

Biokonjugation eines Farbstoffpaares als fluoreszentes Modul für siRNA, Aptamere und boronsäuremodifizierte DNA

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

M.Sc. Jeannine Steinmeyer

aus Summit, New Jersey, USA

Karlsruhe, 2018

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2018

Meiner Familie

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt“

Albert Einstein

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2015 bis April 2018 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Anleitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung, die interessante Themenstellung sowie die wissenschaftlichen Freiheiten und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- dem *Graduiertenkolleg 2039* (DFG) für die wissenschaftlichen Möglichkeiten und die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.
- Prof. Dr. Ute Schepers (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT) für die interessante Zusammenarbeit und die Einführung in die chemische Biologie. Außerdem möchte ich ihrer Mitarbeiterin Bettina Olshausen danken für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Zellexperimente sowie der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.
- Dr. Franziska Rönicke für die unermüdliche Geduld bei der Durchführung der Zellexperimente.
- Prof. Dr. G. Ulrich Nienhaus (Institut für Angewandte Physik, KIT) und Dr. Karin Nienhaus für die erfolgreichen Messungen der fluoreszenten Lebenszeiten sowie ihrer Mitarbeiterin Mathilde Bichelberger für die Durchführung der Experimente.
- Annette Hochgesand für das unermüdliche Messen meiner unzähligen MALDI-Proben, die es ihr nicht immer leichtgemacht haben.
- Claudia Sommer für die tatkräftige Unterstützung in allen organisatorischen und verwaltungstechnischen Anliegen und ihre immer offene Tür.
- Dr. Andreas Rapp, Tanja Ohmer, Anne-Lena Emmerich und Pia Lang für das Messen der NMR-Proben.
- Damian, Sergej und David für das Messen der NMR-Proben am 500 MHz Spektrometer.

- Dr. Norbert Foitzik und seinen Mitarbeiterinnen Ingrid Roßnagel und Angelika Mösle Anfertigen der Massen- und IR-Spektren.
- Dr. Patrick Weis für die ESI-Messungen der boronsäuremodifizierte Oligonukleotide.
- Meinen Arbeitskollegen Dr. Effi Bätzner, Dr. Peggy Bohländer, Dr. Martin Weiser, Dr. Philipp Ensslen, Dr. Marcus Merkel, Dr. Heidi Walter, Dr. Stefanie Arndt, Dr. Nadine Gaß, Dr. Krisana Peewasan, Dr. Barbara Reiß, Linda Nötzel, Andrea Bijeljanin, Tamina Schneider, Benjamin Chaoui, Leonora Nurcaj, Andreas Dittmer, Isabella Weiß, Dennis Harijara, Daniel Sack, Christian Schwechheimer, Dr. Franziska Röncke, Christoph Bickmann, Ulrike Reisacher, Sergej Hermann, Damian Ploschik, Lara Hirsch, Arthur Kuhlmann, Fabienne Speck, Yannic Fritz, Lisa Gramespacher, Benjamin Lehmann, Samantha Wörner, Sara Müller, Judith Winsauer, Julian Gebhard, Nathalie Wagener, Fabian Lang, David Rombach, Katja Krell, Larissa Doll und Robert Hofsäß für die gute Zusammenarbeit, tolle Arbeitsatmosphäre und einzigartige und unvergessliche Zeit mit Mottotagen und abwechslungsreicher Musik.
- Meinen Vertiefer- und Bachelorstudenten Arthur Kuhlmann, Sara Müller und Fabian Lang und meinem Azubi Felix Mazza für das Interesse an und die Unterstützung bei meiner Arbeit und das begeisterte Mitarbeiten.
- Larissa und Marcus für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Benny für die Hilfsbereitschaft bei jeglichen Computerproblemen, die vielen Gespräche, mal mehr und mal weniger verständlich und dafür, dass du für jeden Spaß zu haben bist.
- Damian für die guten Gespräche und der Versorgung mit dem neuesten Gossip.
- Robert für die unterhaltsamen Gespräche und deine ruhige und gelassene Art.
- Jack für ihre Versorgung mit thailändischem Essen, die Spieleabende und das immer offene Ohr.
- Heidi für die Einführung in die Welt der RNA und HPLCs und die vielen guten Gespräche frühmorgens auf dem Balkon.
- Samantha für ihre offene lebenswerte und aufmunternde Art auch wenn alles manchmal doof ist.

- Larissa für ihr offenes Ohr zu jeder Zeit, die frühmorgendliche Gesellschaft - jetzt weiß ich auch was Fischlen sind - und die aufschlussreichen Diskussionen über die allseits geliebten Boronsäuren. Danke für die Unterstützung, vor allem während dem Schreiben dieser Arbeit.
- Phillip, Marcus und Christian für einen unvergesslichen ersten Sommer.
- Dave für seine unglaubliche Begeisterungsfähigkeit, dem offenen Ohr für Probleme jeglicher Art und die meist gute akustische Beschallung.
- Eva für die jahrelange Freundschaft, die Aufmunterung und Unterstützung zu jeder Zeit, dein stetes Bemühen die Chemie zu verstehen oder zumindest so zu tun und die gemeinsame Zeit in Karlsruhe. Vielleicht schlägt es uns ja doch irgendwann wieder in die gleiche Stadt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne eure jahrelange Unterstützung und den richtigen Worten zur richtigen Zeit wäre vieles nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Zu guter Letzt möchte ich Marcus für die wunderbare und unvergessliche Zeit danken und dafür, dass du immer für mich da bist und mich jederzeit zum Lachen bringen kannst. Danke für deine Unterstützung, die vielen hilfreichen Anmerkungen und das Verständnis und die Geduld mit mir, vor allem in den letzten Monaten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung	1
2	Theoretischer Hintergrund	5
2.1	Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer	5
2.2	Beispiele und Anwendungen der FRET-Technik.....	10
2.2.1	Allgemeines	10
2.2.2	Wellenlängenverschiebende DNA/RNA-Sonden.....	11
2.3	Glucosedetektion mittels Boronsäure-Modifikation	18
2.3.1	Fluoreszenzbasierte Saccharidsonden	18
2.3.2	Sensoren in Oligonukleotiden	22
2.4	Kovalente Modifikationen an Nucleinsäuren.....	25
2.4.1	Präsynthetische Modifikationen	25
2.4.2	Postsynthetische Modifikationen.....	27
3	Wellenlängenverschiebende Sonden in DNA	33
3.1	Synthese der Farbstoffbasenanaloga.....	33
3.2	Optische Untersuchungen.....	35
3.2.1	Einfluss der Gegenbasen	35
3.2.2	Chromophor-Chromophor-Abstand.....	42
3.3	In-vivo-Experimente	44
3.4	Zusammenfassung.....	46
4	Wellenlängenverschiebende Sonden in RNA.....	49
4.1	Einführung in die siRNA-Technologie	49
4.2	Übertragung des Konzeptes von DNA auf RNA.....	52
4.3	Fluoreszenzlebenszeiten	56

4.4	In-vivo-Experimente	61
4.5	Zusammenfassung.....	65
5	Wellenlängenverschiebende Sonden in Aptameren	67
5.1	Einführung	67
5.2	Synthese und Charakterisierung der Aptasensoren	71
6	Boronsäuren in DNA.....	77
6.1	Einführung	77
6.2	Postsynthetische Modifikation aminfunktionalisierter DNA	78
6.3	Synthese des aminmodifizierten Bausteines zA.....	83
6.4	Konzeptübertragung auf wellenlängenverschiebende DNA.....	85
6.5	Optische Untersuchungen.....	87
6.5.1	Charakterisierung boronsäuremodifizierter wellenlängenverschiebender Oligonukleotide	87
6.5.2	Optische Eigenschaften als Glucose-Sensoren.....	92
6.5.3	pH-abhängige Messungen	94
6.6	Zusammenfassung und Ausblick	100
7	Zusammenfassung.....	103
8	Experimenteller Teil	107
8.1	Materialien und Methoden	107
8.2	Synthesvorschriften.....	114
8.2.1	Farbstoffmodifizierte Phosphoramiditbausteine	114
8.2.2	Aminfunktionalisierter 7-Deaza-2'-desoxyadenosinbaustein zA	119
8.3	Oligonukleotide	133
8.3.1	Synthese modifizierter DNA unter Normalbedingungen	133
8.3.2	Synthese der farbstoffmodifizierten DNA unter Verwendung von <i>ultramild-</i> Monomeren.....	137

8.3.3	Aufreinigung und Charakterisierung modifizierter DNA	138
8.3.4	Synthese modifizierter RNA	140
8.3.5	Aufreinigung und Charakterisierung modifizierter RNA	143
8.3.6	HPLC-Methoden	145
8.3.7	Sequenzen und Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotide... ..	147
8.4	Zusätzliche Spektren und Daten.....	151
8.4.1	Wellenlängenverschiebende Aptasensoren.....	151
8.4.2	Temperaturabhängigkeit der doppelt modifizierten Oligonukleotide ...	153
8.4.3	Optische Eigenschaften als Glucose-Sensoren.....	153
8.4.4	pH-abhängige optische Untersuchungen	156
9	Literaturverzeichnis.....	157
10	Appendix	169
10.1	Publikationen.....	169
10.2	Posterbeiträge und Konferenzen	170
10.3	Lehre.....	170

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	Da	Dalton
µL	Mikroliter	dA	2'-Desoxyadenosin
µM	Mikromolar	DAD	Diodenarraydetektor
Ac	Acetyl	DC	Dünnschichtchromatographie
Ak	Akzeptor	dC	2'-Desoxycytidin
a. u.	willkürliche Einheit (<i>arbitrary units</i>)	DCM	Dichlormethan
abs	Absorption	dG	2'-Desoxyguanosin
abs.	absolut	DIPEA	Diisopropylethylamin
AraU	1-β-D-Arabinofuranosyluracil	DMF	Dimethylformamid
bzw.	beziehungsweise	DMSO	Dimethylsulfoxid
ca.	circa	DMTr	Dimethoxytrityl
cAraU	2'-O-Progaryluridin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
CDI	Carbonyldiimidazol	ds	doppelsträngig
cL	Prop-2-yn-1-yl-(<i>R</i>)-(2,4-dihydroxybutyl)carbammat	dT	2'-Desoxythymidin
Cl	Chlorid	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
cm	Zentimeter	EE	Essigsäureethylester
CPG	<i>controlled pore glass</i>	EI	Elektronenstoßionisation
cU	2'-O-Progaryluridin	em	Emission
CuAAC	kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition	eq	Äquivalente
d	Dublett, Schichtdicke	ESI	Elektronensprayionisation
Do	Donor	ET	Energietransfer
		<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
		EtOH	Ethanol

Abkürzungsverzeichnis

exc	Anregung (<i>excitation</i>)	Lsg.	Lösung
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>	M	molar
FC	<i>Flash Chromatographie</i>	m	Multipllett
FLIM	Fluoreszenz-Lebensdauer- Mikroskopie (fluorescence lifetime imaging microscopy)	MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
		mbar	Millibar
FRET	Fluoreszenzresonanzenergie- transfer	MeCN	Acetonitril
		MeOH	Methanol
G	Guanosin	mg	Milligramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein	MHz	Megahertz
GTP	Guanosintriphosphat	min	Minute
h	Stunde	miRNA	<i>micro RNA</i>
HeLa	Henrietta Lacks	mL	Milliliter
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol	mM	millimolar
HPA	Hydroxypicolinsäure	mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>	MS	Massenspektroskopie
		MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
HR	hochauflösend (<i>high resolution</i>)		
Hz	Hertz	m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
I	Intensität	NaOH	Natriumhydroxid
IC	<i>internal conversion</i>	Na-P _i	anorganischer Natriumphosphatpuffer
ISC	<i>inter system crossing</i>		
J	Kopplungskonstante	NEt ₃	Triethylamin
k	Geschwindigkeitskonstante	NEt ₃ *HF	Triethylamintrihydrofluorid
konz.	konzentriert	NH ₃	Ammoniak

NHS	N-Hydroxysuccinimid	s	Singulett, Sekunde
nm	Nanometer	S ₀	nicht angeregter Grundzustand
nmol	Nanomol	S ₁	erster elektronisch angeregter Zustand
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>		
p.a.	pro analysi	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
PA	2-Cyanoethyl-diisopropylchloro-phosphoramidit	ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
		t	Triplet
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
		TBTA	Tris-(Benzyltriazolylmethyl)amin
pH	pH-Wert	TBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborat
pmol	Picomol		
ppm	<i>parts per million</i>	THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
quant.	quantitativ	THF	Tetrahydrofuran
rA	Adenosin	T _m	Schmelztemperatur
rC	Cytidin	TO	Thiazolorange
R _f	Retentionsfaktor	TR	Thiazolrot
rG	Guanosin	UV	Ultraviolett
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	vgl.	vergleiche
RLC	<i>RISC loading complex</i>	vis	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts (<i>visible</i>)
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAi	RNA-Interferenz	z.B.	zum Beispiel
RP	Umkehrphase (<i>reserved phase</i>)	δ	chemische Verschiebung
rpm	<i>rounds per minute</i>	ε ₂₆₀	Extinktionskoeffizient bei 260 nm
RT	Raumtemperatur		
rU	Uridin		

λ_{em}	Emissionswellenlänge	τ	Lebenszeit
λ_{exc}	Anregungswellenlänge	ϕ_{F}	Fluoreszenzquantenausbeute

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

1 Einleitung und Themenstellung

“Schizophrenie, Depression, Autismus – alles das Gleiche?” ist nur eine der Schlagzeilen, die die neuesten Untersuchungen von Humangenetikern der University of California in Los Angeles beschreibt.^[1] Diese haben herausgefunden, dass die genannten psychischen Erkrankungen im Gehirn eine Art molekularen Fingerabdruck hinterlassen, der sich bei den verschiedenen Leiden in gewisser Weise ähnelt.^[2] So ist bereits länger bekannt, dass die Vererbung bestimmter Gene gehäuft zu Depressionen^[3] oder auch Schizophrenie^[4] führen können. Genanalysen können dabei eine Disposition für diese Gene zeigen, die jedoch keine Aussage über die Wahrscheinlichkeit liefert, ob die Krankheit tatsächlich auftritt, da dafür die Aktivität dieser Gene wichtiger ist. Das bedeutet, dass nicht die DNA selbst, sondern die Kopien dieser in Form von mRNA und somit im Endeffekt die Genexpression ausschlaggebend ist. Eine erhöhte Expression bestimmter Gene führt dabei zum Krankheitsbild, wobei beobachtet wurde, dass diese speziellen Gene bei gesunden Probanden stumm blieben. Dieses Erkenntnis bietet eine Grundlage für das Verständnis der Mechanismen hinter den Krankheiten und eröffnet so die Möglichkeit, gezielt Therapien zu entwickeln.^[2]

Zur Entwicklung solcher speziellen Therapien, die beispielsweise auf der Regulierung der Genexpression beruhen, bedarf es der Aufklärung des vorliegenden Mechanismus auf molekularer Ebene. Hilfreich dafür ist die Verwendung molekularer Sonden. Eines dieser Systeme basiert auf dem Einsatz eines Energietransferpaares zur Markierung des zu untersuchenden Biomoleküls, welches einen Fluoreszenzenergietransfer (FRET) eingeht.^[5] Dieser Energietransfer ist abstandsabhängig und ermöglicht es, strukturelle Änderungen innerhalb des biologischen Systems zu visualisieren sowie die Aufnahme und den Abbau des Biomoleküls nachzuverfolgen.^[6-7] Beruht die fluoreszente Auslesung auf einem Zwei-Farben-System, können unspezifische Wechselwirkungen mit Zellbestandteilen, die das Risiko einer falschen Interpretation der Ergebnisse erhöhen, vermieden werden. Zur Markierung werden häufig kleine organische Moleküle eingesetzt, da der Einsatz großer farbiger Moleküle, wie beispielsweise dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), die natürliche Funktion des zu untersuchenden Systems beeinträchtigen können.^[8]

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein photostabiles Energietransferpaar untersucht werden, welches aus zwei Fluorophoren besteht, dessen Grundgerüst aus der Familie der

Cyaninfarbstoffe stammt (siehe Abbildung 1). Dieses wurde bereits in früheren Arbeiten kovalent an Oligonukleotide geknüpft und das resultierende optische Verhalten untersucht.^[9-10] Die dabei verwendete postsynthetische Anknüpfungsmethode benötigt jedoch Kupfer(I) als Katalysator, welches zelltoxisch wirkt und daher für Anwendungen in lebenden Organismen weniger geeignet ist. Daher sollen die beiden Fluorophore in dieser Arbeit als Basensurrogate während der Festphasensynthese in die Oligonukleotide eingebracht werden.

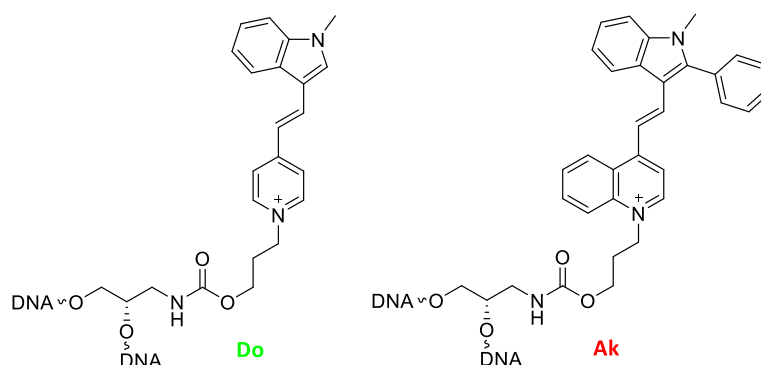


Abbildung 1. Strukturen des in dieser Arbeit verwendeten Energietransferpaares sowie deren Verlinkung im DNA-Rückgrat.

Die Verwendung eines azyklischen Linkers ermöglicht die Interkalation der Fluorophore in den Basenstapel, wodurch eine Abschirmung von der äußeren Umgebung stattfindet. Dabei soll der Einfluss der Umgebung und des Abstandes der beiden Fluorophore zueinander in DNA untersucht, hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften optimiert und in lebenden Zellen auf ihre bioanalytische Anwendbarkeit getestet werden. Durch die Übertragung des optimierten Konzeptes auf RNA soll dessen Genregulierungsfähigkeit im Rahmen der RNA-Interferenz gezeigt werden (siehe Abbildung 2). Neben der Genregulierungsfähigkeit gegenüber des GFP-Gens in lebenden Zellen werden auch die drei essentiellen Stadien der RNA-Interferenz mittels Fluoreszenzlebenszeitmessungen untersucht.

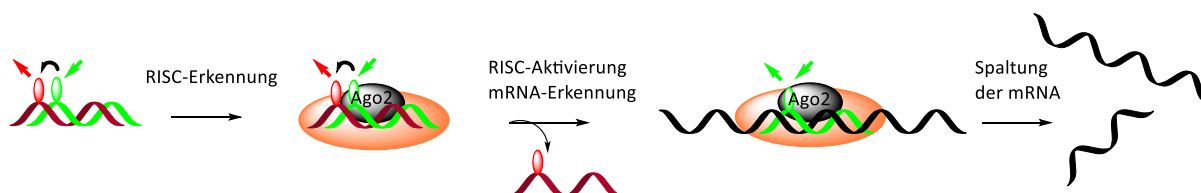


Abbildung 2. Schema der wichtigsten Stadien der RNA-Interferenz zur Genregulierung durch siRNA.

Ein weiteres Anwendungsgebiet des photostabilen Energietransferpaares ist dessen Visualisierung einer erfolgreichen Detektion eines Zielmoleküls in Aptasensoren. Im Rahmen

der vorliegenden Arbeit soll eine postsynthetische Verknüpfung mit Aptameren stattfinden, die die Fähigkeit besitzen, sensitiv auf einen Glucose-Boronsäure-Komplex zu reagieren und eine erfolgreiche Detektion durch einen Farbwechsel zu visualisieren. Die dabei optimierte Sequenz soll anschließend auf ein Zwei-Komponenten-System übertragen werden, bei dem die zur Glucosedetektion benötigte Boronsäure kovalent in das Oligonukleotid integriert ist. Dafür soll ein Konzept ausgearbeitet werden, das postsynthetisch die orthogonale Markierung mit dem Energietransferpaar und der Boronsäure ermöglicht. Bei einer erfolgreichen Detektion soll die eingebrachte Boronsäure die D-Glucose erkennen, eine kovalente Bindung mit dieser eingehen und somit das Aptamer schließen, wodurch ein Farbwechsel des Energietransferpaares induziert wird (siehe Abbildung 3).

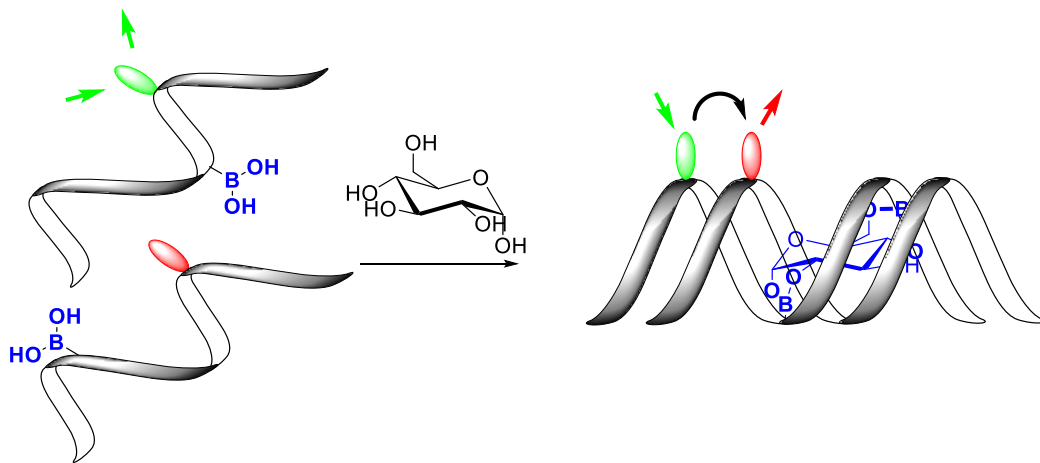


Abbildung 3. Funktionsweise des geplanten glucosesensitiven Aptasensors.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer

Fluoreszenzspektroskopie

Durch die Absorption eines Photons kann ein Molekül vom Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (z.B. S_1) angehoben werden. Die dabei aufgenommene Energie kann über verschiedene Prozesse wieder abgegeben werden. Eine wichtige Rolle für die Bildgebung in der Bioanalytik spielen hierbei neben der strahlungslosen Schwingungsrelaxation (VR, *vibrational relaxation* ($k_{VR} = 10^{10} - 10^{12} \text{ s}^{-1}$)^[5]), emittierende Prozesse wie Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Die beiden letztgenannten Prozesse werden auch unter Photolumineszenz zusammengefasst und unterscheiden sich durch die Multiplizität ihres angeregten Zustandes. Bei der Fluoreszenz findet nach den Kriterien der Auswahlregeln von elektronischen Zuständen ein spinerlaubter Übergang vom Singulett-Zustand S_1 in S_0 statt und ist daher ein schneller Prozess ($k_{em} = 10^7 - 10^9 \text{ s}^{-1}$)^[5], da die beiden Zustände die gleiche Spinmultiplizität besitzen. Bei der Phosphoreszenz relaxiert das Elektron aus dem angeregten Triplett-Zustand (T_1) zurück in den Singulett-Grundzustand (S_0) ($k_{phos} = 10^{-2} - 10^3 \text{ s}^{-1}$)^[5]. Aufgrund der Spinumkehr weisen diese spinverbotenen Übergänge längere Lebenszeiten auf, die im Millisekunden- bis Sekunden-Bereich liegen. Die oben genannten Prozesse lassen sich mit Hilfe des *Jablonski*-Diagrammes zusammenfassen (siehe Abbildung 4).^[11]

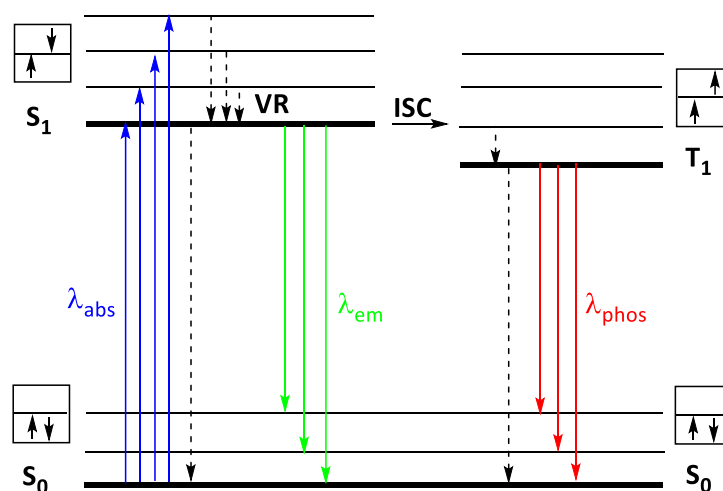


Abbildung 4. Schematische Darstellung des *Jablonski*-Diagramms.^[11] λ_{abs} : Absorptionswellenlänge, λ_{em} : Emissionswellenlänge, λ_{phos} : Phosphoreszenzwellenlänge, VR: Schwingungsrelaxation, ISC: *Intersystem Crossing*, S: Singulett-Zustand, T: Triplett-Zustand.

Der strahlungslose Übergang zwischen zwei spingleichen Zuständen wird als *Internal Conversion* (IC) bezeichnet und der dazu konkurrierende spinverbotene Übergang zum Triplett-Zustand als *Intersystem Crossing* (ISC). Die *Kasha*-Regel besagt, dass die Emission nur aus dem niedrigsten Schwingungszustand des niedrigsten elektronisch angeregten Zustandes stattfinden kann.^[12] Dadurch kommt es nach Anregung zu einer Schwingungsrelaxation in den untersten Schwingungszustand des angeregten Zustandes und anschließender Emission in einen der Schwingungszustände des elektronischen Grundzustandes. Diese Übergänge führen dazu, dass sich Absorptions- und Emissionsspektrum im Idealfall spiegelbildlich verhalten und die emittierte Energie immer geringer ist als die absorbierte. Diese Differenz wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

Die Quantenausbeute quantifiziert die Fluoreszenz. Diese gibt an, wie viele der absorbierten Photonen zur Fluoreszenz beitragen. Anders formuliert ist es das Verhältnis aus dem strahlenden Prozess zu der Summe aller Relaxationsprozesse. Je näher diese Zahl an 1 ist desto höher ist der Anteil der strahlenden Prozesse am Gesamtrelaxationsprozess.^[5]

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

Φ_F	Quantenausbeute
k_{em}	Geschwindigkeitskonstante der Emission
$\sum k_{nr}$	Geschwindigkeitskonstanten der nichtstrahlenden Prozesse

Neben der Quantenausbeute spielt auch die Fluoreszenzlebenszeit eine wichtige Rolle. Diese lässt sich auch mit den Geschwindigkeitskonstanten der Prozesse beschreiben und ist definiert als die reziproke Summe dieser beiden^[5]:

$$\tau = \frac{1}{k_{em} + \sum k_{nr}} \quad (II)$$

τ	Fluoreszenzlebenszeit
--------	-----------------------

Diese beschreibt die durchschnittliche Zeit, in der sich ein Molekül im ersten angeregten Zustand S_1 befindet, bevor es zur spontanen Emission kommt und es in den Grundzustand zurückkehrt.

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Wie bereits beschrieben, kann ein angeregtes Molekül seine Energie durch IC, Fluoreszenz oder nach ISC durch Phosphoreszenz wieder abgeben. In Anwesenheit von Fluoreszenzlöschern kann jedoch auch ein Energietransfer bzw. Elektronentransfer zum Verlust der Energie führen. Dies kann in Form eines Energieübertrages von einem elektronisch angeregten Donor auf einen Akzeptor im Grundzustand beschrieben werden. Dabei kehrt der Donor in den Grundzustand zurück und der Akzeptor wird in einen höheren angeregten Zustand angehoben, wodurch es zu einer Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit des Donors kommt. Der Akzeptor kann wiederum entweder strahlungslos oder durch Emission in den Grundzustand zurückkehren (siehe Abbildung 5).

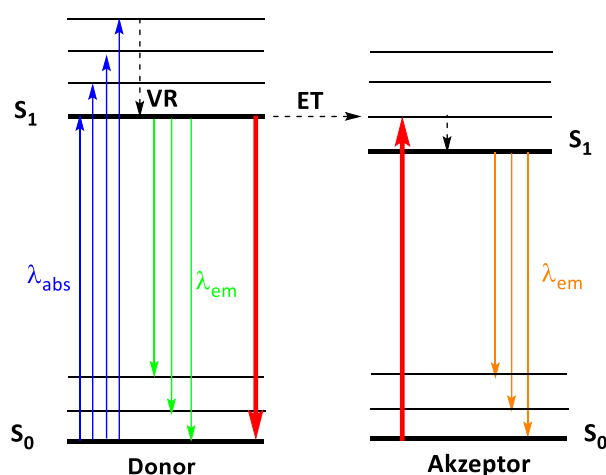


Abbildung 5. Vereinfachte Darstellung des *Jablonski*-Diagrammes zur Veranschaulichung des strahlungslosen Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor.

Prinzipiell kann zwischen zwei verschiedenen Energietransfermechanismen unterschieden werden: dem strahlenden und dem strahlungslosen. Beim strahlenden Energietransfer wird ein emittierendes Photon des Donors vom Akzeptor Molekül reabsorbiert. Der strahlungslose Prozess impliziert dagegen, dass kein zweites Photon in den Energietransfer involviert ist. In diesem Fall findet eine direkte Energieübertragung durch Prozesse wie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen über längere Distanzen (FRET) (1 – 10 nm) zwischen Donor und Akzeptor oder Wechselwirkungen über kurze Distanzen (Dexter-Energietransfer) (< 1 nm) zwischen den Molekülorbitalen durch konzertierten Elektronentransfer statt. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) wird auch nach seinem Entdecker Förster-Resonanz-Energietransfer genannt, der diesen 1948 erstmals beschrieb.^[13] *Styrer* und *Haugland* bestätigten diese theoretische Annahme 1967 bei der Untersuchung fluoreszenzmarkierter Polypropylene.^[14] Die

Geschwindigkeitskonstante dieses Energietransfers kann durch folgende Formel beschrieben werden^[5, 15]:

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

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

k_{FRET}	Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers
τ_{Do}	Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
R_0	Förster Radius (Abstand bei 50 % FRET-Effizienz)
r	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
κ	Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor
Φ_{Do}	Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
n	Brechungsindex des umgebenden Mediums
J	spektrales Überlappungsintegral des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors

Neben der Fluoreszenzlebenszeit und der Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors spielen auch der Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor, der den Winkel zwischen den Dipolmomenten der beiden Chromophore beschreibt, und der Abstand der beiden Chromophore voneinander eine wichtige Rolle. Eine weitere wichtige Größe ist das spektrale Überlappungsintegral zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, das ungleich 0 sein muss.

Die Effizienz des Energietransfers E kann mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:^[16]

$$E = 1 - \frac{I_{\text{Do,FRET}}}{I_{\text{Do}}} = 1 - \frac{\tau_{\text{Do,FRET}}}{\tau_{\text{Do}}} = 1 - \frac{\Phi_{\text{Do,FRET}}}{\Phi_{\text{Do}}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (\text{IV})$$

$I_{\text{Do,FRET}}$	Intensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
I_{Do}	Intensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$\tau_{\text{Do,FRET}}$	Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
τ_{Do}	Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$\Phi_{\text{Do,FRET}}$	Quantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
Φ_{Do}	Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

Diese zeigt, ebenso wie die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers, eine starke Distanzabhängigkeit der beiden Chromophore voneinander auf. Im Vergleich zu den Emissionsintensitäten hat die Berechnung der Effizienz über Fluoreszenzlebenszeiten bzw. Quantenausbeuten den Vorteil, dass diese konzentrationsunabhängig sind.

2.2 Beispiele und Anwendungen der FRET-Technik in der Bioanalytik

2.2.1 Allgemeines

Aufgrund der Empfindlichkeit der FRET-Technik gegenüber der Orientierung und des Abstandes zweier Chromophore zueinander (siehe Kapitel 2.1) kann diese als *in situ* Werkzeug vielseitig zur Charakterisierung verschiedener Prozesse angewendet werden.^[5] So wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl FRET-basierender Peptidsensoren entwickelt, die nach Erkennung eines Target-Moleküls ihre Tertiärstrukturen verändern und somit zwei Chromophore in räumliche Nähe gelangen.^[17] Außerdem kann die Technik zur Strukturaufklärung von Biomolekülen eingesetzt werden.^[6-7] Diese Fähigkeit zeichnet die FRET-Technik als „molekulares Lineal“ aus, da eine hohe Sensitivität im Nanometerbereich vorhanden ist.^[7, 14, 18-19] Dies ermöglicht Abstände und somit Strukturveränderungen in beispielsweise DNA-Origami^[20] und molekularen Sonden^[21] zu bestimmen. Auch die Echtzeitspektroskopie dynamischer Vorgänge *in vivo* wird somit ermöglicht.^[22] Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Verwendung umgebungssensitiver Fluorophore, welche mit einer Änderung ihrer Absorptions- und Emissionseigenschaften auf ein sich veränderndes äußeres Umfeld reagieren.^[23] Die am häufigsten verwendete Sonde zur Messung von z.B. intrazellulären pH-Werten ist ein polares BCECF (2',7'-Bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxy-Fluorescein) Derivat von Tsien *et al.*^[24]

Zur Visualisierung biologischer Vorgänge in der Zelle ist die Verwendung verschiedener Fluorophore sowie deren Anknüpfung an Nukleinsäuren von großer Bedeutung.^[25-26] Besondere Aufmerksamkeit erhält dabei die zelluläre Aufnahme von DNA und RNA und deren anschließender Abbau. Des Weiteren ermöglicht sie die Funktionalität einer spezifischen Sequenz zu verfolgen. Dafür werden jedoch häufig einfach markierte Fluoreszenzsonden verwendet bzw. die Kombination von einem Farbstoff mit einem Fluoreszenzlöcher, deren Auslesung aufgrund von Autofluoreszenz der Zellbestandteile und unspezifischer Bindungen zu falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen führen können. Die sogenannten „light-up“-Sonden, die häufig für In-vivo-Bildgebung verwendet werden, reagieren durch eine starke Erhöhung ihrer Fluoreszenzintensität auf Hybridisierung bzw. Zielmolekülerkennung.^[27-28] Aufgrund der oben genannten Nachteile kann auch auf funktionalisierte Nukleinsäuren umgestiegen werden, deren Auslesung auf mehreren Wellenlängen beruht, worauf im nächsten Kapitel genauer eingegangen wird.

2.2.2 Wellenlängenverschiebende DNA/RNA-Sonden

Die falsche Interpretation von Ergebnissen aufgrund unspezifischer Fluoreszenz kann in den wellenlängenverschiebenden DNA-Sonden umgangen werden. Dabei werden Sonden verwendet, deren Verschiebung mittels FRET stattfindet.^[6, 29] Prinzip dieser ist, dass die Kombination von zwei oder mehr Farbstoffen zu einem Farbwechsel während der Detektion führt, wodurch Vorgänge in der Zelle genauer beschrieben werden können. Ein Beispiel hierfür sind die wellenlängenverschiebenden Molecular Beacons, von denen erstmals 2000 von *Tyagi* und *Kramer* berichtet wurde (siehe Abbildung 6).^[30]

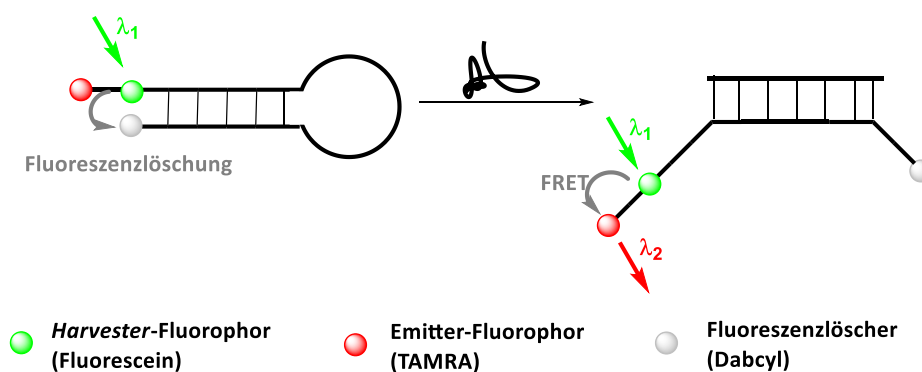
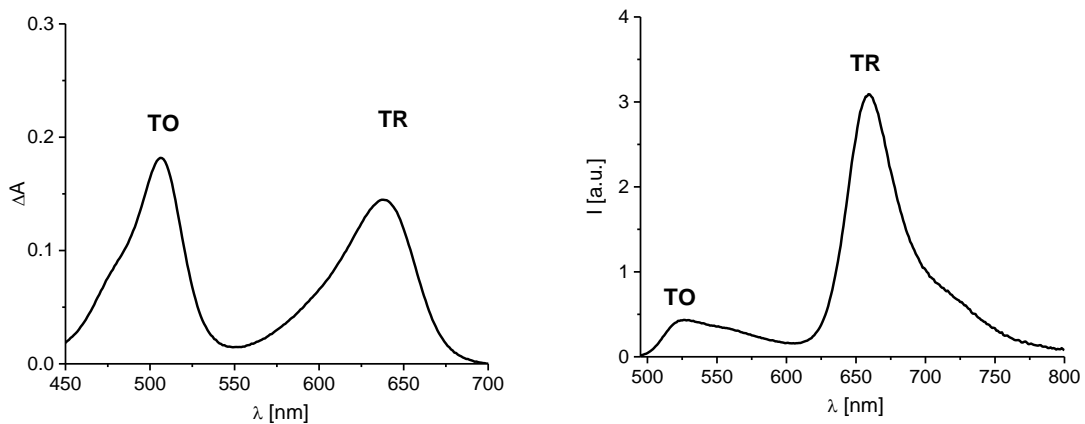


Abbildung 6. Konzept der wellenlängenverschiebenden Molecular Beacons (MBs) von *Tyagi* und *Kramer*.

Diese weisen in der Haarnadelstruktur (siehe Abbildung 6 links) bei Einstrahlung mit einer geeigneten Wellenlänge keine Fluoreszenz auf, da die eingestrahelte Energie auf den Fluoreszenzlöcher übertragen und somit strahlungslos abgegeben wird. Nach Zugabe der passenden Zielsequenz verändert sich die Struktur durch die Bindung dieser, sodass die beiden Farbstoffe außer Reichweite des Fluoreszenzlöschers liegen, eine Energieübertragung vom Fluorescein auf den Emitter stattfinden kann und Licht längerer Wellenlänge emittiert wird. Die Verwendung von Fluorophoren, die im längerwelligen Bereich (>450 nm) absorbieren und emittieren führt zu weniger Autofluoreszenz und damit zu einer höheren Sensitivität und verlässlicheren Ergebnissen. Nachteilig ist jedoch, dass die Auslesung weiterhin auf einer Emitterwellenlänge beruht. *Tan et al.* entwickelten daher die Molecular Beacons weiter.^[31] Er modifizierte diese mit einem Fluorescein-Coumarin-Paar, wodurch bei der Ausbildung der Haarnadelstruktur eine Energieübertragung des Fluoresceins auf das Emittermolekül Coumarin stattfinden kann und somit dieses emittiert. Bei Erkennung der Zielsequenz wird die Haarnadelstruktur geöffnet und es findet keine Energieübertragung mehr statt, sondern eine Emission des Fluoresceins. Somit beruht die Detektion sowohl auf der Emissionszunahme des

einen Fluorophors als auch auf der Abnahme bzw. Zunahme des Anderen. Dies führt zu einer erleichterten Handhabung und einer geringeren Wahrscheinlichkeit einer Fehlinterpretation. Weitere Beispiele für die Verwendung von Molecular Beacons in der Bioanalytik sind solche, die auf Excimere bzw. excimerartiger Fluoreszenz^[32-37] beruhen oder photoaktivierbar sind.^[38]

a)



b)

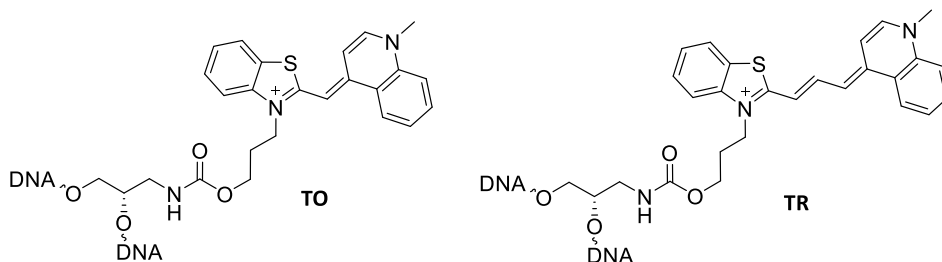


Abbildung 7. Strukturen (b), Absorption und Fluoreszenz (a) der beiden als „Traffic Lights“ bekannten Farbstoffe Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR).

Um die Eigenfluoreszenz einiger Zellbestandteile zu umgehen, ist es von Vorteil, wenn die verwendeten Farbstoffe mit Wellenlängen größer 400 nm angeregt werden können. Ein bekanntes Beispiel von wellenlängenverschiebenden DNA/RNA-Sonden sind diejenigen, die Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR) als Energietransfer-Paar enthalten und als „DNA/RNA Traffic Lights“ publiziert wurden.^[10, 39-42] Neben einem Absorptionsmaximum bei 490 nm haben sie zusätzlich den Vorteil einer großen Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge, wodurch die Hintergrundfluoreszenz der Zelle vermieden und Anregungslicht besser herausgefiltert werden kann (siehe Abbildung 7a).^[43]

Der kovalente Einbau der beiden Farbstoffe wurde auf zwei verschiedene Arten verwirklicht. Zum einen wurden beide mit einem azyklischen (S)-2-Amino-1,3-propandiol-Linker (siehe

Abbildung 7b) versehen und so als Basensurrogat in DNA bzw. RNA eingebaut und zum anderen die Oligonukleotide mittels der von *Huisgen* publizierten kupfer(I)-katalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) modifiziert (siehe Abbildung 9). Aufgrund des fehlenden Zuckergerüsts im ersten Fall soll den beiden Farbstoffen eine Interkalation ermöglicht werden. Durch die Fähigkeit der beiden Chromophorgerüste, π - π -Wechselwirkungen Grundzustands-Dimere auszubilden, wird eine Destabilisierung durch die fehlenden Basenpaare fast ausgeglichen (es findet im Vergleich zu einem natürlichen A-T-Paar nur eine Destabilisierung um 2 °C statt). Die Einflüsse von Orientierung, Umgebung und Abstand der beiden Fluorophor-Basensurrogate zueinander wurde durch *Wagenknecht et al.* untersucht.^[40-41, 43-44] Die Anwendung **TO**-modifizierter Fluoreszenzsonden im zweiten Fall ist stark eingeschränkt, da die Intensitätsverhältnisse nicht eindeutig sind.^[45-46]

Der bioanalytische Anwendungsbereich der mit Farbstoffbasensurrogaten modifizierten Sonden ist sehr breit. Sie wurden zur Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen in die Stammregion von Molecular Beacons eingebettet, wodurch der Verstärkungsfaktor f im Vergleich zu einem Fluorescein/Rhodamin-Paar drastisch verbessert werden konnte.^[41, 47-48]

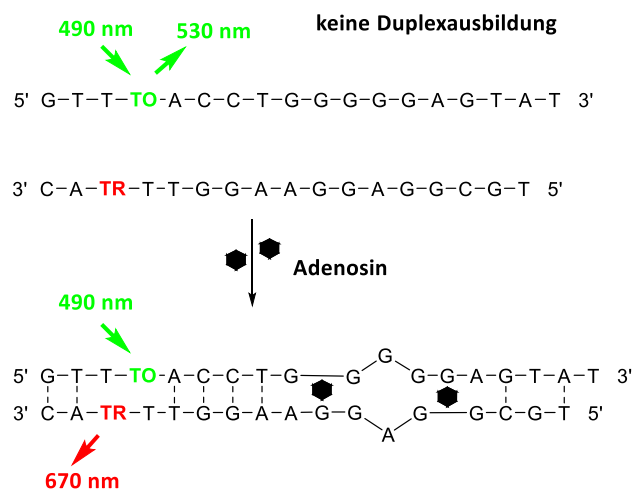


Abbildung 8. Funktionsprinzip des wellenlängenverschiebenden Aptasensors von *Wagenknecht et al.*

Außerdem wurden sie in adenosinbindende Aptamere integriert, deren Sequenz von einer 27 nt langen DNA-Sequenz abgeleitet ist, die 1995 von *Huizenga* und *Szostak* für die Zielmoleküle Adenosin und ATP selektiert wurde^[49] und 1997 von *Patel et al.* NMR-spektroskopisch untersucht wurde.^[50] Dabei wurden zwei nur teilweise komplementäre Einzelstränge mit jeweils einem der Farbstoffe modifiziert, die nach Zugabe des Zielmoleküls

Adenosin einen Duplex ausbilden können, wodurch die beiden Fluorophore in räumliche Nähe zueinander kommen und einen Energietransfer eingehen (siehe Abbildung 8).^[40]

Die Übertragung des Konzeptes auf RNA führte zu den „*RNA Traffic Lights*“.^[39, 42] Die beiden Farbstoffe wurden dabei als Basensurrogate in sogenannte *small interfering RNA* (siRNA) eingebracht. Dabei handelt es sich um 21-23 nt lange RNA-Duplexe, die aus einem *Sense* und einem *Antisense*-Strang bestehen. Der *Antisense*-Strang ist komplementär zu einer spezifischen mRNA und kann diese binden. Dadurch kann deren Funktion unterbunden werden, wodurch das darauf kodierte Protein nicht mehr exprimiert werden kann.^[51-52] Die in diesem Fall verwendete siRNA hat die Fähigkeit, das grün fluoreszierende Protein (GFP) zu regulieren. Dafür wurden die Duplexe in CHO-K1-Zellen transfiziert und anschließend deren Verhalten sowie Fähigkeit als GFP-Regulator mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet.^[39]

Um Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung innerhalb von Zellen beobachten zu können, ist die molekulare Bildgebung mittels Fluoreszenzmikroskopie von immenser Bedeutung.^[53] Neue hochauflösende Methoden wie PALM^[54] und STED^[55] helfen dabei Zellprozesse aufzuklären. Ein Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass helle und photostabile Farbstoffe benötigt werden, die den Anforderungen entsprechen. Ein Nachteil der in diesem Kapitel beschriebenen Farbstoffe **TO** und **TR** ist deren geringe Fluoreszenz-Halbwertszeit (**TO**: 32 min, **TR**: 7 min) und der damit verbundenen geringen Photostabilität. Diese wurden mit einer 75 W Xenonlampe mit Wellenlängen >305 nm belichtet, um die direkte Anregung der DNA zu vermeiden, und anhand der Abnahme der Emissionsintensität in Anwesenheit eines DNA-Doppelstranges quantifiziert.^[45]

Die Gruppe um *Wagenknecht* hat sich aus der daraus resultierenden Problematik bei der Echtzeit-Verfolgung mit der Entwicklung neuer photostabiler Farbstoffe beschäftigt.^[45, 56] Die dabei entwickelten Cyanin-Farbstoffe besitzen Fluoreszenz-Halbwertszeiten zwischen 11 und 636 Minuten und wurden bereits in bioanalytischen Systemen untersucht.^[9] Das in dieser Arbeit verwendete Energietransfer-Paar (siehe Abbildung 9) wurde bereits postsynthetisch in DNA und RNA eingebracht und optisch sowie bioanalytisch charakterisiert.^[9-10, 57-59] Bei diesem Farbstoffpaar handelt es sich um ein effizientes Energietransfer-Paar, welches in DNA auf seine optischen Eigenschaften hin untersucht wurde.^[59] Dabei wurden sowohl der arabino-konfigurierte (**cAraU**) sowie ribo-konfigurierte (**cU**) Uridin-Baustein untersucht und ebenso deren Kombinationen.

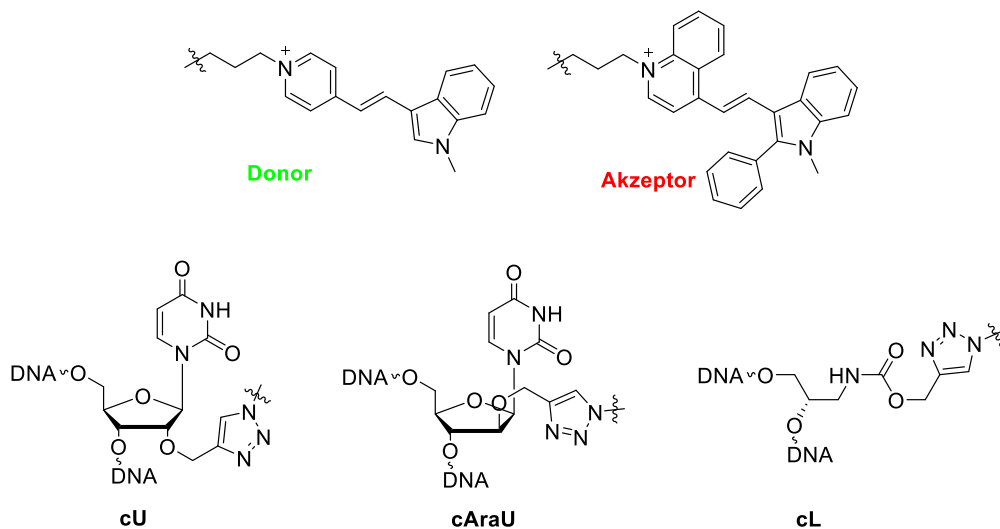


Abbildung 9. Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sowie der bisherigen postsynthetischen Verknüpfung an Oligonukleotiden.^[10]

Dabei wies die Kombination von zwei Ribose-Bausteinen den effizientesten Farbkontrast (1:60) sowie die höchste Fluoreszenzquantenausbeute (31.2 %) auf. Die Übertragung des Konzeptes auf RNA zeigte jedoch, dass durch die andersartige Helixstruktur die beiden Farbstoffe bei postsynthetischer Anknüpfung an Ribose-Bausteinen eine sehr geringe Distanz aufweisen und daher eine starke Fluoreszenzlöschung stattfindet. Durch die Modifizierung von arabino-konfigurierten Bausteinen lässt sich die Einschränkung der Farbstoffe jedoch umgehen und durch flexible Bewegung optimal anordnen. Diese Aussage konnte durch molekulardynamische Simulationen bestätigt werden (siehe Abbildung 10 links). Diese zeigen, dass bei der ribo-Konfiguration eine relativ starre π -stapelnde Orientierung mit einer geringen Distanz der beiden Farbstoffe vorliegt, wodurch Grundzustandswechselwirkungen den Energietransfer stören. Bei der arabino-Konfiguration findet eine große Umstrukturierung über wenige hundert Nanosekunden statt, woraus eine signifikant größere mittlere Distanz resultiert, die die Anregung eines nicht gestapelten Donors und den Energietransfer auf einen nicht gestapelten sowie nicht angeregten Akzeptor erlauben. Die Unterschiede lassen sich auch dadurch erklären, dass die ribo-konfigurierten Bausteine die Farbstoffe in die kleine Furche dirigieren, die im Falle der RNA breit aber flach ist. Im Falle der arabino-konfigurierten Bausteine werden die beiden Farbstoffe in die große Furche gelenkt, die im Falle der RNA eng und tief ist und somit den Farbstoffen eine bessere Umgebung zur optimalen Ausrichtung liefert.^[10] Die Transfektion der beiden RNA-Duplexe in HeLa-Zellen konnte erfolgreich

durchgeführt werden und zeigt dieselben optischen Eigenschaften, die auch aus den Fluoreszenzspektren *in vitro* ersichtlich sind.

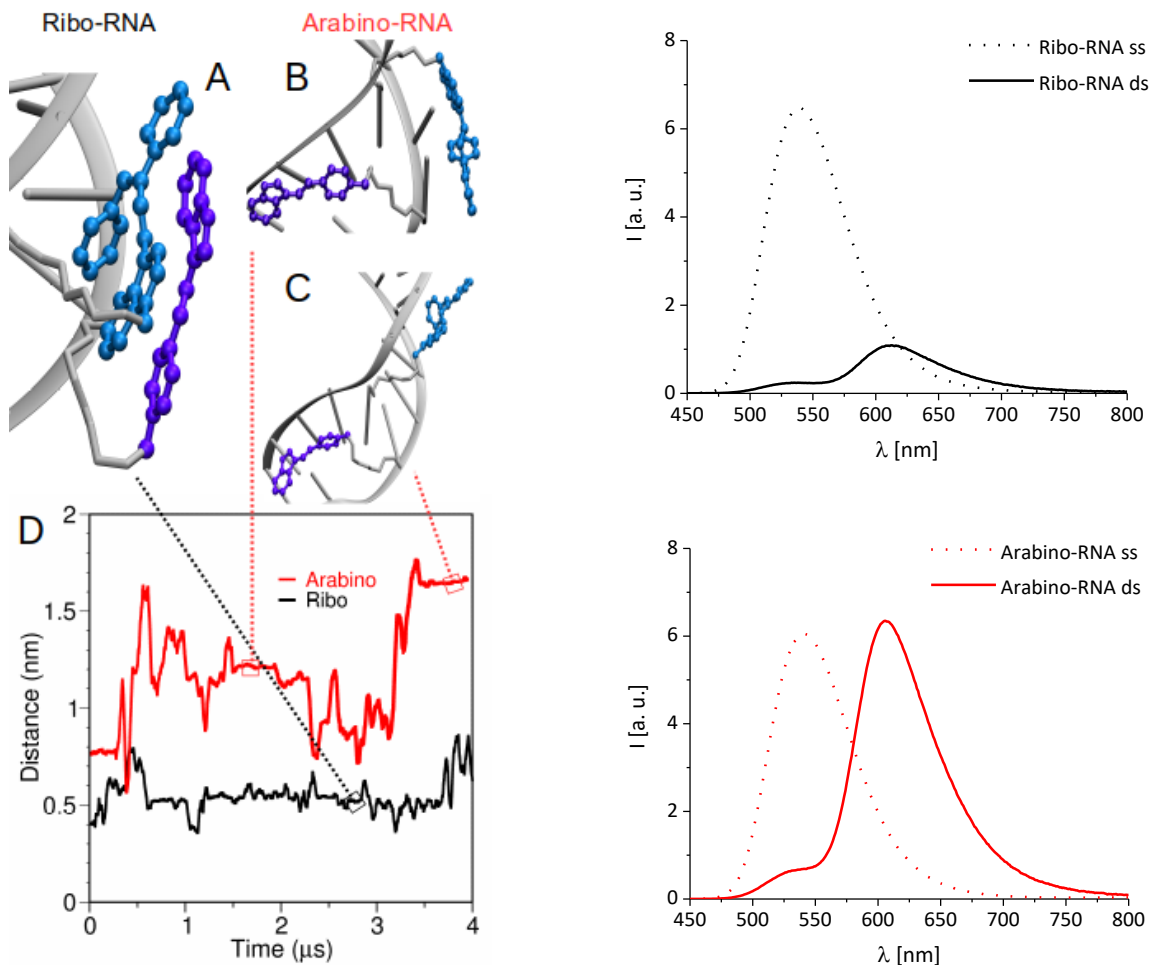


Abbildung 10. MD-Simulationen der Orientierungen der Farbstoffe zueinander in den ribo- und arabino-konfigurierten RNA-Duplexen (links).^[60] Fluoreszenz der donormodifizierten RNA-Einzelstränge und mit dem Energietransferpaar modifizierten RNA-Duplexe (rechts).

Eine weitere bioanalytische Anwendung ist die Verwendung dieser beiden sowie zweier zusätzlicher Farbstoffe in zwei Molecular Beacons, wodurch eine 2 mal 2 Farben-Auslesung möglich ist. Diese Auslesung ermöglicht eine gleichzeitige sensitive Detektion von zwei unterschiedlichen RNA-Sequenzen (miRNA-21 und miRNA-31), was *in vivo* in Krebszellen nachgewiesen werden konnte.^[57] Bei diesen beiden RNA-Sequenzen handelt es sich um kurze nichtkodierende Sequenzen, die in kolorektalen Karzinomen über exprimiert werden und somit ein großes Interesse in der simultanen sensitiven Detektion dieser liegt.^[61]

Wie bereits zuvor **TO** und **TR** wurden auch die beiden oben beschriebenen photostabilen Fluorophore in Adenosin-sensitive Aptamere integriert und deren Verhalten spektroskopisch

untersucht.^[58] Bei den dabei untersuchten Anknüpfungen handelte es sich um den ribokonfigurierten (**cU**) Baustein und einen azyklischen Linker (**cL**) (siehe Abbildung 9). Die Sequenzen der untersuchten Split-Aptamere wurden ebenfalls von denen von *Huizenga* und *Szostak* Selektierten abgeleitet.^[49] Die Charakterisierung umfasste sowohl verschiedene Orientierungen der Farbstoffe und Linker zueinander als auch die Verlängerung der Stammregion. Die optische Charakterisierung zeigte, dass eine Verlängerung der Stammregion eine Erhöhung der Schmelztemperatur bewirkt. Dadurch konnten ebenso die Intensitätsverhältnisse und Verstärkungsfaktoren (Quotienten aus dem Intensitätsverhältnis mit dem Zielmolekül und dem ohne Zielmolekül) auf 7.7 bzw. 12.7 gesteigert werden. Eines der charakterisierten Split-Aptamere wurde ebenfalls in DNA-Origami-Zangen integriert, wobei die Zugabe von ATP zum erfolgreichen Schließen der Aptamere und somit der DNA-Origami-Zangen führt.^[62]

2.3 Glucosedetektion mittels Boronsäure-Modifikation

Die Entwicklung von Konzepten zur selektiven Detektion und Bindung von Zielmolekülen durch speziell entwickelte Rezeptoren ist von enormer Wichtigkeit.^[63] *Shinkai et al.* hat sich neben anderen Arbeitsgruppen^[64-67] bereits vor mehr als 20 Jahren mit der Wechselwirkung von Boronsäuren mit Diolen beschäftigt.^[68-76] Diese sind dafür bekannt, dass sie die Fähigkeit besitzen, 1,2- und 1,3-Diole reversibel zu binden,^[77-79] wie sie in Kohlenhydraten vorkommen. Erstmals beschäftigte sich 1954 *Kuivila et al.*^[80] genauer mit aromatischen Boronsäuren und bereits 1959 wurden die ersten quantitativen Untersuchungen der gebildeten Boronsäure-Zucker-Komplexe veröffentlicht.^[81] Der selektive Nachweis von Kohlenhydraten in wässrigen Lösungen ist von enormer Wichtigkeit, da sie im Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielen und die Bestimmung der Konzentration in medizinischen Vorgängen von Vorteil wäre.^[75] Viele Krankheiten, wie beispielsweise Diabetes^[82-83] und Krebserkrankungen,^[84-86] werden mit dem Glucose-Transport im Körper in Zusammenhang gebracht, wodurch besonders die Erkennung von D-Glucose unerlässlich ist.^[67, 87]

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl verschiedener, auf Boronsäuren basierender Sensoren zur Sacchariddetektion entwickelt,^[63, 78] wobei im Rahmen dieses Kapitels nur auf fluoreszenzbasierte Sensoren eingegangen wird und auf solche, die in Oligonukleotide eingebracht wurden.

2.3.1 Fluoreszenzbasierte Saccharidsonden

Zur Visualisierung verschiedener Vorgänge ist es, wie schon in Kapitel 2.2 beschrieben, von Nutzen, Oligonukleotide oder auch Sensoren mit Fluoreszenzsonden zu markieren. Die Markierung kann dabei, wie bereits beschrieben, auf einem Fluorophor beruhen oder auch, durch die Verwendung eines Donor-Akzeptor-Paares, auf einer Zwei-Farben-Auslesung, wodurch eine falsche Interpretation der Ergebnisse vermieden werden kann. Die ersten Fluoreszenzsensoren zur Detektion von Sacchariden wurden von *Czarnik et al.* 1992 publiziert.^[64] Diese bestehen aus einem Anthracengerüst, an dem an der 2- bzw. 9-Position eine Boronsäure geknüpft wurde (siehe Abbildung 11, **BA1** und **BA2**). Dies induzierte eine Löschung der Fluoreszenz um 30 % im Falle der 2-Anthrylboronsäure bei der Ausbildung des Fructose-Boronsäure-Esters. Für die Anknüpfung in 9-Position fällt diese geringer aus. *Aoyama*

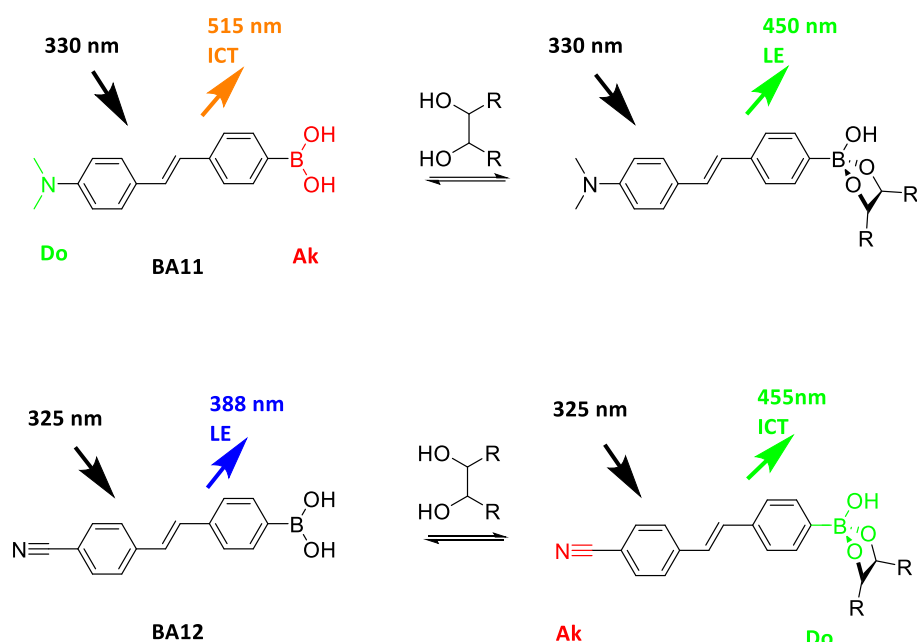


Abbildung 12. Die Unterbrechung des internen Charge-Transfer-Überganges durch die Veränderung des Hybridisierungsstatus des Bors von sp^2 zu sp^3 .

Wang *et al.* zeigte mit einem simplen Naphthalinsystem einen 41-fachen Anstieg der Fluoreszenz durch Zugabe von 50 mM Fructose.^[94] Alle Untersuchungen der vorgestellten Sensoren haben auch gezeigt, dass die Diol-Boronsäure-Komplexbildung stark pH-abhängig ist.^[63] Die bisher gezeigten Sensoren beruhen auf dem Prinzip des internen Charge-Transfer-Überganges, weitere im Anschluss gezeigte Beispiele dagegen auf dem Prinzip des photoinduzierten Elektrontransfers.^[63]

Bei den Systemen, die auf diesem Prinzip beruhen, handelt es sich häufig um ein Fluorophor, welches durch einen Abstandshalter, der ein tertiäres Amin enthält, vom boronsäuremodifizierten Teil getrennt ist (siehe Abbildung 13). Wulff *et al.* regte als erstes die Diskussion über positive Effekte dieses proximal gelegenenamins an, da beobachtet wurde, dass die Bindung bei neutralem pH-Wert stattfinden kann.^[65] Ein weiterer Effekt bezieht sich auf die Verkleinerung des O-B-O-Winkels bei Komplexbildung und der damit verbundenen Erhöhung der Azidität. Diese Zunahme führt zu einer Verstärkung der N-B-Bindung und stört dadurch den photoinduzierten Elektronentransfer. Der erste fluoreszente, auf diesem System basierende Sensor wurde von Shinkai *et al.* 1994 publiziert.^[95-96]

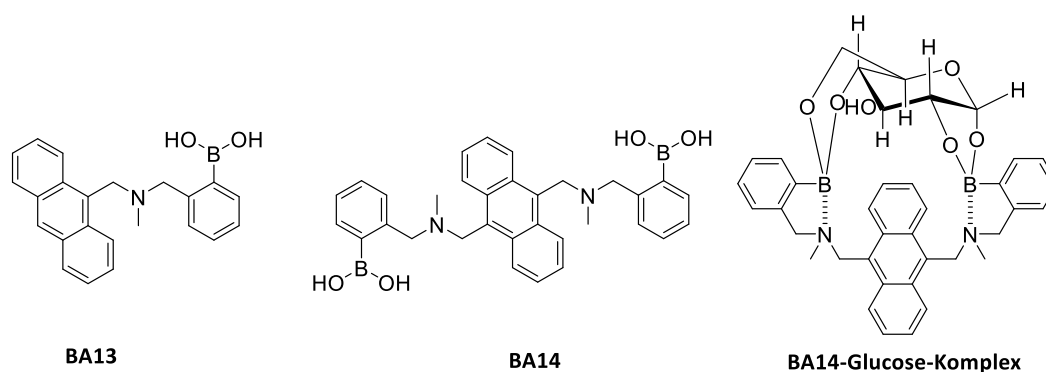


Abbildung 13. Sensoren die auf dem photoinduzierten Elektronentransfer beruhen (**BA13** und **BA14**) und die Struktur des ausgebildeten Komplexes von **BA14** mit D-Glucose.

BA13 zeigt einen starken Fluoreszenzanstieg bei Saccharidzugabe und kann in einem weiten pH-Bereich verwendet werden. Die Bindungskonstanten nehmen, wie schon bei der 35 Jahre früher von *Edwards* und *Lorand* entwickelten Phenylboronsäure, von D-Glucose nach D-Fructose zu.^[81] Die Weiterentwicklung von **BA13** führte zu einem Sensor **BA14**, welcher zwei Boronsäurefunktionalitäten besitzt, aufgrund derer eine erhöhte Selektivität gegenüber D-Glucose auftritt (**BA14-Glucose-Komplex**).^[72, 97-100]

Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, kann eine Donor-Akzeptor-Wechselwirkung auch auf einen Energietransfer des Donors auf den Akzeptor beruhen. *James et al.* machte sich dies zu Nutzen und publizierte 2002 erstmals einen Sensor, der mit zwei Boronsäuren modifiziert ist und ein Energietransfer-Paar enthält (siehe Abbildung 14).^[101]

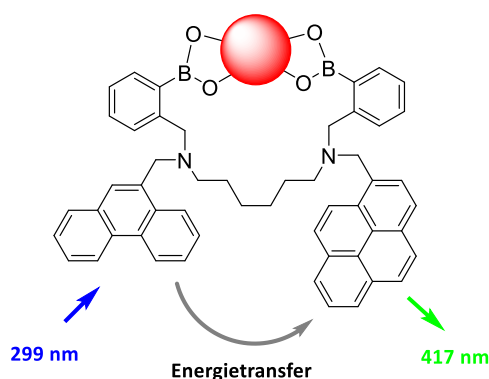


Abbildung 14. Struktur des von *James et al.* Entwickelten, auf Energietransfer beruhenden Sensors.

Die beiden Fluorophore Phenanthren und Pyren sind dabei durch einen Hexamethyl linker getrennt und enthalten, wie auch die auf dem photoinduzierten Elektronentransfer beruhenden Systeme, zwei proximale tertiäre Amine. Bei Anregung des Systems im Maximum des Donors Phenanthren kommt es durch Zugabe von D-Glucose zu einem Anstieg der

Akzeptoremission bei 417 nm, wobei keine Emission von Phenanthren zu beobachten ist. Außerdem kommt es durch Zugabe zu einer Abnahme der Excimer-Fluoreszenz von Phenanthren und Pyren, welches auf eine Störung der π - π -Wechselwirkungen der beiden durch Strukturänderung hinweist.

Um die entwickelten Sensoren in Anwendungen^[102-103] zu testen, ist es unabdingbar, dass diese in Polymere^[104-105], Proteine^[71, 79, 106], Nanopartikel^[85] oder auch Oligonukleotide eingebracht werden. Auf die Einbringung der Sensoren in Oligonukleotide wird im Folgenden genauer eingegangen.

2.3.2 Sensoren in Oligonukleotiden

Bereits 1996 wurde die erste Verwendung von Boronsäuren in Oligonukleotiden von *Shinkai et al.* beschrieben.^[69] Sie synthetisierten zwei boronsäuremodifizierte Porphyrine (**P-BA1** und **P-BA2**, siehe Abbildung 15), welche eine Selektivität gegenüber D-Glucose und D-Xylose aufweisen, die mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte.^[74] Positiv geladene Porphyrine sind dafür bekannt, dass sie mit DNA wechselwirken. Diese Tatsache wird in diesem Konzept ausgenutzt, da davon ausgegangen wird, dass bei einem pH-Wert bei dem zwei der vier Boronsäuren dissoziiert sind, solch eine positive Gesamtladung vorhanden ist, dass eine Bindung mit der negativ geladenen DNA stattfindet.

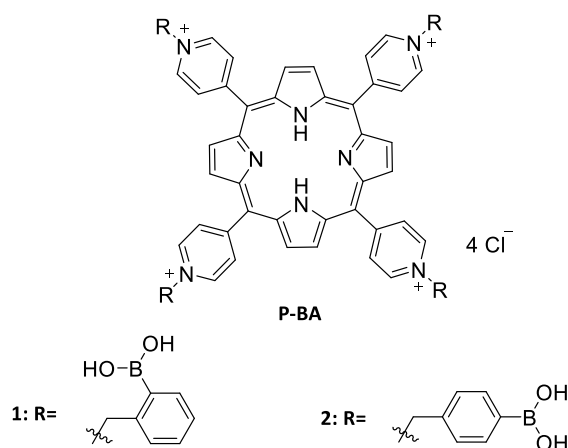


Abbildung 15. Die von *Shinkai et al.* synthetisierten boronsäurefunktionalisierten Porphyrine.

Die Zugabe von Zuckern vereinfacht die Dissoziation der restlichen zwei Boronsäuren, wodurch das Porphyrin neutral ist und keine Wechselwirkung stattfindet. Bei der Verwendung GC-reicher Oligonukleotide ist bekannt, dass Porphyrine interkalieren, wohingegen bei

AT-reichen eine Bindung an die Helix stattfindet. Somit interkalieren bei GC-reichen Oligonukleotiden die Porphyrine in Abwesenheit von Sacchariden. Bei Zugabe von D-Fructose wurde festgestellt, dass eine effiziente Dekomplexierung stattfindet, der Porphyrin-Fructose-Komplex aus der Helix austritt und eine Blauverschiebung der Absorption um 6 nm stattfindet. Bei Zugabe von D-Glucose findet die Dekomplexierung in zwei Schritten statt. Zwei Porphyrine werden durch D-Glucose verbunden und treten anschließend aus der Helix aus, was durch eine Blauverschiebung um 20 nm begleitet ist. Somit ist es mit diesem Konzept möglich, DNA-Bindungseigenschaften durch An- und Abwesenheit von Zuckern zu kontrollieren.

Die kovalente Einbringung von Boronsäuren in Oligonukleotide wurde erstmals 2007 von Wang *et al.* verwirklicht. Sie führten die Funktionalität enzymkatalysiert in Form eines modifizierten Triphosphat-Bausteines (siehe Abbildung 16, **BA-TP1**) ein.^[107] 2008 führten sie ein SELEX-Verfahren (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) durch, um eine gezielte Auswahl an boronsäurefunktionalisierten Aptamersequenzen zu erhalten, die in der Lage sind, Glykoproteine zu binden. Interessant dabei ist, dass die gefundenen Sequenzen keine Übereinstimmungen aufweisen, was darauf hindeutet, dass aufgrund der Größe des Glykoproteins an verschiedenen spezifischen Positionen gebunden wird.^[108]

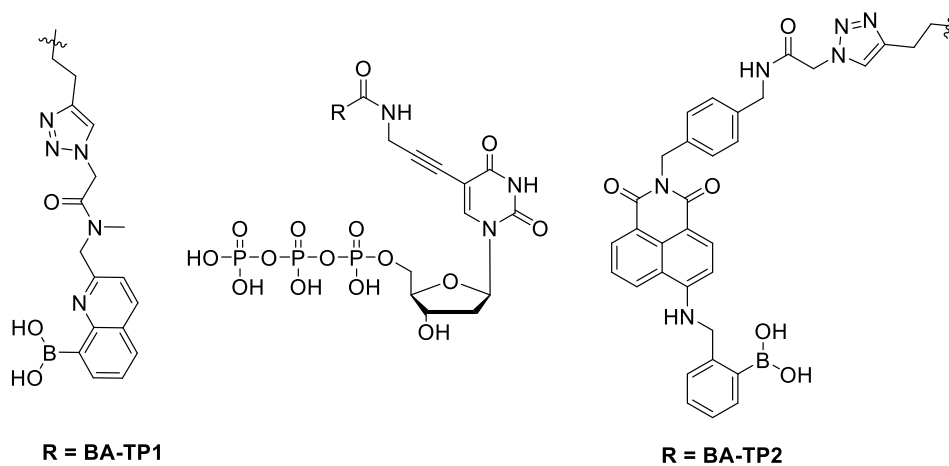


Abbildung 16. Die von Wang *et al.* synthetisierten Triphosphate.

Um einen fluoreszenten boronsäuremodifizierten Sensor zu erhalten, entwickelte die Gruppe um Wang das bereits zuvor beschriebene Triphosphat weiter (siehe Abbildung 16, **BA-TP2**). Dieses zeigt einen Anstieg der Emissionsintensität nach Zugabe von D-Fructose, sowohl als Triphosphat, wie auch kovalent an DNA gebunden.^[109] Ein Nachteil der enzymatischen DNA-Synthese ist die geringe synthetisierbare Menge sowie die ortsspezifische Einbringung in die

Sequenz. Daher wurde ein difluoriertes Cyclooctinphosphoramidit entwickelt, in DNA eingebracht und diese mit dem entsprechenden Boronsäureazid mittels SPAAC postsynthetisch funktionalisiert (siehe Abbildung 17).

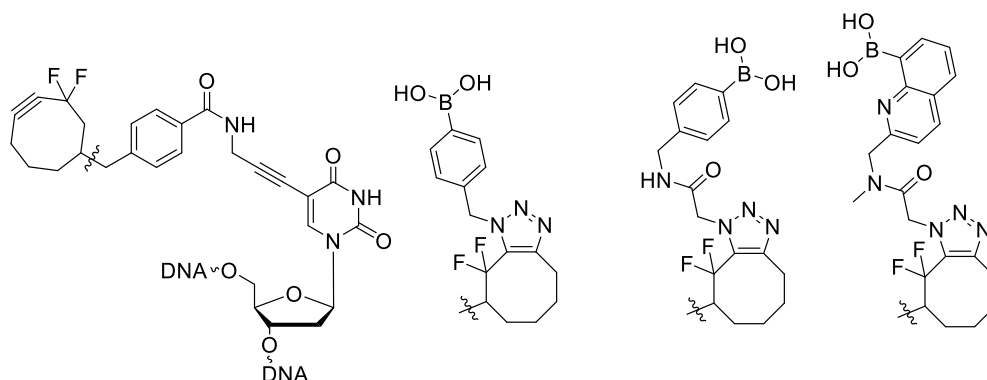


Abbildung 17. Die von Wang untersuchten kupferfreien Methoden.

Die erfolgreiche Synthese konnte mittels Oxidation der Boronsäurefunktionalität zum Phenol mit H_2O_2 auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden.^[110]

Die von Wang synthetisierten und in DNA inkorporierten Boronsäuremodifikationen haben einige Nachteile. Neben der geringen Verfügbarkeit durch den enzymatischen Einbau können sterisch anspruchsvolle Linker die Struktur und daher die Bindungseigenschaften bzw. Erkennung negativ beeinflussen. Ein ebenfalls postsynthetischer Ansatz wurde von Sessler *et al.* gewählt. Sie modifizierten endständig aminmodifizierte DNA mittels einer Amidkupplung mit der gewünschten Boronsäure.^[111] Diese zeigten, dass eine Detektion von Sacchariden möglich ist, dafür jedoch mehrere Erkennungsseiten benötigt werden. Nachteilig ist in diesem Fall jedoch die Einschränkung auf eine endständige Modifizierung.

2.4 Kovalente Modifikationen an Nukleinsäuren

Die sequenzspezifische Modifizierung von Oligonukleotiden ist von immenser Bedeutung für bioanalytische und diagnostische Verfahren und kann durch verschiedene Methoden verwirklicht werden.^[112-113] Zur kovalenten Anknüpfung können die modifizierten Bausteine entweder als Phosphoramidite während der Festphasensynthese oder postsynthetisch durch Kopplung an ein modifiziertes Nucleosid in die Nucleinsäure eingebracht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe wurden zum einen über einen (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker^[114-115] kovalent während der Festphasensynthese an DNA und RNA geknüpft und andererseits auch mittels CuAAC an acetylenfunktionalisierten Uridin eingeführt. Auf beide Methoden wird in diesem Kapitel genauer eingegangen.

2.4.1 Präsynthetische Modifikationen

Die kovalente Anknüpfung der beiden Farbstoffe während der Festphasensynthese erfolgte mit einem bekannten azyklischen Linker (siehe Abbildung 18). Dieser ist positiv geladene Fluorophore weitaus stabiler als die übliche Ribose-Einheit, da die Hydrolyse der glykosidischen Bindung vermieden wird.^[41, 116-117]

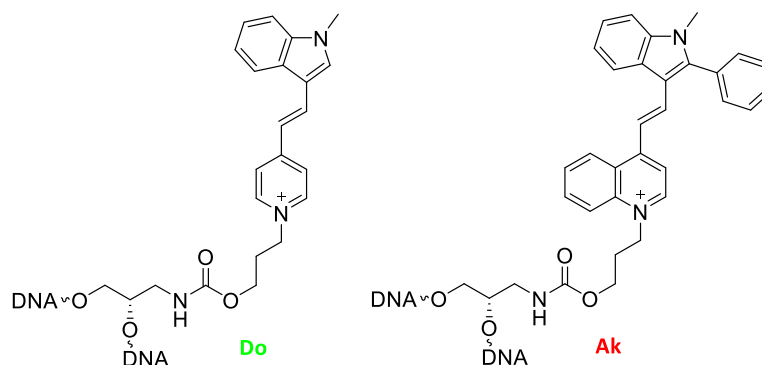


Abbildung 18. Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffbasenanaloga.

Die Fluorophore können nach erfolgter Phosphoramiditsynthese mittels automatisierter Festphasensynthese in DNA bzw. RNA integriert werden.

Azyklische Linker haben außerdem den Vorteil, dass sie stabil gegenüber den Bedingungen der Festphasensynthese sind, keine Trennung der beiden Anomere nötig ist und die Interkalation der Fluorophore in den Basenstapel durch erhöhte Flexibilität ermöglicht wird.

Ein weiteres Beispiel für einen azyklischen Linker sind die von *Megger et al.* verwendeten Glykollinker, die zur Synthese von GNA (*Glycol nucleic acid*) verwendet wurden.^[118] Die komplette Substitution des Ribose-Rückgrates durch Glykollinker bewirkt dabei höhere Schmelztemperaturen der Analoga, beeinflussen jedoch nicht die Watson-Crick-Paarung.^[118-120] *Pedersen et al.* verwendete *twisted intercalating nucleic acids* (TINA)^[121] und *Asanuma et al.* untersuchte sowohl azyklische *threolinol* sowie auch *serinol nucleic acids* (aTNA und SNA)^[122] (siehe Abbildung 19).

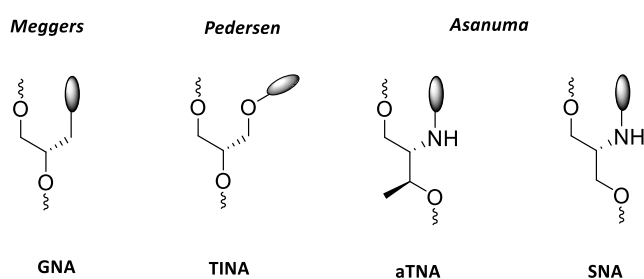


Abbildung 19. Verschiedene azyklische Linker, die zur automatisierten Festphasensynthese befähigt sind.

Im Gegensatz zu aTNA und GNA besitzt SNA die Fähigkeit, sowohl mit DNA als auch mit RNA stabile Duplexe auszubilden.^[122] Außerdem erkennt SNA die komplementäre Sequenz in einer antiparallelen Weise mit einer bemerkenswerten thermischen Stabilität.

Die bereits beschriebenen Bausteine können ebenfalls als Basenersatz in DNA bzw. RNA eingebracht werden. Als besonders gut geeignet hat sich dabei der azyklische (S)-3-Amino-1,2-propandiol Linker herausgestellt, der unter anderem für die ortsgenaue Integrierung von **TO** und **TR** in DNA und RNA verwendet wurde, wodurch hervorragende optische Eigenschaften erzielt werden konnten.^[39-43]

Der erfolgreiche Einbau modifizierter Bausteine hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen ist es nötig, dass ein stabiles Phosphoramidit verwendet wird, welches weder durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung noch durch Nebenreaktionen der Funktionalitäten abgebaut werden kann und daher resistent gegenüber den verwendeten Chemikalien, wie dem *Oxidizer* und *Activator*, ist. Je nach Empfindlichkeit des Bausteins gegenüber Nukleophilen, kann auch mit mildereren Methoden aufgearbeitet werden. Die dafür verwendeten Nukleoside sind mit weitaus weniger stabilen Schutzgruppen ausgestattet, wodurch die Entschützung und Abspaltung von der festen Phase bei niedrigeren Temperaturen, durch kürzere Reaktionszeiten und mit weniger nukleophilen Basen möglich wird.^[123] Ist es nicht möglich,

die gewünschte Modifikation auf diese Art und Weise zu integrieren, oder können nicht ausreichend hohe Ausbeuten erreicht werden, muss auf postsynthetische Methoden zurückgegriffen werden, auf welche im nächsten Kapitel genauer eingegangen wird.

2.4.2 Postsynthetische Modifikationen

Die postsynthetische Modifizierung birgt die Möglichkeit, Moleküle, die unter den Bedingungen der Festphasensynthese instabil sind, ortsspezifisch in Oligonukleotide einzubringen. Dafür wird während der Synthese eine reaktive Gruppe in die Sequenz eingebracht, die den Bedingungen der DNA-Synthese standhält und durch die die gewünschte Modifikation nach Aufarbeitung eingebracht wird.

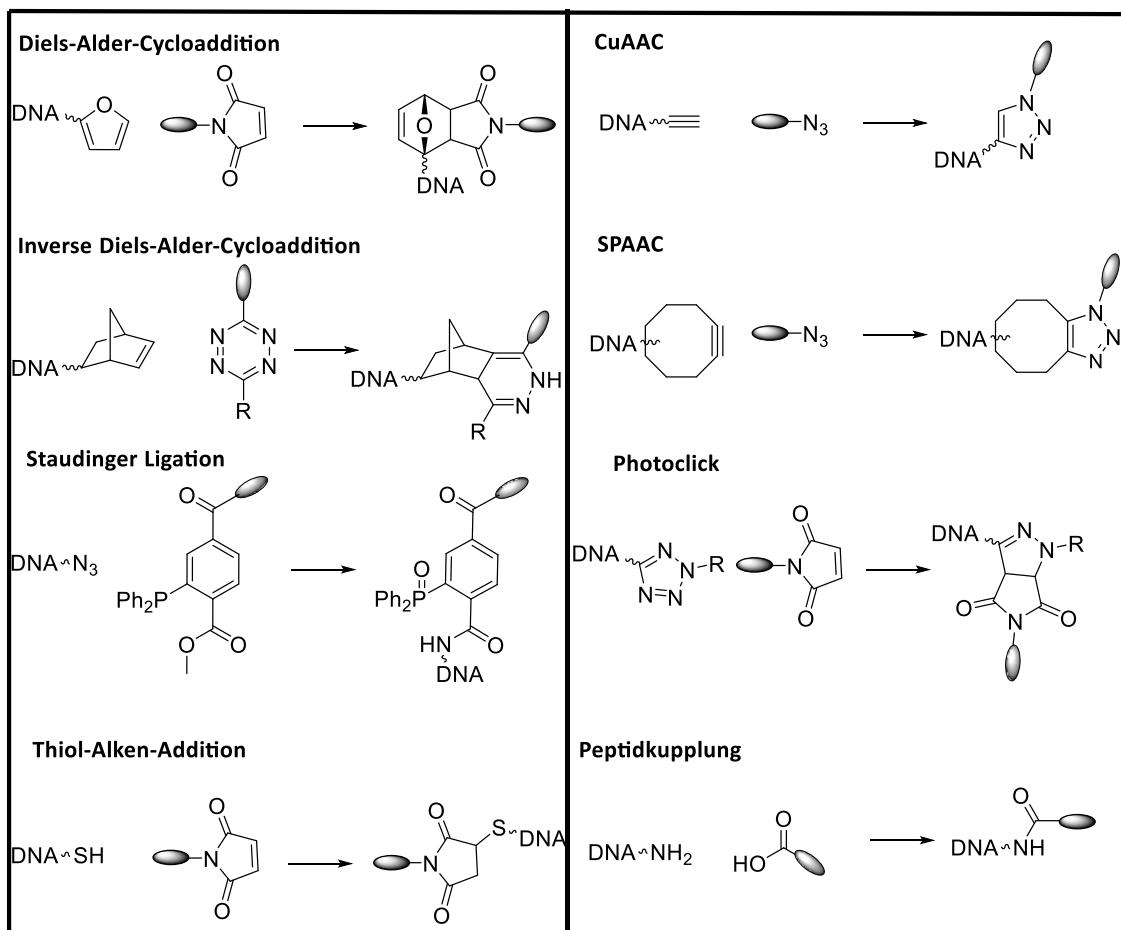


Abbildung 20. Postsynthetische Markierungsmethoden von Oligonukleotiden.^[123-125]

Jedoch müssen, wie auch beim direkten Einbau, gewisse Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen müssen die Reaktionen bioorthogonal und spezifisch sein und zum anderen unter möglichst milden Bedingungen ablaufen. Aufgrund der stetigen Zunahme an, für spezielle

Anwendungen entwickelte Sonden, wurden in den letzten Jahren viele verschiedene Markierungsmethoden entwickelt. Zur Markierung von Nucleinsäuren zählen dazu unter anderem die [4+2]-Cycloadditionen (Diels-Alder- bzw. Inverse Diels-Alder-Reaktionen), die Amidkupplung von Aminen mit aktivierten NHS-Estern bzw. Säurechloriden, die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen, die auch unter dem Namen „Click“-Reaktion bekannt ist, und die Reaktion von Thiolen mit Maleimiden.^[123-124, 126]

Da in dieser Arbeit die 1,3-dipolare Cycloaddition sowie die Amidkupplung zur postsynthetischen Modifizierung eingesetzt wurden, wird auf diese in diesem Kapitel näher eingegangen.

„Click“-Reaktion

Die 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden ist einer der bekanntesten Vertreter in der „Click“-Chemie. Die von *Huisgen*^[127] bereits Ende der 1950er Jahre beschriebene Reaktion wurde 2002 von *Sharpless*^[128] und *Meldal*^[129] zur gleichen Zeit durch die Entwicklung einer kupfer(I)-katalysierten Variante (*copper catalyzed azide alkyne cycloaddition: CuAAC*) weiterentwickelt. Merkmale dieser „Click“-Reaktionen sind nach *Sharpless* sehr hohe Ausbeuten, ein breites Anwendungsgebiet, eine hohe Stereoselektivität, keine bzw. nur wenige und leicht abtrennbare Nebenprodukte, eine gute Verfügbarkeit der Ausgangsverbindungen und Reagenzien und eine leichte Durchführung. Außerdem sollte die Reaktion unter milden Bedingungen, wie in wässrigem Medium, bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert, ablaufen, hydrolyse- und oxidationsstabil sein und durch das Baukastenprinzip aufbaubar sein.^[130] Durch die Entwicklung der kupfer(I)-katalysierten Variante ist die Reaktion bei Raumtemperatur durchführbar und liefert stereospezifisch nur das 1,4-substituierte Produkt. Für die Reaktion in Nucleinsäuren wird dazu ein alkinmodifizierter Baustein während der Festphasensynthese eingebaut, der anschließend mit dem entsprechenden azidmodifizierten Rest unter Ausbildung stabiler Triazole umgesetzt wird.

Da Alkine und Azide im Organismus nicht vorhanden sind und die gebildeten Triazole stabil und nicht toxisch sind, eignen sie sich hervorragend zur bioorthogonalen Markierung in Biomolekülen.^[131] Lange Zeit jedoch war das Problem, dass durch Kupfer(I) Oxidationen und Strangbrüche in Oligonucleotiden ausgelöst werden, sodass ein Einsatz nicht möglich war.

Durch die Verwendung von kupfer(I)-chelatisierenden Liganden, wie TBTA (Tris(benzyltriazolylmethyl)amin) bzw. THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin), ist es möglich Kupfer abzuschirmen und dadurch destabilisierende Wechselwirkungen zu umgehen sowie die Reaktion zu beschleunigen.^[132] Diese Entwicklung führte dazu, dass eine Vielzahl an alkinmodifizierten Bausteinen synthetisiert wurde und nicht nur kleine Oligonukleotide, sondern ganze Genfragmente modifiziert werden können.^[133] Die Gruppen von *Carell*^[134] und *Seela*^[135] entwickelten solche Nukleoside, welche erfolgreich über die Festphasensynthese eingebaut werden konnten (siehe Abbildung 21).

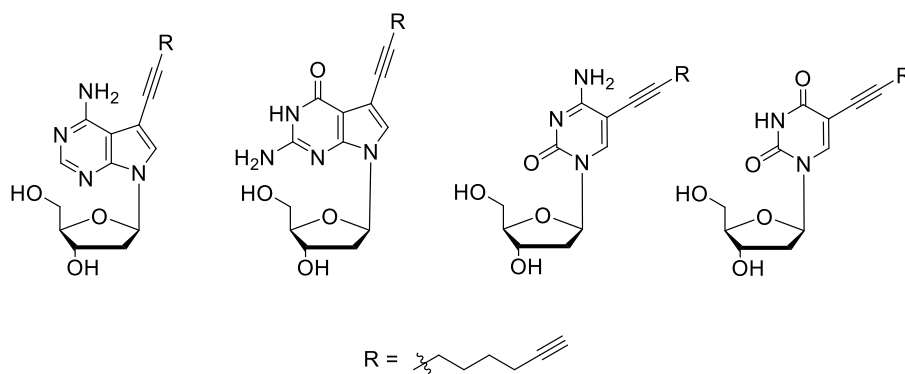


Abbildung 21: Die von *Carell* und *Seela* veröffentlichten alkinfunktionalisierten Bausteine.^[133-135]

Um mehrere Modifikationen in ein Oligonukleotid zu integrieren, ist es erforderlich, dass orthogonale Markierungsmethoden verwendet werden. Daher setzte *Carell et al.* verschieden geschützte Alkine ein, die spezifisch entschützt und anschließend mit einem Azid geklickt werden können.^[133, 136]

Die Verwendung von Basen, die an der 2'-Position des Zuckers die Alkin-Funktion tragen, kann die Destabilisierung der Duplexe, die bei basenmodifizierten Bausteinen auftreten, verhindern.^[137-138] *Wagenknecht et al.* verwenden aus diesem Grund zum einen das 2'-O-Propargyluridin (**cU**) und einen azyklischen Alkin-Linker (**cL**), der auf (S)-3-Amino-1,2-propandiol basiert. Zum Anderen führte die Entwicklung eines alkinmodifizierten Arabinosebausteins (**cAraU**) zu einer anderen Ausrichtung von Fluorophoren an der DNA- bzw. RNA-Helix und somit zu veränderten optischen Eigenschaften von Energietransferpaaren (siehe Kapitel 2.2.2 und Abbildung 9).^[10, 59]

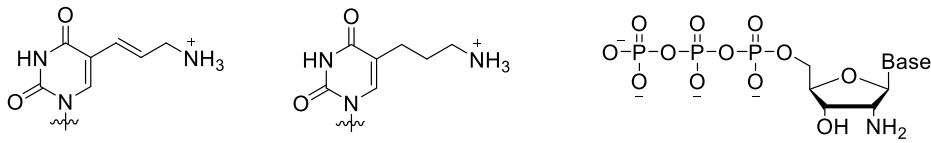
Die Toxizität von Kupfer(I) stellt jedoch auch weiter ein Problem bei In-vivo-Anwendungen dar, da die Zellteilung inhibiert wird und der Zelltod verursacht werden kann.^[139-140] Daher wurden kupferfreie „Click“-Reaktionen entwickelt.^[141] Eine bekannte Variante ist dabei die

ringgespannte Alkin-Azid-Cycloaddition (*Strain promoted azide alkyne cycloaddition*: SPAAC). Bereits 1961 berichteten *Wittig* und *Krebs*^[142] von einer „explosionsartigen“ Reaktion von Cyclooctin mit Phenylazid. *Bertozzi et al.* entwickelte aus dieser Beobachtung eine „Click“-Variante^[143], die die hohe Ringspannung des Cyclooctins ausnutzt, um die Reaktion anzutreiben. Eine weitere Möglichkeit einer postsynthetischen kupferfreien Modifizierung von Oligonukleotiden ist die von *Wagenknecht et al.* untersuchte „Photoclick“-Reaktion, bei der Tetrazole mit elektronenarmen Doppelbindungen reagieren.^[125]

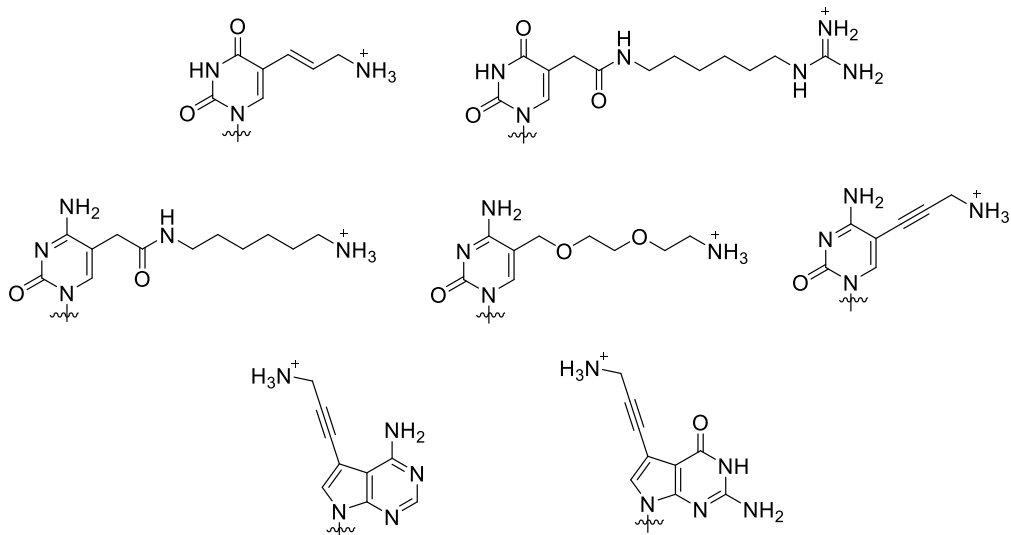
Amidkupplung

Eine wesentlich ältere postsynthetische Modifizierungsmöglichkeit ist die Einführung eines Alkylamins in die DNA und die postsynthetische Reaktion dieser mit elektrophilen Derivaten des einzubringenden Moleküls.^[144] Diese Reaktion zeigt jedoch einige Nachteile auf. Zum einen verfügt sie über eine geringe Chemoselektivität, da Kreuzreaktionen mit den exozyklischen Aminogruppen der Basen stattfinden können. Ein weiteres Problem stellt die Hydrolyse der Reagenzien dar, die jedoch durch die Einstellung des pH-Wertes kontrolliert werden kann.^[123] *Greenberg et al.* umgingen das Problem der Chemoselektivität, indem sie die postsynthetische Reaktion an einem vollständig geschützten Oligonukleotid durchführten. 1997 publizierten sie dazu ein erstes Konzept, bei dem endständig ein mit einer photolabilen Gruppe geschütztes Alkylamin eingeführt wurde. Die Schutzgruppe war dabei das Bindeglied zwischen Oligonukleotid und CPG^[145], wodurch nach der photobasierten Abspaltung unter anderem die Reaktion mit einem Pyren-Derivat stattfinden konnte.^[146-147] Die Weiterentwicklung führte im Jahr darauf zu einem doppelt endständig modifizierten Oligonukleotid.^[148] Die Modifikation innerhalb eines Nukleotids wurde schließlich 1999 in Form eines 2'-zuckermodifizierten Uridins realisiert.^[149] Die Amin-Funktion kann auf verschiedene Arten an Oligonukleotide kovalent gebunden werden. Eine Übersicht über die verschiedenen Anknüpfungspunkte an Triphosphate wurde 2010 von *Sugimoto* veröffentlicht (siehe Abbildung 22).^[150]

Modifikationen für RNA



Modifikationen für DNA

Abbildung 22. Modifikationsmöglichkeiten der Basen und Zuckergerüste in DNA und RNA.^[150]

Eine weitere Anwendung ist die Synthese neuer DNA-kodierter Bibliotheken.^[151-154] *Neri et al.* testeten dafür verschiedene Kupplungsreagenzien mit acht verschiedenen Carbonsäuren.^[155]

Die Kupplung wurde, im Gegensatz zu denen von *Greenberg*, an bereits abgespaltener und entschützter DNA durchgeführt. Sie konnten ein System entwickeln, welches EDC, HOAt und DIPEA zur Aktivierung enthält und dieses erfolgreich für verschiedenste Carbonsäuren und Aminmodifizierungen mit hohen Ausbeuten einsetzen. Die Bandbreite der einzusetzenden Modifikationen, Aktivierungsreagenzien sowie Anwendungsbereiche ist sehr breit und wird in der Literatur ausführlich behandelt.^[144, 156-161]

3 Wellenlängenverschiebende Sonden in DNA

Die Visualisierung biologischer Vorgänge in der Zelle ist von immenser Bedeutung und kann, wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, unter Verwendung verschiedener Fluorophore und Anknüpfungsmethoden realisiert werden. Die beiden als Energietransferpaar bekannten Fluorophore **TO** und **TR** wurden erfolgreich auf unterschiedliche Weise an DNA und RNA geknüpft.^[42] Aufgrund deren geringen Photostabilität wurden spätere Untersuchungen mit den photostabilen Farbstoffen **5** und **6** durchgeführt. Die Kombination dieser beiden zum Energietransferpaar hat zur Folge, dass **5** bei 435 nm anregbar ist, seine Energie auf **6** überträgt und Licht einer Wellenlänge von 610 nm emittiert wird. Daher wurden diese in DNA und RNA eingebracht, wobei drei verschiedene postsynthetische Ansätze verfolgt wurden (siehe Kapitel 2.2.2, Abbildung 9). Auffällig dabei ist der immense Einfluss der verwendeten Verknüpfungsart auf die spektroskopischen Eigenschaften.^[10] Um die durch die postsynthetische Funktionalisierung entstehenden Nachteile, wie die Kupfer(I)-Toxizität zu umgehen, soll im Folgenden die Synthese und der Einbau der beiden Farbstoffe in DNA als Basenanaloga beschrieben sowie deren spektroskopischen Eigenschaften optimiert werden.

3.1 Synthese der Farbstoffbasenanaloga

Die beiden Farbstoffe **5** und **6** wurden nach einer im Arbeitskreis *Wagenknecht* entwickelten Syntheseroute hergestellt (siehe Abbildung 23, beispielhaft für den Donorfarbstoff **5**).^[9]

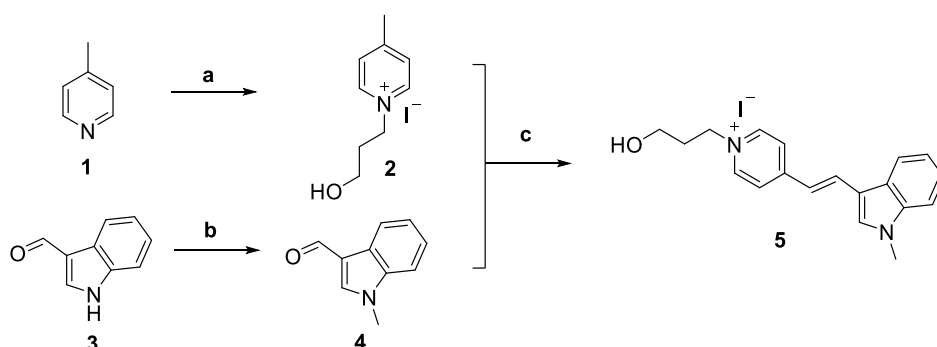


Abbildung 23. Synthese des Cyaninfarbstoffes **5**: a) 3-Iodpropanol, 1,4-Dioxan, 101 °C, 16 h, 89 %; b) K₂CO₃, DMC, DMF, 130 °C, 19 h, 91 %; c) Piperidin, EtOH, 80 °C, 19 h, 65 %.

Dafür wurden die beiden aromatischen Systeme alkyliert und anschließend in einer Knoevenagel-Kondensation zu den jeweiligen Farbstoffen umgesetzt. Zur Anknüpfung an den (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker wurde zunächst der jeweilige Farbstoff mit 1,1-Carbonyldiimidazol aktiviert und anschließend über eine Carbamat-Brücke an den DMT-geschützten Linker (L) geknüpft (siehe Abbildung 24). Diese Reaktion bereitete einige Schwierigkeiten, da die Umsetzung zum gewünschten Produkt sehr langsam abläuft. Auch eine leichte Erhöhung der Temperatur sowie portionsweise Zugabe des Linkers konnte die Reaktionszeit nicht verkürzen. Die höchsten Ausbeuten konnten durch eine Reaktionszeit von 7 Tagen erreicht werden. Der Linker wurde unter literaturbekannten Bedingungen hergestellt.^[114-115, 162] Die Phosphoramiditsynthesen der beiden Farbstoffbasenanaloga **9** und **10** wurden nach Standardbedingungen^[163-164] durchgeführt und diese anschließend in der automatisierte Festphasensynthese eingesetzt. Die Verwendung von *ultramild*-Reagenzien war der Basenlabilität der Farbstoffe geschuldet, wobei die Kupplungsprotokolle denen der natürlichen Bausteine entsprachen. Für den Einbau der Basenanaloga **9** und **10** wurde dieses durch verlängerte Kupplungszeiten und höhere Substanzmengen modifiziert (siehe Kapitel 8.3.2).

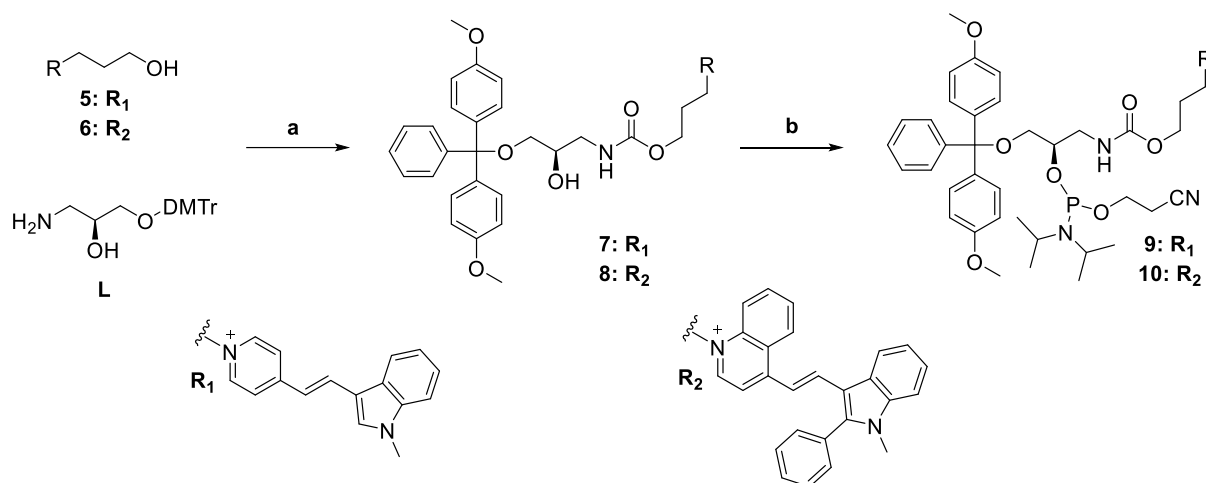


Abbildung 24. Syntheseroute der beiden Farbstoffbasenanaloga: a) 1. CDI, DMF, RT, 16 h, 2. L, RT, 7 d, **7**: 69 %, **8**: 56 %; e) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DCM, RT, 16 h, **9**: 99 %, **10**: 99 %.

Nach Abspaltung von der festen Phase mit einer methanolischen Kaliumcarbonatlösung sowie der Aufreinigung der Oligonukleotide wurden diese optisch charakterisiert.

3.2 Optische Untersuchungen

Die optischen Eigenschaften der beschriebenen Farbstoffe als Energietransferpaar in Oligonukleotiden sind stark abhängig von der Art ihrer Anknüpfung (siehe Kapitel 2.2.2). In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Anknüpfung an das 2'-Ribofuranosid (**cU**) in DNA ein Kontrastverhältnis I_{610}/I_{535} von 1:60 aufweist, wohingegen das Kontrastverhältnis bei Verwendung des 2'-Arabinofuranosids (**cAraU**) auf 1:20 sinkt.^[10] Aufgrund dieser Abhängigkeit sollten die beiden Chromophore als Basenanaloga in DNA eingebracht werden und deren optische Eigenschaften in Abhängigkeit der Gegenbasen sowie wachsenden Chromophor-Chromophor-Abständen untersucht werden, um anschließend dieses Konzept auf RNA zu übertragen.

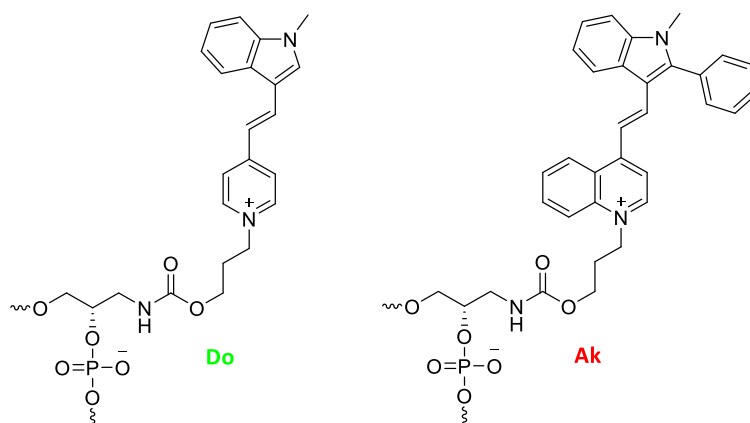


Abbildung 25. Strukturen der eingesetzten Farbstoffbasenanaloga. Das Ribofuranosid wurde durch einen azyklischen (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker ersetzt.

3.2.1 Einfluss der Gegenbasen

Um die Auswirkungen wechselnder Gegenbasen auf den Energietransfer der beiden, als Basenanaloga eingebauten Chromophore, zu untersuchen, wurde das Nachbarnukleosid der Modifikation systematisch variiert. Dadurch wurden 16 Oligonukleotidkombinationen erhalten (siehe Abbildung 26), auf deren spektroskopische Eigenschaften im Folgenden genauer eingegangen wird. Die Farbstoffanordnung und Sequenzen der synthetisierten DNA-Stränge wurde von den bereits bekannten RNA-Konstrukten mit **TO** als Donor und **TR** als Akzeptor abgeleitet.^[42]

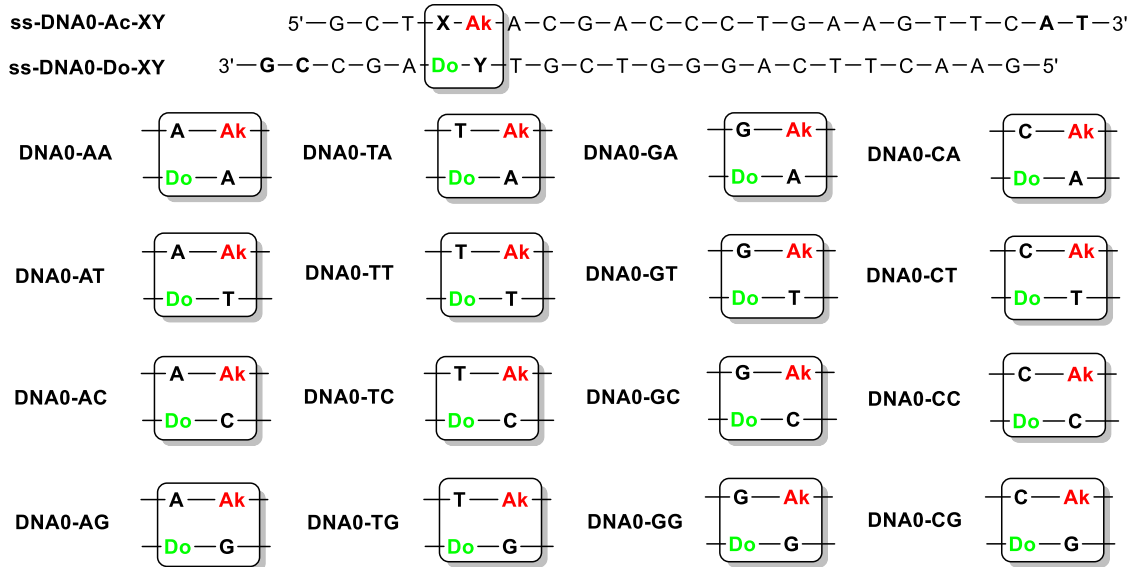


Abbildung 26. Sequenzen der modifizierten Oligonukleotide **DNA0-XY**.

Die Absorptionsspektren der Duplexe **DNA0-XY** zeigen ihre Absorptionsbanden bei den für die Farbstoffe typischen Wellenlängen von etwa 470 nm (**Do**) und 550 nm (**Ak**) (siehe Abbildung 27).

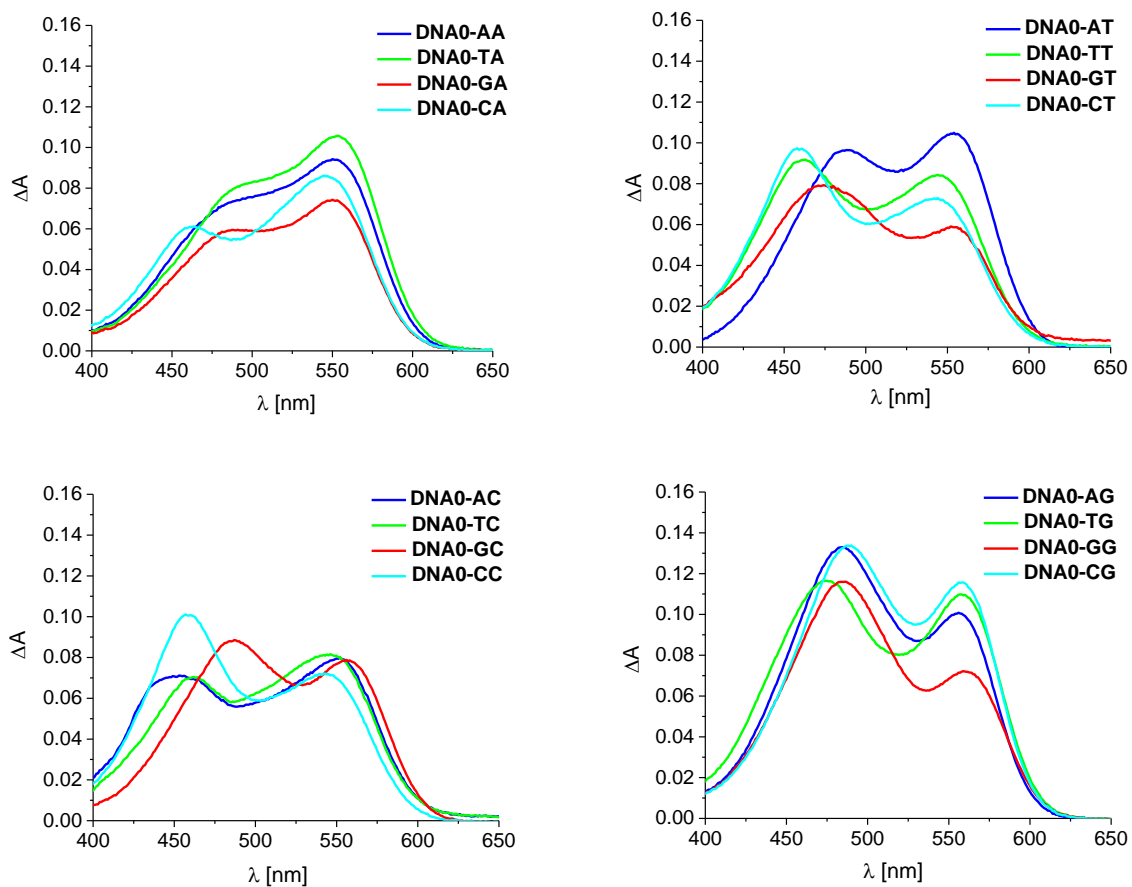


Abbildung 27. Absorption der synthetisierten Duplexe **DNA0-XY**. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

Die Extinktionskoeffizienten beider Chromophore zeigen auffällige Differenzen bei Betrachtung aller Duplexe, wobei die des Donors gravierender sind. So weisen alle Duplexe **DNA0-XA** geringere Extinktionskoeffizienten des Donors als des Akzeptors auf, die Duplexe **DNA0-XT** dahingegen haben, bis auf **DNA0-AT**, geringere Extinktionskoeffizienten für den Akzeptor. Dies wirkt sich auch auf die Emissionsintensitäten sowie Kontrastverhältnisse aus, worauf weiter unten eingegangen wird. Auffällig ist außerdem, dass die Extinktionskoeffizienten des Donors sehr viel größer sind, wenn es sich bei der Nachbarbase um ein Guanosin handelt. Außerdem zeigen fast alle **DNA0-CY** Duplexe im Gegensatz zu den anderen blauverschobene Maxima, wobei jedoch das Maximum des Donors stärker verschoben ist (siehe Abbildung 27 und Tabelle 1).

Tabelle 1. Optische Daten der untersuchten Duplexe **DNA0-XY**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

DNA	$\lambda_{\max Do}$ [nm]	$\lambda_{\max Ak}$ [nm]	$\Delta\lambda^{[a]}$ [nm]	$A_{\max}^{[b]}$	$A_{\max ss}^{[c]}$	$A_{\max}/A_{\max ss}$
DNA0-AA	487	551	64	0.78	0.28	2.8
DNA0-TA	492	552	60	0.76	0.32	2.4
DNA0-GA	485	549	64	0.80	0.36	2.7
DNA0-CA	461	546	85	0.71	0.30	2.4
DNA0-AT	487	554	67	0.92	0.45	2.0
DNA0-TT	461	544	83	1.09	0.52	2.1
DNA0-GT	472	555	83	1.34	0.58	2.3
DNA0-CT	458	544	86	1.33	0.49	2.7
DNA0-AC	450	552	102	0.88	0.47	1.9
DNA0-TC	462	546	94	0.86	0.55	1.6
DNA0-GC	486	558	72	1.12	0.61	1.8
DNA0-CC	457	542	85	1.40	0.51	2.7
DNA0-AG	483	556	73	1.32	0.81	1.6
DNA0-TG	473	558	85	1.06	0.94	1.1
DNA0-GG	485	561	76	1.61	1.04	1.6
DNA0-CG	488	558	70	1.16	0.88	1.3

[a] $\Delta\lambda_{\text{abs}} = \lambda_{\max Do} - \lambda_{\max Ak}$; [b] $A_{\max} = A_{\max Do} / A_{\max Ak}$; [c] $A_{\max ss} = A_{\max ss Do} / A_{\max ss Ak}$.

Die Extinktionskoeffizienten der beiden Fluorophore in den Einzelsträngen sind signifikant kleiner als die in den Doppelsträngen. So kann die Betrachtung des Quotienten der Absorptionsmaxima der Einzelstränge $A_{\max ss} = A_{\max ss Do} / A_{\max ss Ak}$, die anschließend zu Duplexen

hybridisiert werden, helfen, eine Auswahl der besten Gegenbasenkombination zu treffen. Dabei wurden Duplexe als gute Energietransfersonden identifiziert, bei denen der Quotient der Absorptionsmaxima im Doppelstrang doppelt so groß ist wie der der Einzelstränge. Diese Beobachtung ist vor allem für **DNA0-AT** gültig mit $A_{\max}/A_{ss} = 2.0$ (siehe Tabelle 1).

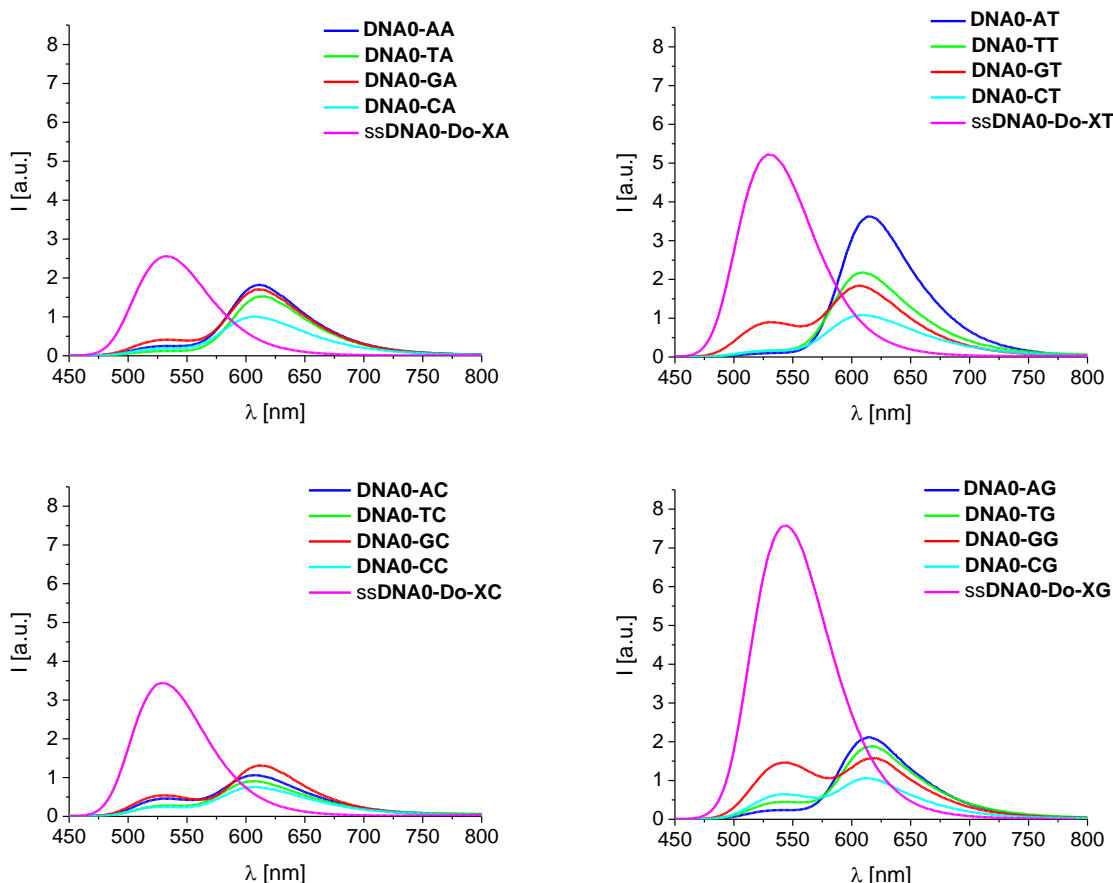


Abbildung 28. Fluoreszenz der synthetisierten Duplexe **DNA0-XY**. Die zugehörigen donormodifizierten Einzelstränge sind magentafarben dargestellt. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

Zur Identifizierung eines effektiven Energietransfers zwischen dem Donor- und Akzeptorfluorophor kann, bei einer selektiven Anregung bei 435 nm, das Intensitätsverhältnis I_{610}/I_{535} der beiden Emissionsmaxima bei 610 nm (**Ak**) und 535 nm (**Do**) betrachtet werden (siehe Abbildung 28). Ein optimaler Energietransfer wird dabei durch eine geringe Emissionsintensität I_{535} und eine hohe Emissionsintensität I_{610} ausgezeichnet und folglich durch einen hohen Kontrast I_{610}/I_{535} und durch eine charakteristische rot/grüne Fluoreszenzauslesung identifiziert. Eine weitere zu betrachtende Größe zur Bewertung der Qualität des Energietransfers ist der Verstärkungsfaktor f . Dabei handelt es sich um den Quotienten des Kontrastverhältnisses I_{610}/I_{535} des Doppelstranges geteilt durch das Kontrast-

verhältnis I_{610}/I_{535} des zugehörigen donormodifizierten Einzelstranges (siehe Tabelle 2). Auffällig bei den Emissionsspektren ist die sich stark unterscheidende Emissionsintensität der donormodifizierten Einzelstränge. Ein zum Fluorophor benachbartes G beeinflusst die Intensität der Emission positiv, wohingegen die geringste Emissionsintensität bei einem benachbarten A zu beobachten ist. Wenn die Wellenlängendifferenz beider Absorptionsmaxima $\Delta\lambda$ größer als 84 nm ist, findet eine Fluoreszenzlöschung des Donors, jedoch kein effizienter Energietransfer auf den Akzeptor statt. Dies liegt darin begründet, dass die Überlappung der Emission des Donors mit der Absorption des Akzeptors nicht ausreichend für einen erfolgreichen Energietransfer ist. Offensichtlich ist dies bei **DNA0-AC**, bei dem $\Delta\lambda = 102$ nm und $I_{610}/I_{535} = 2.4$ ist.

Tabelle 2. Optische Eigenschaften der synthetisierten Duplexe **DNA0-XY**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

DNA	I_{535}	I_{610}	I_{610}/I_{535}	f	$\Phi_{F\ Do}^{[a]}$	$\Phi_{FAK}^{[b]}$	T_m [°C]
DNA0-AA	0.25	1.81	7.2	43	0.002	0.182	70
DNA0-TA	0.12	1.52	12.3	72	0.002	0.188	73
DNA0-GA	0.41	1.71	4.1	24	0.014	0.216	68
DNA0-CA	0.19	1.00	5.2	30	0.002	0.094	67
DNA0-AT	0.10	3.55	33.9	212	0.001	0.346	74
DNA0-TT	0.16	2.17	13.0	81	0.002	0.182	71
DNA0-GT	0.89	1.81	2.0	13	0.019	0.124	68
DNA0-CT	0.17	1.08	6.5	40	0.002	0.063	75
DNA0-AC	0.44	1.06	2.4	16	0.003	0.062	70
DNA0-TC	0.28	0.90	3.3	22	0.003	0.056	74
DNA0-GC	0.54	1.31	2.4	16	0.009	0.109	75
DNA0-CC	0.24	0.75	3.1	21	0.009	0.086	73
DNA0-AG	0.23	2.08	8.9	33	0.007	0.229	70
DNA0-TG	0.43	1.84	4.2	16	0.011	0.174	71
DNA0-GG	1.42	1.51	1.1	4	0.076	0.177	73
DNA0-CG	0.62	1.06	1.7	6	0.030	0.128	82

[a] $\lambda_{exc} = 435$ nm, $\lambda_{em} = 450-550$ nm; [b] $\lambda_{exc} = 435$ nm, $\lambda_{em} = 550-800$ nm.

Wie bereits schon für **TO**- und **TR**-modifizierte Duplexe beschrieben^[44], kann es zwischen zwei Chromophoren zu Grundzustandswechselwirkungen kommen, welche den Energietransfer der beiden stören. Das bedeutet, dass zwei excitonisch gekoppelte Dimere beider Farbstoffe

keinen effizienten Energietransfer eingehen können, da dafür eine selektive Anregung des elektronisch entkoppelten Donors in Nachbarschaft eines entkoppelten und nicht angeregten Akzeptors stattfinden muss. Die Absorptionsmaxima beider Farbstoffe sowie deren Quotient kann darüber genauere Auskunft geben. Absorptionsverhältnisse $A_{\max\text{Do}}/A_{\max\text{Ak}} > 1.1$ deuten auf excitonische Wechselwirkungen der Farbstoffe hin, die zu höheren Extinktionskoeffizienten des Donors und niedrigeren des Akzeptors führen. Besonders offensichtlich ist dies im Duplex **DNA0-GG**. Das Absorptionsverhältnis ist $A_{\max\text{Do}}/A_{\max\text{Ak}} = 1.6$ und im Emissionsspektrum ist fast kein Energietransfer zu erkennen, sondern hauptsächlich Fluoreszenzlöschung. Das Intensitätsverhältnis $I_{610}/I_{535} = 1.1$ und der Verstärkungsfaktor $f = 4.0$ sind damit die niedrigsten Werte der vorgestellten Duplexe. Diese repräsentative Interpretation von Grundzustandswechselwirkungen konnte durch weitere Experimente bestätigt werden.

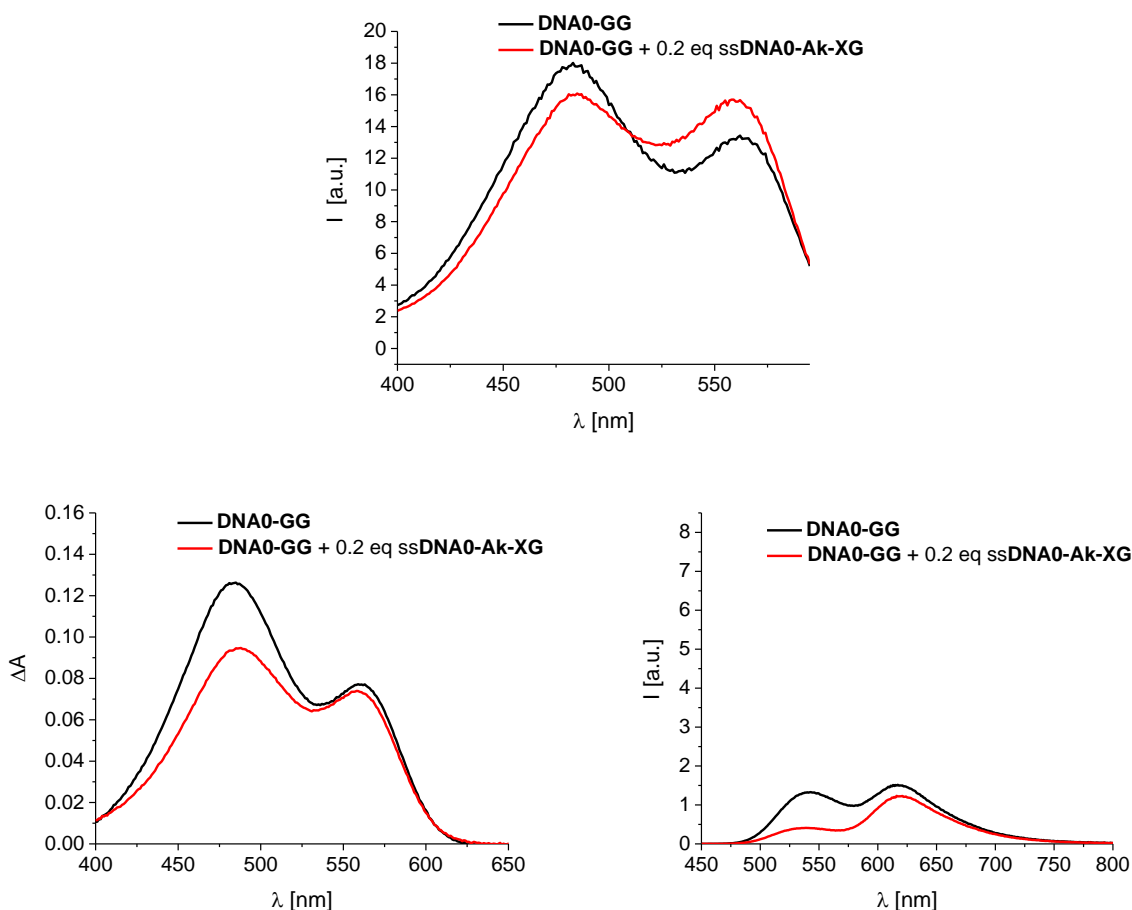


Abbildung 29. Anregungsspektren (oben), Absorption (unten links) und Fluoreszenz (unten rechts) des Duplexes **DNA0-GG** nach Zugabe eines Überschusses an **ssDNA0-Ak-XG** zum Nachweis der Grundzustandswechselwirkungen. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

Dafür wurden spektroskopische Messungen durchgeführt, bei denen 1.2 Äquivalente des Oligonukleotids, welches den Akzeptor enthält, zum donormodifizierten Einzelstrang gegeben wurden. Dabei wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion der Donorfluoreszenz beobachtet. Die Intensität der Akzeptorfluoreszenz wird jedoch nicht weiter gesteigert. Dieses Experiment zeigt, dass der geringe Energietransfer auf Grundzustandwechselwirkungen und nicht auf einen Unterschuss an donormodifizierter DNA zurückzuführen ist. Diese Aussage wird des Weiteren durch die Absorptions- und Anregungsspektren gestützt (siehe Abbildung 29). Das Absorptionsspektrum zeigt einen geringeren Extinktionskoeffizienten des Donors, jedoch keinen höheren des Akzeptors, was auf die Bildung von Dimeren hinweist und folglich zu einer Fluoreszenzlöschung des Donors führt, jedoch zu keinem effektiveren Energietransfer. Die Anregungsspektren stimmen mit denen der Absorption überein, was zeigt, dass die absorbierte und emittierte Strahlung proportional zueinander ist. Alle Duplexe der Reihe **DNA0-XG** werden stark durch ihre Umgebung beeinflusst. Das wird deutlich bei der Betrachtung der optischen Daten: Sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsmaximum des Akzeptors sind im Vergleich zu den anderen Duplexen um etwa 5 nm rotverschoben. Diese Verschiebung deutet auf Stapelwechselwirkungen des Akzeptors mit G hin.

Die Schmelztemperaturen der Duplexe **DNA0-XY** mit XY = AT, TA, CG und GC liegen im Vergleich zu den restlichen Duplexen bei höheren Werten (siehe Tabelle 2). Dies kann auf eine Basenpaarung der beiden Gegenbasen miteinander hinweisen, wodurch die optischen Eigenschaften der beiden Farbstoffe kontrolliert werden.

Die Überprüfung der optischen Daten aller Doppelstränge ergeben, dass sich A und T besonders gut als Gegenbase eignen. Dies zeigt sich besonders in den Duplexen **DNA0-AT**, **DNA0-TT** und **DNA0-TA**, die Kontrastverhältnisse I_{610}/I_{535} zwischen 12 und 34 und Verstärkungsfaktoren zwischen 72 und 212 aufweisen. Klar erkennbar ist auch, dass sich C und G als Gegenbasen nicht eignen, da insbesondere die Duplexe **DNA0-XC** sehr geringe Emissionsintensitäten des Akzeptors aufweisen. Bei Betrachtung aller Faktoren zeigt sich, dass **DNA0-AT** die besten optischen Eigenschaften aufweist. Mit einem Kontrastverhältnis von 34, einem Verstärkungsfaktor von 212, hohen Emissionsintensitäten und einer Akzeptorquantenausbeute von 35 % eignet sich dieser Doppelstrang hervorragend für In-vitro- und In-vivo-Anwendungen. Nach der Evaluierung der besten Gegenbasen wurde im

Anschluss der Abstand der beiden Chromophore variiert, um die bestmöglichen optischen Eigenschaften zu erreichen.

3.2.2 Chromophor-Chromophor-Abstand

Da excitonisch wechselwirkende Fluorophore mit dem Energietransfer konkurrieren, wurden die beiden Chromophore durch zusätzliche Basenpaare voneinander getrennt, da dadurch die relative Lage der beiden Übergangsdipolmomente zueinander beeinflusst werden kann. Dafür wurden drei Duplexe **DNA1-DNA3** synthetisiert, deren Chromophor-Chromophor-Abstand zwischen ein und drei Basenpaaren liegt, wobei die beste Gegenbasenkombination verwendet wurde (siehe Abbildung 30). Diese wurden im Anschluss mit **DNA0-AT** verglichen.

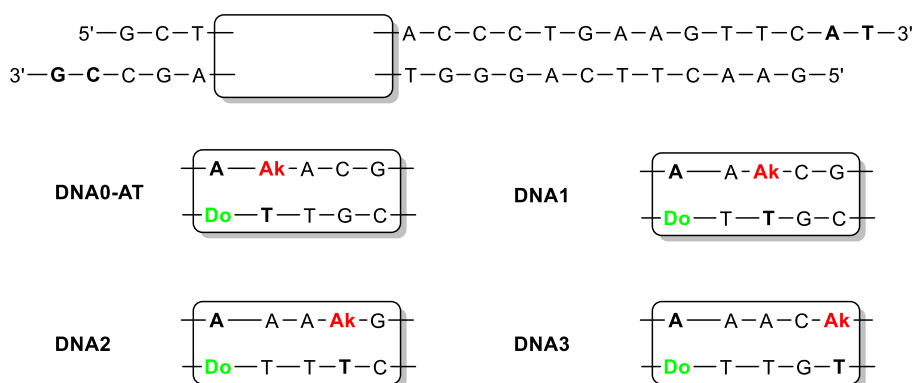


Abbildung 30. Sequenzen der synthetisierten Duplexe **DNA0-AT** und **DNA1-DNA3** zur Evaluierung des Chromophor-Chromophor-Abstandes.

Bei Betrachtung des Abstandes der beiden Absorptionsmaxima wird deutlich, dass sich **DNA1-DNA3** deutlich von **DNA0-AT** unterscheiden (siehe Tabelle 3 und Abbildung 31 links).

Tabelle 3. Absorptionseigenschaften der untersuchten Duplexe **DNA0-AT**, **DNA1-DNA3**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

DNA	λ_{\max} Do [nm]	λ_{\max} Ak [nm]	$\Delta\lambda$ ^[a] [nm]	A_{\max} ^[b]	$A_{\max ss}$ ^[c]	$A_{\max}/A_{\max ss}$
DNA0-AT	487	554	67	0.92	0.45	2.0
DNA1	478	557	79	0.92	0.44	2.1
DNA2	479	552	73	1.15	0.53	2.2
DNA3	472	549	77	1.19	0.70	1.7

[a] $\Delta\lambda = \lambda_{\max Do} - \lambda_{\max Ak}$; [b] $A_{\max} = A_{\max Do} / A_{\max Ak}$; [c] $A_{\max ss} = A_{\max ss Do} / A_{\max ss Ak}$.

Die Maxima sind dabei im Gegensatz zu **DNA0-AT** für den Donor deutlich blauverschoben, wohingegen der Unterschied des Akzeptormaximums weniger drastisch ist. Die Extinktionskoeffizienten von **DNA2** und **DNA3** sind für den Donor höher als für den Akzeptor. Die Emissionsspektren zeigen deutlich, dass durch die zusätzlichen Basenpaare keine Verbesserung der Intensitätsverhältnisse erreicht werden konnte (siehe Abbildung 31 rechts). Diese nehmen von 34 bei **DNA0-AT**, über 3.2 für **DNA1**, 4.4 für **DNA2** bis nur 1.9 für **DNA3** ab und der Verstärkungsfaktor f fällt von 212 auf 12 (siehe Tabelle 4).

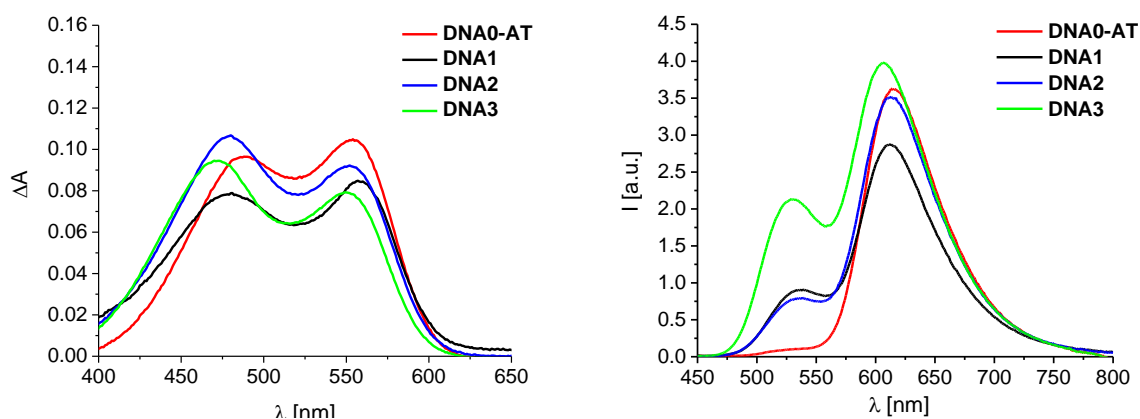


Abbildung 31. Absorption (links) und Fluoreszenz (rechts) der Duplexe **DNA0-AT** und **DNA1-DNA3**. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

Bei solch kurzen Abständen zwischen zwei Farbstoffen kann die relative Orientierung der beiden Dipolvektoren zueinander den Energietransfer kontrollieren. Dies wurde unter anderem von *Asanuma et al.*^[165] und *Wilhelmsson et al.*^[19] untersucht.

Tabelle 4. Optische Eigenschaften der synthetisierten Duplexe. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

DNA	I_{535}	I_{610}	I_{610}/I_{535}	f	$\Phi_{\text{F Do}}^{[a]}$	$\Phi_{\text{F Ak}}^{[b]}$	T_m [°C]
DNA0-AT	0.10	3.55	33.9	212	0.001	0.346	74
DNA1	0.84	2.65	3.2	20	0.018	0.188	67
DNA2	0.74	3.25	4.4	27	0.027	0.234	67
DNA3	2.11	3.94	1.9	12	0.059	0.241	62

[a] $\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 450-550$ nm; [b] $\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 550-800$ nm.

Die Schmelztemperaturen der Duplexe nehmen von **DNA0-AT** nach **DNA3** deutlich ab. Dies deutet auf eine Destabilisierung der Doppelstränge hin. Die Unterschiede der

Intensitätsverhältnisse können sogar bei Betrachten der Fluoreszenzküvette mit bloßem Auge erkannt werden (siehe Abbildung 32).

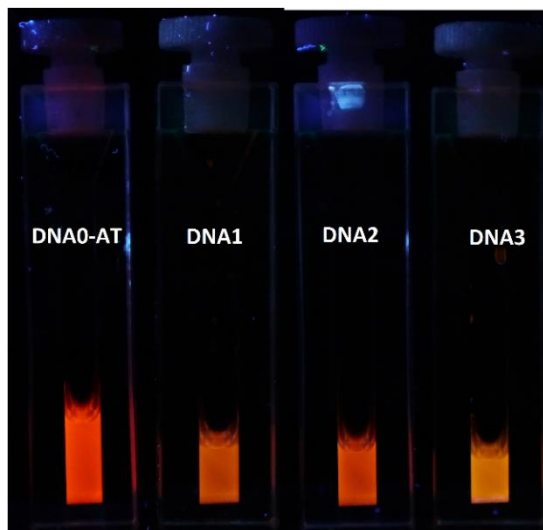


Abbildung 32. Aufnahme der Fluoreszenzküvetten von **DNA0-AT**, **DNA1-DNA3** bei Anregung mit einer UV-Handlampe bei 365 nm.

Die Variation des Abstandes zwischen den beiden Chromophoren führte zu keiner Verbesserung der optischen Eigenschaften. Daher wurde für die folgenden Zellexperimente **DNA0-AT** verwendet, welche die beste Gegenbasenkombination enthält, die geringsten Grundzustandswechselwirkungen der beiden Fluorophore aufweist und daraus resultierend die vielversprechendsten optischen Eigenschaften zeigt.

3.3 In-vivo-Experimente

Um die Anwendung der synthetisierten Duplexe als bioanalytische Sonden zu testen, wurde **DNA0-AT** als optimaler Kandidat ausgewählt. Dieser wurde für Experimente in lebenden Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) verwendet. Da die DNA aufgrund ihrer Ladung und Größe nicht zellgängig ist, wurde auf ein Transfektionsreagenz zurückgegriffen, welches die DNA in Vesikel verpackt und so ins Zellinnere transportiert. Dort wird die DNA wieder freigegeben und der Energietransfer der Fluorophore im Cytoplasma kann mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

Zur Untersuchung und Visualisierung der DNA mit den optimalsten optischen Eigenschaften, wurden 15 pmol Duplex unter Verwendung von ScreenFect® A als Transfektionsreagenz auf

3×10^4 HeLa-Zellen transfiziert. Diese wurden für 24 h inkubiert, bevor sie mittels Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie visualisiert wurden. Dafür wurden die Duplexe mit einem Laser mit geeigneter Wellenlänge ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) angeregt und anschließend im Donor- ($\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}530 \text{ nm}$) und Akzeptorkanal ($\lambda_{\text{em}} = 650\text{-}790 \text{ nm}$) detektiert.

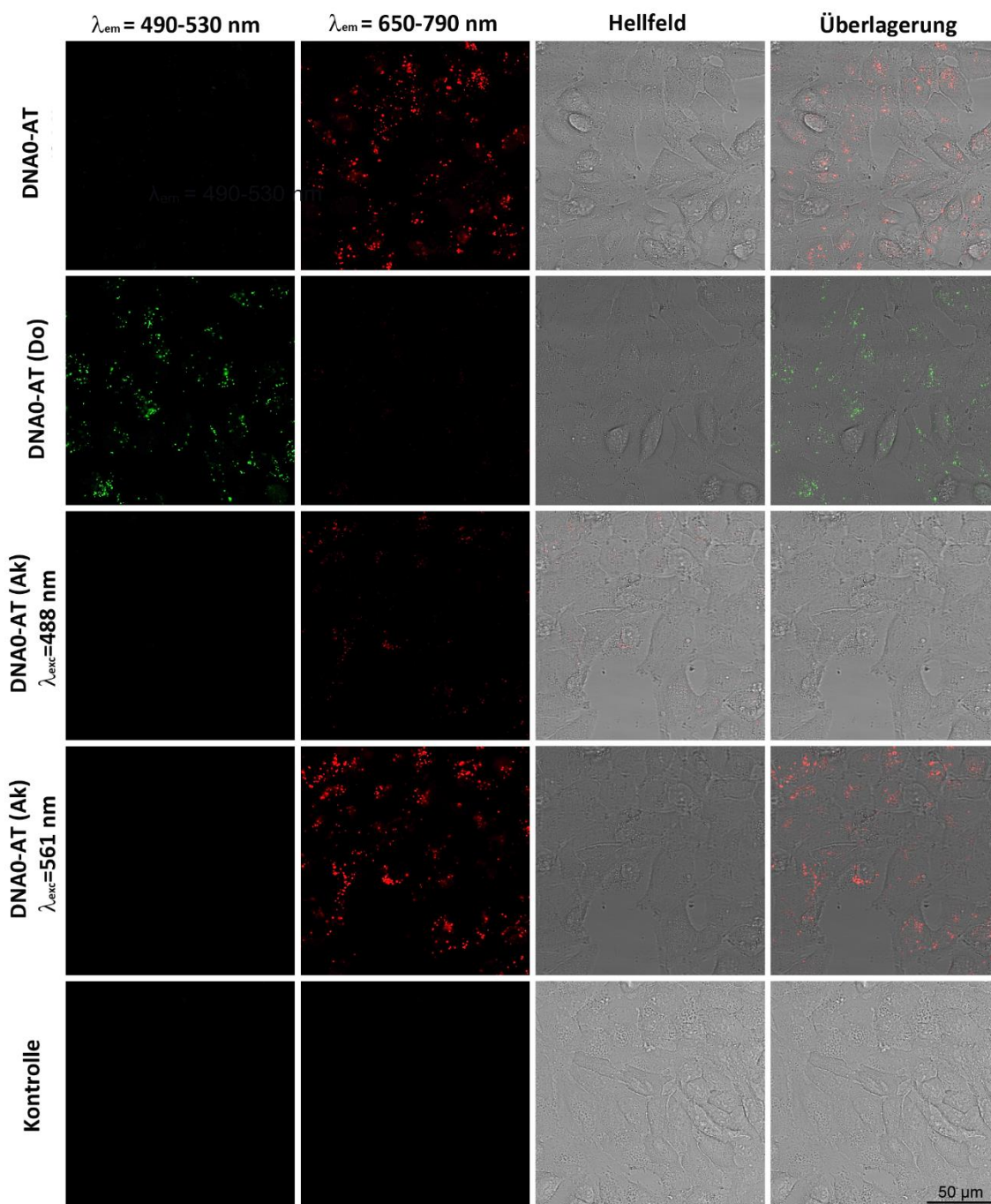


Abbildung 33. Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von HeLa-Zellen 24 h nach Transfektion von 15 pmol **DNA0-AT** (erste Zeile), **DNA0-AT (Do)** (zweite Zeile), **DNA0-AT (Ak)** (dritte und vierte Zeile) sowie der Kontrolle (fünfte Zeile). Die Fluoreszenz wurde im ersten und zweiten Kanal aufgezeichnet. Die dritte Spalte zeigt das Hellfeld und die vierte die Überlagerung aller drei Kanäle. Wenn nicht anders beschrieben, wurde mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Ionen-Laser) angeregt.

Abbildung 33 zeigt die Fluoreszenzkanäle des Donors (erste Spalte), des Akzeptors (zweite Spalte), die Hellfeldaufnahme (dritte Spalte) sowie die Überlagerung der drei ersten Kanäle (vierte Spalte). Die erste Zeile zeigt die Aufnahme des Duplexes **DNA0-AT**. Dabei ist ein deutliches Fluoreszenzsignal im Akzeptorkanal zu sehen, was eine erfolgreiche Transfektion nachweist. Der Donorkanal dagegen weist keine Fluoreszenz auf, was den erfolgreichen nahezu quantitativen Energietransfer in der Zelle bei einer Anregung mit einem Argon-Ionen-Laser bei $\lambda = 488$ nm zeigt. Zur Kontrolle wurden neben dem Energietransferpaar auch die Duplexe des einfach modifizierten Donor- (**DNA0-AT (Do)**, zweite Zeile) bzw. Akzeptorstranges (**DNA0-AT (Ak)**, dritte und vierte Zeile) transfiziert. Die Transfektion aller Doppelstränge verlief erfolgreich, was durch die Fluoreszenzsignale gegeben ist. Beim Duplex **DNA0-AT (Do)** ist ausschließlich ein Fluoreszenzsignal bei dem für den Donor typischen Wellenlängenbereich ($\lambda_{em} = 490-530$ nm) zu beobachten. Der Duplex **DNA0-AT (Ak)** weist bei einer Anregung mit dem Argon-Ionen-Laser bei $\lambda_{exc} = 488$ nm nur eine geringe Fluoreszenzintensität auf, was zeigt, dass die direkte Anregung des Akzeptors im Falle des Energietransferpaares vernachlässigbar ist. Eine Anregung im Absorptionsmaximum dagegen weist eine deutlich intensivere Fluoreszenz auf.

Diese Experimente haben gezeigt, dass das Energietransferpaar mit den besten evaluierten Eigenschaften auch für In-vivo-Anwendungen geeignet ist. Die beiden Basensurrogate eignen sich daher als exzellentes Energietransferpaar mit einem fast quantitativen Energietransfer und einer hohen Helligkeit sowie Fluoreszenzintensität sowohl *in vitro* wie auch *in vivo*.

3.4 Zusammenfassung

Die Synthese der beiden Farbstoffbasenanaloga **9** und **10** wurde erfolgreich durchgeführt (siehe Kapitel 3.1). Die beiden Bausteine konnten unter Verwendung der *Ultramild*-Methode während der Festphasensynthese in DNA eingebaut werden (siehe Kapitel 8.3.2). Zur Evaluierung der optischen Eigenschaften der Duplexe wurden sowohl die Gegenbasen der Fluorophore wie auch deren Abstand zueinander variiert. Dabei stellte sich **DNA0-AT** als bester DNA-Duplex heraus, welches ein Intensitätsverhältnis von 34 und einen Verstärkungsfaktor von 212 aufweist. Dieses konnte erfolgreich in HeLa-Zellen transfiziert und dort mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Somit erfüllt dieser Duplex nicht nur

die Anforderungen einer bioanalytischen Sonde, sondern übertrifft auch die optischen Eigenschaften der zuvor beschriebenen „DNA Traffic Lights“ mit **TO** und **TR** als Energietransferpaar.^[42]

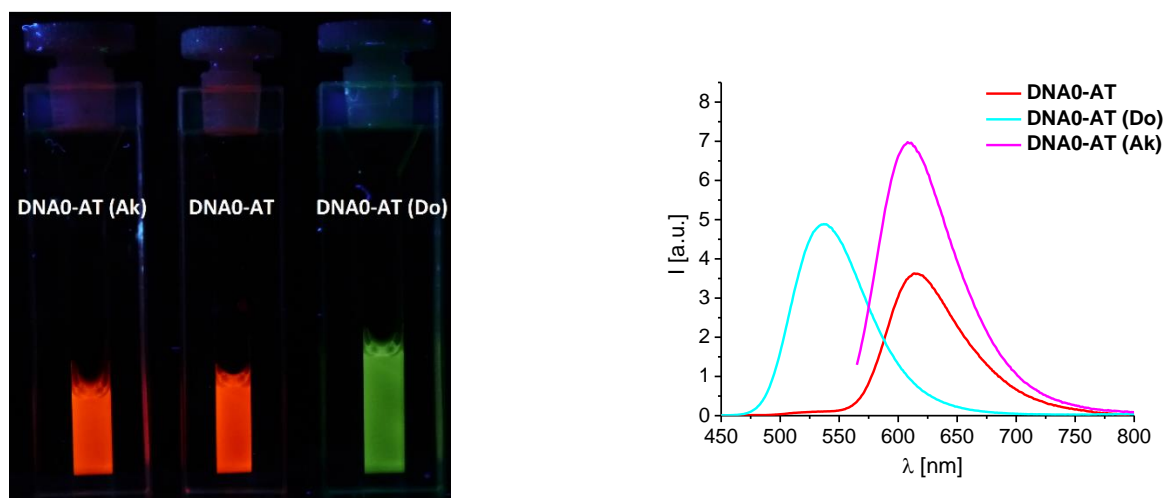


Abbildung 34. Aufnahme der Fluoreszenzküvetten von **DNA0-AT**, **DNA0-AT (Do)** und **DNA0-AT (Ak)** bei Anregung mit einer UV-Handlampe bei 365 nm (links) und die zugehörige Fluoreszenz (rechts). Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C; $\lambda_{exc}=435$ nm, $\lambda_{em}=450-800$ nm.

Der effiziente Energietransfer der beiden Farbstoffe kann bei Betrachtung einer Fluoreszenzküvette mit bloßem Auge erkannt werden (siehe Abbildung 34). Dabei wird deutlich, dass bei Verwendung einer Handlampe mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 365$ nm mit bloßem Auge kein Unterschied der Fluoreszenzintensitäten des doppelt und einfach modifizierten Duplexes erkannt werden kann. Aufgrund der hervorragenden optischen Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe mit dieser Sequenz sowie der Vermeidung von zelltoxischem Kupfer(I) wurde dieses Konzept auf RNA übertragen, worauf im folgenden Kapitel eingegangen wird.

4 Wellenlängenverschiebende Sonden in RNA

4.1 Einführung in die siRNA-Technologie

Der Nobelpreis für Physiologie und Medizin wurde 2006 *C. Mello* und *A. Fire* für die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) verliehen. Diese wurde 1998 erstmals im Fadenwurm *C. elegans*^[166] und wenige Jahre später auch in Säugetieren entdeckt.^[167] Unter RNAi wird die gezielte Inhibition der Expression bestimmter Gene durch kurze doppelsträngige RNA verstanden.^[168]

Der heutzutage fast vollständig aufgeklärte Mechanismus beginnt damit, dass eine doppelsträngige RNA durch die Endonuklease Dicer in 21-23 Nukleotide lange siRNAs (*small interfering RNAs*) geschnitten wird. Diese kleineren doppelsträngigen siRNAs besitzen an den 3'-Enden jeweils zwei Basen lange Überhänge und bestehen aus einem Sense- und einem Antisense-Strang (siehe Abbildung 35). Der Antisense-Strang ist komplementär zur mRNA, welche inhibiert werden soll. Neben dem Erkennungsbereich, genauer zwischen den Basen 10 und 11, wird letztlich die Spaltung der passenden mRNA initiiert, wodurch die Expression des darauf codierten Gens inhibiert wird.

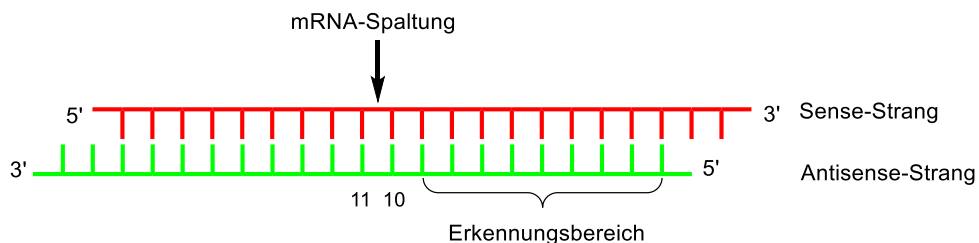


Abbildung 35. Schematische Darstellung einer 21-Nukleotid langen doppelsträngigen siRNA. Diese besteht aus einem Sense-Strang (rot) und einem Antisense-Strang (grün). Der Erkennungsbereich und die mRNA-Spaltungsstelle sind markiert.^[168]

In dieser Arbeit wurden die kurzen doppelsträngigen siRNAs chemisch synthetisiert, wodurch die Spaltung durch den Dicer übersprungen und der in Abbildung 36 gezeigte Mechanismus erst ab der RISC-Erkennung (*RNA induced silencing complex*) eintritt. An diesem Punkt wird die siRNA durch den RISC erkannt und gebunden. Nach Entwindung wird der Sense-Strang aus dem Komplex freigegeben und somit der RISC aktiviert. Nach Erkennung der passenden mRNA wird diese durch den komplementären Antisense-Strang gebunden und die katalytische

Einheit Argonaut 2 (Ago2) spaltet an einer spezifischen Stelle, wodurch der Schutz der mRNA gestört wird. Die mRNA verfügt dadurch weder über den 5'-Cap noch über den PolyA-Schwanz und der Abbau durch RNAsen findet statt, wodurch das auf ihr codierte Protein nicht mehr exprimiert werden kann. Nach der Wiedergewinnung des RISC können weitere mRNAs gespalten werden.^[169-170]

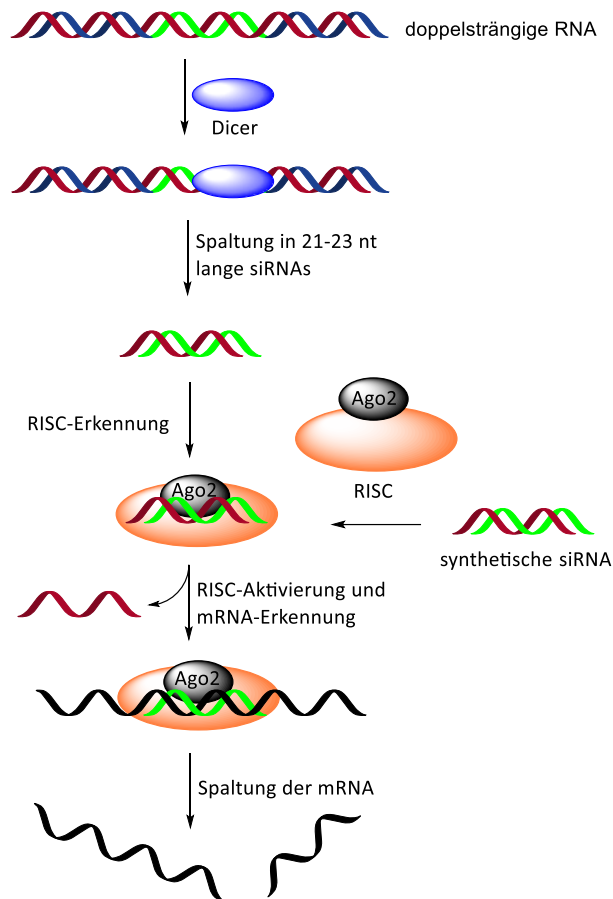


Abbildung 36. Mechanismus der RNA-Interferenz zur Genregulierung durch siRNA.^[169, 171-172]

Die RNAi-Technologie eröffnet, besonders seit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms, ein neues Feld an therapeutischen Möglichkeiten.^[173] So stellt es ein wichtiges Werkzeug zur spezifischen Ausschaltung bzw. Regulierung von Genen dar, deren Genprodukte zu unheilbaren Krankheiten führen.^[168, 174-175] Der gezielte Einsatz solcher auf RNAi basierender Therapeutika setzt jedoch einen effektiven und an spezielle Zellen adressierten Transport voraus.^[176-177] siRNA weist eine geringe Größe, einen hydrophilen Charakter und eine negative Ladung auf. Sie kann daher nicht ohne weiteres die Lipiddoppelschicht der Zellmembran überwinden. Daher wurden verschiedene Methoden,^[172]

wie beispielsweise die Konjugation an oberflächenspezifischen Antikörpern,^[178] der Transport als, mit kationischen Lipiden gebildeter, Lipoplex und die Mikroinjektion entwickelt.^[171]

Um den Mechanismus der RNAi visuell zu verfolgen, wurden die beiden Chromophore **TO** und **TR** bereits in früheren Arbeiten erfolgreich in siRNA eingebracht. Die für das GFP-Gen (GFP: Grün fluoreszierendes Protein) spezifische Sequenz, die mit den beiden Fluorophoren modifiziert war, konnte erfolgreich zur Regulierung des GFP-Proteins verwendet werden.^[39, 42] Die Regulierung dieses Proteins wurde gewählt, da es sich dabei um ein etabliertes System handelt, dessen Regulierung durch Fluoreszenzlöschung visualisiert werden kann. Durch die Modifizierung mit den beiden Farbstoffen wird zusätzlich ermöglicht, die verschiedenen Stadien der siRNA zu verfolgen. Dabei wurde **TO** außerhalb des Erkennungsbereiches in den Antisense-Strang und **TR** in den Sense-Strang eingebaut. Die Weiterentwicklung dieses Systems zeigte, dass der Einsatz zweier photostabiler Farbstoffe und deren postsynthetische Anknüpfung mittels CuAAC zu einer Verbesserung des Kontrastverhältnisses führte, jedoch zur Synthese das zelltoxische Kupfer(I) verwendet werden muss. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die beiden als Energietransferpaar bekannten Fluorophore als Basenanaloga in RNA eingebracht werden. Dafür wird das bereits in DNA optimierte System (siehe Kapitel 3) auf RNA übertragen und anschließend deren optische Charakterisierung durchgeführt sowie in In-vivo-Anwendungen getestet.

4.2 Übertragung des Konzeptes von DNA auf RNA

Die Visualisierung von Vorgängen in der Zelle ist von enormer Wichtigkeit. Bei der Verwendung von Sonden, die auf DNA-Basis beruhen, kann jedoch deren Toxizität für die Zelle problematisch sein, da diese DNA als Fremdkörper identifiziert und je nach Konzentration den Zelltod einleitet. Bei RNA hingegen ist diese Cytotoxizität weniger stark gegeben. Ein weiterer Unterschied zwischen DNA und RNA liegt in deren unterschiedlich ausgebildeten Duplex-Struktur. Bei der DNA handelt es sich um eine B-Helix, deren Zucker in einer C₂'-endo-Konformation vorliegen, wodurch eine große flache und eine kleine tiefe Furche entstehen. RNA hingegen bildet eine A-Helix aus, bei der die Zucker eine C₃'-endo-Konformation annehmen, wodurch es zur Ausbildung einer tiefen großen und einer flachen kleinen Furche kommt. (siehe Abbildung 37).

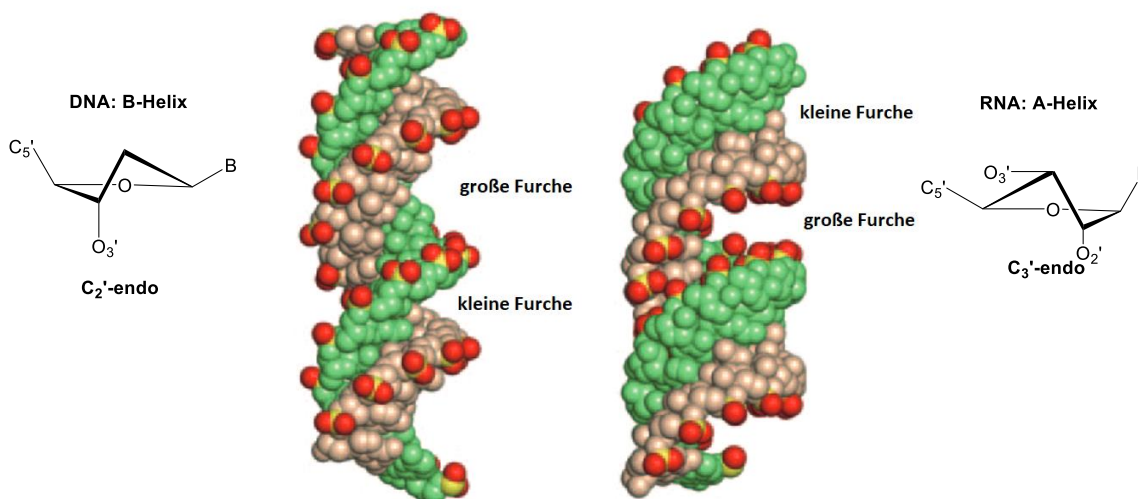


Abbildung 37. Strukturen der Zuckerkonformationen und Kalottenmodell der Strukturen der B-Helix (links) und A-Helix (rechts). Adapted/Translated by permission from Nature, Nature Reviews Molecular Cell Biology, ^[169], Copyright 2007.

Bei Betrachtung der gesamten Helix erscheint die RNA im Gegensatz zur DNA gestaucht und breit. Dadurch sind auch die Ganghöhen (DNA: 3.54 nm; RNA: 2.53 nm) und Durchmesser (DNA: 2.37 nm; RNA: 2.55 nm) unterschiedlich. Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.2.2), hat die Helix-Struktur einen immensen Einfluss auf die optischen Eigenschaften von angeknüpften Fluorophoren, da sie je nach Oligonukleotid in unterschiedlich geformte Furchen dirigiert werden bzw. bei Interkalation unterschiedliche Orientierungen und Distanzen zueinander einnehmen. Daher wurde nicht nur das in DNA optimierte System

DNA0-AT auf RNA übertragen, sondern auch das zu **DNA1** analoge System (Sequenzen siehe Abbildung 38).

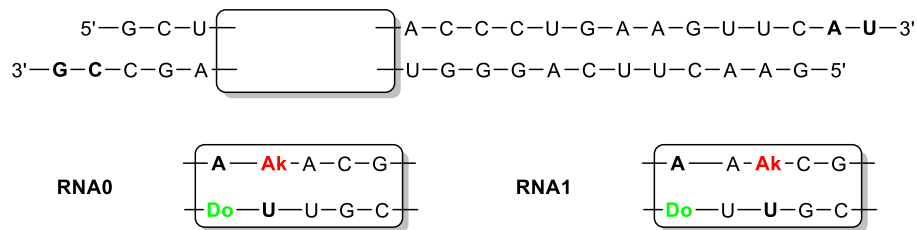


Abbildung 38. Sequenzen der synthetisierten RNA-Duplexe **RNA0** und **RNA1**.

Die Synthese der beiden Farbstoffbasenanaloga **9** und **10** verlief analog zu denen, die in DNA inkorporiert wurden. Nach erfolgreicher Festphasensynthese, unter Verwendung der *Ultramild*-Methode, wurden die Oligonukleotide mit einem Ammoniumhydroxid-Ethanol-Gemisch von 3:1 anstatt der methanolischen Kaliumcarbonatlösung abgespalten, da die Hydroxyfunktion der 2'-Position der bereits vorinstallierten Base auf der festen Phase nicht als Silylether, sondern als Acetylester geschützt ist und daher eine Abspaltung unter den für DNA kompatiblen Bedingungen nicht gegeben ist. Nach erfolgter Abspaltung aller Schutzgruppen wurde die optische Charakterisierung durchgeführt.

Wie auch bei den Duplexen der DNA sind die typischen Absorptionsmaxima beider Farbstoffe zu sehen (siehe Abbildung 39). Die Extinktionskoeffizienten beider Fluorophore unterscheiden sich jedoch gravierend. Diejenigen von **RNA0** sind deutlich größer als die von **RNA1**. Des Weiteren ist die Absorption des Donors bei **RNA1** um 9 nm blauverschoben, wohingegen die Wellenlänge der Akzeptorabsorption sich nicht verändert (siehe Tabelle 5).

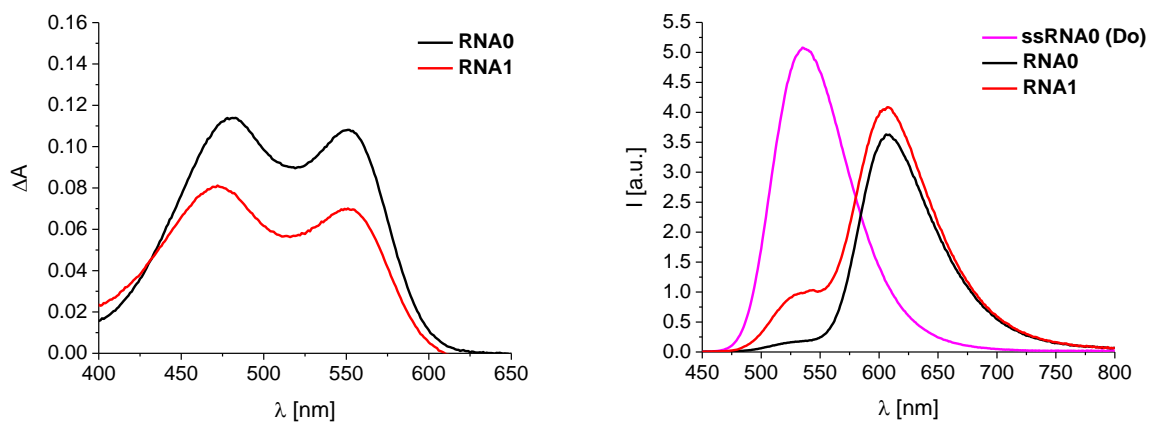


Abbildung 39. Absorption (links) und Fluoreszenz (rechts) der beiden synthetisierten Duplexe **RNA0** und **RNA1**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

Die Auswirkungen der Absorptionsunterschiede sind deutlich in den Emissionsspektren zu sehen. So wird bei beiden Konstrukten die Donoremission gelöscht, jedoch im Fall von **RNA0** effektiver, was auch aus den Quantenausbeuten des Donors ersichtlich ist (siehe Abbildung 39 rechts und Tabelle 6).

Tabelle 5. Absorptionseigenschaften der untersuchten Duplexe **RNA0** und **RNA1**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

RNA	λ_{\max} Do [nm]	λ_{\max} Ak [nm]	$\Delta\lambda$ ^[a] [nm]	A_{\max} ^[b]	$A_{\max ss}$ ^[c]	$A_{\max}/A_{\max ss}$
RNA0	481	551	70	1.05	0.58	1.8
RNA1	472	551	79	1.16	0.81	1.4

[a] $\Delta\lambda = \lambda_{\max Do} - \lambda_{\max Ak}$; [b] $A_{\max} = A_{\max Do} / A_{\max Ak}$; [c] $A_{\max ss} = A_{\max ss Do} / A_{\max ss Ak}$.

Auffällig ist außerdem, dass sich die Intensitäten der Akzeptorfluoreszenz kaum unterscheiden, jedoch die ineffiziente Löschung der Donorfluoreszenz zu zwei sehr unterschiedlichen Kontrastverhältnissen führt. So nimmt durch das zusätzliche Basenpaar das Kontrastverhältnis I_{610}/I_{535} um 80 % ab und der Verstärkungsfaktor f ebenfalls. Wie bereits bei den abstandsabhängigen DNA-Duplexen zu beobachten war, findet eine Destabilisierung der Doppelhelix mit zunehmendem Abstand der beiden Chromophore statt, die jedoch im Falle der RNA weniger drastisch ist (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6. Optische Eigenschaften der synthetisierten Duplexe **RNA0** und **RNA1**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

RNA	I_{535}	I_{610}	I_{610}/I_{535}	f	$\Phi_{F Do}$ ^[a]	$\Phi_{F Ak}$ ^[b]	T_m [°C]
RNA0	0.18	3.59	19.8	99	0.002	0.25	82
RNA1	0.98	4.06	4.1	21	0.019	0.22	80

[a] $\lambda_{exc} = 435$ nm, $\lambda_{em} = 450-550$ nm; [b] $\lambda_{exc} = 435$ nm, $\lambda_{em} = 550-800$ nm.

Die genauere Betrachtung der Emissionsintensitäten der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge zeigt, dass im Fall der RNA die Intensitäten der Doppelstränge sehr viel höher sind als im Einzelstrang. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass im Einzelstrang eine undefinierte Struktur vorliegt, in der der Fluorophor der Umgebung ausgesetzt ist und sich nicht optimal ausrichten kann. Bei Ausbildung des Doppelstranges interkaliert der Farbstoff in den Basenstapel und wird so von der Umgebung abgeschirmt. Durch die

gestauchte und, im Gegensatz zu DNA, breitere Struktur scheint es zu einer optimalen Ausrichtung des Fluorophors zu kommen, wodurch die Emissionsintensität weiter gesteigert werden kann (siehe Abbildung 40).

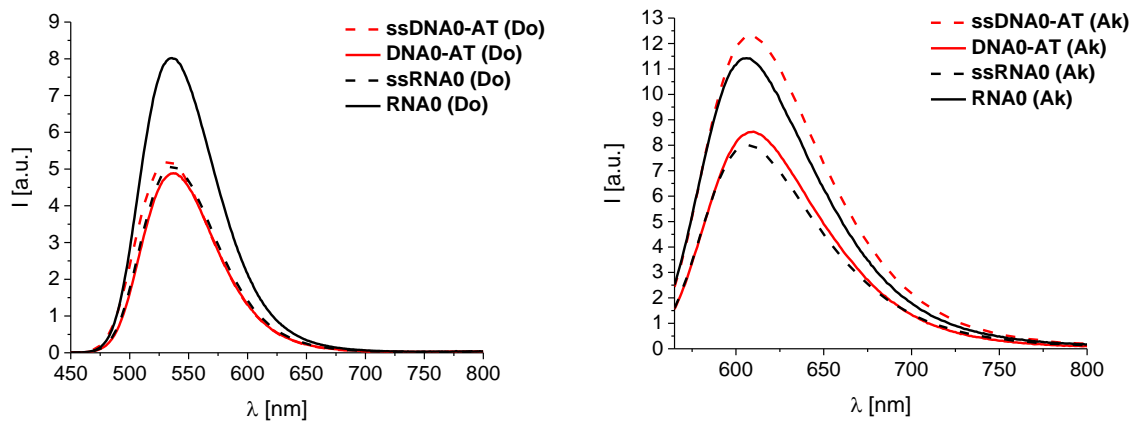


Abbildung 40. Fluoreszenz der donormodifizierten (links) und akzeptormodifizierten (rechts) Einzel- und Doppelstränge von **DNA0-AT** und **RNA0** im Vergleich. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

Die Emissionseigenschaften in DNA hingegen verhalten sich anders (siehe Abbildung 40). Die des donormodifizierten Einzel- und Doppelstranges zeigen nur eine geringfügige Veränderung. So findet eine bathochrome Verschiebung um 5 nm des Emissionsmaximums des Doppelstranges statt und die Intensität nimmt leicht ab. Die Emissionsintensitäten des Akzeptors unterscheiden sich weitaus stärker. Der Akzeptor ist im Gegensatz zum Donor größer, dadurch kann es im Doppelstrang zu stärkeren Wechselwirkungen mit den Gegenbasen sowie Nachbarbasen kommen, wodurch es durch Molekülstöße zu einem Verlust an Energie kommen kann. Diese Wechselwirkungen, die auch im donormodifizierten Doppelstrang eine Rolle spielen, rühren vermutlich von der gestreckten Helixstruktur her und führen zu einer Löschung der Fluoreszenz.

Das unterschiedliche Verhalten der Fluorophore in DNA und RNA kann auch in den Absorptionsspektren beobachtet werden. Der Extinktionskoeffizient beider Farbstoffe ist in RNA um etwa 30 % größer als in DNA, was sich, wie bereits erwähnt, auf die Emissionsintensitäten der einfachmodifizierten Oligonukleotide auswirkt. Außerdem zeigt **RNA0** ein um 6 nm hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum des Donors, bei nur geringfügiger Veränderung desjenigen des Akzeptors. Daraus resultiert ein geringeres

Kontrastverhältnis von **RNA0**, wobei ein weiterer Faktor dafür auch die Veränderung des Absorptionsquotienten im Duplex ist (siehe Abbildung 41 und Tabelle 5).

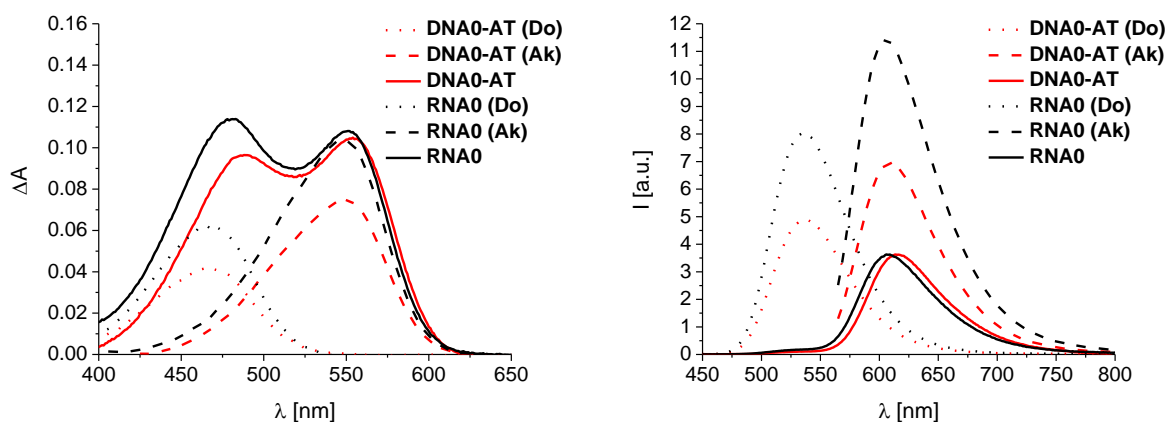


Abbildung 41. Vergleich der Absorption (links) und Fluoreszenz (rechts) des besten RNA- und DNA-Duplexes. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

Das Emissionsspektrum der DNA weist im Gegensatz zur RNA ein um 10 nm bathochrom verschobenes Emissionsmaximum des Akzeptors auf. Dieses resultiert aus der bereits bathochromen Verschiebung von **DNA0-AT (Ak)**.

Die Übertragung des Konzeptes von DNA auf RNA konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der direkte Vergleich der beiden sequenzgleichen Nukleinsäuren zeigt Unterschiede auf, die jedoch auf die verschieden ausgebildeten Duplex-Strukturen zurückgeführt werden können. Trotz des etwas geringeren Kontrastverhältnisses I_{610}/I_{535} von 20 und Verstärkungsfaktors f von 99 eignet sich **RNA0** hervorragend als Kandidat für Experimente in lebenden Zellen sowie Messungen von Fluoreszenzlebenszeiten, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

4.3 Fluoreszenzlebenszeiten

Um die optisch optimierte RNA als siRNA in der lebenden Zelle zu verwenden, ist neben dem Verhalten des doppelt modifizierten Duplexes auch das der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge sehr wichtig. Die größte Stabilisierung des RNA-Duplexes wird erreicht, wenn dieser doppelt modifiziert ist, was die Schmelztemperaturen von **RNA0 (Do)**, **RNA0 (Ak)** und **RNA0** belegen. Die bereits beschriebenen Emissionsintensitätsunterschiede (siehe Kapitel 4.2) sind auch sehr deutlich aus den Quantenausbeuten ersichtlich (siehe Tabelle 7). So nimmt die Quantenausbeute des akzeptormodifizierten Stranges nach Hybridisierung um 16 % und die

Emissionsintensität um 42 % zu. Der donormodifizierte Strang zeigt sogar eine Zunahme der Quantenausbeute um 46 % und der Emissionsintensität um 59 %.

Tabelle 7. Kontrastverhältnisse, Quantenausbeuten und Schmelztemperaturen der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge von **RNAO** sowie von **RNAO**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

RNA	I_{610}/I_{535}	$\Phi_{F\ Do}^{[a]}$	$\Phi_{F\ Ak}^{[b]}$	T_m [°C]
ssRNAO (Do)	0.2	0.48	-	-
RNAO (Do)	0.2	0.70	-	80
ssRNAO (Ak)	99	-	0.38	
RNAO (Ak)	217	-	0.44	79
RNAO	20	0.002	0.25	82

[a] $\lambda_{exc} = 435$ nm, $\lambda_{em} = 450$ -550 nm; [b] $\lambda_{exc} = 435$ nm, $\lambda_{em} = 550$ -800 nm.

Dieses Verhalten der Emissionen ist sehr wichtig, um die siRNA in der Zelle zu verfolgen und ihre Genregulierungsfähigkeiten zu testen. Nach der Erkennung und Bindung der doppelsträngigen siRNA durch den RISC wird der akzeptormodifizierte Sense-Strang aus dem Komplex ausgeschleust und die donormodifizierte RNA liegt als Einzelstrang vor, wodurch die Emissionsintensität des Donors, aufgrund des fehlenden Energietransfers, erhöht ist. Anschließend findet eine Hybridisierung mit der Ziel-mRNA statt und impliziert so eine weitere Zunahme der Emissionsintensität durch Ausbildung des Doppelstranges. Diese drei Zustände weisen unterschiedliche Emissionsintensitäten und Quantenausbeuten auf, sodass eine Differenzierung der Stadien möglich wird. Bei einer Verringerung der Quantenausbeute kommt es zu einem verstärkten Energieverlust durch nichtstrahlende Prozesse und so zu einer Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit (siehe Kapitel 2.1, Formel IV), da diese beiden Größen direkt voneinander abhängig sind. Eine Möglichkeit, Fluoreszenzlebenszeiten innerhalb von lebenden Zellen zu ermitteln, ist die Verwendung der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM: *fluorescence lifetime imaging microscopy*). Somit könnte neben der Genregulierung, welche durch Fluoreszenzlöschung zu beobachten ist, zusätzlich ein Nachweis zum Bindungszustand der siRNA in der lebenden Zelle realisiert werden.

In Zusammenarbeit mit *M. Bichelberger* aus der Arbeitsgruppe *Nienhaus* wurden die Lebenszeiten der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge sowie des doppelt

modifizierten Duplexes bestimmt, um die Eignung des Duplexes für die Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie in lebenden Zellen zu ermitteln. Dafür wurde eine zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie verwendet, die auf der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beruht. Dafür wird die Probe mit einem Laserpuls angeregt und anschließend die am Detektor ankommenden Photonen zu jedem Zeitpunkt gezählt. Der Logarithmus der Anzahl der Photonen wird über der Zeit aufgetragen, wodurch die Proben je nach Fluoreszenzlebenszeit ein unterschiedliches Abklingverhalten aufweisen (siehe Abbildung 42).

Das Abklingverhalten kann nicht durch eine einfach exponentielle Kurve dargestellt werden, was auf mehrere Fluoreszenzlebenszeiten der Fluorophore hindeutet. Diese resultieren aus den verschiedenen wechselwirkenden Orientierungen der Farbstoffe mit der RNA. Die hier dargestellten Abklingkurven der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge sind biexponentiell gefittet.

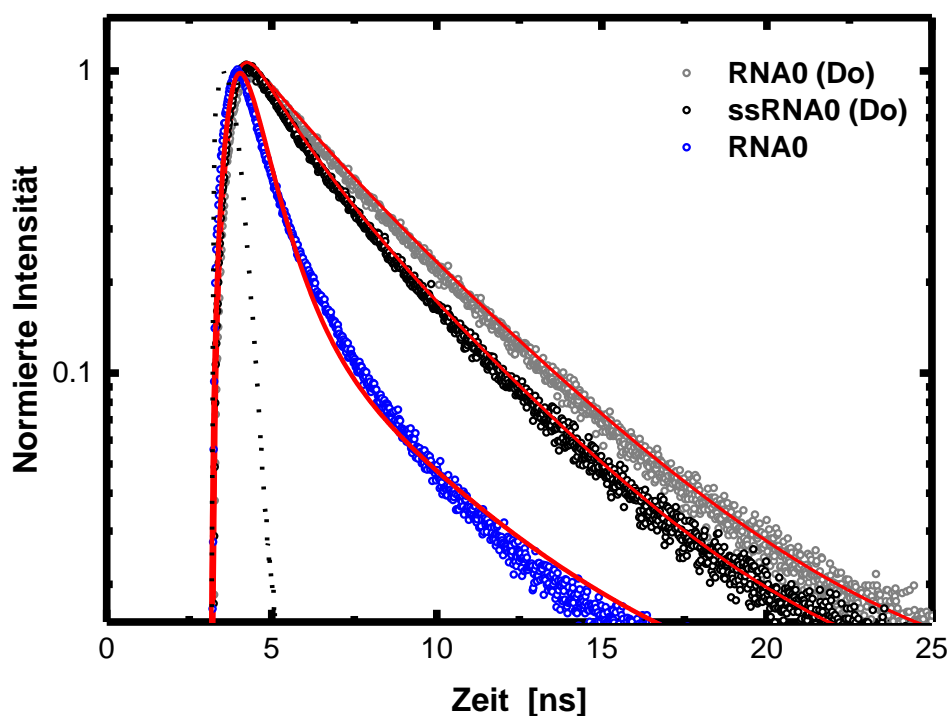


Abbildung 42. Fluoreszente Abklingkurven des Donorfarbstoffes in **RNA0 (Do)**, **ssRNA0 (Do)** und **RNA0**; rote Linien: bi- bzw. triexponentieller freier Fit, schwarze gestrichelte Linie: IRF (*impulse response function*).

Bei den Lebenszeiten des Donors im Einzel- und Doppelstrang handelt es sich einerseits um eine sehr kurze Lebenszeit, die je nach Konstrukt bei 1.3 und 1.8 ns liegt und andererseits um eine längere Lebenszeit bei 3.8 und 4.2 ns. Die Population der jeweiligen Lebenszeit ist im Fall des Einzelstranges **ssRNA0 (Do)** etwa gleich. Beim einfach modifizierten Doppelstrang **RNA0 (Do)** hingegen verfallen 73 % auf die längere Lebenszeit. Die längste durchschnittliche Lebenszeit τ_{av} mit 3.6 ns besitzt **RNA0 (Do)** (siehe Tabelle 8). Das durchschnittliche Abklingverhalten der Fluoreszenz des Einzelstranges ist schneller und könnte der größeren Flexibilität des Farbstoffes und demzufolge möglicherweise dem Energieverlust durch strahlungslose Vorgänge geschuldet sein.

Das fluoreszente Abklingen des doppelt modifizierten Duplexes **RNA0** kann nicht durch zwei exponentielle Funktionen dargestellt werden, wodurch die gemessenen Lebenszeiten nicht für die Berechnung der FRET-Effizienz verwendet werden können. Um eine Näherung zu erhalten, wurden diese Lebenszeiten durch eine triexponentielle Abklingkurve dargestellt. Dabei wurde angenommen, dass die kürzeste Lebenszeit von 0.1 ns die Lebenszeit des Donors wiedergibt, der in den Energietransfer involviert ist und die längeren mit nicht interagierenden Donormolekülen zusammenhängen.

Tabelle 8. Gemessene Fluoreszenzlebenszeiten und Populationen des einfach donormodifizierten Einzel- und Doppelstranges und des doppelt modifizierten RNA-Duplexes.

RNA	τ_1 [ns]	f_1 [%]	τ_2 [ns]	f_2 [%]	τ_3 [ns]	f_3 [%]	τ_{av} [ns]
ssRNA0 (Do)	1.3	46	3.8	54			2.6 ± 0.1
RNA0 (Do)	1.8	27	4.2	73			3.6 ± 0.2
RNA0	0.1	84	1.0	12	3.1	4	0.3 ± 0.1

Für diese Näherung wurden die längeren Lebenszeiten sowie deren Populationen auf die Parameter festgesetzt, die mithilfe des einfach modifizierten Doppelstranges erhalten wurden. Die genauere Betrachtung der Abklingkurven (siehe Abbildung 42) zeigt jedoch, dass die Annahme als triexponentieller Fit das gemessene Abklingverhalten nicht genau beschreibt. Somit ist die Annäherung zwar geeignet zur Beschreibung der Daten, jedoch nicht um eine quantitative Aussage über den erhaltenen FRET zu treffen. Aufgrund dieser Problematik wurde die offensichtliche FRET Effizienz von 90 % mit folgender Formel berechnet:

$$E_{\text{app}} = \frac{I_{\text{Ak}}}{I_{\text{Do}} + I_{\text{Ak}}} \quad (\text{V})$$

E_{app}	offensichtliche FRET Effizienz
I_{Ak}	Emissionsintensität des Akzeptors
I_{Do}	Emissionsintensität des Donors

Auch das Verhalten des Akzeptors zeigt eine ähnliche Tendenz und besteht aus je zwei Lebenszeiten. Durch Hybridisierung mit dem passenden Gegenstrang verlängert sich die Lebenszeit, was möglicherweise auf einen geringeren Energieverlust durch strahlungslose Übergänge zurückgeführt werden kann. Der Akzeptor im doppelt modifizierten Duplex weist ebenso eine geringere Lebenszeit auf, was mit den Emissionsintensitäten und Quantenausbeuten übereinstimmt (siehe Tabelle 9 und Tabelle 7).

Tabelle 9. Lebenszeiten des einfach akzeptormodifizierten Einzel- und Doppelstranges sowie die des doppelt modifizierten Duplexes.

RNA	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	τ_{av} [ns]
ssRNA0 (Ak)	1.1	3.8	2.7 ± 0.1
RNA0 (Ak)	1.6	4.1	3.3 ± 0.1
RNA0	0.9	3.6	2.3 ± 0.1

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der RNA-Duplex für die Verwendung in der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie geeignet ist. Aufgrund der signifikanten Verkürzung der durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeit des Donors auf 0.3 ns im Duplex sind die Voraussetzungen für eine Verfolgung des siRNA-Transportes sowie Abbau in der lebenden Zelle gegeben. Des Weiteren nimmt die Lebenszeit durch Dissoziation zum Einzelstrang zu und wird durch Hybridisierung mit der mRNA weiter gesteigert. Die letztgenannte Eigenschaft ist sehr nützlich, da sie die Detektion der Bindung der mRNA an die siRNA mittels Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie ermöglicht. Zur weiteren Untersuchung der biologischen Anwendbarkeit des RNA-Duplexes wurde dieser Experimenten in der lebenden Zelle unterworfen, welche im nächsten Kapitel genauer beschrieben werden.

4.4 In-vivo-Experimente

Die Untersuchungen des synthetisierten doppelt modifizierten RNA-Duplexes **RNAO** in lebenden Zellen ermöglichen die Beurteilung dieser als potentielle bioanalytische Sonde. Um die Visualisierung *in vivo* zu testen, wurden 5 pmol **RNAO** unter Verwendung von ScreenFect®A als Transfektionsreagenz auf 2×10^4 HeLa-Zellen transfiziert und die Aufnahme sowie der Abbau über einen Zeitraum von 48 h verfolgt (siehe Abbildung 43).

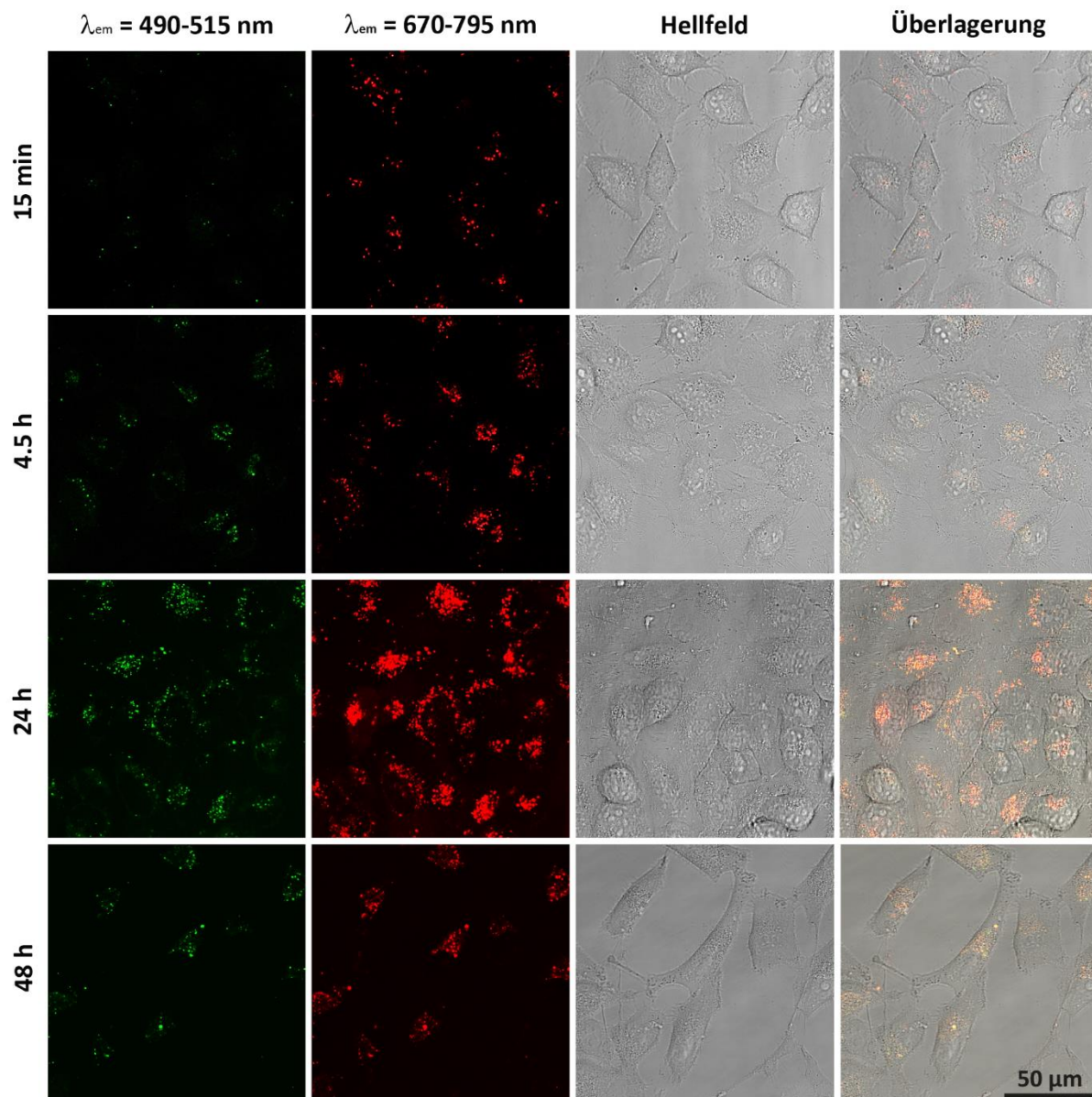


Abbildung 43. Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Transfektion von 5 pmol **RNAO** nach 15 min (erste Zeile), 4.5 h (zweite Zeile), 24 h (dritte Zeile) und 48 h (vierte Zeile). Die Fluoreszenz der beiden Fluorophore wurde im ersten und zweiten Kanal aufgezeichnet. Die dritte Spalte zeigt das Hellfeld und die vierte die Überlagerung aller drei Kanäle. Es wurde mit $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Ionen-Laser) angeregt.

Dabei wurde mithilfe eines Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskops die RNA mit geeigneter Wellenlänge ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) angeregt und anschließend im Donor- ($\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}515 \text{ nm}$) und Akzeptorkanal ($\lambda_{\text{em}} = 670\text{-}790 \text{ nm}$) detektiert. Die Aufnahmen nach Inkubationszeiten von 15 min, 4.5 h, 24 h und 48 h zeigen eine erfolgreiche Transfektion der RNA in endosomale Kompartimente, worauf die punktuelle Verteilung der Fluoreszenz hinweist. Dabei kann die Fluoreszenz des Donors (erste Spalte) und Akzeptors (zweite Spalte), die Hellfeldaufnahme (dritte Spalte) und die Überlagerung der ersten drei Kanäle (vierte Spalte) betrachtet werden. Bereits nach 15 min ist eine geringe Aufnahme der RNA in endosomale Kompartimente zu beobachten, die bis zu 24 h stark zunimmt. Fluoreszenzsignale können sowohl im Donor als auch im Akzeptorkanal wahrgenommen werden, was darauf hindeutet, dass bereits nach 4.5 h ein gewisser Anteil des Duplexes dehybridisiert vorliegt. Nach etwa 24 h ist der Anteil an transfizierter RNA am höchsten und wird anschließend von der Zelle abgebaut, was durch die Aufnahme nach 48 h bestätigt wird, da weitaus weniger Fluoreszenzsignale wahrgenommen werden können. Die vorgestellten Experimente in lebenden Zellen wurden in Zusammenarbeit mit *B. Olshausen* aus der Arbeitsgruppe *Schepers* und *Dr. F. Rönicke* durchgeführt.

Der donormodifizierte Einzelstrang der synthetisierten RNA ist komplementär zu Teilen der GFP-kodierenden mRNA und ist daher in der Lage, die Expression dieser zu regulieren. Um die Aktivität der in dieser Arbeit synthetisierten siRNA zu überprüfen, wurden 4.25 pmol **RNAO** in GFP-HeLa-Zellen transfiziert. Zur Visualisierung der Genregulierungsfähigkeit wurden 24 h nach der Transfektion Aufnahmen mittels Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie gemacht (siehe Abbildung 44 dritte Zeile). Zum Vergleich wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der die Zellen keiner siRNA ausgesetzt waren und eine Positivkontrolle, bei der eine siRNA transfiziert wurde, die nachweislich eine Regulierung des GFP-Gens initiiert (Dharmacon® GFP-Duplex I, siehe Abbildung 44 erste und zweite Zeile). Deutlich zu sehen ist, dass auch in den Aufnahmen der Negativkontrolle, die die Expression des GFP nicht regulieren sollte, helle und weniger helle Zellen detektiert werden können. Ebenso zeigen die Aufnahmen der Positivkontrolle sowohl regulierte wie auch nicht regulierte Zellen. Dies könnte auf eine unvollständige Freisetzung der siRNA ins Cytosol zurückgeführt werden. Bei Betrachtung der Zellen, die mit **RNAO** behandelt wurden, sind, wie auch bei den Kontrollen, sowohl regulierte wie auch nicht regulierte Zellen zu sehen. Die Aufnahme der siRNA über Endocytose in endosomale Vesikel ist deutlich anhand der punktuellen roten Fluoreszenz in

der zweiten Spalte zu sehen. Die Bereiche, die nicht zu einer Regulation der GFP-Expression geführt haben und eine starke grüne Fluoreszenz zeigen, weisen dagegen eine deutliche Rotfärbung des gesamten Cytosols auf. In diesen Zellen wurde demnach die siRNA ins Cytosol freigegeben, wodurch eine Regulierung ermöglicht werden würde. Interessanterweise ist diese Rotfärbung des Cytosols nicht in den Zellen erkennbar, deren grüne Fluoreszenz nur schwach oder gar nicht vorhanden ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die siRNA bereits ins Cytosol freigegeben, vom RISC erkannt und gebunden wurde und somit die Expression regulierte. Passend dazu sollte die Regulierung der noch fluoreszierenden Zellen nach weiterer Inkubation stattfinden. Mikroskopische Aufnahmen nach 48 h wiesen jedoch keine Fluoreszenz im Akzeptorkanal auf und es war eine hohe Zellsterblichkeit gegeben, weswegen keine Bestätigung dieser Aussage erzielt werden konnte.

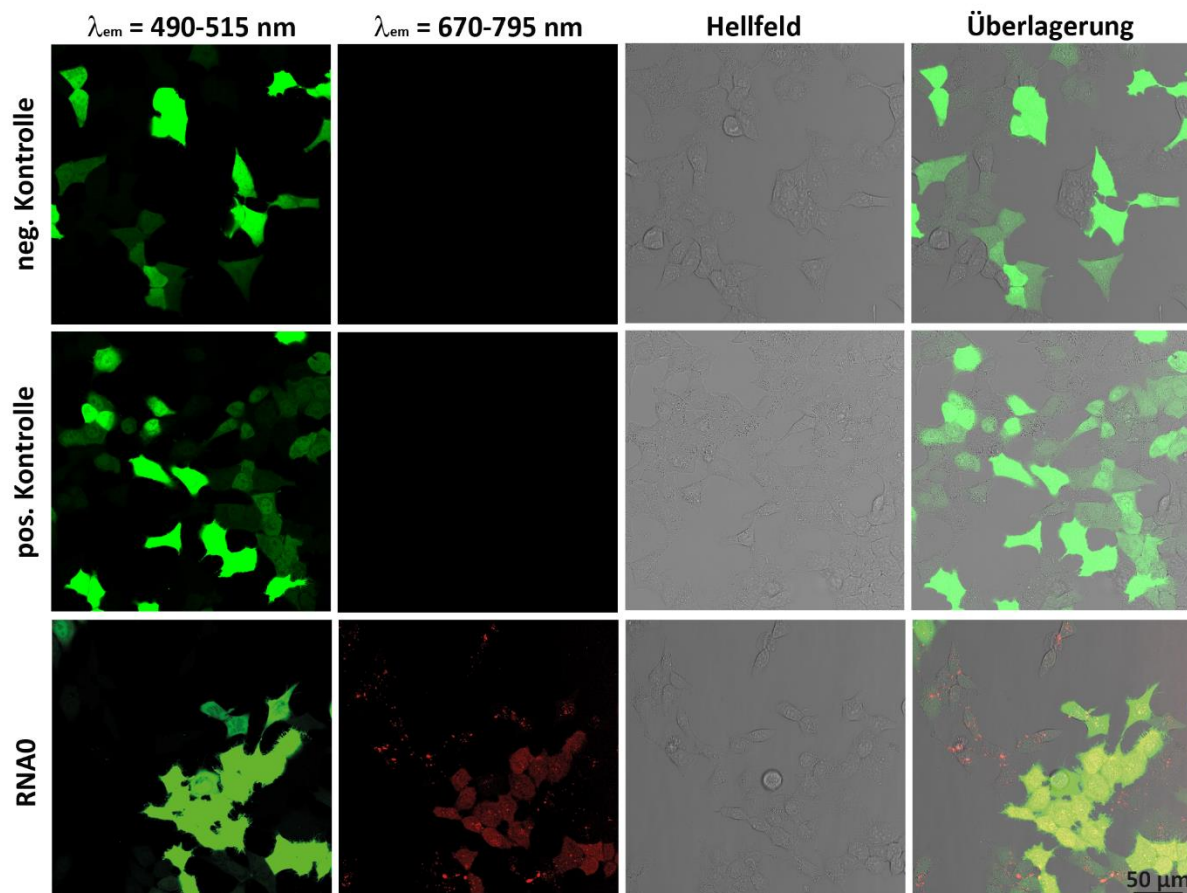


Abbildung 44. Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von HeLa-GFP-Zellen (erste Zeile) 24 h nach der Transfektion mit 4.25 pmol einer kommerziellen Positivkontrolle (Dharmacon® GFP-Duplex I, zweite Zeile) und **RNAi** (dritte Zeile). Die Fluoreszenz der beiden Fluorophore wurde im ersten und zweiten Kanal aufgezeichnet. Die dritte Spalte zeigt das Hellfeld und die vierte die Überlagerung aller drei Kanäle. Es wurde mit $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Ionen-Laser) angeregt.

Die Transfektion von **RNAO** in lebende GFP-HeLa-Zellen verlief erfolgreich. Da jedoch die Positiv- als auch die Negativkontrolle sowohl grün fluoreszierende wie auch nicht fluoreszierende Zellen aufweist, kann keine endgültige Aussage zur Genregulierungsfähigkeit von **RNAO** getroffen werden.

Im Anschluss wurde die Toxizität des verwendeten RNA-Duplexes mittels eines MTT-Toxizitätstests bestimmt. Dafür wurden drei verschiedene Konzentrationen des Duplexes **RNAO** transfiziert und für 72 h inkubiert. Um den Einfluss des verwendeten Transfektionsreagenzes ScreenFect® A zu beurteilen, wurde dieses mit der für die höchste RNA-Konzentration benötigten Menge getestet. Der Vergleich zeigt, dass die Toxizität, wie erwartet, mit zunehmender Konzentration an RNA ansteigt. Es ist jedoch sehr deutlich, dass die Toxizität hauptsächlich durch das Transfektionsreagenz verursacht wird. Insbesondere beim Vergleich der Zellproliferationen der **Kontrolle SF-A** und **RNAO** mit der Konzentration 0.15 μM wird ersichtlich, dass hauptsächlich das Transfektionsreagenz für die hohe Zellsterblichkeit verantwortlich ist (siehe Abbildung 45).

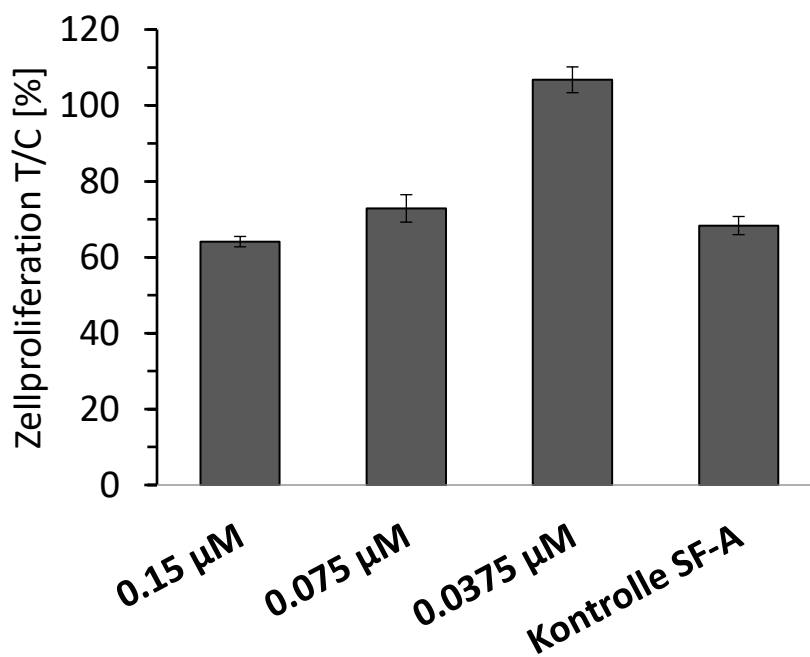


Abbildung 45. Konzentrationsabhängiger Toxizitätstest von **RNAO**. Es wurden Konzentrationen von 0.0375 μM , 0.075 μM und 0.15 μM getestet. **Kontrolle SF-A** zeigt die Toxizität der Menge an Transfektionsreagenz, dass für eine Konzentration von 0.15 μM **RNAO** benötigt wird. Die Toxizität ist in Bezug auf unbehandelte Zellen angegeben.

4.5 Zusammenfassung

Die beiden Sequenzen der RNA-Duplexe **RNA0** und **RNA1** konnten erfolgreich durch den Einbau der Farbstoffbasenanaloge über Festphasensynthese verwirklicht werden. Die optische Charakterisierung zeigte ein hervorragendes Kontrastverhältnis I_{610}/I_{535} von 20 und einen Verstärkungsfaktor f von 99 für **RNA0** und qualifizierte dieses dadurch für Fluoreszenzlebenszeitmessungen. Diese Messungen zeigten, dass die drei Stadien, die für die RNA-Interferenz essentiell sind, verschiedene Lebenszeiten aufweisen (siehe Abbildung 46). So wären weiterführende Experimente unter Verwendung der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie in lebenden Zellen durchführbar. Die offensichtliche FRET-Effizienz E_{app} des untersuchten RNA-Duplexes liegt bei 90 %.

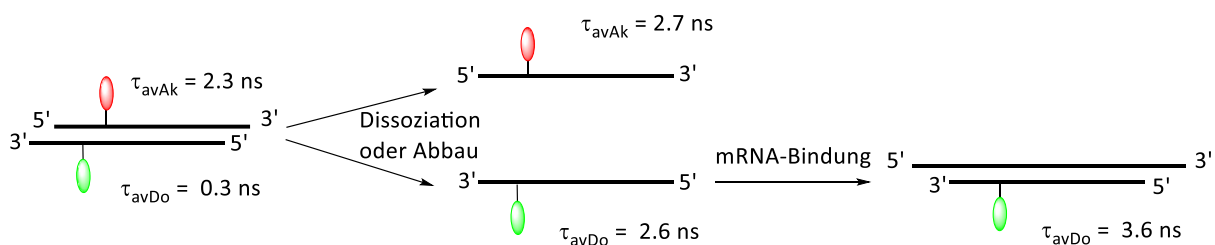


Abbildung 46. Fluoreszenzlebenszeiten der verschiedenen zu durchlaufenden Stadien bei der Regulation der Expression. Die für die Verfolgung der Regulation essentiellen Stadien sind der mit dem Donor einfach modifizierte Einzel- und Doppelstrang sowie der doppelt modifizierte **RNA0**-Duplex.

Die weiteren Experimente wurden in lebenden Zellen durchgeführt, um die Aufnahme der RNA in Zellen zu testen und die Regulierungsfähigkeit der synthetisierten RNA am GFP-Gen herauszufinden. Die Aufnahme der siRNA in die Zelle wurde erfolgreich durchgeführt und konnte auch in GFP-exprimierenden Zellen reproduziert werden. Über die Regulation der GFP-Expression kann keine endgültige Aussage getroffen werden, da sowohl die Positiv- wie auch die Negativkontrolle keine eindeutigen Rückschlüsse ziehen lassen. Da es sich bei der verwendeten Sequenz jedoch um eine bereits von *C. Holzhauser* positiv getesteten siRNA-Sequenz handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression prinzipiell reguliert werden kann. Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, sollten die Experimente unter Verwendung anderer Transfektionsreagenzien und -methoden wiederholt werden, damit eine effektive Aufnahme in das Cytosol der Zellen garantiert werden kann. Eine weitere Möglichkeit, deutlichere Ergebnisse zu erhalten, wäre die Verwendung anderer Auslesungsmethoden, die nicht auf der Fluoreszenzmikroskopie beruhen.

5 Wellenlängenverschiebende Sonden in Aptameren

5.1 Einführung

Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäuren, die eine Substratbindungsstelle mit hoher Affinität und Spezifität gegenüber ihren Zielmolekülen aufweisen. In Abwesenheit des Zielmoleküls liegen sie als ungeordnete Einzelstränge vor, die nach Erkennung eine definierte dreidimensionale Struktur ausbilden, wodurch dieses gebunden wird.

Ellington und *Szostak* berichteten 1990 über die Isolierung von kurzen RNA-Strängen, die in der Lage waren, kleine organische Farbstoffe zu binden.^[179] Sie nannten diese Einzelstränge Aptamere, eine Wortneuschöpfung, die aus dem lateinischen Ausdruck *aptus* (passen) und dem griechischen Wort *meros* (Teil) zusammengesetzt ist. Zur gleichen Zeit beschrieben *Tuerk* und *Gold* den Selektionsprozess von Bakteriophage-T4-DNA-Polymerasen bindenden RNA-Molekülen, den sie als SELEX-Prozess (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) bezeichneten.^[180] Dabei erfolgt die Selektion, ausgehend von einer Oligonukleotidbibliothek (ca. 10^{15} - 10^{16} Sequenzen), durch Inkubation mit dem Zielmolekül, anschließender Trennung der nicht bindenden von den bindenden Sequenzen und Amplifizierung der bindenden Sequenzen mittels PCR. Die daraus entstehende Bibliothek bildet die Grundlage eines erneuten Zyklus, wobei diese Vorgehensweise solange wiederholt wird, bis ein Aptamer mit einer ausreichend guten Affinität und Selektivität ermittelt worden ist.^[180]

Als Zielmoleküle können neben kleinen Molekülen, wie Metallionen,^[181] Adenosin,^[49-50, 182] organische Farbstoffe^[183] oder Steroide^[184] auch große Moleküle wie Peptide bzw. Proteine,^[185-186] Krebszellen^[187] oder Antibiotika^[188] dienen. Die Bindung erfolgt dabei durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen mit den Aromaten der Oligonukleotide und elektrostatische Wechselwirkungen.

Der Vorteil oligonukleotidbasierter Aptamere gegenüber Antikörpern ist die chemische Festphasensynthese. So ist das Aptamer in großen Mengen erhältlich und ermöglicht es zusätzliche chemische Modifikationen an den Oligonukleotiden vorzunehmen. Auf diese Weise können spezielle Modifikationen für eine erhöhte Selektivität eingesetzt und durch die Einbringung von Fluorophoren Aptasensoren generiert werden.^[189] Ein von *Mayer et al.*

weiterentwickelter SELEX-Prozess, das sogenannte „Click“-SELEX-Verfahren, ermöglicht die modulare Einbringung von chemischen Gruppen während des SELEX-Prozesses. Die chemischen Modifikationen werden dabei vor dem Selektionsschritt mittels CuAAC in das Oligonukleotid eingebracht und im Amplifikationsschritt wieder entfernt. Dadurch können Komplikationen, die aufgrund enzymatischer Inkompatibilität auftreten, vermieden und eine Vielzahl verschiedener Funktionalitäten eingeführt werden.^[190-191]

Zur Echtzeit-Verfolgung kleiner Moleküle in lebenden Zellen werden häufig genetisch kodierte Sensoren verwendet, die typischerweise aus fluoreszenten Proteinen bestehen, die die Zielmolekülbindende Domäne umgeben. Die Bindung des Zielmoleküls induziert eine konformative Änderung, die eine Reorganisation des fluoreszenten Proteins induziert und dadurch detektiert werden kann.^[192] Im Gegensatz dazu bauen die RNA-Aptamere *Broccoli*^[193] und *Spinach*^[194-196] auf einem modularen Ansatz auf.^[197] Diese RNA-basierenden Aptamere bestehen dabei aus einem zielmolekülbindenden RNA-Aptamer und einem Aptamer, das ein kleines Fluorophor binden und dessen Fluoreszenz anschalten kann. Die dabei benötigten kleinen und fluoreszenten Moleküle ähneln dabei dem Fluorophor des Grün fluoreszierenden Proteins. Eine Auslesung, die auf einer Emissionswellenlänge beruht, birgt jedoch die Gefahr einer falschen Interpretation aufgrund unspezifischer Effekte. Die Einbringung eines Energietransferpaares ermöglicht die Synthese von wellenlängenverschiebenden Aptasensoren. Diese konnten von *Wagenknecht et al.* für die Detektion von Adenosin erfolgreich synthetisiert werden (siehe Kapitel 2.2.2).^[40, 58]

Die Detektion von Sacchariden, insbesondere von Glucose, durch speziell entwickelte Rezeptoren ist von enormer Wichtigkeit.^[63] Boronsäuren sind dafür bekannt, dass sie mit 1,2- und 1,3-Diolen reversibel eine kovalente Bindung eingehen (siehe Kapitel 2.3). Der Nachweis und die Bestimmung der Konzentration von Kohlenhydraten in wässrigen Lösungen ist besonders im medizinischen Bereich von großer Bedeutung, da insbesondere D-Glucose mit beispielsweise Diabetes^[82-83] und Krebserkrankungen^[84-86] in Zusammenhang gebracht wird.^[67, 87] Ein großer Teil der bisher entwickelten, boronsäurebasierenden Rezeptoren besitzt jedoch keine Selektivität gegenüber D-Glucose. Daher entwickelten *Shinkai et al.* bereits 1994 einen für D-Glucose selektiven anthracenbasierten, mit zwei Boronsäuren modifizierten Rezeptor.^[72] Diesen verwendeten *Stojanovic et al.* in einer 2014 veröffentlichten Arbeit zur Selektion eines D-Glucose sensitiven Aptamers.^[198] Dieses 44 Basen lange Aptamer ist in der

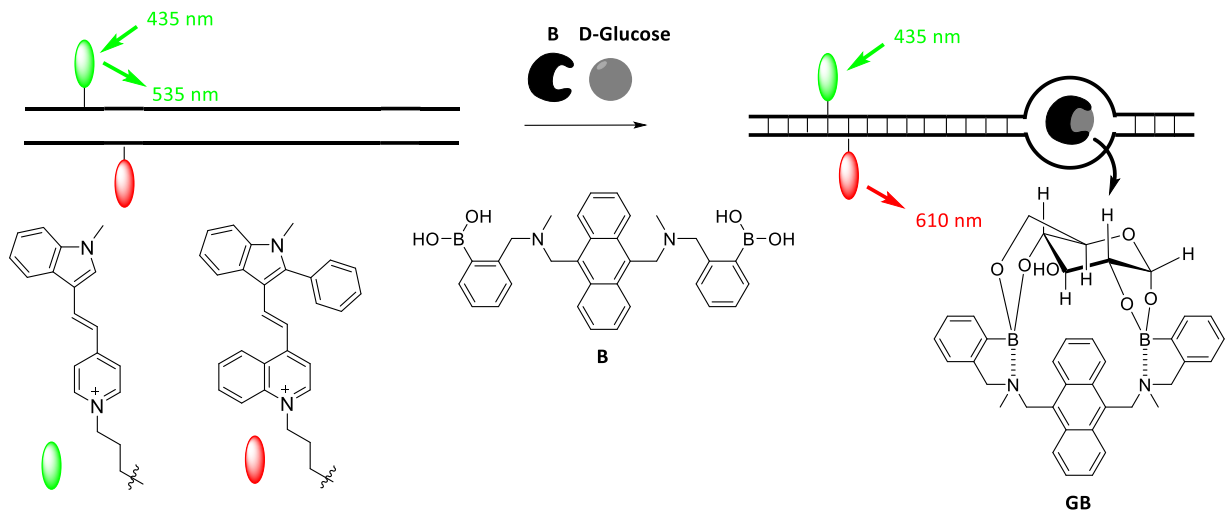


Abbildung 48. Funktionsprinzip des auf einer Zwei-Farben-Auslesung beruhenden Aptamers.

Die Synthese der Aptamere sowie deren optische Charakterisierung in An- und Abwesenheit des Zielkomplexes wird im nächsten Kapitel beschrieben.

5.2 Synthese und Charakterisierung der Aptasensoren

Die Oligonukleotide **Apt1-Apt8** wurden mittels Festphasensynthese unter Standardbedingungen hergestellt. Dabei wurde sequenzspezifisch 2'-Propargyluridin eingebaut, welches mittels CuAAC mit je einem der beiden Azide der Farbstoffe **5** und **6** verknüpft wurde (siehe Abbildung 49). Die postsynthetische Modifikation mittels CuAAC wurde gewählt, weil die Oligonukleotide auf diese Weise einfacher und in größeren Mengen zugänglich sind. Die Sequenzen wurden dabei vom selektierten Aptamer, welches von *Stojanovic* publiziert wurde, abgeleitet, da dieses eine hohe Affinität gegenüber dem Glucose-Rezeptor-Komplex **GB** aufweist.^[198] Um beide Farbstoffe unabhängig voneinander in die Sequenz zu integrieren, wurden Split-Aptamere synthetisiert. Die Einzelstränge wurden mit dem Azid des Donorfarbstoffes **5** oder mit dem des Akzeptorfarbstoffes **6** postsynthetisch modifiziert und damit acht verschiedene Doppelstränge **Apt1cAk-Apt8cDo** als potentielle D-Glucose-sensitive Split-Aptamere erhalten. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der komplementären Basenpaare in der Stammregion sowie in der Anordnung der beiden Farbstoffe zueinander (siehe Abbildung 49).

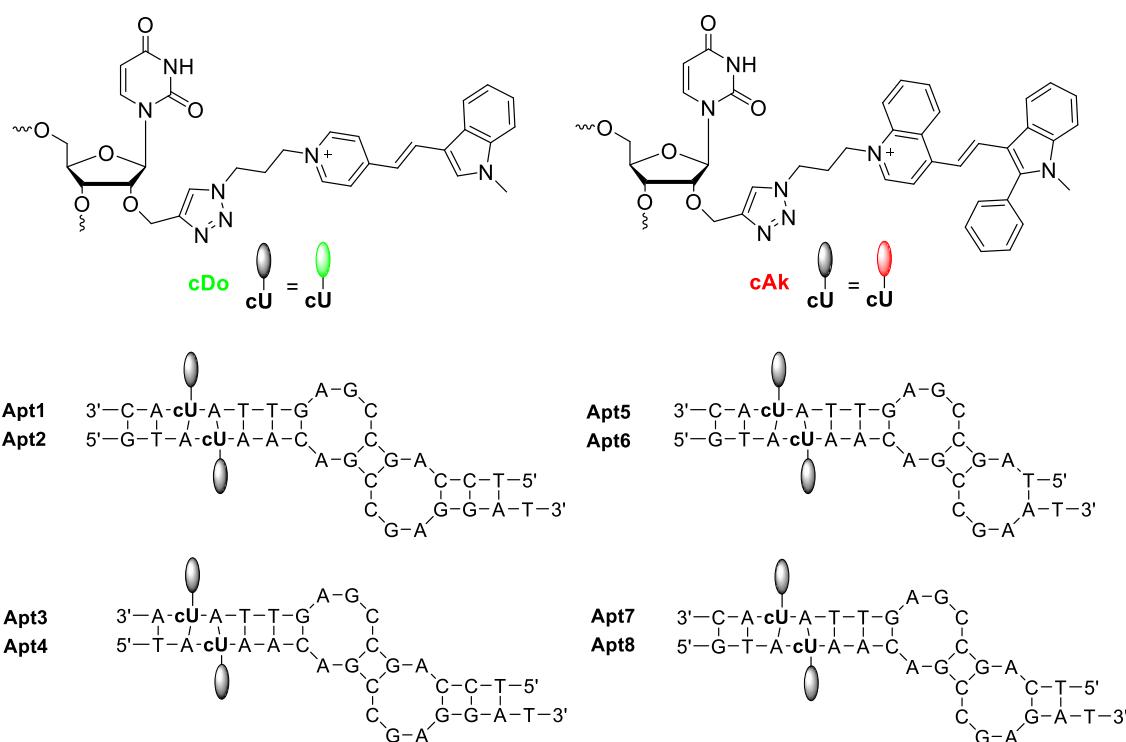


Abbildung 49. Strukturen des verwendeten Bausteines **cU** und der beiden Farbstoffe sowie Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide **Apt1-Apt8**. Die Einzelstränge wurden jeweils mit dem Donor (z.B. **Apt1cDo**) und alternativ mit dem Akzeptor (z.B. **Apt1cAk**) modifiziert, wodurch acht verschiedene Split-Aptamere erhalten wurden.

Der Rezeptor mit den beiden Boronsäurefunktionalitäten (**B**) (siehe Abbildung 48) wurde nach Literaturvorschriften dargestellt.

Die Absorptionen aller acht doppelsträngigen Split-Aptamere zeigen die für die Farbstoffe typische Signale bei etwa 462 nm (**cDo**) und 550 nm (**cAk**), sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Zielkomplexes **GB**. Die Zugabe des Zielkomplexes führt zusätzlich zu einer starken Absorption zwischen 330 und 440 nm (siehe Abbildung 50, beispielhaft für das Split-Aptamer **Apt1cAk/2cDo** dargestellt). Für die optische Charakterisierung wurden Lösungen verwendet, die 2.5 μ M DNA, 2.5 mM Boronsäure-Rezeptor (**B**) und 1.18 M Glucose (**G**) enthielten. Diese Konzentrationsverhältnisse wurden von *Stojanovic* übernommen, da geringere **GB**-Konzentrationen nicht dazu führten, dass sich das Aptamer schloss.

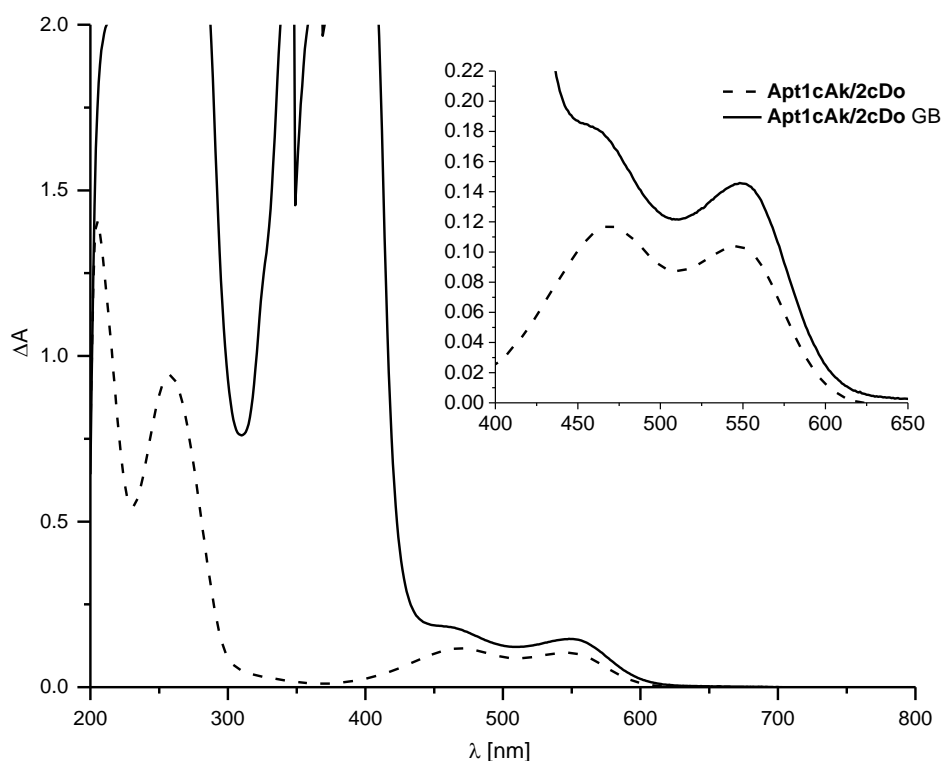


Abbildung 50. Absorption des Split-Aptamers **Apt1cAk/2cDo** als Beispiel in Abwesenheit und Anwesenheit des Zielkomplexes **GB**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, +**GB**: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose.

Die erfolgreiche Erkennung induziert, dass das Aptamer geschlossen werden kann, wodurch zusätzlich neben der grünen eine rote, durch Energietransfer entstehende, Fluoreszenz zu sehen ist (siehe Abbildung 51). Aufgrund der geringen Schmelztemperaturen der Duplexe zwischen 14 °C und 35 °C (siehe Tabelle 10) wurden die Messungen bei 10 °C durchgeführt, da so eine effiziente Hybridisierung ermöglicht werden konnte (siehe Abbildung 51). Hinsichtlich

der hohen Absorption des Boronsäurerezeptors bei 435 nm wurden die Duplexe bei 462 nm angeregt, wobei die geringe direkte Anregung des Akzeptors toleriert wurde.

Tabelle 10. Optische Daten der untersuchten Split-Aptamere **Apt1cAk/2cDo-Apt7cDo-8cAk**. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 °C, +GB: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose.

Aptamer	-GB	+GB	T _m [°C]
	A ₄₇₀ /A ₅₅₀	A ₄₇₀ /A ₅₅₀	
Apt1cAk/2cDo	1.1	1.2	35
Apt1cDo/2cAk	1.1	1.4	32
Apt3cAk/4cDo	1.1	1.3	33
Apt3cDo/4cAk	1.1	1.4	30

Aptamer	-GB	+GB	T _m [°C]
	A ₄₇₀ /A ₅₅₀ ¹	A ₄₇₀ /A ₅₅₀	
Apt5cAk/6cDo	1.1	1.2	14
Apt5cDo/6cAk	1.0	1.1	15
Apt7cAk/8cDo	1.0	1.2	16
Apt7cDo/8cAk	0.9	1.2	15

Bei Zugabe des Zielkomplexes findet eine Zunahme beider Extinktionskoeffizienten statt, wobei die des Donors größer ist (Spektren siehe Kapitel 8.4.1). Dadurch nimmt das Extinktionsverhältnis der Absorptionen bei 470 nm und 550 nm (A₄₇₀/A₅₅₀) durch Zugabe des Zielkomplexes **GB** zu (siehe Tabelle 10).

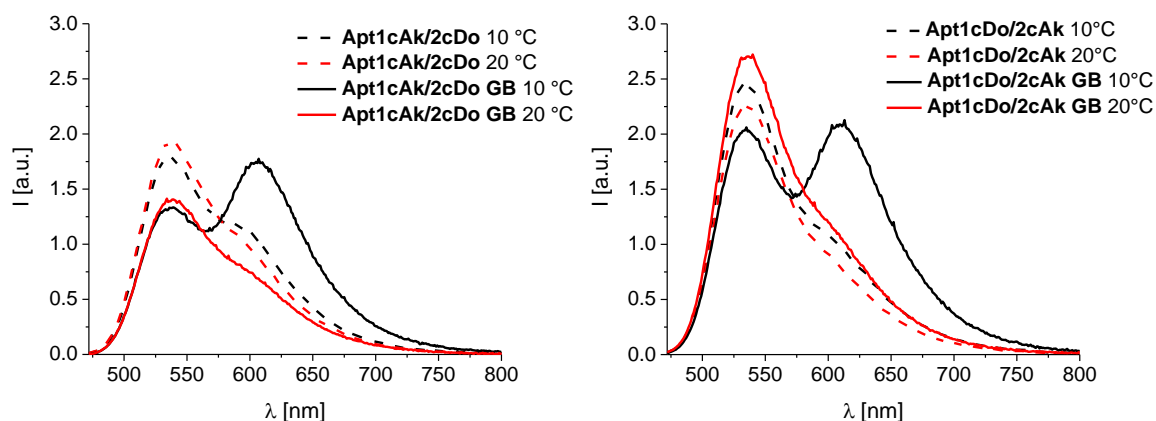


Abbildung 51. Fluoreszenz der Split-Aptamere **Apt1cAk/2cDo** und **Apt1cDo/2cAk** in Abwesenheit und Anwesenheit von **GB** bei 10 und 20 °C. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 °C bzw. 20 °C, +GB: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose; $\lambda_{\text{exc}}=462$ nm, $\lambda_{\text{em}}=477-800$ nm.

Zusätzlich bewirkt die Zugabe von **GB** eine Blauverschiebung des Donormaximums um bis zu 10 nm, wodurch die beiden Maxima eine Differenz von bis zu 90 nm aufweisen (siehe Tabelle 11). Beide Effekte wirken sich positiv auf die Fluoreszenzintensitäten aus. Diese Rot/grün-Verhältnisse wurden, wie auch schon in Kapitel 3.2 beschrieben, mit Hilfe der

Emissionsintensitäten des Akzeptors (610 nm) und des Donors (535 nm) bestimmt und geben Auskunft über die Effizienz des Energietransfers.

Tabelle 11. Wellenlängen der Absorptionsmaxima in Anwesenheit (+GB) und Abwesenheit (-GB) des Zielkomplexes. Bedingungen: 2.5 µM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 °C, +GB: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose.

Aptamer	-GB			+GB			$\Delta\lambda^{[a]} - \Delta\lambda$
	$\lambda_{\max \text{ Do}}$	$\lambda_{\max \text{ Ak}}$	$\Delta\lambda^{[a]}$	$\lambda_{\max \text{ Do}}$	$\lambda_{\max \text{ Ak}}$	$\Delta\lambda^{[a]}$	
Apt1cAk/2cDo	469	546	77	459	549	90	13
Apt1cDo/2cAk	469	547	78	458	548	88	10
Apt3cAk/4cDo	467	546	79	460	544	85	6
Apt3cDo/4cAk	470	545	75	460	543	83	8
Apt5cAk/6cDo	467	545	78	463	545	82	4
Apt5cDo/6cAk	470	545	75	464	547	83	8
Apt7cAk/8cDo	470	545	75	464	548	84	9
Apt7cDo/8cAk	470	546	76	464	551	87	11

[a] $\Delta\lambda = \lambda_{\max \text{ Ak}} - \lambda_{\max \text{ Do}}$.

Die Erkennung des Zielkomplexes **GB** wurde anhand des Verstärkungsfaktors *f* beurteilt, welcher den Quotienten aus dem Intensitätsverhältnis I_{610}/I_{535} in Anwesenheit und Abwesenheit von **GB** beschreibt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12. Kontrastverhältnisse und Verstärkungsfaktoren der Split-Aptamere. Bedingungen: 2.5 µM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 °C, +GB: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose.

Aptamer	-GB		<i>f</i>	Aptamer	+GB		<i>f</i>
	I_{610}/I_{535}	I_{610}/I_{535}			I_{610}/I_{535}	I_{610}/I_{535}	
Apt1cAk/2cDo	0.6	1.3	2.4	Apt5cAk/6cDo	0.6	0.5	0.8
Apt1cDo/2cAk	0.4	1.0	2.5	Apt5cDo/6cAk	0.4	0.5	1.2
Apt3cAk/4cDo	0.4	0.5	1.3	Apt7cAk/8cDo	0.6	0.7	1.2
Apt3cDo/4cAk	0.4	0.6	1.4	Apt7cDo/8cAk	0.4	0.8	1.9

Die Emissionen aller Duplexe zeigen bei Anwesenheit des Zielkomplexes **GB** einen Energietransfer und dessen erfolgreiche Detektion bei Verstärkungsfaktoren >1. Eine Ausnahme davon ist Duplex **Apt5cAk/6cDo**, der die geringste Anzahl an komplementären Basenpaaren enthält. Dieser weist einen geringeren Energietransfer nach Zugabe des

Komplexes auf, jedoch nimmt die Emissionsintensität des Donors im Vergleich zu der vor der Zugabe stark zu (siehe Tabelle 12 und Abbildung 52). Im Gegensatz dazu besitzt **Apt1cAk/2cDo** die längste Stammregion und daraus resultierend einen deutlich verbesserten Verstärkungsfaktor von 2.4. Wird die Stammregion, in der die Farbstoffe liegen, gekürzt, wirkt sich das ungünstig auf die Verstärkungsfaktoren und ebenso auf die Intensitätsverhältnisse in Anwesenheit des Zielkomplexes aus (siehe **Apt3/4**). Diese verringern sich mit $f=1.3-1.4$ im Vergleich zu **Apt1/2**, was zeigt, dass sowohl die Erkennung von **GB** wie auch das Schließen des Aptamers weniger effektiv sind. Offensichtlich sind mindestens zwei Basenpaare neben dem Farbstoffpaar nötig, um einen erkennbaren Energietransfer zu ermöglichen. Die Kürzung der Stammregion auf der anderen Seite des Aptamers führt, wie bereits beschrieben, zu einem ineffektiven Energietransfer (siehe **Apt5/6**). Die Verlängerung der Stammregion um ein komplementäres Basenpaar erhöht die Verstärkungsfaktoren von 0.8 auf 1.2 (**Apt5cAk/6cDo** auf **Apt7cAk/8cDo**) und von 1.2 auf 1.9 (**Apt5cDo/6cAk** auf **Apt7cDo/8cAk**) bei nur geringfügig höheren Schmelztemperaturen. Die Intensitätsverhältnisse bei Abwesenheit des Zielkomplexes unterscheiden sich nicht von denen in **Apt1/2** und **Apt5/6**, was für die Notwendigkeit der zwei Basenpaare neben den Farbstoffen spricht. Besonders auffällig ist der immense Einfluss eines GC-Basenpaares auf die Schmelztemperaturen (vergleiche **Apt1/2** und **Apt3/4** mit **Apt5/6** und **Apt7/8**).

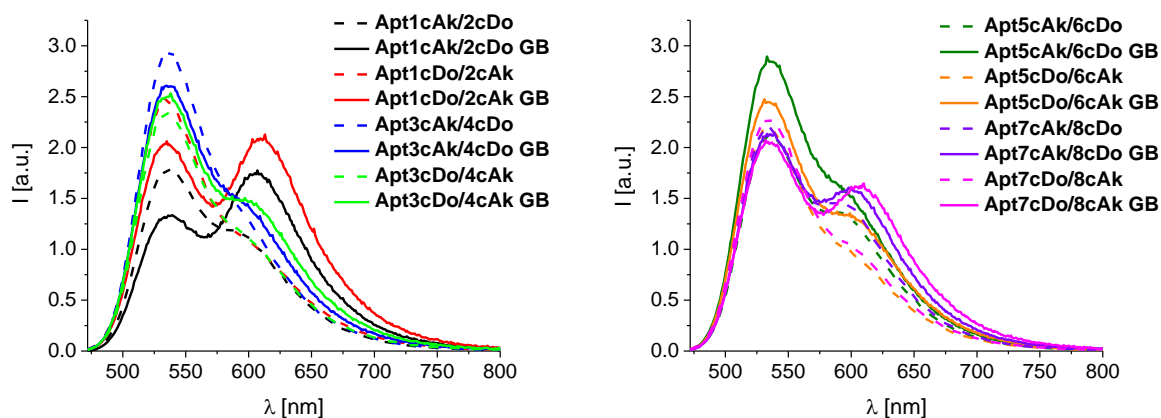


Abbildung 52. Fluoreszenz aller acht synthetisierten Split-Aptamere **Apt1cAk/2cDo-Apt7cDo/8cAk** vor und nach der Zugabe des Zielkomplexes **GB**. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 $^{\circ}\text{C}$, +**GB**: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose; $\lambda_{\text{exc}}=462$ nm, $\lambda_{\text{em}}=477-800$ nm.

Zusätzlich ist die Orientierung der beiden Farbstoffe zueinander sowie deren Umgebung wichtig für die optischen Eigenschaften und deren Fähigkeit, den Komplex **GB** zu binden.

Auffällig ist, dass die Orientierung **AptncDo/n+1cAk** bei allen Sequenzen, bis auf **Apt1/2**, größere Verstärkungsfaktoren aufweist. Der direkte Vergleich der unterschiedlichen Orientierungen in den gleichen Sequenzen weist jedoch keine Differenz der Kontrastverhältnisse vor der Zugabe des Komplexes auf. Die besten Split-Aptamere zur Detektion des Zielkomplexes **GB** sind **Apt1/2** und **Apt7cDo/8cAk**, die Verstärkungsfaktoren von bis zu 2.5 aufweisen. Besonders bei **Apt7cDo/8cAk** ist die Erkennung deutlich ausgeprägt, da diese eine Schmelztemperatur von fast 20 °C weniger als **Apt1/2** aufweist.

Die von *Stojanovic* selektierten DNA-Sequenzen konnten erfolgreich auf das Konzept der wellenlängenverschiebenden Split-Aptamere übertragen werden. Durch die Verwendung eines bekannten Energietransferpaares ist es möglich, die Erkennung des Zielkomplexes visuell zu bestätigen. Die erfolgreiche Detektion induziert dabei einen Fluoreszenzfarbwechsel von grün nach rot, da die beiden Fluorophore durch das Schließen des Aptamers in räumliche Nähe zueinanderkommen und einen Energietransfer eingehen. Besonders **Apt1cAk/2cDo** zeigt eine deutliche Verstärkung der roten Fluoreszenz nach Erkennung des Zielkomplexes mit einem Kontrastverhältnis I_{610}/I_{535} von 1.3, was dieses Split-Aptamer für eine erfolgreiche Detektion von D-Glucose qualifiziert.

Eine Problematik des vorgestellten Konzeptes ist die Notwendigkeit eines zusätzlichen Rezeptors, wodurch das Erkennungssystem auf drei Komponenten beruht. Des Weiteren stellt die hohe benötigte Konzentration des Zuckers zur erfolgreichen Detektion eine Hürde dar, da diese die Anwendbarkeit als sensitive Detektoren in lebenden Zellen unmöglich macht. Durch die kovalente Verknüpfung der Boronsäureeinheit mit dem Aptamer könnte eine Reduktion auf ein Zwei-Komponenten-System zur selektiven Detektion von Sacchariden ermöglicht werden. Auf die Vorstellung und Anwendbarkeit eines solchen Konzeptes wird im nächsten Kapitel eingegangen.

6 Boronsäuren in DNA

6.1 Einführung

Das von *Stojanovic* entwickelte Konzept eines Aptamers zur Detektion eines D-Glucose-Boronsäurerezeptor-Komplexes konnte erfolgreich auf wellenlängenverschiebende Aptasensoren übertragen werden (siehe Kapitel 5.2). Die dabei zu verwendenden Konzentrationen zur erfolgreichen Erkennung des Komplexes sind jedoch sehr hoch, sodass eine sensitive Detektion unter diesen Bedingungen nicht möglich ist. Des Weiteren beruht die Erkennung auf einem Drei-Komponenten-System, welches die Detektion weiter erschwert. Eine Verbesserung könnte durch die Reduktion auf ein Zwei-Komponenten-System erhalten werden. Die dafür benötigte kovalente Verknüpfung der Boronsäure mit dem Oligonukleotid stellt jedoch, aufgrund ihrer hohen Reaktivität sowie hygroskopischen Natur, eine Herausforderung dar. Bisher wurden postsynthetische Ansätze verfolgt, bei denen die Boronsäure mittels Amidkupplung, SPAAC oder CuAAC in Oligonukleotide eingebracht wurde (siehe Kapitel 2.3.2). Da die Auslesung einer erfolgreichen Detektion weiterhin auf einem Energietransfer beruhen soll, wurde zur Einbringung der Boronsäure in DNA ein neues Konzept ausgearbeitet. Dabei werden die beiden Farbstoffe erneut postsynthetisch mittels CuAAC in die Oligonukleotide eingebracht. Die Boronsäure soll anschließend mittels Amidkupplung an ein zuvor eingebautes aminmodifiziertes 7-Deaza-2'-desoxyadenosin (**zA**) geknüpft werden, um auf diese Weise boronsäuremodifizierte und wellenlängenverschiebende Aptasensoren zur Glucosedetektion zu erhalten (siehe Abbildung 53).

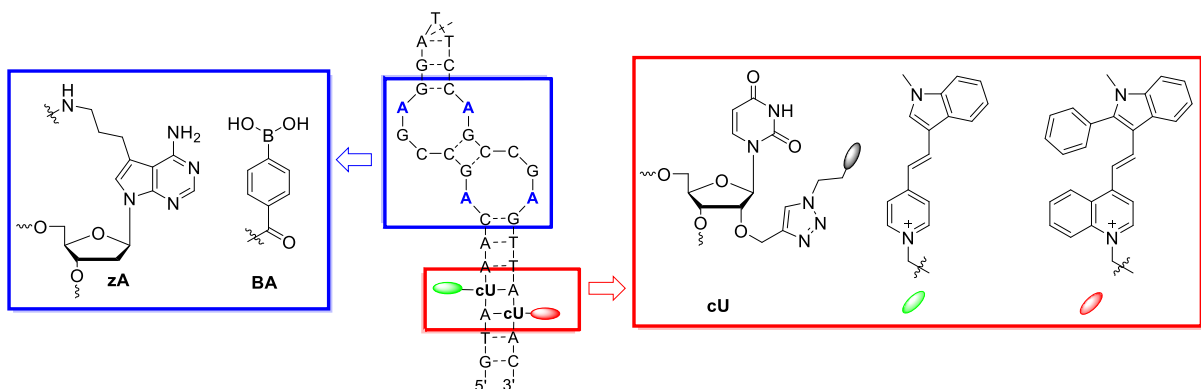


Abbildung 53. Prinzip des auf zwei Komponenten beruhenden Systems zur Synthese von boronsäuremodifizierten wellenlängenverschiebenden Aptasensoren zur D-Glucosedetektion.

Da Boronsäuren dafür bekannt sind, in Gegenwart von Kupfersalzen Nebenreaktionen einzugehen, wurden Reaktionsbedingungen evaluiert, die eine orthogonale Einführung der beiden Fluorophore via CuAAC tolerieren. Die Sequenzen wurden von dem zuvor vorgestellten Aptamer **Apt1cAk/2cDo** (siehe Kapitel 5.2) abgeleitet, da dieses in Abwesenheit eines geeigneten Zielmoleküls nur einen geringen Energietransfer aufweist. Die Stammregion ist jedoch bei einer erfolgreichen Erkennung ausreichend lang, um die Schließung des Aptamers und einen Energietransfer zu ermöglichen. Die ersten Amidkupplungen der Boronsäuren mit DNA wurden mit einem kommerziell erhältlichen 5'-aminohexylmodifizierten Oligonukleotid **DNA4** durchgeführt, um die Reaktivität des Boronsäurereagenzes in verschiedenen Lösemittelsystemen zu untersuchen. Außerdem sollten anhand dieser die benötigten Reaktionsbedingungen, Aufreinigungs- und Analytikmethoden optimiert werden.

6.2 Postsynthetische Modifikation aminfunktionalisierter DNA

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde an kommerziell erhältlicher 5'-aminohexylmodifizierter DNA (**DNA4**) durchgeführt (siehe Abbildung 54). Die ersten Experimente wurden mit NHS-Esterderivaten der Phenylboronsäure durchgeführt. Die NHS-Aktivierung von **B1** zu **B2** konnte dabei nach Literaturbedingungen erfolgreich durchgeführt werden.

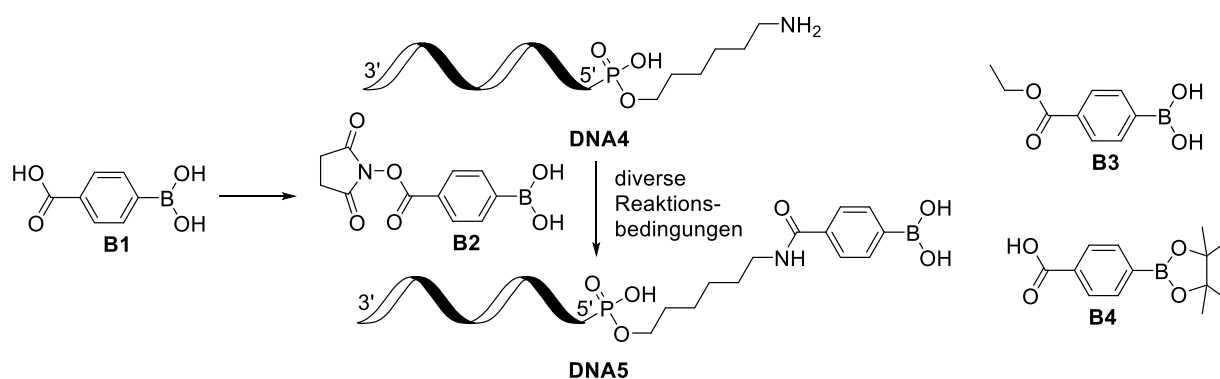


Abbildung 54. Postsynthetische Modifikation des 5'-Endes von 5'-aminohexylmodifiziertem Oligonukleotid **DNA4** mit 4-Carboxyphenylboronsäure (**B1**) (links) und die untersuchten Phenylboronsäurederivate **B3** und **B4** (rechts).

Bei der Reaktion von **B2** mit **DNA4** konnte bei Raumtemperatur in einem DMF/Carbonatpuffer weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von DIPEA ein Umsatz beobachtet werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 60 °C führte, unabhängig von Lösemittelsystem und pH, zur

Oxidation des Phenylboronsäurerestes zum Phenolrest im Oligonukleotid (**DNA5-OH**). Für Hydroxylamine ist bekannt, dass sie Arylboronsäuren oxidieren.^[199] Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass diese Reaktivität auch für N-Hydroxysuccinimide bei höheren Temperaturen gegeben ist (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13. Übersicht der getesteten Reaktionsbedingungen zur Einführung der NHS-aktivierten Carboxyphenylboronsäure (**B2**).

Boronsäurequelle	Lösemittelsystem	Base	Bedingungen	Produkt
NHS-Ester der 4-Carboxyphenyl- boronsäure (B2)	DMF/Carbonatpuffer (pH 8.3)	DIPEA	0 °C, 8 h	-
			RT, 8 h	
			RT, 8 h	
			RT, 24 h	
	DMF/Phosphatpuffer (pH 9)		60 °C, 2 h	ausschließlich Nebenprodukt
	DMF/Phosphatpuffer (pH 7)			

Der weniger reaktive Ethylester (**B3**, 4-Carboxyphenylboronsäure) ist unter Verwendung verschiedener Basen bei 60 °C keine Reaktion eingegangen (siehe Tabelle 14). Daher wurde eine Amidkupplung der 4-Carboxyphenylboronsäure (**B1**) mit verschiedenen Aktivierungsreagenzien durchgeführt. Bei der Verwendung des Aktivierungsreagenzes EDC konnte das gewünschte Produkt **DNA5** jedoch nur in geringen Ausbeuten erhalten werden. Andere für Amidkupplungen typische Aktivierungsreagenzien, wie DCC/HOBt, führten in Pyridin und Pyridin/Wasser-Gemischen nur zu geringen Umsätzen. Analytische HPLC-Daten zeigten eine Umsetzung von **DNA4**, jedoch zum größeren Teil zu **DNA5-OH**. Dies konnte vor allem bei der Verwendung von TBTU in einem DMF/Carbonatpuffer-Gemisch beobachtet werden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14. Zur Amidkupplung getestete Reaktionsbedingungen unter Verwendung der Boronsäurequellen **B1** und **B3**.

Boronsäurequelle	Lösemittelsystem	Reagenzien	Base	Bedingungen	Produkt [Anteil in %]		
4-Carbethoxyphenylboronsäure (B3)	DMF/Carbonatpuffer (pH 8.3)		Et ₃ N	60 °C, 2 h	-		
			DIPEA				
4-Carboxyphenylboronsäure (B1)	DMF/Carbonatpuffer (pH 8.3)	EDC		60 °C, 2 h	< 5 %		
				60 °C, 6 h			
				60 °C, 18 h			
	Pyridin	DCC/HOBt		RT, 2 h	-		
				60 °C, 2 h			
	H ₂ O/Pyridin				< 5 %		
	DMF/Carbonatpuffer (pH 8.3)		DIPEA		60 °C, 2 h	Mischung < 5 %	
	DMF/THF				RT, 18 h	-	
	DMF/DCM					< 5 %	
	DMF/Carbonatpuffer (pH 8.3) entgast		TBTU	DABCO	RT, 18 h	Mischung < 5 %	
				DBU			
				Et ₃ N			40 °C, 2 h
				DIPEA			60 °C, 2 h
(EtOH) ₃ N				60 °C, 2 h			Mischung ~ 60 %

Die pinakolgeschützte 4-Carboxyphenylboronsäure (**B4**) erbrachte ebenfalls nicht das gewünschte Produkt, da auch hier eine Oxidation stattfand und **DNA5** nur in geringen Ausbeuten erhalten werden konnte (siehe Tabelle 15). Um mögliche Sauerstoffquellen, die für

die Oxidation von Boronsäuren benötigt werden, auszuschließen, wurden für alle weiteren Experimente entgaste Lösemittelsysteme verwendet. Die unter diesen Bedingungen vielversprechendsten Ergebnisse wurden mit TBTU als Aktivierungsreagenz in Gegenwart von Triethanolamin als Base erhalten. Durch die Verwendung entgaster Lösungsmittel und einer Reaktionszeit von 2 h bei 60 °C konnte **DNA5** mit Ausbeuten von bis zu 60 % erhalten werden. Die Synthese konnte auch durch niedrigere Temperaturen oder längere Reaktionszeiten nicht weiter optimiert werden.

Tabelle 15. Reaktionsbedingungen zur Amidkupplung der pinakolgeschützten 4-Carboxyphenylboronsäure **B4**.

Boronsäurequelle	Lösemittelsystem	Reagenzien	Base	Bedingungen	Produkt [Anteil in %]
4-Carboxyphenyl- boronsäurepinakolester (B4)	DMF/Carbonatpuffer (pH 8.3) entgast	TBTU	DIPEA	RT, 18 h	Mischung < 5 %
				40 °C, 2 h	

Trotz der entgasten Lösemittel konnte die Entstehung von **DNA5-OH** nicht vollständig unterdrückt werden. Problematisch an diesem war, dass die Trennung von **DNA5** und **DNA5-OH** unter Standardbedingungen (NH₄OAc-Puffer, pH 6.5) nicht möglich ist, da sie sehr ähnliche Retentionszeiten aufweisen. Boronsäuren sind dafür bekannt, dass sie mit 1,2- und 1,3-Diolen reversible kovalente Bindungen eingehen (siehe Kapitel 2.3). Diese Eigenschaft konnte bereits zur Identifizierung über MALDI-TOF Massenspektrometrie von **DNA5** genutzt werden. Bei Verwendung von einer 9:1 HPA/Zitronensäure-Mischung als Matrix wurde ein um $m/z=155$ g/mol höheres Signal, verglichen mit dem gewünschten Produkt **DNA5**, erhalten. Dieses konnte einem Komplex aus Zitronensäure und **DNA5** (**DNA5-CA**) zugeordnet werden, was zeigt, dass der eindeutige und zweifelsfreie Nachweis der Boronsäure im Oligonukleotid nur indirekt erreicht werden kann. Zusätzlich eröffnet diese Komplexbildung die Möglichkeit einer erfolgreichen Trennung der beiden Spezies. Durch die Verwendung eines Zitronensäurepuffers sollte die Retentionszeit von **DNA5**, durch die Ausbildung des Komplexes **DNA5-CA**, soweit verschoben werden, dass eine HPLC-Trennung dieser von **DNA5-OH** durchführbar wird (siehe Abbildung 55).

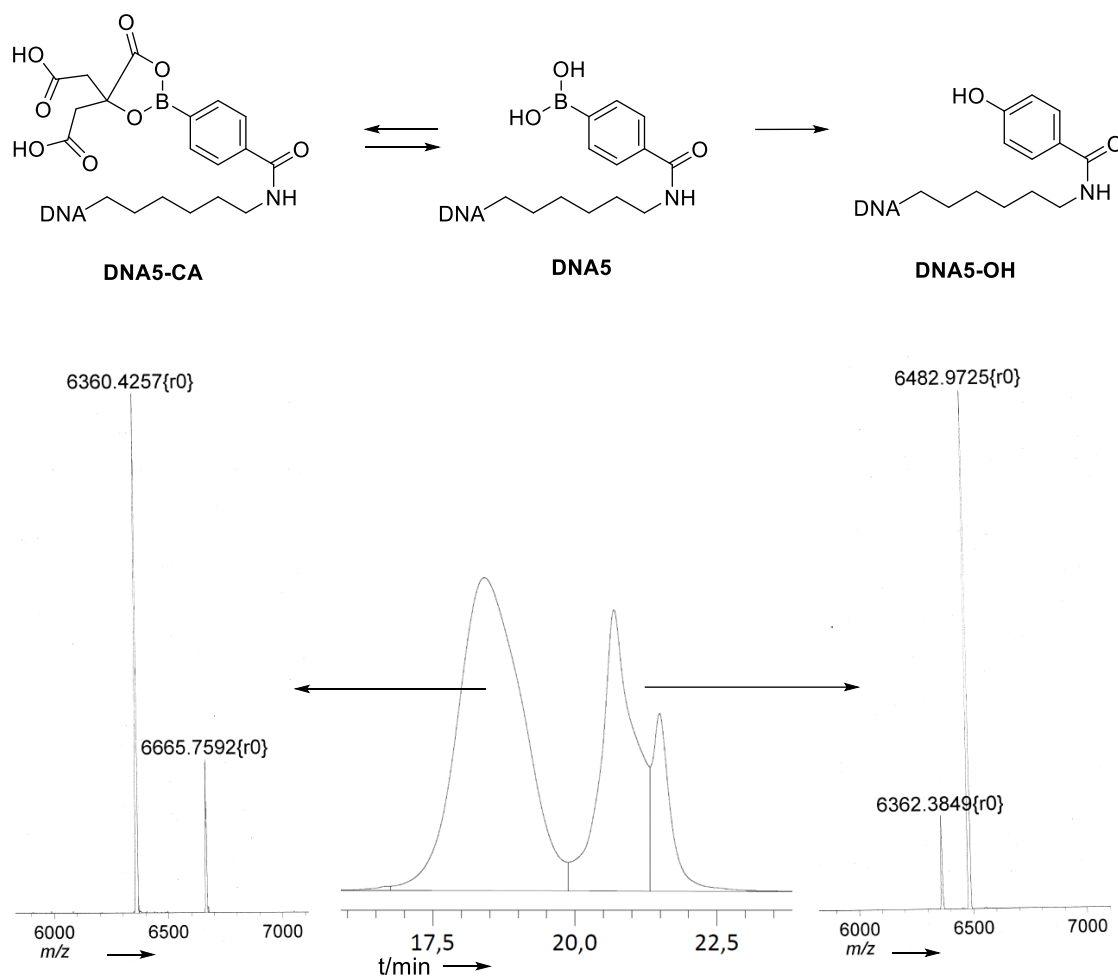


Abbildung 55. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von **DNA5** und **DNA5-OH**, nachgewiesen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie der Oligonukleotide **DNA5-CA** (links, berechnet $m/z=6665.3$ Da) und **DNA5-OH** (rechts, berechnet $m/z=6481.3$ Da) im Vergleich zu **DNA4** (berechnet $m/z=6361.3$ Da) als interner Standard.

Die überschüssige Zitronensäure konnte anschließend durch eine zweite HPLC-Trennung unter Standardbedingungen (NH_4OAc -Puffer, pH 6.5) entfernt werden. Die postsynthetische Modifizierung von **DNA4** konnte somit erfolgreich mit einer Ausbeute von 60 % verwirklicht werden.

Nachdem die Bedingungen der Amidkupplung optimiert wurden, sollte die postsynthetische Einbringung der Boronsäurefunktion auf das aminmodifizierte 7-Deaza-2'-desoxyadenosin **zA** übertragen werden, um eine interne Modifizierung zu ermöglichen und die Orthogonalität der postsynthetischen Methoden zu evaluieren. Die Synthese des Vorläufers **zA** zur Einführung der Boronsäure wird im nächsten Kapitel beschrieben.

6.3 Synthese des aminmodifizierten Bausteines zA

Zur postsynthetischen Einbringung der Boronsäure an einer spezifischen Stelle innerhalb der Oligonukleotidsequenz sollte das 7-Deaza-2'-desoxyadenosin synthetisiert werden. Dessen 7-Position ist ein bevorzugter Anknüpfungspunkt für Propargylamin-^[200-201] und Propylaminlinker,^[202] um darüber artifizielle Funktionalitäten in DNA einzubringen. Dabei wird angenommen, dass der Linker an dieser Position die natürliche anti-Konformation des Nucleosids nicht in die ungünstige syn-Konformation ändert. Die Vorstufe 7-Iodo-7-deaza-2'-desoxyadenosin (**18**) wurde ausgehend von 2'-Desoxyribose (**11**) synthetisiert (siehe Abbildung 56).

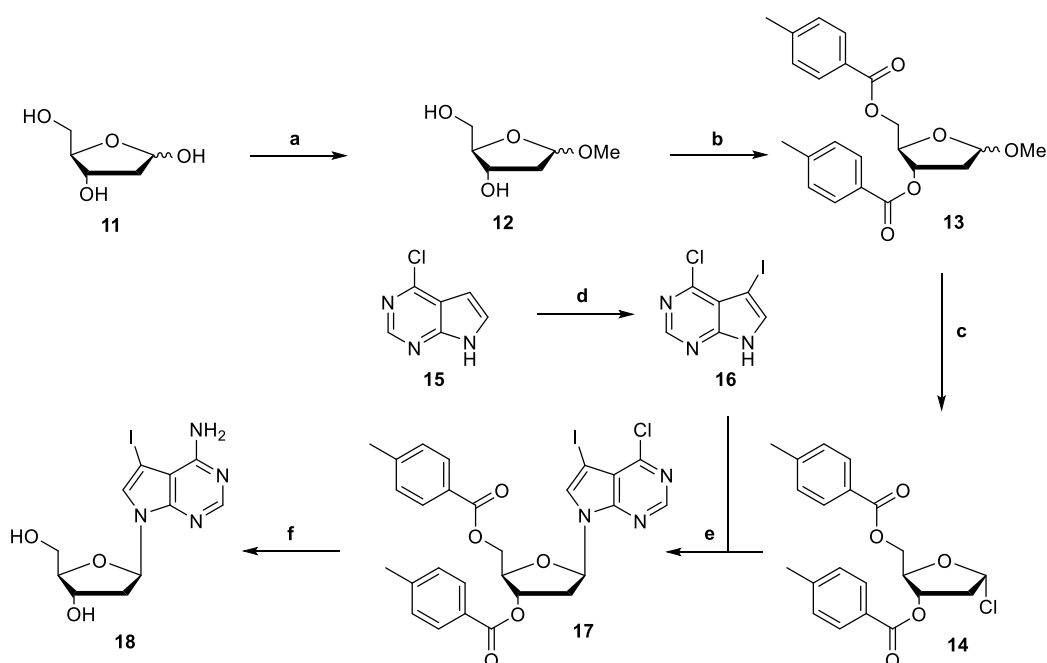


Abbildung 56. Synthese von 7-Iodo-7-deaza-2'-desoxyadenosin (**18**). a) HCl/MeOH, RT, 25 min, quant.; b) p-Toluoylchlorid, Et₃N, Aceton, RT, 16 h, 71 %; c) HCl/Dioxan, AcOH, 0 °C, 2 h, 71 %; d) NIS, DCM, RT, 1 h, 73 %; e) TDA-I, KOH, MeCN, RT, 1 h; f) NH₃/MeOH, 120 °C, 20 h, 78 % über 2 Stufen.

Die Synthese des p-toluoylgeschützten Chlorzuckers **14** erfolgte dabei nach Literaturvorschriften mit einer Gesamtausbeute von 50%.^[203-205] Die Iodierung des Heterozyklus **15** wurde, angelehnt an eine von *Seela et al.* beschriebenen Synthese, mit N-Iodsuccinimid in Dichlormethan mit einer Ausbeute von 73 % durchgeführt.^[206] Die Kupplung des Chlorzuckers **14** mit dem Heterozyklus erfolgte baseninduziert nach *Seela*.^[201, 206] Der p-toluoylgeschützte Purinzucker **17** konnte anschließend mittels Ammoniak in Methanol entschützt und nach Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie mit einer

Ausbeute von 55 % erhalten werden. Die anschließende Aminierung der 6-Position durch Substitution des Chloratoms wurden mit 7 M Ammoniaklösung in Methanol in einem Druckgefäß bei 120 °C durchgeführt. Dabei konnte **18** mit einer Ausbeute von 73 % erhalten werden. Da die Aminierung der 6-Position zum Teil bereits bei Raumtemperatur während der Entschützung stattfand, wurde auf eine Aufreinigung des entschützten Chloroderivates verzichtet und die direkte Umsetzung zum ungeschützten aminierten Nucleosid gewählt. Dadurch konnte die Ausbeute auf 78 % über zwei Stufen erhöht werden, wodurch die Gesamtausbeute um 14 % auf 29 % gesteigert werden konnte. Ausgehend von diesem Baustein wurde die Synthese des für die Modifikation **zA** benötigten Phosphoramidits **24** durchgeführt (siehe Abbildung 57).

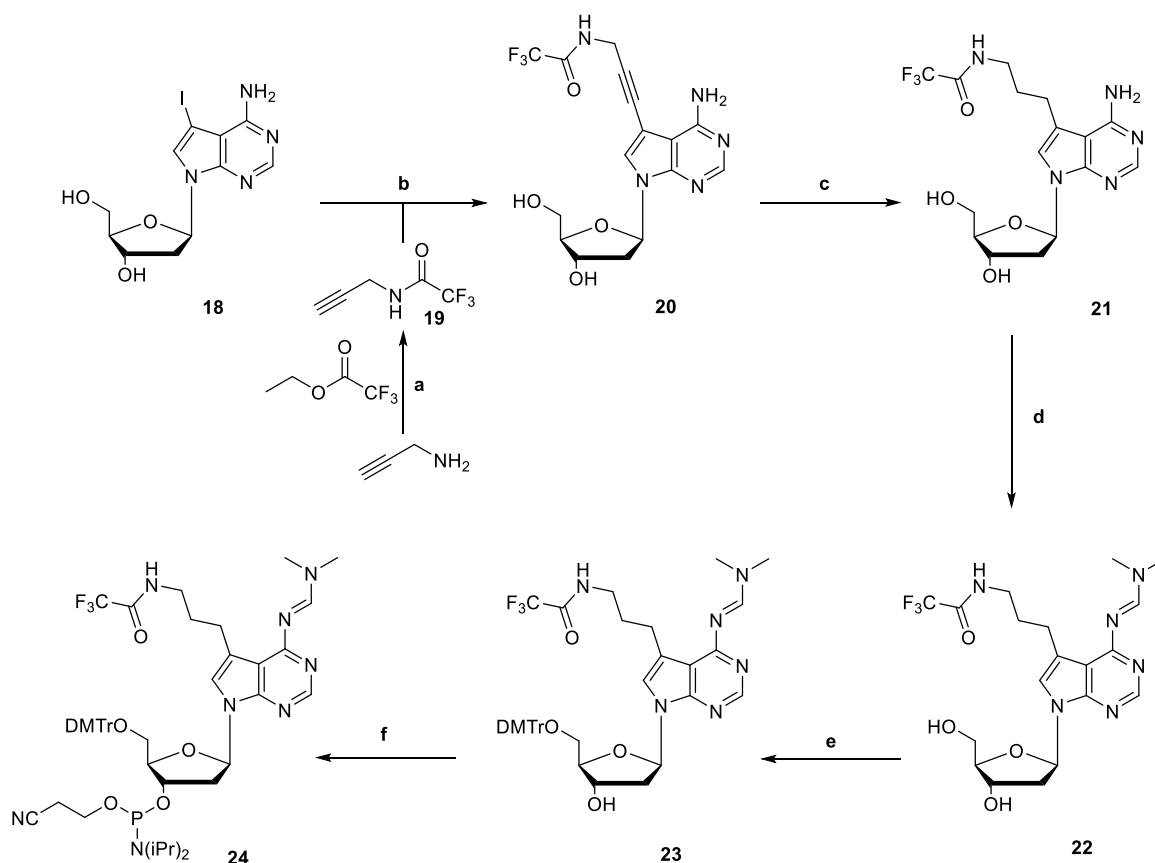


Abbildung 57. Synthese von **24**. a) Trifluoressigsäureethylester, MeOH, RT, 24 h, 77 %; b) CuI, Et₃N, Pd(PPh₃)₄, DMF, RT, 24 h, 92 %; c) Pd(OH)₂, MeOH, Et₃SiH, RT, 16 h, 85 %; d) DMF-DMA, MeOH, 40 °C, 2 h, 80 %; e) DMT-Cl, Pyridin, RT, 1 h, 89 %; f) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, DCM, RT, 1 h, 98 %.

Die Synthese von **19** wurde nach einer literaturbekannten Synthese durchgeführt.^[207] Die anschließende Sonogashira-Reaktion erfolgte unter Verwendung des Katalysators Pd(PPh₃)₄, wodurch das linkermodifizierte Nucleosid **20** mit einer Ausbeute von 92 % erhalten wurde.

Die anschließende Reduktion der Dreifachbindung wurde gewählt, da daraus eine erhöhte Flexibilität der später inkorporierten Boronsäure erreicht werden kann. **21** konnte mit einer Ausbeute von 85 % erhalten werden. Die Schützung des freien Amins sowie der freien 5'-OH-Funktion konnte, angelehnt an eine Vorschrift von *Seela*, erfolgreich durchgeführt werden.^[201] Die anschließende Umsetzung von **23** zum Phosphoramidit erfolgte unter Standardbedingungen wodurch **24** mit einer Gesamtausbeute von 12 % über 12 Stufen erhalten wurde.

6.4 Konzeptübertragung auf wellenlängenverschiebende DNA

Nach der erfolgreichen Synthese des Vorläufers **24** zur Einführung der Aminfunktion in die DNA sollte dieser in Oligonukleotide integriert werden, deren Sequenzen von **Apt1cAk/2cDo** abgeleitet wurden (siehe Kapitel 5.2). Das synthetisierte Phosphoramidit **24** konnte zusammen mit 2'-Propargyluridin erfolgreich über die automatisierte Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut werden (Synthesekonzept siehe Abbildung 58).

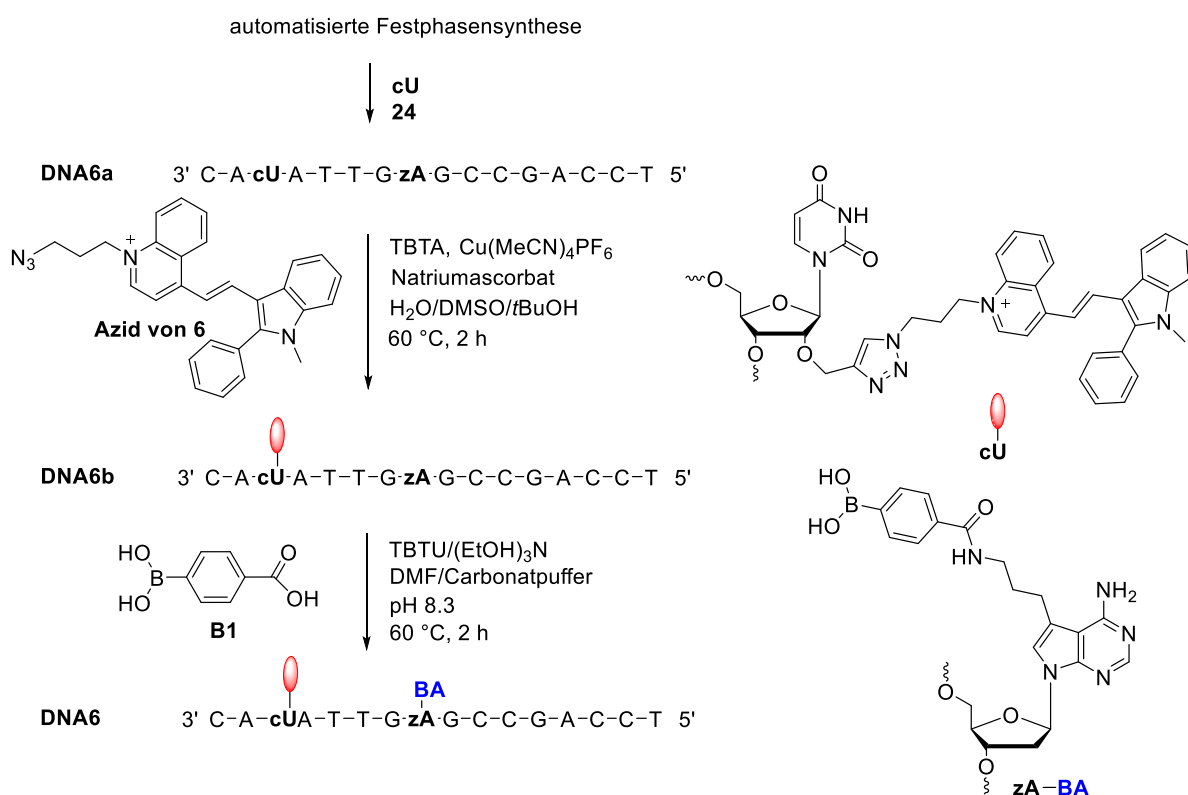


Abbildung 58. Syntheschema der doppelt modifizierten Oligonukleotide, veranschaulicht am Beispiel von **DNA6**.

Nach der Abspaltung der exozyklischen Schutzgruppen sowie von der festen Phase mit konzentrierter Ammoniaklösung wurde 2'-Propargyluridin postsynthetisch via CuAAC mit den Aziden der beiden Farbstoffe **1** und **2** modifiziert (siehe Abbildung 58, beispielhaft für die Synthese von **DNA6** dargestellt). Da Boronsäuren zu Nebenreaktionen in Gegenwart von Kupfer(I)-Salzen neigen, wurde die postsynthetische Modifizierung mit den beiden Farbstoffen vor der Einführung der Boronsäure vorgenommen. Kupferreste wurden anschließend durch die Behandlung der Oligonukleotide mit EDTA-Lösung und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung entfernt. Dadurch konnten die farbstoffmodifizierten Oligonukleotide mit einem ungeschützten Aminlinker erhalten werden (**DNA6b**). Im Anschluss wurde die 4-Carboxyphenylboronsäure (**B1**) mit den zuvor optimierten Reaktionsbedingungen eingeführt (siehe Kapitel 6.2).

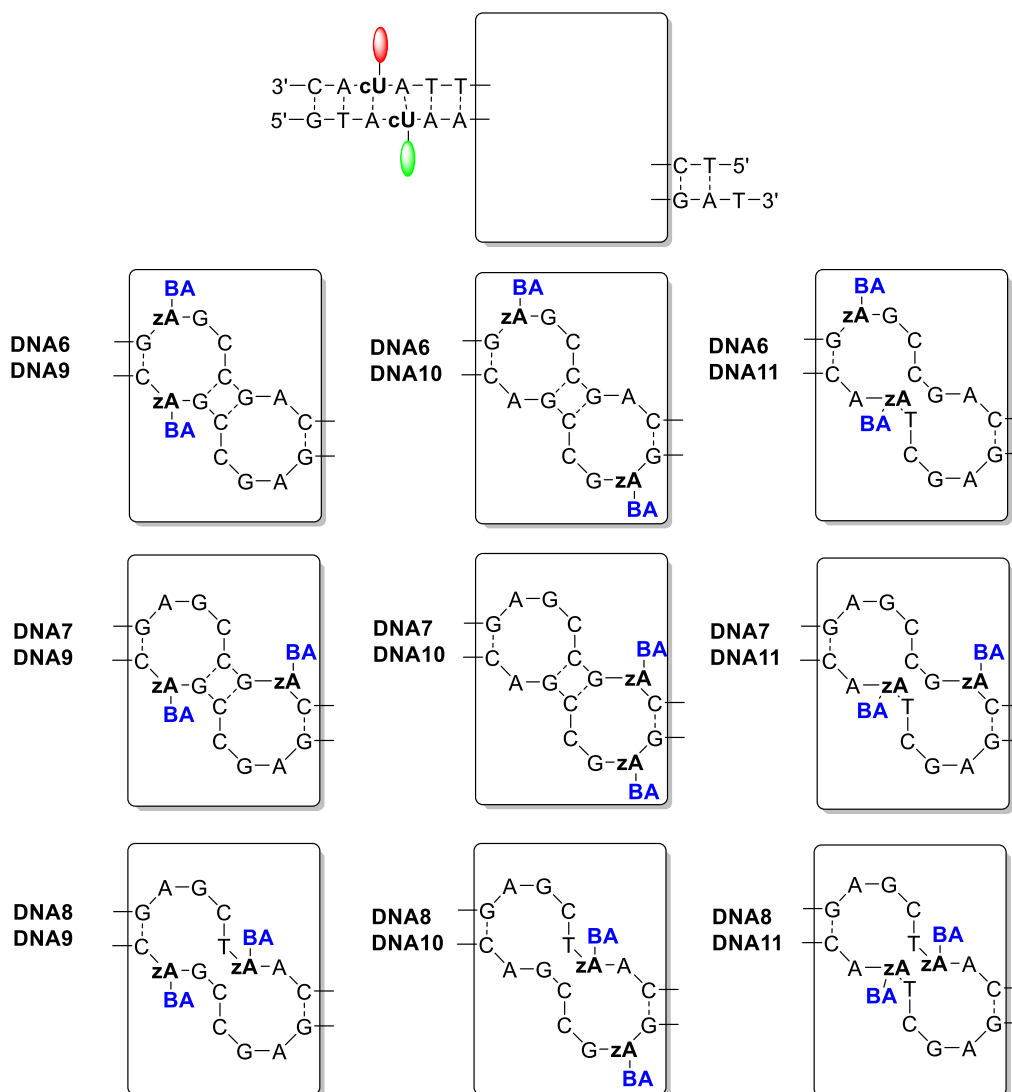


Abbildung 59. Sequenzen der synthetisierten doppelt modifizierten Oligonukleotide **DNA6-DNA11**.

Die orthogonale Synthesestrategie konnte erfolgreich auf das Konzept der doppelt modifizierten Oligonukleotide (**DNA6-DNA11**) übertragen werden (siehe Abbildung 59). Diese enthalten entweder den grün emittierenden Donor (siehe Abbildung 53) oder den rot emittierenden Akzeptor (siehe Abbildung 58) und in drei verschiedenen Abständen die Boronsäurefunktionalität. Durch Kombination aller Einzelstränge konnten neun potentielle doppelsträngige Aptamere mit je zwei Boronsäureeinheiten erhalten werden. Diese wurden für erste Experimente als Split-Aptamere synthetisiert.

6.5 Optische Untersuchungen

6.5.1 Charakterisierung boronsäuremodifizierter wellenlängenverschiebender Oligonukleotide

Zusätzlich zu den boronsäuremodifizierten Oligonukleotiden wurden die farbstoffmodifizierten Oligonukleotide **Apt1cAk** und **Apt2cDo** (siehe Kapitel 5.2 Abbildung 49), die keine Boronsäure enthalten, optisch untersucht, um die durch Boronsäuren induzierten Einflüsse zu analysieren. Die Einzelstränge der Oligonukleotide zeigen die für die Farbstoffe typische Absorption bei 462 nm (donormodifiziert) und 550 nm (akzeptormodifiziert) (siehe Abbildung 60, beispielhaft dargestellt für **DNA9** und **DNA10** bzw. **DNA6** und **DNA7**). Die Extinktionskoeffizienten der boronsäuremodifizierten Oligonukleotide (**DNA6**, **DNA7**, **DNA9**, **DNA10**) unterscheiden sich dabei nur geringfügig von denen der einfach farbstoffmodifizierten Aptasensoren (**Apt1cAk**, **Apt2cDo**) (siehe Abbildung 60 links).

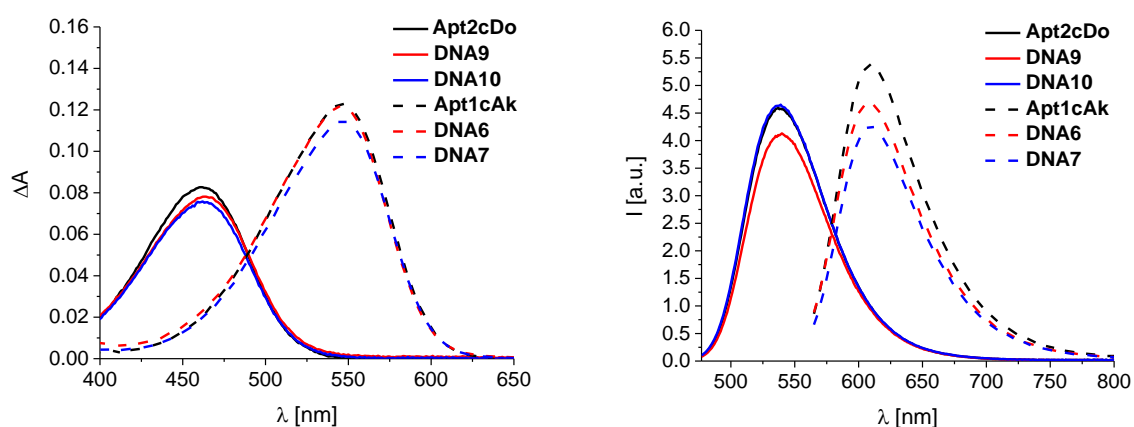


Abbildung 60. Absorption (links) und Fluoreszenz (rechts) der Einzelstränge der doppelt modifizierten Oligonukleotide **DNA6**, **DNA7**, **DNA9** und **DNA10** im Vergleich zu denen der einfach modifizierten **Apt1cAk** und **Apt2cDo**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc}}=462$ nm, $\lambda_{\text{em}}=477-800$ nm (**DNA9**, **DNA10** und **Apt2cDo**); $\lambda_{\text{exc}}=550$ nm, $\lambda_{\text{em}}=565-800$ nm (**DNA6**, **DNA7** und **Apt1cAk**).

Deutlichere Unterschiede sind in den Emissionsspektren zu beobachten. Bei einer Anregung bei 462 nm weist **DNA9** etwa 90 % der grünen Emissionsintensität, im Vergleich zum Referenzstrang **Apt2cDo**, auf. In **DNA10** dagegen befindet sich die Boronsäurefunktionalität weiter vom Farbstoff entfernt, wodurch keine Löschung der Emissionsintensität stattfindet. Sind die Oligonukleotide dahingegen mit dem Akzeptorfluorophor modifiziert und somit anregbar bei 550 nm, nimmt die Boronsäure mehr Einfluss auf das Emissionsverhalten. So zeigen die beiden Einzelstränge **DNA6** und **DNA7** eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 21 % bzw. 13 % im Vergleich zum Referenzstrang **Apt1cAk**.

Auch die Doppelstränge der boronsäuremodifizierten Oligonukleotide weisen die typischen Absorptionsmaxima bei 462 nm und 550 nm auf (siehe Abbildung 61). Die genauere Betrachtung zeigt, dass die potentiellen Aptamere auch ohne D-Glucose ein zueinander sehr unterschiedliches Verhalten aufweisen. So unterscheiden sich die Extinktionskoeffizienten des Donors gravierend je nach Position der Boronsäuren.

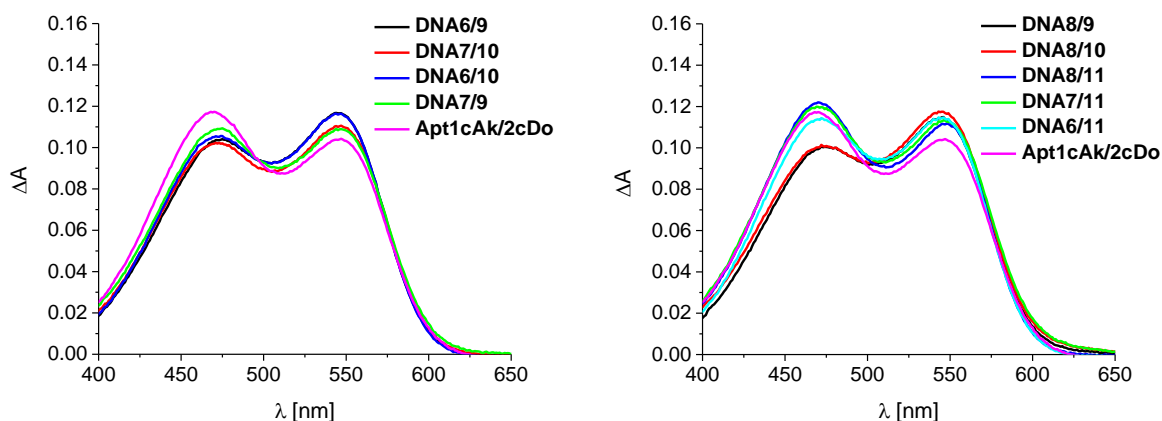


Abbildung 61. Absorption der doppelt modifizierten potentiellen Aptasensoren **DNA6/9-DNA8/11**. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

Wenn der Quotient der Absorptionsmaxima des Donors und Akzeptors $A_{Do}/A_{Ak} > 1.0$ ist, kommt es zu einer größeren Wechselwirkung der beiden Boronsäuren innerhalb der Oligonukleotide, was zu einem höheren Kontrastverhältnis führt (siehe Tabelle 16). Die Fluoreszenz wurde bei 10 °C aufgenommen, da bei dieser Temperatur der Einfluss der Boronsäuren auf den Energietransfer ausgeprägter ist und daher das unterschiedliche Verhalten besser dargestellt werden kann (siehe Abbildung 62 und Kapitel 8.4.2 Abbildung 77). Weiterhin induzieren die sehr geringen Schmelzpunkte der Duplexe, dass diese nur bei Temperaturen unter 15 °C geschlossen werden (siehe Tabelle 16).

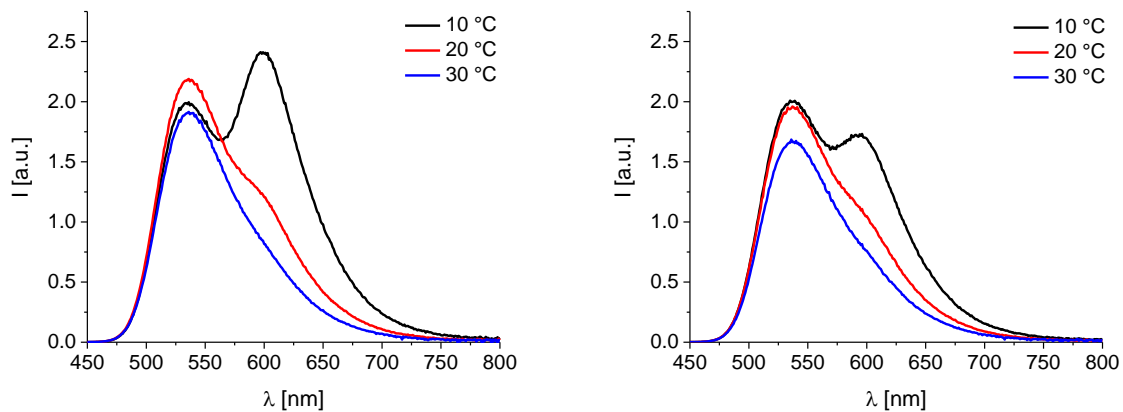


Abbildung 62. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz von **DNA6/10** (links) und **DNA6/9** (rechts). Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450\text{-}800$ nm.

Auffällig ist die negative Auswirkung der beiden Boronsäuren aufeinander, wenn sie sich innerhalb des doppelsträngigen Oligonukleotids direkt gegenüberliegen (siehe **DNA6/9** und **DNA7/10**). Diese Orientierung der beiden zueinander führt zu einem geringen Kontrastverhältnis und äußert sich zudem in einer relativ niedrigen Schmelztemperatur, die deutlich unter der des unmodifizierten Aptasensors **Apt1cAk/2cDo** liegt. Wird die Sequenz des Doppelstranges beibehalten, die beiden Boronsäuren jedoch voneinander entfernt und jeweils in einer separaten Schlaufe platziert, nimmt das Kontrastverhältnis zu (siehe **DNA7/9** und **DNA6/10**). Dies induziert im Fall von **DNA7/9** jedoch eine Löschung der Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen doppelsträngigen Oligonukleotiden, was außerdem durch eine Stabilisierung des Duplexes begleitet wird (siehe Abbildung 63 links und Tabelle 16).

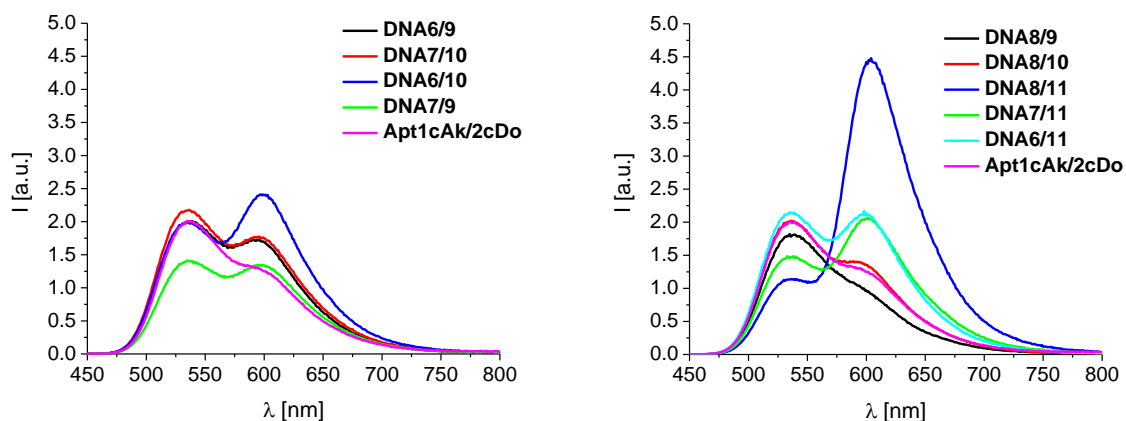


Abbildung 63. Fluoreszenz der doppelt modifizierten potentiellen Aptasensoren **DNA6/9-DNA8/11**. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 °C; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450\text{-}800$ nm.

Bei den bisher beschriebenen DNA-Strängen wurde die Sequenz des untersuchten Aptasensors **Apt1cAk/2cDo** insoweit beibehalten, dass ausschließlich 2'-Desoxyadenosinbausteine durch aminfunktionalisiertes 7-Deaza-2'-desoxyadenosin **zA** ausgetauscht wurden. Bei den folgenden Oligonukleotiden (**DNA8** und **DNA11**) hingegen wurde die komplementäre Region zwischen den zwei Schlaufen modifiziert, sodass auch eine Veränderung der Sequenz stattfand, da 2'-Desoxyguanosin durch aminfunktionalisiertes 7-Deaza-2'-desoxyadenosin **zA** ersetzt wurde. Die Öffnung der Zange zwischen den Schlaufen sollte eine erhöhte Flexibilität des Aptamers induzieren, wodurch eine verbesserte Glucosedetektion und -bindung ermöglicht werden sollte.

Tabelle 16. Optische Eigenschaften der untersuchten potentiellen Aptasensoren und des Referenzduplexes **Apt1cAk/2cDo**. Bedingungen: 2.5 µM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 °C.

DNA	$\Delta\lambda^{[a]}$ [nm]	A_{Do}/A_{Ak}	I_{Ak}	I_{Do}	I_{Ak}/I_{Do}	T_m
Apt1cAk/2cDo	78	1.1	1.25	1.98	0.6	35
DNA6/9	72	0.9	1.72	2.01	0.9	19
DNA6/10	74	0.9	2.41	1.98	1.2	15
DNA6/11	74	1.0	2.17	2.14	1.0	17
DNA7/9	74	1.0	1.35	1.41	1.0	25
DNA7/10	74	0.9	1.77	2.17	0.8	15
DNA7/11	77	1.1	2.07	1.47	1.4	20
DNA8/9	72	0.9	1.03	1.82	0.6	24
DNA8/10	72	0.9	1.40	1.98	0.7	13
DNA8/11	77	1.1	4.48	1.13	4.0	26

[a] $\Delta\lambda_{abs} = \lambda_{maxDo} - \lambda_{maxAk}$.

Auch die zangenlosen Oligonukleotide weisen sehr unterschiedliche optische Eigenschaften auf. So zeigen alle Doppelstränge bis auf **DNA8/9** ein besseres Kontrastverhältnis als der nur farbstoffmodifizierte Aptasensor. Die räumliche Nähe der Boronsäuremodifikation zum Donorfarbstoff wirkt sich negativ auf den Energietransfer aus, was sehr deutlich bei **DNA8/9** beobachtet werden kann, welcher mit $I_{Ak}/I_{Do} = 0.6$ mit Abstand das geringste Kontrastverhältnis aufweist. Auffällig ist, dass sich **DNA8/9** und **DNA7/11** ausschließlich durch die Position der Boronsäuren im jeweiligen Strang unterscheiden. So weisen die Boronsäuren in beiden Doppelsträngen die gleichen Nachbarbasen und Gegenbasen sowie Orientierung zueinander auf (siehe Abbildung 64). Sie unterscheiden sich ausschließlich durch ihre jeweilige

Distanz zu den beiden inkorporierten Farbstoffen. Die zunehmende Distanz zum Energietransferpaar um ein zusätzliches Basenpaar führt in **DNA7/11**, verglichen mit **DNA8/9**, zu einer Zunahme des Kontrastverhältnisses um 246 % und gleichzeitig zu einer Destabilisierung des Duplexes um 4 °C.

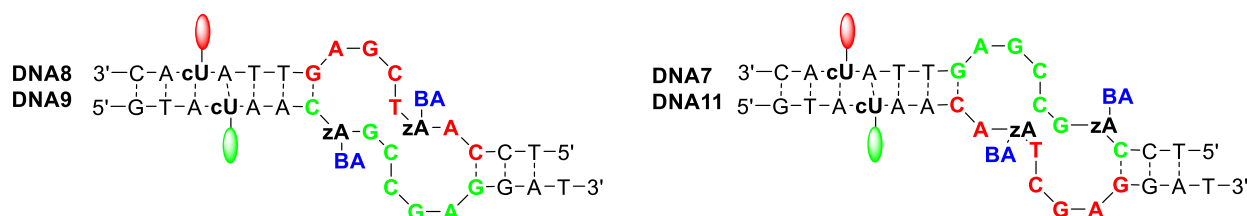


Abbildung 64. Sequenzen der beiden doppelsträngigen Oligonukleotide **DNA8/9** und **DNA7/11**. Die übereinstimmenden Sequenzabschnitte sind farblich hervorgehoben.

Auch **DNA8/10** und **DNA6/11** gleichen sich in der Anordnung der beiden Boronsäuren zueinander sowie deren Umgebung. So weisen beide zwar ähnliche Absorptions-, jedoch sehr unterschiedliche Emissions- und Schmelzeigenschaften auf. **DNA8/10** zeigt ein geringeres Kontrastverhältnis, gleichzeitig aber auch eine extrem geringe Schmelztemperatur des Duplexes, die geringste aller untersuchten Doppelstränge. Bei **DNA6/11** liegt diese um 4 °C höher und resultiert in einer Zunahme des Kontrastverhältnisses um 142 %. Die immense Destabilisierung des Duplexes führt zu Schmelztemperaturen, die geringer als 19 °C sind, welche vermehrt in den Oligonukleotiden zu finden, die die Boronsäure weit möglichst entfernt vom Donorfarbstoff oder sehr nah zum Akzeptorfarbstoff haben (siehe **DNA6/9**, **DNA6/10**, **DNA6/11**, **DNA7/10**, **DNA8/10**). Eine Stabilisierung des Duplexes findet statt, wenn sich die beiden Boronsäuren in jeweils unterschiedlichen Schlaufen befinden, jedoch gleichzeitig eine gewisse räumliche Nähe aufweisen (siehe **DNA7/9**, **DNA8/9**, **DNA7/11**, **DNA8/11**). Das weist darauf hin, dass eine Interaktion der Boronsäuren mit dem Phosphatrückgrat bzw. den gegenüberliegenden Basen zu einer stärkeren Wechselwirkung der beiden Stränge miteinander führt.^[208-209] Ein weiteres Indiz dafür ist das extrem erhöhte Kontrastverhältnis im Gegensatz zu dem nicht boronsäuremodifizierten Doppelstrang **Apt1cAk/2cDo**. Das bestmögliche Kontrastverhältnis der untersuchten Duplexe liegt ohne das Zielmolekül D-Glucose bei 4.0. Dieses wird durch die Boronsäuremodifikation in der Zangenregion erreicht, da dies eine Basenpaarung des aminmodifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosins mit dem gegenüberliegenden Thymin ermöglicht. Dies

resultiert außerdem in einer Stabilisierung des Duplexes, welche aber immer noch knapp 10 °C unter der Schmelztemperatur des Referenzduplexes **Apt1cAk/2cDo** liegt.

Das entwickelte Konzept zur orthogonalen Modifizierung mit einer Boronsäure bei vorheriger Einführung eines Fluorophors mittels CuAAC konnte erfolgreich verwirklicht werden. Um die genauen Auswirkungen der Boronsäuren auf die Eigenschaften als wellenlängenverschiebende Oligonukleotide zu evaluieren, wäre jedoch der Aufbau einer kompletten Bibliothek notwendig, da dadurch auch die hier aufgezeigten Zusammenhänge bestätigt werden können. Die bisher gezeigten Ergebnisse beschreiben ausschließlich das Verhalten der Oligonukleotide in Abwesenheit des Zielmoleküls D-Glucose. Die Auswirkungen der Anwesenheit des Zielmoleküls D-Glucose soll im nächsten Kapitel genauer betrachtet werden.

6.5.2 Optische Eigenschaften als Glucose-Sensoren

Die synthetisierten doppelt modifizierten Oligonukleotide besitzen im Doppelstrang jeweils zwei Boronsäuren. Da D-Glucose im Gegensatz zu D-Fructose zwei Bindungsstellen für die Ausbildung der Boronsäureester zur Verfügung stellen, sollte die Verfügbarkeit von zwei Boronsäuren innerhalb eines Doppelstranges die selektive Bindung und somit Detektion von D-Glucose erleichtern. Diese Detektion würde im Idealfall den zuvor einzeln vorliegenden Strängen die Hybridisierung ermöglichen, wodurch das eingebaute Energietransferpaar in räumliche Nähe gelangt und ein Fluoreszenzfarbwechsel von grün nach rot stattfindet.

Um die Eignung der vorliegenden Doppelstränge **DNA6-DNA11** als D-Glucose-Sensoren zu untersuchen, wurden diese mit einer steigenden Konzentration des Zielmoleküls inkubiert und anschließend optisch charakterisiert. Die ersten Tests wurden mit nicht zuvor hybridisierten Oligonukleotiden durchgeführt, die schrittweise mit einer höheren Konzentration an D-Glucose versetzt, anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und letztlich bei 15 °C (siehe Abbildung 65 links) auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht wurden. Diese Temperatur wurde gewählt, da diese etwa dem Schmelzpunkt des untersuchten Doppelstranges entspricht (siehe Tabelle 16). Dabei kann eine leichte Veränderung des Kontrastverhältnisses bei zunehmender Glucosekonzentration beobachtet werden. Die Differenzen sind jedoch so klein, dass sie nicht zur Detektion der D-Glucose

geeignet sind, da sie innerhalb der Fehlertoleranz der Messungen liegen. Um die Auswirkungen einer vorherigen Hybridisierung in Abwesenheit des Zielmoleküls zu evaluieren, wurden weitere Messungen mit höheren Glucosekonzentrationen durchgeführt (siehe Abbildung 65 rechts).

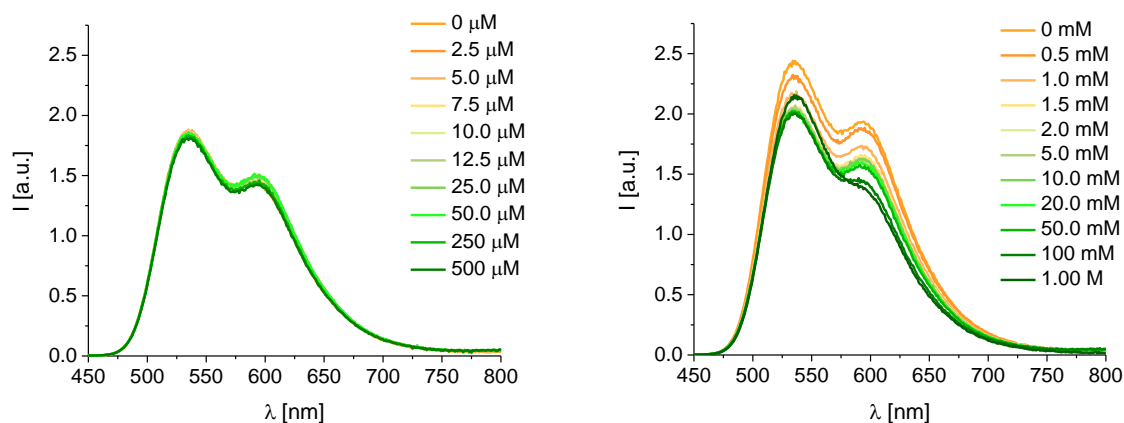


Abbildung 65. Fluoreszenz von **DNA6/10** nach Titration mit D-Glucose bei 15 °C ohne (links) und mit (rechts) vorheriger Hybridisierung. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 15 °C; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

Diese zeigen, dass eine vorherige Hybridisierung zu einer erhöhten Emissionsintensität führt. Auch hier kann bei einer Glucosekonzentration von 500 μM eine geringe Erhöhung des Kontrastverhältnisses von 0.79 auf 0.81 beobachtet werden, wobei jedoch ein Teil der Emissionsintensität gelöscht wird. Die weitere Zugabe von D-Glucose induziert ausschließlich eine Löschung der Fluoreszenz und zusätzlich eine Verminderung des Energietransfers, welches sehr offensichtlich bei einer Konzentration von 1.00 M D-Glucose wird. Auch die Untersuchung der übrigen Doppelstränge führte nicht zum gewünschten Erfolg (Titrationsspektren siehe Kapitel 8.4.3). Die optischen Untersuchungen wurden dabei für verschiedene Temperaturen durchgeführt, wobei auch die Inkubationszeiten bis zu 14 h variiert wurden. Auch eine Hybridisierung nach Glucosezugabe sowie eine Verminderung der Salzkonzentration führte nicht zur erwünschten Schließung des Doppelstranges. Alle durchgeführten Versuche sowie deren Ergebnisse sind in Kapitel 8.4.3 dargestellt.

Da bekannt ist, dass Boronsäuren je nach pH-Wert ihrer Umgebung unterschiedlich vorliegen und somit eine unterschiedliche Bindungsaffinität gegenüber Diolen aufweisen, wurden anschließend pH-abhängige optische Untersuchungen durchgeführt.

6.5.3 pH-abhängige Messungen

Boronsäuren weisen je nach Umgebungsart und pH-Wert ihrer Umgebung ein trivalentes oder tetravalentes Verhalten auf. Bei ihrer Fähigkeit, mit Alkoholen unter Abspaltung von Wasser Boronsäureester zu bilden, handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, bei der mehrere Teilgleichgewichte beteiligt sein können (siehe Abbildung 66).^[210] In wasserfreien organischen Lösungsmitteln wird ausschließlich die trivalente Spezies beobachtet. In wässriger basischer Umgebung wird das Elektronendefizit am Bor-Atom durch Koordination eines vierten Bindungspartners ausgeglichen, sodass sich der O-B-O-Winkel von trigonal planaren 120° einem tetraedrischen Winkel von 109.5° annähert. Eine Konsequenz aus dieser Verringerung des Bindungswinkels ist eine geringere Lewis-Azidität der freien Boronsäure im Vergleich zum neutralen Ester.^[63, 211]

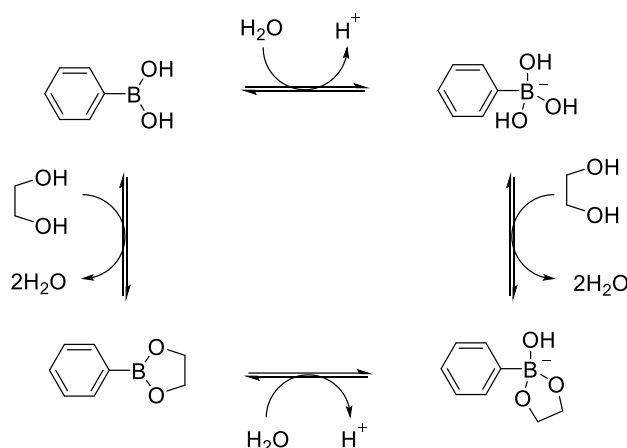


Abbildung 66. Gleichgewicht der Phenylboronsäure und einem 1,2-Diol in wässriger Umgebung.

Da die bisher durchgeführten Messungen auf eine Wechselwirkung durch Wasserstoffbrücken-Aggregationseffekte der Boronsäuren mit dem Phosphatrückgrat bzw. den Basen der Oligonukleotide hinweisen, wäre es möglich, dass die Zugabe des Zielmoleküls D-Glucose bei einem neutralen pH-Wert zu einer Aufhebung dieser Wechselwirkung führt. So könnte es bei einer ausreichend hohen Konzentration zu einer quantitativen Absättigung der Boronsäure durch D-Glucose kommen. Dadurch entfernen sich die beiden Fluorophore so weit voneinander, dass kein effizienter Energietransfer mehr stattfinden kann. *Smietana et al.* beobachteten bei ihren Untersuchungen, dass die Ausbildung der Boronsäureester stark pH- und temperaturabhängig ist. Ihre Forschung beschäftigt sich mit dem Einbau eines am 5'-Ende boronsäuremodifizierten Thymidins in DNA.^[212-213] Dieses modifizierte Oligonukleotid wird nach der Synthese der Autoligation mit einem geeigneten Templatstrang unterworfen. Dabei

findet die Ligation des boronsäuremodifizierten Oligonukleotids mit einem am 3'-Ende RNA-modifizierten Oligonukleotids, durch die Ausbildung eines Boronsäureesters, statt. Dabei beobachteten sie im basischen Milieu eine Zunahme der Schmelztemperatur, was auf eine erfolgreiche Ligation hindeutet und zeigt, dass die Esterausbildung bei höheren pH-Werten schneller stattfindet.^[214-215] Aufgrund dieser Vermutung wurden weitergehende Experimente exemplarisch an **DNA7/9** durchgeführt, bei denen der Einfluss des pH-Wertes untersucht wurde. Die optische Charakterisierung des Doppelstranges **DNA7/9** ohne die Zugabe des Zielmoleküls zeigt die typischen Absorptionsmaxima der beiden Fluorophore (siehe Abbildung 67).

Tabelle 17. Optische Eigenschaften von **DNA7/9** bei verschiedenen pH-Werten. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer (pH = 7 und 9 (Zugabe von NaOH)), 10 mM TAE Puffer (pH = 8), 10 mM Citratpuffer (pH = 6), 250 mM NaCl, 10 °C.

DNA (pH-Wert)	λ_{\max} Do [nm]	λ_{\max} Ak [nm]	$\Delta\lambda$ ^[a] [nm]	A_{Do}/A_{Ak}	I_{Ak}	I_{Do}	I_{Ak}/I_{Do}
DNA7/9 (6)	471	548	87	0.9	1.73	1.20	1.4
DNA7/9 (7)	472	546	84	1.0	1.35	1.40	1.0
DNA7/9 (8)	472	545	83	1.0	1.08	1.35	0.8
DNA7/9 (9)	472	544	82	1.0	0.90	1.98	0.5

[a] $\Delta\lambda = \lambda_{\max Do} - \lambda_{\max Ak}$.

Auffällig sind die sich ändernden Extinktionskoeffizienten. So wird der des Donorfarbstoffes bei zunehmendem pH-Wert größer, wohingegen der des Akzeptorfarbstoffes erst eine Zunahme bei pH 9 zeigt. Außerdem wird das Absorptionsmaximum des Akzeptors mit zunehmender Basizität leicht blauverschoben.

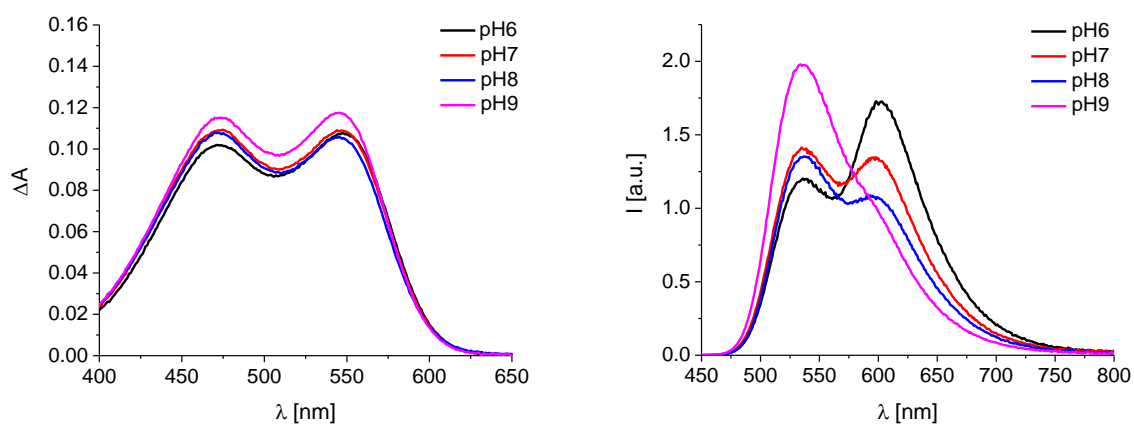


Abbildung 67. Absorption (links) und Fluoreszenz (rechts) von **DNA7/9** bei verschiedenen pH-Werten. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer (pH = 7 und 9 (Zugabe von NaOH)), 10 mM TAE Puffer (pH = 8), 10 mM Citratpuffer (pH = 6), 250 mM NaCl, 10 °C; $\lambda_{exc}=435$ nm, $\lambda_{em}=450-800$ nm.

Der Quotient der Absorption bei 462 nm und 550 nm nimmt mit zunehmendem pH-Wert zu, was in einem verminderten Kontrastverhältnis mit steigendem pH-Wert resultiert (siehe Tabelle 17 und Abbildung 67). Die Abnahme des Kontrastverhältnisses mit zunehmendem pH-Wert ist ein weiterer Hinweis auf die verstärkte Wechselwirkung der Boronsäuren mit dem Gegenstrang. Durch die Erhöhung der Basizität im wässrigen Medium wird das Gleichgewicht auf Seite der tetravalenten Spezies verschoben (siehe Abbildung 66). Die Wechselwirkung der beiden Einzelstränge wird aufgehoben und es findet kein Energietransfer aufgrund mangelnder räumlicher Nähe der beiden Fluorophore statt. Im Gegensatz dazu weist der Referenzstrang **Apt1cAk/2cDo** ein konträres Verhalten auf. Das Kontrastverhältnis ist weitaus weniger abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums und nimmt mit steigendem pH-Wert zu (siehe Abbildung 68).

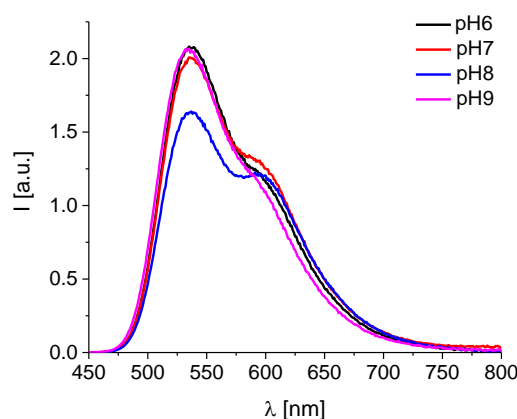


Abbildung 68. Fluoreszenz des Referenzstranges **Apt1cAk/2cDo** in Abhängigkeit des pH-Wertes. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer (pH = 7 und 9 (Zugabe von NaOH)), 10 mM TAE Puffer (pH = 8), 10 mM Citratpuffer (pH = 6), 250 mM NaCl, 10 °C; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

Bei einem pH-Wert von 9 ist bereits ein Teil der DNA deprotoniert, wodurch die Hybridisierung der beiden Einzelstränge erschwert wird. Dies kann bei beiden Doppelsträngen (**Apt1cAk/2cDo** und **DNA7/9**) in Form des geringsten Kontrastverhältnisses beobachtet werden. Auch die Titration mit dem Zielmolekül D-Glucose wurde bei den vier verschiedenen pH-Werten an **DNA7/9** durchgeführt (Titrationsspektren bei 10 °C siehe Kapitel 8.4.4 Abbildung 87). Dabei konnte eine Veränderung des Energietransfers und somit des Kontrastverhältnisses bei zunehmendem pH-Wert beobachtet werden. Besonders ausgeprägt ist diese bei einer Temperatur von 5 °C und einem pH-Wert von 9 (siehe Abbildung 69). Bis zu einer Konzentration von 5 mM der D-Glucose kann eine Zunahme des Kontrastverhältnisses auf bis zu 0.7 beobachtet werden. Damit kann ein Verstärkungsfaktor f von 1.3 erhalten werden.

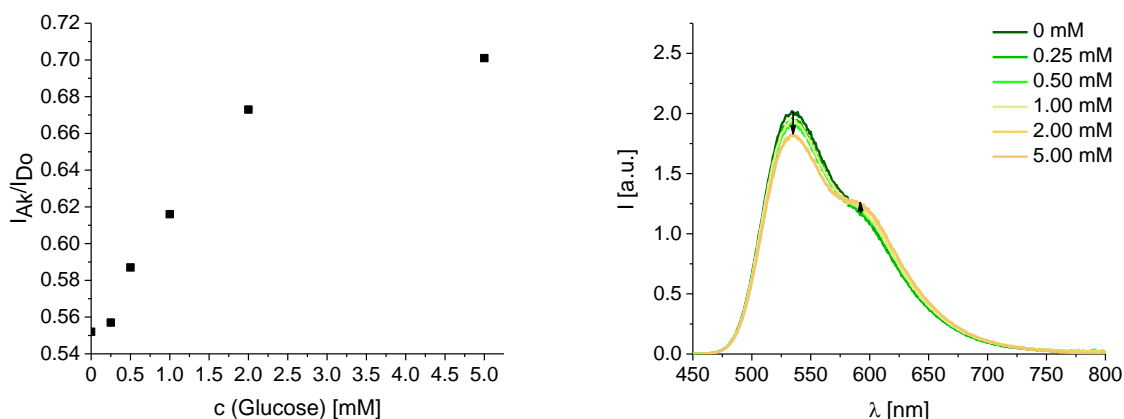


Abbildung 69. Kontrastverhältnis von **DNA7/9** bei pH 9 in Abhängigkeit der Glucosekonzentration (links) und Emissionsspektren der Titration (rechts). Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na Pi Puffer, pH 9 (Zugabe von NaOH), 250 mM NaCl, 5 °C; $\lambda_{exc}=435$ nm, $\lambda_{em}=450-800$.

Da der Energietransfer relativ gering bleibt und eine erfolgreiche und sichtbare Detektion erst bei 5 °C stattfindet, wurde ein weiterer Doppelstrang bei pH 9 untersucht. Für diese Untersuchung wurde **DNA8/11** ausgewählt, da dieser bei pH 7 das größte Kontrastverhältnis zeigt, das durch die mögliche Basenpaarung zwischen dem aminmodifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosin und Thymidin verursacht wird. Bei einer erfolgreichen Detektion bei pH 9 sollte daher eine effizientere und sichtbarere Änderung des Energietransfers stattfinden.

Zur Evaluierung des besten Kontrastverhältnisses wurde **DNA8/11** bei verschiedenen Temperaturen und einem pH-Wert von 9 untersucht (siehe Abbildung 70). Das Kontrastverhältnis der Doppelstränge ohne Zugabe des Zielmoleküls nimmt, wie erwartet, mit zunehmender Temperatur ab. Durch die Zugabe der D-Glucose kann in allen Fällen eine Zunahme des Kontrastverhältnisses beobachtet werden. Auffällig ist, dass bei 5 °C der Verstärkungsfaktor f mit 1.1 kleiner ist als bei höheren Temperaturen (siehe Tabelle 18). Das bedeutet, dass der Doppelstrang bereits ohne Glucosezugabe fast vollständig geschlossen vorliegt und das Zielmolekül nur eine geringfügige weitere Schließung induziert. Bei einer Erhöhung der Temperatur nimmt zwar das Kontrastverhältnis ab, aber es kommt zu einer Erhöhung des Verstärkungsfaktors. Dies zeigt, dass das Aptamer durch Zugabe des Zielmoleküls effektiver geschlossen werden kann. So ist es möglich im Gegensatz zu **DNA7/9** eine Detektion von D-Glucose sogar bei 20 °C zu ermöglichen.

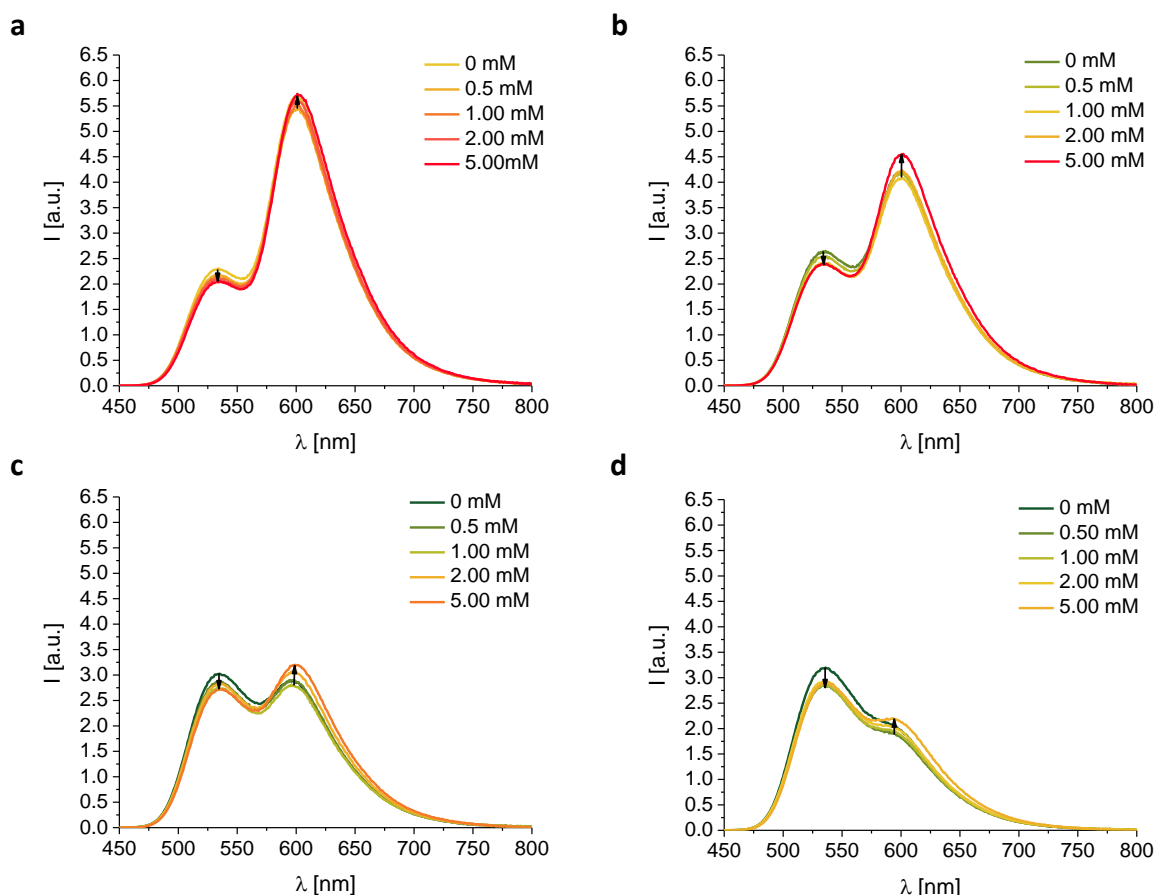


Abbildung 70. Emissionsspektren der Titration von **DNA8/11** mit D-Glucose bei pH = 9. a) 5 °C; b) 10 °C; c) 15 °C; d) 20 °C. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, pH 9 (Zugabe von NaOH), 250 mM NaCl; $\lambda_{exc}=435$ nm, $\lambda_{em}=450-800$ nm.

Das beste Detektionsvermögen hat **DNA8/11** bei einer Temperatur von 10 °C, da bei dieser Temperatur ein Verstärkungsfaktor von 1.3 bei einer maximalen Zugabe von 5 mM D-Glucose erreicht werden kann (siehe Tabelle 18). Die Auftragung des Kontrastverhältnisses in Abhängigkeit der Glucosekonzentration zeigt eine stetige Zunahme des Kontrastverhältnisses mit zunehmender Konzentration (siehe Abbildung 71 links).

Tabelle 18. Kontrastverhältnisse und Verstärkungsfaktoren von **DNA8/11** mit und ohne Zielmolekül bei unterschiedlichen Temperaturen. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 9.

T [°C]	I _{Ak} ^[a]	I _{Do} ^[a]	I _{Ak} /I _{Do} ^[a]	I _{Ak} ^[b]	I _{Do} ^[b]	I _{Ak} /I _{Do} ^[b]	f
5	5.59	2.29	2.5	5.74	2.05	2.8	1.1
10	4.06	2.65	1.5	4.54	2.38	1.9	1.3
15	2.88	3.03	1.0	3.32	2.83	1.2	1.2
20	2.06	3.18	0.7	2.39	3.18	0.8	1.2

[a] 0 mM D-Glucose; [b] 5 mM D-Glucose.

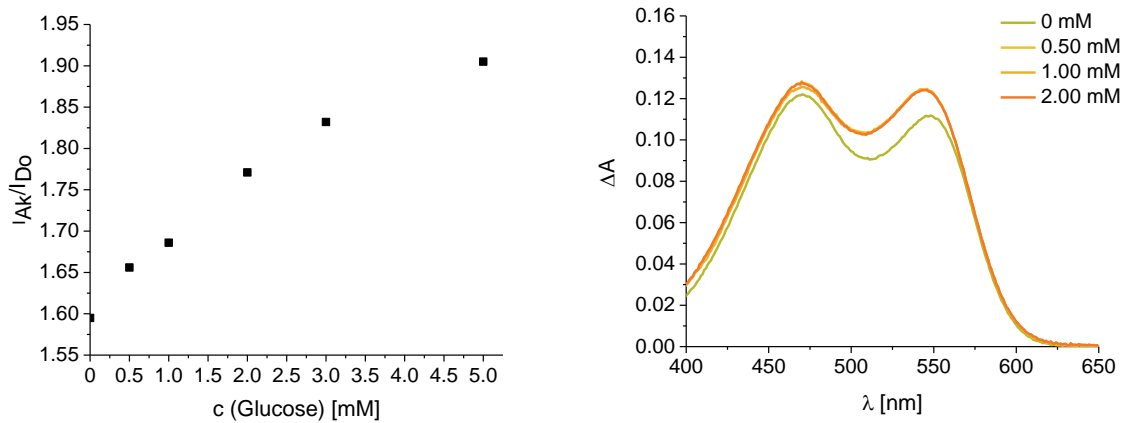


Abbildung 71. Auftragung des Kontrastverhältnisses in Abhängigkeit der D-Glucosekonzentration (links) und Absorption (rechts) des Doppelstranges **DNA8/11** bei 10 °C und pH 9. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 9, 10 °C.

Die Extinktionskoeffizienten beider Farbstoffe nehmen durch die Zugabe des Zielmoleküls zu, wobei die Zunahme des Extinktionskoeffizienten des Akzeptors ausgeprägter als die des Donors ist. Damit konnte gezeigt werden, dass **DNA8/11** durch die zusätzliche Basenpaarung als Sensor zur Glucosedetektion geeignet ist und diese bei Temperaturen bis zu 20 °C durchgeführt werden kann.

6.6 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte erfolgreich eine kovalente Verknüpfung einer Boronsäurefunktionalität orthogonal zu einer CuAAC realisiert und zweifelsfrei identifiziert werden. Dafür wurde eine Synthesestrategie entwickelt, die erlaubt, die Boronsäure an einer beliebigen Stelle der Sequenz einzuführen und zusätzlich die postsynthetische kupferkatalysierte Reaktion eines Fluorophors zu tolerieren. Durch die Verwendung dieser Strategie wurden neun verschiedenen potentielle Aptasensoren entwickelt, die im Gegensatz zu den von *Stojanovic* publizierten Aptameren durch die kovalente Verknüpfung der Boronsäure mit dem Oligonukleotid auf einem Zwei-Komponenten-System beruhen. Auffallend sind die extremen Auswirkungen der beiden in den Schleifen platzierten Boronsäuren auf die optischen Eigenschaften der Doppelstränge. So werden bereits ohne die Zugabe des Zielmoleküls D-Glucose Kontrastverhältnisse von bis zu 4.0 bei 10 °C erreicht. Die Detektion des Zielmoleküls erwies sich als komplizierter als angenommen, da bei einem neutralen pH-Wert eine starke Wechselwirkung der Boronsäure mit dem als Gegenstrang vorliegenden Oligonukleotid stattfindet. So weisen fast alle Oligonukleotide ein größeres Kontrastverhältnis als der Referenzduplex **Apt1cAk/2cDo** auf, was auf eine verstärkte Wechselwirkung der beiden Oligonukleotide durch die Boronsäuren hinweist. Die Erhöhung des pH-Wertes auf 9 hebt diese Wechselwirkungen zum Großteil auf, wodurch eine Detektion im Konzentrationsbereich von wenigen mmol/L ermöglicht wurde. Dabei konnte ein Verstärkungsfaktor von bis zu 1.3 erreicht werden.

Insgesamt war es möglich, einen Aptasensor zu entwickeln, der erfolgreich D-Glucose im Konzentrationsbereich von wenigen mmol/L detektieren kann. Nachteilig an dem bisherigen System ist jedoch dessen ausschließliche Anwendbarkeit im basischen wässrigen Milieu. Eine weitere Modifizierung der vorliegenden Boronsäure (siehe Abbildung 72 **BN-BA**) könnte die bei neutralem Milieu vorliegenden Wechselwirkungen durch die B-N-Koordination unterbinden, da dadurch das p-Orbital durch einen nukleophilen Angriff geschützt wird. Außerdem erzwingt die Koordination des Stickstoffes an das Bor-Atom den für die Bindung des Zuckers notwendigen tetraedrischen O-B-O-Winkel. Die postsynthetische Modifizierung mit dieser Boronsäure könnte eine Detektion im neutralen wässrigen Milieu ermöglichen. Die Problematik, die optimale Sequenz zur Detektion des Zielmoleküls herauszufinden, wird dadurch jedoch nicht gelöst. Eine Möglichkeit, eine Selektion der Aptamersequenz

durchzuführen, bietet hierbei SELEX. Dafür müsste jedoch die Boronsäure als basenmodifizierter Phosphoramiditbaustein zugänglich sein. Die Amidkupplung von **B1** mit dem Aminlinker am freien Nucleosid wurde bereits erfolgreich durchgeführt (siehe Kapitel 8.2). Zur Vermeidung von Nebenreaktionen und zur Verminderung der Hygroskopie ist es jedoch von Vorteil, wenn eine pinakolgeschützte Boronsäure eingeführt wird. Ein pinakolgeschütztes boronsäuremodifiziertes Nucleosid wurde 2018 von *Obika et al.* erfolgreich synthetisiert und konnte mittels Festphasensynthese eingebaut werden.^[216] Dieses Konzept könnte auf den mit Propyl-linkern modifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosinbaustein übertragen werden.

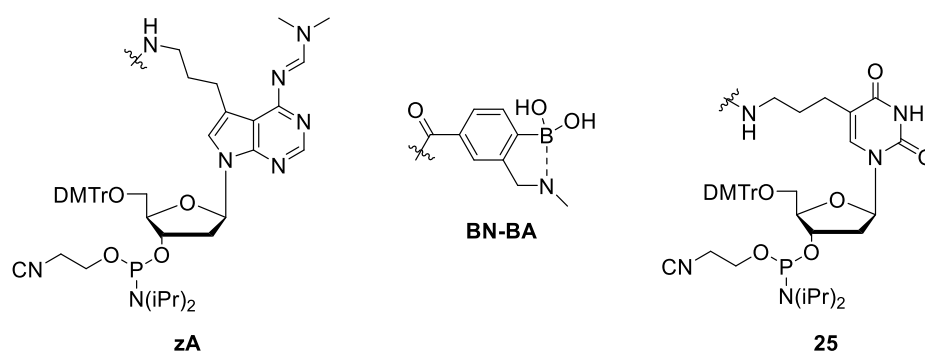


Abbildung 72. Bausteine zur Einführung der Boronsäure über Festphasensynthese und alternative Modifikation der Boronsäure zur möglichen Detektion bei neutralem pH-Wert.

Um eine leichtere Zugänglichkeit zu erhalten, wäre die Modifizierung ausgehend von 5-Iod-2'-desoxyuridin denkbar, wodurch der Baustein **25** (siehe Abbildung 72) mittels *Ultramild*-Methode eingebaut werden könnte. Auf diese Weise kann eine Bibliothek aufgebaut werden, die zur Selektion verwendet werden kann. Eine Auslesung der erfolgreichen Detektion von D-Glucose mittels eines Energietransferpaares wäre in diesem Fall jedoch nicht mehr möglich.

7 Zusammenfassung

Im Wesentlichen beschäftigte sich diese Arbeit mit der Untersuchung eines photostabilen Energietransferpaares, welches kovalent in Nukleinsäuren eingebracht wurde. Dabei lag der Fokus auf der präsynthetischen sowie postsynthetischen Verknüpfung der Fluorophore und deren Anwendbarkeit als bioanalytische Sonden, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Die beiden Fluorophore konnten erfolgreich als Basensurrogate synthetisiert und über die automatisierte Phosphoramiditchemie in DNA eingebaut werden, wodurch eine Interkalation der beiden in die Helix ermöglicht wurde. Dort konnte der Einfluss der Umgebung sowie des Abstandes der beiden Farbstoffe zueinander evaluiert werden. Dabei stellte sich **DNA0-AT**, mit A bzw. T als Gegenbase und den beiden Fluorophoren in direkter Nachbarschaft, als beste Energietransfersonde heraus, da sich diese durch hervorragende Kontrastverhältnisse und hohe Quantenausbeuten auszeichnet. Zusätzlich zu den hervorragenden optischen Eigenschaften wird im Gegensatz zum postsynthetischen Ansatz der Einsatz von zelltoxischem Kupfer(I) vermieden, was diese Sonden sehr attraktiv für den Einsatz in lebenden Zellen macht. Dies konnte repräsentativ durch eine erfolgreiche Transfektion von **DNA0-AT** in HeLa-Zellen gezeigt werden, was zusätzlich ihre Anwendbarkeit zur fluoreszenten Bildgebung *in vivo* bestätigt (siehe Abbildung 73).

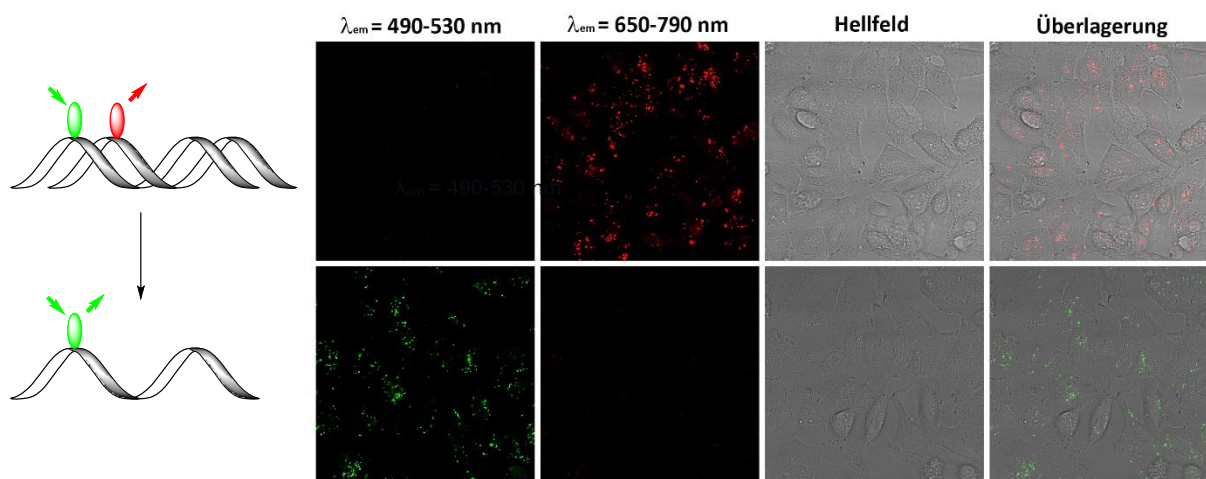


Abbildung 73. Laser-Scanning-Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von HeLa-Zellen 24 h nach Transfektion von 15 pmol **DNA0-AT** und **ssDNA0-AT (Do)**. Die Fluoreszenz wurde im ersten und zweiten Kanal aufgezeichnet. Die dritte Spalte zeigt das Hellfeld und die vierte die Überlagerung aller drei Kanäle. Es wurde mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Ionen-Laser) angeregt.

Die Übertragung des in DNA optimierten Konzeptes auf RNA konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Die veränderte Helixstruktur führt nur zu geringfügigen Änderungen der optischen Eigenschaften und resultiert in einer fluoreszenzmarkierten Sonde, die nachweislich annähernd keine Toxizität gegenüber lebenden Zellen aufweist. Die erfolgreich durchgeführte Transfektion in lebende Zellen zeigt, dass das Energietransferpaar die biologische Aktivität der synthetisch hergestellten siRNA nicht beeinflusst. Auch wenn über die Regulierung des GFP-Gens keine eindeutige Aussage getroffen werden konnten, konnte auch die Transfektion in GFP-HeLa-Zellen erfolgreich realisiert werden. Zusätzlich zeigten Fluoreszenzlebenszeitmessungen, dass die drei essentiellen Stadien der Genregulierung im Rahmen der RNA-Interferenz unterschiedliche Lebenszeiten aufweisen, wodurch dieses für weiterführende Messungen mit der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie geeignet ist (siehe Abbildung 74).

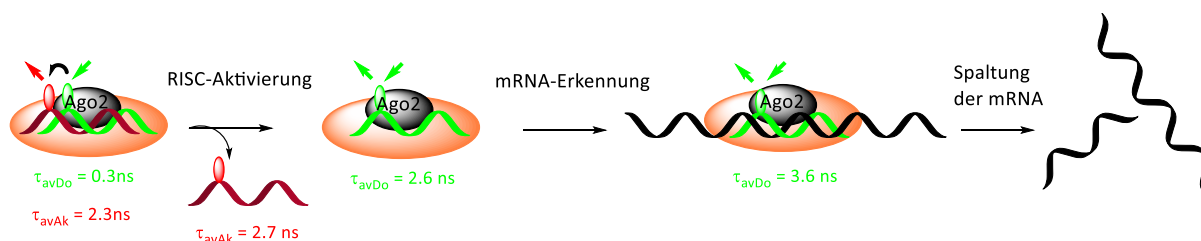


Abbildung 74. Schema der drei essentiellen Stadien der RNA-Interferenz und die zugehörigen Lebenszeiten *in vitro*.

Eine postsynthetische Einführung des Energietransferpaares ermöglichte die Synthese von Aptasensoren, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber einem D-Glucose-Boronsäure-Komplex aufweisen. Durch die Platzierung des Energietransferpaares in der Stammregion der Aptamere konnte bei einer erfolgreichen Erkennung des Zielkomplexes ein Farbwechsel beobachtet werden, da durch das Schließen des Oligonukleotids eine räumliche Nähe der beiden Fluorophore zueinander erzwungen wird. Dabei konnte eine Aptamersequenz evaluiert werden, deren Verstärkungsfaktor von 2.5 zeigt, dass das Aptamer durch die Zugabe des Zielkomplexes bei 10 °C effektiv geschlossen wird.

Um die Sensitivität einer erfolgreichen Detektion zu erhöhen, ist es von Vorteil, die Zahl der zur Detektion benötigten Komponenten zu verringern. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die dafür benötigte Boronsäure kovalent in das Oligonukleotid integriert werden. Dafür wurde erfolgreich ein Synthesekonzept entwickelt, welches ermöglicht, Boronsäurefunktionalitäten an eine beliebige Stelle der Sequenz einzubringen und diese mit einer orthogonalen

kupferkatalysierten postsynthetischen Modifizierung mit einem Fluorophor zu kombinieren und zweifelsfrei zu identifizieren. In leicht basischem Milieu war somit die Möglichkeit gegeben, mit einer Sensitivität im Konzentrationsbereich von wenigen mmol/L das Zielmolekül D-Glucose zu detektieren. So konnte mittels der Reduktion um eine Komponente, durch die kovalente Einbringung der Boronsäure, die Sensitivität um das 200-fache gesteigert werden. Dies resultierte in einem Farbwechsel der Lösung mit einem Verstärkungsfaktor von 1.3 (siehe Abbildung 75).

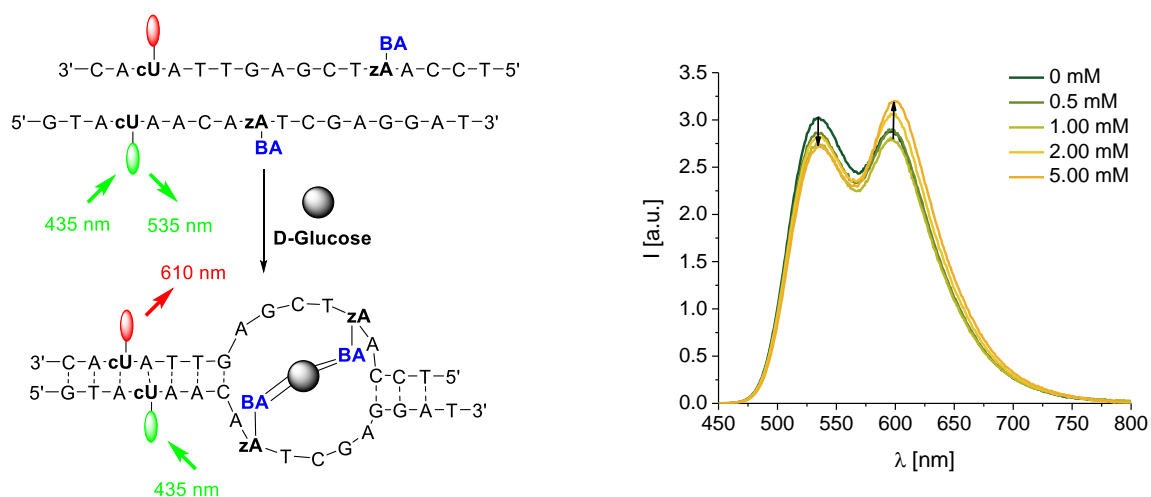


Abbildung 75. Funktionsprinzip und Sequenz des glucosesensitiven Aptasensors und Fluoreszenz der Detektion von D-Glucose von **DNA8/11** bei 15 °C und pH 9.

Insgesamt konnte die erste orthogonale Synthesestrategie verwirklicht werden, bei der gleichzeitig eine Boronsäurefunktionalität und ein Fluorophor mittels kupfer(I)-katalysierter Cycloaddition eingeführt werden kann. Diese Entwicklung eröffnet die Möglichkeit, eine Vielzahl an Boronsäurederivaten in Oligonukleotide zu integrieren und deren Sensitivität sowie Affinität gegenüber D-Glucose zu testen.

8 Experimenteller Teil

8.1 Materialien und Methoden

Lösemittel und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Sigma Aldrich*, *ABCR*, *TCl*, *Merck* und *Carl Roth* bezogen. Die Qualitätsstufe war dabei mindestens „zur Synthese“. Die verwendeten Lösemittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe p.A. (*pro analysi*). Trockene Lösemittel wurden von der Firma *Acros Organics* bezogen und unter Argon aufbewahrt. Für HPLC-Aufreinigungen wurden hochreine (HPLC Grade) organische Lösemittel und doppelt entionisiertes Wasser aus einer *Millipore-Q8*-Anlage verwendet.

Reaktionsführung

Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden unter Argon-Atmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,996 % Reinheit) durchgeführt. Die dafür verwendeten Glasgeräte wurden im Hochvakuum ausgeheizt.

Chromatographie

- **Dünnschichtchromatographie (DC):**

Es wurden fertige mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0.25 mm verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm bzw. Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Die chemische Auswertung erfolgte durch Anfärben mit einer Lösung aus Schwefelsäure in Methanol (3 % H₂SO₄) und anschließendem Erhitzen mit dem Heißluftfön.

- **Flash-Chromatographie (FC):**

Es wurde Kieselgel 60 der Firma *Sigma Aldrich* mit einer Korngröße von 40-63 μ m verwendet. Die Säulen wurden nass gepackt und es wurde nach dem von *Still*

beschriebenen Verfahren^[217] mit leichtem Überdruck chromatographiert. Die zu reinigende Substanz wurde entweder in der mobilen Phase gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert. Präparative *reversed-phase* Aufreinigungen wurden an einem *IntelliFlash 310* der Firma *Varian* durchgeführt. Dafür wurden KP-C18-HS Säulen der Firma *Biotage* verwendet.

- **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):**

Reversed-phase (RP) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Oligonukleotiden wurde an zwei verschiedenen modularen HPLC-Systemen der Firma *Shimadzu* durchgeführt (1: Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL, Säulenofen von *Knauer*, Steuersoftware Class-VP; 2: Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AD, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M20A, Säulenofen CTO-10AS, Steuersoftware Lab Solutions). Zur analytischen Chromatographie wurde eine *reversed-phase Supelcosil™* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm, 3 µm) mit einem Fluss von 1 mL/min verwendet. Semipräparative Trennungen wurden mit einer *reversed-phase Supelco Discovery® BIO Wide Pore* C18-Säule (250 x 10 mm, 5 µm) und einem Fluss von 2.5 mL/min durchgeführt. Bei Trennungen von DNA wurde die Säule mit 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH = 6.5, Laufmittel A) äquilibriert und mit verschiedenen Gradienten von Acetonitril (Laufmittel B) eluiert. RNA-Trennungen erfolgten nach dem gleichen Prinzip, jedoch unter Verwendung eines 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffers (Laufmittel A, RNase-frei). Die Trennung von boronsäuremodifizierten Oligonukleotiden erfolgte mit einem 100 mM Ammoniumcitratpuffer (pH = 6.6, Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B). Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260$ nm und der charakteristischen Absorption der jeweiligen artifiziellen Bausteine.

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff an einer Lyophilisierungsanlage *Alpha 1- 2 LD Plus* von *Christ* oder in einem Vakuumkonzentrator (*Alpha RVC*) von *Christ* getrocknet.

Festphasensynthese

Die Festphasensynthese von DNA und RNA erfolgte an einem *PerSpective Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems*. Die Synthese wurde unter Verwendung von Argon als Schutzgas durchgeführt. Als feste Phase wurde CPG (*controlled pore glass*) mit einer Belegung von 1 μmol (500 Å) verwendet. Die benötigten Phosphoramidite, Reagenzien und CPG-Säulen wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *ChemGenes*, *Proligo* und *Glen Research* bezogen.

RNase freies Arbeiten

Die bei der RNA-Synthese verwendeten Reagenzien wurden nur mit desinfizierten Handschuhen (Ethanol) angefasst und die Arbeitsfläche zuvor mit Ethanol gereinigt. Es wurden ausschließlich zertifizierte RNase freie Plastikgefäße (Eppendorfreaktionsgefäße, Falcon® Tubes, Pipettenspitzen) verwendet. Glasgeräte wurden vor Verwendung mindestens 4 Stunden bei 200 °C ausgeheizt. Die Herstellung von RNase freiem Wasser erfolgte durch die Zugabe von 0.13 % DEPC zu 2 L entionisiertem Wasser und Rühren über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Vernichtung des DEPCs wurde das Wasser mindestens 1 Stunde zum Sieden erhitzt.

Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte bzw. aminmodifizierte DNA- und RNA-Stränge wurden von der Firma *Metabion* in HPLC-aufgereinigten und lyophilisierten Zustand bezogen. Sie wurden in entionisiertem (DNA) bzw. RNase freiem (RNA) Wasser gelöst und ihre Konzentration über die Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt.

NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden an einem *Bruker B-ACS 60* oder *Ascend 500* in deuteriertem Lösungsmittel der Firma *eurisotop* aufgenommen. Dafür befanden sich etwa 5-10 mg der zu messenden Substanz, gelöst in 0.4 bis 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel, in einem Probenröhrchen von 5 mm Durchmesser. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in

ppm angegeben in Bezug auf Tetramethylsilan (TMS) als Nullpunkt. Zur Kalibrierung wurde das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels verwendet:

CDCl₃: ¹H-NMR: δ = 7.26 ppm ¹³C-NMR: δ = 77.16 ppm

DMSO-d₆ ¹H-NMR: δ = 2.50 ppm ¹³C-NMR: δ = 39.52 ppm

CD₃OD-d₄ ¹H-NMR: δ = 3.31 ppm ¹³C-NMR: δ = 49.00 ppm

Die Kopplungskonstante J wurde in Hz angegeben und die Multiplizität der ¹H-Signale wie folgt abgekürzt: s (Singulett), br (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dublett), ddd (Dublett von Dublett von Dublett), t (Triplet), td (Triplet von Dublett), q (Quartett), dq (Dublett von Quartett), m (Multipllett).

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für organische Chemie am KIT aufgenommen. Die Messungen wurden an einem *Finnigan* MAT 95 durchgeführt, wobei als Ionisierungsverfahren EI (Elektronenstoßionisation) und FAB (Fast Atom Bombardement) verwendet wurde. MALDI-TOF Aufnahmen wurden an einem *Biflex-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* und einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* durchgeführt. Dabei wurden folgende Matrices verwendet:

- DNA/RNA: - 3-Hydroxypicolinsäure (gesättigte Lösung in MeCN:Wasser = 1:1) / Diammoniumhydrogencitrat (0.44 M in Wasser) = 9:1
- 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (gesättigte Lösung in Methanol)
- 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (gesättigte Lösung in Methanol) / Diammoniumhydrogencitrat (0.44 M in Wasser) = 2:1
- Kleine Moleküle: - 6-Aza-2-thiothymin (gesättigte Lösung in Acetonitril)

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

Optische Spektroskopie

Die Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt.

UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden an einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit einem temperierbaren Küvettenhalter aufgenommen. Die Spektren wurden gegen das verwendete Lösungsmittel basislinienkorrigiert. Es wurden folgende Parameter verwendet: SBW: 2.0 nm, Durchschnittszeit 0.1 s, Datenintervall 1.0, Lampenwechsel 350 nm.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte der Oligonukleotide wurden an einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* durchgeführt. Dabei wurde die Absorptionsänderung bei $\lambda = 260$ nm in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 90 °C verfolgt. Bei 10 °C bzw. 90 °C wurde die Temperatur für jeweils 10 Minuten konstant gehalten. Die Heiz-/Kühlrate betrug 0.5 °C/min und die Messdaten wurden ebenfalls mit dieser Rate aufgenommen.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* von *Jobin-Yvon* mit Peltier-Element (*LFI-3751*) aufgenommen. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Messungen mit einer Toleranz von 0.1 °C bei 20 °C durchgeführt und gegen die Raman-Streuung des Lösungsmittels korrigiert. Es wurden folgende Parameter verwendet: *Increment* 1.0 nm, *Increment time* 0.2 s, *Integration time* 0.1 s, *Slits* 3 nm.

Quantenausbeuten

Quantenausbeuten wurden an einem *Quantaurus QY C11347* der Firma *Hamamatsu* bestimmt.

Zellproliferationstest (MTT-Test)

Um die Toxizität der verwendeten DNA und RNA Proben sowie der verwendeten Farbstoffe gegenüber HeLa-Zellen zu untersuchen, wurde die Zellviabilität unter Verwendung des *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferations Assay* nach Angaben des Herstellers *Promega* bestimmt. Basierend auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) zum blau violetten wasserunlöslichen Formazan in lebenden Zellen durch NADH, NADPH und der mitochondrialen Succinat Dehydrogenase, kann sich nach erfolgter Zelllyse das Formazan im Medium lösen und dessen Menge über die Absorption bestimmt werden. Dadurch kann ein direkter Zusammenhang zwischen der Zellproliferation und der Absorption hergestellt werden.

Pro Kammer in einer Mikrotiterplatte (96 Kammern) wurden 1×10^4 HeLa-Zellen in 100 μl DMEM, versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin, ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen an Farbstoffen bzw. DNA/RNA-Proben (0.0375 – 0.30 μM) behandelt, wobei pro Konzentration jeweils 6 Kammern behandelt wurden. Die Positivkontrollen wurden im Fall der Farbstoffe mit DMSO (2 % in Na-P_i-Puffer) und im Fall der RNA-Experimente mit der geringsten Konzentration an ScreenFect®A (1.5 μl) versetzt. Die Negativkontrollen wurden für 5 min mit 5 μl 20 %-igem Triton X-100 der Firma *Serva* behandelt. Nach 72 h wurden zu jeder Kammer 15 μl MTT-Reagenz pipettiert und die Zellen für 2.5 h inkubiert. Zur anschließenden Lyse der Zellen wurden diese mit 100 μl Lysispuffer (Solubilization Solution/Stop-Mix) versetzt und nach 24 h mit Hilfe eines Photometers (Ultra Microplate Reader Elx808, BioTEK Instruments, INC) durch Aufzeichnung der Absorption bei 595 nm ausgelesen.

Transfektion und Fluoreszenzmikroskopie

HeLa-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen mit Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose, *Invitrogen*) unter Zusatz von 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FKS, *Sigma-Aldrich*) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die reguläre Subkultur wurde bei 70-80 % Konfluenz durchgeführt.

Für Transfektionsexperimente wurden 2×10^4 HeLa-Zellen (1×10^4 für die Experimente nach 48 h) in ein 8 well μ -Slide (μ Slide 8 well ibiTreat, IBIDI) ausgesät und für 24 h kultiviert und anschließend mit 5 pmol siRNA (15 pmol DNA) behandelt. Dafür wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers eine ScreenFect®siRNA Lösung hergestellt, die 2 μl ScreenFect®siRNA und 38 μl Dilution Buffer (*ScreenFect GmbH*) enthält. Für jeden Ansatz wurden 10 μl dieser Lösung mit einer Lösung bestehend aus jeweils 5 pmol siRNA (15 pmol DNA) (2.5 μM Stammlösung in

10 mM Na-P_i-Puffer und 250 mM NaCl, pH 7) und 8 µl Dilution Buffer vereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden 180 µl frisches Kulturmedium zugegeben und auf die vorbereiteten Zellen angewendet. Der Transfektionsprozess wurde nach der gewünschten Zeit gestoppt, indem die Zellen dreimal mit frischem Kulturmedium gewaschen wurden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden an einem inversen Mikroskop (*Leica, DM18-CS*) mit der Software *LAS-AF 1.1.0.12420* und dem *HPCL APO CS2 40x/1.10* Wasser-Objektiv aufgenommen.

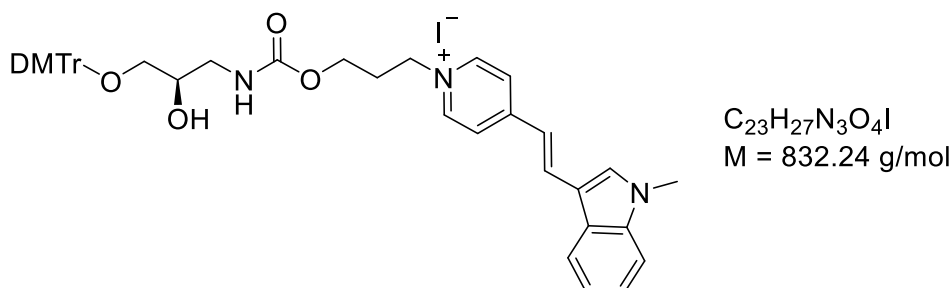
Der Donorfarbstoff wurde bei 488 nm mit einem Argon-Ionen-Laser (30 %) angeregt. Die Emission der Fluoreszenz wurde bei 490-515 nm und 670-795 nm gemessen. Die Bildauflösung betrug 1024x1024 Pixel bei einer Scangeschwindigkeit von 200 Hz.

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) und *Dr. F. Rönicke* durchgeführt.

8.2 Synthesevorschriften

8.2.1 Farbstoffmodifizierte Phosphoramiditbausteine

(R,E)-1-(3-(((3-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2-hydroxypropyl)carbonyloxy)propyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium (7)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 477 mg **5** (1.00 eq, 1.13 mmol) in 15 mL trockenem DMF gelöst. Es wurden 276 mg 1,1'-Carbonyldiimidazol (1.50 eq, 1.70 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 869 mg 3-(Bis-(4-methoxy-phenyl)phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propylamin (**L**, 2.00 eq, 2.26 mmol) wurde für 7 Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH + 0.1 % Et₃N 40:1 - 20:1) aufgereinigt. Es wurde **7** (695 mg, 0.83 mmol, 73 %) als orangener Schaum isoliert.

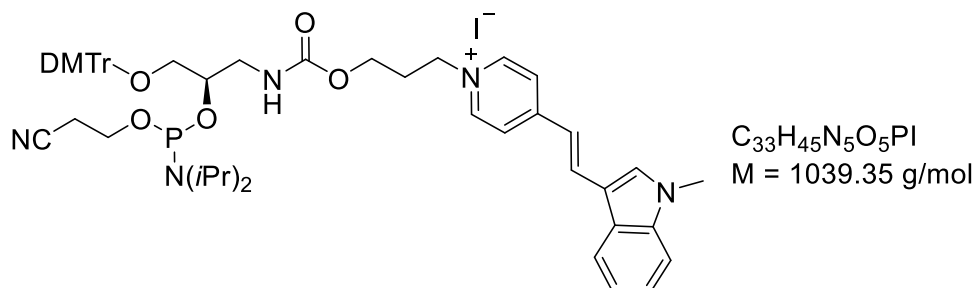
DC (2-Butanol : H₂O : Essigsäure = 80 : 15 : 5): R_f = 0.28

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.88 (br, 1H, NH), 8.76 (dd, *J* = 18.7, 6.5 Hz, 2H, H_{arom}), 8.28 – 8.12 (m, 4H, H_{arom}), 7.97 (d, 1H, H_{arom}), 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H_{arom}), 7.43 – 7.37 (m, 2H, H_{arom}), 7.36 – 7.18 (m, 10H, DMTr), 6.92 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H_{arom}), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H, DMTr), 4.94 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, OH), 4.57 – 4.43 (m, 2H, CH₂), 4.19 - 3.98 (m, 2H, CH₂), 3.89 (s, 3H, CH₃), 3.72 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.68 (s, 1H, CH), 3.25 – 3.15 (m, 1H, CH₂), 3.00 – 2.89 (m, 2H, CH₂), 2.89 – 2.78 (m, 1H, CH₂), 2.33 – 2.16 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 158.0, 156.0, 154.6, 145.0, 143.4, 138.0, 136.0, 135.8, 129.7, 127.7, 126.6, 125.3, 123.0, 121.8, 121.4, 120.6, 116.8, 113.1, 112.6, 111.0, 85.1, 68.7, 65.6, 64.6, 60.2, 56.3, 55.0, 54.7, 44.3, 33.1, 29.9, 29.4.

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₄₄H₄₆O₆N₃ [M⁺]: 712.3381, gefunden: 712.3384.

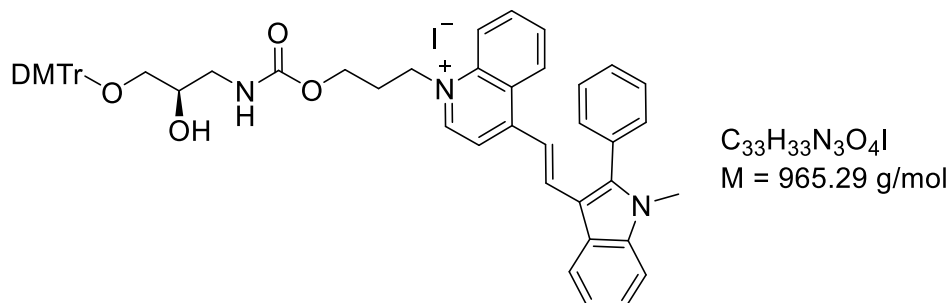
1-(3-(((2R)-3-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphanyl)oxy)propyl)carbamoyl)oxy)propyl)-4-((E)-2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium (9)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 230 mg **7** (1.00 eq, 0.27 mmol) in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 144 µl DIPEA (3.00 eq, 0.82 mmol, 105 mg) und 92 µl 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.50 eq, 0.41 mmol, 93 mg) zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand aus Benzol lyophilisiert. Es wurde **9** (quant.) als gelbes Öl erhalten.

MALDI-MS m/z: berechnet für $C_{54}H_{64}O_7N_5$ [M⁺]: 912.45, gefunden: 912.2.

(R,E)-1-(3-(((3-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2-hydroxypropyl)carbamoyl)oxy)propyl)-4-(2-(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)quinolin-1-ium (8)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 410 mg **6** (1.00 eq, 0.75 mmol) in 18 mL trockenem DMF gelöst. Es wurden 183 mg 1,1'-Carbonyldiimidazol (1.50 eq, 1.13 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 445 mg 3-(Bis-(4-methoxy-phenyl)phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propylamin (**L**, 1.50 eq, 1.13 mmol) wurde für 7 Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH + 0.1 % Et₃N 40:1-20:1) aufgereinigt. Es wurde **8** (470 mg, 0.49 mmol, 65 %) als roter Schaum isoliert.

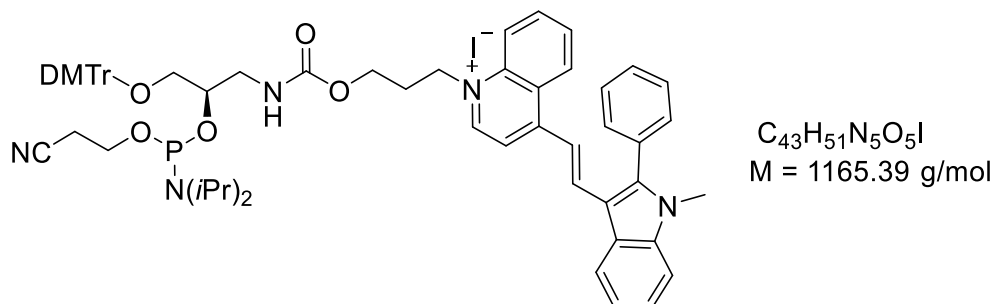
DC (2-Butanol : H₂O : Essigsäure = 80 : 15 : 5): R_f = 0.32

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, NH), 8.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H_{arom}), 8.44 – 8.31 (m, 2H, H_{arom}), 8.18 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{arom}), 7.99 – 7.86 (m, 4H, H_{arom}), 7.73 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{arom}), 7.69 – 7.59 (m, 5H, H_{arom}), 7.51 – 7.37 (m, 4H, DMTr, H_{arom}), 7.30 – 7.17 (m, 7H, DMTr), 6.99 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H_{arom}), 6.88 – 6.84 (m, 3H, DMTr), 6.84 – 6.78 (m, 1H, H_{arom}), 4.97 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 4.10 – 3.98 (m, 2H, CH₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.71 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.67 (s, 1H, CH), 3.23 – 3.14 (m, 1H, CH₂), 2.99 – 2.89 (m, 2H, CH₂), 2.88 – 2.82 (m, 1H, CH₂), 2.25 – 2.15 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 158.0, 156.0, 153.8, 147.3, 146.5, 145.0, 138.0, 137.7, 135.7, 134.8, 132.9, 131.0, 129.7, 129.2, 129.0, 128.6, 127.7, 127.4, 126.5, 126.3, 125.8, 124.8, 123.7, 122.5, 121.0, 118.7, 113.7, 113.1, 112.0, 111.4, 85.1, 68.7, 65.6, 60.5, 55.0, 53.1, 44.3, 40.1, 34.4, 31.6, 30.4, 28.7.

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₅₄H₅₂O₆N₃ [M⁺]: 838.3851, gefunden: 838.3853.

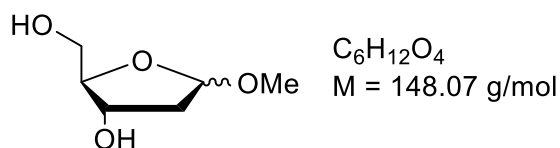
1-(3-((((2R)-3-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphanyl)oxy)propyl)carbamoyl)oxy)propyl)-4-((E)-2-(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)quinolin-1-ium (10)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 350 mg **8** (1.00 eq, 0.36 mmol) in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Es wurden 89 μ l DIPEA (3.00 eq, 1.08 mmol, 139 mg) und 167 μ l 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2.00 eq, 0.72 mmol, 167 mg) zugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand aus Benzol lyophilisiert. Es wurde **10** als roter Feststoff erhalten.

MALDI-MS m/z: berechnet für $C_{64}H_{70}O_7N_5$ [M⁺]: 1038.49, gefunden: 1038.1.

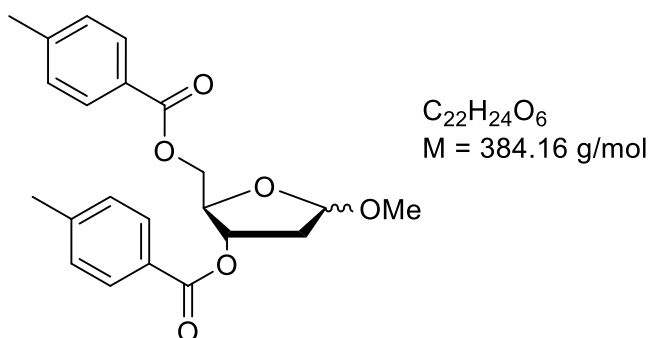
8.2.2 Aminfunktionalisierter 7-Deaza-2'-desoxyadenosinbaustein zA

(2R,3S)-2-(hydroxymethyl)-5-methoxytetrahydrofuran-3-ol (12)

1.00 g 2-desoxy-D-ribose (**10**) (1.00 eq, 7.46 mmol) wurden in 12 mL trockenem Methanol gelöst und mit Argon entgast (5-10 min). Eine Lösung aus 1 % HCl in Methanol (2 mL) wurde tropfenweise zugegeben. Es wurde für 25 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, anschließend $NaHCO_3$ zugegeben und für weitere 10 Minuten gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[203]

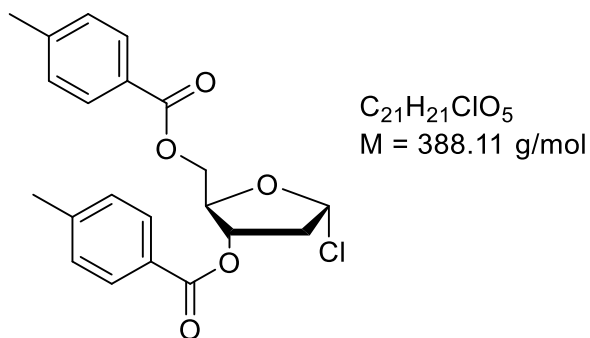
(2R,3S)-5-methoxy-2-(((4-methylbenzoyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-3-yl-4-methylbenzoat (13)



1.10 g **12** (1.00 eq, 7.46 mmol) wurden in 20 mL Aceton gelöst und 2.47 mL p-Toluoylchlorid (2.50 eq, 18.65 mmol) langsam zu getropft. Anschließend wurden 2.55 mL Triethylamin zugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (SiO₂, n-Hexan/EE 20:1 - 10:1) aufgereinigt. Es wurde **13** (2.03 g, 5.30 mmol, 71 %) als beigefarbenes Öl erhalten.

DC (Hexan : EE = 5 : 1): R_f = 0.32, 0.39 (α- und β-Anomer)

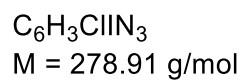
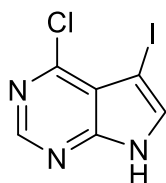
Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[204]

(2R,3S,5R)-5-chloro-2-(((4-methylbenzoyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-3-yl 4-**Methylbenzoat (14)**

3.80 g **13** (1.00 eq, 9.89 mmol) wurden in 19.3 mL Essigsäure gelöst und anschließend wurden tropfenweise 21.4 mL 4M HCl in Dioxan (10.0 eq, 98.9 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C runtergekühlt und zwei Stunden gerührt. Bei -20 °C wurde auskristallisiert und anschließend der Niederschlag abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Es wurde **14** (2.73 g, 7.02 mmol, 71 %) als weißer Feststoff erhalten.

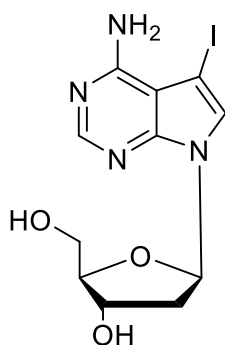
Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[218]

6-Chloro-7-iodo-7-deazapurin (**16**)



1.00 g 6-Chlorodeazapurin (**15**) (1.00 eq, 6.51 mmol) wurden unter starkem Rühren in 55 mL DCM gelöst und langsam 1.70 g NIS (1.10 eq, 7.18 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend der Feststoff abfiltriert. Es wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurde **16** (1.33 g, 4.75 mmol, 73 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[219]

7-Iodo-7-Deaza-2'-desoxyadenosin (18)

$C_{11}H_{13}IN_4O_3$
 $M = 376.00 \text{ g/mol}$

657 mg **16** (1.00 eq, 2.35 mmol) wurden in 15 mL Acetonitril gelöst und vorsichtig mit 330 mg KOH-Pulver (2.50 eq, 5.88 mmol) und 38 μ l TDA-I (0.05 eq, 0.118 mmol, 38 mg) versetzt. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 1.00 g **14** (1.10 eq, 2.58 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde eine weitere Stunde gerührt, der Feststoff anschließend abfiltriert und mit heißem Aceton nachgewaschen.

Das Lösemittel wurde entfernt und der Rückstand in 18 mL NH_3 in Methanol (7M) gelöst und über Nacht bei 120 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , DCM/MeOH 100:0-93:7) aufgereinigt. Es wurde **18** (689 mg, 1.83 mmol, 78 %) als weißer Feststoff erhalten.

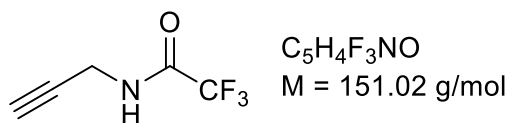
DC (DCM : MeOH = 95 : 5) $R_f = 0.24$

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.10 (s, 1H, H-2), 7.66 (s, 1H, H-8), 6.67 (br, 2H, NH_2), 6.48 (dd, $J = 8.2, 5.9$ Hz, 1H, H-1'), 5.26 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.04 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.32 (dq, $J = 5.6, 2.7$ Hz, 1H, H-3'), 3.81 (td, $J = 4.3, 2.3$ Hz, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, 2xH-5'), 2.45 (ddd, $J = 13.5, 8.2, 5.7$ Hz, 1H, H-2_a'), 2.15 (ddd, $J = 13.1, 6.0, 2.7$ Hz, 1H, H-2_b').

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 157.2 (C-6), 151.9 (C-2), 149.7 (C-4), 126.8 (C-8), 103.1 (C-5), 87.4 (C-4'), 82.9 (C-1'), 70.9 (C-3'), 61.9 (C-5'), 51.9 (C-7), 40.1 (C-2').

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für $C_{11}H_{14}IO_3N_4$ [M+H]: 377.0111, gefunden: 377.0109.

2,2,2-Trifluoro-N-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**19**)

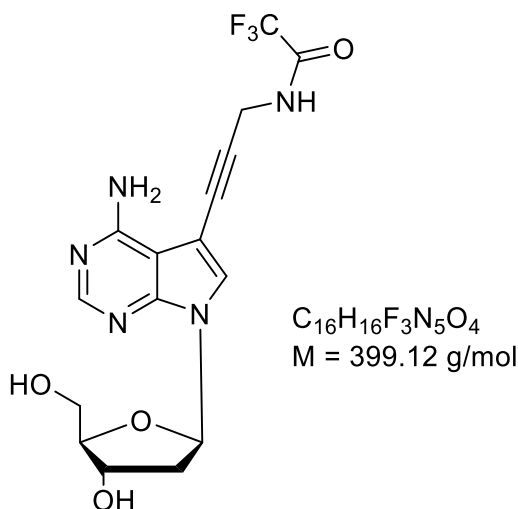


Unter Argon-Atmosphäre wurden langsam 4.50 mL Trifluoressigsäureethylester (1.20 eq.; 38.0 mmol, 5.33 g) zu einer eisgekühlten Lösung von 2.00 mL Propargylamin (1.00 eq.; 31.0 mmol, 1.72 g) in 30 mL absolutem Methanol getropft. Nach 30 Minuten wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 100 mL gesättigter $NaHCO_3$ ausgeschüttelt und anschließend die wässrige Phase mit 25 mL Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL Wasser gewaschen welches mit 25 mL Dichlormethan gewaschen wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , DCM) aufgereinigt. Es wurde **19** (3.61 g, 23.9 mmol, 77 %) als farblose Flüssigkeit erhalten.

DC (DCM : MeOH = 9 : 1): $R_f = 0.78$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[207]

N-(3-(4-amino-7-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)prop-2-yn-1-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid (20)



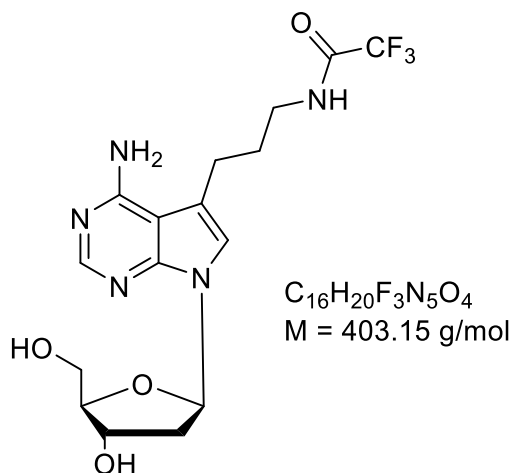
250 mg **18** (1.00 eq, 0.66 mmol), 305 mg **19** (3.00 eq, 1.99 mmol), 28 mg CuI (22 mol%, 0.146 mmol) und 184 μ l Triethylamin (2.00 eq, 1.32 mmol) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. Die Lösung wurde entgast und anschließend mit 47 mg Pd(PPh₃)₄ (10 mol%, 0.067 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 40:1-9:1) aufgereinigt. Es wurde **20** (242 mg, 0.61 mmol, 92 %) als weißer Feststoff erhalten.

DC (DCM : MeOH = 9 : 1): $R_f = 0.33$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 10.10 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H-2), 7.76 (s, 1H, H-8), 6.47 (dd, $J = 8.9, 5.9$ Hz, 1H, H-1'), 5.27 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.07 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.34 (m, 1H, H-3'), 4.31 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH₂), 3.81 (td, $J = 4.1, 2.2$ Hz, 1H, H-4'), 3.56 (ddd, $J = 11.5, 5.9, 4.1$ Hz, 1H, H-5_a'), 3.50 (ddd, $J = 11.6, 5.9, 4.1$ Hz, 1H, H-5_b'), 2.45 (m, 1H, H-2_a'), 2.17 (ddd, $J = 13.2, 6.0, 2.8$ Hz, 1H, H-2_b').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 157.5 (C-6), 156.3 (-NH-CO-CF₃), 152.7 (C-2), 149.2 (C-4), 126.6 (C-8), 116.9 (-CO-CF₃), 99.5 (C-5), 94.2 (C-7), 87.5 (C-4'), 86.8 (C-C-CH₂), 83.2 (C-1'), 76.3 (C-C-CH₂), 70.9 (C-3'), 61.9 (C-5'), 40.1 (C-2'), 29.9 (C-C-CH₂).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₁₆H₁₇O₄N₅F₃ [M+H]: 400.1233, gefunden: 400.1235.

N-(3-(4-Amino-7-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)propyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (21)

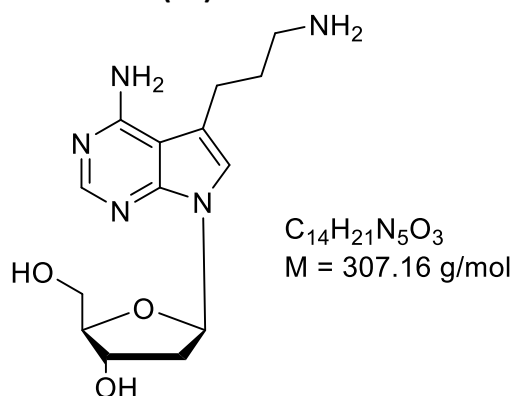
Unter Argon-Atmosphäre wurden 640 mg **20** (1.00 eq, 1.60 mmol) und 120 mg Pd(OH)₂ (0.17 mmol) (auf Kohle, 20 w%) in 20 mL trockenem Methanol suspendiert und 2.56 mL Triethylsilan (10.0 eq, 16.0 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Feststoff über Celite abgesaugt, mit Methanol eluiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 40:1-20:1-9:1) aufgereinigt. Es wurde **21** (870 mg, 1.36 mmol, 85 %) als weißer Feststoff erhalten.

DC (DCM : MeOH = 9 : 1): R_f = 0.15

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 9.45 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.02 (s, 1H, H-2), 7.12 (s, 1H, H-8), 6.63 (s, 2H, NH₂), 6.47 (dd, J = 8.4, 5.9 Hz, 1H, H-1'), 5.25 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 3'-OH), 5.09 (t, J = 5.7 Hz, 1H, 5'-OH), 4.32 (m, 1H, H-3'), 3.79 (td, J = 4.7, 2.4 Hz, 1H, H-4'), 3.54 (ddd, J = 11.5, 5.6, 4.7 Hz, 1H, H-5_a'), 3.48 (ddd, J = 11.4, 6.1, 4.4 Hz, 1H, H-5_b'), 3.26 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.75 (m, 2H, CH₂), 2.46 (m, 1H, H-2_a'), 2.10 (ddd, J = 13.1, 6.0, 2.5 Hz, 1H, H-2_b'), 1.83 – 1.71 (tt, J = 7.2 Hz, 7.1 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 157.6 (C-6), 156.1 (-NH-CO-CF₃), 151.4 (C-2), 150.5 (C-4), 118.9 (C-8), 115.8 (-CO-CF₃), 114.3 (C-7), 102.0 (C-5), 87.1 (C-4'), 82.7 (C-1'), 71.2 (C-3'), 62.2 (C-5'), 40.1 (C-2'), 38.8 (CH₂-NH), 29.5 (CH₂), 23.1(CH₂).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₁₆H₂₁O₄N₅F₃ [M+H]: 404.1546, gefunden: 404.1546.

(2R,3S,5R)-5-(4-Amino-5-(3-aminopropyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-7-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (26)

In einem ausgeheizten Kolben wurden 240 mg **21** (1.00 eq, 0.59 mmol) in 10 mL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung gelöst und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurde **26** (182 mg, 0.59 mmol, 99 %) als weißer Feststoff erhalten.

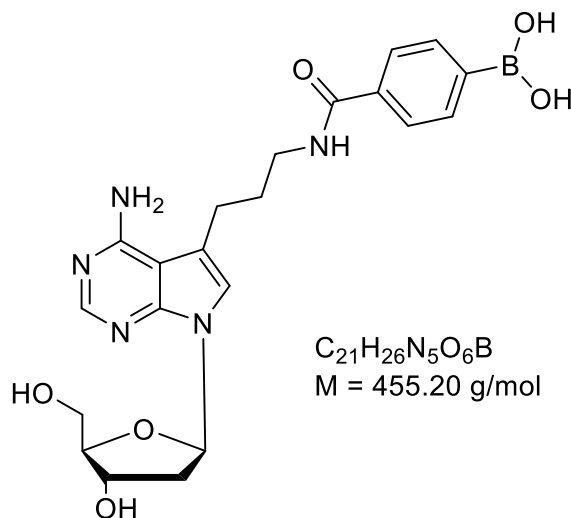
DC (DCM : MeOH = 9 : 1): $R_f = 0.1$

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.03 (s, 1H, H-2), 7.63 (s, 2H, NH_2), 7.13 (s, 1H, H-8), 6.68 (s, 2H, NH_2), 6.47 (dd, $J = 8.3, 5.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 5.27 (s, 1H, 3'-OH), 5.11 (s, 1H, 5'-OH), 4.35 – 4.29 (m, 1H, 3'-H), 3.79 (m, 1H, 4'-H), 3.54 (dd, $J = 11.7, 4.7 \text{ Hz}$, 1H, H-5 $_a$ '), 3.48 (dd, $J = 11.8, 4.3 \text{ Hz}$, 1H, H-5 $_b$ '), 2.83 (t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH}_2$), 2.79 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 2.45 (m, 1H, H-2 $_a$ '), 2.11 (ddd, $J = 13.2, 6.0, 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H-2 $_b$ '), 1.80 (tt, $J = 7.6 \text{ Hz}, 7.5 \text{ Hz}$, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 157.6 (C-6), 151.5 (C-2), 150.5 (C-4), 119.0 (C-8), 113.9 (C-7), 101.9 (C-5), 87.2 (C-1'), 82.8 (C-4'), 71.2 (C-3'), 62.2 (C-5'), 40.1 (C-2'), 38.5 ($\text{NH}_2\text{-CH}_2$), 28.7 (CH_2), 22.8 (CH_2).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für $C_{14}H_{22}O_3N_5$ [M+H]: 308.1723, gefunden: 308.1721.

(4-((3-(4-Amino-7-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)propyl)carbamoyl)phenyl)boronsäure (27)



In einem ausgeheizten Kolben wurden 110 mg **26** (1.00 eq, 0.36 mmol), 89 mg 4-Carboxyphenylboronsäure (1.50 eq, 0.54 mmol), 172 mg TBTU (1.50 eq, 0.54 mmol) und 184 μL DIPEA (3.00 eq, 1.08 mmol) in 3 mL trockenem DMF gelöst und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels einer *reversed-phase* Chromatographie mit einer C18-Säule aufgereinigt (Gradient: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 1:1). Es wurde **27** (115 mg, 0.25 mmol, 70 %) als weißer Feststoff erhalten.

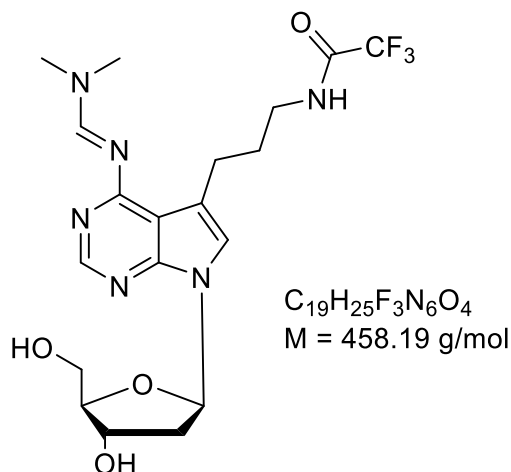
DC ($\text{H}_2\text{O} : \text{ACN} = 1 : 1$): $R_f = 0.44$

^1H NMR (500 MHz, MeOD-d_4): δ (ppm) = 8.03 (s, 1H, H-2), 7.83 – 7.71 (m, 4H, H_{arom}), 7.19 (s, 1H, H-8), 6.47 (dd, $J = 8.3, 5.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 4.50 (m, 1H, H-3'), 3.98 (m, 1H, H-4'), 3.78 (dd, $J = 12.1, 3.3 \text{ Hz}$, 1H, H-5_a'), 3.71 (dd, $J = 12.1, 3.7 \text{ Hz}$, 1H, H-5_b'), 3.48 (m, 2H, NH- CH_2), 2.88 (m, 2H, CH_2), 2.64 (ddd, $J = 14.0, 6.0 \text{ Hz}, 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H-2_a'), 2.25 (ddd, $J = 13.5, 5.9, 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H-2_b'), 1.99 (tt, $J = 7.2 \text{ Hz}, 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD-d_4): δ (ppm) = 170.5 (CO), 159.1 (C-6), 151.7 (C-2), 151.1 (C-4), 134.8 (C_{arom}), 127.2 (C_{arom}), 121.4 (C-8), 116.5 (C-7), 104.3 (C-5), 88.9 (C-1'), 86.3 (C-4'), 73.1 (C-3'), 63.8 (C-5'), 41.2 (C-2'), 40.4 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 31.2 (CH_2), 24.8 (CH_2).

MALDI-MS m/z : calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_6\text{B}$ [M]: 455.20, found: 455.23.

N-(3-(4-(((E)-(dimethylamino)methylene)amino)-7-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)propyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (22)



In einem ausgeheizten Kolben wurden 710 mg **21** (1.00 eq, 1.76 mmol) in 35 mL Methanol gelöst, 3.95 mL DMF-DMA (16.8 eq, 29.5 mmol) zugegeben und die Lösung 2 h bei 40 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Es wurde **22** (645 mg, 1.41 mmol, 80 %) als weißer Feststoff erhalten.

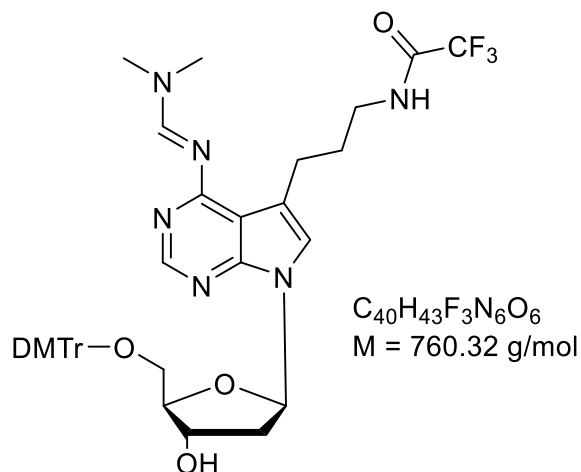
DC (DCM : MeOH = 9 : 1): $R_f = 0.38$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 9.43 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, CH), 8.26 (s, 1H, H-2), 7.24 (s, 1H, H-8), 6.52 (dd, $J = 8.5, 6.0$ Hz, 1H, H-1'), 5.25 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.03 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.33 (m, 1H, H-3'), 3.80 (td, $J = 7.7, 4.6$ Hz, 1H, H-4'), 3.55 (m, 1H, H-5_a'), 3.49 (m, 1H, H-5_b'), 3.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 3.09 (s, 3H, NCH₃), 2.82 (dt, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 2.52 (m, 1H, H-2_a'), 2.14 (ddd, $J = 13.1, 5.9, 2.6$ Hz, 1H, H-2_b'), 1.89 (tt, $J = 7.2, 7.1$, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 160.6 (C-6), 156.4 (CH), 156.0 (-NH-CO-CF₃), 151.7 (C-2), 150.8 (C-4), 120.5 (C-8), 116.0 (CO-CF₃), 115.7 (C-7), 109.9 (C-5), 87.1 (C-1'), 82.7 (C-4'), 71.1 (C-3'), 62.2 (C-5'), 40.4 (C-2'), 39.0 (CH₂-NH), 34.5 (2xNCH₃), 29.9 (CH₂), 23.8 (CH₂).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₁₉H₂₅O₄N₆F₃ [M+H]: 459.1968, gefunden: 459.1968.

N-(3-(7-((2R,4S,5R)-5-((Dimethoxytriphenylmethyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-4-(((E)-(dimethylamino)methylene)amino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)propyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (23)



Es wurden 760 mg **22** (1.00 eq, 1.66 mmol) in 10 mL trockenem Pyridin gelöst und zweimal coevaporiert. Anschließend wurde X in 10 mL trockenem Pyridin gelöst, 674 mg DMT-Cl (1.20 eq, 1.99 mmol) zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 10 mL Methanol zugegeben und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH + 0.1 % Et₃N 100:1-20:1) aufgereinigt. Es wurde **23** (1.12 g, 1.48 mmol, 89 %) als farbloser Schaum erhalten.

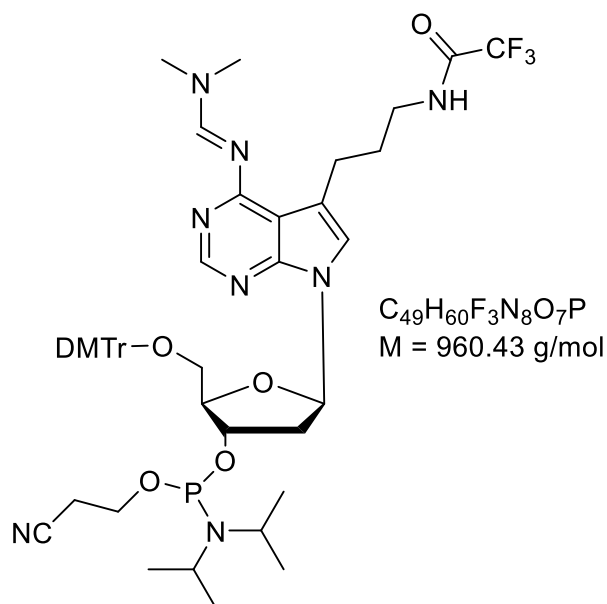
DC (DCM : MeOH = 50 : 1 + 0.1 % Et₃N): R_f = 0.21

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 9.40 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, CH), 8.28 (s, 1H, H-2), 7.38 (m, 2H, DMT), 7.31 – 7.15 (m, 7H, DMT), 7.10 (s, 1H, H-8), 6.87 – 6.77 (m, 4H, DMT), 6.58 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 5.36 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, 3'-OH), 4.41 (m, 1H, H-3'), 3.93 (m, 1H, H-4'), 3.71 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 3.16 – 3.10 (m, 4H, NH-CH₂, H-5'), 3.09 (s, 3H, NCH₃), 2.76 – 2.69 (m, 2H, CH₂), 2.56 (ddd, *J* = 13.2, 6.6, 3.7 Hz, 1H, H-2_a'), 2.24 (ddd, *J* = 13.0, 6.3, 3.8 Hz, 1H, H-2_b'), 1.78 (tt, *J* = 7.1, 5.9 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 160.6 (C-6), 158.1 (2xC-OCH₃), 156.4 (CH), 156.1 (-NH-CO-CF₃), 152.0 (C-2), 151.1 (C-4), 145.0 (C_{arom}), 135.6 (C_{arom}), 135.5 (C_{arom}), 129.8 (C_{arom}), 127.8 (C_{arom}), 126.7 (C_{arom}), 120.2 (C-8), 116.0 (CO-CF₃), 115.9 (C-7), 113.1 (C_{arom}), 109.8 (C-5), 85.6 (C-1'), 85.2 (DMT), 82.2 (C-4'), 71.1 (C-3'), 64.4 (C-5'), 55.0 (2xOCH₃), 40.5 (C-2'), 39.0 (CH₂-NH), 34.5 (2xNCH₃), 29.9 (CH₂), 23.7 (CH₂).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₄₀H₄₄O₆N₆F₃ [M+H]: 761.3269, gefunden: 761.3269.

(2R,3S,5R)-2-(Dimethoxytriphenylmethyl)-5-(4-(((E)-(dimethylamino)methylene)amino)-5-(3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-7-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl)-diisopropylphosphoramidit (24**)**



Es wurden 200 mg **23** (1.00 eq, 0.26 mmol) in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 138 μl DIPEA (3.00 eq, 0.79 mmol, 102 mg) und 121 μl 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2.00 eq, 0.53 mmol, 125 mg) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde direkt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , DCM/Aceton + 0.1 % Et_3N 1:1) aufgereinigt. Es wurde **24** (250 mg, 0.26 mmol, 98 %) als weißer Feststoff erhalten.

DC (DCM : Aceton = 1 : 1 + 0.1 % Et_3N): $R_f = 0.73$

^{31}P NMR (202 MHz, DMSO) $\delta = 147.51, 146.99$.

MALDI-MS m/z: berechnet für $C_{49}H_{60}F_3N_8O_7P$ [M+H]: 961.43, gefunden: 961.39.

8.3 Oligonukleotide

8.3.1 Synthese modifizierter DNA unter Normalbedingungen

Allgemeines

Die automatisierte Festphasensynthese der Oligonukleotide erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems (ABI)*. Die kommerziell erhältlichen Phosphoramidite der natürlichen DNA-Bausteine wurden dabei in Acetonitril (*amidite diluent*) gelöst und als 0.067 M Lösungen verwendet. Der artifizielle Baustein 2'-O-Propargyl-Uridin (**cU**) wurde von der Firma *ChemGenes* bezogen und als 0.083 M Lösung in Acetonitril (*amidite diluent*) eingesetzt. Der synthetisch hergestellte DNA-Baustein **zA** wurde als 0.1 M Lösung in Acetonitril (*amidite diluent*) verwendet.

Kupplungsprotokolle

Die einzelnen Schritte der Syntheseyklen der Oligonukleotidsynthese werden im Kupplungsprotokoll festgelegt. Die Anzahl der Pulse (1 Puls = 16 µl) und die Kupplungsdauer (in s) sind in Tabelle 19 exemplarisch für das Kupplungsprotokoll des Bausteines Thyminidn gezeigt.

Tabelle 19. Kupplungsprotokoll des Bausteins Thymidin.

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

Bei den artifiziellen Bausteinen wurde der Schritt *§Coupling* verändert um eine effektive Kupplung zu gewährleisten. Die veränderten Protokolle sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 aufgeführt:

Tabelle 20. Kupplungsprotokoll für den Baustein **cU**.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit
§Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	6	0
23	6 + Act	PULSE	5	0
23	6 + Act	PULSE	3	100
2	Act	PULSE	4	150
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0

Tabelle 21. Kupplungsprotokoll für den Baustein **zA**.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit
§Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	7	0
24	7 + Act	PULSE	7	600
2	Act	PULSE	5	300
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0

Aufarbeitung der unter Normalbedingungen synthetisierten Oligonukleotide

Die CPG-Säulen wurden nach erfolgter Synthese mindestens 10 Minuten im Hochvakuum getrocknet und anschließend geöffnet und das Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Abspaltung von der festen Phase und der Schutzgruppen wurde das Granulat mit 700 µl konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung (>25%, *trace select*, Fluka) versetzt und 16 h bei 55 °C erhitzt. Nach erfolgter Abspaltung wurden die abgekühlten Proben in einem Vakuumkonzentrator vom Ammoniak befreit (35 min, 35 °C, 100 mbar) und anschließend die überstehende Lösung abgenommen und das Granulat dreimal mit je 200 µl HPLC-Wasser nachgewaschen. Die wässrigen Proben wurden anschließend im Vakuumkonzentrator bis zur

Trockne (25 °C, 0.1 mbar) eingengt. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung für die postsynthetische „Click“-Reaktion eingesetzt.

Postsynthetische „Click“-Reaktion

Die gefriergetrockneten DNA-Stränge wurden in 50 µl HPLC-Wasser gelöst und mit 114 µl des jeweiligen Azids (10 mM in DMSO/t-BuOH 3:1), 34 µl TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/t-BuOH 3:1), 25 µl Natriumascorbat-Lösung (400 mM in HPLC-Wasser) und 17 µl Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/t-BuOH 3:1) versetzt und 2 h bei 60 °C erhitzt. Die Lösungen wurden zur Komplexbildung der Kupferionen mit 150 µl einer Na₂EDTA-Lösung (50 mM in HPLC-Wasser) versetzt und zur Fällung der DNA wurden anschließend 450 µl Natriumacetatlösung (0.3 M in HPLC-Wasser) und 7 mL Isopropanol zugegeben und die Mischung über Nacht bei -28 °C inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min) und der Rückstand zweimal mit je 2 mL 80 %igem Isopropanol gewaschen. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und mittels *reversed-phase* HPLC aufgereinigt (Methode siehe Kapitel 8.3.6 Tabelle 31).

Peptidkupplung mit 4-Carboxyphenylboronsäure (B1)

Die bereits postsynthetisch modifizierten DNA-Stränge wurden in 1 µl/nmol (1 µl Lösung pro nmol DNA) Na₂CO₃/NaHCO₃-Puffer (0.1 M, pH = 8.3, 30 Minuten mit Argon entgast) gelöst und mit je 1 µl/nmol TBTU (80 mM in DMF, 30 Minuten mit Argon entgast) und 1 µl/nmol 4-Carboxyphenylboronsäure (**B1**) (80 mM in DMF, 30 Minuten mit Argon entgast) versetzt. Danach wurden 0.11 µl/nmol (EtOH)₃N zugegeben und die DNA-Lösungen weitere 10 Minuten entgast. Die Lösungen wurden 2 h bei 60 °C erhitzt und alle 30 Minuten durchmischt. Zur Fällung der DNA wurden 2 mL t-BuOH zugegeben und die Lösungen 10 Minuten bei -28 °C inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung abpipettiert. Der Rückstand wurde getrocknet und mittels *reversed-phase* HPLC mit einem Ammoniumcitratpuffer aufgereinigt (Methode siehe Kapitel 8.3.6 Tabelle 32). Zur Entfernung des überschüssigen Ammoniumcitratpuffers wurden die sauberen Fraktionen vereinigt und anschließend erneut mittels *reversed-phase* HPLC aufgereinigt (Methode siehe Kapitel 8.3.6 Tabelle 33).

8.3.2 Synthese der farbstoffmodifizierten DNA unter Verwendung von *ultramild*-Monomeren

Allgemein

Aufgrund der Basenlabilität der beiden verwendeten Cyanin-Styryl-Farbstoff-Basenanaloga konnte das ursprüngliche Schutzgruppenkonzept nicht beibehalten werden, weswegen auf die sogenannten *ultramild*-Monomere zurückgegriffen werden musste. Die in diesem Fall verwendeten Basen sind phenoxyacetylgeschütztes A (dA^{Pac}), 4-isopropyl-phenoxyacetylgeschütztes G (dG^{iPrPac}) und acetylgeschütztes C (dC^{ac}). Diese basenlabileren Schutzgruppen können unter milderer Bedingung (0.05 M K_2CO_3 in MeOH bei Raumtemperatur für 16 h bzw. konzentrierte Ammoniumhydroxidlösung in Ethanol bei Raumtemperatur für 4 h) abgespalten werden. Damit die iPrPac-Schutzgruppe von dG beim *Capping*-Schritt nicht durch Acetat ausgetauscht werden kann, wird in diesem Fall Cap A (Ac_2O) durch Pac_2O ersetzt. Die *ultramild*-Monomere wurden von der Firma *GlenResearch* bezogen und gemäß den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt. Die synthetisch hergestellten Farbstoff-Basenanaloga wurden als 0.1 M Lösung in Dichlormethan verwendet. Tabelle 22 zeigt die veränderten Schritte des Kupplungsprotokolls.

Tabelle 22. Kupplungsprotokolle der Farbstoffbasenanaloga.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit
§Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	20	0
23	6 + Act	PULSE	6	0
23	6 + Act	PULSE	2	900
23	6 + Act	PULSE	2	600
23	6 + Act	PULSE	5	200
24	7 + Act	PULSE	1	500
24	7 + Act	PULSE	3	300
5	7	PULSE	7	200
5	7	PULSE	40	0
24	7 + Act	PULSE	10	0
23	6 + Act	PULSE	6	0
23	6 + Act	PULSE	2	900
23	6 + Act	PULSE	2	600
23	6 + Act	PULSE	5	200
24	7 + Act	PULSE	1	500
24	7 + Act	PULSE	3	300
5	7	PULSE	7	200

5	7	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	80	0
§Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	12	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

Aufarbeitung der unter *ultramild*-Bedingungen synthetisierten Oligonukleotide

Die CPG-Säulen wurden über Nacht im Hochvakuum getrocknet und anschließend geöffnet und das Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurde anschließend zur Abspaltung der exozyklischen Amin-Schutzgruppen sowie von der festen Phase mit 1 mL einer 0.05 M methanolischen K₂CO₃-Lösung versetzt und 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Neutralisation wurden 6 µl Eisessig zugegeben und die Suspension gut vermischt. Die überstehende Lösung wurde abgenommen und das Granulat zweimal mit je 200 µl HPLC-Wasser nachgewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuumkonzentrator (1: 1 h, 40 °C, 340 mbar; 2: 16 h, 25 °C, 0.1 mbar) entfernt und der Rückstand mittels *reversed-phase* HPLC aufgereinigt (siehe Kapitel 8.3.3).

8.3.3 Aufreinigung und Charakterisierung modifizierter DNA

Aufreinigung mittels *reversed-phase* HPLC

Die gefriergetrockneten Oligonukleotid-Pellets wurden in 300 µl HPLC-Wasser gelöst und mittels *reversed-phase* HPLC (*Supelco Discovery® BIO Wide Pore* C18-Säule (250 x 10 mm, 5 µm)) aufgereinigt. Die dafür verwendeten Gradienten sind in Kapitel 8.3.6 aufgelistet.

Die Fraktionen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt und anschließend mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) auf ihre Reinheit überprüft. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und getrocknet.

Charakterisierung mittels MALDI-TOF

MALDI-TOF Spektren wurden am KIT, am Institut für Organische Chemie an einem Biflex-IV Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linear negativen Modus und an *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* im linear negativen bzw. linear positiven Modus gemessen. Als Matrix diente entweder eine 9:1-Mischung aus 3-Hydroxypicolinsäure (ges. Lösung in 50% MeCN) und Diammoniumcitrat (0.1 M in H₂O) oder 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (0.3 M in EtOH).

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet, wobei dafür die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ bestimmt wurde. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten Oligonukleotids kann wie folgt berechnet werden:

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

Die Vorfaktoren dA, dC, dG und dT beschreiben dabei die Anzahl der jeweils vorkommenden natürlichen DNA-Bausteinen und ϵ die molaren Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Basen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (siehe Tabelle 23). Die Hypochromizität wird durch den Faktor 0.9 berücksichtigt.

Tabelle 23. Extinktionskoeffizienten der natürlichen DNA-Bausteine.

DNA-Base	$\epsilon \text{ [mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
dA	15.4
dC	7.3
dG	11.7
dT	8.8

Der molare Extinktionskoeffizient der artifiziellen Base **cU** bzw. der postsynthetisch eingeführten Farbstoffe muss jeweils dazu addiert werden und wird in Tabelle 24 aufgeführt. Die Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide sind in Kapitel 8.3.7 aufgeführt.

Tabelle 24. Extinktionskoeffizienten des artifiziellen Bausteines **cU** und **zA** und der postsynthetisch eingeführten Farbstoffe **Do** und **Ak**.

DNA-Base	ϵ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Do	10.2
Ak	13.1
cU	10.1
zA	7.2

Die Absorbanz der Oligonukleotide zur Konzentrationsbestimmung wurde mit einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäuremodus bestimmt, wobei jeweils 1 μ l der Stammlösung zur Messung der optischen Dichte entnommen wurde.

Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden die modifizierten Einzelstränge mit den jeweiligen komplementären Gegensträngen (1.0 eq) in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (Na-P_i, pH = 7.0) und 250 mM Natriumchlorid-Lösung 10 Minuten bei 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

8.3.4 Synthese modifizierter RNA

Allgemein

Die Synthese der modifizierten RNA erfolgte an einem *Expedite 8909* Nucleic Acid Synthesizer der Firma *Applied Biosystems (ABI)*. Die verwendeten natürlichen RNA Bausteine und CPG-Säulen wurden als *ultramild*-Monomere von der Firma *GlenResearch* bezogen und gemäß den empfohlenen Bedingungen eingesetzt. Wie bereits in Kapitel 8.3.2 beschrieben, musste aufgrund der Basenlabilität der Cyanin-Styryl-Farbstoff-Basenanaloga auf die *Ultramild*-Methode zurückgegriffen werden. Aufgrund der sterisch anspruchsvollen 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe wurde der reaktivere *Activator 42*[®] (0.25 M 5-[3,5-Bis(trifluormethyl)phenyl]-1H-tetrazol) der Firma *SAFC* verwendet, um eine effektivere Kupplung zu erreichen. Die synthetisch hergestellten Basenanaloga wurden als 0.1 M Lösung in Dichlormethan eingesetzt.

Kupplungsprotokolle

Aufgrund der bereits beschriebenen sterisch anspruchsvollen 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe müssen die Kupplungszeiten im Vergleich zur DNA-Synthese erhöht werden. Um unerwünschte Strangverlängerungen zu vermeiden, wurde außerdem ein zweiter *Capping*-Schritt eingefügt. Tabelle 25 zeigt am Beispiel des Uridin-Bausteines das veränderte Kupplungsprotokoll, wobei die rot hervorgehobenen Werte gegenüber dem DNA-Protokoll verändert wurden (in Klammern zum Vergleich der in DNA verwendete Wert).

Tabelle 25. Kupplungsprotokoll der natürlichen RNA-Bausteine unter Verwendung der *Ultramild*-Methode.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit
\$Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	60 ₍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 ₍₅₎	0
21	U + Act	PULSE	5	0
21	U + Act	PULSE	6 ₍₂₎	201 ₍₁₆₎
2	Act	PULSE	8 ₍₃₎	180 ₍₂₄₎
1	Wsh	PULSE	7	80 ₍₅₆₎
1	Wsh	PULSE	8	0
\$Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	7 ₍₈₎	0
13	Caps	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	6 ₍₀₎	15 ₍₀₎
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$Oxidizing				
15	Ox	PULSE	20 ₍₁₅₎	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Auch das Kupplungsprotokoll des Einbaus der Farbstoff-Basenanaloga in RNA wurde aufgrund der geringeren Reaktivität verändert und ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26. Kupplungsprotokoll für den Einbau der Farbstoffbasenanaloga in RNA.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit
§Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	6 ₍₂₀₎	0
23	6 + Act	PULSE	12 ₍₆₎	0
23	6 + Act	PULSE	10 ₍₂₎	1200 ₍₉₀₀₎
23	6 + Act	PULSE	10 ₍₂₎	1200 ₍₆₀₀₎
23	6 + Act	PULSE	10 ₍₅₎	50 ₍₂₀₀₎
24	7 + Act	PULSE	3 ₍₁₎	1000 ₍₅₀₀₎
24	7 + Act	PULSE	3	300
5	7	PULSE	7	200
5	7	PULSE	15 ₍₄₀₎	0
5	7	PULSE	15 ₍₀₎	0 ₍₀₎
24	7 + Act	PULSE	6 ₍₁₀₎	0
23	6 + Act	PULSE	12 ₍₆₎	0
23	6 + Act	PULSE	10 ₍₂₎	1200 ₍₉₀₀₎
23	6 + Act	PULSE	10 ₍₂₎	1200 ₍₆₀₀₎
23	6 + Act	PULSE	10 ₍₅₎	50 ₍₂₀₀₎
24	7 + Act	PULSE	3 ₍₁₎	1000 ₍₅₀₀₎
24	7 + Act	PULSE	3	300
5	7	PULSE	7	200
5	7	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	80	0
§Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	7 ₍₁₂₎	0
13	Caps	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	6 ₍₀₎	15 ₍₀₎
12	Wsh A	PULSE	14	0
§Oxidizing				
15	Ox	PULSE	20 ₍₁₅₎	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
§Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Aufarbeitung der unter *ultramild*-Bedingungen synthetisierten RNA

Nach erfolgter RNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet und anschließend das Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die komplette RNA-

Synthese und Aufarbeitung wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Die Abspaltung der Schutzgruppen sowie die von der festen Phase erfolgte durch die Zugabe einer 3:1 Mischung aus einer konzentrierten Ammoniumhydroxid-Lösung (>25%, *trace select*, Fluka) und Ethanol für 4 h bei Raumtemperatur. Nach erfolgter Abspaltung wurde die überstehende Lösung abgenommen und der Rückstand mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol und DEPC-Wasser gewaschen und die vereinigten Fraktionen lyophilisiert. Zur Abspaltung der 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe wurde das RNA-Pellet in 300 µl DMSO gelöst und 300 µl Et₃N·3HF zugegeben. Die Lösung wurde 2.5 h bei 60 °C erhitzt und anschließend abgekühlt. Zur Fällung der RNA wurden 600 µl Isopropyltrimethylether zugegeben und solange durchmischt bis die RNA ausfiel. Zur vollständigen Fällung wurden 200 µl Diethylether zugegeben und die Suspension über Nacht bei -28 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand dreimal mit je 1 ml Diethylether gewaschen. Das RNA-Pellet wurde im Hochvakuum getrocknet und mittels *reversed-phase* HPLC aufgereinigt.

8.3.5 Aufreinigung und Charakterisierung modifizierter RNA

Aufreinigung mittels *reversed-phase* HPLC

Die gefriergetrockneten RNA-Pellets wurden in 300 µl DEPC-Wasser gelöst und mittels *reversed-phase* HPLC (*Supelco Discovery® BIO Wide Pore C18-Säule* (250 x 10 mm, 5 µm)) aufgereinigt. Die dafür verwendeten Gradienten sind in Kapitel 8.3.6 aufgelistet.

Die Fraktionen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgesammelt und mittels MALDI-TOF auf ihre Reinheit hin überprüft. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Charakterisierung mittels MALDI-TOF

Die Charakterisierung mittels MALDI-TOF wurde, wie bereits in Kapitel 8.3.3 beschrieben, durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der modifizierten RNA wurde mit Hilfe des Lambert Beerschen Gesetzes bestimmt, wofür die optische Dichte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt wurde. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten Ribonukleotids in Wasser kann wie folgt berechnet werden:

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

Die Vorfaktoren rA , rC , rG und rU beschreiben dabei die Anzahl der jeweils vorkommenden natürlichen RNA-Bausteinen und ϵ die molaren Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Basen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (siehe Tabelle 27). Die Hypochromizität wird durch den Faktor 0.9 berücksichtigt.

Tabelle 27. Extinktionskoeffizienten der natürlichen RNA-Bausteine.

RNA-Base	$\epsilon \text{ [mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
rA	15.4
rC	7.2
rG	11.5
rU	9.9

Der molare Extinktionskoeffizient der artifiziellen Base cU bzw. der postsynthetisch eingeführten Farbstoffe muss jeweils dazu addiert werden und wird in Tabelle 24 (Kapitel 8.3.3) aufgeführt. Die Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide sind in Kapitel XY aufgeführt.

Die Absorbanz der Oligonukleotide zur Konzentrationsbestimmung wurde mit einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäuremodus bestimmt, wobei jeweils $1 \mu\text{l}$ der Stammlösung zur Messung der optischen Dichte entnommen wurde.

8.3.6 HPLC-Methoden

Die verwendeten HPLC-Methoden für die synthetisierten DNA- sowie RNA-Stränge sind in Tabelle 28 - Tabelle 33 aufgeführt.

Tabelle 28. HPLC-Methoden der synthetisierten einfach Farbstoff modifizierten DNA-Stränge.

DNA	Gradient [% B]	Laufzeit	Temperatur [°C]	Detektionswellenlängen [nm]
ssDNA0-Do-XY- ssDNA3-Do	0-15	40	40	260, 462
ssDNA0-Ak-XY- ssDNA3-Ak	0-20	45	40	260, 550

Tabelle 29. HPLC-Methoden der synthetisierten einfach modifizierten Farbstoff RNA-Stränge.

RNA	Gradient [% B]	Laufzeit	Temperatur [°C]	Detektionswellenlängen [nm]
ssRNA0 (Do)	0-15	40	60	260, 462
ssRNA0 (Ak), ssRNA1 (Ak)	0-20	45	60	260, 550

Tabelle 30. HPLC-Methoden zur Trennung der synthetisierten einfach farbstoffmodifizierten Aptamere **Apt1-Apt8**.

DNA	Gradient [% B]	Laufzeit	Temperatur [°C]	Detektionswellenlängen [nm]
Apt1cDo-Apt8cDo	0-15	40	40	260, 462
Apt1cAk-Apt8cAk	0-20	45	40	260, 550

Tabelle 31. HPLC-Gradienten der Trennung nach CuAAC von **DNA6-DNA11**.

DNA	Gradient [% B]	Laufzeit	Temperatur [°C]	Detektionswellenlängen [nm]
DNA6-8	0-20	40	40	260, 550
DNA9-11	0-15	45	40	260, 462

Tabelle 32. HPLC-Methoden der Trennung unter Verwendung eines Ammoniumcitratpuffers nach postsynthetischer Amidmodifizierung von **DNA6-DNA11**.

DNA	Gradient [% B]	Laufzeit	Temperatur [°C]	Detektionswellenlängen [nm]
DNA6-8	7-15	20	40	260, 550
DNA9-11	5-12	20	40	260, 462

Tabelle 33. *Reversed-phase* HPLC-Methoden zur Entfernung des Ammoniumcitratpuffers von **DNA6-DNA11**.

DNA	Gradient [% B]	Laufzeit	Temperatur [°C]	Detektionswellenlängen [nm]
DNA6-8	7-15	20	40	260, 550
DNA9-11	5-11	20	40	260, 462

8.3.7 Sequenzen und Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotide

Styryl-Cyanin-Farbstoffbasenanaloga modifizierte DNA

ssDNA0-Do-XA	5' G-A-A-C-T-T-C-A-G-G-G-T-C-G-T- ADo A-G-C-C-G 3'
ssDNA0-Do-XT	5' G-A-A-C-T-T-C-A-G-G-G-T-C-G-T-T- Do A-G-C-C-G 3'
ssDNA0-Do-XC	5' G-A-A-C-T-T-C-A-G-G-G-T-C-G-T- CDo A-G-C-C-G 3'
ssDNA0-Do-XG	5' G-A-A-C-T-T-C-A-G-G-G-T-C-G-T- GDo A-G-C-C-G 3'
ssDNA2-Do	5' G-A-A-C-T-T-C-A-G-G-G-T-C-T-T-T- Do A-G-C-C-G 3'
ssDNA3-Do	5' G-A-A-C-T-T-C-A-G-G-G-T-T-G-T-T- Do A-G-C-C-G 3'
ssDNA0-Ak-AY	5' G-C-T- AAk A-C-G-A-C-C-C-T-G-A-A-G-T-T-C-A-T 3'
ssDNA0-Ak-TY	5' G-C-T-T- AAk A-C-G-A-C-C-C-T-G-A-A-G-T-T-C-A-T 3'
ssDNA0-Ak-GY	5' G-C-T- GAk A-C-G-A-C-C-C-T-G-A-A-G-T-T-C-A-T 3'
ssDNA0-Ak-CY	5' G-C-T- CAk A-C-G-A-C-C-C-T-G-A-A-G-T-T-C-A-T 3'
ssDNA1-Ak	5' G-C-T- AA - AAk C-G-A-C-C-C-T-G-A-A-G-T-T-C-A-T 3'
ssDNA2-Ak	5' G-C-T- AA - AAk G-A-C-C-C-T-G-A-A-G-T-T-C-A-T 3'
ssDNA3-Ak	5' G-C-T- AA - AA - CAk A-C-C-C-T-G-A-A-G-T-T-C-A-T 3'

Tabelle 34. Massen und Extinktionskoeffizienten der einfach farbstoffmodifizierten DNA.

DNA	Berechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
ssDNA0-Do-XA	6940.3	6943.6	217.7
ssDNA0-Do-XT	6931.3	6934.9	211.8
ssDNA0-Do-XC	6916.3	6916.6	210.4
ssDNA0-Do-XG	6956.3	6960.0	214.4
ssDNA2-Do	6906.3	6903.6	209.1
ssDNA3-Do	6946.3	6947.3	213.1
ssDNA0-Ak-AY	6985.3	6985.9	217.4

ssDNA0-Ak-TY	6976.3	6973.9	211.4
ssDNA0-Ak-GY	7001.3	7000.2	214.0
ssDNA0-Ak-CY	6961.3	6958.1	210.1
ssDNA1-Ak	6985.3	6986.6	217.4
ssDNA2-Ak	7009.3	7007.2	224.7
ssDNA3-Ak	6969.3	6968.5	220.7

Styryl-Cyanin-Farbstoffbasenanaloga modifizierte RNA

ssRNA0 (Do) 5' G-A-A-C-U-U-C-A-G-G-G-U-C-G-U-U^{Do}A-G-C-C-G 3'

ssRNA0 (Ak) 5' G-C-U-A^{Ak}A-C-G-A-C-C-C-U-G-A-A-G-U-U-C-A-U 3'

ssRNA1 (Ak) 5' G-C-U-A-A^{Ak}C-G-A-C-C-C-U-G-A-A-G-U-U-C-A-U 3'

Tabelle 35. Massen und Extinktionskoeffizienten der einfach farbstoffmodifizierten RNA.

RNA	Berechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
ssRNA0 (Ak)	7251.1	7249.5	221.1
ssRNA1 (Ak)	7251.1	7251.5	221.1
ssRNA0 (Do)	7197.1	7194.4	215.0

Einfach modifizierte Aptasensoren

Apt1cAk 5' T-C-C-A-G-C-C-A-G-T-T-A^{Ak}cU^{Ak}A-C 3'

Apt1cDo 5' T-C-C-A-G-C-C-A-G-T-T-A^{Do}cU^{Do}A-C 3'

Apt2cAk 5' G-T-A^{Ak}cU^{Ak}A-A-C-A-G-C-C-G-A-G-G-A-T 3'

Apt2cDo 5' G-T-A^{Do}cU^{Do}A-A-C-A-G-C-C-G-A-G-G-A-T 3'

Apt3cAk 5' T-C-C-A-G-C-C-A-G-T-T-A^{Ak}cU^{Ak}A 3'

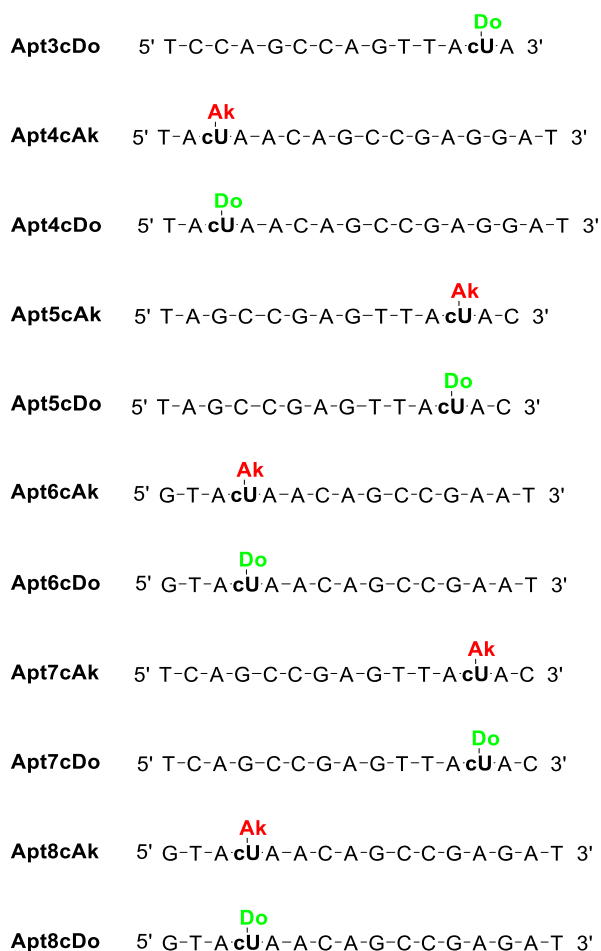


Tabelle 36. Molare Massen und Extinktionskoeffizienten der Aptamere **Apt1-Apt8**.

DNA	Berechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Apt1cAk	5323.1	5320.0	174.9
Apt1cDo	5197.0	5194.9	172.0
Apt2cAk	5725.1	5728.8	202.6
Apt2cDo	5599.1	5597.9	199.7
Apt3cAk	5034.0	5034.0	168.3
Apt3cDo	4908.0	4905.2	165.4
Apt4cAk	5396.1	5397.0	192.1
Apt4cDo	5270.0	5270.3	189.2
Apt5cAk	4745.0	4743.6	161.8

Apt5cDo	4618.9	4616.0	158.8
Apt6cAk	5067.0	5067.7	181.6
Apt6cDo	4941.0	4940.4	178.6
Apt7cAk	5034.0	5031.5	168.3
Apt7cDo	4908.0	4908.0	165.4
Apt8cAk	5396.1	5396.2	192.1
Apt8cDo	5270.0	5268.2	189.2

Doppelt modifizierte Aptasensoren

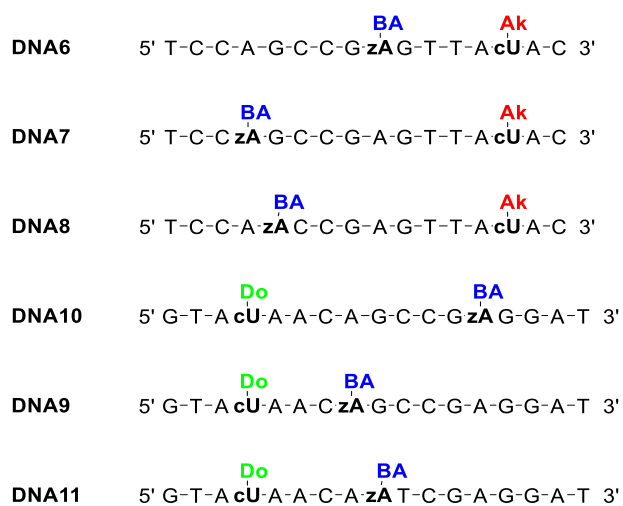


Tabelle 37. Molare Massen und Extinktionskoeffizienten von DNA6-DNA11.

DNA	Berechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DNA6	5527.2	5683.2	168.2
DNA7	5527.2	5683.2	168.2
DNA10	5803.2	5959.2	193.0
DNA9	5803.2	5959.2	193.0
DNA8	5378.3	5690.5	172.9
DNA11	5654.4	5965.6	197.7

8.4 Zusätzliche Spektren und Daten

8.4.1 Wellenlängenverschiebende Aptasensoren

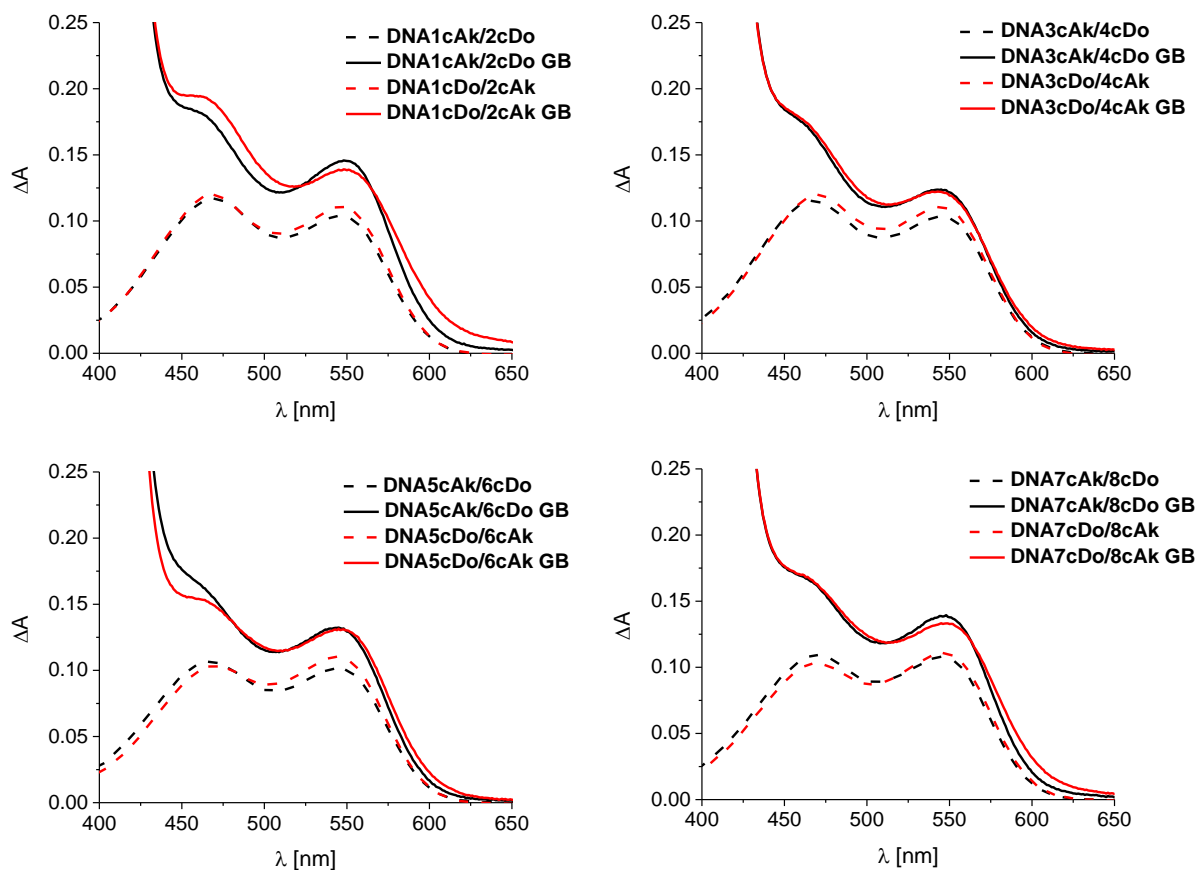


Abbildung 76. Absorptionen aller Split-Aptamere in Anwesenheit und Abwesenheit des Zielkomplexes **GB**. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^{\circ}\text{C}$, **+GB**: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose

Tabelle 38. Quantenausbeuten der Split-Aptamere. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 10 $^{\circ}\text{C}$, **+GB**: 2.5 mM Rezeptor, 1.18 M D-Glucose.

DNA	$\Phi_{\text{F Do}}^{\text{[a]}}$	$\Phi_{\text{F Ac}}$
Apt1cAk/2cDo	0.079	0.142 ^[b]
Apt1cAk/2cDo GB	0.092	0.180 ^[b]
Apt1cDo/2cAk	0.090	0.144 ^[b]
Apt1cDo/2cAk GB	0.100	0.168 ^[b]
Apt3cAk/4cDo	0.101	0.158 ^[b]

Apt3cAk/4cDo GB	0.088	0.149 ^[b]
Apt3cDo/4cAk	0.082	0.136 ^[b]
Apt3cDo/4cAk GB	0.089	0.151 ^[b]
Apt5cAk/6cDo	0.082	0.139 ^[b]
Apt5cAk/6cDo GB	0.081	0.153 ^[b]
Apt5cDo/6cAk	0.093	0.141 ^[b]
Apt5cDo/6cAk GB	0.119	0.191 ^[b]
Apt7cAk/8cDo	0.090	0.148 ^[b]
Apt7cAk/8cDo GB	0.093	0.165 ^[b]
Apt7cDo/8cAk	0.100	0.153 ^[b]
Apt7cDo/8cAk GB	0.102	0.170 ^[b]
Apt1cAk ss		0.166 ^[c]
Apt1cDo ss	0.294	
Apt2cAk ss		0.082 ^[c]
Apt2cDo ss	0.301	
Apt3cAk ss		0.195 ^[c]
Apt3cDo ss	0.252	
Apt4cAk ss		0.124 ^[c]
Apt4cDo ss	0.273	
Apt5cAk ss		0.219 ^[c]
Apt5cDo ss	0.272	
Apt6cAk ss		0.137 ^[c]
Apt6cDo ss	0.226	
Apt7cAk ss		0.202 ^[c]
Apt7cDo ss	0.285	
Apt8cAk ss		0.177 ^[c]
Apt8cDo ss	0.258	

[a] $\lambda_{\text{exc}} = 462 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470\text{-}550 \text{ nm}$; [b] $\lambda_{\text{exc}} = 462 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}800 \text{ nm}$; [c] $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 560\text{-}800 \text{ nm}$.

8.4.2 Temperaturabhängigkeit der doppelt modifizierten Oligonukleotide

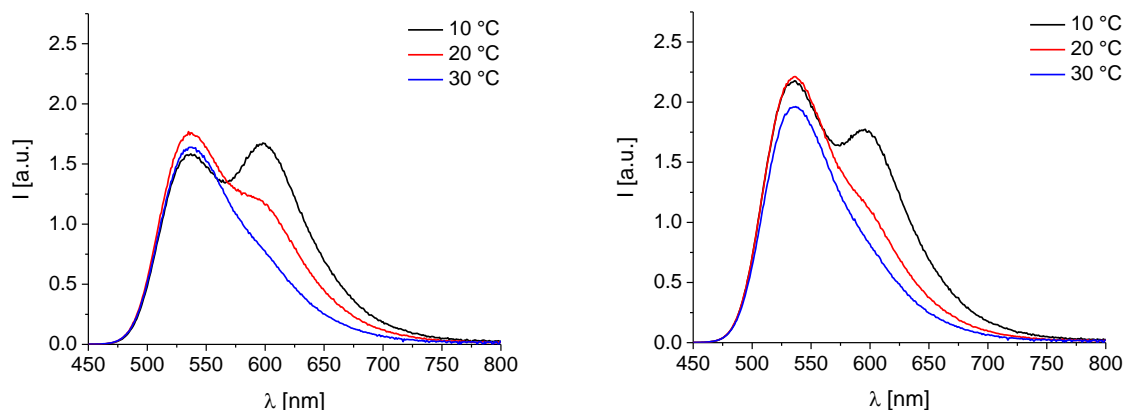


Abbildung 77. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz von **DNA7/9** (links) und **DNA7/10** (rechts). Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

8.4.3 Optische Eigenschaften als Glucose-Sensoren

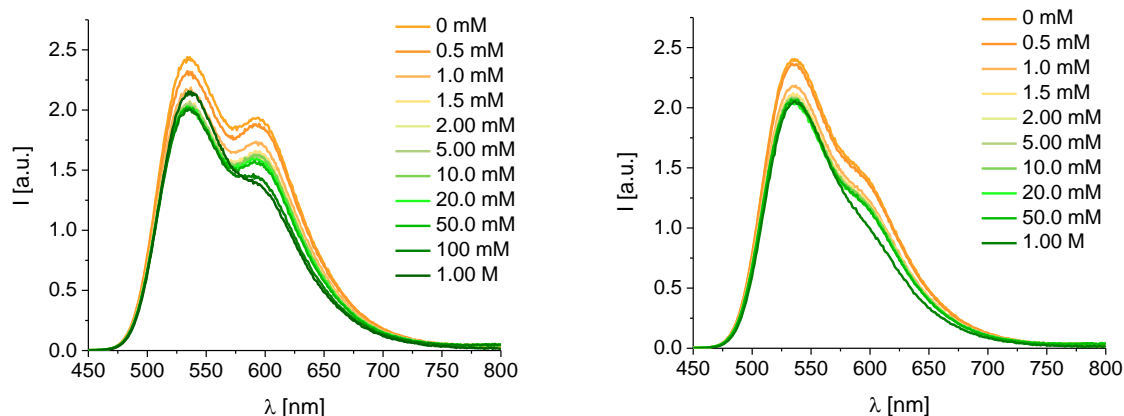


Abbildung 78. Fluoreszenz von **DNA6/10** nach Titration mit D-Glucose bei 15 °C (links) und 20 °C (rechts). Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

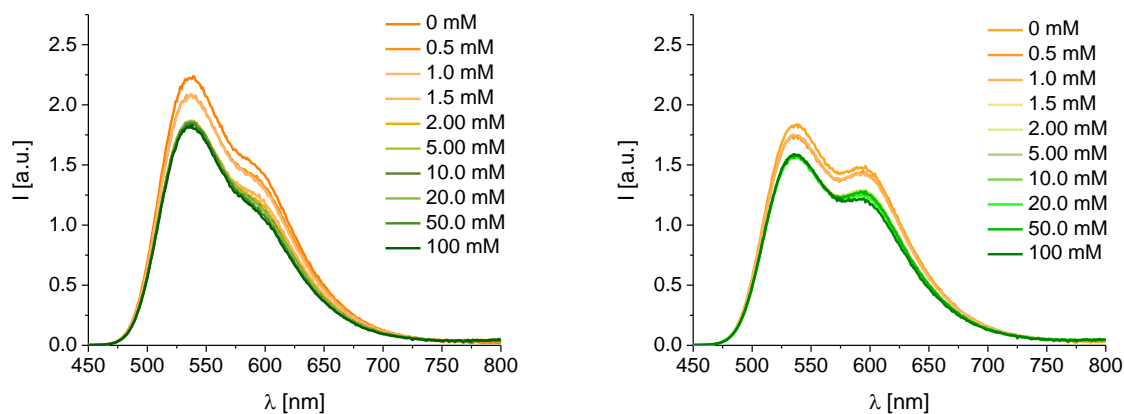


Abbildung 79. Fluoreszenz von **DNA6/9** (links) und **DNA7/9** (rechts) nach Titration mit D-Glucose bei 15 °C. Bedingungen: 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; $\lambda_{\text{exc}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450-800$ nm.

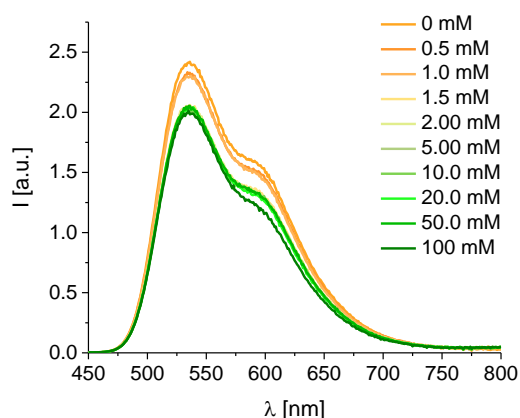


Abbildung 80. Fluoreszenz von **DNA7/10** nach Titration mit D-Glucose bei 15 °C. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

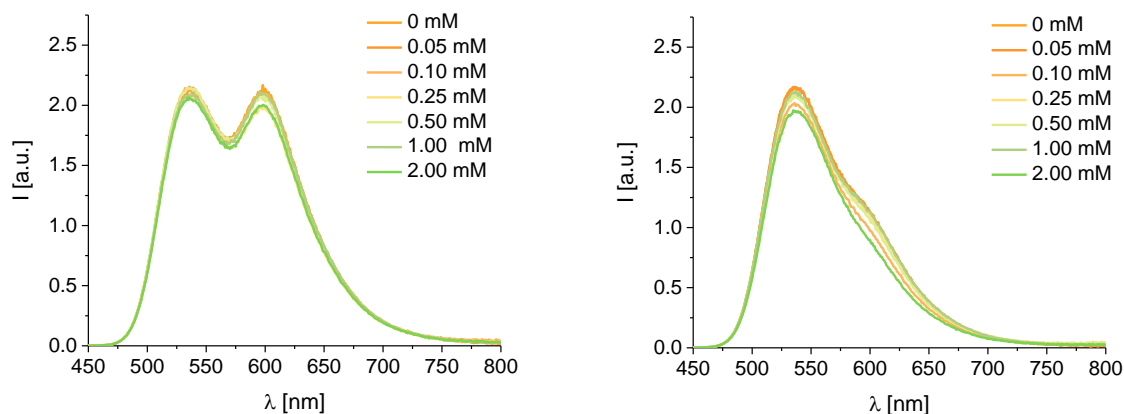


Abbildung 81. Fluoreszenz von **DNA6/11** nach Titration mit D-Glucose bei 10 °C (links) und 20 °C (rechts). Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

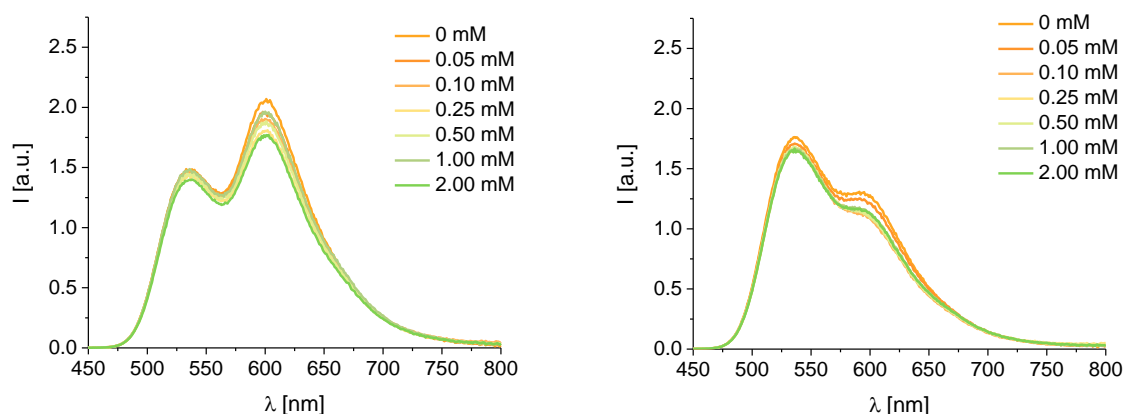


Abbildung 82. Fluoreszenz von **DNA7/11** nach Titration mit D-Glucose bei 10 °C (links) und 20 °C (rechts). Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

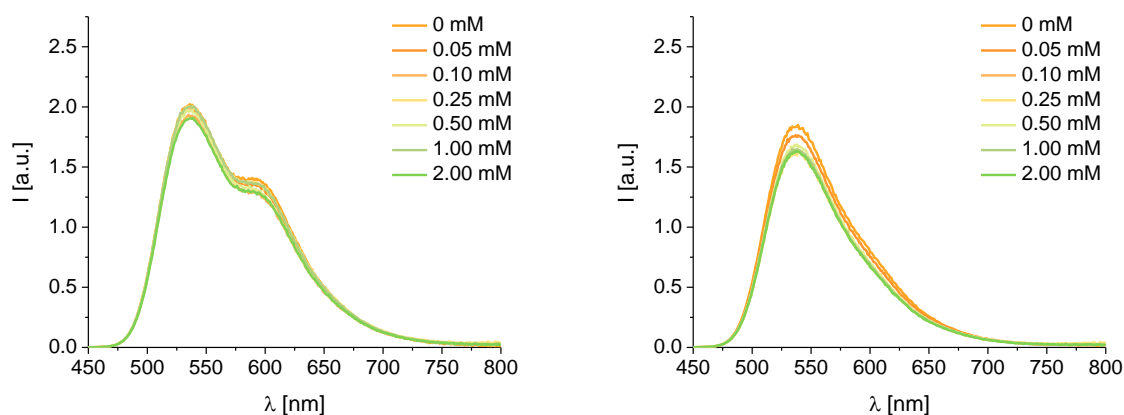


Abbildung 83. Fluoreszenz von **DNA8/10** nach Titration mit D-Glucose bei 10 °C (links) und 20 °C (rechts). Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

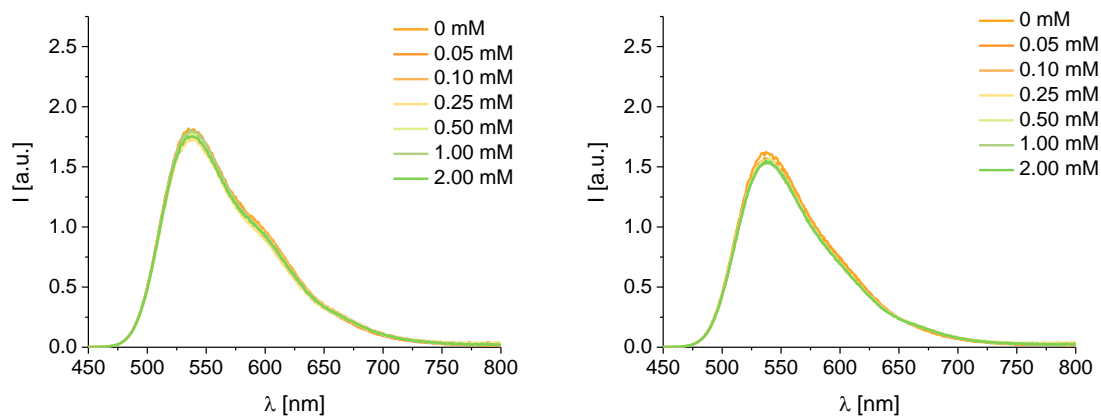


Abbildung 84. Fluoreszenz von **DNA8/9** nach Titration mit D-Glucose bei 10 °C (links) und 20 °C (rechts). Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

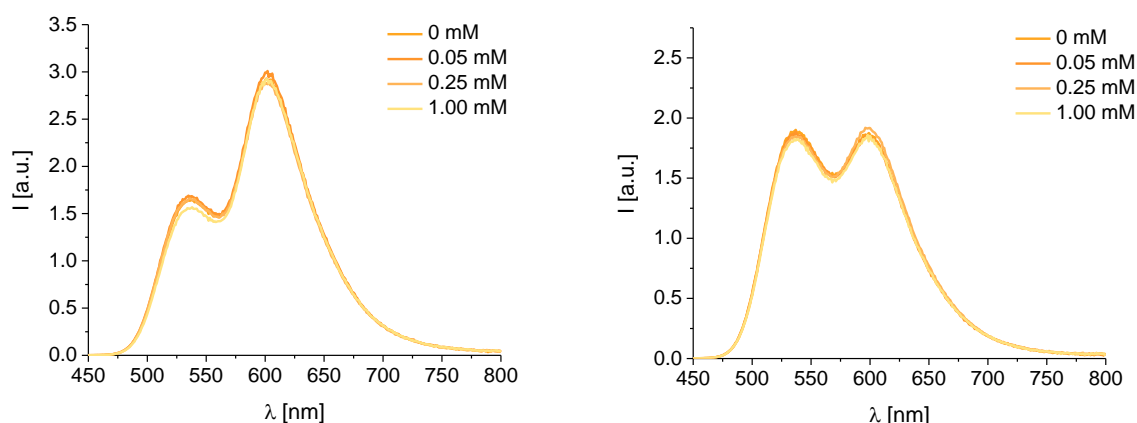


Abbildung 85. Fluoreszenz von **DNA8/11** nach Titration mit D-Glucose mit 100 mM NaCl bei 15 °C (links) und 20 °C (rechts). Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

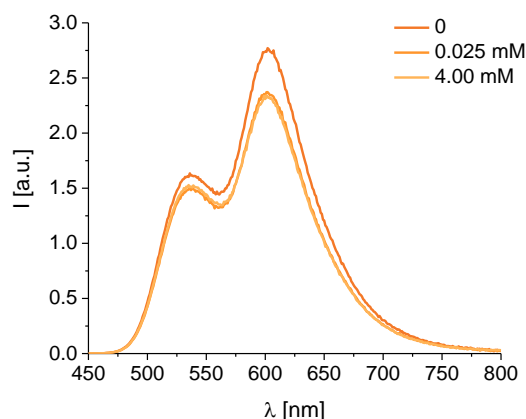


Abbildung 86. Fluoreszenz von **DNA8/11** nach Titration mit D-Glucose bei 20 °C. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

8.4.4 pH-abhängige optische Untersuchungen

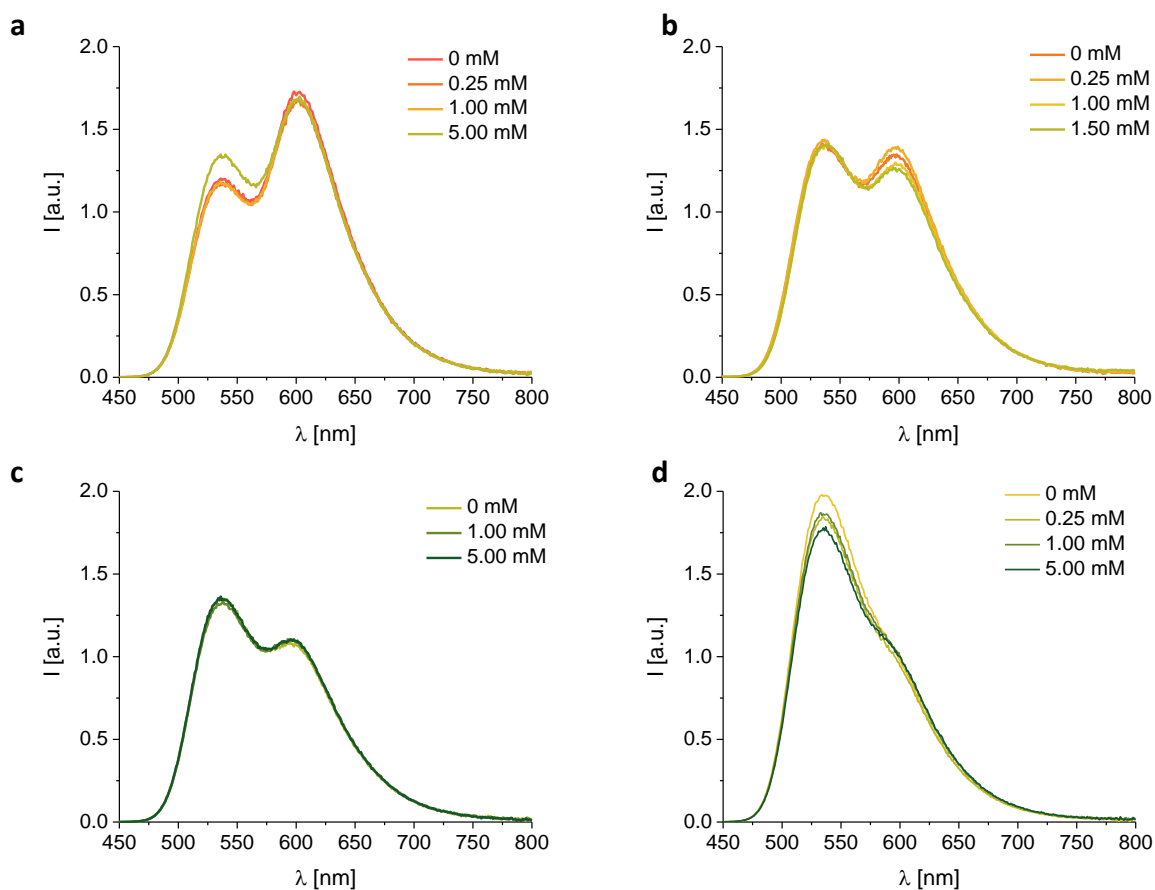


Abbildung 87. Fluoreszenz von **DNA7/9** der Titration mit D-Glucose bei 10 °C bei a) pH = 6; b) pH = 7; c) pH = 8; d) pH = 9. Bedingungen: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi-Puffer, 250 mM NaCl, 10 °C; λ_{exc} =435 nm, λ_{em} =450-800 nm.

9 Literaturverzeichnis

- [1] "Schizophrenie, Depression, Autismus - alles das Gleiche?", online unter <http://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2018-02/neurologie-gehirn-gen-forschung-psychische-stoerungen>, aufgerufen am 02/19/2018.
- [2] M. J. Gandal *et al.*, *Science* **2018**, 359, 693.
- [3] C. L. Hyde *et al.*, *Nat. Genet.* **2016**, 48, 1031-1036.
- [4] C. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics *et al.*, *Nature* **2014**, 511, 421-427.
- [5] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, WILEY-VCH, **2011**.
- [6] D. M. J. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 507-517.
- [7] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10002-10003.
- [8] B. A. Pollok, R. Heim, *Trends in Cell Biology*, 9, 57-60.
- [9] P. R. Bohländer, *Detektion von Nukleinsäuren durch postsynthetisch modifizierte Fluoreszenzsonden auf Basis photostabiler Cyaninfarbstoffe*, Karlsruher Institut für Technologie, **2015**.
- [10] H.-K. Walter, „DNA/RNA Traffic Lights 2.0“ *Entwicklung von wellenlängenverschiebenden DNA- und RNA-Sonden unter Verwendung von „Click“-Modifikationen*, Karlsruher Institut für Technologie, **2016**.
- [11] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, WILEY-VCH, **2002**.
- [12] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, 9, 14-19.
- [13] T. Förster, *Annalen der Physik* **1948**, 437, 55-75.
- [14] L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 719-726.
- [15] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, 14, 187-191.
- [16] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 103-110.
- [17] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2002**, 3, 906.

- [18] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-846.
- [19] K. Börjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.
- [20] I. H. Stein, V. Schüller, P. Böhm, P. Tinnefeld, T. Liedl, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 689-695.
- [21] J. R. Grunwell, J. L. Glass, T. D. Lacoste, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4295-4303.
- [22] M. P. Lillo, J. M. Beechem, B. K. Szpikowska, M. A. Sherman, M. T. Mas, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11261-11272.
- [23] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4589.
- [24] A. M. Paradiso, R. Y. Tsien, T. E. Machen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7436-7440.
- [25] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- [26] C. Dohno, K. Nakatani, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5718-5729.
- [27] M. E. Ostergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5771-5788.
- [28] T. Wang, J. Ray, *Protein Cell* **2012**, *3*, 739-754.
- [29] A. Kienzler, R. Flehr, R. A. Kramer, S. Gehne, M. U. Kumke, W. Bannwarth, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1852-1863.
- [30] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191.
- [31] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 402-405.
- [32] R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227-1230.
- [33] Y. J. Seo, G. T. Hwang, B. H. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4037-4039.
- [34] D. M. Kolpashchikov, *Scientifica* **2012**, *2012*, 928783.
- [35] D.-S. Xiang, G.-H. Zhou, M. Luo, X.-H. Ji, Z.-K. He, *Analyst* **2012**, *137*, 3787-3793.
- [36] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062-2063.

- [37] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.
- [38] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746-2748.
- [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, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.
- [41] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7373-7379.
- [42] C. Holzhauser, *Wellenlängenverschiebende DNA- Und RNA-Sonden zur bioanalytischen Anwendung*, Karlsruher Institut für Technologie, **2012**.
- [43] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 1239-1248.
- [44] S. Barrois, S. Worner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1126-1129.
- [45] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7547-7551.
- [46] C. Holzhauser, M. M. Rubner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 722-724.
- [47] S. Jockusch, A. A. Marti, N. J. Turro, Z. Li, X. Li, J. Ju, N. Stevens, D. L. Akins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 493-498.
- [48] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268-7272.
- [49] D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656-665.
- [50] C. H. Lin, D. J. Patei, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 817-832.
- [51] G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244.
- [52] C. Arenz, U. Schepers, *RNA interference: From an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application?*, Vol. 90, **2003**.
- [53] P. V. Chang, C. R. Bertozzi, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8864-8879.
- [54] 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.

- [55] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8206-8210.
- [56] P. R. Bohlander, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [57] P. R. Bohlander, M. L. Abba, F. Bestvater, H. Allgayer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5001-5006.
- [58] H.-K. Walter, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 92-96.
- [59] H.-K. Walter, B. Olshausen, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 127-137.
- [60] H.-K. Walter, V. Schneider, *MD-Simulationen der Orientierungen der Farbstoffe zueinander in den ribo- und arabino-konfigurierten RNA-Duplexen*, Karlsruher Institut für Technologie, **2017** (Unveröffentlichte Ergebnisse).
- [61] K. Schee, K. Boye, T. W. Abrahamsen, Ø. Fodstad, K. Flatmark, *BMC Cancer* **2012**, *12*, 505.
- [62] H.-K. Walter, J. Bauer, J. Steinmeyer, A. Kuzuya, C. M. Niemeyer, H.-A. Wagenknecht, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 2467-2472.
- [63] T. D. James, M. D. Phillips, S. Shinkai, *Boronic Acids in Saccharide Recognition*, RSC Publishing, **2006**.
- [64] J. Yoon, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5874-5875.
- [65] G. Wulff, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2093-2102.
- [66] L. K. Mohler, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7037-7038.
- [67] X. Sun, T. D. James, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8001-8037.
- [68] M. Takeuchi, M. Taguchi, H. Shinmori, S. Shinkai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 2613-2618.
- [69] H. Suenaga, S. Arimori, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 607-612.
- [70] T. Nagasaki, H. Shinmori, S. Shinkai, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2201-2204.
- [71] H. Kobayashi, K. Nakashima, E. Ohshima, Y. Hisaeda, I. Hamachi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 997-1002.

- [72] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2287-2289.
- [73] G. Deng, T. D. James, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4567-4572.
- [74] S. Arimori, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 77-78.
- [75] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2038-2050.
- [76] S. Shinkai, K. Tsukagoshi, Y. Ishikawa, T. Kunitake, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1039-1041.
- [77] X. Wu, Z. Li, X.-X. Chen, J. S. Fossey, T. D. James, Y.-B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8032-8048.
- [78] R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1106-1123.
- [79] K. L. Bicker, J. Sun, J. J. Lavigne, P. R. Thompson, *ACS Comb. Sci.* **2011**, *13*, 232-243.
- [80] H. G. Kuivila, A. H. Keough, E. J. Soboczanski, *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 780-783.
- [81] J. P. Lorand, J. O. Edwards, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 769-774.
- [82] H. Yasuda, T. Kurokawa, Y. Fujii, A. Yamashita, S. Ishibashi, *BBA Biomemb.* **1990**, *1021*, 114-118.
- [83] X. Wang, S. Ioacara, A. DeHennis, *Diabetes Technologies & Therapeutics* **2015**, *17*, 780-786.
- [84] X.-D. Xu, H. Cheng, W.-H. Chen, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2679.
- [85] S. Wang, D. Yin, W. Wang, X. Shen, J.-J. Zhu, H.-Y. Chen, Z. Liu, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22757.
- [86] R. Peracaula, S. Barrabés, A. Sarrats, P. M. Rudd, R. de Llorens, *Disease Markers* **2008**, *25*, 207-218.
- [87] W. Zhai, B. M. Chapin, A. Yoshizawa, H.-C. Wang, S. A. Hodge, T. D. James, E. V. Anslyn, J. S. Fossey, *Org. Chem. Front.* **2016**, *3*, 918-928.
- [88] Y. Nagai, K. Kobayashi, H. Toi, Y. Aoyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 2965-2971.
- [89] H. Suenaga, H. Yamamoto, S. Shinkai, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 2179-2186.
- [90] H. Suenaga, M. Mikami, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4825-4828.

- [91] H. Shinmori, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1893-1902.
- [92] N. DiCesare, J. R. Lakowicz, *Chem. Commun.* **2001**, 2022-2023.
- [93] N. DiCesare, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 6834-6840.
- [94] X. Gao, Y. Zhang, B. Wang, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4615-4618.
- [95] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 477-478.
- [96] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, R. Iguchi, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8982-8987.
- [97] J. D. Larkin, K. A. Frimat, T. M. Fyles, S. E. Flower, T. D. James, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2922-2931.
- [98] T. D. James, K. R. A. Samankumara Sandanayake, S. Shinkai, *Nature* **1995**, *374*, 345-347.
- [99] J. Zhao, M. G. Davidson, M. F. Mahon, G. Kociok-Köhn, T. D. James, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16179-16186.
- [100] W. Zhai, L. Male, J. S. Fossey, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2218-2221.
- [101] S. Arimori, M. L. Bell, C. S. Oh, T. D. James, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4249-4251.
- [102] A. Stephenson-Brown, S. Yong, M. H. Mansor, Z. Hussein, N.-C. Yip, P. M. Mendes, J. S. Fossey, F. J. Rawson, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17213-17216.
- [103] D. Mandal, S. K. Mandal, M. Ghosh, P. K. Das, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12042-12052.
- [104] W. Sun, H. Bandmann, T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7701-7707.
- [105] W. M. J. Ma, M. P. Pereira Morais, F. D'Hooge, J. M. H. van den Elsen, J. P. L. Cox, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. Commun.* **2009**, 532-534.
- [106] D. Stones, S. Manku, X. Lu, D. G. Hall, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 92-100.
- [107] N. Lin *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1222-1229.
- [108] M. Li, N. Lin, Z. Huang, L. Du, C. Altier, H. Fang, B. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12636-12638.

- [109] X. Yang, C. Dai, A. Dayan Calderon Molina, B. Wang, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1073-1075.
- [110] C. Dai, L. Wang, J. Sheng, H. Peng, A. B. Draganov, Z. Huang, B. Wang, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3598-3600.
- [111] A. E. Hargrove, A. D. Ellington, E. V. Anslyn, J. L. Sessler, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 388-396.
- [112] S. Verma, F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 99-134.
- [113] A. J. A. Cobb, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 3260-3275.
- [114] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 744-751.
- [115] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4977-4986.
- [116] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1685-1690.
- [117] J. Barbaric, C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 364-370.
- [118] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4174-4175.
- [119] M. K. Schlegel, A. E. Peritz, K. Kittigowittana, L. Zhang, E. Meggers, *ChemBioChem* **2007**, 8, 927-932.
- [120] E. Meggers, L. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 1092-1102.
- [121] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 2090-2097.
- [122] H. Kashida, K. Murayama, T. Toda, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1285-1288.
- [123] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [124] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3106-3116.
- [125] S. Arndt, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 14808-14811.
- [126] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1249-1262.
- [127] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.
- [128] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.

- [129] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [130] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [131] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388-1405.
- [132] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [133] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478-8487.
- [134] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [135] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodiversity* **2006**, *3*, 509-514.
- [136] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [137] M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1299-1302.
- [138] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [139] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [140] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912-1916.
- [141] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1541-1553.
- [142] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [143] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [144] M. S. Urdea, B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne, T. Horn, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4937-4956.
- [145] D. L. McMinn, M. M. Greenberg, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3827-3840.
- [146] D. L. McMinn, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3289-3294.
- [147] D. L. McMinn, T. J. Matray, M. M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7074-7075.

- [148] J. D. Kahl, D. L. McMinn, M. M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4870-4871.
- [149] J.-T. Hwang, M. M. Greenberg, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2021-2024.
- [150] M. Kuwahara, N. Sugimoto, *Molecules* **2010**, *15*, 5423-5444.
- [151] L. Mannocci, M. Leimbacher, M. Wichert, J. Scheuermann, D. Neri, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12747-12753.
- [152] R. M. Franzini, F. Samain, M. Abd Elrahman, G. Mikutis, A. Nauer, M. Zimmermann, J. Scheuermann, J. Hall, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1453-1461.
- [153] R. M. Franzini *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3927-3931.
- [154] A. L. Satz *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1623-1632.
- [155] Y. Li, E. Gabriele, F. Samain, N. Favalli, F. Sladojevich, J. Scheuermann, D. Neri, *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 438-443.
- [156] N. K. Vaish, A. W. Fraley, J. W. Szostak, L. W. McLaughlin, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3316-3322.
- [157] K. Shinozuka, S. Kohgo, H. Ozaki, H. Sawai, *Chem. Commun.* **2000**, 59-60.
- [158] T. Hojland, S. Kumar, B. R. Babu, T. Umemoto, N. Albaek, P. K. Sharma, P. Nielsen, J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2375-2379.
- [159] D. R. Halpin, J. A. Lee, S. J. Wrenn, P. B. Harbury, *PLOS Biology* **2004**, *2*, e175.
- [160] J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 165-187.
- [161] J. D'Onofrio, D. Montesarchio, L. De Napoli, G. Di Fabio, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4927-4930.
- [162] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1845-1847.
- [163] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [164] J. Steinmeyer, F. Rönicke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 514-518.
- [165] T. Kato, H. Kashida, H. Kishida, H. Yada, H. Okamoto, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 741-750.
- [166] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806.

- [167] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494.
- [168] J. Kurreck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1404-1426.
- [169] T. M. Rana, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2007**, *8*, 23.
- [170] Z. Li, T. M. Rana, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1122-1131.
- [171] K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 129.
- [172] M. Dominska, D. M. Dykxhoorn, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1183.
- [173] G. J. Hannon, J. J. Rossi, *Nature* **2004**, *431*, 371.
- [174] G. Zhu, G. Niu, X. Chen, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2186-2197.
- [175] D. M. Dykxhoorn, J. Lieberman, *Cell* **2006**, *126*, 231-235.
- [176] J. C. Burnett, J. J. Rossi, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 60-71.
- [177] L. Aagaard, J. J. Rossi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 75-86.
- [178] E. Song *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 709.
- [179] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [180] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505.
- [181] J. Wrzesinski, J. Ciesiolka, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6257-6268.
- [182] M. Barbu, M. N. Stojanovic, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 658-660.
- [183] K. Endo, Y. Nakamura, *Anal. Biochem.* **2010**, *400*, 103-109.
- [184] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928-4931.
- [185] L. Giver, D. Bartel, M. Zapp, A. Pawul, M. Green, A. D. Ellington, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5509-5516.
- [186] N. Hamaguchi, A. Ellington, M. Stanton, *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 126-131.
- [187] S. E. Lupold, B. J. Hicke, Y. Lin, D. S. Coffey, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4029.
- [188] K.-M. Song, E. Jeong, W. Jeon, M. Cho, C. Ban, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2153-2161.
- [189] G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672-2689.

- [190] F. Tolle, G. M. Brändle, D. Matzner, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10971-10974.
- [191] F. Tolle, *Click-SELEX - A versatile approach towards nucleobase-modified aptamers-*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2016**.
- [192] E. J. Cho, J.-W. Lee, A. D. Ellington, *Annual Review of Analytical Chemistry* **2009**, *2*, 241-264.
- [193] G. S. Filonov, J. D. Moon, N. Svendsen, S. R. Jaffrey, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16299-16308.
- [194] J. S. Paige, K. Y. Wu, S. R. Jaffrey, *Science* **2011**, *333*, 642.
- [195] R. L. Strack, W. Song, S. R. Jaffrey, *Nature Protoc.* **2013**, *9*, 146.
- [196] J. S. Paige, T. Nguyen-Duc, W. Song, S. R. Jaffrey, *Science* **2012**, *335*, 1194.
- [197] J. Ouellet, *Frontiers in Chemistry* **2016**, *4*, 29.
- [198] K.-A. Yang *et al.*, *Nat Chem* **2014**, *6*, 1003-1008.
- [199] E. Kianmehr, M. Yahyaei, K. Tabatabai, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2713-2715.
- [200] M. Hollenstein, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5162-5172.
- [201] F. Seela, M. Zulauf, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1878-1898.
- [202] Q. Z. Wang, D.; Liu, Y.; Cheng, M.; He, J.; Liu, K., *Nucl. Acid Ther.* **2012**, *6*, 423-427.
- [203] M. Quintiliani, J. Balzarini, C. McGuigan, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 9111-9119.
- [204] I. Dhimitruka, J. SantaLucia Jr, *Synlett* **2004**, *2004*, 0335-0337.
- [205] T.-M. Chin, L.-K. Huang, L.-S. Kan, *J. Chin. Chem. Soc.* **1997**, *44*, 413-416.
- [206] F. Seela, K. Xu, *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1083-1105.
- [207] A. S. K. Hashmi, T. Häffner, W. Yang, S. Pankajakshan, S. Schäfer, L. Schultes, F. Rominger, W. Frey, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10480-10486.
- [208] Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6634-6654.
- [209] L. I. Bosch, T. M. Fyles, T. D. James, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11175-11190.
- [210] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291-5300.

- [211] A. R. Martin, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5684-5713.
- [212] A. R. Martin, I. Barvik, D. Luvino, M. Smietana, J.-J. Vasseur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4193-4196.
- [213] D. Luvino, C. Baraguey, M. Smietana, J.-J. Vasseur, *Chem. Commun.* **2008**, 2352-2354.
- [214] R. Barbeyron, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 542-547.
- [215] M. Smietana, A. R. Martin, J.-J. Vasseur, *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 1659-1667.
- [216] S. Mori, K. Morihiro, T. Okuda, Y. Kasahara, S. Obika, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 1112-1118.
- [217] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [218] A. Dierckx, F.-A. Miannay, N. Ben Gaied, S. Preus, M. Björck, T. Brown, L. M. Wilhelmsson, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5987-5997.
- [219] S. De Ornellas, J. M. Slattery, R. M. Edkins, A. Beeby, C. G. Baumann, I. J. S. Fairlamb, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 68-72.

10 Appendix

10.1 Publikationen

A. Eördögh, J. Steinmeyer, K. Peewasan, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, "Polarity Sensitive Bioorthogonally Applicable Far-Red Emitting Labels for Postsynthetic Nucleic Acid Labeling by Copper-Catalyzed and Copper-Free Cycloaddition", *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 457-464.

J. Steinmeyer, F. Röncke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, "Synthesis of Wavelength-Shifting Fluorescent DNA and RNA with Two Photostable Cyanine-Styryl Dyes as the Base Surrogate Pair", *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 514-518.

H.-K. Walter, J. Bauer, J. Steinmeyer, A. Kuzuya, C. M. Niemeyer, H.-A. Wagenknecht, "DNA Origami Traffic Lights" with a Split Aptamer Sensor for a Bicolor Fluorescence Readout", *Nano Lett.* **2017**, *17*, 2467-2472.

J. Steinmeyer, H.-A. Wagenknecht, "Synthesis of DNA modified with boronic acid: Compatibility to copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition", *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 431-436.

J. Steinmeyer, H.-K. Walter, M. Bichelberger, V. Schneider, T. Kubař, F. Röncke, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, U. Schepers, M. Elstner, H.-A. Wagenknecht, "„siRNA traffic lights“: Arabino-configured 2'-anchors for fluorescent dyes are key for dual color readout in cell imaging", *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 3726-3731.

10.2 Posterbeiträge und Konferenzen

- 09/2015 VII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Berlin, **2015** (Poster)
- 10/2016 Nucleic Acid Chemistry, Beilstein Organic Chemistry Symposium **2016** (Poster)
- 09/2017 VIII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Mainz, **2017** (Poster)
- 10/2017 Symposium on molecular architectures for fluorescent imaging of cells, Karlsruhe, **2017** (Poster)

10.3 Lehre

- SS2015 Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie und der chemischen Biologie am KIT
- 07/2015 - 11/2015 Betreuung der Bachelorarbeit von Arthur Kuhlmann
Thema: *Synthese fluoreszenzmarkierter DNA und Untersuchung der Abstandsabhängigkeit des Energietransfers*
- SS2016 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, chemischen Biologie und Lebensmittelchemie am KIT
- 09/2016 - 11/2016 Betreuung der Vertieferarbeit von Sara Müller
Thema: *Synthese eines modifizierten Deazaadenin-Phosphoramidit-Bausteins zur Synthese eines glucosespezifischen DNA-Aptasensors*
- 10/2016 - 01/2017 Betreuung der Vertieferarbeit von Fabian Lang
Thema: *Synthese neuer glucosespezifischer DNA-Aptasensoren*
- WS2016/17 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT
- 03/2017 - 08/2017 Betreuung von Felix Mazza im ersten Ausbildungsjahr zum Chemielaboranten
- SS2017 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, chemischen Biologie und Lebensmittelchemie am KIT

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und die Satzung *des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)* zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe. Weiterhin versichere ich, dass die elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt. und die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut gesichert ist.

Karlsruhe, den 07.03.2018

Jeannine Steinmeyer