intramolekularen Wasserstoff-Brücke des Arabinose-Zuckers (gepunktete Linie).^[87]

2'-Modifizierte Oligonukleotide, insbesondere arabinokonfigurierte Oligonukleotide, bilden eine wichtige Klasse in der Antisense-Technik zur Regulierung von Genen.^[89] Die Attraktivität von Arabino-Oligonukleotiden beruht hauptsächlich auf ihrer Resistenz gegenüber Nukleasen, welche aufgrund der invertierten 2'-Hydroxylgruppe auftritt, und der Fähigkeit gleichzeitig ihre Aktivität beizubehalten.^[90] Die meisten Substitutionen an der C_{2'}-Position resultieren in einer C_{3'}-endo Konformation des Zuckers, die dann in einer RNA-ähnlichen A-Helix resultiert. Antisense-RNA-Hybride werden nicht von dem für die Genregulierung essentiellen Enzym RNase H erkannt. Dieses Enzym bindet nur dann an die kleine Furche, wenn diese die Größe eines DNA-RNA-Hybrids aufweist.^[87] Arabino-Oligonukleotide besitzen eine C_{2'}-endo-Konformation und bilden somit eine DNA-ähnliche B-Helix aus. Diese formt zusammen mit RNA stabile Hybride, die von RNase H erkannt werden und zur Spaltung der gewünschten RNA führen.^[87]

3.1 Synthese des cAraU-Bausteins

Um die Auswirkung der veränderten Positionierung der Fluorophore auf den Energietransfer zu untersuchen, wurde das 2'-*O*-propargylmodifizierte Uridin (**cAraU**, s. Schema 1) synthetisiert. Um dieses später mittels Festphasensynthese in DNA zu integrieren, wurde der Phosphoramidit-Baustein **8** ausgehend vom kommerziell erhältlichen 1-β-D-Arabinofuranosyl-uracil (**AraU**) in fünf Synthesestufen hergestellt.



Schema 1: Synthese des 2'-*O*-Propargyl-modifizierten Uridins (**cAraU**).

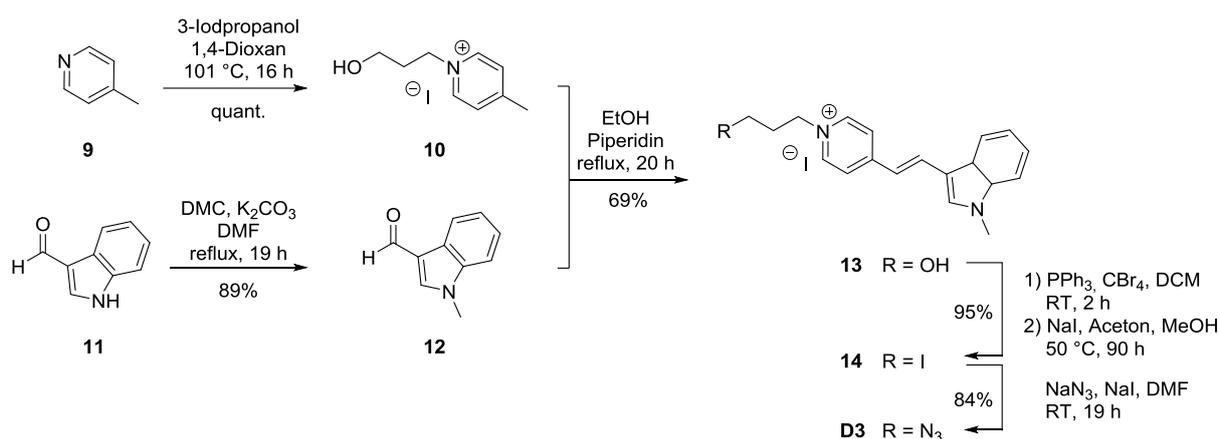
Im ersten Schritt wurden die 3'- und 5'-OH-Gruppen von **AraU** selektiv unter Verwendung des Markiewicz-Silylethers (1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan) geschützt.^[91,92] Danach erfolgte als zentraler Schritt der Synthesesequenz die Anknüpfung der, für die „Click“-Reaktion benötigten Alkin-Gruppe an die 2'-OH Gruppe des Zuckers. Hierbei wurde zunächst die Hydroxyl-Gruppe mittels Natriumhydrid (NaH) deprotoniert und anschließend mit Propargylbromid versetzt, welches in einer nukleophilen Substitution zum gewünschten Produkt **6** reagierte. Durch die Verwendung von NaH als Base anstatt der laut Literatur für die Synthese von **cU** verwendeten sehr starken, nicht-nukleophilen Phosphazenenbase BEMP (2-*tert*-Butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-diazaphosphorin)^[93] konnte auf die Einführung der Pivaloyloxymethyl-Schutzgruppe (POM) an der N3-Position des Uridins verzichtet werden. Die Substitution am N3-Stickstoff wurde nicht beobachtet. Im nächsten Syntheseschritt wurde die Silylschutzgruppe mit TBAF entfernt, um den alkinmodifizierten Zucker **cAraU** mit nahezu quantitativer Ausbeute zu erhalten. Anschließend wurde die 5'-OH-

Position mit der, für die Oligonukleotid-Festphasensynthese erforderlichen, 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) versehen (**7**) und der Phosphoramidit-Baustein **8** durch Umsetzung von **7** mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit dargestellt.

Der Baustein **8** konnte mit einer Gesamtausbeute von 54% über fünf Synthesestufen hinweg synthetisiert werden. Zusätzlich konnte aufgrund der Verwendung von NaH anstelle der kostenintensiven Phosphazenenbase BEMP die Synthesesequenz im Vergleich zum literaturbekannten **cU**-Phosphoramidit-Baustein um einen Schritt verkürzt werden.

3.2 Synthese der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **D3** und **A4**

Das Energietransfer-Paar, bestehend aus den Cyanin-Styryl-Farbstoffen **D3** und **A4**, welches für die Modifikation der Fluoreszenzsonden benötigt wird, wurde anfänglich nach einer im Arbeitskreis *Wagenknecht* entwickelten Syntheseroute synthetisiert (s. Schema 2 beispielhaft für Donorfluorophor **D3**).^[55] Bei dieser Vorgehensweise wurden zunächst die beiden aromatischen Systeme des Cyanin-Styryl-Farbstoffs alkyliert und anschließend in einer Knoevenagel-Kondensation zum Fluorophor **13** verknüpft. Die für die postsynthetische Modifikation benötigte Azid-Funktion konnte über zwei Synthesestufen eingefügt werden. Hierfür wurde die Hydroxy-Gruppe zuerst in einer Kombination aus Appel- und Finkelstein-Reaktion in das Iodid **14** überführt. Im finalen Schritt wurde das Iodid unter Verwendung von Natriumazid durch ein Azid (**D3**) substituiert. Der Akzeptorfarbstoff **A4** wurde analog zur Syntheseroute von **D3** synthetisiert.



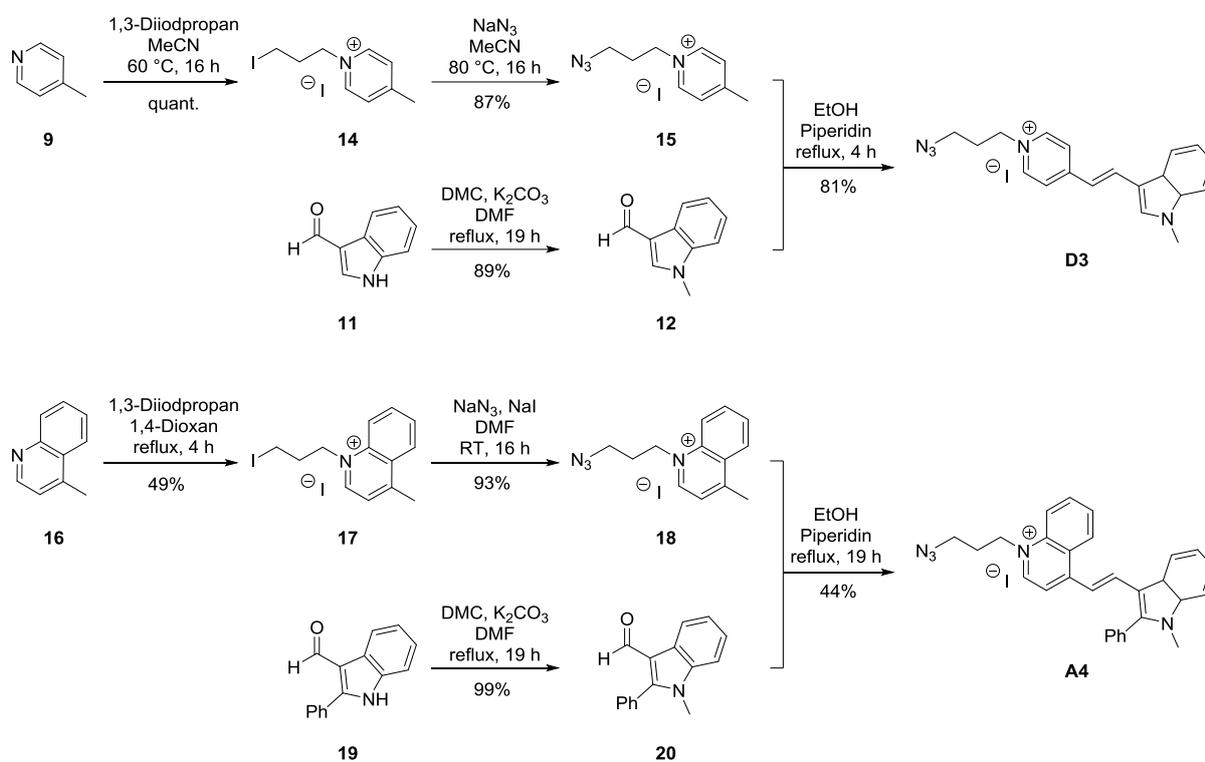
Schema 2: Ursprüngliche Syntheseroute des Cyanin-Styryl-Farbstoffs **D3**.

Bei dieser Syntheseroute bereitete die Bildung des Iodids (**14**) die größten Probleme. Das in der Reaktion als Nebenprodukt entstehende Triphenylphosphinoxid ließ sich nur schwer abtrennen, was mehrere Kristallisationsschritte erforderlich machte. Weiterhin verlief die Finkelstein-Reaktion zur Bildung des Iodids aus dem zuvor *in situ* generierten Bromid oft nicht quantitativ, was zu Mischungen aus Bromid- und Iodid-Spezies führte.

Die ursprüngliche Synthesesequenz ließ sich jedoch optimieren, indem 4-Picolin (**9**) bzw. 4-Methylchinolin (**16**) direkt mit 1,3-Diodopropan alkyliert und anschließend in die Azide **15** und **18** überführt wurden (s. Schema 3). Die Methylierung der Aldehyde **11** und **19** sowie die Kupplung der beiden aromatischen Systeme erfolgten analog zur ursprünglichen

Syntheseroute. Somit konnte die Synthesesequenz um einen Schritt verkürzt und die Gesamtausbeute für den azidmodifizierten Donorfluorophor **D3** von 55 % auf 70 % erhöht werden. Die Gesamtausbeute für den Akzeptorfluorophor **A4** konnte im Vergleich zur alten Syntheseroute nicht gesteigert werden und beträgt 20 % (alte Syntheseroute: 61 %).

Die neu erarbeitete Synthesestrategie bringt einen weiteren Vorteil mit sich. Die Fluorophore lassen sich hiermit nach dem Baukasten-Prinzip aufbauen. Es kann nun jedes beliebige Azid mit jedem beliebigen Aldehyd kombiniert werden und somit eine große Bibliothek an Fluorophoren generiert werden.



Schema 3: Neu entwickelte Route für die Synthese der Farbstoffe **D3** und **A4**. Oben: Syntheschema für **D3**; unten: Syntheschema für **A4**.

3.3 cAraU in DNA

Der Phosphoramidit-Baustein **8** wurde mittels automatisierter DNA-Festphasensynthese in zwei unterschiedliche DNA-Stränge (**DNA1a** und **DNA2a**; a = Arabino) unter Anwendung einer leicht erhöhten Kupplungszeit (10 min) eingebaut. Die Sequenzen entsprechen den von *P. Bohländer* verwendeten DNA-Strängen zur Untersuchung von Energietransferpaaren^[55] (Anknüpfung an **cU**), um später einen direkten Vergleich zwischen **cU**- und **cAraU**-modifizierten DNA-Sonden zu ermöglichen.

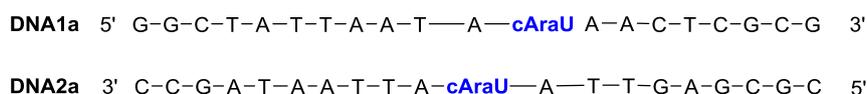
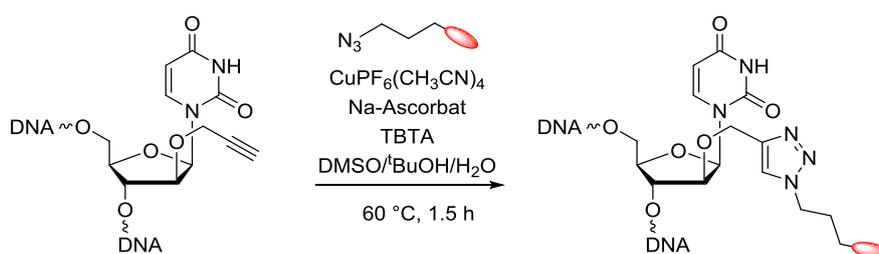


Abbildung 20: Sequenzen von **DNA1a** und **DNA2a**.

Nach Abspaltung von der festen Phase sowie der Entschützung der exozyklischen Aminschutzgruppen unter basischen Bedingungen erfolgte die postsynthetische kupfer(I)-katalysierte „Click“-Reaktion mit den azidmodifizierten Donorfarbstoffen **D1** – **D4** und den Akzeptorfarbstoffen **A1** – **A5** (Reaktionsbedingungen siehe Schema 4). Hierbei wurde **DNA1a** jeweils mit einem der Donorfarbstoffe (**D**) und **DNA2a** mit den Akzeptorfarbstoffe (**A**) verknüpft (s. Abbildung 21). Die Azide der Farbstoffe **D3** und **A4** wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben synthetisiert. Die Azide der Farbstoffe **D1**, **D2** und **D4** sowie **A1** – **A3** und **A5** wurden von *P. Bohländer* zur Verfügung gestellt.



Schema 4: Kupfer(I)katalysierte „Click“-Reaktion an **cAraU**-modifizierter DNA.

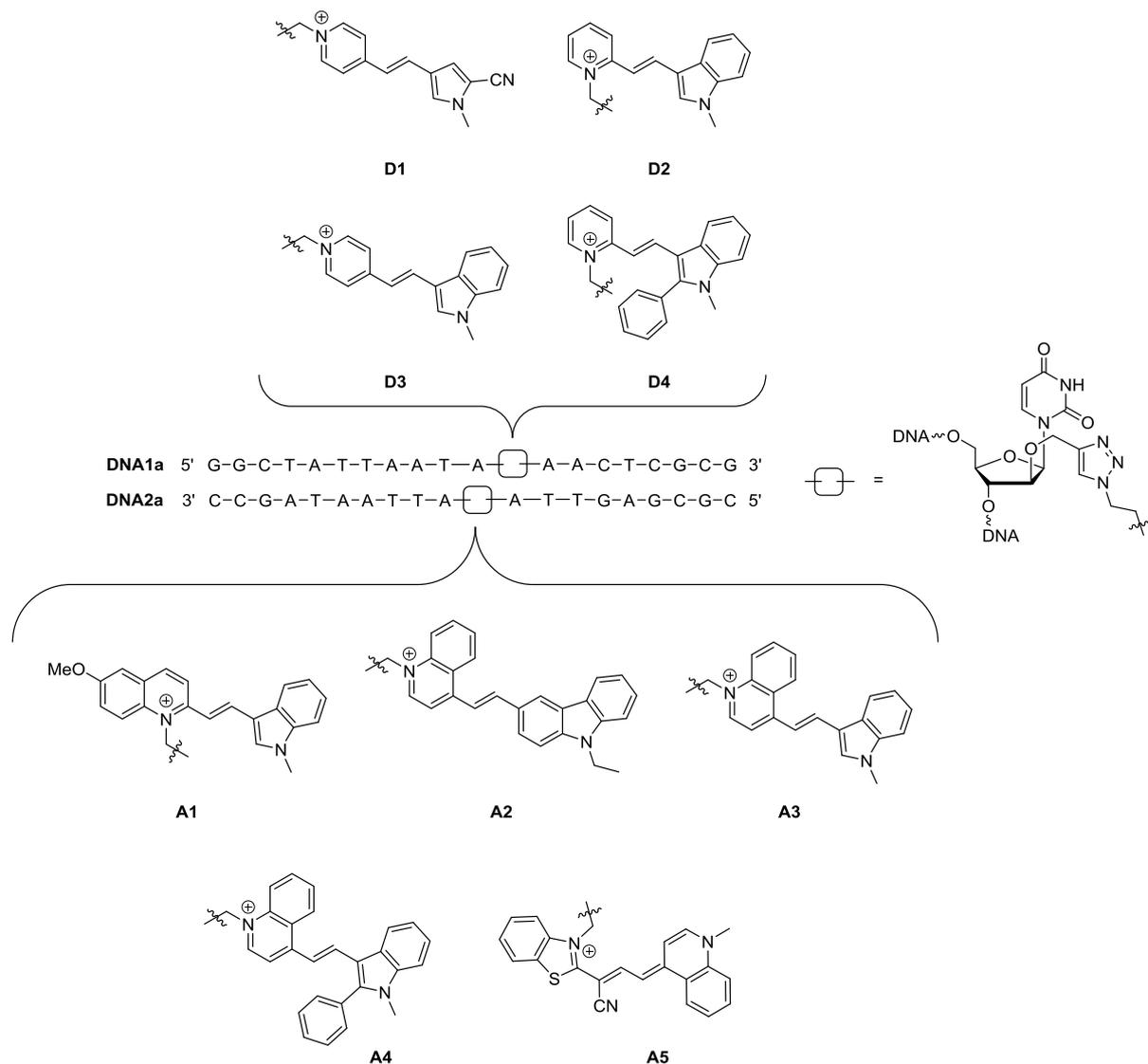


Abbildung 21: Sequenzen der **cAraU**-funktionalisierten DNA-Stränge **DNA1a** und **DNA2a** sowie eine Übersicht über die daran geknüpften Fluorophore. oben: Donorfluorophore **D1 – D4**; unten Akzeptorfluorophore **A1 – A5**.

3.3.1 Charakterisierung der einfach markierten Einzel- und Doppelstränge

Um die genaue Auswirkung des **cAraU**-Bausteins auf die optischen Eigenschaften der Fluorophore zu untersuchen, wurden zunächst die Fluorophore **D1 – D4** und **A1 – A5** einzeln in DNA untersucht. Hierfür wurden Fluoreszenz- und Absorptionsspektren aufgenommen sowie Schmelztemperaturen der Duplexe und Quantenausbeuten gemessen und mit den Daten der **cU**-modifizierten Sonden (**DNA1r-...**; r = Ribo) verglichen.

Der Vergleich von arabino- und ribokonfigurierten donormodifizierten Fluoreszenz-Sonden zeigt im DNA-Einzelstrang (ss) keine signifikanten Unterschiede. Die Fluoreszenz (s. Abbildung 22, links) sowie die Absorption (s. Abbildung 22, rechts) zeigen nahezu identische Maxima und Intensitäten. Lediglich **DNA1a-D3** zeigt eine etwas geringere Fluoreszenzintensität, die durch die geringere Extinktion des Farbstoffs verursacht wird. Die doppelsträngige DNA (ds) zeigt hingegen weitaus größere Unterschiede zwischen **cAraU**- und **cU**-Konfiguration. Die genauere Betrachtung der Fluoreszenzspektren zeigt, dass alle ribokonfigurierten Doppelstränge (**DNA1r-D1 ds – DNA1r D4 ds**) eine niedrigere Fluoreszenzintensität als im Einzelstrang aufweisen. Dieser lösche Effekt ist bei kann durch die erhöhte Wechselwirkung mit den Nukleobasen der dsDNA erklärt werden. Zusätzlich hat der Fluorophor im Doppelstrang eine eindeutig stärker exponierte Position als im undefinierten Einzelstrang und ist somit mehr Molekülstößen ausgesetzt, die den Fluorophor rasch wieder in seinen Grundzustand zurückversetzen. Die arabinokonfigurierten Oligonukleotide folgen diesem Trend jedoch nicht einheitlich. **DNA1a-D1 ds** und **DNA1a-D2 ds** zeigen nur eine verschwindend kleinere Emission im Duplex. **DNA1a-D3 ds** und **DNA1a-D4 ds** weisen sogar eine gesteigerte Fluoreszenzintensität auf. Dieses Phänomen kann möglicherweise durch die Art der Fluorophor-Anknüpfung erklärt werden. Wie zuvor beschrieben erfolgt die Platzierung des Fluorophors bei Verwendung von **cU** in Richtung der kleinen Furche der Doppelhelix. Der **cAraU**-Baustein hingegen dirigiert die Farbstoffe in Richtung der großen Furche und lässt ihnen womöglich mehr Platz für eine optimale Orientierung und schirmt sie darin teilweise von der Lösemittelumgebung ab. Dieses Verhalten kann dann zu verminderter Fluoreszenzlöschung führen bzw. sogar eine Steigerung der Fluoreszenz bewirken.

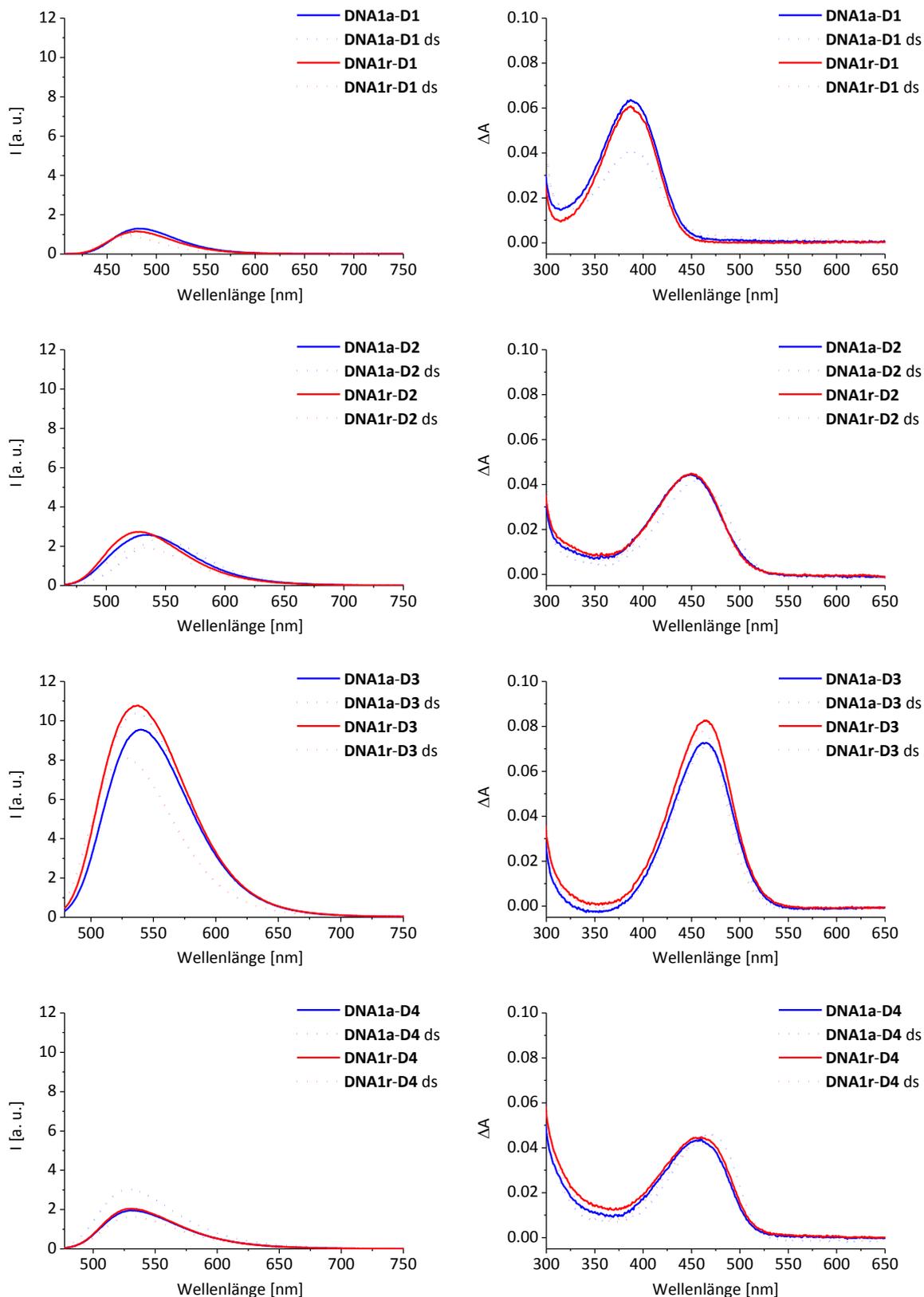


Abbildung 22: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der einfach markierten Einzel- und Doppelstränge (ds) der Donor-Fluorophore **D1 – D4**. **cAraU**-modifizierte DNA-Stränge sind in blau dargestellt, **cU**-modifizierte DNA-Stränge in rot. Verwendete Parameter: $\lambda_{exc} = 391$ nm (**DNA1a-D1**), 450 nm (**DNA1a-D2**), 464 nm (**DNA1a-D3**, **DNA1a-D4**); Spaltbreite: 2/2.

Das bisher beschriebene Verhalten spiegelt sich unmittelbar in den Werten der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F wider. Diese zeigt für einzelsträngige **cAraU**- und **cU**-modifizierte Stränge sehr ähnliche Werte (s. Tabelle 1). Nur, wie bereits zuvor ausgeführt, hat **DNA1a-D3** verglichen mit der Ribo-Konfiguration **DNA1r-D3** eine kleinere Quantenausbeute. Weitaus wichtiger für die später folgenden Energietransfer-Experimente sind jedoch die Werte der Quantenausbeuten im Doppelstrang. Die neue Arabino-Konfiguration zeigt hier gegenüber der bereits bekannten Ribo-Konfiguration für alle Donor-Fluorophore eine gesteigerte Quantenausbeute. Für Farbstoff **D1** konnte durch Wechsel der Anknüpfung von **cU** zu **cAraU** die Quantenausbeute im Doppelstrang 84 % erhöht werden. **D2** zeigt eine Verbesserung um 11 %, **D3** 70 % und **D4** 79 % im Vergleich mit der Ribo-Konfiguration.

Die Verwendung von **cAraU** als Anknüpfungsbaustein und damit die Positionierung der Farbstoffe in der großen Furche der DNA bewirkt nicht nur eine Steigerung der Fluoreszenz, sondern auch eine Verschiebung der Fluoreszenzmaxima hin zu höheren Wellenlängen. Alle **cAraU**-modifizierten Donor-Doppelstränge zeigen verglichen mit dem jeweiligen **cU**-Analogon bathochrom verschobene Maxima. Die größte Verschiebung hat hierbei **DNA1a-D2** ds mit 15 nm.

Tabelle 1: Anregungswellenlänge λ_{exc} , Differenz der Schmelztemperatur (T_m) zum unmodifizierten Duplex sowie Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F im Einzel- (ss) und Doppelstrang (ds) der einfach modifizierten **DNA1a-D1 – D4** und **DNA1r-D1 – D4**.

Farbstoff	λ_{exc} [nm]	DNA1a-...			DNA1r-...		
		ΔT_m [°C]	$\phi_{F, ss}$	$\phi_{F, ds}$	ΔT_m [°C]	$\phi_{F, ss}$	$\phi_{F, ds}$
D1	391	0.7	0.050	0.096	2.0	0.049	0.052
D2	450	3.2	0.158	0.136	4.1	0.147	0.122
D3	464	0.9	0.344	0.452	3.7	0.414	0.266
D4	462	3.2	0.120	0.156	3.0	0.112	0.087

Die Analyse der Schmelztemperaturen zeigt für **cAraU**-modifizierte Sonden einen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen aufgebauten Fluorophoren. Bei den Donor-Fluorophoren **D1** und **D3** ist die Methin-Brücke an der 4-Position des Pyridins angebracht. **D2** und **D4** hingegen sind über die 2-Position des Pyridins mit dem zweiten Heterozyklus verknüpft (s. Abbildung 21). Die 4-verknüpften Farbstoffe **D1** und **D3** zeigen in Verbindung mit der Arabino-Konfiguration kaum eine Erhöhung der Schmelztemperatur und damit auch nur eine geringe Stabilisierung der DNA-Duplexe. Die Markierung der DNA-Stränge erfolgte an der 2'-Position des Zuckers, weshalb angenommen wird, dass die Farbstoffe sich in einer der Furchen ausrichten und es nicht zur Interkalation der Farbstoffe kommt. Eine Duplex-Stabilisierung wird bei einfach modifizierten Sonden somit nur durch Farbstoff-DNA-Wechselwirkungen in den Furchen erreicht. Die Positionierung des Farbstoffs in der kleinen Furche führt aufgrund der geringeren Dimension stets zu einer Stabilisierung des Duplexes (**DNA1r-D1 – DNA1rD4**). Die große Furche hingegen bietet den Farbstoffen mehr Raum, um sich frei zu orientieren. Die Farbstoff-DNA-Wechselwirkungen können dabei minimiert werden, weshalb der Unterschied zwischen 2- und 4-Verknüpfung möglicherweise nur in **cAraU**-modifizierten Oligonukleotiden (**DNA1a-D1 – DNA1aD4**) sichtbar ist.

Die akzeptormarkierten Fluoreszenz-Sonden zeigen für beide Konfigurationen stets eine Fluoreszenzlöschung im Doppelstrang im Vergleich zum Einzelstrang (s. Abbildung 23) und damit ein konträres Bild zu den Donor-Fluorophoren. Primärer Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich die Größe der Akzeptor-Fluorophore, die über weitaus größere Ringsysteme als die Donor-Fluorophore verfügen. Alle Duplexe, bis auf **DNA2a-A5 ds** und **DNA2r-A5 ds**, zeigen bathochrom verschobene Fluoreszenzmaxima in Bezug auf den jeweiligen Einzelstrang. **A5** verfügt jedoch über eine Sonderstellung, da dieser der einzige Vertreter der Cyanin-Farbstoffe ist und nicht, wie **A1** bis **A4**, zu der Klasse der Cyanin-Styryl-Farbstoffen zählt. **DNA2a-A1 ds**, **DNA2a-A2 ds** und **DNA2a-A4 ds** zeigen Maxima, die über 20 nm zu höheren Wellenlängen hin verschoben sind. Wie auch schon für die Donor-Fluorophore beschrieben, weisen die **cAraU**-modifizierten Akzeptor-Doppelstränge im Vergleich zu ihrem **cU**-modifizierten Pendant rotverschobene Fluoreszenzmaxima auf. Die bathochromen Verschiebungen reichen bis zu 27 nm für **DNA2a-A1 ds** und 19 nm für **DNA2a-A2**.

Tabelle 2: Anregungswellenlänge λ_{exc} , Differenz der Schmelztemperatur (T_m) zum unmodifizierten Duplex sowie Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F im Einzel- (ss) und Doppelstrang (ds) der einfach modifizierten **DNA2a-A1 – DNA2aA5** und **DNA2r-A1 – DNA2rA5**.

Farbstoff	λ_{exc} [nm]	DNA2a-...			DNA2r-...		
		ΔT_m [°C]	$\phi_{F, ss}$	$\phi_{F, ds}$	ΔT_m [°C]	$\phi_{F, ss}$	$\phi_{F, ds}$
A1	502	6.1	0.213	0.127	4.8	0.490	0.210
A2	510	2.9	0.323	0.156	6.1	0.563	0.349
A3	520	2.5	0.504	0.223	5.1	0.542	0.360
A4	542	5.5	0.447	0.310	5.1	0.399	0.314
A5	549	5.5	0.630	0.641	5.2	0.662	0.730

Die Betrachtung der Fluoreszenzquantenausbeuten zeigt ein konträres Bild zu den donormodifizierten Oligonukleotiden. **cAraU**-modifizierte Sonden zeigen im Doppelstrang keine Erhöhung der Quantenausbeuten und weisen im Vergleich zu den **cU**-konfigurierten Oligonukleotiden ebenfalls keine verbesserten Werte auf (s. Tabelle 1). Lediglich **DNA2a-A4** zeigt eine um 12 % gesteigerte Quantenausbeute zur **cU**-modifizierten Variante.

Der Vergleich der Schmelztemperaturen ergibt für alle ribokonfigurierten Duplexe ähnliche Schmelztemperaturerhöhungen. Bei den **cAraU**-modifizierten Doppelsträngen hingegen stechen zwei Duplexe durch geringere Schmelztemperaturerhöhungen heraus. **A2** und **A3** sind, wie die Donor-Fluorophore **D2** und **D4**, über ihre 4-Position mit dem zweiten Heterozyklus verknüpft. Der dritte 4-verknüpfte Farbstoff **A4** folgt dem beschriebenen Trend jedoch nicht. Ursache hierfür könnte der zusätzliche, sperrige Phenyl-Rest und der damit verbundene erhöhte sterische Anspruch sein.

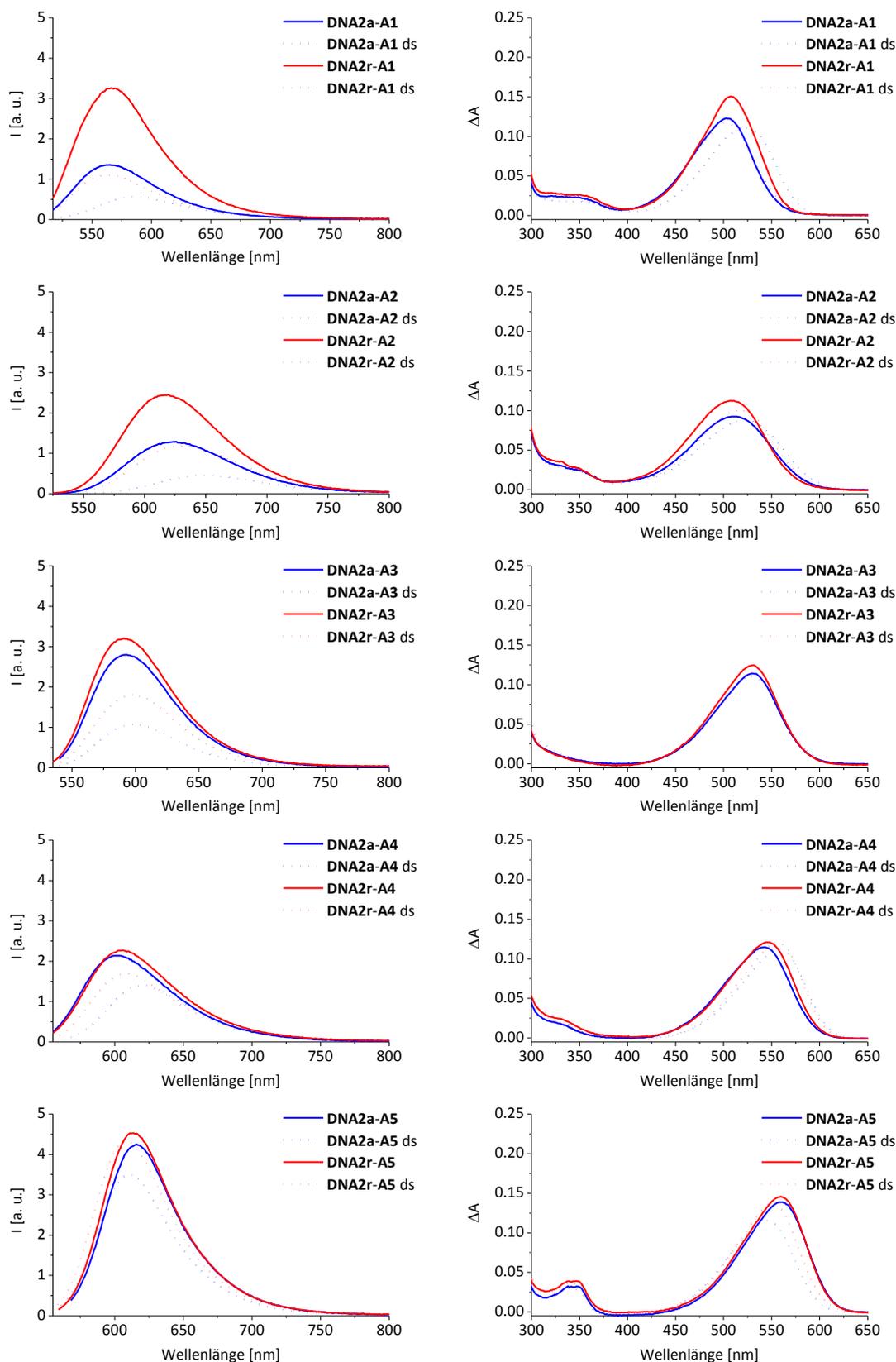


Abbildung 23: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der einfach markierten Einzel- und Doppelstränge (ds) der Akzeptor-Fluorophore **A1 – A5**. **cAraU**-modifizierte DNA-Stränge sind in blau dargestellt, **cU**-modifizierte DNA-Stränge in rot. $\lambda_{\text{exc}} = 502 \text{ nm}$ (**DNA2a-A1**), 510 nm (**DNA2a-A2**), 530 nm (**DNA2a-A3**), 542 nm (**DNA2a-A4**), 550 nm (**DNA2a-A5**); Spaltbreite: 2/2.

3.3.2 Charakterisierung der Energietransfer-Sonden

Im folgenden Kapitel werden die zuvor beschriebenen Donor- und Akzeptor-Oligonukleotide zu Energietransfer-Paaren kombiniert. Um ein ET-Paar bilden zu können, müssen Emission des Donors und Absorption des Akzeptors überlappen und gleichzeitig sollte der Donor-Fluorophor unabhängig vom Akzeptor angeregt werden können. **D1** erfüllt diese Kriterien für alle Akzeptor-Fluorophore **A1** bis **A5**, jedoch können **D2** bis **D4** jeweils nur mit den Akzeptoren **A3** bis **A5** kombiniert werden. Für eine vollständige Charakterisierung und um einen aussagefähigen Vergleich zwischen **cU** und **cAraU** ziehen zu können, wurden nicht nur alle möglichen Donor- und Akzeptor-Kombinationen mit **cAraU**-Konformation untersucht, sondern ebenfalls alle möglichen Mischungen aus **cU**- und **cAraU**-Konformation. Im Folgenden wird hauptsächlich auf die Kontrastverhältnisse (I_A/I_D) der ET-Paare, die Quantenausbeute ϕ_F des Akzeptors bei Anregung des Donor-Fluorophors und das Verhältnis E zur Quantifizierung der Effizienz des Energietransfers eingegangen. E wird berechnet aus dem Quotienten der Quantenausbeute des Akzeptors bei Donor-Anregung und der Quantenausbeute des Akzeptors bei direkter Akzeptor-Anregung. Die Schmelztemperaturen sowie die Absorptionsspektren aller ET-Paare sind in Kapitel 8.6.1 aufgelistet.

Die spektroskopische Untersuchung aller ET-Paare mit **D1** als Donor-Fluorophor ergab eine Steigerung der Kontrastverhältnisse für sechs der fünfzehn neuen (ohne Ribose-Ribose) Kombinationen (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Kontrastverhältnisse (I_A/I_D) der Donor-Akzeptor-Kombinationen aus Arabinose-Arabinose (a – a), Ribose-Ribose (r – r), Arabinose-Ribose (a – r) und Ribose-Arabinose (r – a) mit Donor-Fluorophor **D1**. Verbesserungen zur ursprünglichen Kombination r – r sind blau hervorgehoben.

		I_A/I_D			
		a – a	r – r	a – r	r – a
D1	A1	35	70	198	129
	A2	15	40	48	11
	A3	60	69	58	215
	A4	44	93	85	46
	A5	109	87	80	215

Bei Betrachtung der dazugehörigen Fluoreszenzspektren (Abbildung 25) sticht das ET-Paar **aD1-rA1** ins Auge. Dieses zeigt im Vergleich zum ursprünglichen Paar **rD1-rA1** sowie zu den anderen Kombinationen eine beträchtliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Außerdem wurde eine bemerkenswerte Steigerung der Quantenausbeute um 179 % im Vergleich zu **rD1-rA1** sowie eine Steigerung des Kontrastverhältnisses von 70 auf 198 erreicht. Diese starken Unterschiede können sogar beim Betrachten der Fluoreszenzküvetten mit bloßem Auge erkannt werden (s. Abbildung 24). Eine Erklärung hierfür ist die zuvor erwähnte stark erhöhte Quantenausbeute von **D1** durch Anknüpfung an **cAraU** (von 0.052 für **rD1** ds auf 0.096 für **aD1** ds). Jedoch bedeutet eine höhere Quantenausbeute des Donors nicht automatisch eine Verbesserung des Energietransfers, wie am Paar **aD1-aA1** zu sehen ist. Vielmehr beeinflusst die veränderte Orientierung der Chromophore, verursacht durch die Wahl des „Click“-Bausteins, die Kontrastverhältnisse maßgeblich. Trotzdem kann auch hier kein allgemeiner Trend ausgemacht werden, da ebenfalls die räumliche Struktur des einzelnen Fluorophors mit verantwortlich ist.

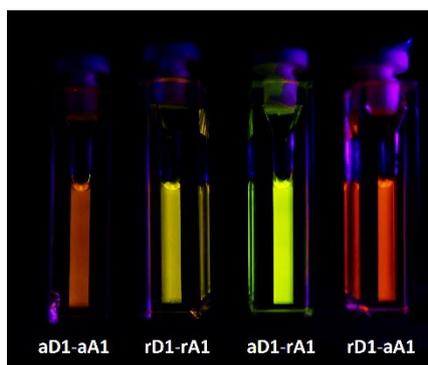


Abbildung 24: Aufnahme der Küvetten von **aD1-aA1**, **rD1-rA1**, **aD1-rA1** und **rD1-aA1** (von links nach rechts) bei Anregung mit einer UV-Handlampe bei 365 nm.

Die verschiedenen Kombinationen aus **D1** und **A1** zeigen große Verschiebungen der Akzeptor-Fluoreszenzmaxima. **aD1-rA1** besitzt ein Fluoreszenzmaximum bei 556 nm, das somit hypsochrom zum ursprünglichen ET-Paar **rD1-rA1** verschoben ist, und zeigt eine eher grüne Fluoreszenz (s. Abbildung 24). **rD1-aA1** dagegen weist ein um 38 nm in den längerwelligen Bereich verschobenes Maximum auf (in Bezug auf **aD1-rA1**) und besitzt deshalb eine orangene Fluoreszenzfarbe. Dies resultiert, wie auch bei **aD1-aA1**, aus der bereits stark bathochrom verschobenen Fluoreszenz des Akzeptor-Farbstoffs **A1** bei Anknüpfung an **cAraU**.

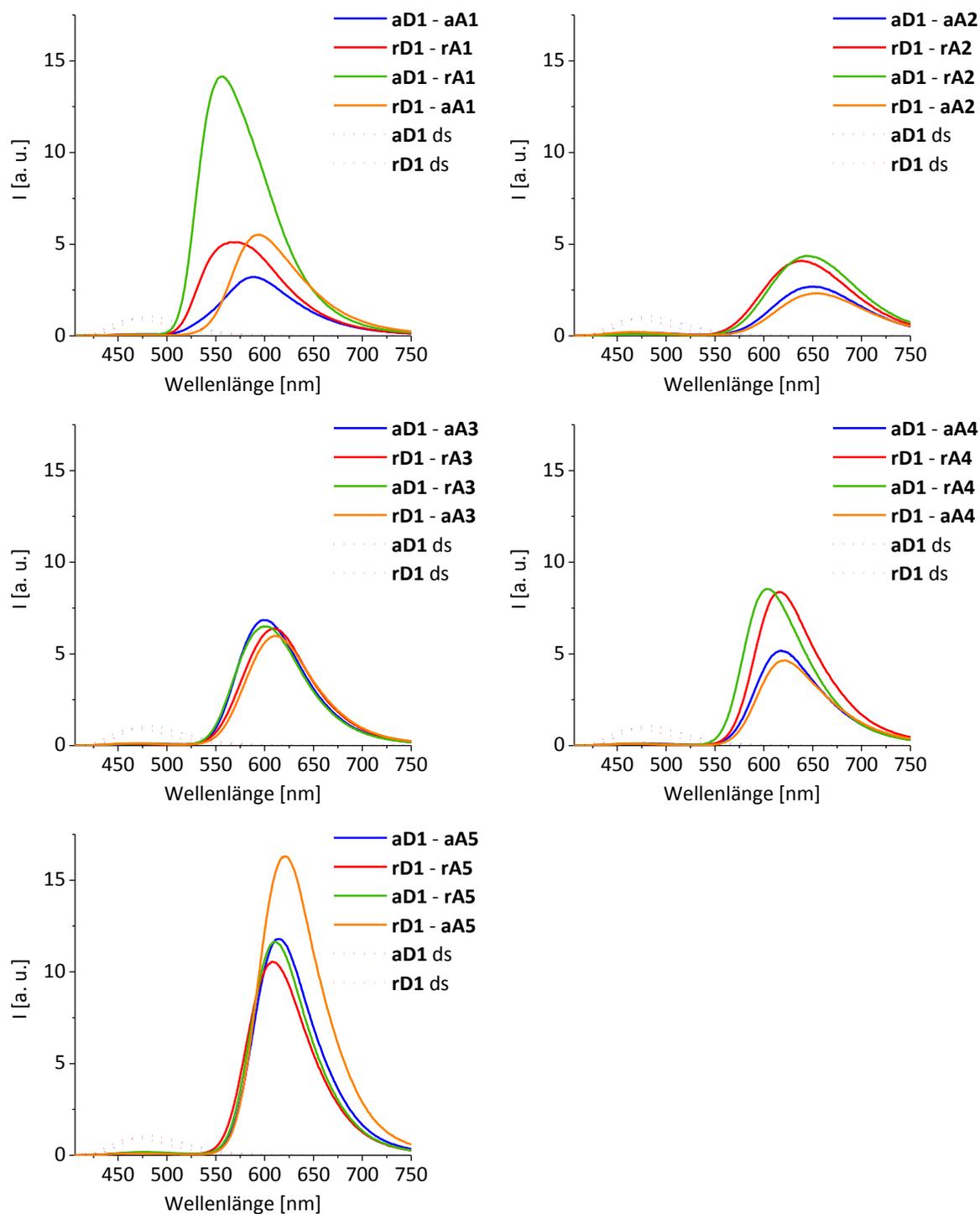


Abbildung 25: Fluoreszenzspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D1** und den Akzeptor-Fluorophoren **A1 – A5**. Verwendete Parameter: $\lambda_{exc} = 391$ nm; Spaltbreite: 3/3.

Ebenfalls auffallend sind die Paare **rD1-aA3** und **rD1-aA5**, die Kontrastverhältnisse von 215 zeigen. Diese sind die höchsten mit diesen Fluorophoren bisher beobachteten Kontrastverhältnisse. Zusammen mit **rD1-aA1** und **aD1-rD1** besitzt das ET-Paar **rD1-aA5** für das Verhältnis E einen Wert größer eins. Dies sagt aus, dass das ET-Paar eine größere Quantenausbeute als der Akzeptor alleine besitzt und damit eine Steigerung der Akzeptor-Quantenausbeute in Anwesenheit des Donors erreicht werden konnte (Tabelle 4).

Tabelle 4: Quantenausbeuten ϕ_F sowie das Verhältnis E aus ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} = 389$ nm)/ ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} =$ [a] 502 nm, [b] 510 nm, [c] 520 nm, [d] 542 nm, [e] 540 nm) aller Donor-Akzeptor-Kombinationen mit dem Donor-Fluorophor **D1**.

		a – a		r – r		a – r		r – a	
		ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E
D1	A1	0.146	0.816 ^[a]	0.217	0.786 ^[a]	0.606	1.059 ^[a]	0.224	1.028 ^[a]
	A2	0.148	0.771 ^[b]	0.206	0.752 ^[b]	0.227	0.783 ^[b]	0.127	0.774 ^[b]
	A3	0.307	0.837 ^[c]	0.245	0.793 ^[c]	0.306	0.832 ^[c]	0.240	0.830 ^[c]
	A4	0.273	0.941 ^[d]	0.340	0.950 ^[d]	0.357	0.890 ^[d]	0.213	0.968 ^[d]
	A5	0.606	0.894 ^[e]	0.545	0.932 ^[e]	0.576	0.850 ^[e]	0.719	1.027 ^[e]

Die spektroskopische Betrachtung der möglichen ET-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D2** und den Akzeptor-Fluorophoren **A3** bis **A5** zeigt eine Verbesserung der Kontrastverhältnisse und Quantenausbeuten in fünf von neun Fällen. Auffallend ist, dass alle Kombinationen, bei denen der Donor-Chromophor an **cAraU** und der Akzeptor an **cU** angebracht wurden, sowie alle Kombinationen des Donors **D2** mit **A5** dieses Verhalten zeigen. Das Energietransfer-Paar **aD2-rA4** zeigt zwar ein gesteigertes Kontrastverhältnis, eine erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute sowie einen größeren Wert für das Verhältnis E, jedoch keine Steigerung der Fluoreszenzintensität, wie dies bei den anderen verbesserten ET-Paaren zu sehen ist (Abbildung 26).

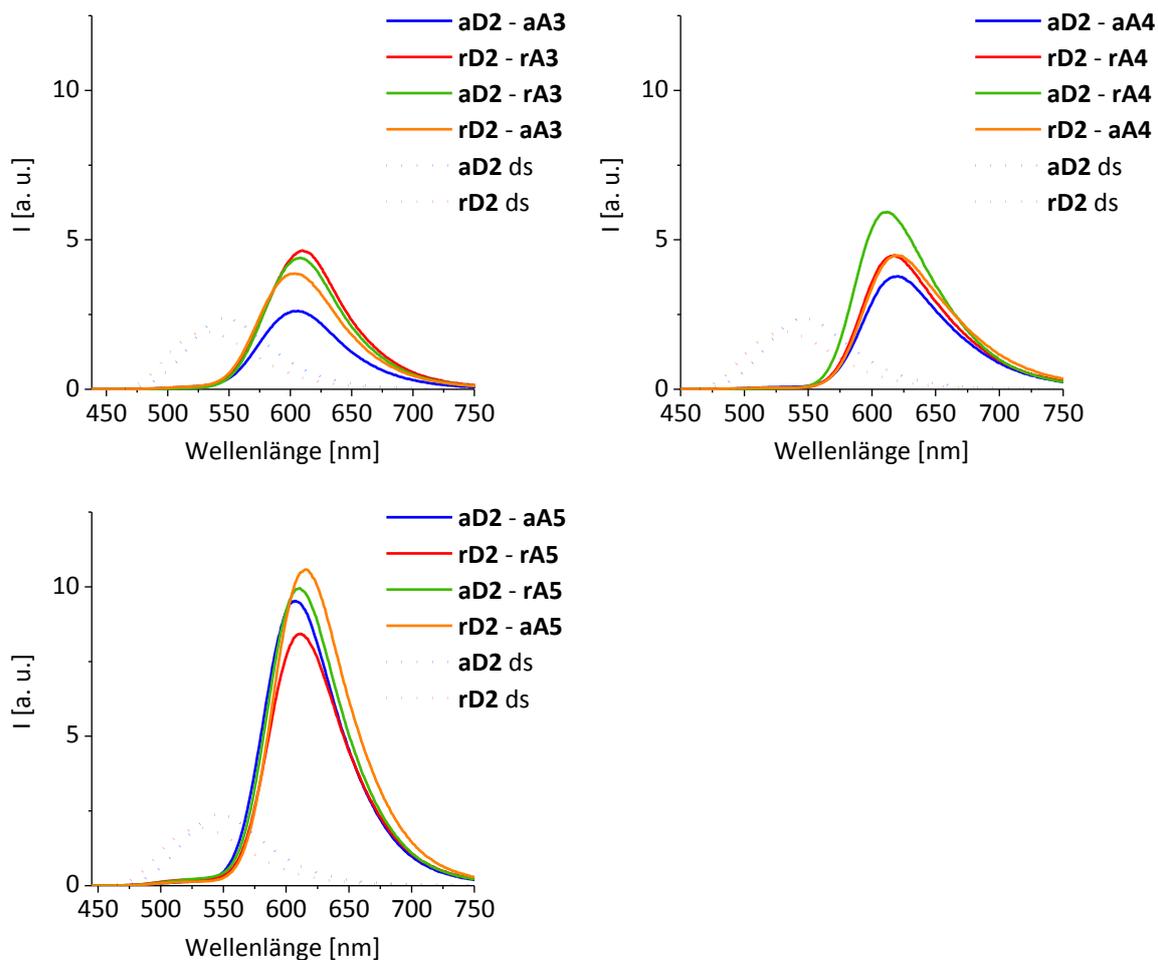


Abbildung 26: Fluoreszenzspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D2** und den Akzeptor-Fluorophoren **A3 – A5**. Verwendete Parameter: λ_{exc} für **A3** = 423 nm **A4** = 435 nm, **A5** = 430 nm; Spaltbreite: 3/3.

Tabelle 5: Kontrastverhältnisse (I_A/I_D) der Kombinationen aus Arabinose-Arabinose (a – a), Ribose-Ribose (r – r), Arabinose-Ribose (a – r) und Ribose-Arabinose (r – a) mit Donor-Fluorophor **D2**. Verbesserungen zur ursprünglichen Kombination r – r sind blau hervorgehoben.

		I_A/I_D			
		a – a	r – r	a – r	r – a
D2	A3	9	59	62	30
	A4	41	136	177	82
	A5	41	40	43	77

Tabelle 6: Quantenausbeuten ϕ_F sowie das Verhältnis E aus ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} = [a] 423 \text{ nm}, [b] 435 \text{ nm}, [c] 430 \text{ nm}$)/ ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} = [a] 520 \text{ nm}, [b] 542 \text{ nm}, [c] 540 \text{ nm}$) aller Kombinationen mit dem Donor-Fluorophor **D2**.

		a – a		r – r		a – r		r – a	
		ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E
D2	A3	0.148	0.840 ^[a]	0.244	0.859 ^[a]	0.285	0.963 ^[a]	0.237	0.888 ^[a]
	A4	0.198	0.966 ^[b]	0.218	0.862 ^[b]	0.319	1.006 ^[b]	0.218	0.948 ^[b]
	A5	0.528	0.933 ^[c]	0.388	0.810 ^[c]	0.564	0.891 ^[c]	0.549	0.979 ^[c]

Der Donor-Fluorophor **D3** zeigt, wie schon **D2**, für alle neuen Kombinationen mit dem Akzeptor **A5** eine Verbesserung der Kontrastverhältnisse (s. Tabelle 7). Diese ergeben zwar nur Werte bis 20, aber ein Blick auf die Fluoreszenzspektren und die Werte der Quantenausbeuten zeigt den großen Unterschied zum ursprünglichen Paar (**rD3-rA5**). Durch die Verwendung des **cAraU**-Bausteins konnte die Fluoreszenzintensität immens gesteigert werden bzw. die Fluoreszenzlöschung im Paar **rD3-rA5** ($E = 0.527$), die höchstwahrscheinlich durch einen zu geringen Abstand der Fluorophore und eine damit einhergehende Bildung von Grundzustand-Dimeren verursacht wurde, unterbunden werden. Somit konnte einer Steigerung der Quantenausbeute um fast 500 % (für **aD3-aA5**) erzielt werden. Ebenfalls nennenswert ist das Paar **rD3-aA5**, dessen Wert für E 1.131 beträgt und damit eine starke Steigerung der maximalen Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Anwesenheit des Donor-Fluorophors zeigt. Es kann bei dieser Kombination von einem sehr effizienten Energietransfer ausgegangen werden.

Tabelle 7: Kontrastverhältnisse (I_A/I_D) der Kombinationen aus Arabinose-Arabinose (a – a), Ribose-Ribose (r – r), Arabinose-Ribose (a – r) und Ribose-Arabinose (r – a) mit Donor-Fluorophor **D3**. Verbesserungen zur ursprünglichen Kombination r – r sind blau hervorgehoben.

		I_A/I_D			
		a – a	r – r	a – r	r – a
D3	A3	11	25	23	6
	A4	20	60	36	10
	A5	20	2	12	15

Tabelle 8: Quantenausbeuten ϕ_F sowie das Verhältnis E aus ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} = [a] 423 \text{ nm}, [b] 435 \text{ nm}, [c] 430 \text{ nm}$)/ ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} = [a] 520 \text{ nm}, [b] 542 \text{ nm}, [c] 540 \text{ nm}$) aller Kombinationen mit dem Donor-Fluorophor **D3**.

		a – a		r – r		a – r		r – a	
		ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E
D3	A3	0.222	0.884 ^[a]	0.226	0.890 ^[a]	0.245	0.860 ^[a]	0.132	0.657 ^[a]
	A4	0.237	0.908 ^[b]	0.312	0.969 ^[b]	0.245	0.942 ^[b]	0.210	1.000 ^[b]
	A5	0.466	0.928 ^[c]	0.078	0.527 ^[c]	0.427	0.841 ^[c]	0.334	1.131 ^[c]

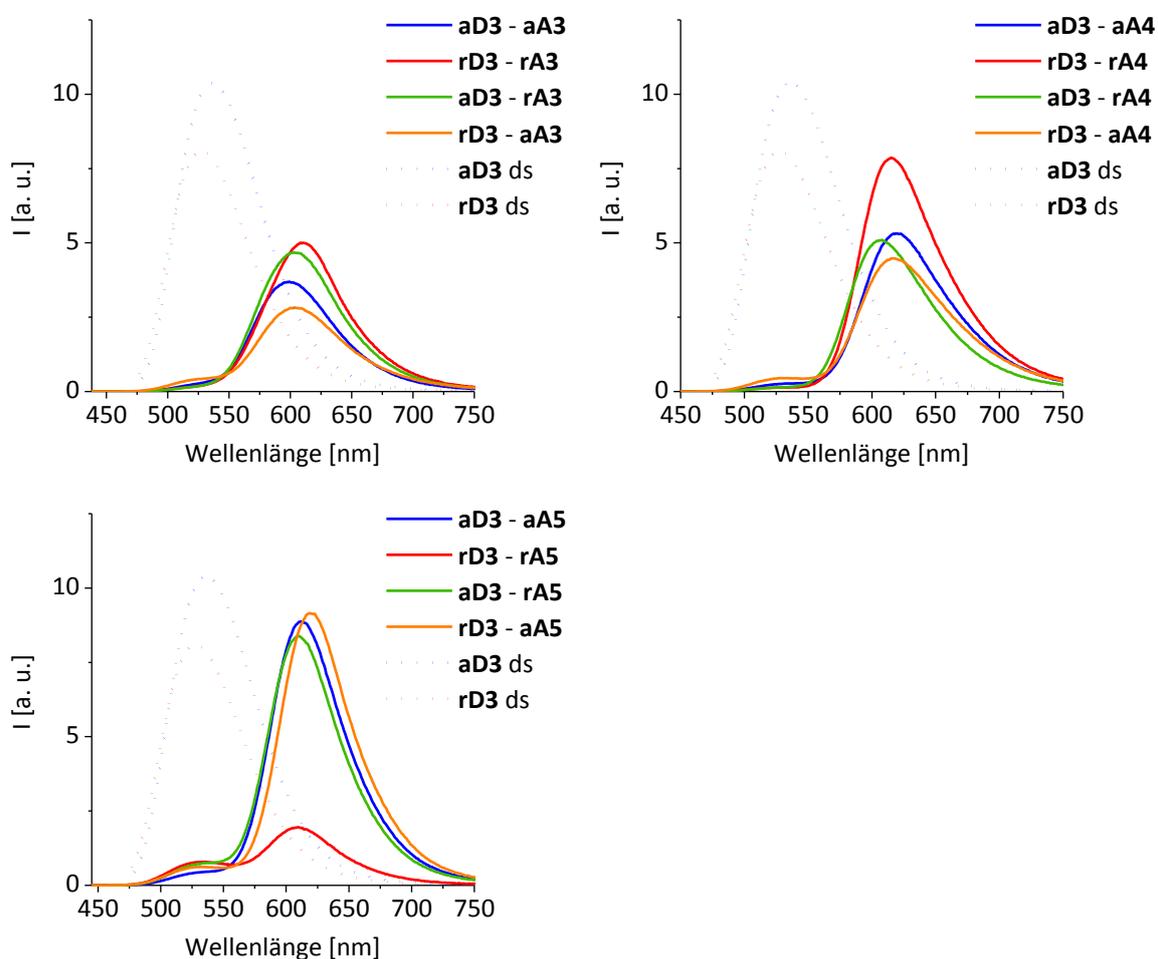


Abbildung 27: Fluoreszenzspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D3** und den Akzeptor-Fluorophoren **A3 – A5**. Verwendete Parameter: λ_{exc} für **A3** = 423 nm **A4** = 435 nm, **A5** = 430 nm; Spaltbreite: 3/3.

Die Analyse der spektroskopischen Ergebnisse des Donor-Chromophors **D4** zeigt viele Parallelen zu **D3**. Auch hier konnte eine Verbesserung der optischen Eigenschaften nur zusammen mit dem Akzeptor-Fluorophor **A5** erzielt werden. Die Paarung **aD4-aA5** zeigt eine um 84 % gesteigerte Quantenausbeute (vgl. mit **rD4-rA5**) und eine Optimierung der Energietransfer-Effizienz (Erhöhung für E von 0.674 (**rD4-rA5**) auf 1.032 (**aD4-aA5**)).

Tabelle 9: Kontrastverhältnisse (I_A/I_D) der Kombinationen aus Arabinose-Arabinose (a – a), Ribose-Ribose (r – r), Arabinose-Ribose (a – r) und Ribose-Arabinose (r – a) mit Donor-Fluorophor **D4**. Verbesserungen zur ursprünglichen Kombination r – r sind blau hervorgehoben.

		I_A/I_D			
		a – a	r – r	a – r	r – a
D4	A3	28	38	27	34
	A4	69	153	139	108
	A5	83	45	48	86

Tabelle 10: Quantenausbeuten ϕ_F sowie das Verhältnis E aus ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} =$ [a] 423 nm, [b] 435 nm, [c] 430 nm)/ ϕ_F (A mit $\lambda_{exc} =$ [a] 520 nm, [b] 542 nm, [c] 540 nm) aller Kombinationen mit dem Donor-Fluorophor **D4**.

		a – a		r – r		a – r		r – a	
		ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E	ϕ_F	E
D4	A3	0.220	0.800 ^[a]	0.206	0.728 ^[a]	0.258	1.000 ^[a]	0.184	0.710 ^[a]
	A4	0.212	0.918 ^[b]	0.229	0.848 ^[b]	0.214	0.907 ^[b]	0.268	1.011 ^[b]
	A5	0.672	1.032 ^[c]	0.366	0.674 ^[c]	0.592	0.912 ^[c]	0.534	0.803 ^[c]

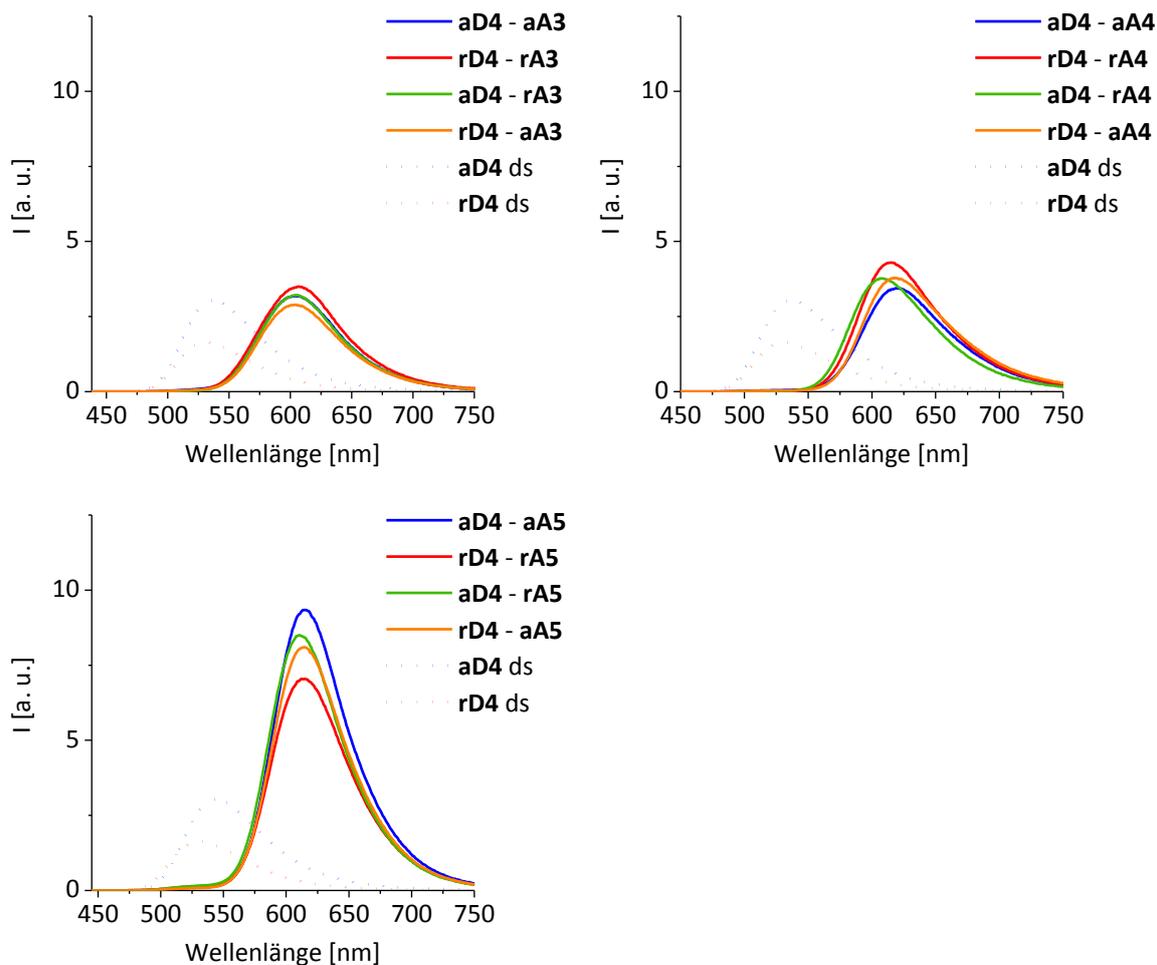


Abbildung 28: Fluoreszenzspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D4** und den Akzeptor-Fluorophoren **A3** – **A5**. Verwendete Parameter: λ_{exc} für **A3** = 423 nm, **A4** = 435 nm, **A5** = 430 nm; Spaltbreite: 3/3.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die Verwendung des **cAraU**-Bausteins eine Steigerung der Quantenausbeute bei 13 der 14 Donor-Akzeptor-Kombinationen erreicht werden konnte. Im Fall des ET-Paars **aD3-aD5** wurde die Fluoreszenzquantenausbeute um fast 500 % gesteigert. Weiterhin wurden die Kontrastverhältnisse von 9 der 14 möglichen Fluorophor-Kombinationen verbessert. Für alle Kombinationen mit dem Akzeptor-Fluorophor **A5**, außer **aD1-rA5**, konnte eine Optimierung des Energietransfers und damit einer Verbesserung des Kontrastverhältnisses realisiert werden. Die ET-Paare **rD1-aA3** und **rD1-aA5** weisen die höchsten, bisher mit diesen Fluorophoren bisher detektierten, Kontrastverhältnisse von 215 auf.

3.3.3 *in vivo* Experimente ausgewählter Energietransfer-Paare

Die beschriebenen Energietransfer-Paare wurden entworfen, um in bioanalytischen Sonden Anwendung zu finden. Deshalb wurden vier ET-Paare mit den vielversprechendsten optischen Eigenschaften für *in vivo* Experimente in menschliche Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) ausgewählt. Da DNA aufgrund ihrer Größe und Ladung nicht zellgängig ist, wurden die modifizierten Duplexe unter Verwendung eines Transfektionsreagenz in Vesikel verpackt, um sie so ins Zellinnere zu schleusen. Im Zellinneren wird die modifizierte DNA dann wieder freigegeben und die Energietransfer-Paare können im Cytoplasma mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

Für die Untersuchung und Visualisierung des Energietransfers in HeLa-Zellen wurden die Energietransfer-Paare **aD1-rA1**, **rD1-aA5**, **aD3-aA5** und **rD4-aA5** verwendet, da diese Paare entweder sehr gute Kontrastverhältnisse *in vitro* zeigten, über hohe Quantenausbeuten verfügen, oder beide Eigenschaften vorweisen. Hierfür wurden die DNA-Doppelstränge in einer Konzentration von 0.075 μM unter Verwendung von kationischen Lipiden transfiziert. 24 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mithilfe von Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie visualisiert. Hierbei wurde der Donor mit einer geeigneten Laserwellenlänge angeregt und die Fluoreszenz im Donor- und Akzeptor-Kanal detektiert. Abbildung 29 zeigt die einzelnen Fluoreszenzkanäle des Donors (erste Spalte) und des Akzeptors (zweite Spalte), die Überlagerung des Donor- und Akzeptorkanals (dritte Spalte) sowie die Hellfeldaufnahme des jeweiligen Bereichs (vierte Spalte). Alle Kombinationen zeigen ein Fluoreszenzsignal im Akzeptor- als auch im Donorkanal. Die Akzeptorfluoreszenz ist trotz selektiver Anregung des Donors sichtbar, was ein eindeutiges Indiz für einen Energietransfer innerhalb der Zelle ist. Die sichtbare Donorfluoreszenz rührt wahrscheinlich daher, dass Teile der Duplexe nach 24 h bereits dehybridisiert sind, sodass kein Energietransfer mehr stattfinden kann. Weiterhin kann es nach 24 h bereits zum teilweisen Abbau der DNA kommen, wodurch die DNA ebenfalls nicht mehr doppelsträngig vorliegt und dann Donorfluoreszenz detektiert wird.

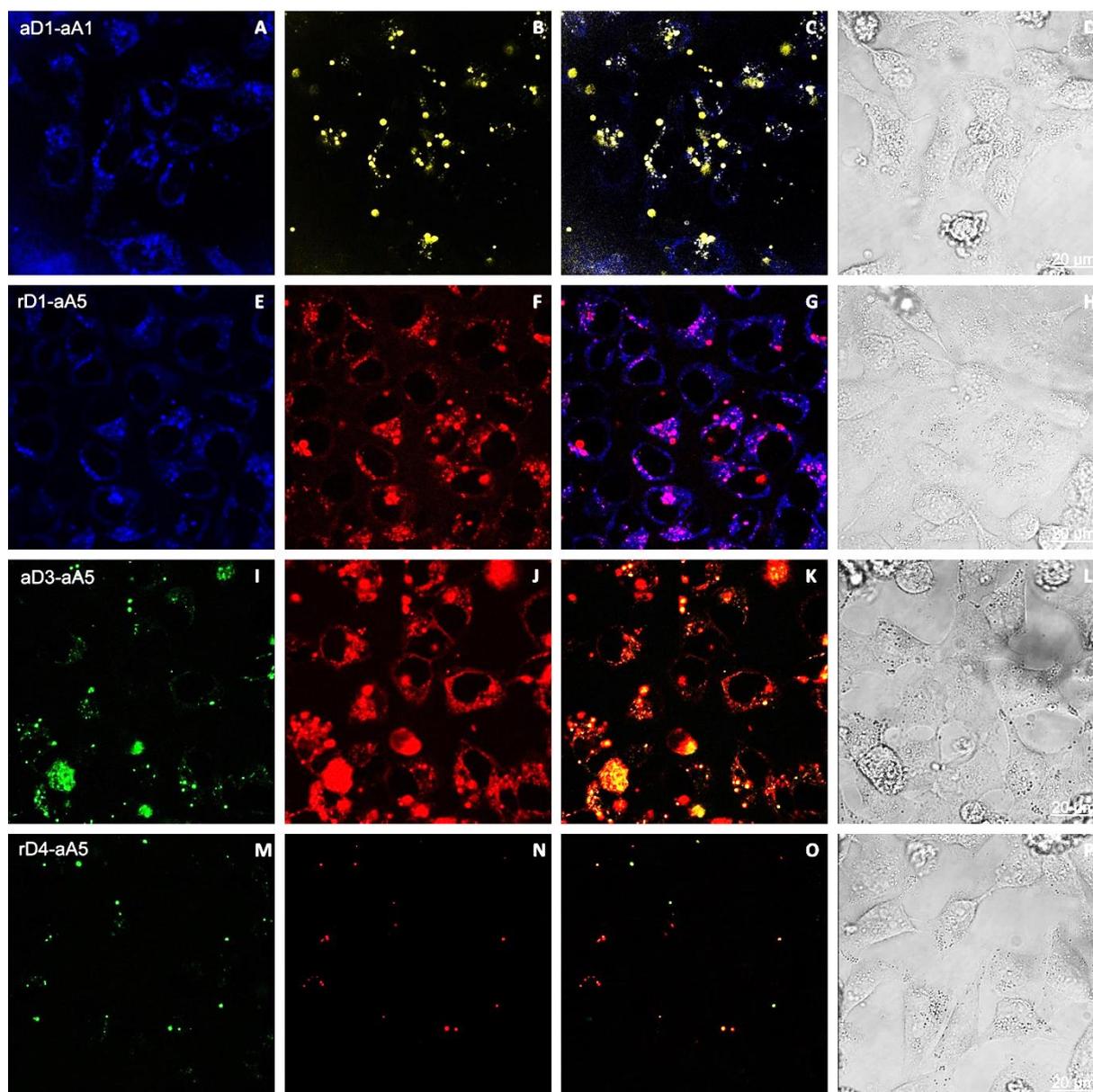


Abbildung 29: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von HeLa-Zellen 24 h nach der Transfektion von 15 pmol **aD1-aA1** (A-D), **rD1-aA5** (E-H), **aD3-aA5** (I-L) und **rD4-aA5** (M-P). Es wurde die Fluoreszenz im Donorkanal (erste Spalte) und Akzeptorkanal (zweite Spalte) aufgezeichnet. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung des Donor- und Akzeptorkanals. Spalte vier zeigt die Hellfeld-Aufnahme des untersuchten Bereichs. Verwendete Parameter: **aD1-aA1**: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ (UV-Laser), $\lambda_{\text{em}} = 435\text{-}470 \text{ nm}$ (A), $575\text{-}750 \text{ nm}$ (B); **rD1-aA5**: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ (UV-Laser), $\lambda_{\text{em}} = 415\text{-}550 \text{ nm}$ (E), $575\text{-}750 \text{ nm}$ (F); **aD3-aA5**: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Ionen-Laser), $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}550 \text{ nm}$ (I), $550\text{-}675 \text{ nm}$ (J); **rD4-aA5**: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Ionen-Laser), $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}550 \text{ nm}$ (M), $675\text{-}800 \text{ nm}$ (N).

aD1-rA1 zeigt im Akzeptorkanal (zweite Spalte Abbildung 29) eine stark gelbe, punktuelle Fluoreszenz, die durch DNA-Duplexe, die sich noch in endosomalen bzw. lysosomalen Vesikeln befinden, verursacht wird. Das ET-Paar ist hier noch intakt, weshalb die gelbe Fluoreszenz überwiegt. Es ist jedoch ebenfalls diffusere Akzeptorfluoreszenz zu sehen, die für sich im Cytosol befindliche DNA spricht. Freigesetzte sowie bereits dehybridisierte DNA reichert sich hauptsächlich im perinukleären Raum an und belegt die erfolgreiche Endozytose der transfizierten DNA-Duplexe (Abbildung 29, **A**). Die Anreicherung im perinukleären Raum ist auch für die ET-Paare **rD1-aA5** (Abbildung 29, **E – H**) und **aD3-aA5** (Abbildung 29, **J – L**) deutlich erkennbar.

Die Konfokalmikroskopie-Aufnahmen für **rD4-aA5** zeigen in beiden Kanälen nur sehr geringe, punktuelle Fluoreszenz. Ursache hierfür könnte eine fehlerhafte und damit nicht erfolgreiche Transfektion sein, wodurch wahrscheinlich keine bzw. nur sehr wenig DNA in die Zellen gelangen konnte. Es ist schwer eine Aussage darüber zu treffen, ob sich die sichtbaren, fluoreszenten Vesikel innerhalb der Zelle oder nur auf der Zelloberfläche befinden.

Mittels Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie konnte jedoch gezeigt werden, dass die verwendeten Fluorophore eine ausreichende Fluoreszenzintensität und Helligkeit besitzen und damit für *in vivo* Experimente geeignet sind. Eine Verkürzung der Transfektionszeit auf wenige Stunden könnte den Anteil an bereits dehybridisierten oder verdauten DNA-Duplexen verringern und damit das Fluoreszenzsignal im Donorkanal minimieren. Da transfizierte Fremd-DNA im Cytosol der Zelle stets als Fremdkörper erkannt wird, wird in der Regel eine Immunantwort ausgelöst, die zum Abbau der doppelsträngige Fremd-DNA durch Endonukleasen oder sogar zum Zelltod führt.^[94,95] Durch die Anknüpfung der Fluorophore an RNA könnte die Zellintegrität erhöht und das Energietransfer-Paar über einen längeren Zeitraum hinweg visualisiert werden.

Weiterhin wurde die Toxizität der Farbstoffe getestet, um deren Eignung für *in vivo* Experimente festzustellen. Hierfür wurden HeLa-Zellen für 72 h mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen inkubiert und anschließend deren Zellproliferation bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des MTT-Test (MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), dessen Funktionsweise auf der Reduktion des gelben, zellgängigen MTTs zum blau-violetten Formazan basiert.^[96] Die Reduktion von MTT erfolgt durch NADH oder NADPH und findet somit nur in lebenden Zellen statt. Die Formazan-Kristalle sind nicht mehr membrangängig

und reichern sich in den lebenden Zellen an. Nach Lyse der Zellen lösen sich die Kristalle wieder und können dann colorimetrisch bestimmt werden.

Alle verwendeten Fluorophore (**D1**, **D3**, **D4**, **A1** und **A5**) zeigten, für die bei der Transfektion verwendeten Konzentration von 0.075 μM , sowie der doppelten Konzentration (0.150 μM), keine signifikante Zelltoxizität (s. Abbildung 30).

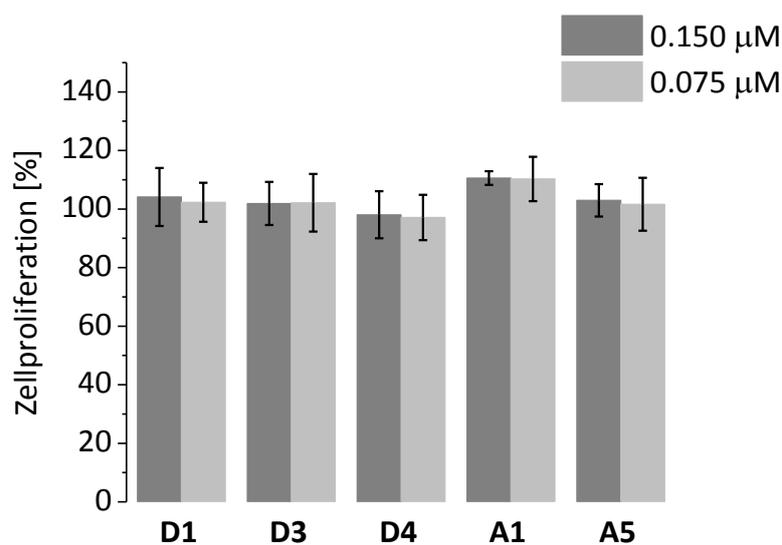


Abbildung 30: Toxizitätstest der Farbstoffe **D1**, **D3**, **D4**, **A1**, und **A5** für Farbstoffkonzentrationen von 0.15 μM (dunkelgrau) und 0.075 μM (hellgrau). Die Zellproliferation ist in % angegeben, bezogen auf unbehandelte Zellen (100 %).

4 Wellenlängenverschiebende siRNA-Sonden zur Genregulierung

4.1 Einführung

Der Begriff der RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt die Inhibierung der Expression eines bestimmten Gens durch sequenzspezifische, kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle. Dieses Phänomen wurde erstmals 1990 in Pflanzen beobachtet,^[97] jedoch erst 1997 für den Fadenwurm *C. elegans* eindeutig beschrieben.^[98] Die Wissenschaftler *Craig C. Mello* und *Andrew Fire* erhielten für ihre Entdeckung der RNA-Interferenz 2006 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie.

Zum heutigen Zeitpunkt ist der RNAi-Mechanismus vollständig aufgeklärt. Zu Beginn wird eine lange doppelsträngige RNA (dsRNA) von der Endonuklease *Dicer* in kleinere RNA-Stücke, die sogenannten *small interfering RNAs* (siRNA), geschnitten. Diese besitzen in der Regel 21 Nukleotide (nt), von denen jedoch nur 19 an Basenpaarungen beteiligt sind, sodass die siRNAs an den 3'-Enden jeweils zwei überhängende Basen besitzen (s. Abbildung 31).

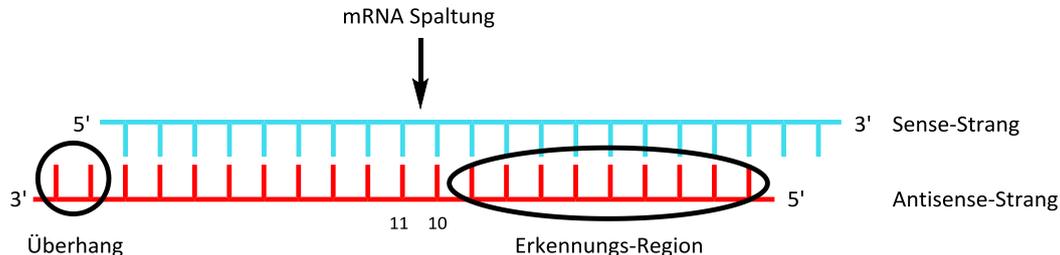


Abbildung 31: Schematische Darstellung einer 21-Nukleotid langen siRNA bestehend aus Sense-Strang (hellblau) und Antisense-Strang (rot). Die Erkennungs-Region für die mRNA sowie der Überhang im Antisense-Strang und die Spaltungsposition der Ziel-mRNA sind markiert.^[99]

Im Rahmen dieser Dissertation wurden siRNAs zur Genregulierung synthetisch hergestellt, weshalb der in Abbildung 32 gezeigte Mechanismus erst ab der Beladung des *RISC-loading Complex* (RLC) von Bedeutung ist. Der mit der siRNA beladene RLC übergibt nun diese an den Ribonukleoproteinkomplex RISC, genauer an dessen katalytische Einheit Argonaut 2, welche später in der Lage ist die mRNA des Ziel-Gens zu spalten. Im nächsten Schritt wird der Sense-Strang aus dem RISC entfernt und der Antisense-Strang, der die komplementäre Sequenz zur Ziel-mRNA trägt, verbleibt. Die Ziel-mRNA bindet nun an den Antisense-Strang und wird anschließend von Argonaut 2 an einer spezifischen Stelle gespalten. Die gespaltene mRNA ist

dann nicht mehr in der Lage sich selbst zu stabilisieren, da sie nicht mehr über einen 5'-Cap sowie Poly-A-Schwanz verfügt. Sie wird somit von RNasen angebaut und das auf ihr codierte Protein kann nicht mehr synthetisiert werden.

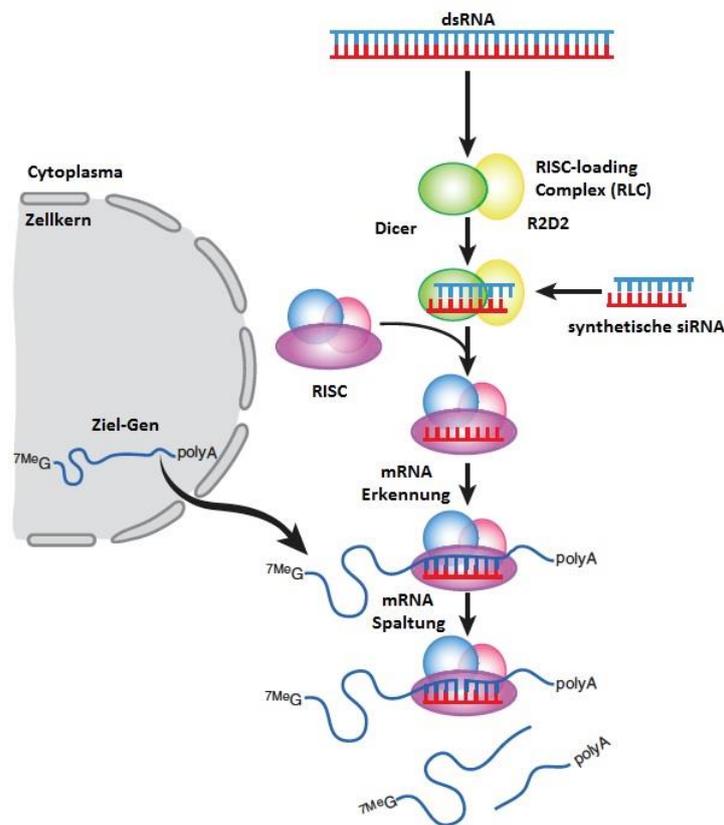


Abbildung 32: Detaillierter Mechanismus RNA-Interferenz zur Genregulierung durch 21-nt lange doppelsträngige siRNA.^[100]

Nach der Entdeckung von RNAi in *C. elegans* konzentrierte sich die Forschung auf die Übertragung des Konzepts auf Säugetier- und Menschenzellen.^[101] Säugetierzellen zeigen eine unspezifische Interferon(INF)-Antwort auf lange dsRNA, die als Schutzmechanismus vor viraler RNA dient. Deshalb wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass RNAi nicht in Säugetier- und Menschenzellen angewendet werden kann. Der Durchbruch gelang *Tuschl et al.*, die entdeckten, dass die INF-Antwort nur durch dsRNA ausgelöst wird, die mehr als 30 Basenpaare besitzen. Sie konnten somit zeigen, dass RNAi durch 21-nt lange Oligonukleotide auch in Säugetierzellen angewendet werden kann.^[102]

Seit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahr 2001 bietet RNAi ein wichtiges Werkzeug zur Inhibierung von Krankheitsgenen. Es wurden seither große Anstrengungen unternommen die RNAi-Technologie zur Therapie von Krankheiten zu nutzen.

Dies erfolgt beispielsweise durch die Adressierung krankheitsspezifischer Allele mit einer geeigneten siRNA.^[103] Eine große Herausforderung ist nicht nur das Finden der siRNA-Sequenzen, sondern auch deren Transport in die Zelle. Aufgrund ihrer kleinen Größe, Hydrophilie und negativen Ladung können siRNA die Lipiddoppelschicht der Zellmembran nicht ohne Hilfe überwinden.^[104] Hierfür wurde eine große Bandbreite an Methoden entwickelt die unter anderem die Verwendung von kationischen Lipiden und der Bildung von Lipoplexen, Antikörpern und Aptamer-verknüpfte siRNAs beinhaltet.^[105–107]

Die Experimente dieser Dissertation bauen auf den Arbeiten von *C. Holzhauser* auf, die sich innerhalb des Arbeitskreises *Wagenknecht* mit der Fluoreszenzmarkierung von siRNAs beschäftigte. In Kapitel 2.2.2 wurde bereits kurz die Anwendung der „Traffic Lights“, bestehend aus den Fluorophoren Thiazolorange (**TO**) und Thiazolrot (**TR**), erläutert. Das ET-Paar wurde dabei außerhalb der Erkennungs-Region in die RNA eingebaut, wobei sich **TO** im Antisense-Strang und **TR** im Sense-Strang befanden.^[39] Die Verwendung eines ET-Paares anstelle einer einfachen Fluoreszenzmarkierung bietet den Vorteil, dass zum einen beide Stränge (Sense- und Antisense-Strang) mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden können und zum anderen die Prozessierung der siRNA im RISC durch einen Wechsel der Fluoreszenzfarbe visualisiert werden kann. Als Sequenz der siRNA wurde eine Sequenz der mRNA des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) gewählt, da dieses ein etabliertes System darstellt und die Möglichkeit bietet, die Genregulation durch Beobachtung der Fluoreszenzlöschung zu verfolgen.

Der Einbau von **TO** und **TR** als Basensurrogate lieferte ein Kontrastverhältnis von 4.6, welches im Rahmen dieser Doktorarbeit durch die Verwendung veränderter Farbstoffe sowie anderer Anknüpfungsmethoden und –punkte an die RNA optimiert werden sollte.

4.2 Synthese und Charakterisierung der Energietransfer-siRNA-Sonden

DNA und RNA bilden zwei sehr unterschiedliche aufgebaute Duplex-Strukturen aus, weshalb ein in DNA funktionierendes und optimiertes System nicht ohne weiteres auf RNA übertragen werden kann. DNA bildet eine B-Helix aus, deren Zucker eine C₂'-endo-Konformation annehmen, wohingegen RNA eine A-Helix ausbildet, deren Zucker in C₃'-endo-Konformation vorliegen. Verglichen mit DNA ist die RNA-Helix gestaucht und aufgedreht (s. Abbildung 33), was bedeutet, dass ihre Ganghöhe nur 2.53 nm (DNA: 3.54 nm) beträgt und ihr Durchmesser leicht vergrößert ist (RNA: 2.55 nm; DNA: 2.37 nm). Dies hat zur Folge, dass die Größen der großen und kleinen Furche stark verändert sind. Die große Furche einer DNA-Doppelhelix ist breit, wohingegen sie in RNA eher eng ist. Ähnlich verhält es sich mit der kleinen Furche. Diese ist in DNA eng und tief, jedoch in RNA breit und flach. In Kapitel 3.3 wurde über die Auswirkungen auf das optische Verhalten von Fluorophoren durch die Veränderung der Lage der Fluorophore berichtet, das heißt genauer durch die Positionierung entweder in der kleinen oder großen Furche der DNA-Doppelhelix. Der strukturelle Vergleich von DNA und RNA zeigt, wie zuvor beschrieben, sehr große Unterschiede zwischen den Dimensionen der Furchen, wodurch die optischen Eigenschaften von Farbstoffen und Energietransfer-Paaren durch die Wahl der geeigneten Anknüpfung maßgeblich beeinflusst werden können.

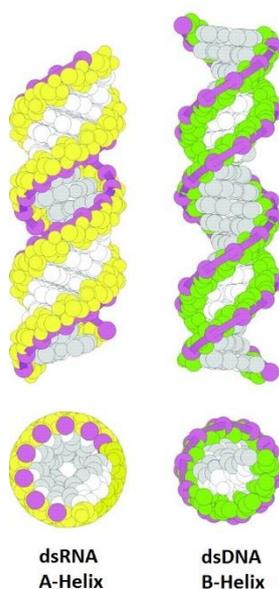


Abbildung 33: Seitenansicht (oben) und Aufsicht (unten) eines Kalotttemodells von doppelsträngiger DNA (dsDNA, links) und RNA (dsRNA, rechts). Ribofuranoside sind in gelb, Desoxyribofuranoside in grün dargestellt.^[108]

Für die Optimierung der Kontrastverhältnisse des Energietransfers in RNA wurden drei strukturell verschiedene „Click“-Bausteine gewählt, die die Positionierung, Orientierung und Distanz der Fluorophore beeinflussen sollen. Es wurden das kommerziell erhältliche 2'-O-Propargyluridin (**cU**), das zuvor vorgestellte Arabino-Analogon **cAraU** sowie ein azyklischer (*S*)-2-Amino-1,3-propandiol-Linker (**cL**) verwendet (s. Abbildung 34). Für **cL** wurde Adenosin als Gegenbase gewählt, da somit in späteren Experimenten eine Kombination von **cL**-modifizierten Strängen mit **cU**- und **cAraU**-modifizierten RNAs möglich ist und es nicht zu Fehlpaarungen im siRNA-Duplex kommt. Weiterhin wurden die Cyanin-Farbstoffe **TO** und **TR** gegen zwei photostabilere Vertreter der Cyanin-Styryl-Farbstoffe getauscht. Es wurde das Energietransfer-Paar bestehend aus Donor-Fluorophor **D3** und Akzeptor-Fluorophor **A4** gewählt. Diese besitzen ähnlich hohe Fluoreszenzintensitäten und sollen deshalb in ihrer Anwendung zur Visualisierung und Nachverfolgung der siRNA innerhalb der Zelle aussagekräftige Ergebnisse über Vorhanden- oder Nichtvorhandensein eines Energietransfers liefern. Außerdem kann dieses ET-Paar mit einer Wellenlänge über 400 nm angeregt werden, wodurch Zellschäden durch Anregung von Zellkompartimenten minimiert werden.

Es wurden die in Abbildung 34 dargestellten RNA-Stränge **RNA1 – RNA6** unter Verwendung der drei verschiedenen „Click“-Bausteine **cU**, **cAraU** und **cL** synthetisiert. Nach der Abspaltung von der festen Phase, jedoch vor der Entschützung der 2'-Silyl-Schutzgruppe, wurde die „Click“-Reaktion mit den Aziden **D3** und **A4** durchgeführt. Die „Click“-Reaktion kann auch nach der Entschützung der 2'-OH-Gruppen^[109,110] oder sogar während der Entfernung der Silyl-Schutzgruppen erfolgen.^[111] Da jedoch die Instabilität von RNA hauptsächlich auf der Möglichkeit eines intramolekularen Angriffs der 2'-Hydroxy-Funktion an der Phosphodiesterbrücke beruht, wird in der Regel auf eine Entschützung vor der „Click“-Reaktion verzichtet. Die „Click“-Reaktion wurde unter den gleichen Bedingungen, wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, durchgeführt. Für die Farbstoffe wurde eine diagonale Anordnung gewählt, die jedoch nicht der der bereits untersuchten, **cU**- und **cAraU**-modifizierten ET-Sonden entspricht. Der Grund hierfür ist, dass sich der Donor-Fluorophor im Antisense-Strang und der Akzeptor-Fluorophor im Sense-Strang befinden muss, um den Farbwechsel von rot nach grün im RISC beobachten zu können. Ein weiterer Grund ist die Vergleichbarkeit mit den früheren Arbeiten von C. Holzhauser, die für **TO** und **TR** diese diagonale Orientierung gewählt hatte.

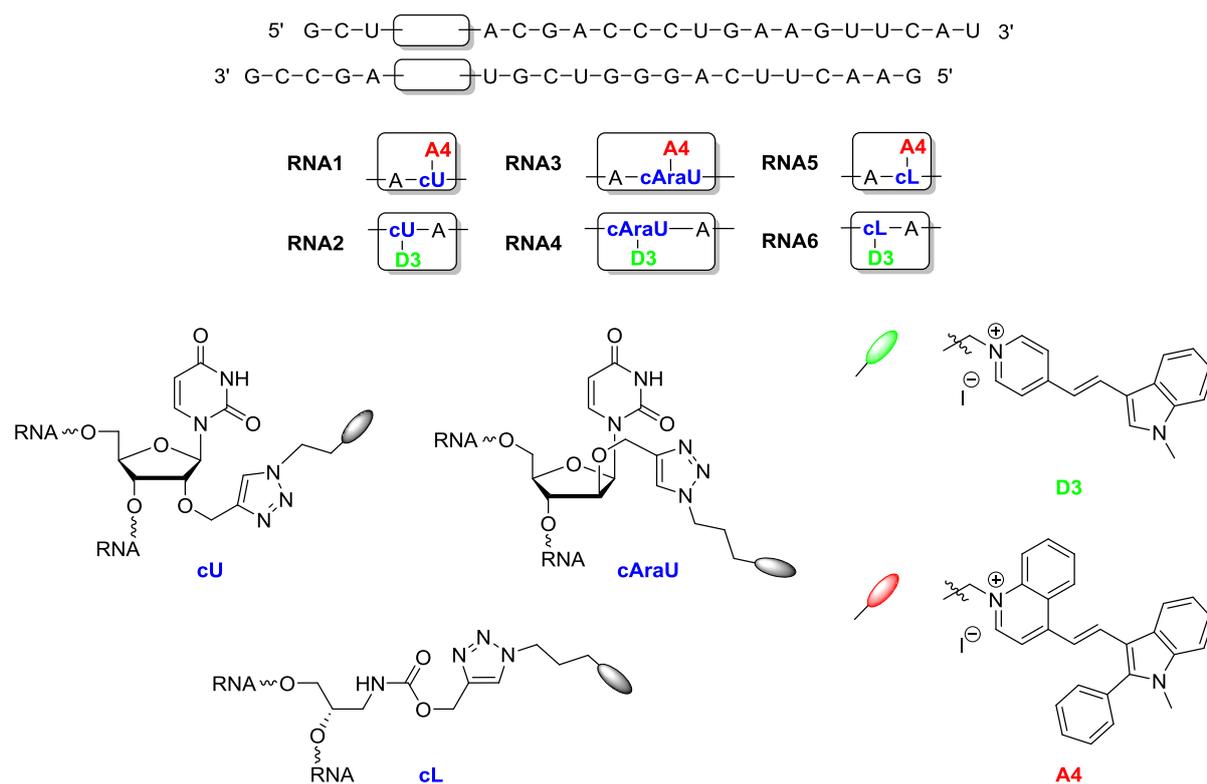


Abbildung 34: Sequenzen der siRNA-Stränge **RNA1 – RNA6** (oben) sowie die Molekülstrukturen der „Click“-Bausteine **cU**, **cAraU**, **cL** und der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **D3** und **A4** (unten).

Zunächst erfolgte die spektroskopische Untersuchung der ET-Sonden bestehend aus den gleichen „Click“-Bausteinen (s. Abbildung 35). Alle Donor-Stränge (gepunktete Linien) zeigen ein Fluoreszenzmaximum bei 540 nm und die ET-Paare (durchgezogene Linie) ein Maximum bei der Akzeptorfluoreszenz (**RNA1-2**: 613 nm, **RNA3-4**: 606 nm, **RNA5-6**: 608 nm). Die Kontrastverhältnisse I_A/I_D betragen für **RNA3-4** 9.3 und 8.4 für **RNA5-6**. Das ET-Paar **RNA1-2**, dessen Farbstoffe jeweils über **cU** an die RNA geknüpft sind, zeigt im Gegensatz zu den ET-Paaren **RNA3-4 (cAraU)** und **RNA5-6 (cL)** eine stark gelöschte Akzeptorfluoreszenz, weshalb das Kontrastverhältnis von 4.5 keinen brauchbaren Wert darstellt.

Auch das Absorptionsspektrum von **RNA1-2** zeigt ein abweichendes Verhalten. Der Extinktionskoeffizient des Akzeptors ist stark reduziert und der des Donors erhöht sowie dessen Maximum hypsochrom verschoben. Dieses Verhalten deutet auf die Bildung von Grundzustands-Heterodimeren und damit verbundenen excitonische Wechselwirkungen der Fluorophore hin.^[112,113] Die Grundzustands-Dimere können keinen Energietransfer mehr eingehen, wodurch die starke Fluoreszenzlöschung erklärt werden kann.

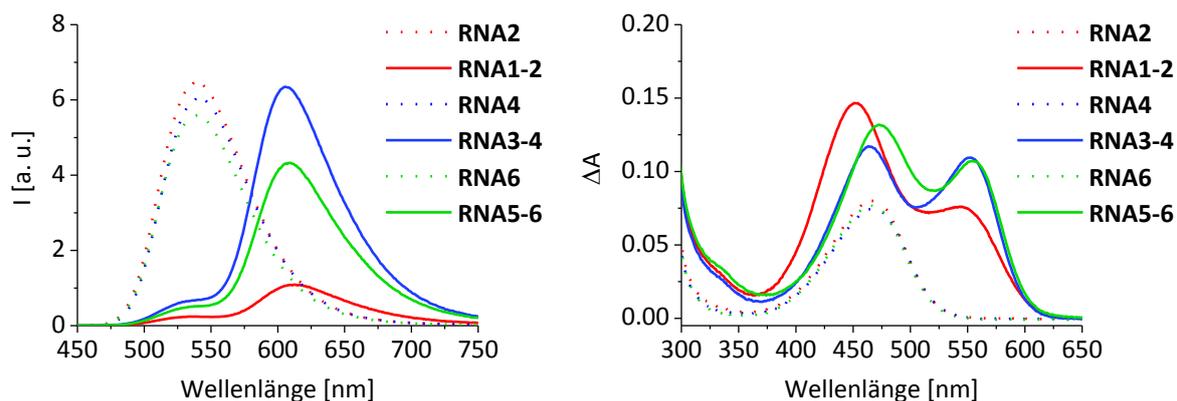


Abbildung 35: Fluoreszenz- (links) und Absorptions-Spektren (rechts) der einfach Donor-modifizierten RNA-Stränge (gepunktete Linie) **RNA2**, **RNA4** und **RNA6** sowie die ET-Paare (durchgezogene Linie) **RNA1-2**, **RNA3-4** und **RNA5-6**. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/3.

Die Änderung des Anknüpfungs-Bausteins zu **cAraU** liefert ein konträres Bild und kann, wie auch schon für DNA, durch die Beschaffenheit der Furchen erklärt werden. **cU** dirigiert die Fluorophore in die kleine Furche, die im Fall der RNA breit, aber sehr flach ist und höchstwahrscheinlich zu einer sehr geringen Distanz und einer verstärkten Wechselwirkung der Fluorophore führt. **cAraU** hingegen drückt die Farbstoffe in die große Furche, die eng und tief ist und ihnen so eine geeignetere Umgebung für einen Energietransfer bietet.

Über die Positionierung der Fluorophore bei ET-Sonde **RNA5-6**, die über einen azyklischen Linker als Anknüpfungs-Baustein verfügt, lässt sich nur sehr schwer eine eindeutige Aussage treffen. Durch das Fehlen des Zuckers und der Base platzieren sich die Fluorophore wahrscheinlich nicht in einer der beiden Furchen, sondern eine Interkalation kann stattfinden.^[73] Strukturoptimierte Modelle über das Verhalten von **cL** im Zusammenhang mit Farbstoffen existieren nur für DNA, weshalb Aussagen über das Verhalten in RNA nur auf Vermutungen basieren.

Abbildung 36 zeigt die Absorptionsspektren der Einzelstränge, der ET-Paare sowie mathematisch berechnete Kurven (gepunktete Linie), die der Addition der beiden Einzelstränge entsprechen. Für einen optimalen Energietransfer sollten die beiden Fluorophore unabhängig voneinander sein und sich nicht gegenseitig durch ihre Nähe beeinflussen. Verhalten sich die Fluorophore wie zwei einzelne, unabhängige Moleküle, so sollte sich das Absorptionsspektrum des ET-Paars wie die Addition der beiden einzelnen Farbstoffe verhalten. Betrachtet man für alle ET-Paare die blaue durchgezogene und die blaue gepunktete Kurve und vergleicht diese miteinander, lässt sich das Verhalten der

Kontrastverhältnisse erklären. Je mehr die tatsächliche Kurve der berechneten Kurve entspricht, desto mehr verhalten sich die Fluorophore unabhängig voneinander und desto effizienter ist ihr Energietransfer. **RNA3-4** entspricht nahezu der berechneten Absorptionskurve und zeigt ebenfalls das höchste Kontrastverhältnis. **RNA5-6** zeigt eine höhere Extinktion des Donors, jedoch behält der Akzeptor sein ursprüngliches Verhalten bei. **RNA1-2** hingegen zeigt für Donor und Akzeptor starke Abweichungen, die somit in einer starken Fluoreszenzlöschung und dem schlechtesten Kontrastverhältnis resultieren.

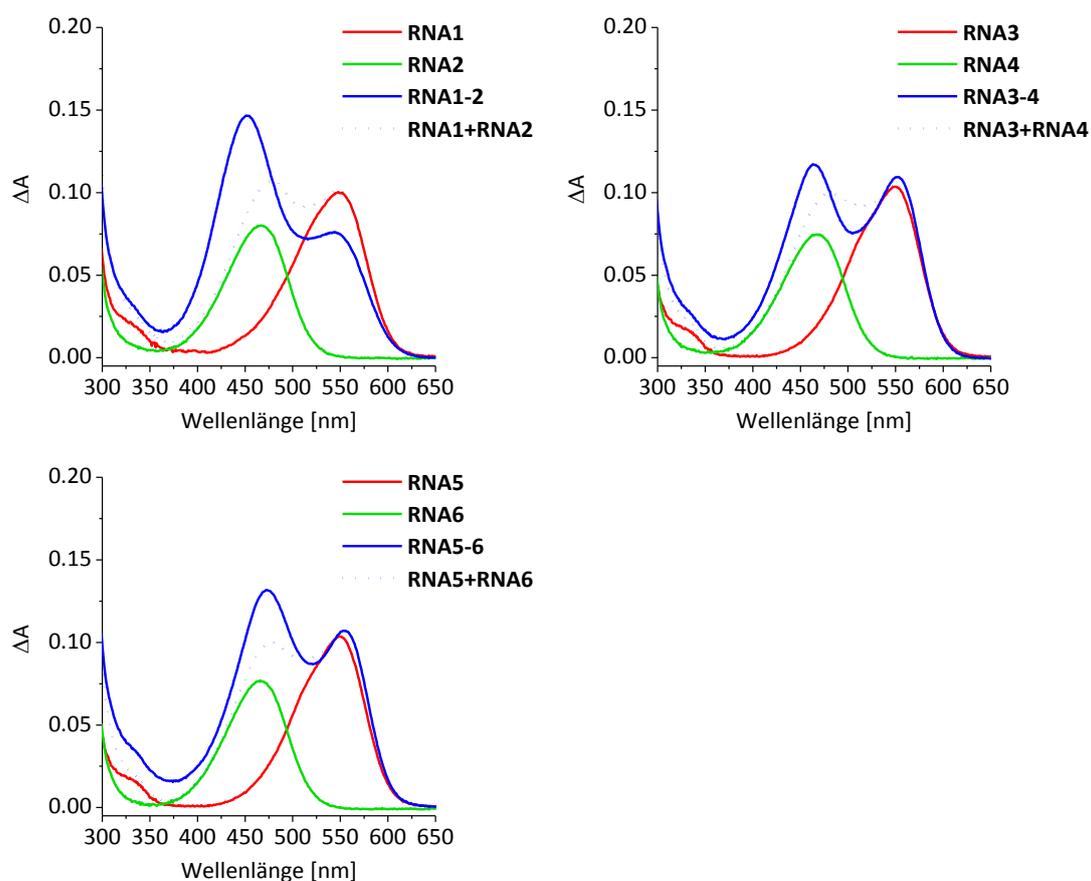


Abbildung 36: Absorptionsspektren der Einzel- und Doppelstränge (durchgezogene Linien) sowie ein berechnetes Absorptionsspektrum (gepunktete Linien) bestehend aus den Einzelsträngen für die ET-Paare **RNA1-2**, **RNA3-4** und **RNA5-6**.

Die Schmelztemperaturen der siRNA-Duplexe spiegeln die Tendenzen der Kontrastverhältnisse und Absorptionsspektren wieder und bestätigen die Bildung von unspezifischen Fluorophor-Aggregaten aufgrund von erhöhten π - π -Wechselwirkungen. Je schlechter der Energietransfer abläuft, desto höher sind die Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen und desto stärker wird der RNA-Duplex stabilisiert. **RNA1-2** hat die

höchste Schmelztemperatur wohingegen **RNA3-4**, welcher das beste Kontrastverhältnis zeigte, den kleinsten Wert aufweist (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Kontrastverhältnisse I_A/I_D und Schmelztemperaturen T_m aller Kombinationen der siRNA-Energietransferpaare bestehend aus **RNA1 – RNA6**.

	RNA1		RNA3		RNA5	
	I_A/I_D	T_m [°C]	I_A/I_D	T_m [°C]	I_A/I_D	T_m [°C]
RNA2	4.5	84.5	9.5	82.3	34.5	83.0
RNA4	5.3	83.7	9.3	82.5	8.4	82.7
RNA6	5.4	83.6	9.6	82.3	8.4	83.6

Nach der Untersuchung der Homo-Paarungen wurden ebenfalls die Paarungen verschiedener Anknüpfungs-Bausteine analysiert. In Tabelle 11 sind die Kontrastverhältnisse der jeweiligen Paarungen aufgeführt. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass alle ET-Sonden, die den gleichen „Click“-Baustein im akzeptormodifizierten RNA-Strang aufweisen, sehr ähnliche Kontrastverhältnisse zeigen. Dieses Muster lässt vermuten, dass die Effizienz des Energietransfers durch die Orientierung und Lage des Akzeptors bestimmt wird. Auch hier können schlechtere Kontrastverhältnisse mit höheren Schmelztemperaturen in Verbindung gebracht werden, wie beispielsweise beim Vergleich von **RNA3-4** und **RNA1-4**. Das Kontrastverhältnis von **RNA1-4** beträgt nur 5.3, wobei die Schmelztemperatur, verglichen mit **RNA3-4**, um 1.2 °C erhöht wurde. Diese Beobachtungen stützen die Aussage, dass excitonische Wechselwirkungen mit dem Energietransfer konkurrieren.

Lediglich **RNA5-2** entspricht nicht diesem Verhalten und zeigt ein stark gesteigertes Kontrastverhältnis von 34.5. **RNA1-2** muss ebenfalls außer Betracht gelassen werden, da hier eine starke Löschung der Fluoreszenz auf keinen ET-Transfer hindeutet. Das Verhalten von **RNA1-2** im Absorptionsspektrum wurde zuvor durch excitonische Wechselwirkungen der Fluorophore erklärt. Die Absorptionsspektren der ET-Sonden **RNA3-2** und **RNA5-2** zeigen ein ähnliches Muster, jedoch wird die Akzeptorfluoreszenz dieser Paare nicht gelöscht (s. Abbildung 37). Die Maxima der Akzeptor-Absorptionen sind bathchrom verschoben und die Banden besitzen eine schmalere Form als die einfach modifizierten Akzeptor-Oligonukleotide. Diese Unterschiede zu **RNA1-2** sowie die niedrigere Schmelztemperatur schließen löschernde, excitonische Wechselwirkungen aus, weshalb die verbesserte

ET-Effizienz nur durch die veränderte Umgebung und Orientierung der Fluorophore erklärt werden kann.

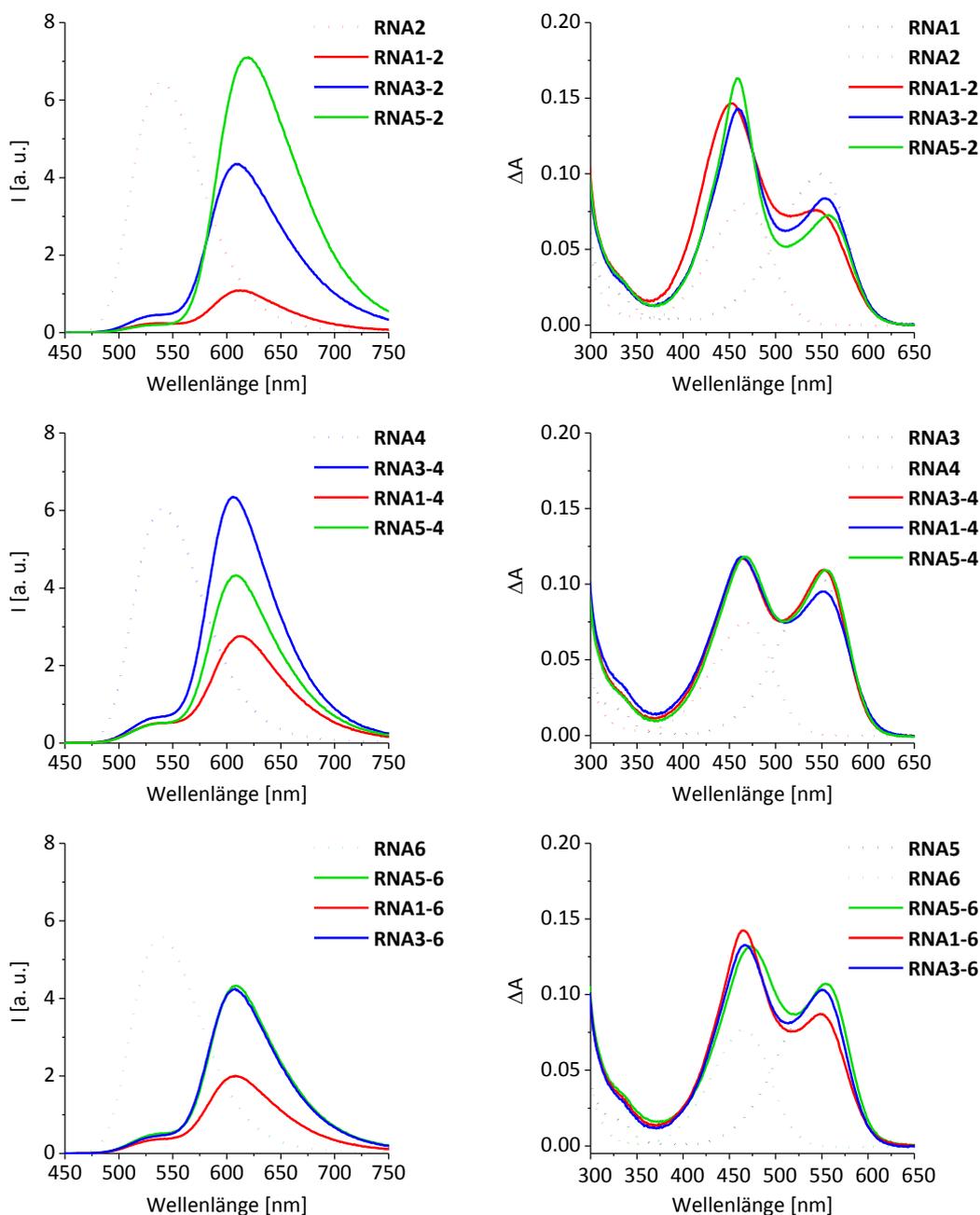


Abbildung 37: Fluoreszenz- (links) und Absorptions-Spektren (rechts) der einfach Donor- und Akzeptor-modifizierten RNA-Stränge (gepunktete Linien) sowie die ET-Paare (durchgezogene Linien) aller Kombinationen bestehend aus **RNA1 – RNA6**. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/3.

In allen weiteren Kombinationen zeigen stets die siRNA-Duplexe, die über eine **cU**-Modifikation verfügen, das schlechteste Kontrastverhältnis auf. Ein Grund hierfür könnte die Positionierung des vergleichsweise großen Akzeptor-Fluorophors in der flachen kleinen Furche der RNA-Helix sein. Diese bietet nicht ausreichend Platz, wodurch der Fluorophor wahrscheinlich zu erhöhten Wechselwirkungen mit den umliegenden Nukleotiden gezwungen wird, die eine Senkung der Fluoreszenzintensität nach sich ziehen.

Um eine starke Wechselwirkung der Fluorophore zu vermeiden, wurden siRNA-Duplexe synthetisiert, die die Fluorophore durch ein A-U-Basenpaar voneinander trennen. Für diese Oligonukleotide wurden die „Click“-Bausteine **cAraU** und **cL** verwendet. Auf die Synthese der **cU**-Sequenzen wurde verzichtet, da diese in den ersten Versuchen stets die schlechtesten Ergebnisse lieferten und auch durch Erhöhung des Abstands keine Verbesserung erwartet wurde. Die Anzahl der A-U- und G-C-Basenpaare wurde beibehalten, sodass Unterschiede in den Schmelztemperaturen direkt auf Farbstoff-Wechselwirkungen zurückgeführt werden können und nicht durch Sequenzunterschiede verursacht werden.

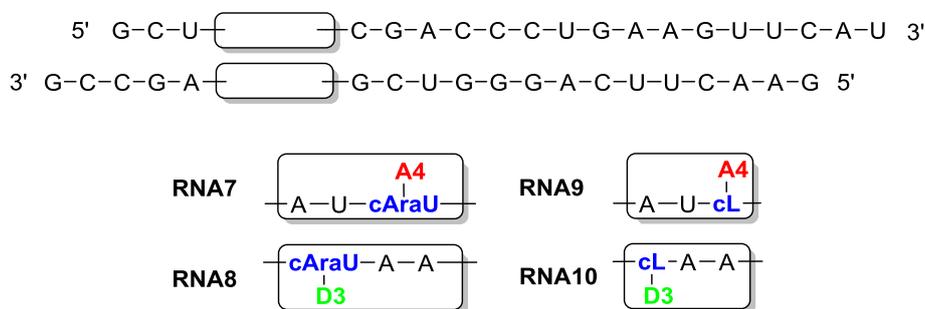


Abbildung 38: Sequenzen der siRNA-Stränge **RNA7 – RNA10**.

Abbildung 39 zeigt die Fluoreszenz der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge sowie der doppelt modifizierten ET-Sonden. Die gepunkteten Linien entsprechend dem ET-Paar ohne trennendes A-U-Basenpaar, die durchgezogenen Linien dem ET-Paar mit trennendem Basenpaar. Die Abstandsvergrößerung der Fluorophore in **RNA7-8** erzielte eine Verbesserung des Kontrastverhältnisses von 9.3 (**RNA3-4**) auf 13.7 (s. Tabelle 12) und ging einher mit der Senkung der Schmelztemperatur des RNA-Duplexes um 1 °C. Weiterhin wurde die Intensität der Akzeptorfluoreszenz im ET-Paar um 60 % gesteigert. Diese Resultate zeigen, dass die Erhöhung der Distanz zwischen den Fluorophoren die excitonischen Wechselwirkungen vermindert und den Energietransfer weiter verbessert.

Die spektroskopische Charakterisierung der cL-modifizierten siRNA-Stränge **RNA9** und **RNA10** lieferten für die durch ein A-U-Basenpaar getrennten Fluorophore sehr ähnliche Ergebnisse. Das Kontrastverhältnis konnte durch die erweiterte Distanz von 8.4 auf 26.3 gesteigert werden, ergab jedoch keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität und spricht für eine Optimierung des Abstands und Orientierung der Fluorophore. Dies bestätigt sich mit der verminderten Schmelztemperatur und dem Verlauf des Absorptionsspektrums, welches für **RNA9-10** ein 1:1-Verhältnis der Donor- und Akzeptormaxima und nicht wie bei **RNA5-6** eine verringerte Akzeptor-Extinktion zeigt.

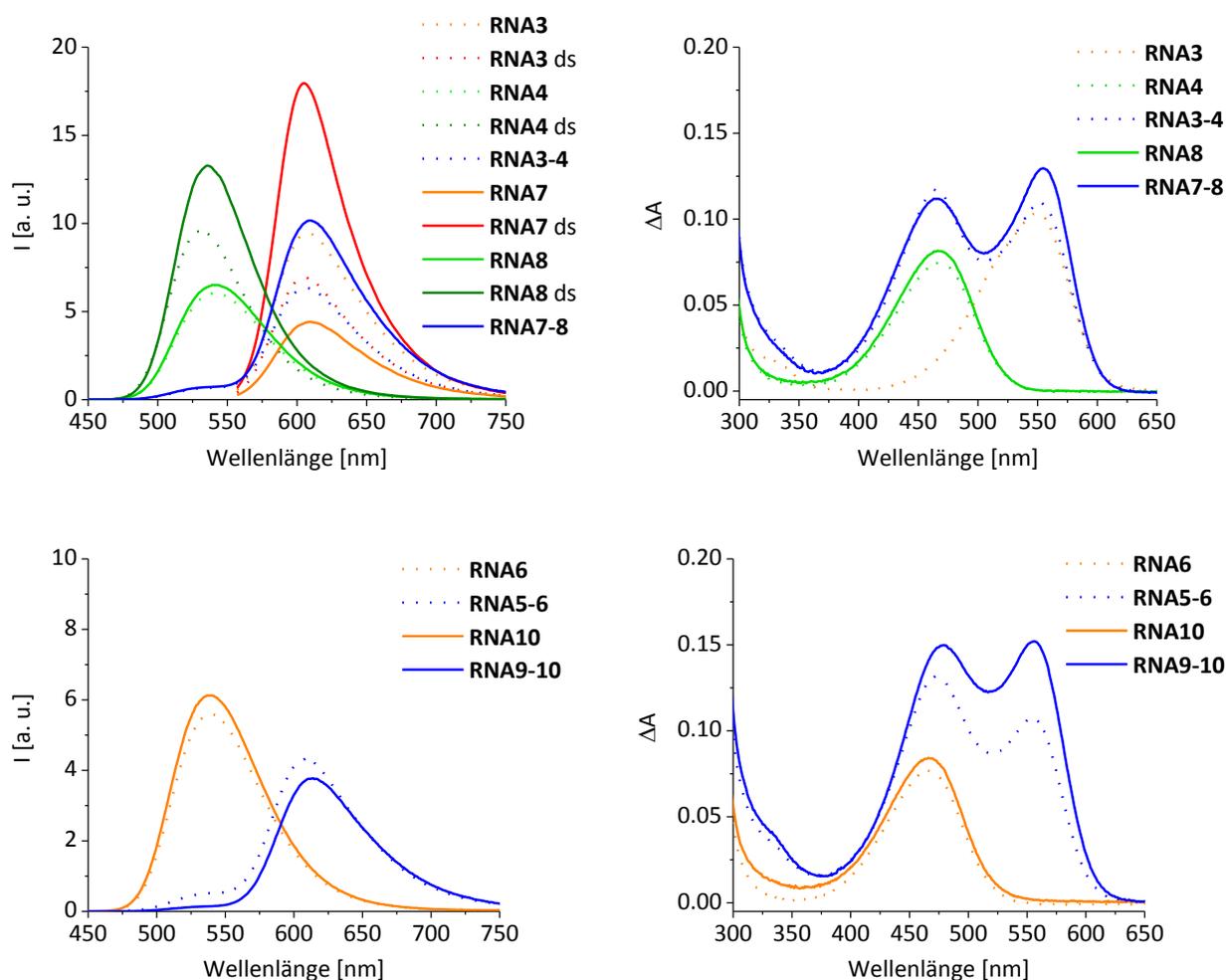


Abbildung 39: Fluoreszenz- (links) und Absorptionsspektren (rechts) der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge **RNA3**, **RNA4**, **RNA6**, **RNA7**, **RNA7** und **RNA10** sowie der doppelt modifizierten Duplexe **RNA3-4**, **RNA5-6**, **RNA7-8** und **RNA9-10**. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm und 542 nm (**RNA4** & **RNA8**); Spaltbreite: 3/3. [Die Spektren für **RNA3**, **RNA3 ds**, **RNA4 ds**, **RNA7**, **RNA7 ds** und **RNA8 ds** wurden an einem anderen Spektrometer aufgenommen, weshalb diese Spektren mit den zuvor gemessenen ins Verhältnis gesetzt wurden, um eine Vergleichbarkeit zu erhalten.]

Tabelle 12: Kontrastverhältnisse I_A/I_D und Schmelztemperaturen T_m der siRNA-Energietransferpaare **RNA7-8** und **RNA9-10** sowie **RNA3-4** und **RNA5-6** zum Vergleich.

	I_A/I_D	T_m [°C]		I_A/I_D	T_m [°C]
RNA3-4	9.3	82.5	RNA5-6	8.4	83.6
RNA7-8	13.7	81.5	RNA9-10	26.3	82.5

Tabelle 13: Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_F der Einzel- und Doppelstränge von **RNA3**, **RNA4**, **RNA7** und **RNA8**.

	ϕ_F	λ_{exc} [nm]		ϕ_F	λ_{exc} [nm]
RNA3	0.346	542	RNA7	0.323	542
RNA3 ds	0.299	542	RNA7 ds	0.663	542
RNA4	0.451	435	RNA8	0.409	435
RNA4 ds	0.647	435	RNA8 ds	0.702	435
RNA3-4	0.319	435	RNA7-8	0.490	435

Für die Anwendung innerhalb der Zelle ist jedoch das Verhalten der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge interessant. **RNA4** zeigt nach der Hybridisierung mit dem unmodifizierten, komplementären Gegenstrang eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um 58 % sowie der Quantenausbeute um 43 % (s. Abbildung 39 und Tabelle 13). **RNA8 ds** zeigt aufgrund der veränderten Basenumgebung sogar eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität um 89 % und eine Steigerung der Quantenausbeute um 72 %.

Dieses Verhalten ist hilfreich bei der Verfolgung der Genregulierung durch die siRNA. Nachdem der RISC die doppelsträngige siRNA gebunden hat, wird der Sense-Strang, also der akzeptormodifizierte RNA-Strang, ausgeschleust, sodass die donormodifizierte RNA zunächst einzelsträngig vorliegt. Wird nun die Ziel-mRNA gebunden, liegt ein Doppelstrang vor und die Fluoreszenz des Donor-Fluorophors wird durch die veränderte Umgebung erhöht. In den verschiedenen Zuständen des Donors, d.h. im siRNA-Doppelstrang, im Einzelstrang und im Doppelstrang mit unmodifiziertem Gegenstrang hat dieser verschiedene Quantenausbeuten sowie Fluoreszenzintensitäten. Erhöht sich die Quantenausbeute, so wird das absorbierte Licht nun weniger in nicht-strahlende Kanäle geleitet, wodurch die Fluoreszenzlebenszeit des

Donor-Fluorophors beeinflusst wird (ϕ_F ist direkt abhängig von τ_D). Die unterschiedlichen Fluoreszenzlebenszeiten können mittels neuartiger Einzelmolekülspektroskopie-Methoden, insbesondere der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM: *Fluorescence-lifetime imaging microscopy*), direkt innerhalb der Zelle gemessen werden. Somit wäre es möglich, Daten über den genauen Bindungszustand (einzel- oder doppelsträngig) des Antisense-Strangs zu erhalten.

Um die Eignung des RNA-Duplexes **RNA3-4** für die Untersuchung *in vivo* mittels Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie zu ermitteln, wurden in Zusammenarbeit mit *M. Bichelberger* aus der Arbeitsgruppe *Nienhaus* Lebenszeiten des ET-Duplexes, der einfach modifizierten Einzelstränge sowie des einfach modifizierten Donor-Doppelstrangs bestimmt. Diese Messungen wurden ebenfalls für die **cU**-Konformation (**RNA1-2**) durchgeführt

Für die Ermittlung der Fluoreszenzlebenszeiten wurde die Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (engl.: *time correlated single photon counting*, TCSPC) verwendet. Hierbei wird die Probe mit einem Laserpuls angeregt und die Zahl der ankommenden Photonen zu jeder Zeit nach dem Anregungspuls gezählt. Die logarithmische Auftragung der Intensität (entspricht Anzahl der Photonen zu einem bestimmten Zeitpunkt) gegen die Zeit zeigt für alle gemessenen Proben ein deutlich unterschiedliches Abklingverhalten (s. Abbildung 40).

Für alle Proben wurde ein biexponentielles Verhalten der Abklingkurven ermittelt und damit jeweils zwei Lebenszeiten pro Probe erhalten. Die Existenz mehrerer Lebenszeiten wird in der Regel auf das Vorhandensein verschiedener Konformationen innerhalb einer Probe zurückgeführt. Es kann für die gemessenen siRNA-Proben jedoch keine genaueren Aussagen über die Art dieser Konformationen gemacht werden, da keine detaillierten strukturellen Informationen über die RNA-Duplexe existieren. Die Betrachtung der prozentualen Verteilung der Lebenszeiten τ_1 , τ_2 und der gemittelten Lebenszeit τ_{av} (s. Tabelle 14) zeigt für **cU** und **cAraU** bei den einzelnen Proben jeweils ähnlich Werte. Dies lässt vermuten, dass das Vorhandensein zweier Lebenszeiten und damit zweier Konformationen nicht von der Art der Anknüpfung abhängt, sondern durch die Fluorophore verursacht wird. Diese prozentuale Verteilung gibt jedoch keine Aussage darüber, wie die tatsächliche prozentuale Verteilung der beiden Konformationen ist.

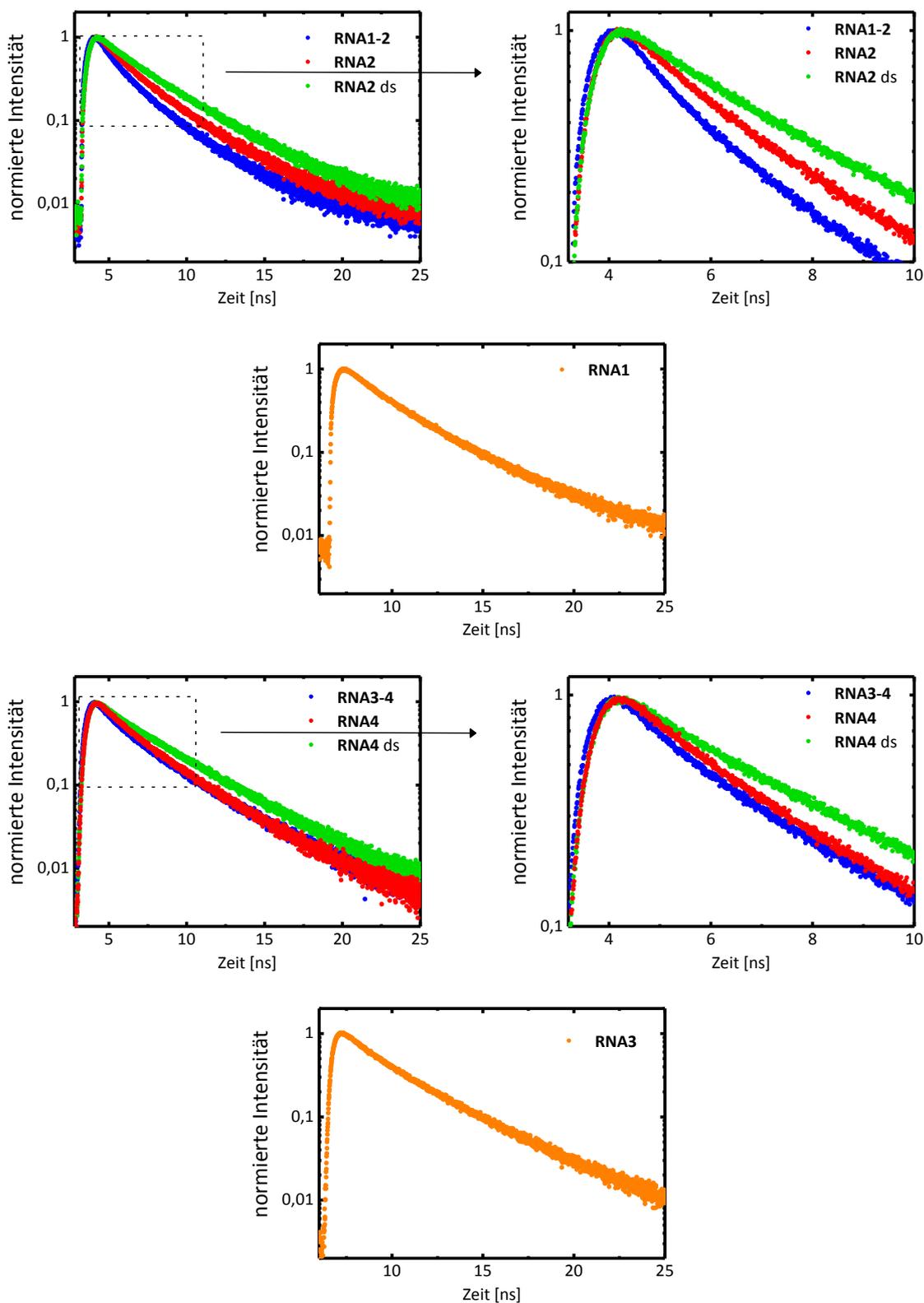


Abbildung 40: Links: Normierte Fluoreszenzabklingkurven der ET-Duplexe **RNA1-2** und **RNA3-4**, der einfachmodifizierten Donor-Einzelstränge **RNA2** und **RNA4**, der einfachmodifizierten Doppelsträng **RNA2 ds** und **RNA4 ds** sowie der einfachmodifizierten Akzeptoreinzelstränge **RNA1** und **RNA3**. Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der Fluoreszenzabklingkurven.

Tabelle 14: Fluoreszenzlebenszeiten τ_1 und τ_2 der siRNA-Proben sowie die prozentuale Verteilung der beiden Lebenszeiten innerhalb der gemittelten Lebenszeit τ_{av} .

	Anteil [%]	τ_1 [ns]	Anteil [%]	τ_2 [ns]	τ_{av} [ns]
RNA1-2	27	0.6	73	2.9	2.3
RNA1	18	1.0	82	3.6	3.1
RNA2	25	1.1	75	3.4	2.8
RNA2 ds	10	1.0	90	3.7	3.4
RNA3-4	20	0.7	80	3.5	3.0
RNA3	17	0.9	83	3.7	3.2
RNA4	23	1.3	77	3.6	3.1
RNA4 ds	10	1.2	90	4.1	3.8

Die zuvor beschriebene Abhängigkeit zwischen Fluoreszenzquantenausbeute und –lebenszeit spiegelt sich in den gemessenen Werten wieder. Die Erhöhung der Quantenausbeute des Donorfluorophors durch die Hybridisierung mit dem unmodifizierten Gegenstrang führt bei **RNA4** als auch bei **RNA2** zur einer Verlängerung der Fluoreszenzlebenszeit (s. Tabelle 14). Die Lebenszeit des Donors im ET-Paar ist stets die kürzeste aller gemessenen Lebenszeiten, da der ET-Transfer auf den Akzeptor sehr schnell erfolgt und dessen Fluoreszenz im **cU-** und **cAraU-** Energietransfer-Duplex stark gelöscht wird. Da die Donorfluoreszenz in **RNA1-2** stärker gelöscht ist als in **RNA3-4**, weist **RNA1-2** somit auch eine kürzere Lebenszeit als **RNA3-4** auf.

Für alle Zustände des Donors (im ET-Paar, einzelsträngig, doppelsträngig) werden unterschiedliche Fluoreszenzlebenszeiten erhalten, sodass die siRNA-Duplexe **RNA1-2** als auch **RNA3-4** für *in vivo* Untersuchungen mittels FLIM geeignet sind (s. Abbildung 41). Somit besteht die Möglichkeit, das genaue Verhalten der siRNA innerhalb der Zelle auf Einzelmolekülbasis zu ermitteln.

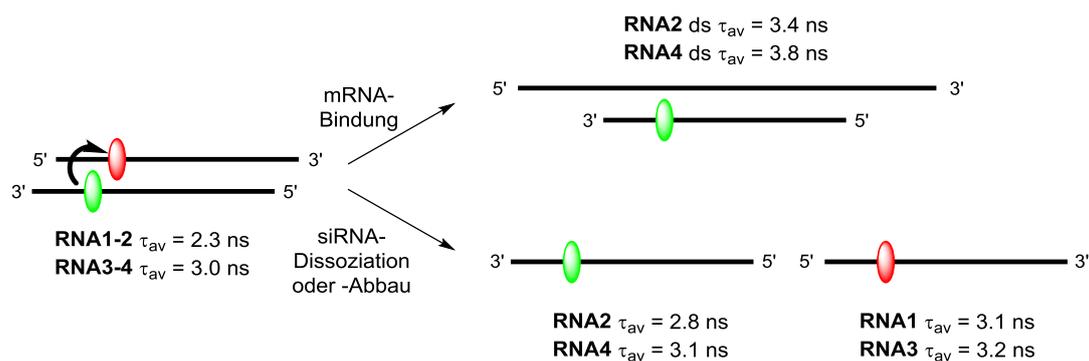


Abbildung 41: Schematische Darstellung der drei möglichen Zustände des Donorfluorophors sowie die jeweils gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten.

Bei der Untersuchung mittels FLIM werden stets nur die Donorlebenszeiten betrachtet, sodass **RNA1-2** ebenfalls ein Kandidat für diese Experimente wäre. Verglichen mit **RNA3-4** zeigt der Duplex **RNA1-2** sowie **RNA1 ds** und **RNA2**, größere Lebenszeitunterschiede und könnte somit aussagekräftigere Ergebnisse liefern. Möchte man die gleichen Proben jedoch ebenfalls mittels Konfokalmikroskopie verfolgen, so ist **RNA1-2** ungeeignet, da dieser Duplex nahezu keine Akzeptorfluoreszenz im ET-Paar zeigt.

4.3 *in vivo* Experimente

Nach der ausführlichen Untersuchung der siRNA-Sonden in *in vitro* Experimenten, wurden diese auch *in vivo* auf ihre Tauglichkeit geprüft. Hierfür wurde **RNA3-4** zunächst unter Verwendung eines lipoplexbildenden Transfektionsreagenzes in HeLa-Zellen transfiziert und dessen Fluoreszenz nach 24 h mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie visualisiert. Bei Anregung der Sonde mit 488 nm, sind die Donor- und Akzeptorfluoreszenz deutlich in den jeweiligen Kanälen zu erkennen (s. Abbildung 42, **A** und **B**). Die Fluoreszenz ist hauptsächlich punktuell und deutet darauf hin, dass sich die RNA in endosomalen Vesikeln befindet.

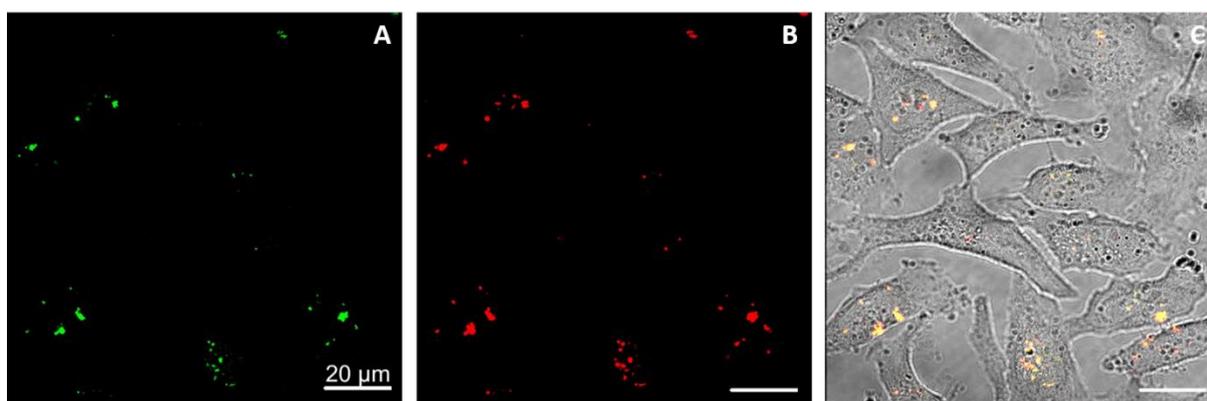


Abbildung 42: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von HeLa-Zellen 24 h nach der Transfektion von 15 pmol **RNA3-4**. Verwendete Parameter: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Ionen-Laser), $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}515 \text{ nm}$ (**A**), 675-800 nm (**B**).

Die synthetisierte siRNA-Sequenz ist komplementär zu Teilen der GFP-codierenden mRNA und ist somit in der Lage, dessen Expression auf Gen-Basis zu regulieren. Um die Aktivität der siRNA zu überprüfen, wurde in diesem Fall **RNA7-8**, welche ein besseres Kontrastverhältnis sowie eine bessere Fluoreszenzquantenausbeute zeigt, in GFP-transformierte HeLa-Zellen transfiziert. Die Visualisierung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgte 20 h nach der Transfektion (s. Abbildung 43, **B**). Zum Vergleich wurden ebenfalls Aufnahmen unbehandelter HeLa-GFP-Zellen angefertigt (s. Abbildung 43, **A**). Es ist zu erkennen, dass die unbehandelte Probe deutlich mehr grün emittierende Zellen zeigt, als die mit **RNA7-8** behandelte Probe. Ebenfalls ist in den Zellen, in denen die GFP-Expression herunterreguliert wurde, auch die Akzeptorfluoreszenz der transfizierten siRNA zu detektieren. Die Zellen in denen GFP nicht reguliert wurde, ist auch kaum Akzeptorfluoreszenz zu erkennen. Dies spricht dafür, dass **RNA7-8** in der Lage ist das GFP-Gen zu regulieren (s. Abbildung 43, vergrößerter Ausschnitt).

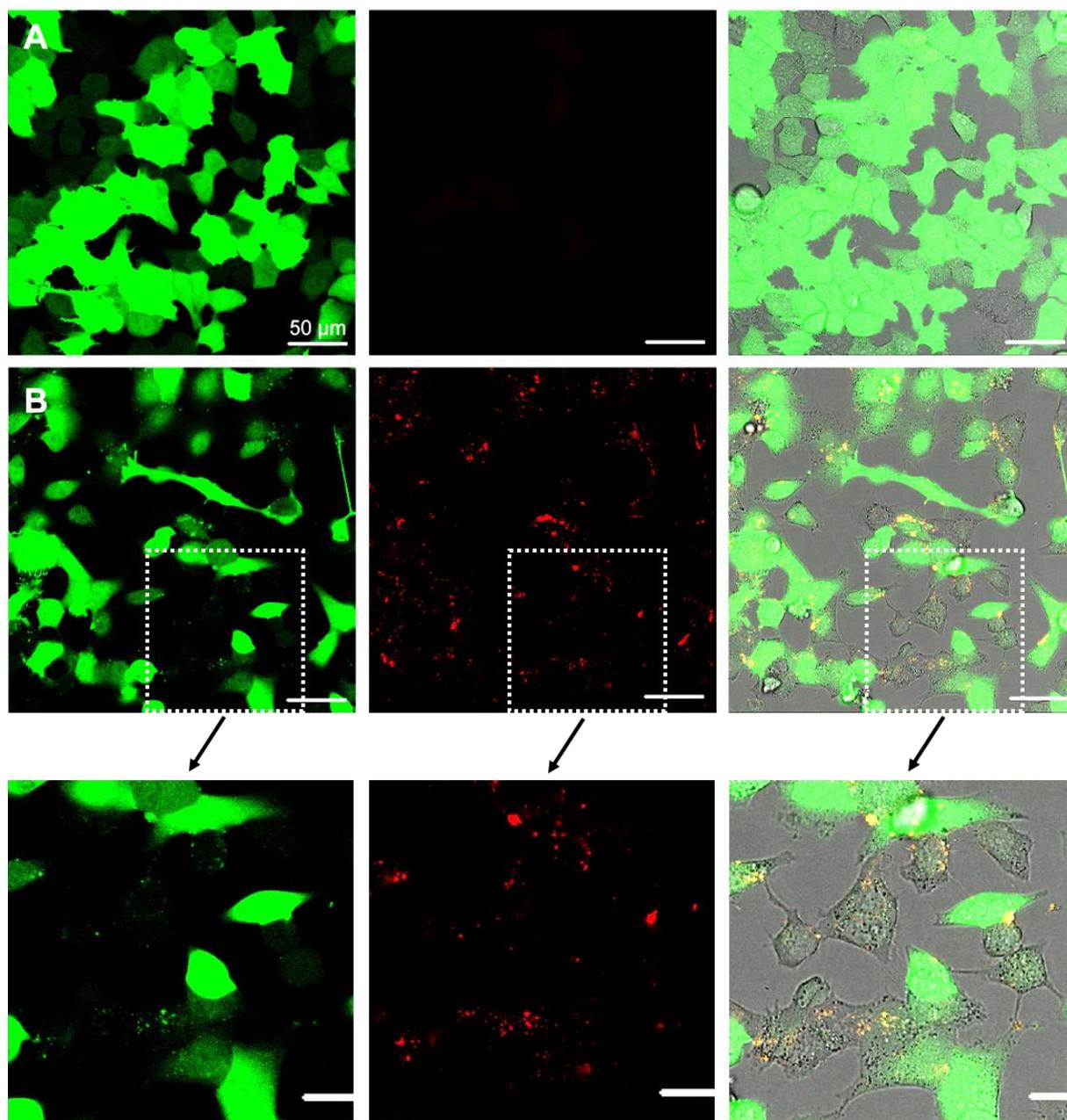


Abbildung 43: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von HeLa-GFP-Zellen (A) 20 h nach der Transfektion von 15 pmol **RNA7-8** (B). Verwendete Parameter: $\lambda_{exc} = 488$ nm (Argon-Ionen-Laser), $\lambda_{em} = 535$ -567 nm (erste Spalte), 675-800 nm (zweite Spalte).

Es ist zu beachten, dass diese Aufnahmen lediglich qualitative Aussagen über die Regulationsaktivität der verwendeten siRNA **RNA7-8** liefern und kein quantitatives Ergebnis. Ebenfalls ist zu beachten, dass die gezeigten Aufnahmen aus einem ersten Versuch stammen, die siRNA selbst und deren Aktivität in HeLa-GFP-Zellen zu visualisieren. Um genauere Informationen über die Aktivität und das Verhalten der siRNA in HeLa-GFP-Zellen zu erhalten, müssen weitere Zellexperimente durchgeführt werden.

Die verwendete Sequenz entspricht der von *C. Holzhauser* getesteten siRNA-Sequenz,^[39] wobei lediglich die Farbstoffe getauscht und der azyklische Linker durch Uridin ersetzt wurde. Somit ist davon auszugehen, dass auch die hier synthetisierte RNA in der Lage ist die GFP-Expression zu regulieren.

Zuletzt wurde die Toxizität der verwendeten siRNA-Duplexe **RNA3-4** und **RNA7-8** bestimmt. Um ermitteln zu können, ob eine mögliche Toxizität durch die Modifizierung mit Fluorophoren oder die Verwendung von Kupfer zur Modifizierung der RNA-Stränge resultiert, wurde zusätzlich die Toxizität von Referenz-Duplexen bestimmt. Hierfür wurde ein unmodifizierter siRNA-Duplex (**RNA ds**) mit der gleichen Sequenz verwendet sowie der gleiche unmodifizierte RNA-Duplex, der jedoch zuvor den „Click“-Bedingungen ausgesetzt war (**RNA ds/Cu**). Beim Vergleich der für die Transfektionen verwendeten Konzentration von 0.15 μM zeigt die unmodifizierte, unbehandelte und kommerziell erworbene siRNA die höchste Zelltoxizität verglichen mit den behandelten bzw. modifizierten Duplexen **RNA ds/cU** bzw. **RNA3-4** und **RNA7-8**. Das bedeutet, dass die postsynthetische Modifikation mittels kuper(I)katalysierter „Click“-Reaktion nicht für den Zelltod nach der Transfektion verantwortlich ist, sondern das Transfektionsreagenz selbst das giftigste für die Zelle ist.

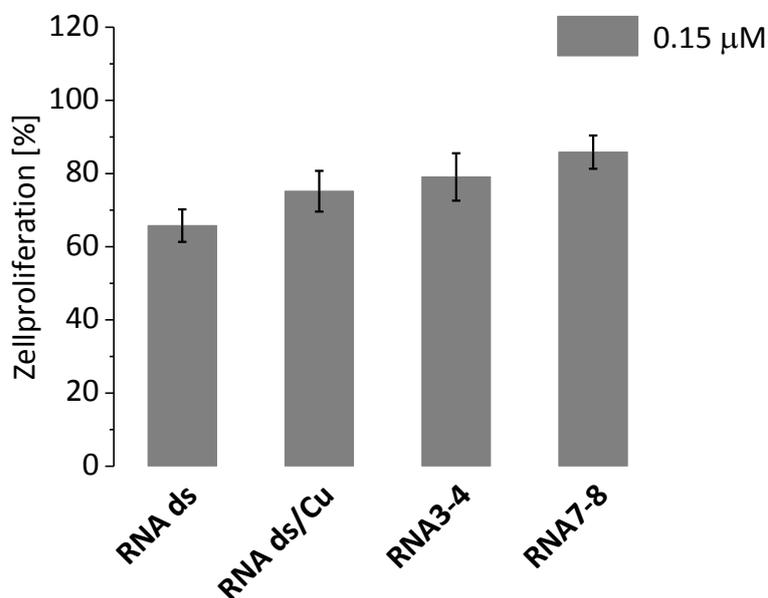


Abbildung 44: Toxizitätstest der siRNA-Duplexe **RNA3-4** und **RNA7-8** für eine Konzentration von 0.15 μM sowie der unmodifizierten Duplexe **RNA ds** und **RNA ds/Cu**. Die Zellproliferation ist in % angegeben, bezogen auf Zellen, die nur mit *ScreenFect A* behandelt wurden (100 %).

5 Wellenlängenverschiebende Aptasensoren

5.1 Einführung und Vorarbeiten

Die Bezeichnung „Aptamer“ ist eine Wortneuschöpfung der Wissenschaftler *Andrew Ellington* und *Jack Szostak*.^[114] Im Jahr 1990 berichteten sie über die Isolierung kurzer RNA-Stränge, die die Fähigkeit besitzen organische Farbstoffe zu binden.^[114] Der Begriff Aptamer setzt sich aus dem lateinischen Wort *aptus* (=passen) und dem griechischen Ausdruck *meros* (=Teil) zusammen und beschreibt damit das Schlüssel-Schloss-Prinzip zwischen dem Aptamer-Strang und seinem Zielmolekül.

Aptamere sind kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur in der Lage sind, ein Zielmolekül mit hoher Affinität und Selektivität zu binden. Das Oligonukleotid liegt dabei in Abwesenheit des Zielmoleküls (Ligand) als ungeordneter Einzelstrang vor (s. Abbildung 45). Durch Zugabe des Liganden bildet das Oligonukleotid eine charakteristische räumliche Struktur aus, die in der Lage ist den Liganden zu binden.

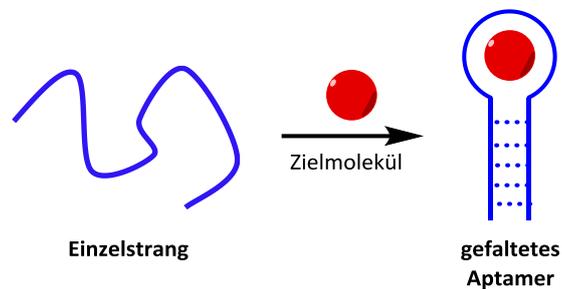


Abbildung 45: Funktionsprinzip eines Aptamers.

Zielmoleküle für Aptamere umfassen kleine Moleküle wie beispielsweise Metallionen,^[115] Adenosin bzw. Adenosintriphosphat (ATP),^[116–118] Steroide^[119] oder organische Farbstoffe^[120] sowie große Molekülen wie Antibiotika,^[121] Peptiden bzw. Proteinen^[122,123] bis hin zu Krebszellen.^[124,125] Die selektive Bindung des Zielmoleküls basiert auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen mit den Aromaten der Nucleobasen und elektrostatischen Wechselwirkungen (Van der Waals-, Ionen- und Dipolkräfte).

Die Identifizierung der Aptamer-Sequenzen erfolgt mit Hilfe von *in-vitro*-Selektionstechniken, der SELEX-Technologie (engl.: *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). Diese wurde zeitgleich mit der Publikation von *Ellington* und *Szostak* erstmals von *Craig Tuerk*

und *Larry Gold* beschrieben.^[126] Die Selektion der spezifischen Aptamer-Sequenz erfolgt ausgehend von einer randomisierten Oligonukleotid-Bibliothek (ca. 10^{15} – 10^{16} Sequenzen). Zunächst wird diese mit dem gewünschten Zielmolekül inkubiert und die bindenden von den nicht-bindenden Sequenzen separiert. Handelt es sich beim Zielmolekül um ein kleines Molekül, so wird dieses in der Regel auf einer festen Phase immobilisiert und die nicht-bindenden Sequenzen in einer Affinitätschromatographie abgetrennt. Anschließend erfolgt die Amplifizierung der bindenden Sequenzen mittels PCR, die dann die neue Bibliothek eines neuen Selektions-Separations-Amplifikations-Zyklus bildet. Dieser Zyklus wird so oft wiederholt, bis ein Aptamer mit ausreichend guter Selektivität und Affinität ermittelt werden konnte.

Aptamere haben einen vielseitigen Anwendungsbereich, wozu der Einsatz von Aptameren zu therapeutischen Zwecken gehört.^[127,128] Pegaptanib beispielsweise war das erste, von der FDA (engl.: *Food and Drug Administration*; dt.: Behörde für Lebens- und Arzneimittel) als Wirkstoff zugelassene Aptamer.^[129] Dabei handelt es sich um ein 27-nt langes, modifiziertes RNA-Aptamer, welches zur Behandlung von altersbedingter Makula-Degeneration (AMD, Erkrankung der Netzhaut) eingesetzt wird.^[129] Pegaptanib verlangsamt bzw. stoppt das Fortschreiten der Krankheit, indem es spezifisch an das Protein VEGF-A (engl.: *vascular endothelial growth factor*) bindet und dieses damit inhibiert. VEGF-A ist ein extrazelluläres Protein, welches für die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) sowie deren erhöhte Durchlässigkeit mitverantwortlich ist. Diese Faktoren sind entscheidend beim Verlust der Sehkraft im Zusammenhang mit AMD.^[129]

Aptamere können auch in sogenannten *Drug-Delivery-Systemen* beispielsweise zur Krebsbehandlung genutzt werden. Als *Drug-Delivery* wird die gezielte und selektive Freisetzung eines Wirkstoffs an einem gewünschten Ort bezeichnet. Für den Einsatz als *Drug-Delivery-System* verfügt das Aptamer zwei Bindungsstellen. Zunächst eine, die das Krebsmedikament bindet, und eine weitere, die eine hohe Affinität gegenüber den Krebszellen aufweist. Somit kann das Medikament gezielt an die gewünschte Stelle transportiert werden und verhindert ungewünschte bzw. toxische Nebenreaktionen durch unspezifische Adressierung des Krebsmedikaments.^[130,131] Weitere Anwendungsgebiete für Aptamere sind die medizinische Diagnostik sowie die *in vivo* Bildgebung mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Proteinbasierte Antikörper sind vor allem im Bereich der Diagnostik weit verbreitet und konkurrieren mit oligonukleotidbasierten Aptameren. Diese verfügen jedoch über eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern. Dazu gehört die vergleichbar einfache Synthese mittels chemischer Festphasensynthese. Sie ermöglicht nicht nur die Produktion des gewünschten Aptamers in großen Mengen, sondern ebenfalls die chemische Modifikation der Oligonukleotide. Durch die Einführung von speziellen Bausteinen kann ein Aptamer für nahezu jede gewünschte Anwendung angepasst werden. Durch Modifikation der Aptamerstränge beispielsweise mit fluoreszenten Reportermolekülen finden sie als Fluoreszenzsonden, sogenannten Aptasensoren, Anwendung.

Ähnlich wie bei den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen *Molecular Beacons*, erfolgt die Fluoreszenzmarkierung von Aptasensoren oft endständig und wird meist mit einem Fluoreszenzlöscher kombiniert.^[132] Somit kann die An- bzw. Abwesenheit des Zielmoleküls durch das Auftreten einer starken Fluoreszenzlöschung detektiert werden. Wie bereits erwähnt, birgt die Detektion mit Hilfe nur einer Wellenlänge die Gefahr von falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen. Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die Verwendung von FRET-Systemen anstelle der Kombination aus Fluorophor und Löscher. In Kapitel 2.2.2 wurde der, von der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelte, wellenlängenverschiebende Aptasensor beschrieben, welcher Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen.

Das verwendete Aptamer basiert auf einer 27-nt langen DNA-Sequenz, die 1994 von *Huizenga* und *Szostak* für die Zielmoleküle Adenosin und ATP selektiert wurde und zu einem der meist untersuchten Aptamere gehört.^[116] *Patel et al.* führten ausführliche NMR-Studien durch und waren dadurch in der Lage, genaue Strukturen des Aptamers in Anwesenheit des Zielmoleküls ATP bzw. AMP (Adenosinmonophosphat) zu erhalten.^[117] Die aromatischen Adenine gehen innerhalb der Bindungstasche mit den benachbarten nichtkanonischen Basenpaaren (G-G und G-A) π - π -Wechselwirkungen ein und werden zusätzlich durch Pseudo-Basenpaarungen (mit Guanin) stabilisiert (s. Abbildung 46, C).^[133] Die Phosphatgruppen zeigen aus dem Basenstapel heraus, weshalb für Adenosin, AMP und ATP ein ähnliches Bindungsverhalten erhalten wird (s. Abbildung 46, A und B).

Energietransfer von **TO** auf **TR** möglich und es sollte hauptsächlich die **TR**-Fluoreszenz ($\lambda_{em} = 670 \text{ nm}$) detektiert werden.

Abbildung 48 zeigt die Fluoreszenzspektren der Titration des Aptamer mit Adenosin (Ad). Bereits in Abwesenheit von Adenosin ist eine, für **TR** charakteristische Fluoreszenzbande bei 670 nm zu erkennen. Das heißt das Aptamer erfährt eine gewisse Vorhybridisierung, die auf die Verlängerung der Stamm-Region sowie auf Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Bei schrittweiser Erhöhung der Adenosin-Konzentration ist ein Absinken der Donorfluoreszenz und ein Ansteigen der Akzeptorfluoreszenz zu sehen. Das zeigt, dass die Bindung des Zielmoleküls und die damit verbundene Ausbildung der Aptamer-Struktur durch einen Wechsel der Fluoreszenzfarbe beobachtet werden kann.

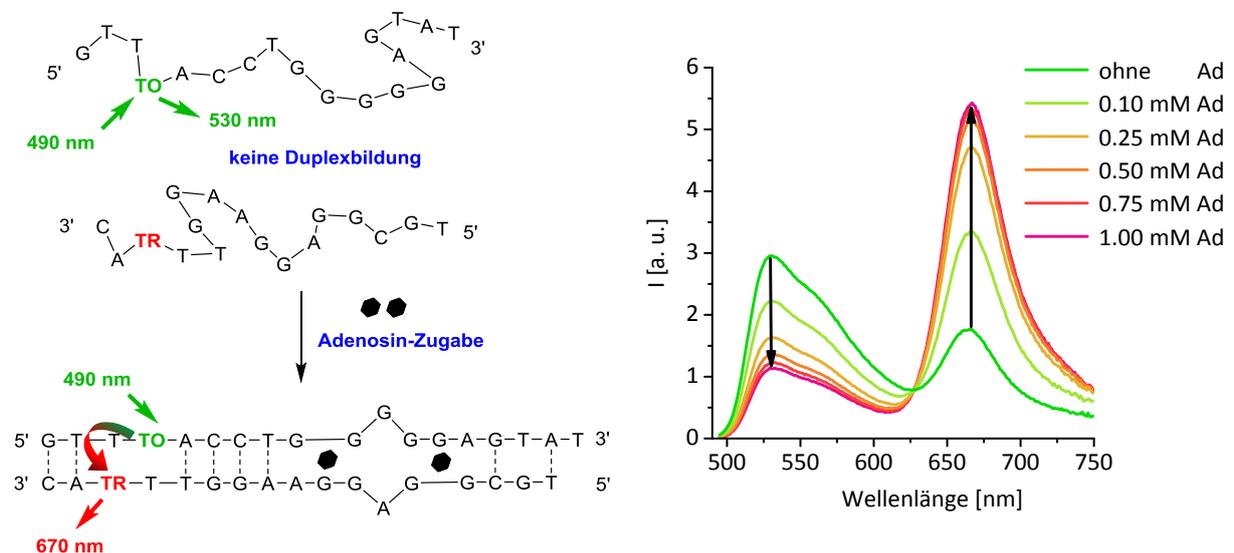


Abbildung 48: Links: Funktionsprinzip und Sequenzen des wellenlängenverschiebenden, adenosinbindenden Aptamers von C. Holzhauser. Rechts: Fluoreszenzspektren der Titration des adenosinbindenden Aptamers.^[44]

Diese Vorarbeiten sind die Grundlage dieser Arbeit. Im folgenden Kapitel sollen die Veränderungen und Optimierungen am bereits existierenden System erläutert werden.

5.2 Neues Konzept

Für die Optimierung und Weiterentwicklung des adenosinbindenden Aptamers wurde, wie zuvor für die wellenlängenverschiebenden siRNA-Sonden (s. Kapitel 4.2), von der Modifikation während der Festphasensynthese abgesehen und auf die postsynthetische Modifikation der DNA-Stränge mittels kupfer(I)katalysierter „Click“-Reaktion zurückgegriffen. Hierfür wurden die bereits bekannten „Click“-Bausteine **cU**, **cAraU** sowie **cL** eingesetzt (s. Abbildung 49). Weiterhin wurde statt der Cyanin-Farbstoffe **TO** und **TR** das weitaus photostabilere Energietransfer-Paar bestehend aus den Cyanin-Styryl-Farbstoffen **D3** und **A4** verwendet. Aufgrund ihrer sehr ähnlichen Fluoreszenzintensitäten können aussagekräftige Resultate über die Ab- bzw. Anwesenheit des Zielmoleküls erhalten werden.

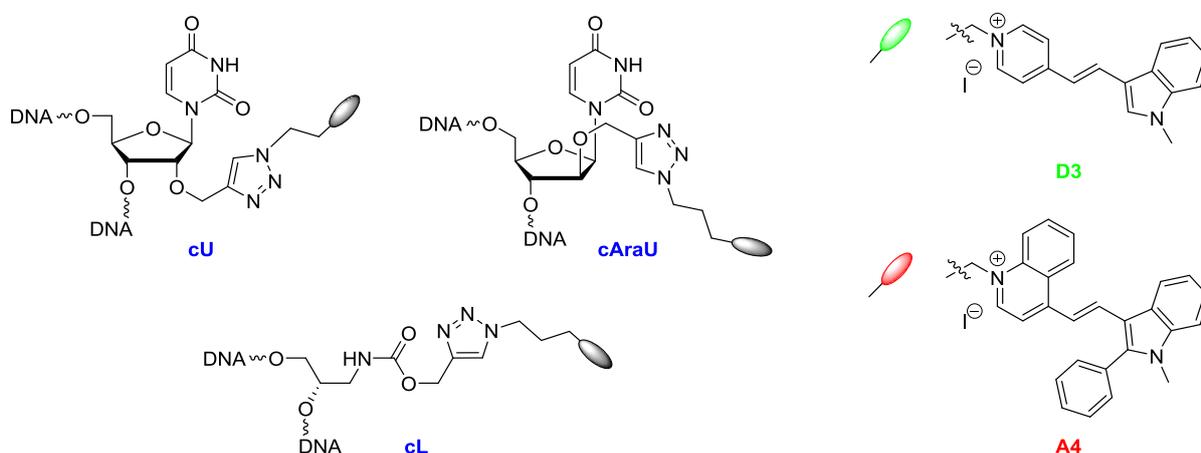


Abbildung 49: Strukturen der für die adenosinbindenden Aptamere verwendeten „Click“-Bausteine (**cU**, **cAraU**, **cL**) sowie der Cyanin-Styryl-Farbstoffe (**D3**, **A4**).

5.2.1 Doppelsträngige (geteilte) Aptamere

Zu Beginn wurde eine Aptamer-Bibliothek synthetisiert, die die „Click“-Bausteine **cU** und **cL** beinhaltet (s. Abbildung 50). Der Baustein **cAraU** existierte zum damaligen Zeitpunkt noch nicht und ist deswegen nicht Bestandteil der Bibliothek. Für die Fluorophore **D3** und **A4** wurde, wie bereits in den Kapiteln 3 und 4, eine diagonale Anordnung gewählt. Es wurden alle möglichen Fluorophor-Orientierungen für **cU** und **cL** synthetisiert, um die Kombination mit den bestmöglichen optischen Eigenschaften zu ermitteln. Die synthetisierte Sequenz entspricht dem von *C. Holzhauser* entwickelten adenosinbindenden Aptamer. Aus den Vorarbeiten war bekannt, dass ab einer Konzentration von 0.75 mM Adenosin die maximale

Ausbildung der Aptamere erreicht wurde. Deshalb wurde für die folgenden Messungen stets eine Konzentration von 1 mM gewählt, um die maximale Aptamer-Bildung zu garantieren.

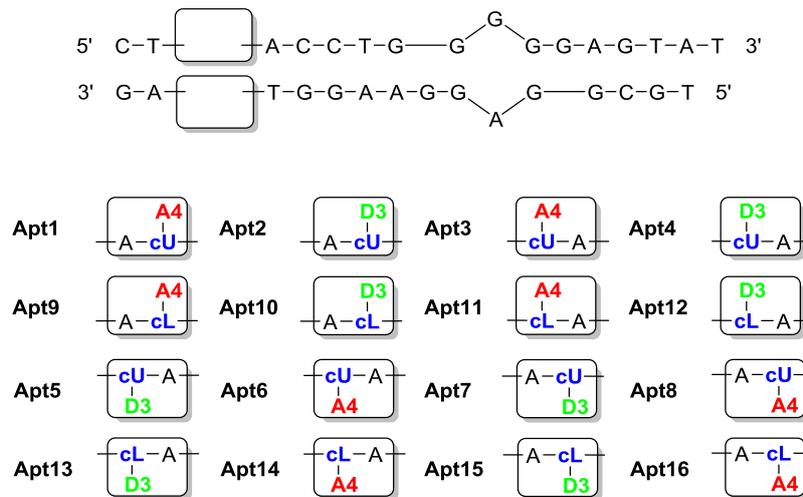


Abbildung 50: Sequenzen der farbstoffmodifizierten Aptamer-Bibliothek für die „Click“-Bausteine **cU** und **cL** bestehend aus **Apt1 – Apt16**.

Zur Evaluation der verschiedenen Kombinationen wurde das optische Verhalten der Homo- (**cU-cU** und **cL-cL**) und Heteropaarungen (**cU-cL** und **cL-cU**) ermittelt (s. Tabelle 15). Hierfür wurden Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in Ab- und Anwesenheit des Zielmoleküls Adenosin (Ad) durchgeführt (Spektren s. Kapitel 8.6.2) und anschließend die jeweiligen Kontrastverhältnisse I_A/I_D bestimmt. Der Quotient aus dem Kontrastverhältnis in Anwesenheit von Adenosin und dem Kontrastverhältnis ohne Adenosin ergibt den sogenannten Verstärkungsfaktor f ,^[42] der ebenfalls eine weitere wichtige Größe zur Beurteilung der Aptamer-Bibliothek darstellt (s. Formel VII).

$$f = \frac{I_A^{\text{mit Ad}}/I_D^{\text{mit Ad}}}{I_A^{\text{ohne Ad}}/I_D^{\text{ohne Ad}}} \quad (\text{VII})$$

Der ideale Aptasensor sollte ohne Zielmolekül keine Hybridisierung der beiden Einzelstränge aufweisen und demzufolge ein möglichst kleines Kontrastverhältnis zeigen. In Anwesenheit hingegen sollte das Kontrastverhältnis so groß wie möglich sein. Da der Verstärkungsfaktor der Quotient dieser beiden Werte ist, sollte auch dieser im idealen Aptasensor über einen hohen Wert verfügen. Jedoch kann nicht nur der Verstärkungsfaktor allein zur Beurteilung eines Aptasensors herangezogen werden, da dieser im Fall von stark gelöschter Fluoreszenz ebenfalls einen hohen Wert zeigt und damit ein falsches Bild des tatsächlichen optischen

Verhaltens liefert. Deshalb müssen stets auch die einzelnen Kontrastverhältnisse als auch die Fluoreszenzintensitäten betrachtet werden.

Tabelle 15: Kontrastverhältnisse I_A/I_D in Ab- und Anwesenheit von Adenosin (Ad) sowie der Verstärkungsfaktor f der homo- (links) und heterogepaarten (rechts) Aptamere.

	I_A/I_D 0 mM Ad	I_A/I_D 1 mM Ad	f		I_A/I_D 0 mM Ad	I_A/I_D 1 mM Ad	f
Apt1-5	0.28	1.35	4.80	Apt1-13	0.24	0.76	3.12
Apt2-6	0.37	2.38	6.48	Apt9-5	0.28	1.49	5.36
Apt3-7	0.28	0.70	2.51	Apt2-14	0.27	1.21	4.45
Apt4-8	0.26	1.10	4.19	Apt10-6	0.38	1.39	3.62
Apt9-13	0.16	1.16	7.28	Apt3-15	0.22	0.91	4.17
Apt10-14	0.23	0.75	3.18	Apt11-7	0.33	0.85	2.61
Apt11-15	0.34	1.33	3.87	Apt4-16	0.21	0.62	2.99
Apt12-16	0.22	0.55	2.48	Apt12-8	0.21	0.48	2.25

Diese Tatsache kann an den Aptasensoren **Apt2-6** und **Apt9-13** veranschaulicht werden. Würde die Evaluation ausschließlich nach dem Verstärkungsfaktor erfolgen, würde **Apt9-13** mit einem Wert von 7.28 als bestes Aptamer ermittelt werden. **Apt2-6** hingegen zeigt für f nur einen Wert von 6.48, aber weist, im Vergleich zu **Apt9-13**, ein besseres Kontrastverhältnis in Anwesenheit einer 1 mM Konzentration an Adenosin auf. Eine genaue Aussage kann deshalb erst nach der Betrachtung der Fluoreszenz- und Absorptionsspektren getroffen werden (s. Abbildung 51). **Apt9-13** weist ohne Adenosin eine fast doppelt so starke Donorfluoreszenz wie **Apt2-6** auf. Diese sinkt nach Adenosin-Zugabe zwar deutlich ab, jedoch überwiegt die Akzeptorfluoreszenz kaum merklich, was auf eine Fluoreszenzlöschung hindeutet. Die Fluoreszenz von **Apt2-6** ist deutlich schwächer, aber in Anwesenheit von 1 mM Adenosin ist eine eindeutige Zunahme der Akzeptorfluoreszenz sowie ein Absinken des Donorfluoreszenz zu erkennen. Der große Wert des Verstärkungsfaktors von **Apt9-13** resultiert, verglichen mit **Apt2-6**, nur aus dem kleineren Kontrastverhältnis ohne Zielmolekül.

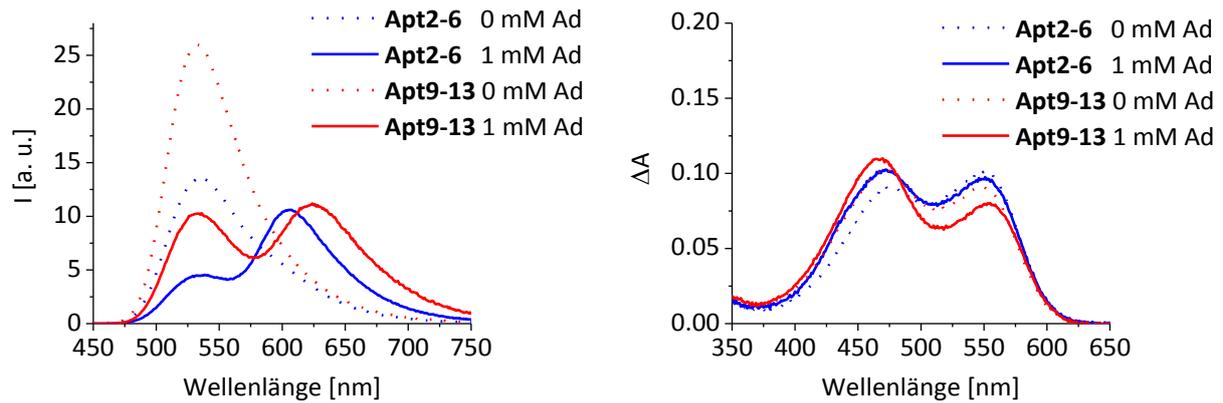


Abbildung 51: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der wellenlängenverschiebenden, adenosinbindenden Aptasensoren **Apt2-6** (blau) und **Apt9-13** (rot). Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

Die Absorptionsspektren von **Apt2-6** und **Apt9-13** bestätigen die Beobachtungen aus den Fluoreszenzdaten. In Anwesenheit von 1 mM Adenosin sinkt die Akzeptorextinktion bei **Apt9-13** während die Donorextinktion steigt und leicht hypsochrom verschoben ist. Das gleiche Verhalten wurde bereits in Kapitel 4, im Zusammenhang mit den wellenlängenverschiebenden siRNA-Sonden, beobachtet. Dieses trat, mit Ausnahme eines siRNA-Duplexes, immer zusammen mit einer Fluoreszenzlöschung auf, die bei **Apt9-13** ebenfalls beobachtet wird.

Basierend auf den Fluoreszenz- und Absorptionsdaten wurde **Apt2-6** als bestmögliche Fluorophororientierung ausgewählt und bildete damit die Grundlage für weitere Untersuchungen und Optimierungen des adenosinbindenden Aptamers.

Zur vollständigen Charakterisierung des ausgewählten Aptasensors **Apt2-6** wurde eine Titration mit Adenosin durchgeführt (s. Abbildung 52). Diese bestätigt die Ergebnisse der Vorarbeiten und zeigt, dass ab einer Konzentration von 0.75 mM Adenosin keine weitere Veränderung des Kontrastverhältnisses mehr zu erkennen ist und die maximal erreichbare Hybridisierung der Aptamere erzielt wurde. Deshalb wurden, wie zuvor erläutert, alle weiteren Messungen in Anwesenheit des Zielmoleküls weiterhin mit 1 mM Adenosin durchgeführt.

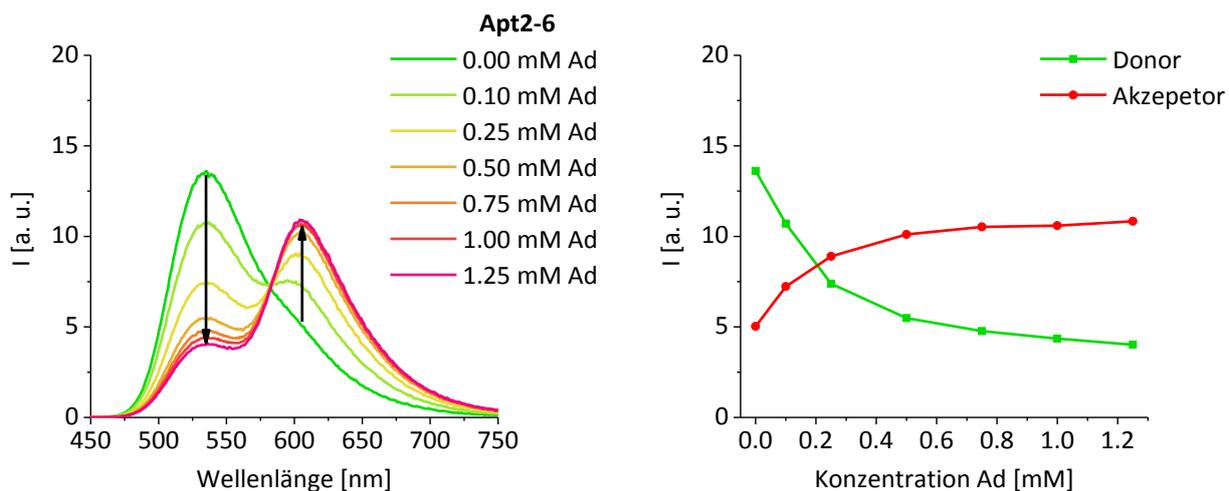


Abbildung 52: Rechts: Fluoreszenzspektren der Titration von **Apt2-6** mit Adenosin (Ad). Links: Verlauf der Donor- und Akzeptorfluoreszenzintensität mit zunehmender Adenosin-Konzentration. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

Für einige der Aptasensoren wurden zusätzlich Messungen bei tieferen Temperaturen (10 °C) durchgeführt, um den Einfluss auf die Zielmolekülbindung und den damit verbundenen ET zu untersuchen (s. Tabelle 16; Fluoreszenz- und UV-Vis-Spektren s. Kapitel 8.6.2).

Tabelle 16: Kontrastverhältnisse I_A/I_D einiger Aptasensoren in Anwesenheit von 1 mM Adenosin (Ad) bei 20 °C und 10 °C.

	I_A/I_D	I_A/I_D		I_A/I_D	I_A/I_D	
	1 mM Ad	1 mM Ad		1 mM Ad	1 mM Ad	
	20 °C	10 °C		20 °C	10 °C	
Apt9-13	1.16	1.46	Apt1-13	0.76	1.31	
Apt10-14	0.75	0.95		Apt9-5	1.49	2.08
Apt11-15	1.33	2.79		Apt2-14	1.21	2.16
Apt12-16	0.55	0.91		Apt10-6	1.39	1.58

In allen Proben wurde eine Erhöhung des Kontrastverhältnisses durch Senken der Temperatur erzielt. Das heißt, je kälter die Probe ist, desto geringer sind die Molekülbewegungen und desto besser wird das Zielmolekül vom Aptamer gebunden. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass die Schmelztemperaturen der Aptamer-Duplexe nur knapp über 20 °C liegen und diese auch mit Adenosin nicht mehr ausreichend hybridisieren. Das Senken der Temperatur bewirkt somit eine verstärkte Duplexausbildung, die eine Verbesserung des Kontrastverhältnisses

erzielt. Die tatsächlichen Schmelztemperaturen der Aptasensoren in Anwesenheit von Adenosin konnten nicht bestimmt werden, da diese Messungen auf einer Änderung der Absorption, bei der für DNA charakteristischen Wellenlänge von 260 nm, beruhen. Adenosin ist Bestandteil eines Oligonukleotids und absorbiert somit ebenfalls bei 260 nm. Bei einer Konzentration von 1 mM Adenosin wird jedoch das maximale Detektionsvermögen des UV-Vis-Spektrometers bei weitem überschritten, sodass keine Änderung der Absorption beim Erwärmen der Probe mehr zu detektieren ist.

Unter der Annahme, dass die Schmelztemperaturen der Aptasensoren zu gering sind, wurden neue Aptamere synthetisiert, deren Stamm-Region um ein A-T-Basenpaar erweitert wurde (s. Abbildung 53; **Apt17-18**). Zu diesem Zeitpunkt wurde der neue „Click“-Baustein erfolgreich synthetisiert, sodass die gleichen Sequenzen ebenfalls unter Verwendung von **cAraU** hergestellt wurden (**Apt19-20**).

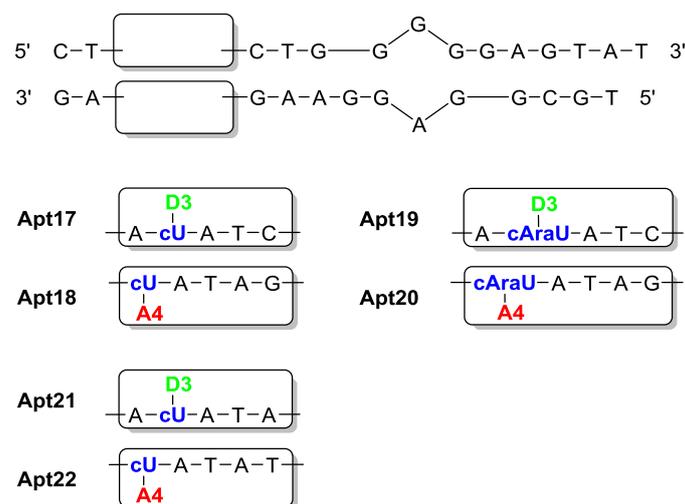


Abbildung 53: Sequenzen der Aptasensoren **Apt17 – Apt22**.

Die Verlängerung der Stamm-Region um ein Basenpaar führt zu einer deutlichen Verbesserung des Kontrastverhältnisses mit Adenosin von 2.38 auf 7.46 und damit auch zu einer Erhöhung des Verstärkungsfaktors von 6.48 auf 12.2 (s. Abbildung 54 und Tabelle 17). Der Grund hierfür liegt bei der Ausbildung bzw. Form der großen Furche. Wie bereits aus Kapitel 3 bekannt, positioniert **cU** die Fluorophore in der kleinen Furche der DNA-Helix. Aus NMR-Studien zum adenonsinbindenden Aptamer ist jedoch bekannt, dass dieses keine gewöhnliche Doppelhelix-Struktur aufweist. Die Verlängerung des Stamms bewirkt somit eine verbesserte Ausbildung der Helix und den Furchen, die dann eine optimierte Positionierung der Fluorophore erlaubt.

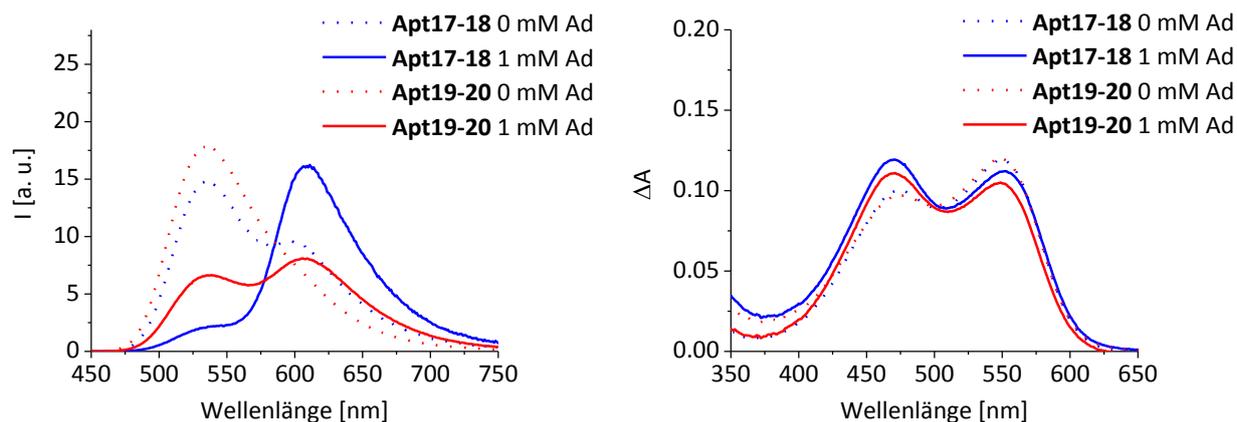


Abbildung 54: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der adenosinbindenden Aptasensoren **Apt17-18** (blau) und **Apt19-20** (rot). Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

Tabelle 17: Kontrastverhältnisse I_A/I_D in Ab- und Anwesenheit von Adenosin (Ad) sowie der Verstärkungsfaktor f der verlängerten homo- (links) und heterogepaarten (rechts) Aptamere **Apt17 – Apt20**.

	I_A/I_D 0 mM Ad	I_A/I_D 1 mM Ad	f		I_A/I_D 0 mM Ad	I_A/I_D 1 mM Ad	f
Apt17-18	0.61	7.46	12.2	Apt17-20	0.38	3.04	7.95
Apt19-20	0.37	1.21	3.28	Apt19-18	0.39	2.09	5.40

Der Fluoreszenzverlauf von **Apt17-18** in Abwesenheit des Zielmoleküls zeigt eine Schulter bei 605 nm. Es lässt sich schlussfolgern, dass die beiden Aptamereinzelsstränge teilweise miteinander wechselwirken und damit auch die Fluorophore in der Lage sind einen Energietransfer einzugehen. Die Verwendung des **cAraU**-Bausteins führt zu einer verminderten Vorhybridisierung des Aptasensors, die wahrscheinlich durch eine niedrigere Schmelztemperatur verursacht wird. Dieses Verhalten stimmt mit den Beobachtungen aus Kapitel 3 überein, in dem für **cAraU**-modifizierte Duplexe geringere Schmelztemperaturen als für **cU**-modifizierte Oligonukleotide ermittelt wurden. Die heterogepaarten Aptasensoren **Apt17-20** und **Apt19-18** zeigen ebenfalls keine Akzeptorfluoreszenzbande in Abwesenheit von Adenosin sowie ein verbessertes Kontrastverhältnis im Vergleich zur **cAraU-cAraU**-Kombination, jedoch keine Verbesserung zu **Apt17-18**.

Nachdem die Paarung aus zwei **cU**-Bausteinen weiterhin als beste Kombination evaluiert wurde, sollte die Schmelztemperatur des Aptasensors **Apt17-18** gesenkt werden. G-C-Basenpaare liefern einen größeren Beitrag zur Schmelztemperatur als A-T-Basenpaare, sodass das zuvor eingeführte G-C-Basenpaar durch ein A-T-Basenpaar ersetzt wurde (s. Abbildung 53; **Apt21-22**). **Apt21-22** zeigt wie erwartet eine geringere Wechselwirkung der Fluorophore in Abwesenheit des Zielmoleküls (I_A/I_D (0 mM Ad) = 0.41), jedoch führte das Tauschen des Basenpaars auch zu einer Verminderung des Kontrastverhältnisses mit 1 mM Adenosin (I_A/I_D (1 mM Ad) = 2.30; Fluoreszenz- und UV-Vis-Spektren siehe Kapitel 8.6.2).

Apt17-18 ist folglich der doppelsträngige Aptasensor mit den besten optischen Eigenschaften zur Detektion von Adenosin. Um auch dessen Selektivität zu bestätigen, wurden Kontrolleexperimente unter Verwendung von Guanosin (G) anstelle von Adenosin durchgeführt. Das Fluoreszenzspektrum in Anwesenheit von 1 mM Guanosin entspricht dem in Abwesenheit eines Zielmoleküls (s. Abbildung 55) und zeigt, dass der entwickelte Aptasensor **Apt17-18** einen Wechsel der Fluoreszenzfarbe von grün nach rot nur bei der selektiven Bindung von Adenosin anzeigt.

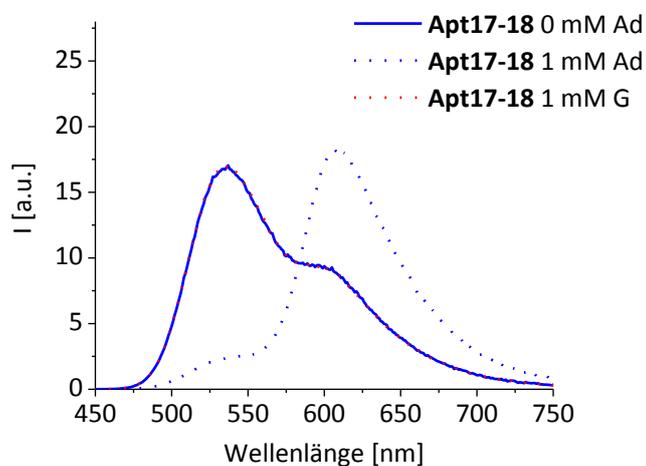


Abbildung 55: Fluoreszenzspektren des adenosinbindenden Aptasensors **Apt17-18** in Abwesenheit eines Zielmoleküls (blaue durchgezogene Linie) und in Anwesenheit von Adenosin (blaue gepunktete Linie) und Guanosin (rote gepunktete Linie). Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

5.2.2 Einzelsträngige Aptamere

Nach der Untersuchung der geteilten, doppelsträngigen Aptamere, sollte nun der ursprüngliche Einzelstrang und damit die Schleifenregion beibehalten werden. Da sich die Schleifenregion sehr nah an der Adenosin-Bindungstasche befindet, war davon auszugehen, dass die Sensitivität gegenüber dem Zielmolekül durch Erhaltung der Sequenz gesteigert werden kann. Dies erforderte die doppelte Markierung der DNA-Stränge, die durch ein sequenzielles „Click“-Verfahren bewerkstelligt wurde. Das heißt, dass zunächst das Oligonukleotid bis kurz vor den zweiten „Click“-Baustein synthetisiert wurde und anschließend die „Click“-Reaktion mit dem ersten Fluorophor, in diesem Fall dem Akzeptor **A4**, auf der festen Phase erfolgte. Die Festphasensynthese wurde danach fortgesetzt und der zweite „Click“-Baustein in den DNA-Strang integriert. Die zweite „Click“-Reaktion mit dem Donorfluorophor **D3** erfolgte ebenfalls auf der festen Phase. Aufgrund der Basenlabilität der verwendeten Cyanin-Styryl-Farbstoffe, musste auf spezielle Phosphoramidite, die sogenannten *Ultramild*-Basen,^[134,135] zurückgegriffen werden. Diese verfügen über ein anderes Schutzgruppenkonzept, welches die Abspaltung von der festen Phase und die Entfernung der Aminschutzgruppen unter schwach basischen Bedingungen ermöglicht (s. Kapitel 8.3.2).

Zunächst wurden die Aptamere **Apt23** und **Apt24** synthetisiert, die auf der Sequenz des Aptasensors **Apt2-6** basieren (s. Abbildung 56). Das in der Stammregion verlängerte Aptamer **Apt17-18** besitzt zwar ein besseres Kontrastverhältnis, jedoch wurde davon ausgegangen, dass die Erhöhung der Schmelztemperatur, die durch die Verlängerung der Stammregion erzielt werden sollte, durch den Erhalt der Schleifenregion kompensiert wird. Somit wurde **Apt2-6** anstelle von **Apt17-18** als Grundlage für die einzelsträngigen Aptamere gewählt.

Apt23 weist die Originalsequenz auf, die aus einer A-T-T-Schleife besteht. In **Apt24** wurde die A-T-T-Schleife durch zwei Polyethylenglykol-Linker (PEG) ersetzt. Der flexible PEG-Linker wurde eingesetzt, um eine zu starke Stabilisierung des Aptamers durch den Erhalt der Schleifenregion zu vermeiden. Da jedoch aus anderen Arbeiten des Arbeitskreises *Wagenknecht* bekannt war, dass die Verwendung des PEG-Linkers eine Erhöhung der Schmelztemperatur bewirkt,^[41] wurden zwei PEG-Bausteine direkt hintereinander in das Aptamer integriert.

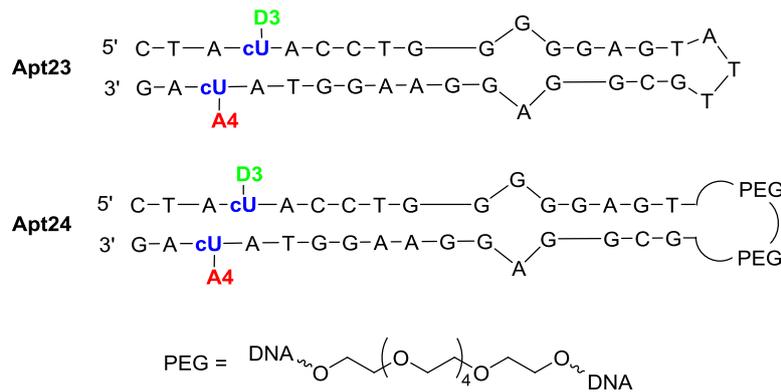


Abbildung 56: Sequenzen der farbstoffmodifizierten, einzelsträngigen Aptamere **Apt23** und **Apt24** sowie Strukturformel des PEG-Bausteins.

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Aptasensoren zeigte, dass diese bereits ohne Zielmolekül eine starke Ausbildung des Doppelstrangs erfahren und damit einen Energietransfer vom Donor- auf das Akzeptorfluorophor aufweisen. Im Fall von **Apt23** beträgt das Kontrastverhältnis ohne Adenosin 10.9 und in Anwesenheit einer 1 mM Konzentration an Adenosin 18.7 (s. Tabelle 18). Das bedeutet eine Steigerung des Kontrastverhältnisses in Anwesenheit von Adenosin um fast 700 % im Vergleich zum doppelsträngigen Aptamer **Apt2-6**. Weiterhin kann daraus geschlussfolgert werden, dass in den geteilten Aptameren keine optimale Hybridisierung der beiden Einzelstränge erfolgt und somit der Energietransfer nicht effizient verläuft. Die Schmelztemperatur des Aptamers liegt weit über der Messtemperatur von 20 °C (s. Tabelle 18) und erklärt die Hybridisierung ohne Zielmolekül.

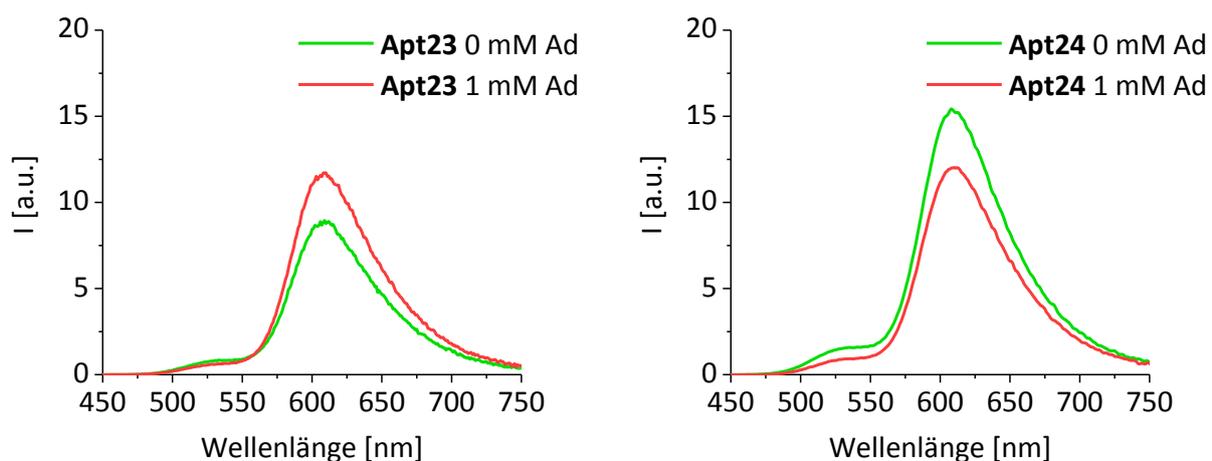


Abbildung 57: Fluoreszenzspektren der einzelsträngigen Aptasensoren **Apt23** (links) und **Apt24** (rechts) in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Adenosin. Verwendete Parameter: $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/3; 20 °C.

Tabelle 18: Kontrastverhältnisse I_A/I_D in Ab- und Anwesenheit von Adenosin (Ad), Verstärkungsfaktor f sowie die Schmelztemperatur T_m der einzelsträngigen Aptamere **Apt23** und **Apt24**.

	I_A/I_D	I_A/I_D	f	T_m [°C]
	0 mM Ad	1 mM Ad		0 mM Ad
Apt23	10.9	18.7	1.71	57.9
Apt24	9.82	13.0	1.32	55.3

Das Ersetzen der A-T-T-Schleife durch zwei PEG-Bausteine bewirkt eine Verringerung der Schmelztemperatur um 2.6 °C. Dies reicht jedoch nicht aus, um eine Hybridisierung des Aptamers ohne Adenosin zu verhindern. **Apt24** weist ein Kontrastverhältnis von 9.82 ohne bzw. 13.0 mit Adenosin auf.

Da die Schmelztemperaturen der einzelsträngigen Aptamere **Apt23** und **Apt24** weit über 20 °C liegen, ist eine Senkung der Schmelztemperatur durch Modifizierung der Aptamersequenz nicht mehr möglich. Inspiriert durch die Arbeitsgruppe *Stojanovic* wurde ein Aptasensor synthetisiert, welcher durch Hybridisierung mit einem unmodifizierten Gegenstrang geöffnet werden soll.^[118] Nach Zugabe von Adenosin soll der Gegenstrang verdrängt werden, da die Bindung des Zielmoleküls eine größere thermodynamische Stabilisierung des Aptamers bewirkt.

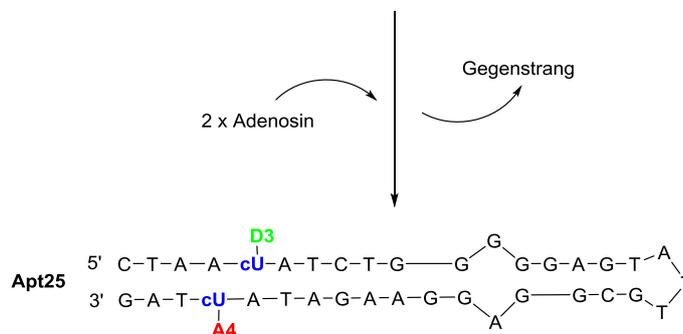
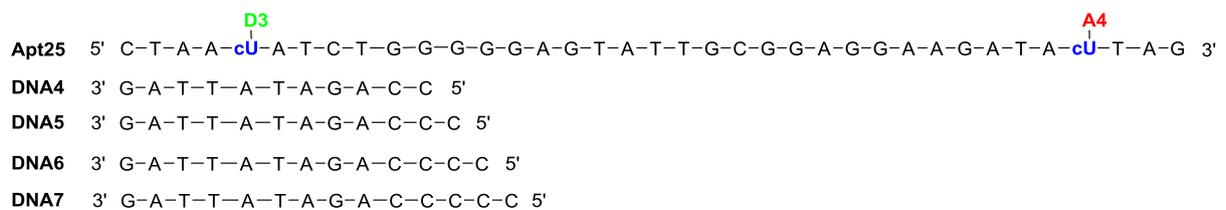


Abbildung 58: DNA-Sequenz des einzelsträngigen Aptasensors **Apt25**, den unmodifizierten Gegensträngen **DNA4** bis **DNA7** sowie das Funktionsprinzip des Strangaustausches.

Für dieses Strangaustausch-Experiment wurde **Apt25** synthetisiert (s. Abbildung 58). **Apt25** verfügt über einen um ein Basenpaar verlängerten Stamm, in dem ein G-C-Basenpaar durch eine A-T-Basenpaar ausgetauscht wurde. Diese Veränderungen wurden durchgeführt, um die Schmelztemperatur mit dem Gegenstrang zu modifizieren.

Für das Öffnen des Aptasensors wurden vier unterschiedlich lange Oligonukleotide (**DNA1 – DNA4**) verwendet, deren berechnete Schmelztemperaturen mit **Apt25** zwischen 30 °C und 38 °C liegen. Zur Ermittlung des geeigneten Gegenstrangs wurde **Apt25** mit dem jeweiligen Oligonukleotid hybridisiert und dessen Fluoreszenz aufgezeichnet (s. Abbildung 59).

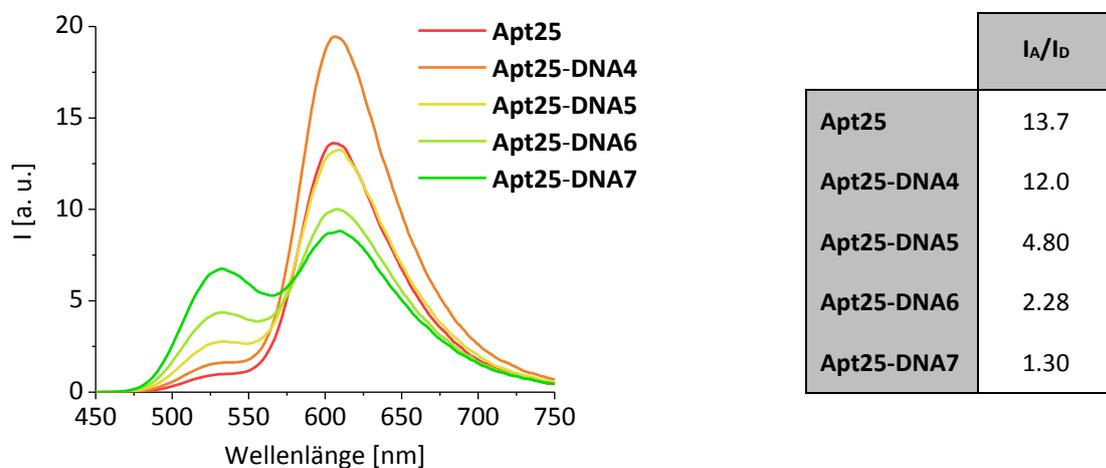


Abbildung 59: Links: Fluoreszenzspektren der Duplexe aus **Apt25** mit **DNA4** bis **DNA7**. Rechts: Kontrastverhältnisse I_A/I_D der Duplexe **Apt25-DNA4** bis **Apt25-DNA7**. Verwendete Parameter: $\lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/3; 20 °C.

Mit zunehmender Länge des Gegenstrangs ist eine deutliche Abnahme des Kontrastverhältnisses zu verzeichnen. Es ist jedoch auch zu erkennen, dass 14 Basenpaare (**Apt25-DNA7**) nicht ausreichen, um das Aptamer komplett zu öffnen bzw. die Fluorophore voneinander zu trennen. Diese Aussage wird durch die Schmelztemperatur von **Apt25** gestützt. Sie beträgt 56.9 °C und liegt weit unter den berechneten Werten für die Duplexe bestehend aus dem Aptamerstamm und den unmodifizierten DNA-Strängen, sodass die thermodynamische Triebkraft zur Bildung des Aptamers weiterhin größer ist. Es ist auch denkbar, dass das Aptamer zwar geöffnet vorliegt, jedoch der ungepaarte Überhang, der den Akzeptorfluorophor beinhaltet, trotzdem in räumliche Nähe gelangt und es daher zu einem Energietransfer kommt. Dies könnte ebenfalls erfolgen, wenn das Aptamer und der Gegenstrang eine Art Triple-Helix bilden.

Apt25-DNA7 wurde für das Strangaustausch-Experiment ausgewählt und in Ab- und Anwesenheit von Adenosin fluoreszenzspektroskopisch vermessen (s. Abbildung 60). Es ist zwar ein Unterschied zwischen den Fluoreszenzspektren mit und ohne Zielmolekül zu erkennen, dieser äußert sich jedoch ausschließlich in einer Löschung der Fluoreszenzintensität. Dies deutet zum einen darauf hin, dass der Gegenstrang durch Zugabe von Adenosin möglicherweise nicht ausreichend verdrängt werden kann. Zum anderen kann die Fähigkeit zur Adenosin-Bindung verloren gehen, da ein zu langer Gegenstrang gewählt wurde, der bis in die Bindungstasche reicht. Adenosin kann nur gebunden werden, wenn die Basen, die für die Erkennung des Adenosins zuständig sind, ungepaart vorliegen.

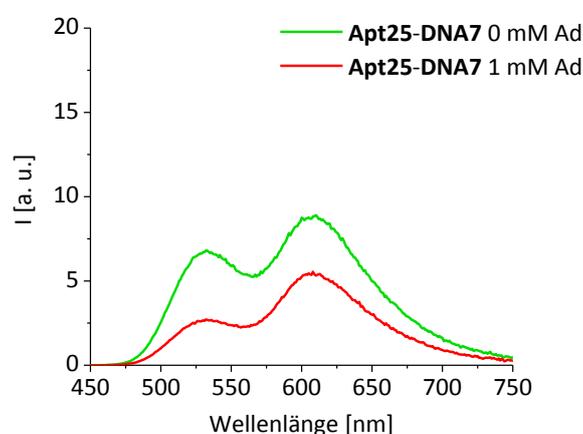


Abbildung 60: Fluoreszenzspektren des Aptamer-DNA-Duplexes **Apt25-DNA7** in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Adenosin. Verwendete Parameter: $\lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/3; 20 °C.

Das von *Stojanovic et al.* verwendete System besteht aus einem Aptamer, welches am 5'-Ende einen 5-nt langen ungepaarten Überhang aufweist, um einen längeren Gegenstrang wählen zu können, der somit nicht mehr in die Adenosin-Bindungstasche reicht.^[118] Es wurde ein weiterer doppeltmodifizierter Aptasensor synthetisiert, der am 5'-Ende über einen 6-nt langen Überhang verfügt (s. Abbildung 61). Als Gegenstrang wurde ein 16-nt langes Oligonukleotid gewählt, welches 11 Basenpaare mit **Apt26** bzw. 7 Basenpaare mit der originalen Aptamersequenz ausbilden kann.

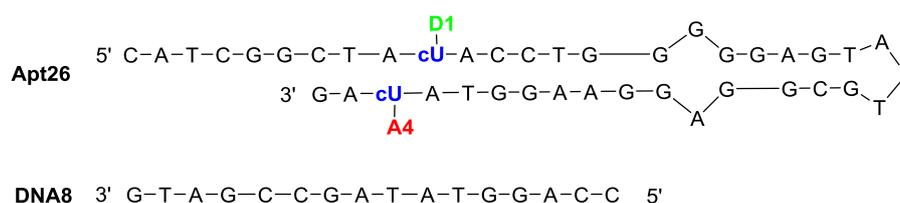


Abbildung 61: Sequenz des doppeltmodifizierten Aptasensors **Apt26** sowie des Gegenstrangs **DNA8**.

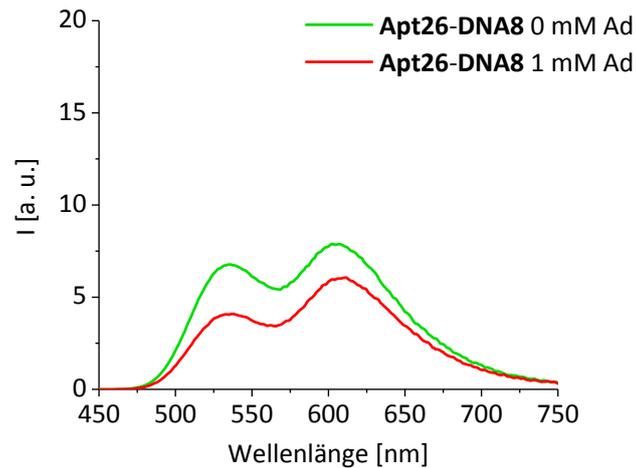


Abbildung 62: Fluoreszenzspektren des Aptamer-DNA-Duplexes **Apt27-DNA8** in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Adenosin. Verwendete Parameter: $\lambda_{exc} = 435$ nm; Spaltbreite: 3/3; 20 °C.

Apt26-DNA8 zeigt mit und ohne Adenosin das gleiche Verhalten wie **Apt25-DNA7** (s. Abbildung 62). Ohne Adenosin ist ebenfalls kein vollständiges Öffnen des Aptamers zu sehen, bzw. immer noch eine überwiegende Akzeptorfluoreszenz detektierbar. Da *Stojanovic et al.* bei ihren Aptameren nur die Differenz der Fluorescein-Fluoreszenz detektieren,^[118] kann auch ihrem Fluorophor-Löscher-System nicht von einem vollständigen Öffnen und Schließen der Aptamere ausgegangen werden.

Eine Erklärung für das optische Verhalten der einzelsträngigen Aptamer-Sonden kann durch die Arbeiten von *Özalp et al.* gegeben werden.^[133] Da keine aufgelösten Strukturen des adenosinbindenden Aptamers in Abwesenheit des Zielmoleküls existieren, bestimmten sie mittels polarimetrischer Interferometrie (DPI) allgemeine strukturelle Unterschiede des Aptamers. Diese ergaben, dass das Aptamer bereits ohne Zielmolekül gefaltet vorliegt, wobei die Bindungstasche jedoch geweitet ist. Durch Bindung der beiden AMP-Moleküle zieht sich diese zusammen und bildet die bekannte dreidimensionale Struktur des Aptamers (s. Abbildung 63).

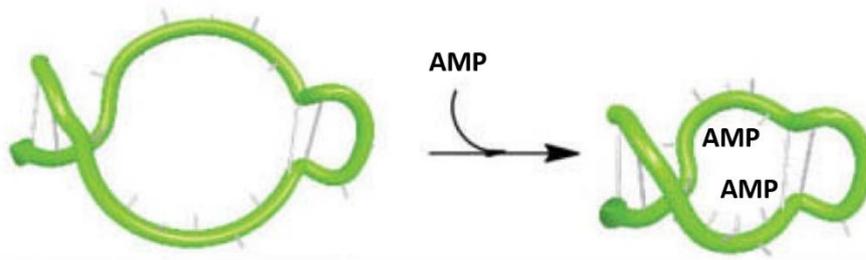


Abbildung 63: Schematische Darstellung der strukturellen Veränderungen durch die Bindung von zwei AMP-Molekülen. Diese Darstellung wurde mittels *Nupack* ermittelt.^[133]

Abbildung 63 illustriert das beschriebene Verhalten und zeigt, dass die Stammregion stets hybridisiert vorliegt. Damit wird das optische Verhalten der Aptasensoren **Apt23 – Apt26** erklärt, das bereits in Abwesenheit von Adenosin einen ausgeprägten Energietransfer aufweist.

Somit konnte gezeigt werden, dass das ursprüngliche Schneiden der Aptamersequenz in der Schleifenregion nicht nur aus synthetischen Gründen, sondern auch aus funktionellen Gründen notwendig ist.

6 DNA-Origami-Zangen

6.1 Einführung

Seit der Publikation von *Nadrian Seeman* aus Jahr 1982 über die Verwendung von DNA als Konstruktionsmaterial zur Bildung von geometrisch definierten Strukturen, entwickelte sich das Forschungsgebiet der sogenannten „Strukturellen DNA-Nanotechnologie“ schnell weiter.^[136–138] Basierend auf den, aus dem Jahr 1964 bereits bekannten, *Holliday*-Strukturen (engl.: *Holliday junctions*), die als Schlüsselintermediate bei der homologen Rekombination dienen, postulierte *Seeman* seine Idee der rigiden *Holliday*-Strukturen. Er entwarf DNA-Sequenzen, die ungepaarte Überhänge besitzen (*sticky ends*) und deshalb in der Lage sind größere, verzweigte Gitterstrukturen auszubilden (s. Abbildung 64; **A**).^[136,138]

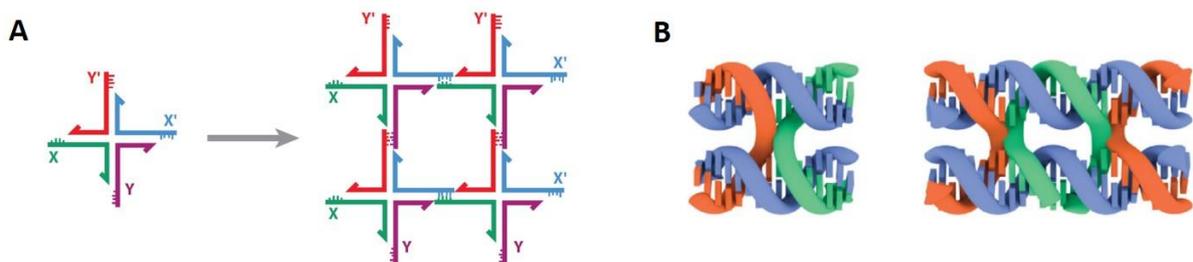


Abbildung 64: **A:** Selbstassemblierung von verzweigten *Holliday*-Strukturen zur Erzeugung größerer Gitternetzwerke.^[138] **B:** Links: dreidimensionale Darstellung einer rigiden *Holliday*-Struktur bzw. einfache *Crossover* Struktur zwischen zwei DNA-Helices. Rechts: *antiparallele Double Crossover* Struktur.^[139]

Die Entwicklung der gerüstbasierten DNA-Origami-Technik, die 2006 erstmals von *Paul Rothemund* vorgestellt wurde, stellt einen weiteren Meilenstein der DNA-Nanotechnologie dar.^[140] Angelehnt an die japanische Kunst des Papierfaltens, wird bei der DNA-Origami-Technik ein langer einzelsträngiger Gerüststrang mit vielen kurzen Faltungssträngen in eine gewünschte, definierte Struktur „gefaltet“. ^[141] Hierfür verwendete *Rothemund* das 7249 Basen lange virale Genom des M13mp18 Bakteriophagen und hybridisierte dieses mit einem 10-fachen Überschuss der 225 Faltungsstränge durch simples, kontrolliertes Abkühlen von 90 °C auf Raumtemperatur innerhalb von 2 h.^[140] Durch diese Technik war es möglich, einfache geometrische Formen wie beispielsweise Quadrate und Dreiecke sowie komplexere Strukturen wie Sterne und Smileys auszubilden.^[140]

Das vorherrschende Strukturmotiv in einem DNA-Origami sind die sogenannten *antiparallelen Double Crossover* Strukturen (s. Abbildung 64; **B**), die auf den zuvor beschriebenen rigiden *Holliday*-Strukturen basieren.^[142] Innerhalb eines DNA-Origamis ist jede DNA-Helix mit ihren beiden Nachbar-Helices über ein regelmäßiges Muster an Kreuzungspunkten verbunden, wodurch eine planare Fläche gebildet wird.^[141] Durch die Verknüpfung mehrerer zweidimensionaler Flächen ist die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen möglich.

Seit dem ersten, im Jahr 2006 hybridisierten, DNA-Origami wurde die Technik immer weiter verfeinert und es wurde eine Vielzahl an Strukturen entworfen. Diese beinhalten nicht nur starre geometrische Formen,^[140] sondern ebenfalls Strukturen, die mit einer gewissen Funktionalität ausgestattet sind. Dazu gehört das Anbringen von funktionellen Gruppen, die in der Lage sind Moleküle an einer definierten Position zu binden. Die chemische Modifikation der Faltungsstränge, mit beispielsweise Biotin, ermöglicht nach der Assemblierung des DNA-Origamis die Bindung von Streptavidin (s. Abbildung 65, **A**).^[143] Die Arbeitsgruppe *Niemeyer* erweiterte das Biotin-Streptavidin-System durch weitere orthogonale Kupplungssysteme. Sie verwendeten benzylguanin- sowie chlorhexanmodifizierte Faltungsstränge, die nach der Hybridisierung des DNA-Origamis mit den selbstmarkierenden Proteinen *O6*-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (*Snap-Tag*) und Halogenalkan-Dehalogenase (*HaloTag*) zur Reaktion gebracht wurden (s. Abbildung 65, **B**).^[144] *Gothelf et al.* führten kleine funktionelle Gruppen wie Amine, Azide und terminale Alkine endständig in die Faltungsstränge ein und konnten somit nach der Hybridisierung der DNA-Origami Struktur postsynthetische Markierungen auf der Oberfläche des DNA-Origamis durchführen.^[145]

Die Charakterisierung der gewünschten DNA-Origami Struktur erfolgt in der Regel durch Rasterkraftmikroskopie (AFM = *atomic force microscopy*). Durch Fluoreszenzmarkierung, insbesondere durch Markierung mit einem Energietransfer-Paar, lässt sich die Assemblierung des DNA-Origamis auch fluoreszenzspektroskopisch nachweisen. *Gothelf et al.* entwickelten eine dreidimensionale DNA-Origami Box und markierten zwei der Faltungsstränge mit einem Energietransfer-Paar bestehend aus den Cyaninfarbstoffen Cy3 und Cy5 (s. Abbildung 65, **C**). Somit waren sie in der Lage, den geschlossenen und offenen Zustand durch die An- bzw. Abwesenheit der Cy5-Fluoreszenz nachzuweisen. Die definierte Platzierung eines wenige Nanometer großen Fluorophors auf einem über hundert Nanometer großen DNA-Origami

ermöglicht die genaue Lokalisierung der Fluoreszenzmarkierung und damit auch eine Charakterisierung auf Einzelmolekülebene.^[24,146,147]

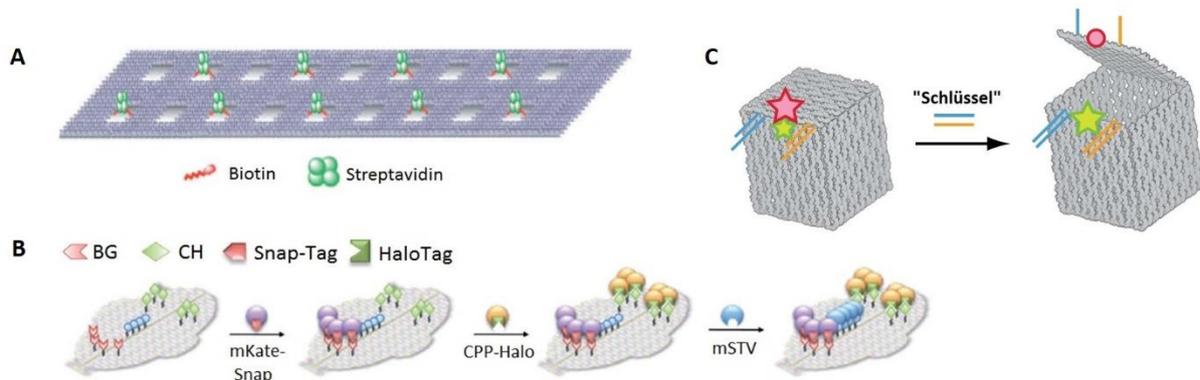


Abbildung 65: Beispiele für funktionalisierte DNA-Origami-Strukturen. **A:** Biotinmarkierte Faltungsstränge ermöglichen die Bindung von Streptavidin nach der Assemblierung; **B:** Modifizierung eines DNA-Origamis mit verschiedenen funktionellen Gruppen (BG = Benzylguanin, CH = Chlorhexan) und anschließender Kupplung mit den entsprechenden Fusionsproteinen (mKate = rot fluoreszierendes monomeres Katushka-Protein, CCP = Cytochrom-C-Peroxidase, mSTV = monovalentes Streptavidin); **C:** DNA-Origami-Box im geschlossenen (rechts) und offenen Zustand (links). Durch Zugabe von längeren „Schlüsseloligonukleotiden“ wird Box geöffnet und die Farbstoffe Cy3 (grüner Stern) und Cy5 (roter Stern) entfernen sich voneinander und ein Energietransfer wird unterbunden.

Kuzuya und Komiyama *et al.* entwickelten das in dieser Arbeit verwendete Konzept der *DNA-Origami-Zangen* (engl.: *DNA Origami pliers*). Diese bestehen aus zwei ca. 170 nm langen Hebeln, die nur über ein Gelenk miteinander verbunden. Das Gelenk der Zangen besteht aus zwei Phosphodiesterbrücken, die zusammen eine *Holliday*-Struktur ausbilden.^[148] Die Zangen können in drei Konformationen vorliegen. In der geöffneten X-Form, die aufgrund der Natur der *Holliday*-Struktur bevorzugt ist, sowie in einer parallelen und anti-parallelen Konformation (s. Abbildung 66, **A**).^[148,149] Kuzuya *et al.* statteten die beiden Hebel der Zange mit funktionellen Einheiten aus, sodass diese in der Lage waren Moleküle, Ionen, miRNAs oder PNA-Stränge zu binden.^[148] Die Bindung des jeweiligen Zielmoleküls führt dabei zu einer Veränderung (Öffnen oder Schließen der Zange) der Konformation. Je nach Art der funktionellen Einheit wird in drei Bindungsmechanismen unterschieden. Wird der vordere Teil der Zange modifiziert, so wird dies als Greif-Mechanismus bezeichnet. Diesen Bindungsmechanismus realisierten Kuzuya *et al.*, indem sie beide Hebel mit Biotin markierten, welches nach Zugabe von bivalentem Streptavidin eine Konformationsänderung zu überwiegend parallelen *DNA-Origami-Zangen* führte (s. Abbildung 66, **B**). Die Modifikation

der hinteren Bereiche der Hebel führt zum Reißverschluss-Mechanismus. Dieser kann je nach Modifikation entweder durch Zugabe einer Ziel miRNA oder ATP geöffnet (*unzipping*) oder durch Zugabe von Natrium- oder Silber-Ionen geschlossen (*zipping*) werden (s. Abbildung 66, C und D). *Kuzuya et al.* integrierten in der Nähe des Gelenkpunktes ebenfalls Fluorophore (6-Fluoresceincarboxyamid (F bzw. FAM) & TexasRed (T bzw. TXR)) und einen Fluoreszenzlöscher (BHQ-2, Q), um die Konformationsänderungen durch eine Änderung der Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluorophore zu detektieren.

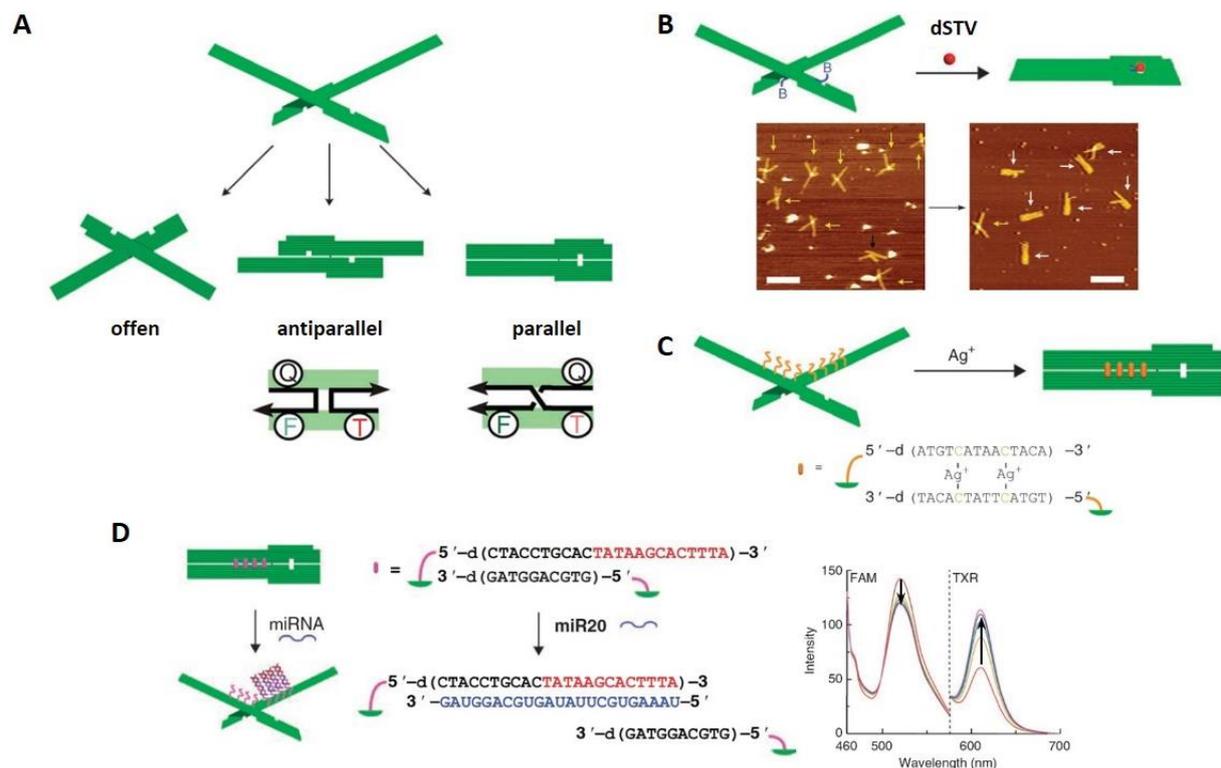


Abbildung 66: Schematische Darstellung des Konzepts der *DNA-Origami-Zangen*. **A:** Mögliche Konformationen der *DNA-Origami-Zangen*: offen, antiparallel, parallel. Je nach vorliegender Konformation löscht der Fluoreszenzlöscher (Q) einen der beiden Fluorophore 6-Fluoresceincarboxyamid (F) und Texas Red (T). **B:** Beispiel für den Greif-Mechanismus. Die Hebel sind mit zwei Biotin-Molekülen (B) modifiziert und können divalentes Streptavidin (dSTV) binden, wodurch die Zange geschlossen wird. Die Konformationsänderung kann mittels AFM visualisiert werden. **C:** Beispiel für den Reißverschluss-Mechanismus. Durch Zugabe von Ag^+ -Ionen werden C-C-Fehlpaarungen innerhalb der DNA-Sequenz stabilisiert und damit die Zange geschlossen. **D:** *DNA-Origami-Zangen* werden durch Zugabe der Ziel miRNA20 geöffnet. Das Öffnen der Zangen kann mittels Fluoreszenzspektroskopie an der Veränderung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten verfolgt werden.^[148]

6.2 Synthese und Charakterisierung funktionalisierter *DNA-Origami-Zangen*

Im Rahmen dieses Projekts sollte eines der zuvor vorgestellten ET-Paare in Form eines der wellenlängenverschiebenden, adenosinbindenden Aptamere in Nanostrukturen integriert werden. Hierfür wurde das von *Kuzuya* und *Komiyama* entwickelte Konzept der *DNA-Origami-Zangen* gewählt, da dieses den Vorteil eines doppelten Auslesens der Ergebnisse bietet. Die Resultate können zum einem mittels Fluoreszenz detektiert und zum anderen die Konformationsänderung zusätzlich mittels AFM visualisiert werden. Dadurch können die fluoreszenzspektroskopisch erhaltenen Resultate durch eine zweite, von der ersten unabhängigen Detektionsmethode, validiert werden. Weiterhin wird durch Einbetten eines ET-Paars in eine Nanostruktur eine Untersuchung auf Einzelmolekülbasis möglich und kann somit einen großen Beitrag zum Verstehen der ET-Systeme leisten.

Zunächst wurde das Energietransfer-Paar **D3-A4** in die *DNA-Origami-Zangen* integriert und der Energietransfer in Strangaustausch-Experimenten untersucht. Anschließend wurden farbstoffmodifizierte adenosinbindende Aptamere in die *DNA-Origami-Zangen* eingebettet und deren Fähigkeit, ATP zu binden, untersucht.

6.2.1 Strangaustausch-Experimente

Die *DNA-Origami-Zangen* bestehen im Originaldesign aus einem einzelsträngigen M13mp18 Gerüststrang (7249-nt) und 236 Faltungssträngen (Sequenzen siehe Kapitel 8.5.3). Innerhalb des DNA-Origamis existieren drei Regionen, die durch modifizierte Faltungsstränge ersetzt wurden (s. Abbildung 67, farbig umrandete Bereiche). Der blaue Bereich muss für den zuvor beschriebenen Greif-Mechanismus modifiziert werden, welcher jedoch nicht Teil der vorliegenden Untersuchungen ist und deshalb nicht weiter erläutert wird. Der grüne Bereich beinhaltet die beiden Fluorophore, FAM und TXR, sowie den Fluoreszenzlöcher BHQ-2. Diese Modifikationen werden im nächsten Kapitel zusammen mit den adenosinbindenden bzw. ATP-bindenden Aptameren verwendet. Für die Strangaustausch-Experimente war eine Modifikation der Faltungsstränge des pink markierten Bereichs notwendig.

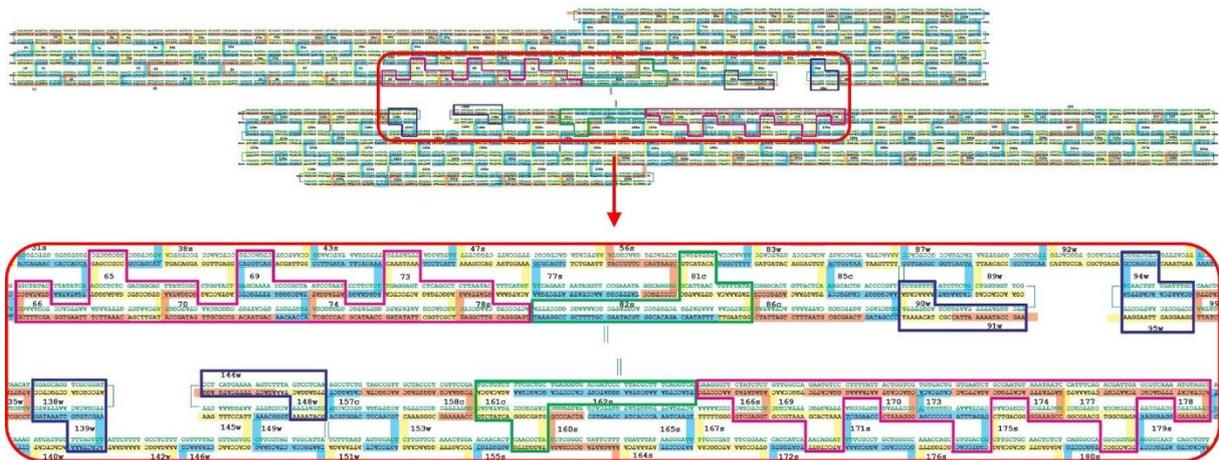


Abbildung 67: Detaillierte Struktur der *DNA-Origami-Zangen*. Die farbige hinterlegte Bereiche entsprechen jeweils einen Faltungsstrang. Der nicht-hinterlegte grüne Strang ist der M13mp18 Gerüststrang. Die blau, grün und pink umrandeten Bereiche markieren die modifizierten Faltungsstränge.

Innerhalb des pink markierten Bereichs können auf jedem der beiden Hebel maximal vier (s. Abbildung 68 links) Modifikationen angebracht werden. Um einen Strangaustausch nach dem Reißverschluss-Mechanismus durchzuführen, erfolgte eine Modifizierung der DNA-Stränge 66s, 70s, 74s, 178s, 174s und 170s. Dafür wurden die Sequenzen um den in Abbildung 68 gezeigten Überhang erweitert (die exakten Sequenzen der DNA-Stränge sind in Kapitel 8.5.3 aufgeführt). Dabei wurde zwischen Strangaustausch-Duplex und Original-Faltungsstrang ein T₄-Linker eingeführt, um eine ausreichende Flexibilität der Modifikation innerhalb der *DNA-Origami-Zange* zu erreichen. Die Modifikation mit dem Energietransfer-Paar **D3-A4** erfolgte nur am äußersten Modifizierungspunkt 4, da dieser die größte Distanz zum Gabelpunkt aufweist und hier die Hebel in der offenen Form am weitesten voneinander entfernt sind. Somit kann am ehesten davon ausgegangen werden, dass das beobachtete Kontrastverhältnis direkt mit der Anzahl an geöffneten und geschlossenen Zangen im Zusammenhang steht und keine Fluoreszenzlöschung durch zu große Nähe zu umliegenden DNA-Strängen auftritt.

Im geschlossenen Zustand besteht der DNA-Duplex aus zwölf Basenpaaren und wird durch Zugabe des unmodifizierten Öffnungsstrangs (CS für *counter strand*) durch einen 23 Basen umfassenden Duplex verdrängt. Das heißt, in der geschlossenen *DNA-Origami-Zange* gehen **D3** und **A4** einen Energietransfer ein, der nach der Zugabe des Öffnungsstrangs unterbunden wird. Somit sollte dann ausschließlich die grüne Fluoreszenz des Donors sichtbar sein. Beim

Strangdesign wurde darauf geachtet, dass die gleiche Orientierung und Umgebung der Farbstoffe, wie bei den in Kapitel 3.3.2 beschriebenen ET-Paaren, verwendet wurde.

In den durchgeführten Strangaustausch-Experimenten wurden stets zwei der vier Modifizierungspunkte mit einem DNA-Duplex ausgestattet, um eine vollständige Schließung der Zange während der Hybridisierung des DNA-Origamis sicher zu stellen. Es wurde jedoch nur jeweils einer der Duplexe mit einem Energietransfer-Paar versehen.

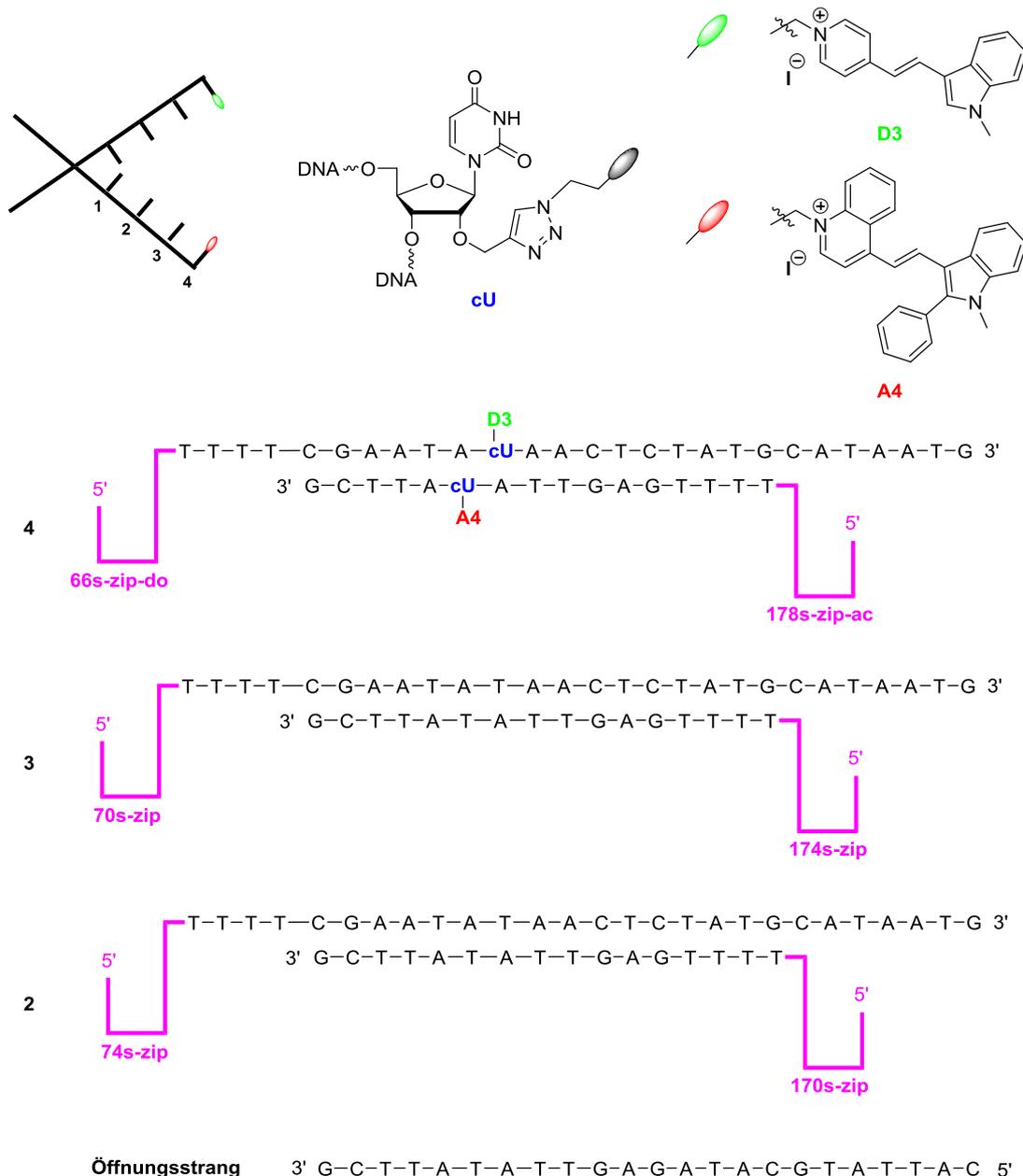


Abbildung 68: Schematische Darstellung der Modifikationspunkte innerhalb der DNA-Origami-Zange, Strukturen des cU-Bausteins und der Cyanin-Styryl-Farbstoffe D3 und A4, Sequenzen der Strangaustausch-Duplexe sowie des Öffnungsstrangs (CS).

Im Folgenden werden die untersuchten *DNA-Origami-Zangen* nach ihrer Art der Modifikation, im Fall der Strangaustausch-Experimente **SA**, bezeichnet. Die tiefgestellten Zahlen geben an, an welchen der vier möglichen Positionen die Modifikationen angebracht sind. Das nachgestellte **ET** steht für das Energietransfer-Paar und auch hier wird mit der tiefgestellten Zahl spezifiziert, an welcher Position das Energietransfer-Paar lokalisiert ist.

Zunächst wurden die Positionen 3 und 4 mit den Strangaustausch-Duplexen modifiziert und der Energietransfer innerhalb der *DNA-Origami-Zangen* mittels Fluoreszenz untersucht. Es gilt zu beachten, dass die Messungen mit 15 nM Lösungen durchgeführt wurden (vgl. DNA/RNA 2.5 μ M), weshalb die gezeigten Spektren ein vergleichsweise schlechtes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis aufweisen. Es wurden keine Absorptionsmessungen durchgeführt, da aufgrund der geringen Konzentration die Farbstoff-Extinktion unterhalb der Detektionsgrenze des zur Verfügung stehenden Spektrometers lag. **SA₃₄ET₄** hat bei Anregung des Donorfluorophors ein Maximum bei der Akzeptorfluoreszenz und zeigt somit, dass ein Energietransfer innerhalb der *DNA-Origami-Zangen* möglich ist. Die im Energietransfer zu beobachtende Akzeptorfluoreszenz ist nicht gelöscht, da sie die gleiche Intensität wie der direkt angeregte (bei 542 nm) Akzeptorfluorophor aufweist (s. Abbildung 69, grünes gepunktetes Spektrum). Das Kontrastverhältnis des beobachteten ET beträgt 2.56. Dieses Ergebnis ist deutlich schlechter verglichen mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.2 (**rD3-rA4** $I_A/I_D = 60$). Die beiden ET-Systeme lassen sich jedoch aus mehreren Gründen nicht direkt miteinander vergleichen. Innerhalb des DNA-Origamis ist weitaus weniger Platz für die Fluorophore, sodass eine unterschiedliche Umgebung gegeben ist. Weiterhin wird zur Assemblierung und Fluoreszenzspektroskopie statt dem zum zuvor eingesetzten Natriumphosphat-Puffer (NaP_i-Puffer) ein TRIS-Acetat-EDTA-Mg²⁺-Puffer (TAE/Mg²⁺-Puffer) verwendet. Die Veränderung des Lösungsmittels hat große Einflüsse auf die Fluoreszenzeigenschaften der Cyanin-Styryl-Farbstoffe und damit auch auf deren Verhalten innerhalb des ET-Paars.

Anschließend wurde in mehreren Schritten der Öffnungsstrang zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die zu messende Probe für 10 min inkubiert, um die Einstellung des Gleichgewichts zwischen geschlossenen und geöffneten Zangen zu gewährleisten. Bereits nach Zugabe von fünf Äquivalenten CS ist nahezu keine Akzeptorfluoreszenz mehr zu detektieren, sondern die Fluoreszenz bei der charakteristischen Wellenlänge des Donors. Nach Zugabe von zehn Äquivalenten wurde keine weitere Veränderung des Kontrastverhältnisses mehr festgestellt,

sodass dies der in diesem System maximal erreichbaren Öffnung der *DNA-Origami-Zangen* entspricht.

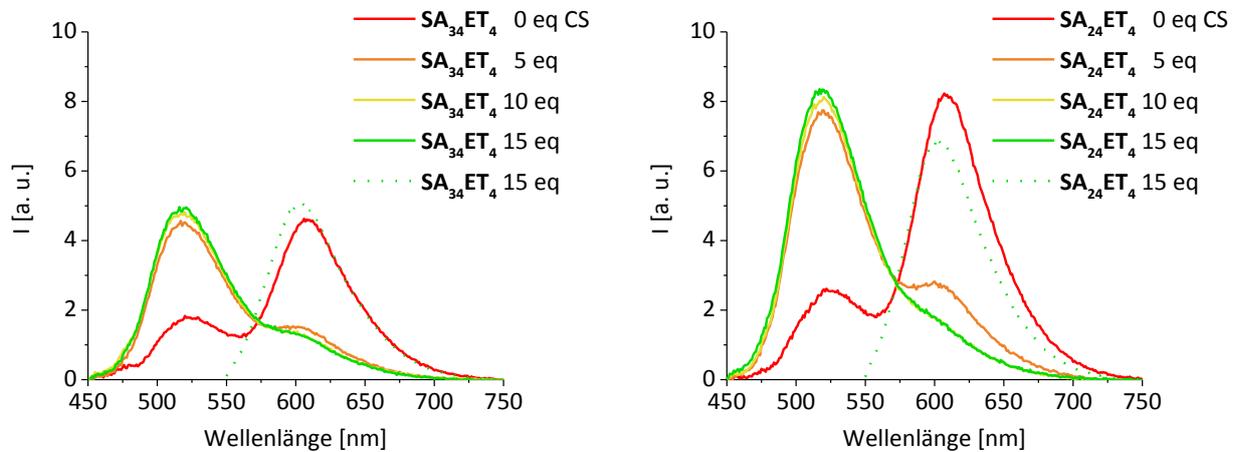


Abbildung 69: Fluoreszenzspektren der Titration von $SA_{34}ET_4$ (links) und $SA_{24}ET_4$ (rechts). Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm (durchgezogene Linien) bzw. 535 nm (gepunktete Linien); Spaltbreite: 5/5.

In einem weiteren Experiment wurden die Positionen 2 und 4 mit den Strangaustausch-Duplexen versehen, wobei Position 4, wie bereits bei $SA_{34}ET_4$, mit dem ET-Paar modifiziert wurde, um eine Vergleichbarkeit zwischen den *DNA-Origami-Zangen* zu erhalten. Die Charakterisierung von $SA_{24}ET_4$ mittels Fluoreszenzspektroskopie zeigt, dass der vergrößerte Abstand zwischen den beiden SA-Duplexen zu einer Erhöhung der Intensität sowie einem leicht gesteigerten Kontrastverhältnis im geschlossenen Zustand ($I_A/I_D = 3.23$) führt. Der Grund hierfür kann der zuvor erwähnte Platzmangel innerhalb des DNA-Origamis sein. Wird der zweite Duplex an der direkt benachbarten Position angebracht, besitzen die Fluorophore möglicherweise nicht ausreichend Platz und werden zu verstärkten Wechselwirkungen mit der DNA gezwungen. Die Erhöhung der Distanz zwischen den Duplexen steigert somit nicht nur die Fluoreszenzintensität, sondern ebenfalls das Kontrastverhältnis, da die Orientierung der Fluorophore zueinander durch den vergrößerten Freiraum optimiert werden kann.

Die Titration von $SA_{24}ET_4$ mit dem Öffnungsstrang zeigt ähnliches Verhalten wie $SA_{34}ET_4$. Bereits nach Zugabe von fünf Äquivalenten CS ist kaum noch Akzeptorfluoreszenz zu beobachten. Nach Zugabe von 15 Äquivalenten CS hat $SA_{34}ET_4$, verglichen mit $SA_{24}ET_4$, jedoch eine niedrigere Akzeptorfluoreszenz. Wie bereits für die adenosinbindenden Aptamere (s. Kapitel 5.2.1) kann auch für die *DNA-Origami-Zangen* ein Verstärkungsfaktor f bestimmt werden. Dieser ist ein Maß dafür, wie groß die Fluoreszenzunterschiede zwischen geöffneter und geschlossener Form sind und gibt damit Informationen darüber wie geeignet das jeweilige

Energietransfer-Paar in der jeweiligen Umgebung für eine aussagekräftige Fluoreszenzdetektion ist. Der Verstärkungsfaktor von $\text{SA}_{34}\text{ET}_4$ beträgt 10.1. Für $\text{SA}_{24}\text{ET}_4$ beträgt dieser 17.0, was einer Steigerung um 68 % entspricht.

Zur weiteren Charakterisierung der *DNA-Origami-Zangen* wurde mit $\text{SA}_{24}\text{ET}_4$ eine native Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abbildung 70). Es ist ein klarer Laufunterschied zwischen den Banden der geschlossenen (s. Abbildung 70, **1**) und offenen Konformation (s. Abbildung 70, **2**) zu erkennen.

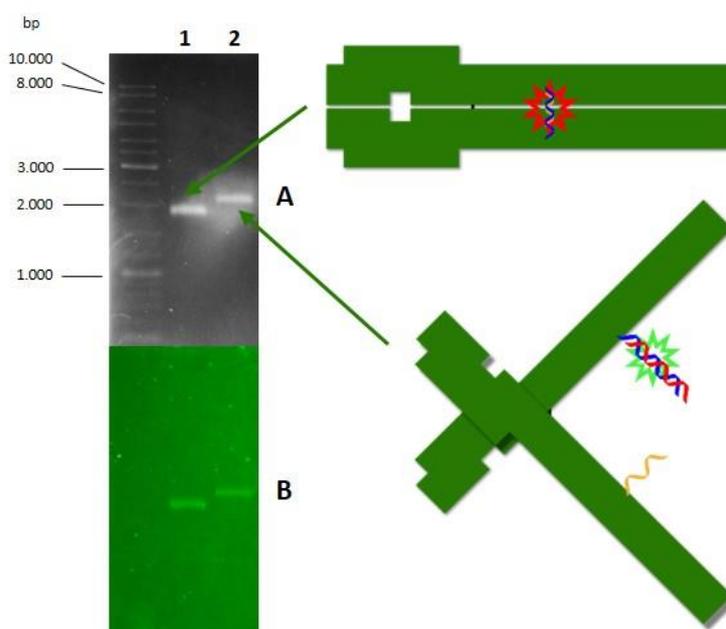


Abbildung 70: Agarose-Gelelektrophorese (links) und schematische Darstellung (rechts) der *DNA-Origami-Zange* $\text{SA}_{24}\text{ET}_4$ ohne (**1**) und nach Zugabe von 15 Äquivalenten CS (**2**). Die Visualisierung erfolgte zunächst durch Detektion der integrierten Fluoreszenzfarbstoffe (**B**; $\lambda_{\text{exc}} = 534 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 607 \pm 36 \text{ nm}$) und anschließend durch Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid (**A**; $\lambda_{\text{exc}} = 302 \text{ nm}$).

Eine genaue Aussage über die Verhältnisse zwischen offener und geschlossener Form der *DNA-Origami-Zangen* kann nur über bildgebende Verfahren getroffen werden. Es wurden deshalb AFM-Aufnahmen der Zangen $\text{SA}_{24}\text{ET}_4$ und $\text{SA}_{34}\text{ET}_4$ jeweils ohne und mit 15 Äquivalenten CS aufgenommen (s. Abbildung 71). Dabei wurden jeweils mehrere Aufnahmen pro Origami durchgeführt und anschließend offene und geschlossene DNA-Origami-Strukturen gezählt, um eine prozentuale Verteilung zwischen den beiden Konformationen zu erhalten. Antiparallele Strukturen wurden dabei als offene Strukturen gezählt.

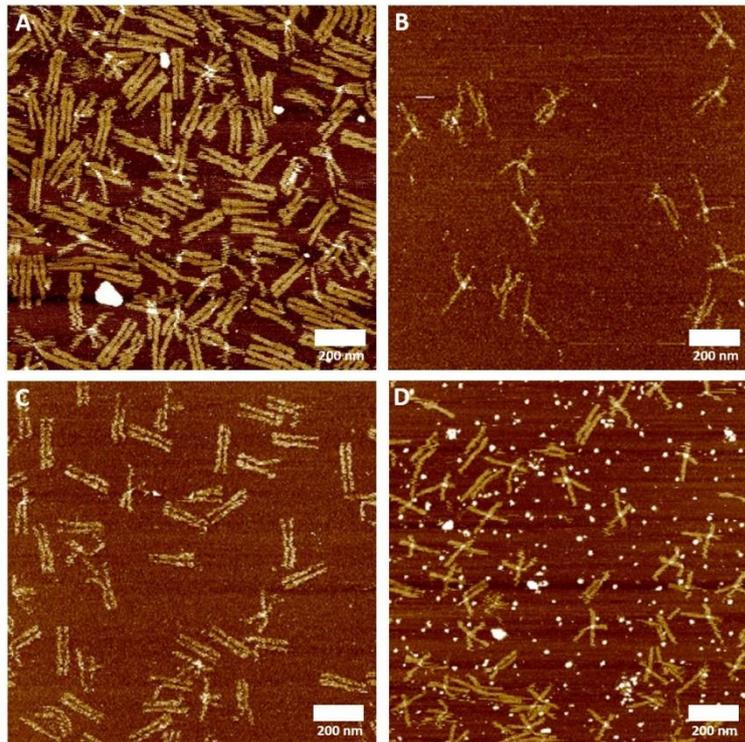


Abbildung 71: AFM-Aufnahmen der *DNA-Origami-Zangen* $SA_{34}ET_4$ (A & B) und $SA_{24}ET_4$ (C & D) jeweils ohne und mit 15 Äquivalenten Öffnungsstrang. A: $SA_{34}ET_4$ 0 eq CS; B: $SA_{34}ET_4$ 15 eq CS; C: $SA_{24}ET_4$ 0 eq CS; D: $SA_{24}ET_4$ 15 eq CS.

Die Auswertung der AFM-Bilder ergab für $SA_{34}ET_4$ und $SA_{24}ET_4$ nahezu identische Werte (s. Tabelle 19). Ohne Öffnungsstrang, direkt nach der Assemblierung des DNA-Origamis, liegen ungefähr 80 % der Zangen geschlossen und 20 % offen vor. Nach Zugabe des Öffnungsstrangs zeigen 90 % der *DNA-Origami-Zangen* eine geöffnete Struktur. Nur 10 % der Zangen liegen weiterhin in geschlossener Konformation vor. Dies zeigt, dass die Lage der SA-Duplexe innerhalb des DNA-Origamis keine Auswirkung auf dessen Schließ- und Öffnungsverhalten hat, sondern ausschließlich auf die optischen Eigenschaften der Fluorophore.

Tabelle 19: Statistische Auswertung der AFM-Aufnahmen der Strangaustausch-Experimente.

	offen	geschlossen	gesamt	% offen	% geschlossen
$SA_{34}ET_4$ 0 eq CS	75	334	409	18.3	81.7
$SA_{34}ET_4$ 15 eq CS	115	16	171	90.6	9.4
$SA_{24}ET_4$ 0 eq CS	48	206	254	18.9	81.1
$SA_{24}ET_4$ 15 eq CS	256	33	289	88.6	11.4

6.2.2 ATP-bindende DNA-Origami-Zangen

Nach der Untersuchung des Energietransfers in Strangaustausch-Experimenten, sollte das ET-Paar **D3-A4** in Kombination mit einem adenosinbindenden Aptamer in die DNA-Origami-Zangen integriert werden. Kuzuya *et al.* veröffentlichten bereits ATP-bindende DNA-Origami-Zangen, die ohne Zielmolekül, aufgrund der Ausbildung eines DNA-Duplexes, geschlossen vorliegen (s. Abbildung 72).^[148] Durch die Zugabe von ATP wird die Bildung des Aptamers bevorzugt, sodass der DNA-Doppelstrang aufgebrochen wird und sich dadurch die Zangen öffnen. Die Visualisierung erfolgte hierbei mittels AFM und Fluoreszenzspektroskopie (FAM/TXR/BHQ-2-System).

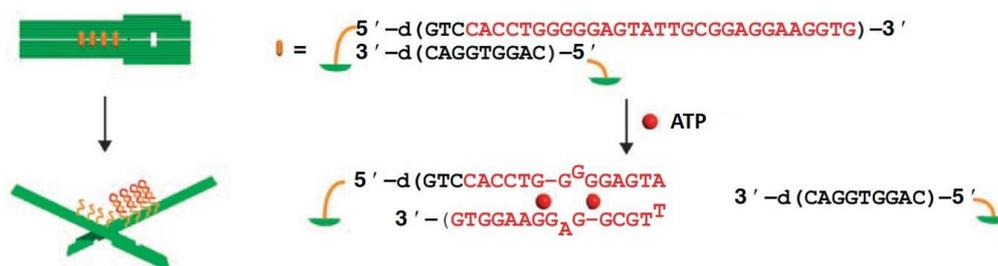


Abbildung 72: Prinzip der ATP-Bindung im System von Kuzuya *et al.* Durch die Zugabe von ATP wird die Bildung des Aptamers bevorzugt, sodass der DNA-Duplex aufgebrochen wird und sich die DNA-Origami-Zange öffnet.^[148]

Im Rahmen dieser Arbeit sollten jedoch die zuvor untersuchten wellenlängenverschiebenden, geteilten, adenosinbindenden Aptamere verwendet werden. Durch das Schneiden der Aptamer-Sequenz in der Schleifenregion bewirkt die Bindung des Zielmoleküls das Schließen der DNA-Origami-Zangen. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Adenosin in Wasser und den geringen Probenvolumina der DNA-Origami-Zangen wurde Adenosintriphosphat (ATP) anstelle von Adenosin verwendet.

Für die Modifikation der Faltungsstränge wurde **Apt2-6** verwendet (s. Kapitel 5.2.1), welches in der synthetisierten Aptamer-Bibliothek das beste Kontrastverhältnis sowie den höchsten Verstärkungsfaktor zeigte. Es wurden für alle vier Modifikations-Positionen farbstoff- und aptamermodifizierte Faltungsstränge synthetisiert (s. Abbildung 73, B).

Die Benennung der DNA-Origami-Zangen erfolgt, analog zum vorhergehenden Kapitel, zunächst durch die Art des Experiments. Im Fall der Aptamere durch **Apt** und eine tiefgestellte Zahl, die die Position des Aptamers angibt. Das nachgestellte **ET** sowie die tiefgestellte Zahl gibt die Position des Energietransfer-Paars an.

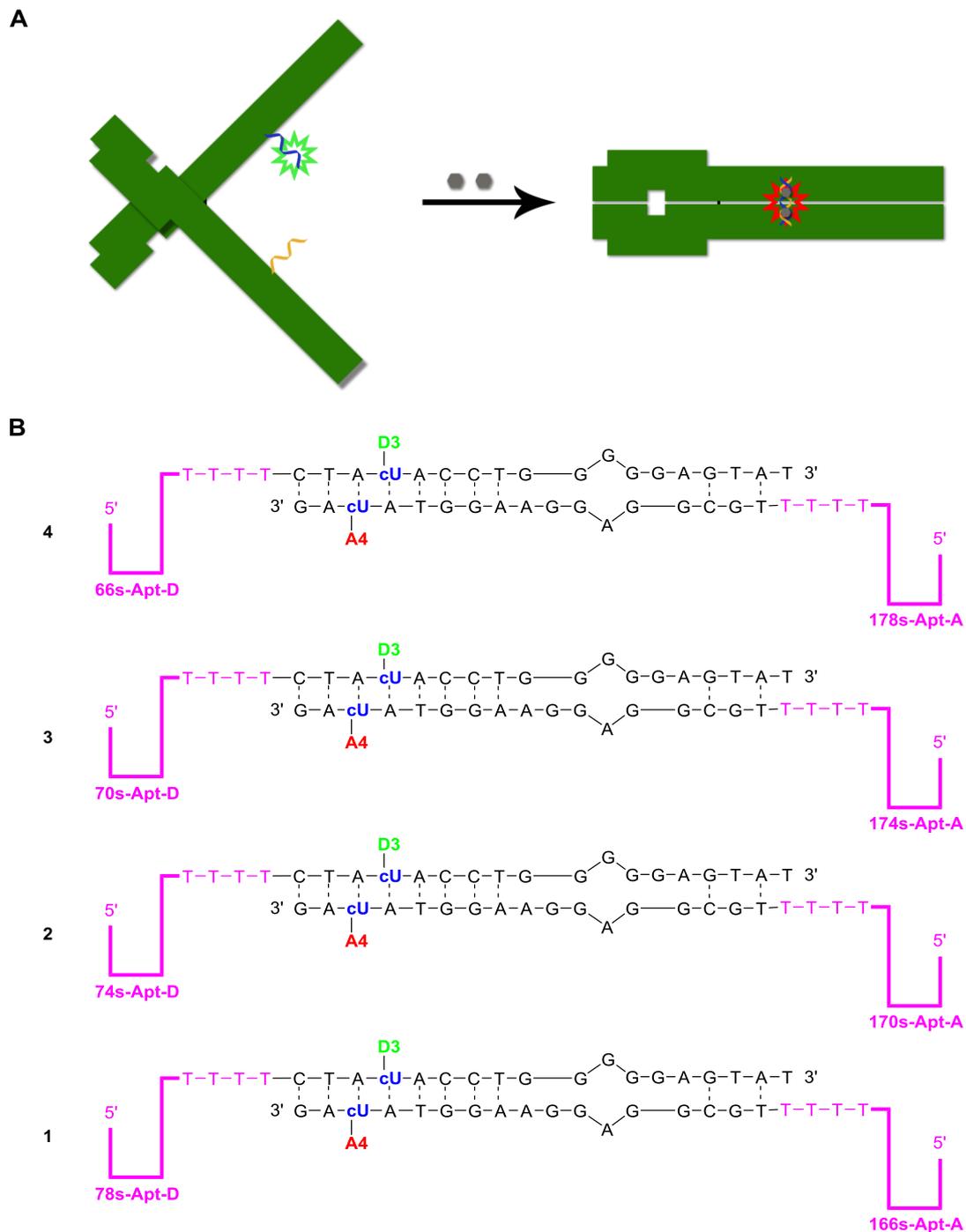


Abbildung 73: **A:** Prinzip der ATP-bindenden wellenlängenverschiebenden *DNA-Origami-Zangen*. Durch die Zugabe von ATP wird das Aptamer ausgebildet, die Zange schließt und ein Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor kann erfolgen. **B:** Sequenzen der Faltungsstränge der ATP-bindenden Aptamere.

Nach Hybridisierung und Reinigung der *DNA-Origami-Zangen* wurden diese mit ATP (1 mM) versetzt und einem kleinen Hybridisierungs-Zyklus (3-mal von 45 °C auf 20 °C mit -1 °C/min) unterzogen, um eine bestmögliche und reproduzierbare Aptamer-Bildung zu gewährleisten. Für die Vergleichbarkeit wurden *DNA-Origami-Zangen* ohne ATP ebenfalls diesem Zyklus unterzogen.

Um die optimale Position für die Modifizierung der ATP-bindenden *DNA-Origami-Zangen* zu ermitteln, wurden vier DNA-Origamis hybridisiert, die an den Positionen eins bis vier mit jeweils einem wellenlängenverschiebenden Aptamer modifiziert wurden. Die Charakterisierung erfolgte zunächst mittels Fluoreszenzspektroskopie (s. Abbildung 74) und durch Bestimmung der Kontrastverhältnisse und Verstärkungsfaktoren (s. Tabelle 20).

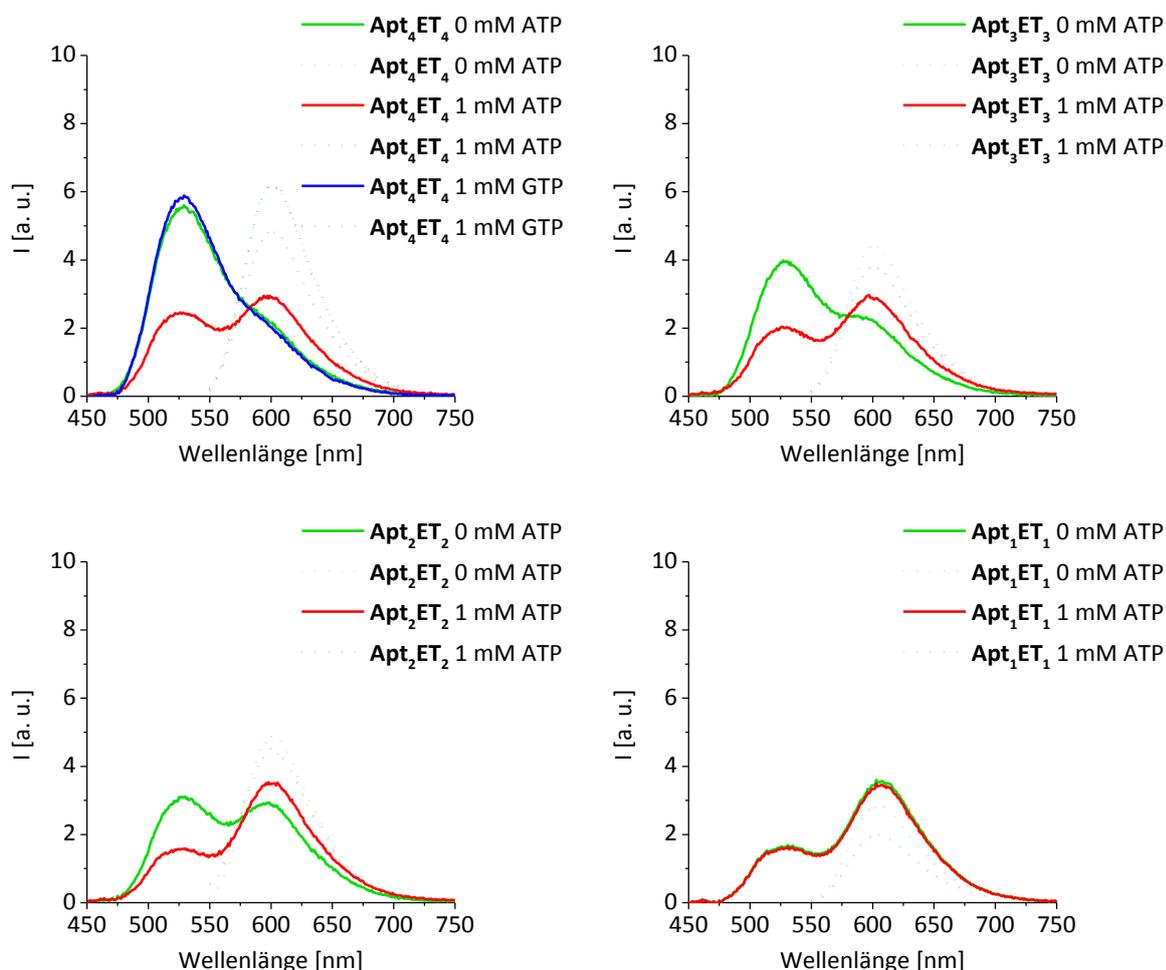


Abbildung 74: Fluoreszenzspektren der ATP-bindenden Aptamere **Apt₄ET₄**, **Apt₃ET₃**, **Apt₂ET₂** und **Apt₁ET₁** in Ab- und Anwesenheit von 1 mM ATP. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm (durchgezogene Linien) bzw. 535 nm (gepunktete Linien); Spaltbreite: 5/5.

Tabelle 20: Kontrastverhältnisse (I_A/I_D) und Verstärkungsfaktoren (f) der DNA-Origami-Zangen **Apt₄ET₄**, **Apt₃ET₃**, **Apt₂ET₂** und **Apt₁ET₁**.

	I_A/I_D	f
Apt₄ET₄ 0 mM ATP	0.39	3.05
Apt₄ET₄ 1 mM ATP	1.19	
Apt₃ET₃ 0 mM ATP	0.56	2.57
Apt₃ET₃ 1 mM ATP	1.44	
Apt₂ET₂ 0 mM ATP	0.92	2.41
Apt₂ET₂ 1 mM ATP	2.22	
Apt₁ET₁ 0 mM ATP	2.17	1.00
Apt₁ET₁ 1 mM ATP	2.17	

Die Betrachtung der Fluoreszenzspektren zeigt einen Zusammenhang zwischen Positionierung und Vorhybridisierung. Je näher die Aptamere in Richtung des Gelenk-Punkts positioniert werden, desto ausgeprägter ist die Vorhybridisierung der Aptamere ohne Zielmolekül und desto geringer ist der Unterschied nach Zugabe von ATP. Der Verstärkungsfaktor nimmt mit zunehmender Nähe zum Gelenk-Punkt ab, wohingegen das Kontrastverhältnis steigt. Der Grund hierfür ist die Distanz der beiden Hebel im geöffneten Zustand. An Position 4 reicht der Abstand zwischen den Hebeln nicht aus, um die beiden Einzelstränge der Aptamere räumlich voneinander zu trennen, sodass die Fluorophore stets miteinander agieren können und die Fluoreszenzspektren in Ab- und Anwesenheit von ATP das gleiche Kontrastverhältnis zeigen. **Apt₄ET₄** hat den höchsten Verstärkungsfaktor ($f = 3.05$), wohingegen **Apt₂ET₂** das beste Kontrastverhältnis ($I_A/I_D = 2.22$) in Anwesenheit von ATP aufweist. Es ist bemerkenswert, dass das Kontrastverhältnis von **Apt₂ET₂** nahezu dem bei **Apt2-6** beobachteten Kontrastverhältnis von 2.66 entspricht. Somit ist gezeigt, dass die Integration der geteilten ATP-bindenden Aptamere in die DNA-Origami-Zangen erfolgreich war und eine Detektion von ATP durch einen Fluoreszenzfarbwechsel möglich ist.

Um die Selektivität der ATP-bindenden, wellenlängenverschiebenden DNA-Origami-Zangen zu prüfen, wurde für **Apt₄ET₄** eine Negativ-Kontrolle unter Verwendung von Guanosin triphosphat (GTP) durchgeführt. Das aufgenommene Fluoreszenzspektrum zeigt

kaum eine Veränderung zu **Apt₄ET₄** ohne ATP, wodurch die Selektivität gegenüber ATP bestätigt wurde (s. Abbildung 74).

Apt₄ET₄ zeigt in Abwesenheit des Zielmoleküls ATP fast keine Akzeptorfluoreszenz, jedoch wird nach Zugabe von ATP nicht das bestmögliche Kontrastverhältnis erhalten. Dies kann daran liegen, dass eine Bindungsenergie nötig ist, um eine Konformationsänderung von der bevorzugten offenen Form in die geschlossene, parallele Form zu bewirken. Möglicherweise reicht dafür die Bindung von zwei ATP-Molekülen in einem Aptamer nicht aus. Um dies genauer zu untersuchen, wurde ein DNA-Origami hybridisiert, welches über zwei geteilte Aptamere verfügt (s. Abbildung 75).

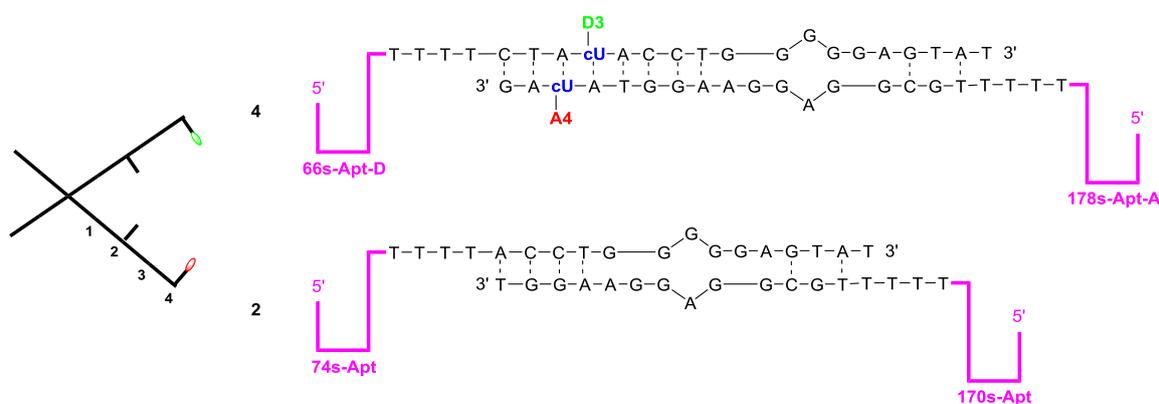


Abbildung 75: DNA-Sequenzen der zweifach aptamermodifizierten *DNA-Origami-Zange* **Apt₂₄ET₄**. Für die Strukturen von **cU**, **D3** und **A4** siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**

Hierfür wurden die Positionen 2 und 4 gewählt, wobei nur das Aptamer an Position 4 über ein ET-Paar verfügt. Die Sequenz des unmodifizierten Aptamers entspricht der von *Huizenga* und *Szostak* selektierten ATP-Aptamers.^[116] Diese Positionen wurden gewählt, da Position 4 keine Interaktion der Fluorophore in Abwesenheit von ATP zeigt und aus den Strangaustausch-Experimenten bekannt war, dass eine direkt benachbarte Modifizierung der Faltungsstränge zur Verminderung Fluoreszenz sowie zur Beeinträchtigung des Kontrastverhältnisses führt. **Apt₂₄ET₄** zeigt bereits ohne Zielmolekül eine Akzeptorfluoreszenz, was darauf hindeutet, dass das Aptamer an Position 2 auch ohne Zugabe von ATP geschlossen ist und somit kooperativ zur Schließung des zweiten Aptamers an Position 4 führt. In Anwesenheit von 1 mM ATP erreicht **Apt₂₄ET₄** ein Kontrastverhältnis von 1.61 und einen Verstärkungsfaktor von 2.24. Das Kontrastverhältnis konnte im Vergleich zu **Apt₄ET₄** durch Hinzufügen eines zweiten Aptamers gesteigert werden, wodurch jedoch eine Vorhybridisierung der Aptamere ohne Zielmolekül bewirkt wird und damit der Wert des Verstärkungsfaktors sinkt.

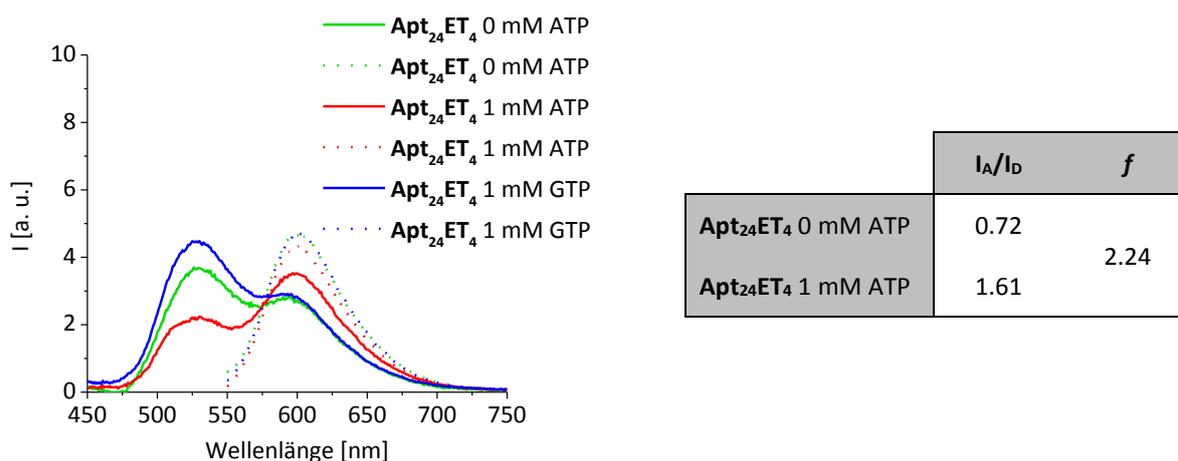


Abbildung 76: Links: Fluoreszenzspektren der zweifach aptamermodifizierten *DNA-Origami-Zange* **Apt₂₄ET₄** in Ab- und Anwesenheit des Zielmoleküls ATP sowie in Anwesenheit von 1 mM GTP. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm (durchgezogene Linien) bzw. 535 nm (gepunktete Linien); Spaltbreite: 5/5. Rechts: Kontrastverhältnis (I_A/I_B) und Verstärkungsfaktor (f) der *DNA-Origami-Zange* **Apt₂₄ET₄**.

Das Anbringen von mehreren Aptameren ist nötig, um ein vollständiges Schließen der *DNA-Origami-Zangen* zu erzielen. Diese müssten jedoch sehr viel weiter entfernt vom Gelenk-Punkt in das DNA-Origami integriert werden, damit eine Vorhybridisierung der Aptamere ausgeschlossen werden kann.

Zur weiteren Charakterisierung der aptamermodifizierten *DNA-Origami-Zangen* wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Da die Bindung des ATP durch das Aptamer ein Gleichgewichtsprozess ist, wurden Agarose-Gele ohne und mit ATP im Laufpuffer durchgeführt (s. Abbildung 77). Durch die Verwendung der gleichen ATP-Konzentration (1 mM) im Laufpuffer konnte ein Herausdiffundieren des Zielmoleküls verhindert werden. Für die Untersuchung der aptamermodifizierten DNA-Origamis wurden die Origamis **SA₂₄ET₄** ohne CS als Referenz für geschlossene und **SA₂₄ET₄** mit 15 Äquivalenten CS für geschlossene *DNA-Origami-Zangen* auf dem gleichen Gel verwendet.

In Abwesenheit von ATP (s. Abbildung 77, links) zeigen die **Apt₄ET₄** (3 & 4) und **Apt₂₄ET₄** (5 & 6) ohne und mit 1 mM ATP in der Probe eine ähnliche Mobilität wie die geöffneten *DNA-Origami-Zangen* (2). Auch für **Apt₂₄ET₄**, welche im Fluoreszenzspektrum eine Vorhybridisierung der Aptamere zeigte, ist keine zweite Bande, die den geschlossenen *DNA-Origami-Zangen* zuzuweisen wäre, zu sehen.

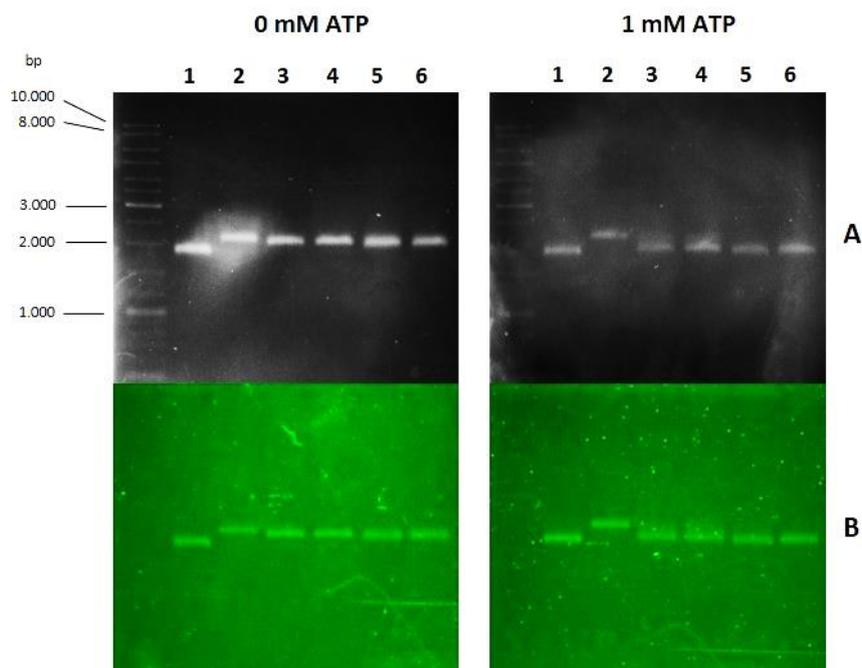


Abbildung 77: Agarose-Gelelektrophorese der ATP-bindenden der *DNA-Origami-Zangen* und **Apt₂₄ET₄** in Ab- (links) und Anwesenheit vom ATP (rechts) im Laufpuffer. Zum Vergleich wurden die geschlossenen (**1**) und geöffneten (**2**) DNA-Origamis **SA₂₄ET₄** der Strangaustausch-Experimente mit aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte zunächst durch Detektion der integrierten Fluoreszenzfarbstoffe (**B**; $\lambda_{exc} = 534 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 607 \pm 36 \text{ nm}$) und anschließend durch Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid (**A**; $\lambda_{exc} = 302 \text{ nm}$). **1:** **SA₂₄ET₄** 0 eq CS; **2:** **SA₂₄ET₄** 15 eq CS; **3:** **Apt₄ET₄** 0 mM ATP; **4:** **Apt₄ET₄** 1 mM ATP; **5:** **Apt₂₄ET₄** 0 mM ATP; **6:** **Apt₂₄ET₄** 1 mM ATP.

Bei Verwendung eines 1 mM ATP enthaltenden Laufpuffers (s. Abbildung 77, rechts) haben **Apt₄ET₄** (**3 & 4**) und **Apt₂₄ET₄** (**5 & 6**) ähnliche Mobilität wie die geschlossenen Zangen (**1**). Für **Apt₄ET₄** (**3 & 4**) ist eine schwache Bande oberhalb der Hauptbande zu erkennen, die auf geöffnete *DNA-Origami-Zangen* hindeutet. Diese Beobachtung deckt sich mit den Fluoreszenzspektren sowie mit den durchgeführten AFM-Aufnahmen (s. Abbildung 78). In beiden Fällen zeigt **Apt₄ET₄** eine geringere Aptamer-Bildung als **Apt₂₄ET₄**. **Apt₄ET₄** zeigt in den AFM-Bildern in Abwesenheit von ATP ein Verhältnis von ungefähr 9:1 zwischen offener und geschlossener Konformation, wohingegen **Apt₂₄ET₄** nur einen leichten Überschuss an offener Form vorweist (s. Tabelle 21). In Abwesenheit von ATP konnte für **Apt₄ET₄** nur ein sehr geringer Überschuss an geschlossenen Zangen ausgezählt werden. **Apt₂₄ET₄** hingegen zeigt 76 % geschlossene *DNA-Origami-Zangen*.

Die AFM-Aufnahmen in Anwesenheit von ATP konnten aufgrund von instrumentellen Problemen nicht mit einem 1 mM ATP enthaltenden Puffer durchgeführt werden. Die Proben wurden auf die Glimmer-Oberfläche aufgetragen und für 3 min inkubiert, sodass eine

ausreichende Adsorption der *DNA-Origami-Zangen* gegeben ist. Anschließend wurde die Glimmer-Oberfläche für die Messungen in Lösung mit TAE/Mg²⁺-Puffer überschichtet, was zu einer nachträglichen Öffnung der Zangen führen kann. Das bedeutet, dass die ausgezählten Ergebnisse möglicherweise nicht exakt der Realität in Anwesenheit von 1 mM ATP entsprechen und bessere Verhältnisse bei Verwendung eines ATP enthaltenden Puffers erzielt werden können.

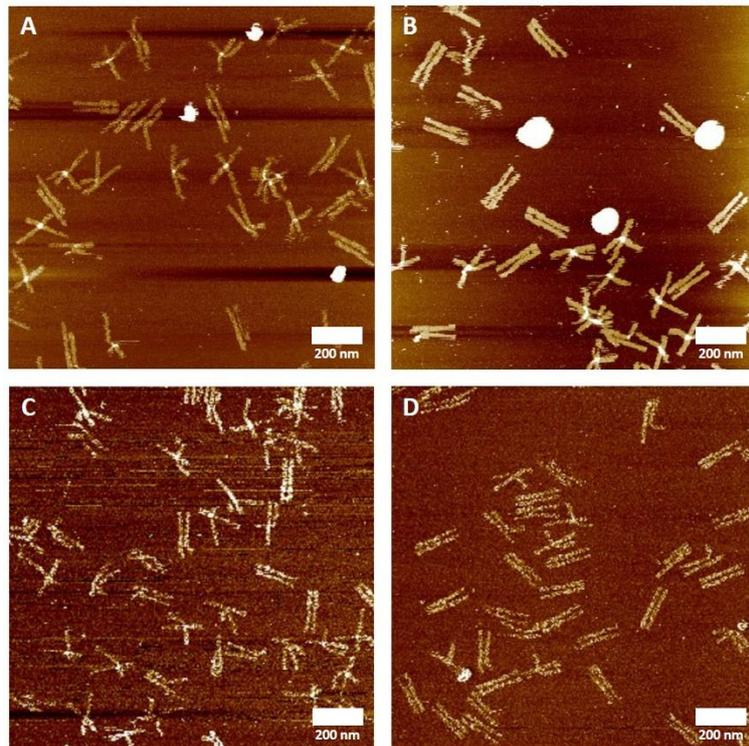


Abbildung 78: AFM-Aufnahmen der *DNA-Origami-Zangen* **Apt₄ET₄** (A & B) und **Apt₂₄ET₄** (C & D) jeweils ohne und mit 1 mM ATP. A: **Apt₄ET₄** 0 mM ATP; B: **Apt₄ET₄** 1 mM ATP; C: **Apt₂₄ET₄** 0 mM ATP; D: **Apt₂₄ET₄** 1 mM ATP.

Tabelle 21: Statistische Auswertung der AFM-Aufnahmen der ATP-bindenden *DNA-Origami-Zangen* **Apt₄ET₄** und **Apt₂₄ET₄**.

	offen	geschlossen	gesamt	% offen	% geschlossen
Apt₄ET₄ 0 mM ATP	25	2	27	92.6	7.4
Apt₄ET₄ 1 mM ATP	48	62	110	43.6	56.4
Apt₂₄ET₄ 0 mM ATP	152	117	269	56.5	43.5
Apt₂₄ET₄ 1 mM ATP	55	173	228	24.1	75.9

Im vorgestellten DNA-Origami-Aptamer-System erfolgt die optische Detektion mittels Energietransfer in unmittelbarer Nähe zur ATP-Bindungsstelle. Die Nähe der Fluorophore zur Bindungsstelle kann Einflüsse auf die Effizienz der Bindung des Zielmoleküls haben, weshalb die geteilten ATP-bindenden Aptamere auch mit dem von *Kuzuya et al.* etablierten Fluorophor-Löscher-System untersucht wurde.

In den folgenden *DNA-Origami-Zangen* wurde der Bereich nahe des Gelenk-Punkts (s. Abbildung 67, grün umrandeter Bereich) mit den Fluorophoren Texas Red (TXR) und 6-Fluoresceincarboxamid (FAM) sowie einem Fluoreszenzlöscher (BHQ-2; *black hole quencher*) versehen (s. Abbildung 79, **A**). In der offenen Form der Zangen wird die Fluoreszenz der Fluorophore nicht gelöscht. In der parallelen, geschlossenen Konformation liegt BHQ-2 in räumlicher Nähe zu TXR, sodass dessen Fluoreszenz geschwächt wird. Liegen die *DNA-Origami-Zangen* in der antiparallelen Konformation vor, wird die Fluoreszenz des 6-Fluoresceins gelöscht. Für verwendeten Aptamer-Faltungssträngen wurde die original Aptamer-Sequenz gewählt (s. Abbildung 79, **B**).^[116,117]

Zunächst wurden Referenz-Origamis hybridisiert, um die maximal und minimal erreichbaren Fluoreszenzintensitäten von FAM und TXR zu bestimmen, damit diese später mit den Fluoreszenzintensitäten der aptamermodifizierten *DNA-Origami-Zangen* verglichen werden konnten. Zur Bestimmung der maximal erreichbaren Intensitäten vom FAM und TXR (**FAM_{max}** & **TXR_{max}**) wurden *DNA-Origami-Zangen* verwendet, die keine Aptamer-Modifikationen sowie keinen Fluoreszenzlöscher besitzen (s. Tabelle 22). Weiterhin wurden die im FAM/TXR/BHQ-2-System minimal (**FAM_{min,apt}** & **TXR_{min,apt}**) und maximal (**FAM_{max,apt}** & **TXR_{max,apt}**) erreichbaren Fluoreszenzintensitäten ermittelt. **FAM_{min,apt}** und **TXR_{max,apt}** wurde an DNA-Origami-Zangen bestimmt, die über FAM, TXR und BHQ-2 verfügten, jedoch keine Aptamer-Modifikationen. Zur Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten von **FAM_{max,apt}** und **TXR_{min,apt}** wurden spezielle, literaturbekannte *DNA-Origami-Zangen* verwendet, die über diverse DNA-Duplexe verfügen, die eine parallele Konformation garantieren.^[149]

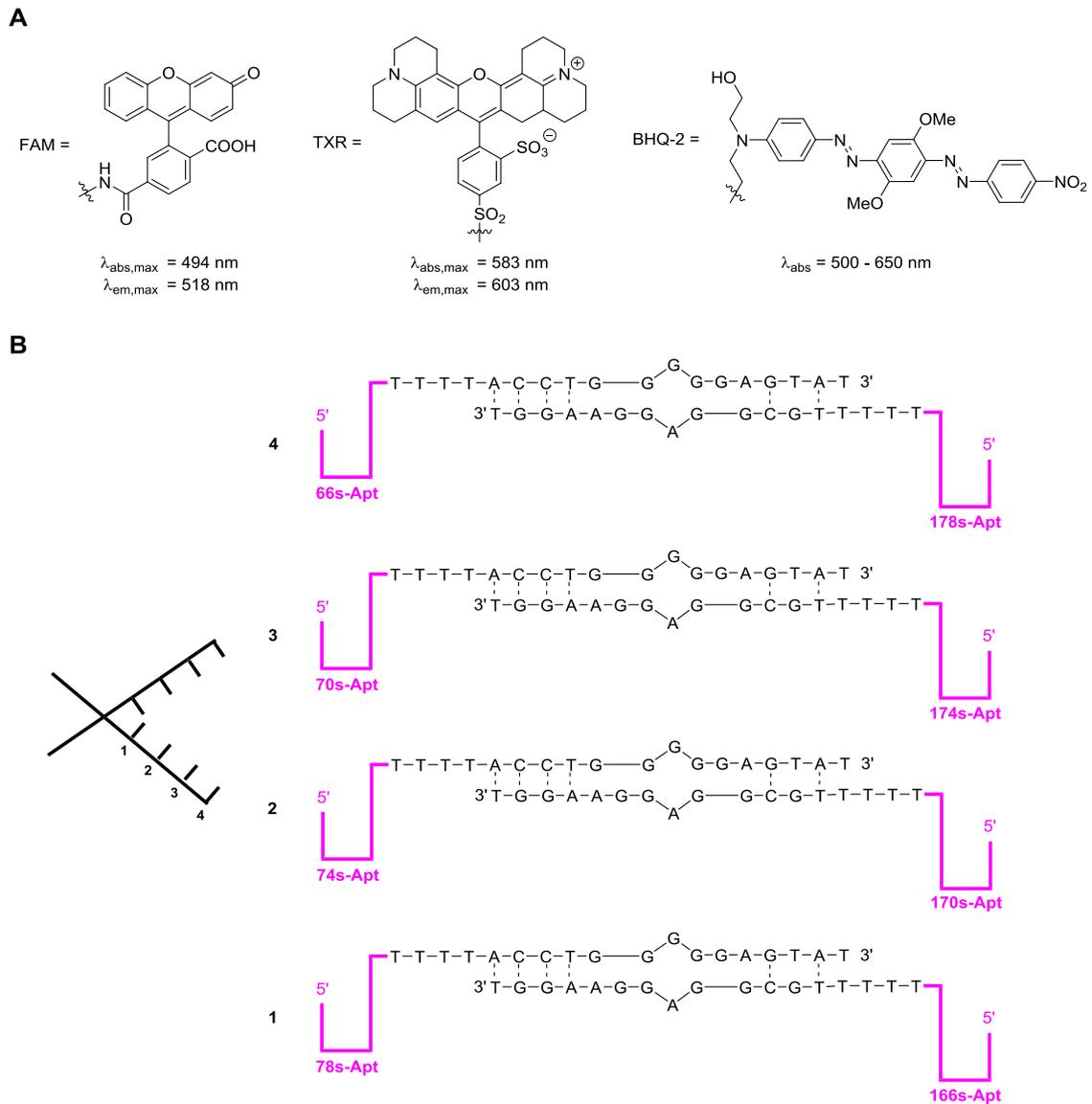


Abbildung 79: A: Strukturen und optische Daten der Fluorophore Texas Red (TXR) und 6-Fluoresceincarboxamid (FAM) sowie des Fluoreszenzlöschers BHQ-2. **B:** Sequenzen der unmodifizierten ATP-bindenden Aptamer-Faltungsstränge.

Tabelle 22: Übersicht über die Modifikationen der Referenz-DNA-Origami-Zangen.

	Modifikation	FAM	TXR	BHQ-2
FAM_{max}	keine	+	+	-
FAM_{min,apt}	keine	+	+	+
FAM_{max,apt}	parallel	+	+	+
TXR_{max}	keine	+	+	-
TXR_{min,apt}	parallel	+	+	+
TXR_{max,apt}	keine	+	+	+

Es wurden vier verschiedene aptamermodifizierte *DNA-Origami-Zangen* synthetisiert, die jeweils über ein, zwei, drei oder vier Aptamere verfügen. Deren FAM- und TXR-Fluoreszenz wurden in Ab- und Anwesenheit von ATP gemessen und mit **FAM_{max}** und **TXR_{max}** ins Verhältnis gesetzt (s. Abbildung 80, Fluoreszenzspektren s. Kapitel 8.6.3). Für die *DNA-Origami-Zangen* **Apt₂₃₄**, **Apt₃₄** und **Apt₄** ist ein klarer Trend in der FAM- und TXR-Fluoreszenz zu erkennen. Je weniger Aptamer-Modifikationen die Zangen aufweisen, desto geringer ist die FAM-Fluoreszenzintensität bzw. desto höher ist die TXR-Fluoreszenzintensität ohne ATP. Das heißt, je weniger Aptamere vorhanden sind, desto mehr offene Zangen liegen vor. Das gleiche Verhalten wird in Anwesenheit von 1 mM ATP beobachtet. Das bedeutet, dass je weniger Aptamere die *DNA-Origami-Zangen* besitzen, desto weniger geschlossene Zangen liegen auch in Anwesenheit von ATP vor.

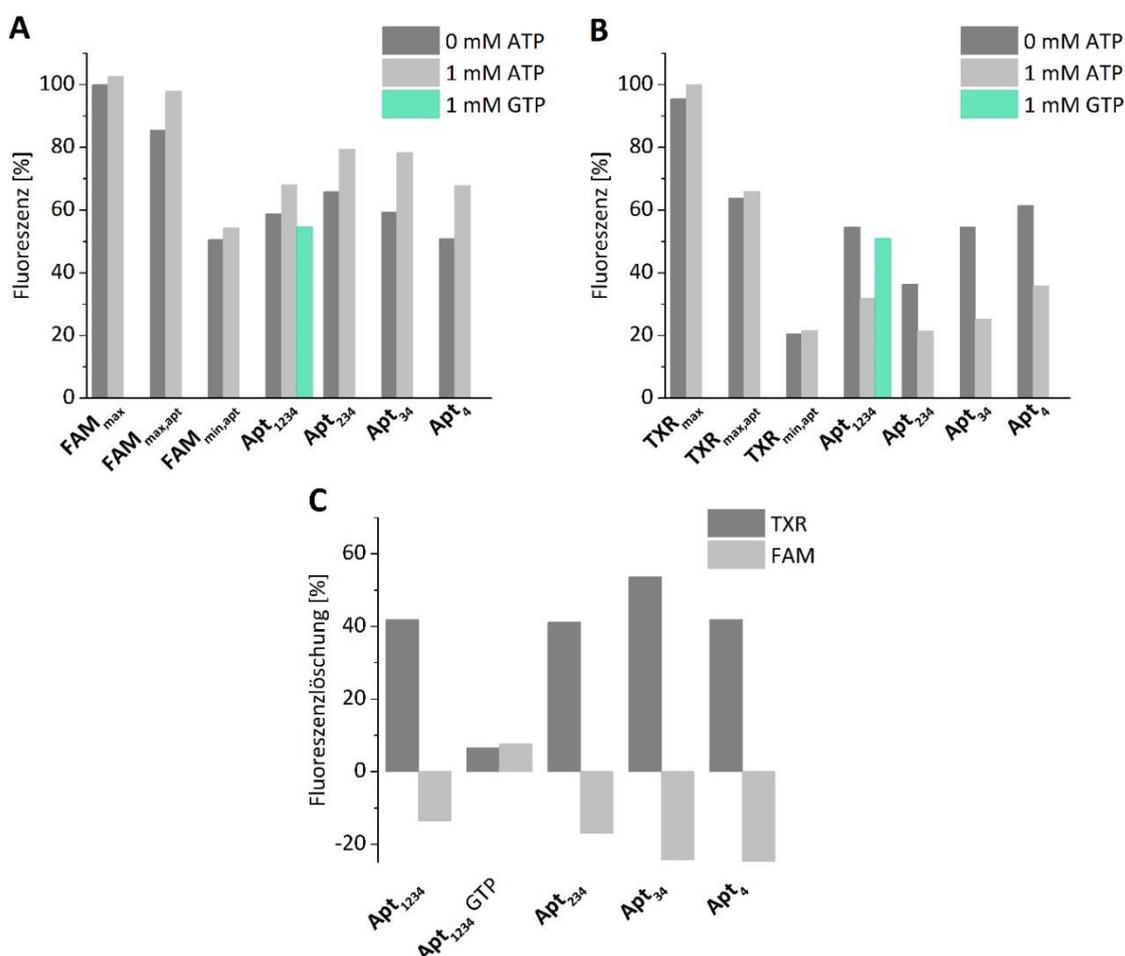


Abbildung 80: Graphische Darstellung der Fluoreszenzunterschiede (A & B) sowie der Fluoreszenzlöschung (C) der FAM-, TXR- und aptamermodifizierten *DNA-Origami-Zangen* **Apt₁₂₃₄**, **Apt₂₃₄**, **Apt₃₄** und **Apt₄**.

Apt₁₂₃₄ hat einen geringeren Absolutwert der Fluoreszenz und passt somit nicht in die Reihe. Ein möglicher Grund hierfür könnte das Aptamer an Position 1 sein, welches in unmittelbarer Nähe zur den Fluorophoren liegt und damit eine Fluoreszenzlöschung bewirken kann. Für **Apt₁₂₃₄** wurde zusätzlich eine Negativkontrolle unter Verwendung von 1 mM GTP durchgeführt. Wie bereits bei den ET-modifizierten Aptamer-Zangen existiert auch hier kein drastischer Unterschied zur Messung in Abwesenheit von ATP.

In Abbildung 80 C ist die prozentuale Fluoreszenzlöschung (positive Werte) bzw. Fluoreszenzerhöhung (negative Werte) aller Zangen aufgetragen. Diese gibt an, wie groß der Fluoreszenzunterschied nach Zugabe von 1 mM ATP ist und somit auch den Anteil an geschlossenen *DNA-Origami-Zangen*. Die Werte für FAM-Fluoreszenzerhöhung und TXR-Fluoreszenzlöschung sind sehr ähnlich. Das zeigt, dass die Verwendung von mehreren Aptameren die Zahl der Zangen, die eine Konformationsänderung durch Zugabe von ATP eingehen, nicht ändert, sondern ausschließlich die Zahl an bereits geschlossenen Zangen in Abwesenheit des Zielmoleküls erhöht. Die Selektivität gegenüber ATP lässt sich anhand Abbildung 80 C ebenfalls gut erkennen. Die Zugabe von GTP vermindert die Fluoreszenz von FAM und TXR gleichermaßen. Das zeigt, dass die GTP lediglich die Fluoreszenzintensität der Fluorophore unspezifisch löscht und nicht zu einer Konformationsänderung führt.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung wellenlängenschiebender Oligonukleotid-Sonden unter Verwendung einer neuen Generation photostabiler Cyanin-Styryl-Farbstoffe und verschiedener „Click“-Modifikationen zur postsynthetischen Fluoreszenzmarkierung behandelt. Diese Sonden können als „DNA/RNA Traffic Lights 2.0“ beschrieben werden, da es sich hierbei um die Entwicklung und Optimierung bereits existierender sowie neuer Energietransfer-Sonden handelt.

cAraU – neuer „Click“-Baustein für die Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden

Um den Einfluss der Zuckerkonformation auf das optische Verhalten von Fluorophoren zu untersuchen, wurde analog zu 2'-Propargyluridin (**cU**) ein neuer „Click“-Baustein synthetisiert, der anstelle der Ribose über eine Arabinose (**cAraU**) verfügt. **cAraU** wurde erfolgreich in DNA integriert und mit neun verschiedenen Fluorophoren postsynthetisch mittels kupfer(I)katalysierter „Click“-Reaktion modifiziert. Es wurde das optische Verhalten der **cAraU**-Sonden untersucht und mit dem der bereits bekannten **cU**-Konformation verglichen.

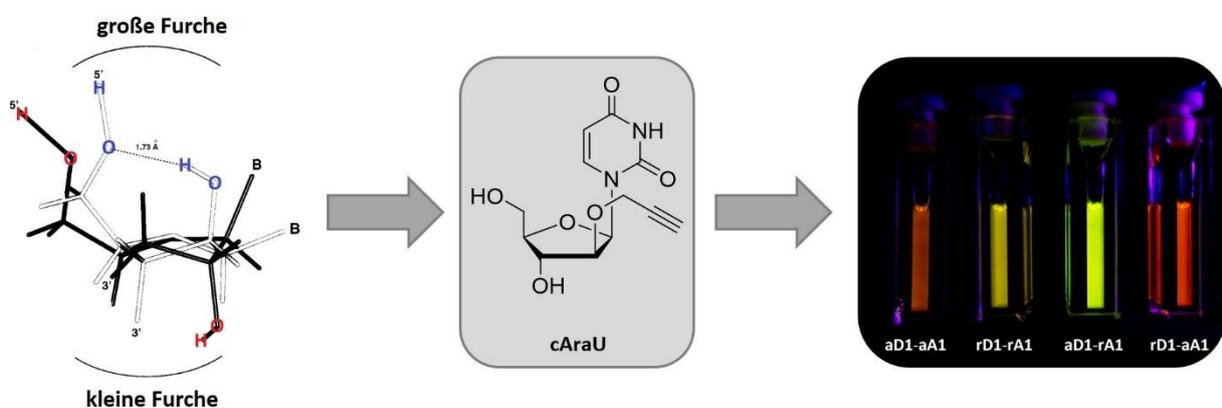


Abbildung 81: Schematische Darstellung der Entwicklung **cAraU**-Bausteins von der Idee (links: unterschiedliche Konformation der Ribo- und Arabinofuranoside) bis zum fluoreszenzmarkierten Baustein in der DNA (rechts: Fluoreszenzfarben der verschiedenen Kombinationen des Energietransferpaars **D1-A1**).

Durch die Verwendung des **cAraU**-Bausteins konnten die Fluoreszenzquantenausbeuten von vier der neun Fluorophore gesteigert werden. Weitaus bemerkenswerter ist das Verhalten von **cAraU** in den Energietransfer-Kombinationen. Es konnte bei 13 der 14 Kombinationen die Fluoreszenzquantenausbeute verbessert und in 9 der Kombinationen das bisherige

Kontrastverhältnis (**cU-cU**-Kombination) optimiert werden. Im Fall des Akzeptorfluorophors **A5** konnten die Kontrastverhältnisse aller Energietransfer-Paare gesteigert werden. Hervorzuheben sind die Paare **rD1-aA3** und **rD1-aA5**, die das höchste bisher beobachtete Kontrastverhältnis dieser Fluorophore von 215 zeigen. Die Verwendung der **cAraU**-Konformation beeinflusst zusätzlich die Emissionswellenlänge, sodass die Fluoreszenzfarbe des gleichen Energietransfer-Paars von grün-gelb bis hin zu orange-rot reichen kann.

Vier der besten Energietransfer-Kombinationen wurden in *in vivo* Experimenten erfolgreich auf ihre Tauglichkeit zur fluoreszenten Bildgebung getestet.

Wellenlängenverschiebende siRNA-Sonden

Der zuvor entwickelte **cAraU**-Baustein wurde zusammen mit den „Click“-Bausteinen **cU** und **cL** in siRNA-Sequenzen zur Regulierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) eingebaut und mit dem Energietransfer-Paar **D3-A4** markiert. Durch die Verwendung der „Click“-Chemie ist es gelungen, siRNA-Sonden zu entwickeln, die ein Kontrastverhältnis von bis zu 34.5 aufweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der neue **cAraU**-Baustein bessere optische Eigenschaften der ET-Sonden liefert als das kommerziell erhältliche **cU**.

Mithilfe der Lebenszeitmessungen konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten siRNA-Duplexe je nach Zustand verschiedene Fluoreszenzlebenszeiten aufweisen und damit für die Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie geeignet sind.

In *in vivo*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die entwickelten siRNA-Sonden zur Visualisierung innerhalb von Zellen geeignet sind und trotz Modifizierung mit einem Energietransfer-Paar ihre Aktivität nicht einbüßen. Die entwickelten siRNA-Sonden zeigen zusätzlich trotz kupfer(I)katalysierter „Click“-Reaktion keine signifikante Toxizität.

Wellenlängenverschiebende, adenosinbindende Aptasensoren

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden adenosinbindende Aptasensoren entwickelt, die durch Zugabe des Zielmoleküls einen Wechsel ihrer Fluoreszenzfarbe von grün nach orange-rot zeigen (s. Abbildung 82). Es wurde eine Kontrastoptimierung durch Variation der Fluorophor-Orientierung und Aptamersequenz durchgeführt. Dies lieferte einen Aptasensor, der ein

Kontrastverhältnis von 7.46 (1 mM Adenosin) und einen Verstärkungsfaktor von 12.2 aufweist.

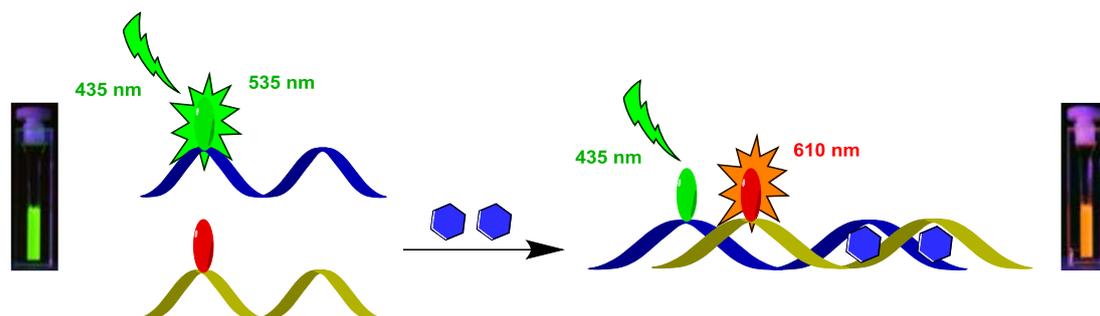


Abbildung 82: Schematische Darstellung des Prinzips der geteilten wellenlängenverschiebenden Aptasensoren.

Durch Verwendung von postsynthetischer „Click“-Chemie war die Synthese einzelsträngiger, zweifachmodifizierter Aptasensoren möglich. Wird die Schleifenregion beibehalten, kann das Kontrastverhältnis deutlich gesteigert werden. Dies führte jedoch zu einer drastischen Senkung des Verstärkungsfaktors, weil die Aptamersequenz bereits vororganisiert ist.

Energietransfer in ATP-bindenden DNA-Origamis

Eines der zuvor entwickelten, geteilten, doppelsträngigen Aptamere konnte im Rahmen eines Forschungsaufenthalts an der *Kansai University* in Osaka (Japan) unter Leitung von *Prof. Dr. Akinori Kuzuya* erfolgreich in das Konzept der *DNA-Origami-Zangen* integriert werden. Die Zangen zeigen durch Bindung zweier ATP-Moleküle eine Veränderung der Fluoreszenzfarbe sowie eine Konformationsänderung, die mittels Fluoreszenzspektroskopie bzw. Rasterkraftmikroskopie detektiert werden kann. Die Selektivität gegenüber strukturell verwandten Analyten konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

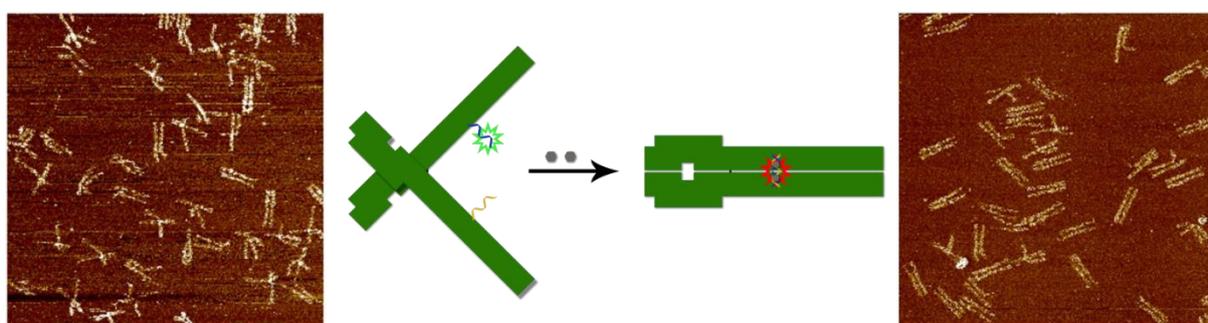


Abbildung 83: Schematische Darstellung der Konformationsänderung der *DNA-Origami-Zangen* durch Bindung zweier ATP-Moleküle sowie AFM-Aufnahmen der Zangen ohne (links) und mit ATP (rechts).

8 Experimenteller Teil

8.1 Materialien und Methoden

Reagenzien und Lösungsmittel

Die bei der Synthese verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *ABCR*, *Alpha Aesar*, *Fluka*, *Merck* und *Sigma Aldrich* bezogen. Die dabei verwendete Qualitätsstufe war mindestens „zur Synthese“. Alle eingesetzten Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe p.a. (*pro analysi*; zur Analyse). Trockene Lösungsmittel wurden von *Acros Organics* bezogen und unter einer Argon-Atmosphäre aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochreine (HPLC Grade) organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Hypersolv*) sowie entionisiertes und ultrafiltriertes Wasser aus einer *Millipore-Q8*-Anlage verwendet. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma *euriso-top* bezogen.

Reaktionsführung

Wenn nötig, wurden Reaktionen zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Argon-Atmosphäre (Schweißargon 5.0, 99.999% rein) durchgeführt. Die verwendeten Glasapparaturen wurden vor Gebrauch im Hochvakuum ausgeheizt.

Chromatographie

- **Dünnschichtchromatographie (DC):**

Verwendet wurden fertige Aluminium DC-Platten der Firma *Merck* mit einer Beschichtung aus 60 F₂₅₄ Kieselgel mit einer Schichtdicke von 0.25 mm. Die Detektion erfolgte über die Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. durch Fluoreszenz bei $\lambda = 366$ nm mit Hilfe einer UV-Handlampe. Die chemische Auswertung von DMT-geschützten Molekülen sowie von Nukelosiden erfolgte durch Anfärben mit einer schwefelsauren Methanol-Lösung (3 Vol.-% H₂SO₄) und anschließendem Erhitzen.

- **Flash-Säulenchromatographie (FC):**

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 der Firma *Sigma Aldrich* verwendet (Korngröße 40 - 63 μm). Die Säulen wurden nass gepackt und nach dem von *Still*^[x] beschriebenen Verfahren und unter Verwendung von Überdruck (Handpumpe) durchgeführt. Die zu reinigenden Substanzen wurden entweder im Laufmittel gelöst oder auf Kieselgel absorbiert auf die Säulen aufgetragen.

- **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):**

Reversed-phase (RP) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von DNA bzw. RNA wurde an einem modularen HPLC-System von *Shimadzu* durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL). Detektion, Steuerung und Auswertung erfolgte mit der Software *Class VP*. Für die analytische Chromatographie wurde eine *reversed-phase Supelcosil*[™] LC-318-Säule (250 x 4.6 mm, 3 μm) verwendet. Semipräparative Trennungen erfolgten unter Verwendung einer *reversed-phase Supelco Discovery*[®] *BIO Wide Pore* C18-Säule (250 x 10 mm, 5 μm). Die Flussrate bei analytischen Methoden betrug 1 mL/min und 2.5 mL/min bei semipräparativen Methoden. Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer für DNA (pH = 6.5, Laufmittel A) und 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer für RNA (Laufmittel A) äquilibriert und anschließend mit verschiedenen Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) eluiert. Die Detektion erfolgte über die DNA bzw. RNA typische UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ sowie der charakteristischen Absorptionswellenlänge des jeweiligen Farbstoffes.

Sublimationstrocknung

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

RNase-freies Arbeiten

Alle Reagenzien, die mit RNA in Kontakt kommen konnten, wurden nur mit desinfizierten Handschuhen (Ethanol) angefasst und die Arbeitsfläche wurde zuvor ebenfalls mit Ethanol gereinigt. Es wurden nur zertifiziert RNase-freie Plastikgeräte (Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen, Falcon® Tubes) verwendet. Zum Herstellen von RNase-freiem Wasser wurde deionisiertes Wasser mit 0.1 % DEPC versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Wasser für mindestens eine Stunde zum Sieden erhitzt um überschüssiges DEPC zu vernichten. Alle temperaturstabilen Glasgeräte wurden für mindestens zwei Stunden bei 200 °C ausgeheizt.

DNA/RNA-Festphasensynthese

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

Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte DNA- und RNA-Stränge wurden von *Metabion* in HPLC gereinigtem und lyophilisiertem Zustand bezogen. Vor der Verwendung wurden sie in entionisiertem und für RNA mit DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260$ nm.

Zellproliferationstest (MTT-Test)

Zur Bestimmung der Toxizität der RNA bzw. der jeweiligen Fluorophore in HeLa-Zellen, wurde die Zellproliferation unter Verwendung des *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferations Assay* nach Angaben des Herstellers *Promega* durchgeführt. Dieser Test basiert auf der intrazellulären Reduktion eines gelben Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) zum blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan durch

NADH und NADPH sowie der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase. Nach erfolgter Lyse der Zellen löst sich das Formazan im Medium und die Menge kann mittels Absorption bestimmt werden und kann direkt mit der Zellproliferation in Zusammenhang gebracht werden.

1×10^4 HeLa-Zellen wurden pro Kammer in einer Mikrotiterplatte (96 Kammern) ausgesät und mit 100 μL DMEM unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt und bei 37 °C und 5 % CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Fluorophore bzw. RNA behandelt (0.0375 – 0.30 μM). Für jede Konzentration wurden 6 Kammern behandelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen im Fall der Fluorophore mit DMSO (2 % in NaP_i -Puffer) und im Fall der RNA mit ScreenFect[®]A (1.5 μL) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden weitere 6 Kammern als Negativkontrolle mit 5 μL 20 %-igem Triton X-100 der Firma *Serva* für 5 min behandelt bevor 15 μL des MTT-Reagenzes hinzugegeben wurde. Die Zellen wurden für 2.5 h inkubiert und dann mit 100 μL Stop-Mix zur Lyse der Zellen versetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 -Atmosphäre erfolgte das Auslesen des Tests mit Hilfe eines Photometers. Dabei wurde die Absorption bei 595 nm aufgezeichnet.

NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden an einem *Bruker* Avance 300, Avance 400, Avance 600 oder Avance DRX 500 gemessen. Die Proben wurden hierfür in einem Probenröhrchen mit 5 mm Außendurchmesser in deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben, bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als Nullpunkt. Die Kalibrierung erfolgte dabei über das Signal des nicht vollständig deuterierten Lösungsmittels ($^1\text{H-NMR}$) bzw. des Lösungsmittelsignals ($^{13}\text{C-NMR}$):^[150]

- CDCl_3 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.16$ ppm
- DMSO-d_6 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.50$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39.52$ ppm

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

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden durch die Analytische Abteilung des Instituts für Organische Chemie des KIT aufgenommen. Die dabei verwendeten Geräte sind nachfolgend aufgelistet:

- EI/FAB: *Finnigan MAT 95*
- MALDI: *Bruker Daltronics Biflex-IV*
- APCI: *Advion Expression CMS*

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

Infrarotspektroskopie

Infrarot-Spektren wurden auf einem *Bruker Alpha T* gemessen. Zur Messung der Proben wurde eine abgeschwächte Totalreflexion, die ATR-Technik (ATR = *Attenuated Total Reflection*) verwendet. Die Lage der Absorptionsbanden wird in Wellenzahlen (ν) mit der Einheit cm^{-1} angegeben.

Optische Spektroskopie

Messungen erfolgten in Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm sowie in Quarzglasküvetten der Firma *Hellma Analytics* mit einer Schichtdicke von 3x3 mm, bei einer Temperatur von 20 °C. Alle DNA/RNA-Spektren wurden, sofern nicht anders angegeben, gegen das jeweilige Lösungsmittel basislinienkorrigiert.

- **UV/Vis-Absorptionsmessungen:**

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden entweder an einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* oder an einem *Perkin Elmer Lamda 750*, jeweils mit temperierbarem Küvettenhalter, aufgenommen. Folgende Messparameter wurden dabei verwendet:

- *Cary 100 Bio*: SBW: 2.0 nm, Durchschnittszeit: 0.1 s, Datenintervall: 1.0 nm, Lampenwechsel: 350 nm
- *Perkin Elmer Lamda 750*: Response: 0.08 s, Datenintervall: 1.0 nm, Lampenwechsel: 320 nm, Slits: 2.0 nm.

Schmelztemperaturmessungen wurden am *Cary 100 Bio* mit dem Programm „Thermal“ durchgeführt. Dabei wurde die Absorptionsänderung der DNA/RNA bei

$\lambda = 260$ nm verfolgt. Die Messungen erfolgten über einen Temperaturbereich von 10 - 90 °C. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min. Die Messdaten wurden in 0.5 °C Schritten aufgezeichnet.

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

- **Fluoreszenzmessungen:**

Die Fluoreszenzmessungen wurden entweder an einem Fluoromax-3 Fluorimeter von *Jobin-Yvon* mit Peltier-Element (*LFI-3751*) oder einem *Horiba Jobin-Yvon Fluoromax-4-NIR* ausgestattet mit einem *Haake A 25* Thermostat der Firma *Thermo Scientific* durchgeführt. Die Korrektur der Spektren erfolgte gegen die Ramanstreuung des reinen Lösungsmittels. Folgende Einstellungen wurden verwendet: *Increment*: 1.0 nm, *Integration time*: 0.2 s.

Mikroskopie

- **Atomkraftmikroskopie (AFM):**

Die AFM Messungen wurden am Institut für Biologische Grenzflächen am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt. Hierfür wurde ein *MultiMode™ 8* Mikroskop (*Bruker*) ausgestattet mit *Nanoscope V* Controller im *ScanAsyst® PeakForce Tapping™* Modus mit Siliciumnitrid Cantilever mit 0.7 N/m Federkonstante und pyramidalen Spitzen (*ScanAsyst Fluid+*, *Bruker*) verwendet. Alle Aufnahmen wurden mit der Software *NanoScope 8.15* ausgewertet.

- **Fluoreszenzmikroskopie:**

Die Bildgebung mittels konfokaler Laser-Scan-Fluoreszenzmikroskopie erfolgte nach 24 h bzw. 48 h an einem *Leica TCS SPE (DMI8)*. Dabei wurde ein ACS APO 63x/1.30 Öl-Objektiv verwendet. Die Anregung der Fluorophore erfolgte mit einem UV- (405 nm) bzw. Argon-Ionen-Laser (488 nm). Die jeweiligen Detektionsbereiche sind in den Bildunterschriften

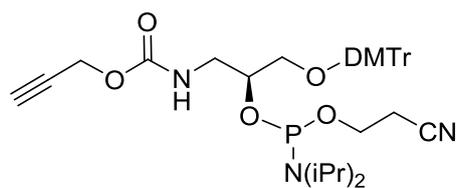
der Mikroskopie-Bilder angegeben. Es wurde eine Auflösung von 1024x1024 für die Aufnahmen gewählt. Die Bearbeitung der Zell-Aufnahmen erfolgte mit der Software *Leica Application Suite X*.

Die Probenvorbereitung und Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit *B. Olshausen* unter der Leitung von *Prof. Dr. U. Schepers* (Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie) durchgeführt.

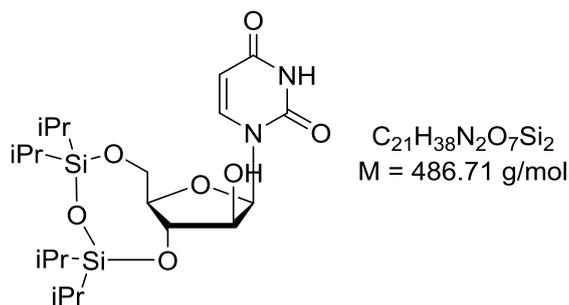
8.2 Synthesevorschriften

8.2.1 „Click“-Bausteine cL und cAraU

Der azyklische, Alkin-modifizierte DNA-Baustein **cL** und das für die Oligonukleotid-Festphasensynthese verwendete Phosphoramidit-Derivat (**9**) wurde nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert.^[71]

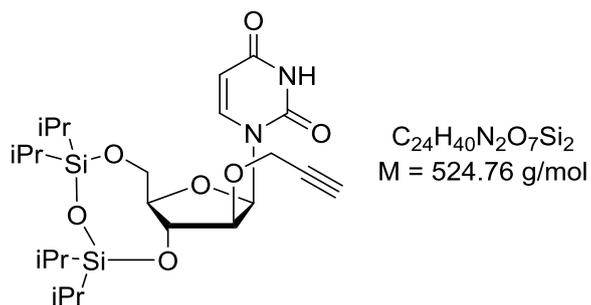


9

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)uracil-1-β-D-arabinofuranosid (5)

Es wurden 2.00 g **AraU** (1.00 eq, 8.20 mmol) über Nacht im Hochvakuum getrocknet und anschließend unter Argonatmosphäre in 10 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend wurden 2.89 mL TIPDSiCl₂ (1.10 eq, 9.02 mmol, 2.85 g) langsam unter Eiskühlung zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0 °C gerührt, daraufhin auf Raumtemperatur aufgewärmt und für weitere 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/EE stufenweiser Gradient 0 -> 50 % EE). Das Produkt **5** wurde als farbloser Feststoff isoliert (3.56 g, 7.32 mmol, 89 %).

Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[92]

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-propargyl-uracil-1-β-D-arabinofuranosid (6)

Unter Argonatmosphäre wurden 1.02 g **5** (1.00 eq, 2.10 mmol) in 20 mL abs. THF gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden unter Feuchtigkeitsausschluss 168 mg NaH (60%ig in Paraffinöl) (2.00 eq, 4.20 mmol) zugegeben und für 15 min gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur aufgewärmt und langsam über 30 min hinweg mit 0.94 mL Propargylbromid (4.00 eq, 8.40 mmol, 1.25 g) versetzt. Danach wurde für weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 10 mL Wasser wurde die Reaktion beendet und anschließend zweimal mit je 100 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels FC (SiO₂, 0-40 % EE in Hexan) gereinigt. **6** (716 mg, 1.37 mmol, 65 %) wurde als farbloser Schaum erhalten.

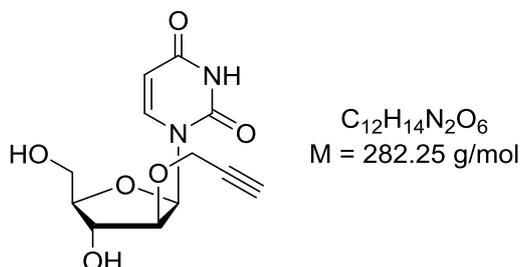
DC (Hexan/EE 1:1): *R_f* = 0.40

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.48 (s, 1H, NH), 7.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.22 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 5.63 (m, 1H, OH-3') 5.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 4.37 (dd, *J* = 7.7 Hz, 6.1 Hz, 1H, H-1'), 4.28 – 4.19 (m, 3H, OCH₂, H-3'), 4.07 (dd, *J* = 13.2 Hz, 2.4 Hz, 1H, H-5a'), 4.00 (dd, *J* = 13.2 Hz, 2.9 Hz, 1H, H-5b'), 3.73 (dt, *J* = 8.6 Hz, 2.6 Hz, 1H, H-4'), 2.42 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH), 1.11 – 0.95 (m, 28H, 8x CH₃ & 4x CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 160.1 (C-4), 150.4 (C-2), 140.9 (C-6), 101.9 (C-5), 82.2 (C-1'), 82.2 (C-4'), 80.4 (C-2'), 78.9 (C-CH), 75.5 (CH), 72.4 (C-3'), 60.5 (C-5'), 59.5 (OCH₂), 17.6 - 17.0 (8x CH₃), 13.6 - 12.5 (4x CH).

MS (FAB) *m/z* (%): 525.2 (65) [MH]⁺.

HR-MS (FAB) *m/z*: berechnet: C₂₄H₄₁N₂O₇Si₂⁺ [MH]⁺: 525.2447, gefunden: 525.2447.

2'-O-Propargyl-uracil-1-β-D-arabinofuranosid (cAraU)

Zu einer Lösung aus 697 mg **6** (1.00 eq, 1.31 mmol) in 17 mL abs. THF wurden 3.28 mL einer 1 M TBAF-Lösung in THF (2.50 eq, 3.28 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 5 min bei Raumtemperatur gerührt, anschließend über eine kurze Kieselgel-Säule gegeben und mit DCM/MeOH (5:1) eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels FC (SiO₂, DCM/MeOH 10:1) gereinigt. Es wurde **cAraU** (366 mg, 1.30 mmol, 99 %) als farbloser Schaum isoliert.

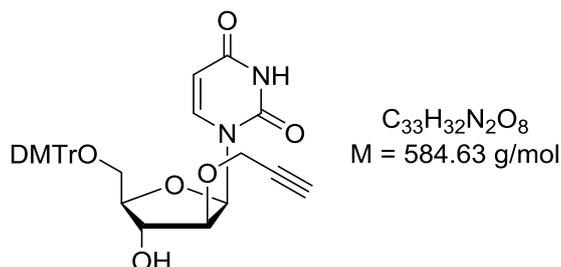
DC (DCM/MeOH 9:1): $R_f = 0.24$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-₆): δ (ppm) = 11.33 (s, 1H, NH), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6), 6.13 (m, 1H, H-1'), 5.63 (m, 1H, OH-3'), 5.60 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 5.02 (m, 1H, OH-5'), 4.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, OCH₂), 4.13 – 4.02 (m, 2H, H-2' & H-3'), 3.72 - 3.49 (m, 3H, H-4' & 2x H-5'), 3.44 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-_d₆): δ (ppm) = 163.1 (C-4), 150.4 (C-2), 141.9 (C-6), 100.6 (C-5), 83.2 (C-1'), 82.8 (C-4'), 82.4 (C-2'), 79.5 (C-CH), 77.6 (CH), 72.5 (C-3'), 59.9 (C-5'), 57.5 (OCH₂).

MS (FAB) m/z (%): 242.3 (100) [M]⁺-CH₂CCH (Propargyl).

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-2'-O-Propargyl-uracil-1-β-D-arabinofuranosid (7)



Es wurden unter Feuchtigkeitsausschluss 354 mg **cAraU** (1.00 eq, 1.26 mmol) in 14 mL abs. Pyridin gelöst und anschließend mit 510 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.20 eq, 1.51 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurden 5 mL MeOH zugegeben und daraufhin die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL EE aufgenommen, 3-mal mit 20 mL einer 1 M NaHCO_3 -Lösung gewaschen und Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels FC (SiO_2 , DCM/MeOH 99:1 + 0.1 % NEt_3) gereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum wurde **7** (729 mg, 1.25 mmol, 99 %) als farbloser Schaum erhalten.

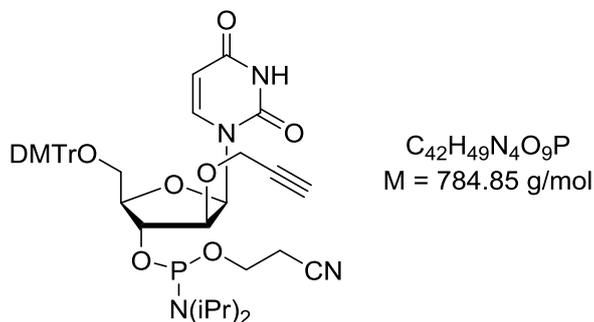
DC (DCM/MeOH 50:1): $R_f = 0.13$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.75 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 7.44 – 7.22 (m, 9H, DMT), 6.88 – 6.81 (m, 4H, DMT), 6.28 (d, $J = 5.8 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 5.43 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 4.39 (dd, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 5.7 Hz, 1H, H-2'), 4.28 - 4.10 (m, 3H, OCH_2 & H-3'), 3.89 (dt, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3.6 Hz, 1H, H-3'), 3.52 (dd, $J = 10.8 \text{ Hz}$, 3.6 Hz, 1H, H-5_a'), 3.46 (dd, $J = 10.8 \text{ Hz}$, 3.8 Hz, 1H, H-5_b'), 2.49 (t, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 163.1, 158.8, 150.4, 144.5, 141.7, 135.5, 135.5, 130.3, 130.2, 128.3, 128.2, 127.3, 113.4, 101.7, 87.0, 83.6, 83.3, 81.0, 79.2, 77.4, 75.8, 74.0, 61.6, 59.0, 55.4.

MS (FAB) m/z (%): 585.1 (68) $[\text{MH}]^+$.

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_8^+$ $[\text{MH}]^+$: 585.2231, gefunden: 585.2231.

3'-O-((2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinyl)-5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-2'-O-Propargyl-uracil-1-β-D-arabinofuranosid (8)

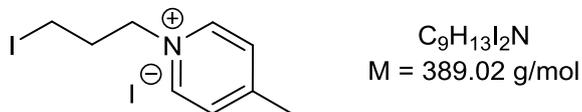
Es wurden 196 mg **7** (1.00 eq, 0.34 mmol) unter Argonatmosphäre in 5 mL abs. DCM gelöst und anschließend mit 175 µL *N,N*-Diisopropylethylamin (3.00 eq, 1.01 mmol, 0.130 g) und 112 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.50 eq, 0.50 mmol, 0.119 g) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde direkt, ohne Entfernen des Lösungsmittels, mittels FC (SiO₂, DCM/Aceton 5:1 + 0.1 % NEt₃) gereinigt. Hierbei wurde **8** (253 mg, 0.32 mmol, 95 %) als farbloser Schaum isoliert.

DC (DCM/Aceton 5:1): $R_f = 0.56$

MS (APCI) m/z (%): 785.6 (70) [MH]⁺.

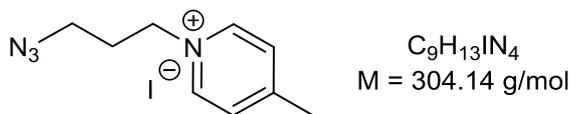
8.2.2 Azidmodifizierte Farbstoffe D3 und A4

1-(3-Iodopropyl)-4-methylpyridin-1-iumiodid (**14**)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 0.68 mL kommerziell erhältlich 4-Picolin (1.00 eq, 7.00 mmol, 652 mg) zusammen mit 3.22 mL 1,3-Diiodpropan (4.00 eq, 28.0 mmol, 5.91 g) in einem Vial in 15 mL abs. MeCN gelöst und für 16 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der ölige Rückstand mit 15 mL EE versetzt und anschließend im Ultraschallbad behandelt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und 2-mal mit 10 mL kaltem EE gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum wurde **14** (2.71 g, 6.97 mmol, quant.) als hellgelber Feststoff erhalten.

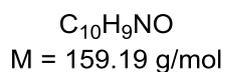
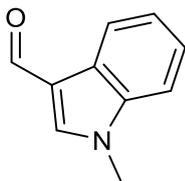
Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[151]

1-(3-Azidopropyl)-4-methylpyridin-1-iumiodid (15)

In einem Vial wurden unter Schutzgas 900 mg **14** (1.00 eq, 2.31 mmol) zusammen mit 376 mg Natriumazid (2.50 eq, 5.78 mmol) in 12 ml abs. MeCN gelöst und für 16 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Feststoff abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 15 mL DCM aufgenommen. Die entstandene braune Lösung wurde ein weiteres Mal filtriert und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **15** (611 mg, 2.01 mmol, 87%) wurde als braunes Öl isoliert.

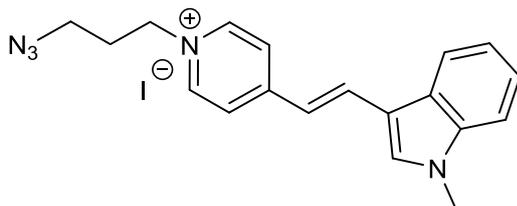
Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[151]

1-Methyl-1H-indole-3-carbaldehyd (**12**)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 1.45 g Indol-3-carbaldehyd (1.00 eq, 10.0 mmol), 1.52 g K_2CO_3 (1.10 eq, 11.0 mmol) und 2.53 mL Dimethylcarbonat (3.00 eq, 30.0 mmol, 2.70 g) in 10 mL abs. DMF gelöst und für 19 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung auf ca. 100 g Eis gegossen und die wässrige Phase 3-mal mit je 150 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend 2-mal mit je 150 mL Wasser (dest.) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend bei 50°C bis zur Trockne eingeeengt. Der erhaltene Feststoff wurde 2-mal mit je 10 mL Hexan gewaschen. **12** (1.41 g, 8.87 mmol, 89%) wurde als hellbrauner Feststoff isoliert.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[152]

(E)-1-(3-Azidopropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid (D3)

$C_{19}H_{20}IN_5$
 $M = 445.31 \text{ g/mol}$

Es wurden 90 mg **15** (1.00 eq, 0.30 mmol) und 48 mg **12** (1.00 eq, 0.30 mmol) in 4 mL abs. Ethanol gelöst und anschließend mit 70 μL Piperidin (2.40 eq, 0.73 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Feststoff abgesaugt und 3-mal mit Diethylether gewaschen. Es wurde Diethylether zur Mutterlauge hinzugegeben und weiterer gebildeter Feststoff wurde ebenfalls abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Es wurde **D3** (108 mg, 0.24 mmol, 81 %) als schwarzbrauner Feststoff erhalten.

DC (2-Butanol/ H_2O /Essigsäure 80:15:5): $R_f = 0.27$.

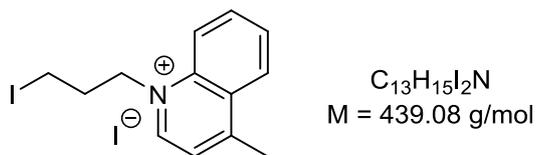
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.76 (d, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H), 8.13 – 8.27 (m, 4H), 7.97 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H), 7.25 – 7.36 (m, 3H), 4.48 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.48 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H), 2.18 (p, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 154.6, 143.4, 138.0, 136.0, 135.8, 125.3, 123.0, 121.9, 121.4, 120.5, 116.8, 112.6, 111.0, 56.7, 47.6, 33.1, 29.5.

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 2924 (w), 2085 (s), 1593 (s), 1376 (w), 1170 (m).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für $C_{19}H_{20}N_5^+$ [M^+]: 318.1713, gefunden: 318.1715.

1-(3-Iodopropyl)-4-methylchinoliniumiodid (17)



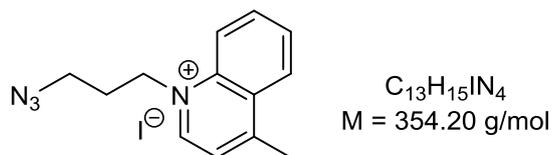
Unter Argon-Atmosphäre wurden 0.87 mL 4-Methylchinolin (1.00 eq, 6.57 mmol, 941 mg) zusammen mit 3.02 mL 1,3-Diodpropan (4.00 eq, 26.3 mmol, 7.78 g) in 10 mL 1,4-Dioxan gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit EE versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 50:1). Nach Trocknen im Hochvakuum wurde **17** (1.40 g, 3.19 mmol, 49 %) als gelber Feststoff erhalten.

DC (DCM/MeOH 9:1): $R_f = 0.38$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 9.38 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H, H_{arom}), 8.60 – 8.55 (m, 2H, H_{arom}), 8.29 – 8.26 (m, 1H, H_{arom}), 8.08 – 8.05 (m, 2H, H_{arom}), 5.03 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, H_{alkyl}), 3.36 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, H_{alkyl}), 3.01 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 158.9, 148.6, 136.9, 135.2, 129.6, 130.0, 127.2, 122.7, 119.1, 57.4, 33.1, 19.7, 1.6.

MS (FAB) m/z (%): 312.0 [M^+] (100).

1-(3-Azidopropyl)-4-methylchinolin-1-iumiodid (18**)**

In einem Vial wurden unter Schutzgas 224 mg **17** (1.00 eq, 0.509 mmol), 331 mg Natriumazid (10.0 eq, 5.09 mmol) und 255 mg Natriumiodid (3.33 eq, 1.70 mmol) in 3 mL abs. DMF gelöst und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 25 mL Diethylether versetzt und der entstandene braune Niederschlag abfiltriert und 2-mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde anschließend in 50 mL DCM gelöst und mit 2.00 g Natriumiodid versetzt. Die organische Phase wurde 3-mal mit 100 mL dest. H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde 2-mal mit 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Trocknem unter Hochvakuum wurde **18** (168 mg, 0.407 mmol, 93 %) als dunkelgrüner Feststoff erhalten.

DC (2-Butanol/H₂O/AcOH 80:15:5) *R_f* = 0.13

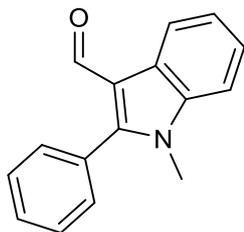
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.61 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{arom}), 8.60 – 8.55 (m, 2H, H_{arom}), 8.32 – 8.23 (m, 1H, H_{arom}), 8.12 – 8.03 (m, 2H, H_{arom}), 5.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H_{alkyl}), 3.57 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H_{alkyl}), 3.02 (s, 3H, CH₃), 2.23 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, H_{alkyl}).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 159.3, 149.2, 137.3, 135.7, 130.1, 129.4, 127.7, 123.2, 119.8, 55.1, 48.2, 29.0, 20.2.

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 2109 (s), 1583 – 1615 (m), 1363 (m), 836 (s), 768 (s).

MS (FAB) *m/z* (%): 227.2 [M⁺] (100).

1-Methyl-2-phenyl-1H-indole-3-carbaldehyd (**20**)



$C_{16}H_{13}NO$
M = 235.29 g/mol

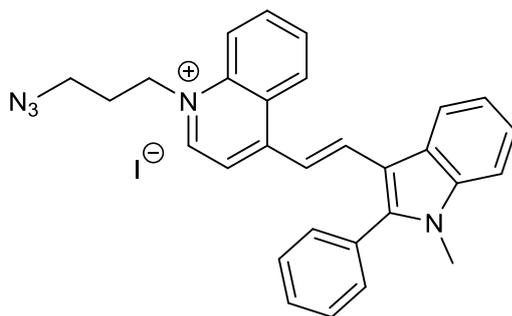
Unter Argon-Atmosphäre wurden 2.21 g 2-Phenylindol-3-carbaldehyd (1.00 eq, 10.0 mmol), 1.52 g K_2CO_3 (1.10 eq, 11.0 mmol) und 3.37 mL Dimethylcarbonat (4.00 eq, 40.0 mmol, 3.60 g) in 10 mL abs. DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde für 19 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung auf ca. 100 g Eis gegossen und die wässrige Phase 3-mal mit je 150 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend 2-mal mit je 150 mL Wasser (dest.) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend bei 50°C bis zur Trockne eingengt. **20** (2.32 g, 9.86 mmol, 99%) wurde als gelber Feststoff isoliert.

DC (2-Butanol/ H_2O / $AcOH$ 80:15:5) $R_f = 0.80$

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 9.61 (s, 1H), 8.16 – 8.31 (m, 1H), 7.65 (dp, $J = 10.0$ Hz, 3.4 Hz, 2.9 Hz, 6H), 7.28 – 7.42 (m, 2H), 3.69 (s, 3H).

^{13}C -NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 185.2, 151.2, 137.1, 131.0, 129.9, 128.6, 128.1, 124.5, 123.7, 122.9, 120.8, 114.4, 110.0, 31.0.

MS (FAB) m/z (%): 236.4 [M^+] (100).

(E)-1-(3-Azidopropyl)-4-(2-(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid

$C_{29}H_{26}IN_5$
 $M = 571.47 \text{ g/mol}$

In einem Vial wurden 168 mg **18** (1.00 eq, 0.47 mmol) zusammen mit 223 mg **20** (1.00 eq, 0.95 mmol) in 13 ml abs. EtOH gelöst und anschließend mit 0.21 ml Piperidin (2.20 eq, 2.09 mmol, 180 mg) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und 3-mal mit kaltem Et₂O gewaschen. Die Mutterlauge wurde zusätzlich mit Et₂O versetzt und weiterer entstandener Feststoff wurde ebenfalls abfiltriert und 3-mal mit kaltem Et₂O gewaschen. Nach Trocknen unter Hochvakuum wurde **A4** (118 mg, 0.207 mmol, 44 %) als dunkelroter Feststoff erhalten.

DC (2-Butanol/H₂O/AcOH 80:15:5) $R_f = 0.30$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 9.01 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 8.69 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.41 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.19 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.84 – 8.01 (m, 4H), 7.62 – 7.74 (m, 6H), 7.43 (quin, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.54 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.16 (quin, $J = 6.7$ Hz, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 153.8, 147.3, 146.6, 138.0, 137.9, 137.8, 134.8, 131.0, 129.8, 129.3, 129.0, 128.6, 126.3, 125.8, 124.8, 123.7, 122.5, 121.0, 118.8, 113.8, 113.6, 112.0, 111.4, 53.5, 47.7, 31.5, 29.2.

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 2099 (s), 1580 (s), 1555 (s), 1386 (m), 1221 (m), 749 (m).

MS (FAB) m/z (%): 444.3 [M^+] (60).

8.3 Oligonukleotide

8.3.1 Synthese modifizierter DNA

Allgemein

Die Synthese der artifiziellen Oligonukleotide erfolgte mit einem *PerSpective Expedite 8909* Nucleic Acid Synthesizer der Firma *Applied Biosystems (ABI)* nach der Standard-Phosphoramidit-Methode. Die kommerziell erhältlichen Phosphoramidite der natürlichen DNA-Basen wurden in Acetonitril (*amidite diluent*) gelöst und als 0.067 M Lösungen verwendet. Die käuflichen, artifiziellen Bausteine 2'-*O*-Propargyl-Uridin (**cU**) und **PEG** wurden als Phosphoramidit von *ChemGenes* bzw. *Glen Research* bezogen und als 0.083 M Lösungen ebenfalls in Acetonitril eingesetzt. Die synthetisch hergestellten Phosphoramidit-Bausteine **cAraU** und **cL** wurden als 0.1 M Lösungen in Acetonitril in den Syntheseautomaten eingesetzt.

Tabelle 23: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Phosphoramidite von dA, dG, dC, dT. Erläuterungen:
Dbk: 3 % Dichloressigsäure in CH₂Cl₂; **Wsh:** MeCN; **Act:** 0.45 M Tetrazol in MeCN; **Caps:** Ac₂O in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox:** Iod in Wasser/THF/Pyridin.

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

Syntheseprotokolle

Im Syntheseprotokoll werden die einzelnen Teilschritte der Syntheseyklen der automatisierten Oligonukleotid-Festphasensynthese festgelegt. Die Anzahl der Pulse (1 Puls = 16 μ L) und die Kupplungsdauer (in Sekunden) lassen sich darin bestimmen. In Tabelle 23 ist ein Standard-Kupplungsprotokoll, welches für die natürlichen Basen dA^{bz}, dG^{ib}, dC^{bz} und dT verwendet wurde, aufgeführt.

Um eine nahezu quantitative Kupplungseffizienz der artifiziellen Bausteine zu erzielen, wurde der in Tabelle 23 hervorgehobene Bereich für jeden Baustein individuell modifiziert. Die veränderten Syntheseprotokolle sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Tabelle 24: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den Einbau von **cU** in DNA.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit [s]
§ Coupling				
21	cU + Act	PULSE	5	0
21	cU + Act	PULSE	2	100
2	Act	PULSE	5	150
1	Wsh	PULSE	7	56

Tabelle 25: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den Einbau von **cAraU** und **cL** in DNA.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit [s]
§ Coupling				
21	cAraU/cL + Act	PULSE	5	0
21	cAraU/cL + Act	PULSE	3	300
2	Act	PULSE	5	300
1	Wsh	PULSE	7	100

Tabelle 26: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den Einbau von **PEG** in DNA.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit [s]
§ Coupling				
21	PEG + Act	PULSE	5	0
21	PEG + Act	PULSE	10	400
2	Act	PULSE	5	300
1	Wsh	PULSE	7	56

Aufarbeitung

Nach erfolgter DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet und anschließend das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Abspaltung der Oligonukleotide von der festen Phase sowie der Entfernung der exozyklischen Amin-Schutzgruppen wurden 700 µL Ammoniumhydroxid-Lösung (>25%, trace select, *Fluka*) zugegeben und die Suspensionen für 16 h bei 55 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben in einem Vakuumkonzentrator CMC-2 Alpha RVC der Firma *Christ* vom Ammoniak befreit (60 min, 34 °C, 100 mbar). Die überstehenden Lösungen wurden entnommen und das Granulat zweimal mit je 200 µL HPLC-Wasser gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden lyophilisiert und für die nachfolgende postsynthetische „Click“-Reaktion ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Postsynthetische „Click“-Reaktion an Alkin-modifizierten Oligonukleotiden

Nach Abspaltung der DNA von der festen Phase wurden die lyophilisierten DNA-Stränge mit jeweils 100 µL HPLC-Wasser, 25 µL (10 µmol, 10.0 eq) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser), 34 µL (3.40 µmol, 3.40 eq) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/tBuOH 3:1), 114 µL (1.14 µmol, 1.14 eq) einer Lösung des jeweiligen Azids (10 mM in DMSO/tBuOH 3:1) und 17 µL (1.70 µmol, 1.70 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung versetzt und für 1.5 h bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die „Click“-Lösungen in ein Falcon® Tube überführt und zur Komplexierung der Kupferionen mit 150 µL Na₂EDTA (40 mM in H₂O) versetzt. Zur Fällung der DNA wurden 450 µL einer 0.3 M wässrigen Natriumacetat-Lösung und 10 mL abs. EtOH zugegeben und die Lösungen für 18 h bei -32 °C gelagert. Im Anschluss wurde die ausgefallene DNA abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm) und 2-mal mit je 1 mL 80%-igem EtOH gewaschen. Das DNA-Pellet wurde im Hochvakuum getrocknet und anschließend mittels *Reversed Phase*-HPLC gereinigt.

Reinigung modifizierter DNA mittels semi-präparativer HPLC

Die präparative Reinigung der einfach modifizierten DNA-Stränge erfolgte über *Reversed Phase*-HPLC (*Supelco Discovery® BIO Wide Pore* C18-Säule (250 x 10 mm, 5 µm)). Die

verunreinigten DNA-Proben wurden vor der Injektion in 250 μL HPLC-Wasser gelöst. In Kapitel 8.3.4 sind die verwendeten Gradienten und Detektionswellenlängen aufgelistet.

Das Produkt wurde fraktionsweise in Eppendorfgefäßen gesammelt und anschließend die Sauberkeit der Proben mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) überprüft. Die entsprechenden Fraktionen wurden anschließend vereinigt und lyophilisiert.

Charakterisierung durch Massenspektrometrie

MALDI-TOF-Massenspektren der aufgereinigten Oligonukleotide wurden am KIT, Institut für Organische Chemie an einem Biflex-IV Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linear negativen Modus aufgenommen. Als Matrix diente entweder eine 2:1 Mischung aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (0.3 M in EtOH) und Diammoniumcitrat (0.1 M in H_2O) oder 3-Hydroxypicolinsäure (ges. Lösung in 50% MeCN) und Diammoniumcitrat (0.1 M in H_2O) im Volumenverhältnis 9:1.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet. Dafür wurde die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten Oligonukleotids bei 260 nm in Wasser kann unter Verwendung folgender Formel berechnet werden:

$$\epsilon_{260} = (dA \cdot \epsilon_{dA} + dC \cdot \epsilon_{dC} + dG \cdot \epsilon_{dG} + dT \cdot \epsilon_{dT}) \cdot 0.9$$

$$\epsilon_{dA} = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \qquad \epsilon_{dG} = 11.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{dC} = 7.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \qquad \epsilon_{dT} = 8.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Dabei stehen dA, dC, dG und dT für die Anzahl der jeweiligen Nukleoside und ϵ beschreibt den molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität.

Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide muss der entsprechende molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} der Modifikation addiert werden. Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel 8.3.5 aufgeführt.

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

Tabelle 27: Molare Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} der „Click“-Bausteine.

Modifikation	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
cU	10.1
cAraU	10.1
cL	0

Tabelle 28: Molare Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} der Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

Modifikation	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
D1	10.6
D2	8.4
D3	10.2
D4	8.4
A1	9.0
A2	17.3
A3	8.6
A4	13.1
A5	3.0

Hybridisierung

Falls nicht anders beschrieben, wurden die modifizierten Einzelstränge zusammen mit 1.0 eq des komplementären Gegenstrang in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPi; pH 7.0) und 250 mM Natriumchlorid-Lösung für 10 Minuten bei 90 °C inkubiert und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Spektroskopie

Die UV/Vis- und Fluoreszenzmessungen aller DNA-Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit einer Konzentration von 2.5 μM mit 250 mM NaCl und 10 mM Phosphat-Puffer (NaP_i) bei pH 7.0 durchgeführt.

8.3.2 Synthese mehrfach modifizierter DNA mit *ultramild* Monomeren

Für die Synthese der doppelmodifizierten Aptamere musste aufgrund der Basenlabilität der eingesetzten Cyanin-Styryl-Farbstoffe auf ein anderes Schutzgruppenkonzept für die DNA-Synthese zurückgegriffen werden. Hierbei wurden phenoxyacetyl-geschütztes A (dA^{Pac}), 4-isopropyl-phenoxyacetyl-geschütztes G ($\text{dG}^{\text{iPrPac}}$) und acetyl-geschütztes C (dC^{ac}) verwendet, die unter milden, schwach basischen (0.05 M K_2CO_3 in Methanol) Bedingungen abgespalten werden können. Um einen Austausch der iPrPac-Schutzgruppe des dG bei Verwendung von Ac_2O im Cap Mix durch Acetat zu verhindern, wurde Cap A durch Pac_2O ersetzt. Die Kupplungszeiten sowie die Anzahl der Pulse für die *ultramild*-Synthese wurden nach denen des Herstellers empfohlenen Bedingungen angepasst (*Glen Research*).

„Click“-Reaktion an alkinmodifizierten Oligonukleotiden auf der festen phase („on bead“)

Zur Doppelmodifizierung der Aptamere wurde zunächst nur ein **cU**-Baustein eingebaut (DMT-on) und anschließend die „Click“-Reaktion des ersten Farbstoffes an der festen Phase („on bead“) durchgeführt. Daraufhin wurde die automatisierte DNA-Synthese fortgesetzt und der zweite **cU**-Baustein integriert.

In einem Eppendorfgefäß wurden jeweils 130 μL MeCN, 50 μL (20.0 μmol , 20.0 eq) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser), 228 μL (2.28 μmol , 2.28 eq) einer Lösung des jeweiligen Azids (10 mM in DMSO/tBuOH 3:1) und 34 μL (3.40 μmol , 3.40 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung vermischt. Auf die Verwendung von TBTA als Cu(I)-komplexierenden Liganden wurde aufgrund dessen schlechter Löslichkeit in Wasser verzichtet, um ein Verstopfen der Filter der DNA-Säulen zu verhindern. Stattdessen wurde MeCN verwendet, welches die gleiche Effektivität wie TBTA als Cu(I)-stabilisierender Ligand gezeigt hat.^[110,153]

Die Reaktionslösung wurde mit Hilfe zweier Spritzen, die jeweils an den Enden der CPG-Säulen befestigt wurden, gleichmäßig über die feste Phase verteilt und für 1.5 h bei 60 °C inkubiert. Die Reaktionslösung wurde im Abstand von jeweils 30 min unter Verwendung der Spritzen erneut durchmischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die „Click“-Lösung entfernt und die feste Phase nacheinander mit jeweils 3 mL folgender Lösungsmittel gewaschen. Es wurden DMSO/tBuOH (3:1), MeCN, H₂O, Na₂EDTA (40 mM in H₂O), H₂O, EtOH und abschließend MeCN bis keine Färbung der Waschlösung mehr zu erkennen war. Die CPG-Säulen wurden unter Hochvakuum getrocknet und danach wieder in den Synthesizer eingesetzt um den zweiten Teil der Aptamere zu synthetisieren.

Aufarbeitung

Nach zweifacher „Click“-Modifikation der Oligonukleotide wurden die CPG-Säulen unter Hochvakuum getrocknet. Das CPG-Granulat wurde anschließend in ein Eppendorfgefäße überführt und zur Abspaltung von der festen Phase sowie der Entschützung der exozyklischen Amin-Schutzgruppen mit 1 mL einer 0.05 M methanolischen K₂CO₃-Lösung versetzt. Das Granulat wurde für 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Neutralisation wurden 6 µL Eisessig zugegeben und die Suspension ordentlich vermischt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende CPG 2-mal mit je 200 µL HPLC-Wasser gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden in einem Vakuumkonzentrator schrittweise bis zur Trockne eingengt (1: 1 h, 40 °C, 340 mbar; 2: 16 h, 25 °C, 0.1 mbar). Der DNA-Rückstand wurde anschließend mittels *Reversed Phase*-HPLC gereinigt (siehe Kapitel 8.3.1 - Reinigung modifizierter DNA mittels semi-präparativer HPLC).

8.3.3 Synthese modifizierter RNA

Allgemein

Die Synthese der modifizierten RNA erfolgte an einem *PerSpective Expedite 8909* Nucleic Acid Synthesizer der Firma *Applied Biosystems (ABI)* wie in Kapitel 8.3.1 beschrieben. Die RNA-Monomere (*UltraFast Deprotection* DMT-2'-O-TBDMS-rC^{ac}, -rA^{bz}, -rG^{ac}, -rU) sowie CPG-Säulen (rC^{ac}, rA^{bz}, rG^{ac}, rU) wurden von der Firma *Glen Research* bezogen. Aufgrund der sterisch anspruchsvollen 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe wurde der Activator (0.45 M Tetrazol in MeCN) gegen den reaktiveren Activator 42[®] (0.25 M 5-[3,5-Bis(trifluormethyl)phenyl]-1H-tetrazol) der Firma *SAFC* ausgetauscht. Hierdurch konnten die Kupplungszeiten verringert und gleichzeitig die Kupplungseffizienz erhöht werden.

Syntheseprotokolle

Wie bereits erwähnt müssen aufgrund der sterisch anspruchsvollen 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe die Kupplungszeiten im Vergleich zur DNA-Synthese erhöht werden. Aus dem gleichen Grund wurde ein zweiter Capping-Schritt hinzugefügt, um unerwünschte Verlängerungen zu verhindern. In Tabelle 31 ist beispielhaft ein Kupplungsprotokoll für eine RNA-Base aufgeführt. Die rot markierten Werte wurden im Vergleich zur DNA verändert.

Für eine möglichst quantitative Kupplungseffizienz wurden die Kupplungszeiten der artifiziellen Bausteine ebenfalls erhöht (siehe Tabelle 29 und Tabelle 30).

Tabelle 29: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den Einbau von **cU** und **cAraU** in RNA.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit [s]
\$ Coupling				
21	cU/cAraU + Act	PULSE	5	0
21	cU/cAraU + Act	PULSE	6	300
2	Act	PULSE	6	350
1	Wsh	PULSE	7	100

Tabelle 30: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den Einbau von cL in RNA.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit [s]
\$ Coupling				
21	cL + Act	PULSE	6	0
21	cL + Act	PULSE	15	620
2	Act	PULSE	8	400
1	Wsh	PULSE	7	100

Aufarbeitung und postsynthetische „Click“-Reaktion

Nach beendeter RNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Vakuum getrocknet und die feste Phase anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt. Es wurde dabei genau darauf geachtet, dass unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet wurde. Die Abspaltung der RNA vom CPG sowie die Entschützung der exozyklischen Amine erfolgten durch Zugabe von 1 mL einer 1:1 (v/v) Lösung aus konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (>25%, trace select, *Fluka*) und Methylamin (in Ethanol) für 15 min bei 60 °C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das NH₃/MeNH₂-Gemisch mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators entfernt (60 min, 34 °C, 100 mbar). Die überstehenden Lösungen wurden abgetrennt und das Granulat zweimal mit je 200 µL einer 1:1 (v/v) Mischung aus HPLC-Wasser und Ethanol gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden lyophilisiert und für die nachfolgende postsynthetische „Click“-Reaktion ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die „Click“-Reaktion wurde analog zur DNA durchgeführt (siehe Kapitel 8.3.1). Alle dafür verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit RNase-freiem (DEPC-behandeltem) Wasser angesetzt.

Tabelle 31: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Phosphoramidite von rA, rG, rC, rU. Erläuterungen: **Dbk:** 3% Dichloressigsäure in CH₂Cl₂; **Wsh:** MeCN; **Act:** 0.25 M Activator 42[®] in MeCN; **Caps:** Ac₂O in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox:** Iod in Wasser/THF/Pyridin.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	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	60 _(DNA: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	7 _(DNA: 5)	0
21	rA + Act	PULSE	5	0
21	rA + Act	PULSE	6 _(DNA: 2)	201 _(DNA: 16)
2	Act	PULSE	8 _(DNA: 3)	180 _(DNA: 24)
1	Wsh	PULSE	7	80 _(DNA: 56)
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	7 _(DNA: 8)	0
13	Caps	PULSE	8 _(DNA: 0)	15 _(DNA: 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

Entfernung der 2'-O-TBDMS-Schutzgruppen

Zur Entschützung der 2'-Silylschutzgruppen wurden die RNA-Pellets in 300 μL trockenem DMSO gelöst, mit 300 μL Triethylamintrihydrofluorid versetzt und für 2.5 h bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die RNA-Lösungen mit 600 μL Isopropyltrimethylsilylether versetzt und solange unter ständigem Belüften durchmischt bis die RNA als Feststoff ausfiel. Es wurden 200 μL Diethylether zur vollständigen Fällung der RNA zugegeben. Der Überstand wurde verworfen und die erhaltenen RNA-Pellets 3-mal mit je 1 mL kaltem Diethylether gewaschen. Die RNA-Pellets wurden anschließend im Hochvakuum getrocknet und mittels *Reversed Phase*-HPLC gereinigt.

Reinigung modifizierter RNA mittels semi-präparativer HPLC

Die präparative Reinigung der RNA-Stränge erfolgte wie bereits in Kapitel 8.3.1 für DNA beschrieben. In Kapitel 8.3.4 sind die verwendeten Gradienten und Detektionswellenlängen aufgelistet.

Charakterisierung durch Massenspektrometrie

MALDI-TOF-Massenspektren der aufgereinigten RNA-Stränge erfolgte wie bereits in Kapitel 8.3.1 im Unterkapitel „Charakterisierung durch Massenspektrometrie“ beschrieben.

Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentrationen der RNA-Stammlösungen erfolgte unter Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes. Hierfür wurde die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} einer unmodifizierten Ribonukleinsäure bei 260 nm in Wasser kann unter Verwendung folgender Formel berechnet werden:

$$\epsilon_{260} = (rA \cdot \epsilon_{rA} + rC \cdot \epsilon_{rC} + rG \cdot \epsilon_{rG} + rU \cdot \epsilon_{rU}) \cdot 0.9$$

$$\epsilon_{rA} = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{rG} = 11.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{rC} = 7.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{rU} = 9.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Dabei stehen rA, rC, rG und rU für die Anzahl der jeweiligen Ribonukleotide und ϵ beschreibt den molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen RNA-Basen bei $\lambda = 260$ nm. Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität.

Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide muss der entsprechende molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} der Modifikation addiert werden. Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel 8.3.5 aufgeführt.

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

8.3.4 HPLC-Methoden

Tabelle 32: Übersicht über die verwendeten HPLC-Methoden zur Reinigung der **cAraU**-Farbstoff-modifizierten Oligonukleotide.

DNA	Modifikation	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Detektions- wellenlängen
DNA1a-D1	cAraU-D1	0 – 10 10	45 55	RT	260 nm, 385 nm
DNA1a-D2	cAraU-D2	0 – 15 15	45 55	RT	260 nm, 444 nm
DNA1a-D3	cAraU-D3	0 – 15 15	45 55	RT	260 nm, 459 nm
DNA1a-D4	cAraU-D4	0 – 15 15	45 55	RT	260 nm, 461 nm
DNA2a-A1	cAraU-A1	0 – 15 15	45 55	RT	260 nm, 497 nm
DNA2a-A2	cAraU-A2	0 – 12 12	45 55	RT	260 nm, 509 nm
DNA2a-A3	cAraU-A3	0 – 17 17	45 55	RT	260 nm, 530 nm
DNA2a-A4	cAraU-A4	0 – 17 17	45 55	RT	260 nm, 542 nm
DNA2a-A5	cAraU-A5	0 – 15 15	45 55	RT	260 nm, 585 nm

Tabelle 33: Übersicht über die verwendeten HPLC-Methoden zur Reinigung der einfach farbstoffmodifizierten Aptamere.

DNA	Modifikation	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Detektions- wellenlängen
Apt2, Apt4, Apt5, Apt7, Apt10, Apt12, Apt13, Apt15, Apt17, Apt19, Apt21	cU/cAraU/cL- D3	0 – 15 15	45 55	40	260 nm, 459 nm
Apt1, Apt3, Apt6, Apt8, Apt9, Apt11, Apt14, Apt16, Apt18, Apt20, Apt22	cU/cAraU/cL- A4	0 – 17 17	45 55	40	260 nm, 542 nm

Tabelle 34: Übersicht über die verwendeten HPLC-Methoden zur Reinigung der doppelt farbstoffmodifizierten Aptamere.

DNA	Modifikation	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Detektions- wellenlängen
Apt23- Apt26	cU/cAraU/cL- D3-A4	0 – 17 17	45 55	40	260 nm, 459 nm, 542 nm

Tabelle 35: Übersicht über die verwendeten HPLC-Methoden zur Reinigung der einfach farbstoffmodifizierten RNA-Stränge.

RNA	Modifikation	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Detektions- wellenlängen
RNA1, RNA3 RNA5, RNA7 RNA9	cU/cAraU/cL- D3	0 – 15 15	45 55	60	260 nm, 459 nm
RNA2, RNA4 RNA6, RNA8 RNA10	cU/cAraU/cL- A4	0 – 17 17	45 55	60	260 nm, 542 nm

Tabelle 36: Übersicht über die verwendeten HPLC-Methoden zur Reinigung der einfach farbstoffmodifizierten DNA-Stränge für *DNA-Origami-Zangen*.

DNA	Modifikation	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Detektions- wellenlängen
66s-SA-D	cU-D3	0 – 15 15	45 65	60	260 nm, 459 nm
66s-Apt-D					
70s-Apt-D					
74s-Apt-D					
78s-Apt-D					
178s-SA-A	cU-A4	0 – 17 17	45 65	60	260 nm, 542 nm
178s-Apt-A					
174s-Apt-A					
170s-Apt-A					
166s-Apt-A					

8.3.5 Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide

cAraU-Energietransfer-DNA

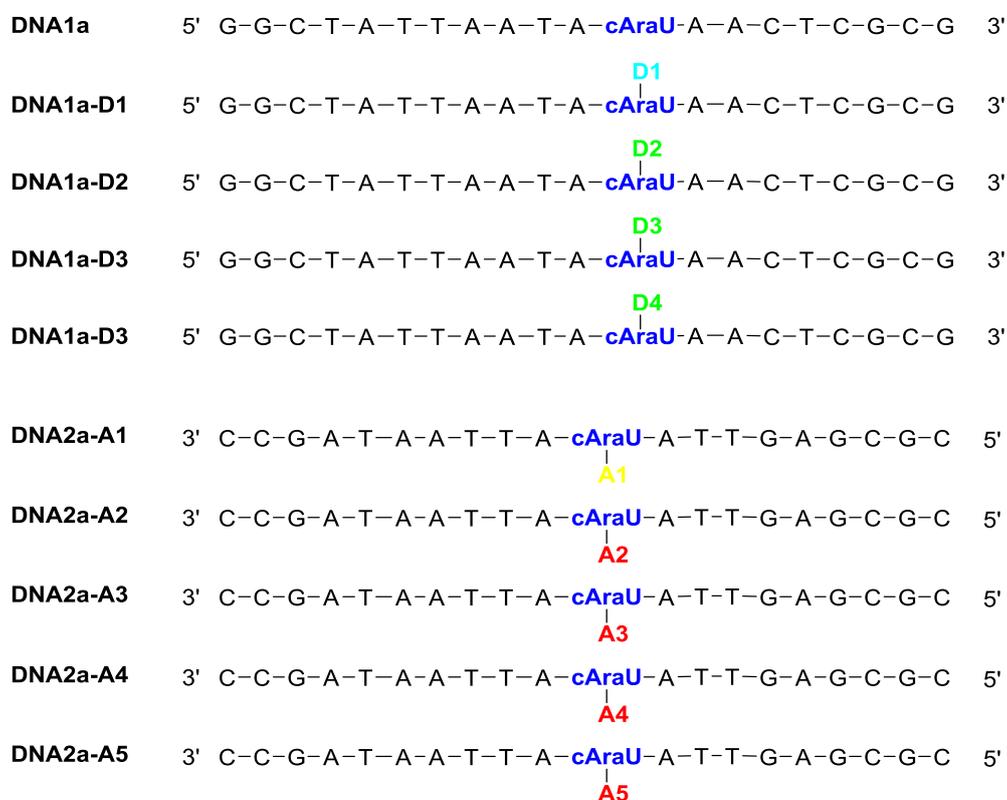


Tabelle 37: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der cAraU-modifizierten DNA-Stränge aus Kapitel 3.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DNA1a	6153.2	6158.2	209.3
DNA1a-D1	6445.2	6451.1	209.7
DNA1a-D2	6470.2	6476.2	207.8
DNA1a-D3	6471.2	6475.5	211.4
DNA1a-D4	6546.3	6553.7	207.8
DNA2a-A1	6550.2	6556.7	210.3
DNA2a-A2	6584.3	6590.0	215.8
DNA2a-A3	6520.2	6525.9	208.0
DNA2a-A4	6597.3	6603.8	214.3
DNA2a-A5	6577.3	6584.4	204.2

siRNA

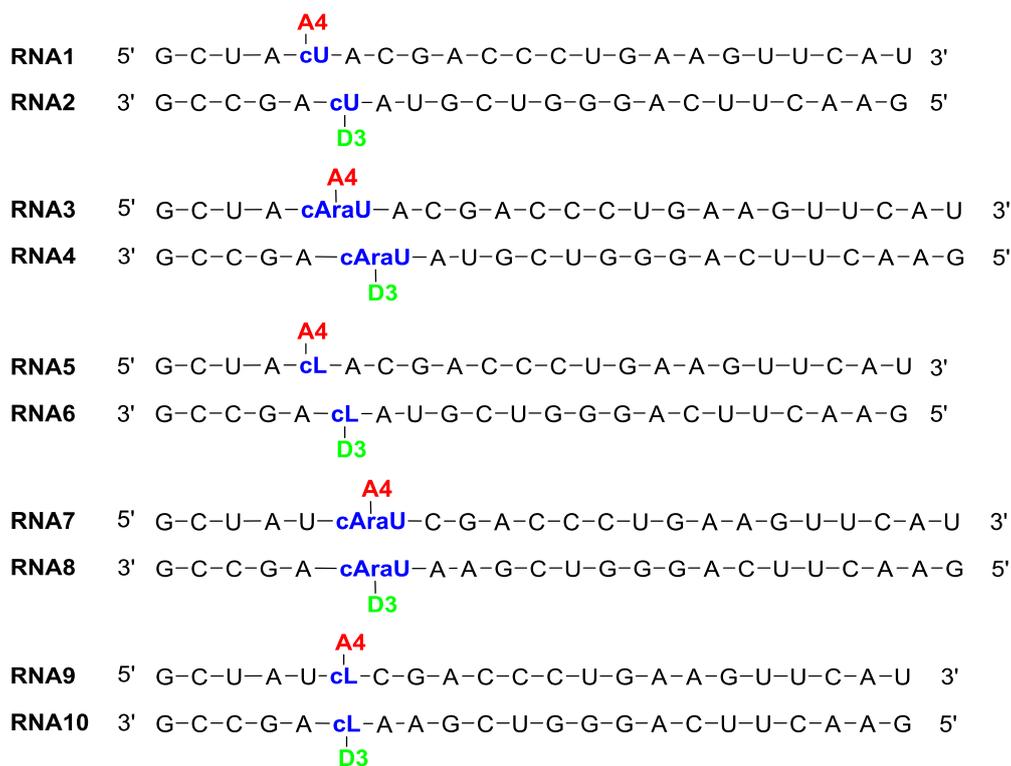


Tabelle 38: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der siRNA-Stränge RNA1 – RNA10 aus Kapitel 4.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
RNA1	7441.2	7447.5	231.2
RNA2	7410.2	7416.7	230.0
RNA3	7441.2	7445.3	231.2
RNA4	7410.2	7417.1	230.0
RNA5	7332.6	7338.6	221.1
RNA6	7301.5	7307.6	219.9
RNA7	7418.2	7424.7	226.2
RNA8	7433.2	7438.7	235.0
RNA9	7309.6	7314.3	216.1
RNA10	7342.5	7330.4	224.9

Einfachmodifizierte Aptasensoren

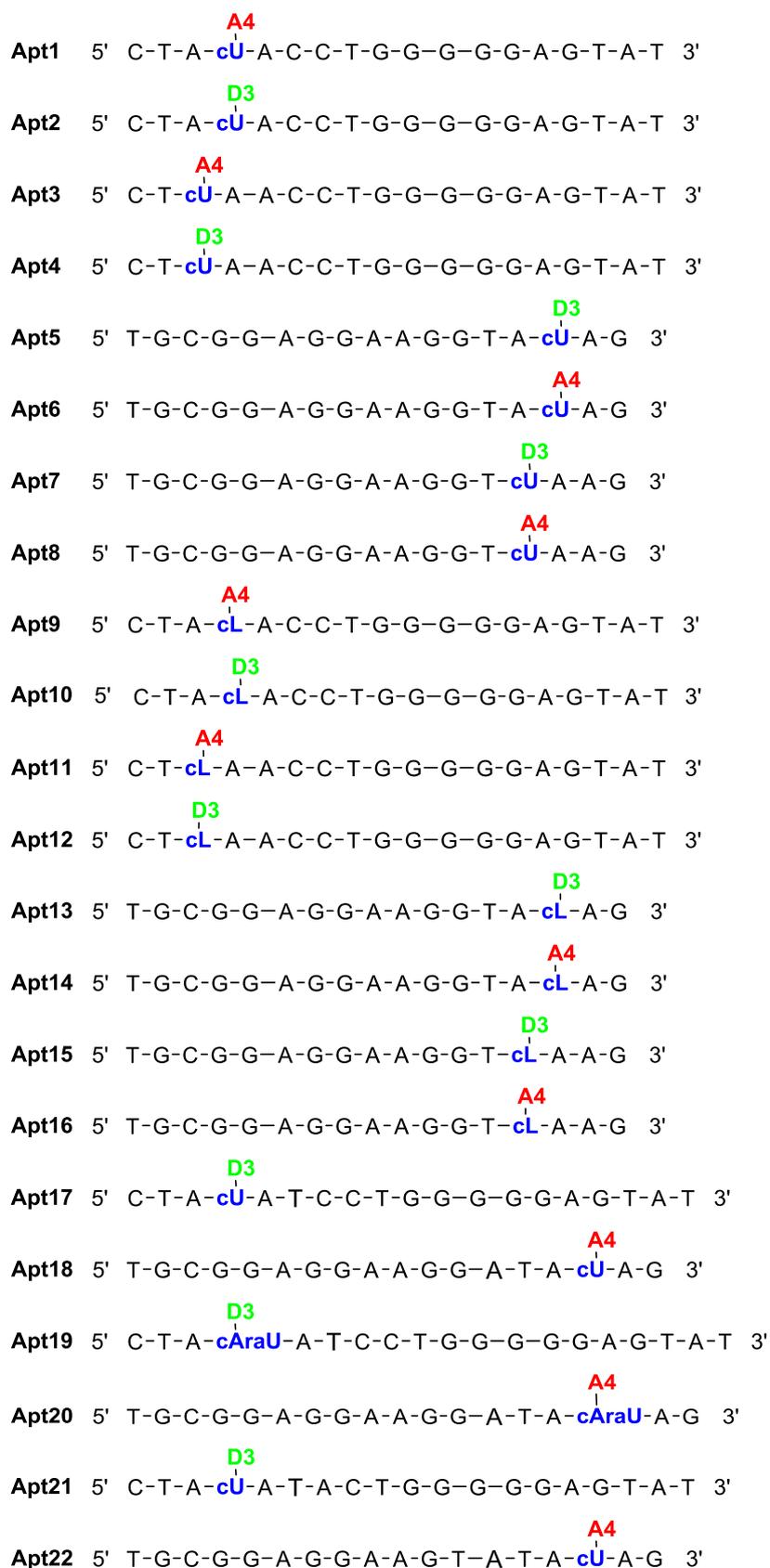


Tabelle 39: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der einfachmodifizierten Aptamere **Apt1 – Apt22** aus Kapitel 5.2.1.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Apt1	6036.2	6040.3	193.2
Apt2	5910.2	5914.4	190.3
Apt3	6036.2	6041.3	193.2
Apt4	5910.2	5913.2	190.3
Apt5	5695.1	5698.1	196.2
Apt6	5821.2	5823.4	199.1
Apt7	5695.1	5697.5	196.2
Apt8	5821.2	5826.3	199.1
Apt9	5927.6	5928.8	183.1
Apt10	5801.4	5800.3	180.2
Apt11	5927.6	5932.1	183.1
Apt12	5801.4	5803.4	180.2
Apt13	5586.4	5585.4	186.1
Apt14	5712.6	5715.0	189.0
Apt15	5586.4	5586.8	186.1
Apt16	5712.6	5714.1	189.0
Apt17	6214.2	6213.8	198.2
Apt18	6134.2	6137.9	213.0
Apt19	6214.2	6218.6	198.2
Apt20	6134.2	6138.3	213.0
Apt21	6238.2	6240.8	205.5
Apt22	6109.2	6112.2	201.4

Zweifachmodifizierte Aptasensoren und unmodifizierte Gegenstränge

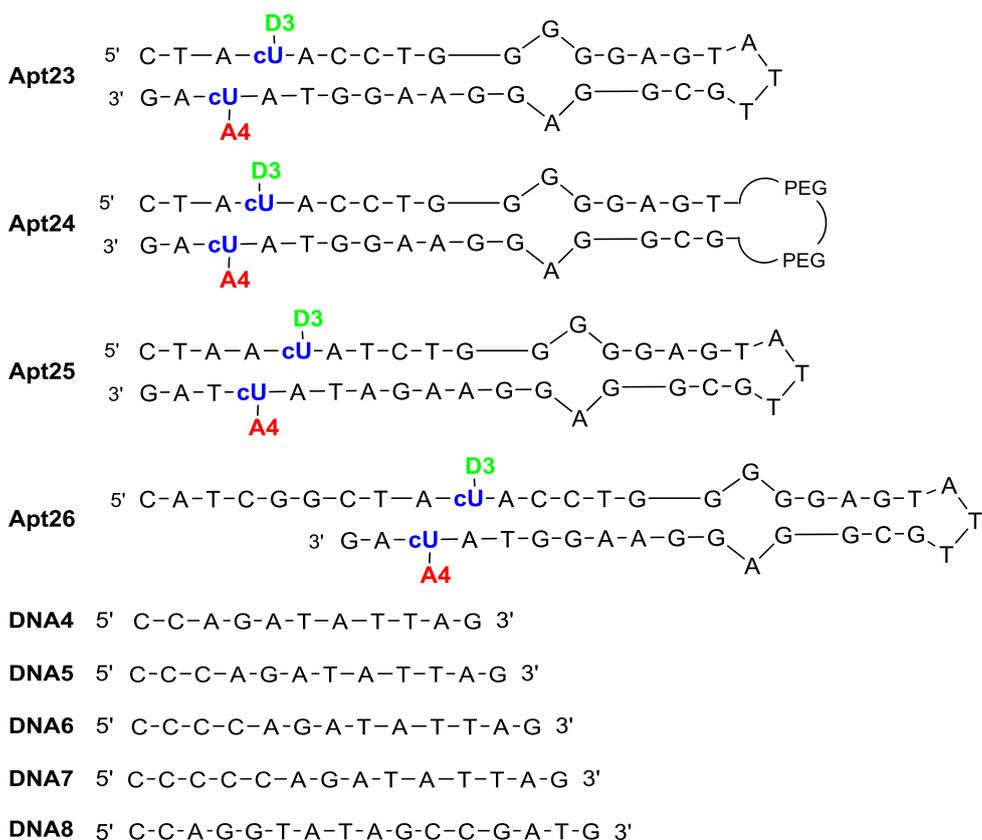


Tabelle 40: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der zweifachmodifizierten Aptamere **Apt23 – Apt26** sowie der unmodifizierten Gegenstränge **DNA4 – DNA8** aus Kapitel 5.2.2.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
Apt23	11793.2	11802.2	389.4
Apt24	11560.3	11540.4	359.7
Apt25	12409.3	12415.8	415.8
Apt26	13646.5	13655.3	445.4
DNA4	3338.6	gekauft	113.4
DNA5	3627.7	gekauft	120.0
DNA6	3916.7	gekauft	126.5
DNA7	4205.7	gekauft	133.1
DNA8	4903.9	gekauft	158.1

DNA-Origami-Zangen – Strang austausch

66s-SA-D 5' GTA-TAG-CCG-CTT-TCG-AGG-TGA-ATT-TTT-TCG-AAT-^{D3}AcUA-_{D3}ACT-CTA-TGC-ATA-ATG 3'
70s-SA 5' GCG-GAT-AAA-CCG-ATA-GTT-GCG-CCG-TTT-TCG-AAT-ATA-_{D3}ACT-CTA-TGC-ATA-ATG 3'
74s-SA 5' ATT-AGG-ATT-CGC-CCA-CGC-ATA-ACC-TTT-TCG-AAT-ATA-_{D3}ACT-CTA-TGC-ATA-ATG 3'
178s-SA-A 5' GAA-GAA-AGA-CCT-ACA-TTT-TGA-CGC-TTT-TGA-GTT-^{A4}AcUA-_{A4}TTC-G 3'
174s-SA 5' GGA-AAG-CCG-ATT-ATT-TAC-ATT-GGC-TTT-TGA-GTT-ATA-TTC-G 3'
170s-SA 5' CTA-AAG-GGC-GAC-CAG-TAA-TAA-AAG-TTT-TGA-GTT-ATA-TTC-G 3'
CS 5' CAT-TAT-GCA-TAG-AGT-TAT-ATT-CG 3'

Tabelle 41: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der DNA-Origami Faltungsstränge aus Kapitel 6.2.1.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
66s-SA-D	16058.8	16061.7	514.7
70s-SA	15704.6	gekauft	508.2
74s-SA	15583.6	gekauft	501.0
178s-SA-A	12802.3	12803.9	392.9
174s-SA	12340.1	gekauft	392.9
170s-SA	12376.1	gekauft	416.7
CS	7049.2	gekauft	230.1

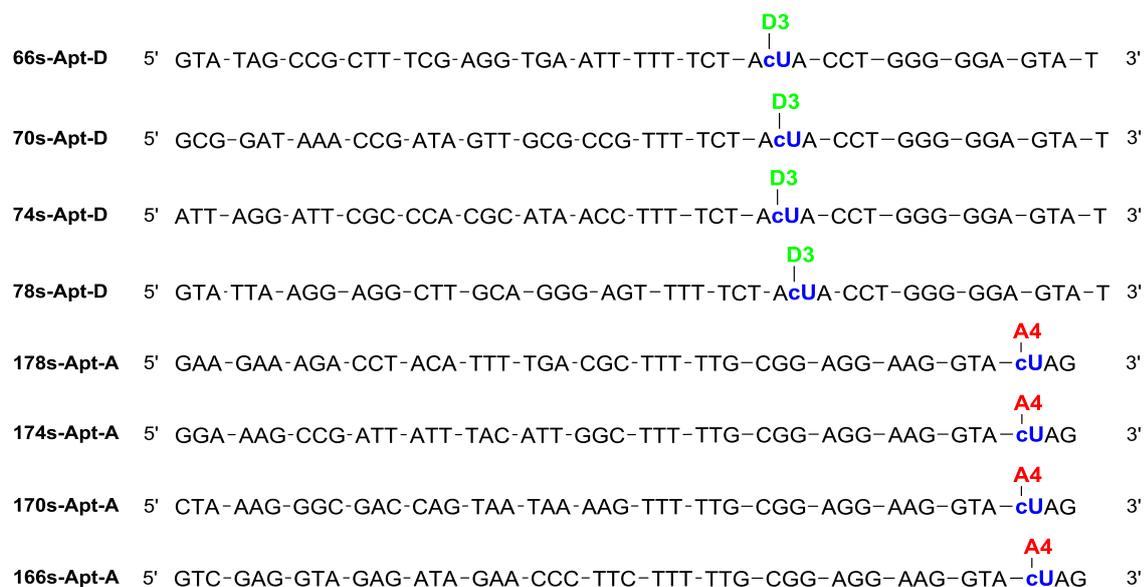
DNA-Origami-Zangen – farbstoffmodifizierte ATP-bindende Aptamere

Tabelle 42: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der farbstoffmodifizierten DNA-Origami Faltungsstränge aus Kapitel 6.2.2.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
66s-Apt-D	14583.5	14584.6	454.6
70s-Apt-D	14587.5		460.4
74s-Apt-D	14466.5	14467.0	453.2
78s-Apt-D	14697.6	14699.4	471.1
178s-Apt-A	14465.6	14465.7	480.6
174s-Apt-A	14487.6	14487.5	472.7
170s-Apt-A	14523.6	14525.9	496.5
166s-Apt-A	14497.6	14501.6	474.0

DNA-Origami-Zangen – ATP-bindende Aptamere

66s-Apt 5' GTA-TAG-CCG-CTT-TCG-AGG-TGA-ATT-TTT-TAC-CTG-GGG-GAG-TAT 3'

70s-Apt 5' GCG-GAT-AAA-CCG-ATA-GTT-GCG-CCG-TTT-TAC-CTG-GGG-GAG-TAT 3'

74s-Apt 5' ATT-AGG-ATT-CGC-CCA-CGC-ATA-ACC-TTT-TAC-CTG-GGG-GAG-TAT 3'

78s-Apt 5' GTA-TTA-AGG-AGG-CTT-GCA-GGG-AGT-TTT-TAC-CTG-GGG-GAG-TAT 3'

178s-Apt 5' GAA-GAA-AGA-CCT-ACA-TTT-TGA-CGC-TTT-TTG-CGG-AGG-AAG-GTA 3'

174s-Apt 5' GGA-AAG-CCG-ATT-ATT-TAC-ATT-GGC-TTT-TTG-CGG-AGG-AAG-GTA 3'

170s-Apt 5' CTA-AAG-GGC-GAC-CAG-TAA-TAA-AAG-TTT-TTG-CGG-AGG-AAG-GTA 3'

166s-Apt 5' GTC-GAG-GTA-GAG-ATA-GAA-CCC-TTC-TTT-TTG-CGG-AGG-AAG-GTA 3'

Tabelle 43: MALDI-MS-Analytik und Extinktionskoeffizienten der unmodifizierten DNA-Origami Faltungsstränge aus Kapitel 6.2.2

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
66s-Apt	13015.2	gekauft	406.0
70s-Apt	13019.2	gekauft	411.8
74s-Apt	12898.2	gekauft	404.6
78s-Apt	13129.2	gekauft	422.5
178s-Apt	12722.2	gekauft	419.2
174s-Apt	12744.1	gekauft	411.3
170s-Apt	12780.2	gekauft	435.1
166s-Apt	12754.1	gekauft	412.6

8.4 Regulierung der GFP Expression mittels siRNA

8.4.1 Zellkultur

HeLa-Zellen:

Humane Cervix-Karzinomzellen (HeLa wt) wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-Medium) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre bis zur Konfluenz adhärent kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese zunächst mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (10 mL 0.25 %-ige Trypsinlösung, 10 mL 5 mM EDTA, 30 mL PBS) benetzt und für 5 bis 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe eines Trypsininhibitors gestoppt (10 % FKS in DMEM). Die Zellen wurden anschließend für die Fluoreszenzmikroskopie in 8-well Zellkultur-Objektträger (*ibidi*[®] *μ-Slide 8 well*) verteilt.

HeLa-GFP-Zellen:

Humane Cervix-Karzinomzellen wurden mit dem Vektor pEGFP-C1 (*Clontech*) transfiziert und mit Neomycin zu einer stabilen Zelllinie selektioniert und kloniert. Die so erhaltenen HeLa-GFP-Zellen exprimieren das grünfluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die weitere Behandlung der HeLa-GFP-Zellen erfolgte wie bereits für nicht-transformierte HeLa-Zellen beschrieben.

Die Zellkultur der HeLa-Zellen erfolgte durch *B. Olshausen* unter der Leitung von *Prof. Dr. U. Schepers* (Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie).

8.4.2 Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden 24 h vor der Transfektion mit der entsprechenden Probe 5×10^4 HeLa-Zellen pro Kammer in einem 8-well Zellkultur-Objektträger (*ibidi® μ -Slide 8 well*) ausgesät. Für die Transfektion wurden 15 pmol der jeweiligen doppelsträngigen DNA bzw. RNA mit *ScreenFect®A Dilution Buffer* auf ein Endvolumen von 9 μ L verdünnt. Anschließend wurden 12 μ L einer 1:10-Lösung aus *ScreenFect®A* und *ScreenFect®A Dilution Buffer* zur verdünnten DNA bzw. RNA gegeben, durch schnelles Aufziehen und Auslassen mit einer Pipette vermischt und zur Bildung der Lipoplexe (Liposom-DNA/RNA-Komplexe) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektions-Lösung wurde zu den Zellen gegeben und für 24 h bei 37 °C in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert.

8.5 DNA-Origami-Zangen

8.5.1 Hybridisierung und Aufreinigung der DNA-Origami-Zangen

Die DNA-Origami-Zangen wurden in einem 1:4-Verhältnis von einzelsträngigem Gerüststrang M13mp18 (*New England Biolabs*) und den 236 Faltungssträngen (Sequenzen siehe Kapitel 8.5.3) mit einer Endkonzentration von 5 nM in 1x TAE/Mg²⁺ Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 2 mM EDTA, 12.5 mM Mg(OAc)₂, pH 8.0) hybridisiert. Hierfür wurde die DNA Proben in einem PCR Thermocycler für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend kontrolliert mit einer Abkühlrate von 1 °C pro Minute auf 20 °C abgekühlt. Die überschüssigen Faltungsstränge wurden mittels Ultrafiltration (Amicon Ultra – 50K, *Millipore*) entfernt und der Rückstand noch 2-mal mit je 480 µL 1x TAE/Mg²⁺-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Origami-Lösungen mittels UV/Vis-Spektroskopie, wie in Kapitel 8.3.1 unter Konzentrationsbestimmung beschrieben, bestimmt.

8.5.2 Charakterisierung der DNA-Origami-Zangen

Probenvorbereitung und spektroskopische Untersuchung

Für die spektroskopische Untersuchung mittels Fluoreszenzspektroskopie wurden 15 nM Lösungen der DNA-Origami-Zangen in 1x TAE/Mg²⁺ hergestellt.

Für die Strangaustauschexperimente wurden die geschlossenen DNA-Origami-Zangen (**SA₃₄ET₄**, **SA₂₄ET₄**) schrittweise mit jeweils 5 eq Öffnungsstrang (CS) versetzt und vor jeder Messung für 10 min bei 20 °C inkubiert. Um die Konzentration an DNA bei jeder Messung konstant zu halten, besaß die Titrationslösung die gleiche Zusammensetzung wie die zu vermessende Probe mit zusätzlich bis zu 15 eq Titrationsstrang.

Zur Untersuchung der adenosinbindenden DNA-Origami-Zangen wurden 15 nM DNA-Origami-Lösungen ohne ATP, mit 1 mM ATP und 1 mM GTP als Negativkontrolle hergestellt. Um eine optimale Bindung des ATP zu gewährleisten, wurden alle Proben in einem Thermocycler drei Hybridisierungszyklen (von 45 °C auf 20 °C mit einer Abkühlrate von - 1 °C/min) unterzogen.

AFM Messungen

Zur bildgebenden Untersuchung der DNA-Origami Proben mittels AFM wurden 5 μL einer 1 nM DNA-Origami-Lösung auf eine frisch gespaltene Mica-Oberfläche gegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mica-Oberfläche mit 10 μL 1x TAE/ Mg^{2+} -Puffer überschichtet und die Probe vermessen.

Gelelektrophorese

Für die Analyse der *DNA-Origami-Zangen* mittels Agarosegelelektrophorese wurde ein 1.5%-iges Agarosegel aus 1.5 g Agarose gelöst in 100 mL 1x TAE/ Mg^{2+} -Puffer hergestellt. Für die Analyse der Aptamer-modifizierten *DNA-Origami-Zangen* wurde der Puffer zusätzlich noch mit 1 mM ATP versetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel bei 7 °C inkubiert und anschließend 6 μL Probenvolumen (10 nM) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 220 min bei 70 V und 7 °C durchgeführt. Die Auswertung der Gele erfolgte zunächst durch Detektion der integrierten Fluoreszenzfarbstoffe durch Anregung bei 534 nm und Detektion bei 607 ± 36 nm. Anschließend wurde das Gel für mindestens 30 min in einer 0.001%-igen Ethidiumbromid-Lösung geschwenkt und die Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids mittels Anregung im UV (302 nm) detektiert.

8.5.3 Sequenzen der *DNA-Origami-Zangen*

Unmodifizierte DNA-Stränge

DNA-Sequenz von 5' nach 3'

1s	CCTAATTTTTTTATCCTGAATCTTACCAACGCTATTTT
2s	TTTTACGAGCGTCTGCAGCACCGTTTTT
3s	CAAGTTTGAATGAAACCATCGATATTCCAGAG
4s	AGCTACAAGCCAGTTACAAAATAAGGCCGGAA
5s	ACGTCACCCCTTAGCGTCAGACTACAACGCC
6s	ATTATTTAAAGATTAGTTGCTATTTTGCACCC
7s	TTTTCATCCCATTACCATTAGCAAACAGCCAT
8s	TTGAAGCCTTAAATCTCCCAAT
9s	CCAAATAAGAAACGATTTAGAGCCAGCA
10	TTTTAATCAGTAGCATAGTTAGCGTTTT
11	TCGTCTTTTCCACAGACAGCCCTCGACAGAAT
12	TTTTTAACGATCTAAAGTTTTG
13s	AAATCACCAGTAGCAGGCATT
14s	TGCCATCTGAGCCATTGGGAATTTTTGTTTA
15s	GCGTTTTTAAATGAAAATAGCAGCCTCACCGTC
16s	ACCGACTTTTTATAATCAAATCCTCATT
17s	TAAAAACAATAGAAGGCTTATCCGGTATTCTAAGAACGCGAG
18s	AGGTGAATTATTTACAGAGAGAATAACA
19s	ACCGAACGAAAATTATTCATTAA
20s	AATCAGATGGGAAGCGCATTAGACGAAGGTAA
21s	ATATTGACCGCCTCCCTCAGAGCCAGAACCGC
22s	TAAGTGAACATTACCGCGCCAATAGCAAGCA
23	TGTATGGGGTCACCAGTACAACTGTAGCGCG
24	TGTAGCATCCAGACGTTAGTAAATGAATTTT
25s	CAGAACCGAACCGATTGAGGGAGGGGGAGAAT
26s	GTAGGAATCACCTGAACAAAGTCCAAAAGGG
27s	CGACATTCCCACCCTCAGAGCCACCCGACTC
28s	ATTGAGCGAAGCAAGCCGTTTTTATTTTCATC
29s	GAGCCGCCTTACCAGCGCCAAAGAAGAGGGTA
30s	TCGAGAACCTAATATCAGAGAGATAGAAAATT
31s	CATATGGTACCAGAACCACCACCATGATATAA
32s	AGAATTGAGTATTAACCAAGTACCGCACTCA
33	TCGGTCATGTAACACTGAGTTTCATTTTGC
34	CCCATGTACCAGCCCCCTTATTAGCGTT

35 TAAACAACCTTTCAACAGTTTCAGCGG
36s GCCAGCATTTTTGTCACAATCAATAACCCACA
37s AAGAACGGGTAAAGCCAATAATACCACGGAA
38s TAAGTTTATGACAGGAGGTTGAGGAGTACCAG
39s AAACAATGTCGGCTGTCTTTCCTTATCATTCC
40s ACGATTGGAAGAAACGCAAAGACAAGAGCAAG
41 AGTGAGAAGCAAGCCCAATAGGAA
42s ATCAATAAAAATAGCAATAGCTATAGGTGGCA
43s ACATATAACCTTGATATTCACAAAAGAGAAGG
44s AGCCCTTTTAATTTACGAGCATGTAGAAACCA
45s TCCTCATTGAAAATACATACATAACTTACCGA
46s AAATAATATCCCATCCTTAAGAAAAGTAAGCATATGTTAG
47s CAAACGTAAAAGCCAGAATGGAAAACATGAAA
48s GAATCATAATAAGGCGTTAAATAAGA
49s AACAAAGTAAGTCCTGAACAAGAAAAACCCG
50s TCTGAATTACTCCTTATTACGCAGGATAGCCG
51s TGTGATAAATTACTAGAAAAAGCCTTTATCAA
52 AGCCACCACCACCGGAACCAGAGCCACC
53 CAGGGATATAGAAAGGAACAATAAGGAATTGC
54 GAATAATAATTTTTTCGAACCGCCACCCTCAG
55s CAATAGATTACCAGAAGGAAACCGAACTGGCA
56s TGATTAAGTACCGTTCCAGTAAGCCCCCTGCC
57 GCTCAAATAGTACCGCCACCCTCGCCACCCT
58 CACCCTCAACGTTGAAAATCTCAAAAAAAG
59s ATCATATGTTTAATGGTTTGAAATACCGACCG
60s CAATAATAATGCAGAACGCGCCTGTGTTTAGT
61 ATCAGCTTCGGAATAGGTGTATCACACCCTCA
62 AGGAGGTTAGGAGCCTTAATTGTATCGGTTT
63s TGGCTTTTACGGAATACCCAAAAGAGGAAACG
64s GACCTAAACGTTATACAAATTCTTACAACATG
65 AGCTTGATGTGCCGTCGAGAGGGTGAGCCGCC
66 GTATAGCCGCTTTCGAGGTGAATTTCTTAAAC
67s TTCAGCTAAGGTTTAAACGTCAGATAATTGCGT
68s AAAGCCAAATATTTTAGTTAATTTTATCTTCT
69 ACAACCATAGCGGGGTTTTGCTCCAGGTCAG
70 GCGGATAAACCGATAGTTGCGCCGACAATGAC
71s AGTAACAGCAGACGACGACAATAAACAGTAT
72s TTTCAAATCGCTCAACAGTAGGGCGTAAAGTA

73 CGGTCGCTAGGCTGAGACTCCTCACAAATAAA
74 ATTAGGATTCGCCACGCATAACCGATATATT
75s ATTCTGTCTACCTTTTACATCGGGAAAATTAT
76s GAATCGCCAAGACAAAGAACGCGAGAAAACCTT
77s TATTTGGAACCTATTATTCTGAAGCGCAGTC
78s GTATTAAGGAGGCTTGCAGGGAGT
79s TAACGGATAAAGTACCGACAAAAGTTAATTGA
80s CCAATCGCATATTTAAACAACGCCAAGTAATAA
81c TTGAATGGTATAAACAGTTAATGCGTCATACA
82s TAAAGGCCGCTTTTGCGAATACGTGGCACAGACAATATTT
83w AGATTTTCGATGATACAGGAGTGTTGAGTAAC
84w TAAGTTTTAAACAGAAATAAAGAGAATATAC
85c GATAGCCCAACGGGGTCAGTGCCTACTGGTAA
86c AGTGCCCGCTATTAGTCTTTAATGCGCGAACT
87w TTGCACGTGGTGAGGCGGTACAGTACAGAAGAT
88w GCCTGCAATAGAACCTACCATATCAGAAACAA
89w CGAACCACCAGTTAACACC
90w AAAACAGATAAAACATCGC
91w CATTAAAAATACCGAA
92w GGAAGGGTCAGTGCCACGCTGAGA
93w CAAATGAAGTTTGGATTATACTTCAATACCAA
94w GCAAATCAACAGTTGAGCCAGCAG
95w AAGGAATTGAGGAAGG
96w TCCTGATTAATCTAAAGCATCACAATATCTG
97w ACCTCAAAGATGATGGCAATTCATTTATTCAT
98w CTAACAACATCAAAACCCTCAATCCTTGCTGA
99w GTCAGTTGTTATCTAAAATATCTTTAGGAGCA
100w GATTATCAACGTTATTAATTTTAATAAATCCT
101w GTAACATTGAGCGGAATTATCATCTGATGAAA
102w TAATACATATTCGACAACCTCGTATAAGTTTGA
103w TTGCCCGATAATAGATTAGAGCCGTCAATAGA
104w ACCAGAAGATCATTTTGCAGAACATTTTTTAGACTT
105s AACAAATTAAGAAAACAAAATTAATTTTAAGAAACC
106w TACAAACATTGAGGATTTAGAAGTTTTT
107s CAAACATCCATTTGAATTACCTTTAACATAGC
108w AAACAGTACCTGAGCAAAAGAAGAATATTCTT
109s TTCAATTACATAAATCAATATATGCTATTAAT
110w TAACCTTGATCGCGCAGAGGCGAACAATATAA

111s GAGAATATTCGCCTGATTGCTTTGTGAATAAT
112s TTTAGGCACTATATGTAAATGCTGATGCAAAT
113s GTTACAAAGAGGCATTTTCGAGCCACATGTAA
114s TTATATAACTTCTGTAAATCGTCGTGAGTGAA
115s TAATTTTCTTTAACCTCCGGCTTAGGTTGGG
116s GACTACCTCCTTAGAATCCTTGAATTTAATGG
117s GATAGCTTTTTATCAAATCATAGGTCTGAGA
118s GAGTCAATAGTGAAAGATTAAGACGCTGAGTTTTTACATTT
119s ACCATAAATCAAAGTTCAGAAAACGAGAATTTTAAAATGTT
120s TTTAAACAATCAGGTCTTTACCCTGACTATTA
121s TAGTCAGAATTCATTGAATCCCCCGGAATCG
122s GAGTAGATAGCAAAGCGGATTGCATCAAAAAG
123w AGACCAGGAAAGAGGACAGATGAATTTT
124w AGTGAATATCAACGTAACAAAGCTTTTTCGGTGTAC
125s AAAAGAAGTTTTGCATAGCGAGAGGCTTTTTTTTGTCTATTC
126w CAACTTTGCGCATAGGCTGGCTGAATATTCAT
127w TACCCAAAAGGCTTGCCCTGACGAGACGATAA
128s AAACCAAACAGAGGGGGTAATAGT
129w AAGAGTAACAATCATAAGGGAACCGAACTGAC
130w AGAACGAGTCTTGACAAGAACCGGCCTTCATC
131w TAGACTGGCCCTCGTTTACCAGACGAAACACC
132w CAGACGGTACAAAGTACAACGGAGTTATACCA
133w AGCGCGAATAGTAAATTGGGCTTGAGCAACAC
134s TATCATAAATAGCGTCCAATACTGTCAAATGC
135w CATCGCCTATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCG
136w TAATTTCACTTTGACCCCAAGCGAATTTGTAT
137w TCATAAATTACGAGGCATAGTAAGAGATGGTT
138w ATCCGCGACCTGCTCC
139w GATAAATTGTGTCGAAACACTAAA
140w ACACTCATACTTTAATCATTGTGATAACGCCA
141s AAAGGAATTTAGTTTGACCATTAGCTGCGAAC
142w ATGCGATTAAAGAGGCAAAAGAAT
143s CGCAAATGAACTAATGCAGATACAATTACCTT
144w [AGACTTTTTTCATGAGG](#)
145w AAGTTTCCATTGCACCAAC
146w CTAAAACGTTAAGAAGCTGGCTCATTAGGAATA
147s CCACATTCGTCAATAACCTGTTTAGTTTCATT
148w [AAAATACGTTGAGGACTAA](#)

149w TCAGGACGTAATGCCACTACGAAGAAACGGGT
150s TTCATTTGTTTCATCAGTTGAGATTTATACCAG
151w ATTAAAGATTGGGAAGAAAAATCTATTACAGG
152s TAGAAAAGAGGGCGCGAGCTGAAAATTAATAT
153w AAAACGAATCCAGTTTGGAAACAAGCAAAGGGC
154s CAATTCTACTAACGGAACAACATTACGTTAAT
155s AGTGTGTTGAGGGGACGACGACACGTGCATC
156s TGCCAGTTCTAATAGTAGTAGCATTGCTGAA
157c CAGAGGCTACGTGGACTCCAACGTAGTCCACT
158c GAAAAACCTCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTA
159s AATAAATCATGGGCGCATCGTAACGTATCGGC
160s CTCAGGAAAAAGAATAGCCCGAGAGCCCACTA
161c AGACAGCAGTCTATCAGGGCGATGTAGGGTTG
162s TGACCTGAAAGCGTAAGGGATCGTCACCCTCAGCAGCGAA
163s GAATTAGCAAAATTAATGACCGTAATGGGATAGCTTCCG
164s ATAAATCAGATCGCACTCCAGCCAGGTCACGT
165s CGTGAACCATCACCCAAATCAAGTAATCCCTT
166s GTCGAGGTAGAGATAGAACCCTC
167s GCACCGCTGTTCCGAAATCGGCAATTTTTGGG
168s CTAATCGCGTCGGATTCTCCGTGAGGCAAAG
169 TGGCCAACGCCGTAAAGCACTAAAATCCTGTT
170 CTAAGGGCGACCAGTAATAAAAGGGACATTC
171s CGCCATTCGCCCCAGCAGGCGAAATCGGAACC
172s TGATGGTGTCTGGTGCCGAAACCGGAACAAA
173 CAGTCACAAGCCCCGATTTAGAGCGGTCCAC
174 GGAAAGCCGATTATTTACATTGGCAGATTCAC
175s GGAAGGGCAGAGAGTTGCAGCAAGCTTGACGG
176s GCTGGTTTGCCATTCAGGCTGCGCTGAGCGAG
177 CTGAAATGGGCGAACGTGGCGAGATCACCGCC
178 GAAGAAAGACCTACATTTTGACGCTCAATCGT
179s TACGCCAGAACAGCTGATTGCCCTAAGGAAGG
180s TGGCCCTGGATCGGTGCGGGCCTTTCCTGTA
181 ATGGAAATCGAAAGGAGCGGGCGCCACCAAGTG
182 TGGCAAGTGCCATTGCAACAGGAAAAACGCTC
183s AGGCGATTGGGTGGTTTTTCTTTTTAGGGCGC
184s AGACGGGCCTGGCGAAAGGGGGATGGAACGCC
185 TACCGCCAGTAGCGGTCACGCTGCTGCGTATT
186 ACCACACCTGCTGGTAATATCCAGAACAATAT

187s CCAGTCACGCGGGGAGAGGCGGTTGCGTAACC
188s GGGCGCCAAAGTTGGGTAACGCCATTTTGTTA
189 CTCAAATATCGGCCTCGCCGCGCTTAATGCG
190 TATGGTTGTAACATCACTTGCCTGAGTAGAAGAA
191 CCGCTACAGGAGCTGCATTAATGAATCG
192s ATGCCTGCGGAAACCTGTCGTGCCGCGGTAC
193s GCCAACGCGACGTTGTAAAACGAC
194s GGCCAGTGCCTAAATTGTAAACGTTAAT
195s ATTTTGTTTTCAAAGGGTGAGAAAGGCCGAGACAGTCAA
196s GGTAAGAAAAATTCGATTAATGGGTTTTT
197s AATCAGCTAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTA
198s ATATTTTACATTTTTTAACCAATAGTGCTGCA
199s ATCAAAAAGATAAAAATTTTGTAGAACCTCAT
200s AACGCAAGTAATTCGCGTCTGGCCTTCGCTAT
201s GCCAGCTTTTTGCGGGAGAAGCCTTTATTT
202s TGTAATACTCATCAACATTAATGAAGTGTG
203s TAACAACCGTTGTACCAAAAACATTATGACCC
204 ATTAGTAACCTTGACGAGCACGTA
205 TTAACCGTTGTAGCAATACTTCTTTG
206 AATTGCGTTCCTCGTTAGAATCAACGCAA
207 TAACGTGCTTTGCGCTCACTGCCCGCTT
208s TCCAGTCGAGGTCGACTCTAGAGGCCAAAAAC
209s TCACCATCTGTATAAGCAAATATTAAGCTTGC
210s ACCGAGCTCGAATTCTCACATT
211s TTGATAATCAGAAAAGCCATCCCCGGT
212s AGGAAGATAATATGATATTCAACCGTTCTAGCTG
213s GAGCTAACGTAATCATGGTCATAGCATGTCAA
214s ATAAATTAATGCCGGACCCCGG
215s TCATATGTAGAGGGTAGCTATTTTGTAGAGAT
216s TGTGTGAATAAAGCCTGGGGTGCCGGAGGCCG
217s CTACAAAGGTAATCGTAAACTAGCTGTTTCC
218s ATAAAGTGATTGTTATCCGCTCACAGAGAATC
219s GATGAACGGCTATCAGGTCATTGCCTGAGAGCTTTTT
220s TTTTGGAGCAAACAAATCCACACTTTT
221 TGTCATCGAGCGGGAGCTAAACATAATGAGT
222 ATTAAGGGTGAGGCCACCGAGTAAAGAGTC
223s CGGCGGATGCAATAAAGCCTCAGAGCATAAAG
224s TGGTGTAGATACAGGCAAGGCAAAGAGGTCAT

225s	TTTTGCGGTTAATTGCTCCTTTTG
226s	GAGTACCTATGGCTTAGAGCTTAATAACATCC
227s	TATAATGCAAACCTCCAACAGGTCAGGATTAGA
228s	CCGGAAGCTGTAGCTCAACATGTTGGTGGCAT
229s	GCAACTAAATTCGAGCTTCAAAGCGAACCCAGA
230s	GCGTTTTAAGTACGGTGTCTGGAAGCTATATT
231s	CCATATAAGAAGCCCGAAAGACTTCAAATATC
232s	ATTAAGAGCAGTTGATTCCCAATTATACATTT
233	TATAATCAGATTTTAGACAGGAACCCGGAAGC
234	TTTTAATCCTGAGAAGTGTTTT
235	TTTTAACATACGAGGGTACGCCAGTTTT
236	ACGTCAAAGCGAACCTCCCGACTTGCGGGAGGTT

modifizierte Faltungsstränge

	DNA-Sequenz von 5' nach 3'	
82ssFR	TAAAGGCCGCTTTTGCGAATACGTGGCACAGA	5'FAM/3'TXR
81clong	CAATATTTTTGAATGGTATAAACAGTTAATGCGTCATACA	
161clong	GCAGCGAAAAGACAGCAGTCTATCAGGGCGATGTAGGGTTG	
162sBHQ	TGACCTGAAAGCGTAAGGGATCGTACCCTCA	3' BHQ-2
65long	TCTTAACAGCTTGATGTGCCGTCGAGAGGGTGAGCCGCC	
69long	ACAATGACAACAACCATAGCGGGTTTTGCTCCAGGTCAG	
73long	GATATATTCGGTCGCTAGGCTGAGACTCCTCACAATAAA	
169long	GGACATTCTGGCCAACGCCGTAAGCACTAAAATCCTGTT	
173long	AGATTCACCAGTCACAAGCCCCGATTTAGAGCGGTCCAC	
177long	TCAATCGTCTGAAATGGGCGAACGTGGCGAGATCACCGCC	
66s-SA-D	GTATAGCCGCTTTGAGGTGAATTTTTTGAATA[cU-D4]AACTCTATGCATAATG	
70s-SA	GCGGATAAACCGATAGTTGCGCGTTTTTGAATATAACTCTATGCATAATG	
74s-SA	ATTAGGATTCGCCACGCATAACCTTTTGAATATAACTCTATGCATAATG	
170s-SA	CTAAAGGGCGACCAGTAATAAAAGTTTTGAGTTATATTCG	
174s-SA	GGAAAGCCGATTATTTACATTGGCTTTTGAGTTATATTCG	
178s-SA-A	GAAGAAAGACCTACATTTTGACGCTTTTGAGTTA[cU-A4]ATTCG	

66s-Apt-D GTATAGCCGCTTTCGAGGTGAATTTTTCTA[cU-D4]ACCTGGGGGAGTAT
70s-Apt-D GCGGATAAACCGATAGTTGCGCCGTTTTCTA[cU-D4]ACCTGGGGGAGTAT
74s-Apt-D ATTAGGATTCGCCCACGCATAACCTTTTCTA[cU-D4]ACCTGGGGGAGTAT
78s-Apt-D GTATTAAGGAGGCTTGCAGGGAGTTTTCTA[cU-D4]ACCTGGGGGAGTAT
166s-Apt-A GTCGAGGTAGAGATAGAACCCTTCTTTTTGCGGAGGAAGGTA[cU-A4]AG
170s-Apt-A CTAAAGGGCGACCAGTAATAAAAGTTTTGCGGAGGAAGGTA[cU-A4]AG
174s-Apt-A GGAAAGCCGATTATTTACATTGGCTTTTTGCGGAGGAAGGTA[cU-A4]AG
178s-Apt-A GAAGAAAGACCTACATTTTGACGCTTTTTGCGGAGGAAGGTA[cU-A4]AG

66s-Apt GTATAGCCGCTTTCGAGGTGAATTTTTACCTGGGGGAGTAT
70s-Apt GCGGATAAACCGATAGTTGCGCCGTTTTACCTGGGGGAGTAT
74s-Apt ATTAGGATTCGCCCACGCATAACCTTTTACCTGGGGGAGTAT
78s-Apt GTATTAAGGAGGCTTGCAGGGAGTTTTACCTGGGGGAGTAT
166s-Apt GTCGAGGTAGAGATAGAACCCTTCTTTTTGCGGAGGAAGGT
170s-Apt CTAAAGGGCGACCAGTAATAAAAGTTTTGCGGAGGAAGGT
174s-Apt GGAAAGCCGATTATTTACATTGGCTTTTTGCGGAGGAAGGT
178s-Apt GAAGAAAGACCTACATTTTGACGCTTTTTGCGGAGGAAGGT

für die DNA-Origami-Zangen verwendete Kombinationen

SA₃₄ET₄ 65long, 66s-SA-D, 69long, 70s-SA, 73, 74, 78s, 166s, 169, 170, 173long, 174s-SA, 177long, 178s-SA-A
SA₂₄ET₄ 65long, 66s-SA-D, 69, 70, 73long, 74s-SA, 78s, 166s, 169long, 170s-SA, 173, 174, 177long, 178s-SA-A
Apt₄ET₄ 65long, 66s-Apt-D, 69, 70, 73, 74, 78s, 166s, 169, 170, 173, 174, 177long, 178s-Apt-A
Apt₃ET₃ 65, 66, 69long, 70s-Apt-D, 73, 74, 78s, 166s, 169, 170, 173long, 174s-Apt-A, 177, 178
Apt₂ET₂ 65, 66, 69, 70, 73long, 74s-Apt-D, 78s, 166s, 169long, 170s-Apt-A, 173, 174, 177, 178
Apt₁ET₁ 65, 66, 69, 70, 73, 74, 78s-Apt-D, 166s-Apt-A, 169, 170, 173, 174, 177long, 178
Apt₂₄ET₂₄ 65long, 66s-Apt-D, 69, 70, 73long, 74s-Apt, 78s, 166s, 169long, 170s-Apt, 173, 174, 177long, 178s-Apt-A
Apt₄ 65long, 66s-Apt, 69, 70, 73, 74, 78s, 166s, 169, 170, 173, 174, 177long, 178s-Apt
Apt₃₄ 65long, 66s-Apt, 69long, 70s-Apt, 73, 74, 78s, 166s, 169, 170, 173long, 174s-Apt, 177long, 178s-Apt
Apt₂₃₄ 65long, 66s-Apt, 69long, 70s-Apt, 73long, 74s-Apt, 78s, 166s, 169long, 170s-Apt, 173long, 174s-Apt, 177long, 178s-Apt
Apt₁₂₃₄ 65long, 66s-Apt, 69long, 70s-Apt, 73long, 74s-Apt, 78s-Apt, 166s-Apt, 169long, 170s-Apt, 173long, 174s-Apt, 177long, 178s-Apt

8.6 Zusätzliche Spektren und Daten

8.6.1 cAraU-Energietransfer-DNA

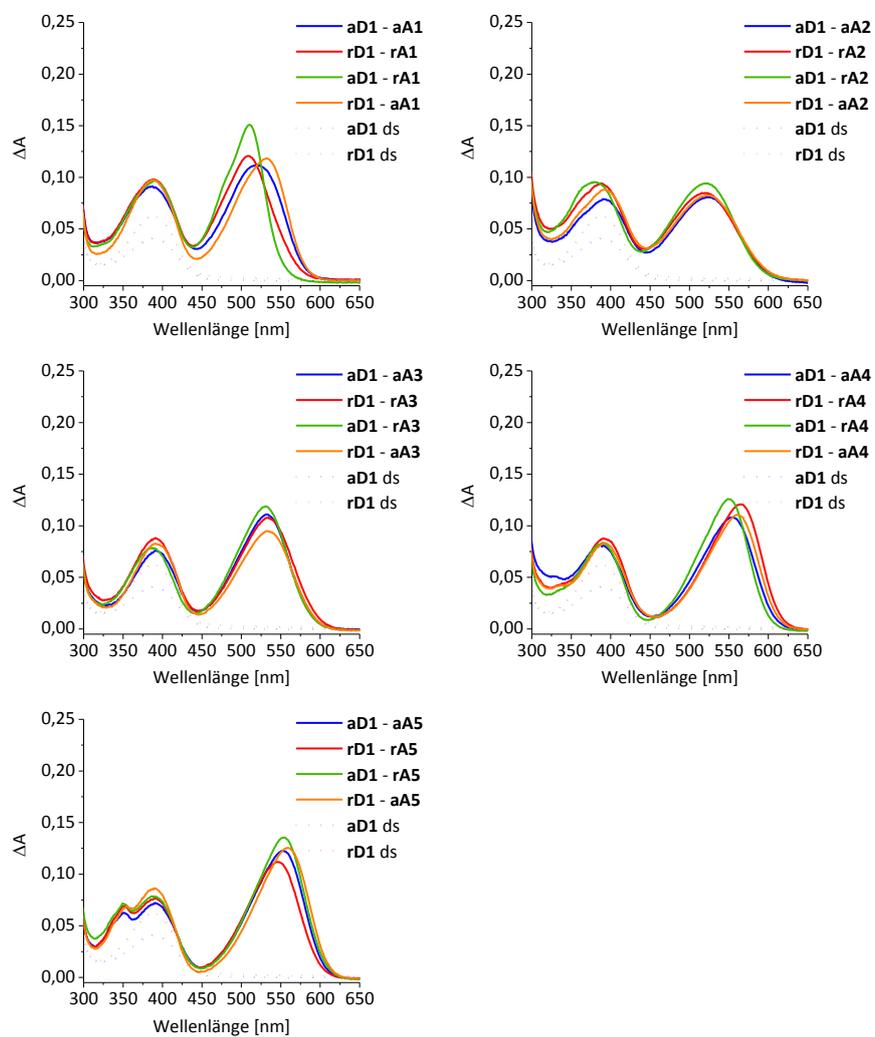


Abbildung 84: Absorptionsspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D1** und den Akzeptor-Fluorophoren **A1 – A5**.

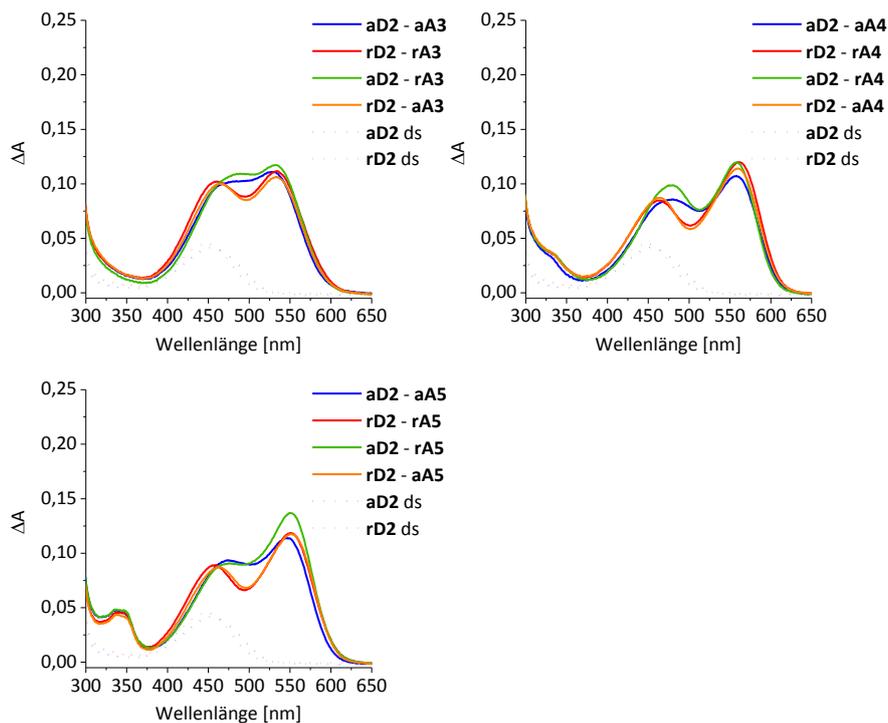


Abbildung 85: Absorptionsspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D2** und den Akzeptor-Fluorophoren **A3 – A5**.

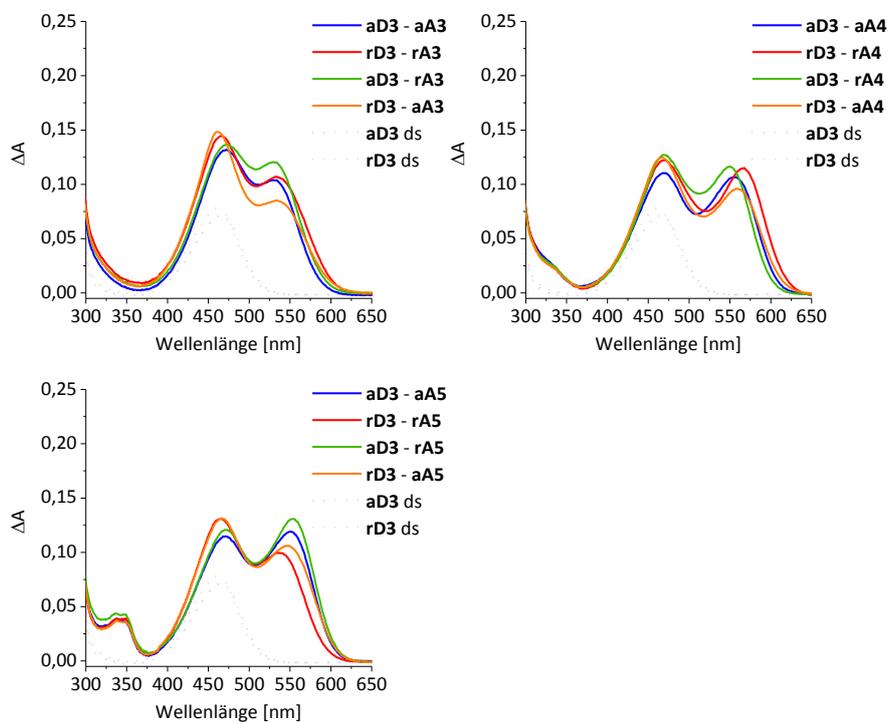


Abbildung 86: Absorptionsspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D3** und den Akzeptor-Fluorophoren **A3 – A5**.

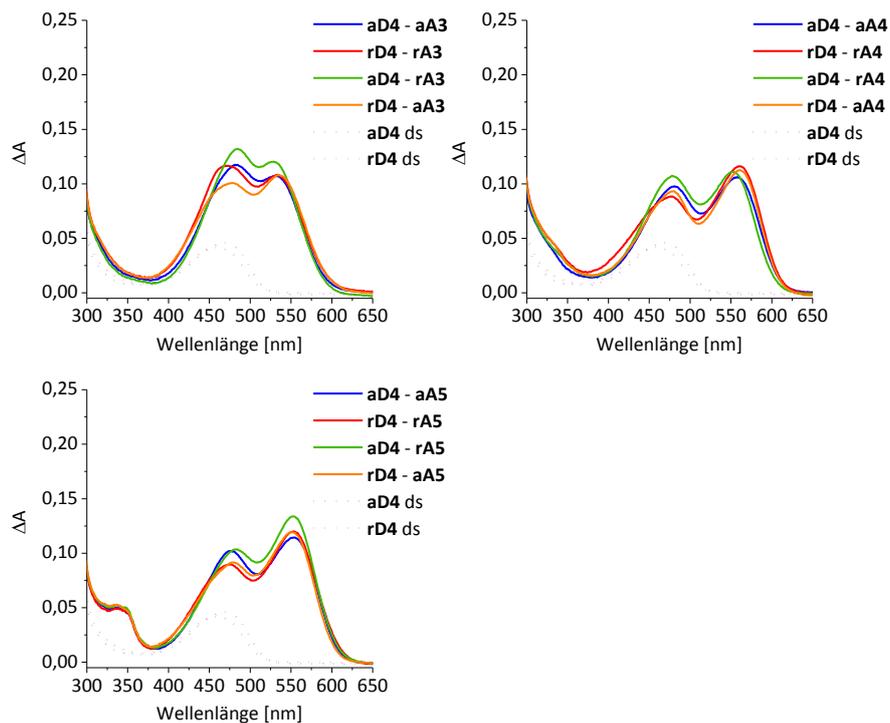


Abbildung 87: Absorptionsspektren aller Kombinationen der Energietransfer-Paare bestehend aus dem Donor-Fluorophor **D4** und den Akzeptor-Fluorophoren **A3 – A5**.

Tabelle 44: Schmelztemperaturen aller Kombinationen der zweifach modifizierten DNA-Duplexe aus Kapitel 3.3.2.

		D1	D2	D3	D4
		T _m [°C]	T _m [°C]	T _m [°C]	T _m [°C]
A1	a-a	63.0	-	-	-
	a-r	65.8	-	-	-
	r-a	67.6	-	-	-
	r-r	65.8	-	-	-
A2	a-a	61.5	-	-	-
	a-r	64.6	-	-	-
	r-a	64.5	-	-	-
	r-r	67.2	-	-	-
A3	a-a	61.3	64.4	62.5	65.4
	a-r	63.2	67.6	64.0	66.1
	r-a	64.2	65.2	65.3	65.7
	r-r	66.0	66.8	67.4	67.7
A4	a-a	62.1	67.1	63.8	66.5
	a-r	65.5	68.1	65.1	67.8
	r-a	65.4	67.7	66.2	68.2
	r-r	67.0	66.9	67.5	67.7
A5	a-a	63.5	68.0	64.5	67.2
	a-r	64.5	67.5	59.6	66.0
	r-a	68.2	69.0	67.7	69.0
	r-r	67.5	67.2	70.0	68.0

8.6.2 Wellenlängenverschiebende Aptasensoren

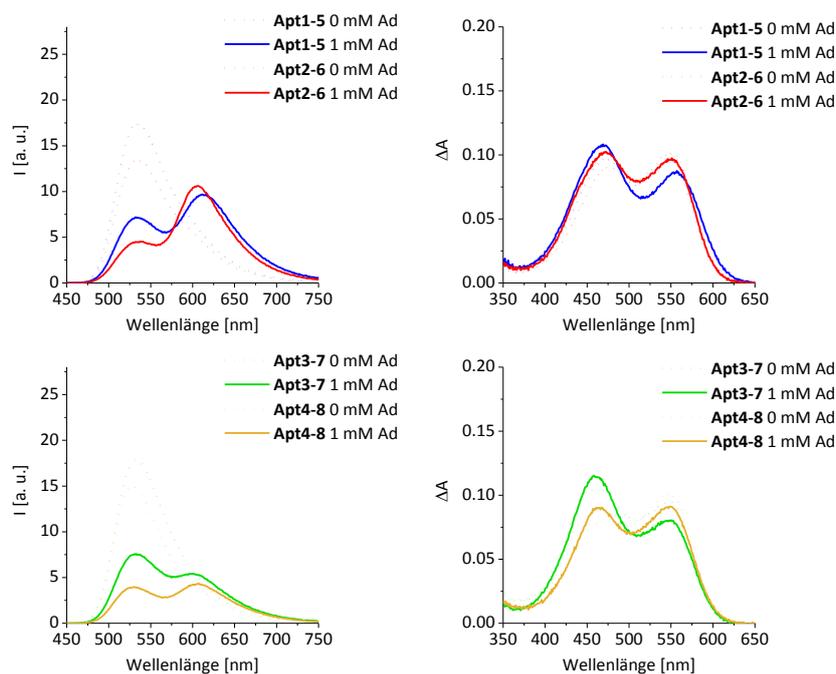


Abbildung 88: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der wellenlängenverschiebenden, adenosinbindenden Aptasensoren **Apt1-5**, **Apt2-6**, **Apt3-7** und **Apt4-8**. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

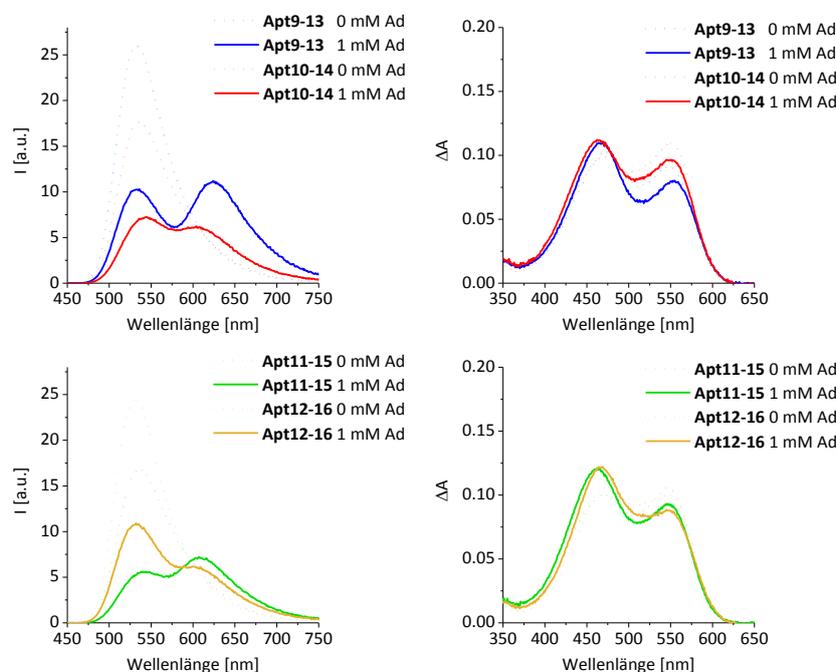


Abbildung 89: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der wellenlängenverschiebenden, adenosinbindenden Aptasensoren **Apt9-13**, **Apt10-14**, **Apt11-15** und **Apt12-16**. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

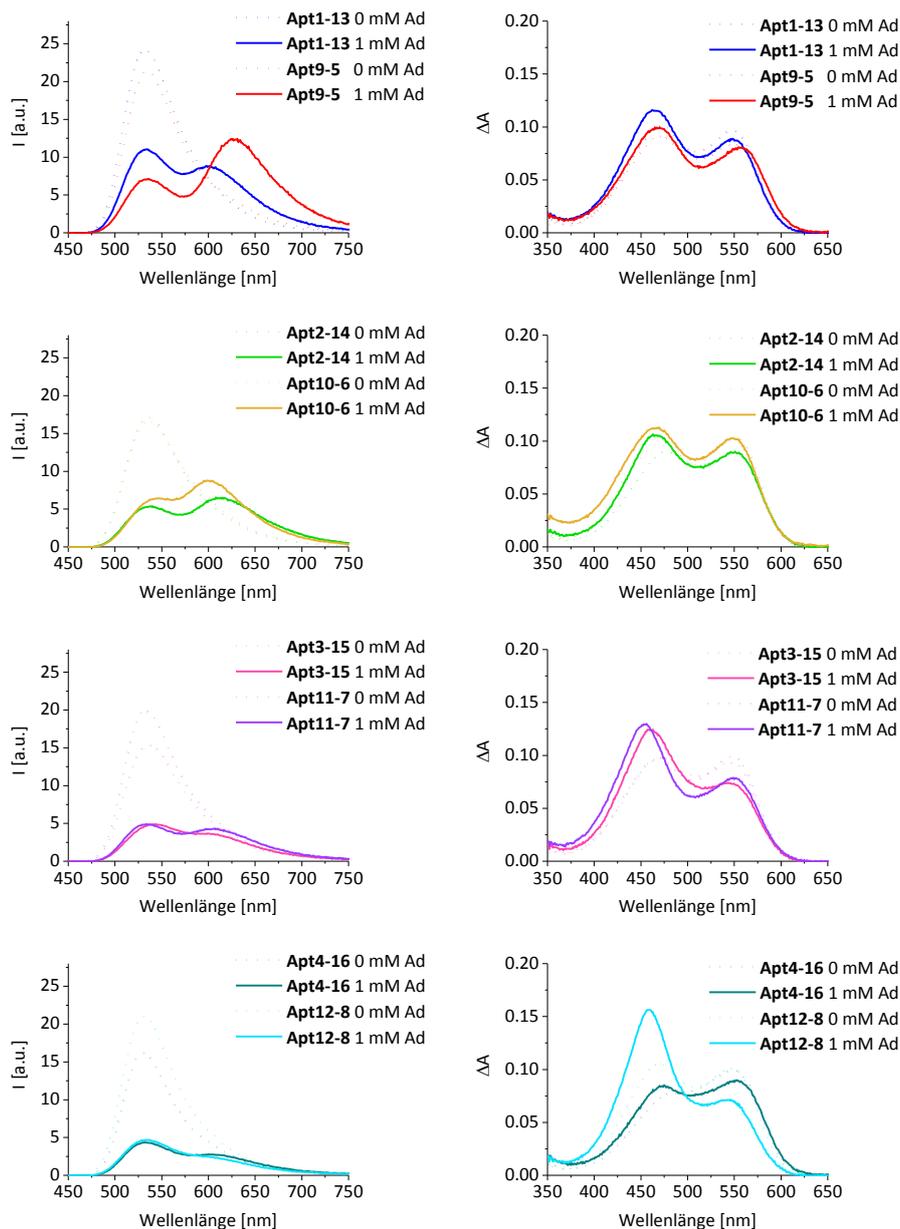


Abbildung 90: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der wellenlängenverschiebenden, adenosinbindenden Aptasensoren **Apt1-13**, **Apt9-5**, **Apt2-14**, **Apt10-6**, **Apt3-15**, **Apt11-7**, **Apt4-16** und **Apt12-8**. Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{exc} = 435$ nm; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

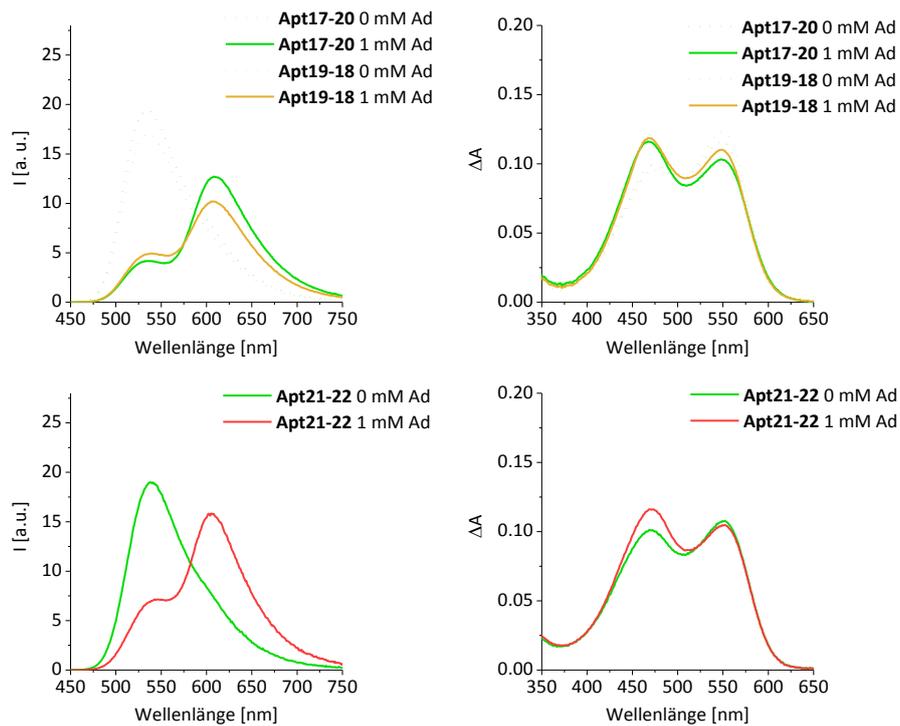


Abbildung 91: Fluoreszenz (links)- und Absorptionsspektren (rechts) der wellenlängenverschiebenden, adenosinbindenden Aptasensoren **Apt17-20**, **Apt19-18** und **Apt21-22** in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Adenosin (Ad). Verwendete Parameter der Fluoreszenz: $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$; Spaltbreite: 3/2; 20 °C.

8.6.3 DNA-Origami-Zangen

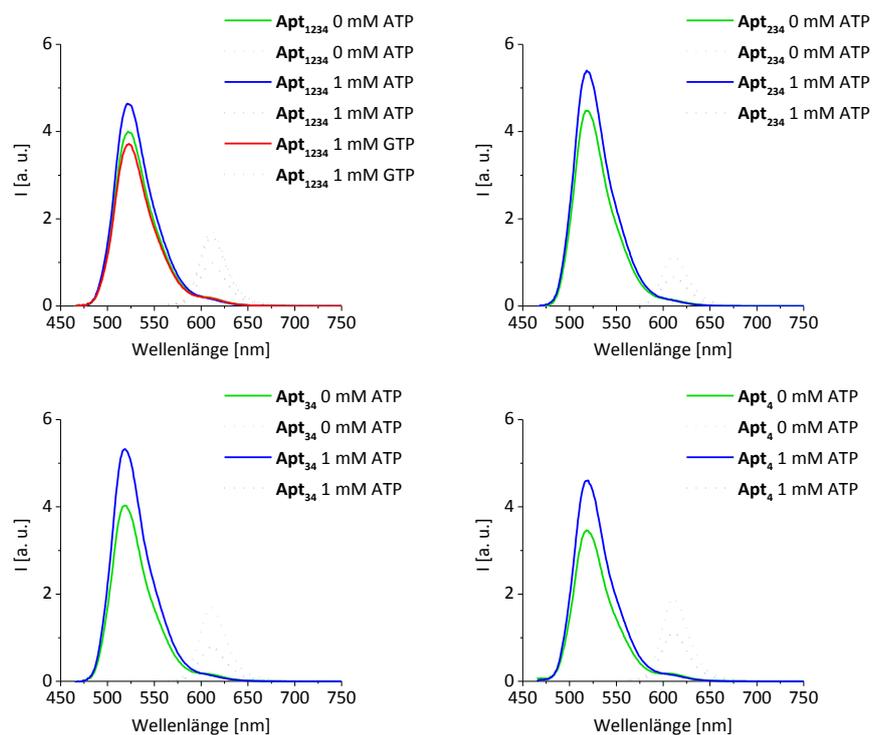


Abbildung 92: Fluoreszenzspektren der *DNA-Origami-Zangen* Apt_{1234} , Apt_{234} , Apt_{34} und Apt_4 in Ab- und Anwesenheit von 1 mM ATP sowie Negativprobe für Apt_{1234} in Anwesenheit von 1 mM GTP.

9 Literaturverzeichnis

- [1] "Eine grün leuchtende Revolution," online unter <http://www.sueddeutsche.de/wissen/nobelpreis-fuer-chemie-eine-gruen-leuchtende-revolution-1.541271>, aufgerufen am 10/25/2016.
- [2] S. Stockrahm, "Grün für das Leben," online unter <http://www.zeit.de/online/2008/41/nobelpreis-chemie>, aufgerufen am 10/25/2016.
- [3] W. W. Merkel, "Die Männer, die Schweine zum Leuchten brachten," online unter <https://www.welt.de/wissenschaft/article2548344/Die-Maenner-die-Schweine-zum-Leuchten-brachten.html>, aufgerufen am 10/25/2016.
- [4] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Physiol.* **1962**, *59*, 223–239.
- [5] J. K. M. Sanders, S. E. Jackson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2821–2822.
- [6] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [7] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, *111*, 229–233.
- [8] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802–805.
- [9] V. Sample, R. H. Newman, J. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2852–2864.
- [10] T. F. de Koning-Ward, P. R. Gilson, J. A. Boddey, M. Rug, B. J. Smith, A. T. Papenfuss, P. R. Sanders, R. J. Lundie, A. G. Maier, A. F. Cowman, et al., *Nature* **2009**, *459*, 945–949.
- [11] A. Schmid, S. Hallermann, R. J. Kittel, O. Khorramshahi, A. M. J. Fröhlich, C. Quentin, T. M. Rasse, S. Mertel, M. Heckmann, S. J. Sigrist, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 659–666.
- [12] B. A. Pollok, R. Heim, *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 57–60.
- [13] C. Dinant, M. E. Van Royen, W. Vermeulen, A. B. Houtsmuller, *J. Microsc.* **2008**, *231*, 97–104.
- [14] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- [15] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14–19.

- [16] G. G. Stokes, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1852**, *142*, 463–562.
- [17] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *6*, 166–175.
- [18] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 55–75.
- [19] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 103–110.
- [20] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, New York, **2001**.
- [21] L. Stryer, *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819–846.
- [22] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4588.
- [23] M. P. Lillo, B. K. Szpikowska, M. T. Mas, J. D. Sutin, J. M. Beechem, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11273–11281.
- [24] I. H. Stein, V. Schüller, P. Böhm, P. Tinnefeld, T. Liedl, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 689–695.
- [25] K. Wang, W. Tan, K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856–870.
- [26] M. E. Østergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5771–5788.
- [27] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [28] X. Fang, J. J. Li, J. Perlette, W. Tan, K. Wang, *Anal. Chem.* **2000**, *1*, 747–753.
- [29] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *5*, 2418–2421.
- [30] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 865–868.
- [31] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062–2063.
- [32] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191–1196.
- [33] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9307–9310.
- [34] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526–528.
- [35] S. Sezi, R. Varghese, T. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 173–176.
- [36] S. Barrois, *Farbwechsel in DNA: Diarylethen-Photoschalter und Cyaninfarbstoffe zur*
186|

- Untersuchung und Steuerung der DNA-Hybridisierung*, Karlsruher Institut für Technologie, **2014**.
- [37] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239–1248.
- [38] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136–1138.
- [39] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H.-A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 890–894.
- [40] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7373–7379.
- [41] S. Barrois, S. Wörner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photoiol. Sci.* **2014**, *13*, 1126–1129.
- [42] S. Jockusch, A. A. Martí, N. J. Turro, Z. Li, X. Li, J. Ju, N. Stevens, D. L. Akins, *Photochem. Photoiol. Sci.* **2006**, *5*, 493–498.
- [43] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268–7272.
- [44] C. Holzhauser, *Wellenlängenverschiebende DNA- Und RNA-Sonden zur bioanalytischen Anwendung*, Karlsruher Institut für Technologie, **2012**.
- [45] C. Schwechheimer, M. Merkel, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Modified Nucleic Acids*, Springer, Cham, **2016**.
- [46] G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244–251.
- [47] S. M. Hammond, A. A. Caudy, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 110–119.
- [48] P. V Chang, C. R. Bertozzi, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8864–8879.
- [49] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 8206–8210.
- [50] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1646.
- [51] Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, B. Altman, S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1044–1056.
- [52] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *3*, 142–155.

- [53] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7547–7551.
- [54] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, 3, 44003.
- [55] P. R. Bohländer, *Detektion von Nukleinsäuren durch postsynthetisch modifizierte Fluoreszenzsonden auf Basis photostabiler Cyaninfarbstoffe*, Karlsruher Institut für Technologie, **2015**.
- [56] P. R. Bohländer, M. L. Abba, F. Bestvater, H. Allgayer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 5001–5006.
- [57] K. Schee, K. Boye, T. W. Abrahamsen, Ø. Fodstad, K. Flatmark, *BMC Cancer* **2012**, 12, 505.
- [58] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675–5685.
- [59] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8846–8847.
- [60] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.
- [61] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711.
- [62] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 67, 3057–3064.
- [63] R. Berg, B. F. Straub, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2715–2750.
- [64] P. M. G. Finn, V. Fokin, J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1302–1315.
- [65] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1388–1405.
- [66] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109–1151.
- [67] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2853–2855.
- [68] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, L. U. V. Munich, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639–3642.
- [69] J. Gierlich, K. Gutmiedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9486–9494.
- [70] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodivers.* **2006**, 3, 509–514.
- [71] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 558–564.

- [72] M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1299–1302.
- [73] D. Lachmann, S. Berndl, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, No. 13.
- [74] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442–3444.
- [75] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [76] A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 781–783.
- [77] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165.
- [78] F. Wolbers, P. Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes, A. Van Den Berg, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5073–5080.
- [79] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.
- [80] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
- [81] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [82] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1541–1553.
- [83] G. B. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Synthesis* **2015**, *47*, 2738–2744.
- [84] S. Arndt, H. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14580–14582.
- [85] M. Manoharan, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 117–130.
- [86] I. K. Astakhova, J. Wengel, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1112–1122.
- [87] D. Venkateswarlu, D. M. Ferguson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5609–5610.
- [88] I. Berger, V. Tereshko, H. Ikeda, V. E. Marquez, M. Egli, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2473–2480.
- [89] I. Pharmaceuticals, *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1616–1641.
- [90] A. M. Noronha, C. J. Wilds, M. J. Damha, C. Gonza, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 9329–

- 9339.
- [91] W. T. Markiewicz, M. Wiewiórowski, *Nucleic Acids Res.* **1978**, 185–190.
- [92] N. N. Dioubankova, A. D. Malakhov, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, P. E. Volynsky, R. G. Efremov, V. A. Korshun, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 841–847.
- [93] M. Grotli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899–5914.
- [94] A. Takaoka, Z. Wang, M. K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, Y. Ohba, et al., *Nature* **2007**, *448*, 501–506.
- [95] M. Yoneyama, T. Fujita, *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 907–908.
- [96] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [97] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **1990**, *2*, 279–289.
- [98] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [99] J. Kurreck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1404–1426.
- [100] M. Dominska, D. M. Dykxhoorn, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1183–1189.
- [101] U. Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [102] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [103] L. Aagaard, J. J. Rossi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 75–86.
- [104] D. M. Dykxhoorn, J. Lieberman, *Cell* **2006**, *126*, 231–235.
- [105] N. S. Sumona, K. Sunil, *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol.* **2010**, *4*, 67–87.
- [106] E. Song, P. Zhu, S. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, et al., *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 709–717.
- [107] J. P. Dassie, X. Liu, G. S. Thomas, R. M. Whitaker, K. W. Thiel, K. R. Stockdale, D. K. Meyerholz, A. P. Mccaffrey, J. O. M. li, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 839–849.
- [108] E. Lescrinier, M. Froeyen, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2975–2989.
- [109] C. Y. Jao, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 15779–15784.

- [110] E. Paredes, S. R. Das, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 125–131.
- [111] W. Wang, K. Chen, D. Qu, W. Chi, W. Xiong, Y. Huang, J. Wen, S. Feng, B. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6747–6750.
- [112] S. Bernacchi, Y. Mély, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e62.
- [113] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2217–2223.
- [114] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [115] J. Wrzesinski, J. Ciesiolka, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6257–6268.
- [116] D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656–665.
- [117] C. H. Lin, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1993**, *4*, 817–832.
- [118] M. Barbu, M. N. Stojanovic, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 658–660.
- [119] M. N. Stojanovic, E. G. Green, S. Semova, D. B. Nikic, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *125*, 6085–6089.
- [120] K. Endo, Y. Nakamura, *Anal. Biochem.* **2010**, *400*, 103–109.
- [121] K. Song, E. Jeong, W. Jeon, M. Cho, C. Ban, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2153–2161.
- [122] L. Giver, D. Bartel, M. Zapp, A. Pawul, M. Green, A. D. Ellington, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5509–5516.
- [123] N. Hamaguchi, A. Ellington, M. Stanton, *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 126–131.
- [124] S. E. Lupold, B. J. Hicke, Y. Lin, D. S. Coffey, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4029–4033.
- [125] S. Jeong, T. Eom, S. Kim, S. Lee, J. Yu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 237–243.
- [126] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [127] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.
- [128] G. Mayer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710–2727.
- [129] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev.* **2006**, *5*, 123–132.
- [130] H. Sun, X. Zhu, P. Y. Lu, R. R. Rosato, W. Tan, Y. Zu, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3*,

e182.

- [131] Y. Zhang, H. Hong, W. Cai, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4185–4194.
- [132] E. J. Cho, J. Lee, A. D. Ellington, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 241–264.
- [133] V. C. Özalp, M. B. Serano-Santos, T. Schäfer, in *Responsive Membr. Mater.* (Eds.: D. Bhattacharyya, T. Schäfer, S.R. Wickramasinghe, S. Daunert), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, Vereinigtes Königreich, **2012**, pp. 1–29.
- [134] J. C. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 51–54.
- [135] H. Vu, C. McCollum, K. Jacobson, P. Theisen, R. Vinayak, E. Spiess, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7269–7272.
- [136] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237–247.
- [137] M. R. Jones, N. C. Seeman, C. A. Markin, *Science (80-.)*. **2015**, *347*, 1260901.
- [138] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 65–87.
- [139] T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, K. V. Gothelf, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5636–5646.
- [140] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [141] B. Saccà, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 58–66.
- [142] X. Li, X. Yang, J. Qi, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6131–6140.
- [143] A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1811–1815.
- [144] B. Saccà, R. Meyer, M. Erkelenz, K. Kiko, A. Arndt, H. Schroeder, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9378–9383.
- [145] N. V Voigt, T. Tørring, A. Rotaru, M. F. Jacobsen, J. B. Ravnsbæk, R. Subramani, W. Mamdouh, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher, et al., *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 200–203.
- [146] I. H. Stein, C. Steinhauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4193–4195.
- [147] B. Saccà, Y. Ishitsuka, R. Meyer, A. Sprengel, E. Schöneweiß, G. U. Nienhaus, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3592–3597.

- [148] A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 449.
- [149] A. Kuzuya, R. Watanabe, M. Hashizume, M. Kaino, *Methods* **2014**, *67*, 250–255.
- [150] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, **1997**, *3263*, 7512–7515.
- [151] P. Kele, G. Mezö, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 344–347.
- [152] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458–62.
- [153] E. Paredes, S. R. Das, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5313–5316.

10 Anhang

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

- Heidi-Kristin Walter, Bettina Olshausen, Ute Schepers, Hans-Achim Wagenknecht, *A postsynthetically 2'-„clickable“ uridine with arabino configuration and its application for fluorescent labelling and imaging of DNA*, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, eingereicht.
- Stefanie Arndt*, Heidi-Kristin Walter*, Hans-Achim Wagenknecht, *Synthesis of Wavelength-shifting DNA Hybridization Probes by Using Photostable Cyanine Dyes*, *J. Vis. Exp.* **2016**, 113, e54121.
- Heidi-Kristin Walter, Peggy R. Bohländer, Hans-Achim Wagenknecht, *Development of a Wavelength Shifting Module for the Adenosine Aptamer Using Photostable Cyanine Dyes*, *ChemistryOpen* **2015**, 4, 92-96.

Posterpräsentationen und Konferenzen

- “*Synthesis of a 2'-O-propargyl modified arabino-uridine and its application in wavelength-shifting DNA- and RNA probes*”, Konstanz Symposium Chemical Biology, Konstanz, **2015**.
- “*Synthesis of a 2'-O-propargyl modified arabino-uridine and its application in wavelength-shifting DNA- and RNA probes*”, 7. Nukleinsäuretreffen der Deutschen Nukleinsäure Gemeinschaft, Berlin, **2015**.
- 24th International Symposium: Synthesis in Organic Chemistry, Cambridge, **2015**.
- “*New photostable cyanine dyes and their application in wavelength-shifting adenosine aptasensors by using “click“-chemistry*”, 2. Doktorandenseminar der Deutschen Nukleinsäure Gemeinschaft, Bad Herrenalb, **2014**.
- 18. Tag der Organischen Chemie Suttgart, Stuttgart, **2014**.

- *“New photostable cyanine dyes and their application in wavelength-shifting adenosine aptasensors by using “click”-chemistry”, XXI. Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Posen (Polen), 2014.*
- *“Increasing fluorescence in thiazole orange- and 5-Nitroindole-labelled DNA and RNA with use of short-range electron transfer”, VI. Nukleinsäuretreffen, Greifswald, 2013.*

