

Einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen zur Leitfähigkeit von modifizierter DNA über Rastertunnelmikroskopie

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



Karlsruher Institut für Technologie

genehmigte

DISSERTATION

von

Christoph Bickmann, M.Sc.

aus Biedenkopf, Hessen, Deutschland

Karlsruhe, 2020

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Schuster

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2020

Für meine Familie und Freunde

*Wissenschaft ist, wenn sie ordentlich betrieben wird, ein transparenter Prozess,
wo jede Antwort eine neue Frage liefert. Wir irren uns empor.*

- Harald Lesch -

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom Juni 2016 bis Juli 2020 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wagenknecht, für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, die Betreuung, die wissenschaftlichen Freiheiten und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Im speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- Claudia Sommer für ihre unendliche Hilfsbereitschaft nicht nur bei all den organisatorischen und formellen Angelegenheiten sowie für ihre ansteckende Gute Laune und Aufmunterung.
- Annette Hochgesand für ihre Geduld mit meinen Maldi-Proben, auch wenn mal nichts, zu messen war.
- Der Analytik-Abteilung, im besonderen Dr. Andreas Rapp für die Hilfestellung bei Problemen mit den NMR-Spektrometern und viele interessante Gespräche über die Studenten.
- Richard von Budberg für das Anfertigen jeglicher Glasgeräte und das Reparieren und dank Kiwi habe ich mich auch immer irgendwie über Glasbruch gefreut.
- Jakob Mayer für die weiteren Reparaturen und die Hilfe bei der Argonflaschendichtung im Besonderen.
- Meinen Arbeitskollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Zusammenarbeit und die gemeinsamen AK Ausflüge: Dr. Krisana Peewasan, Dr. Damian Ploschik, Dr. Sergej Hermann, Dr. Jeanine Steinmeyer, Dr. Benjamin Lehmann, Dr. Robert Hofsäß, Dr. David Rombach, Dr. Christian Schwechheimer, Dr. Franziska Rönicke, Dr. Ulrike Reisacher, Dr. Samantha Wörner, Dr. Yannic Fritz, Sarah Müller, Fabienne Speck, Arthur Kuhlmann, Fabian Lang, Julian Gebhard, Hülya Ucar, Fabian Weick, Larissa Doll, Katja Krell, Daniel Sack, Dennis Harijan, Lara Hirsch, Fabienne Urbanek und Dorothee Ganz.
- Herrn Schuster für die Hilfe bei der Interpretation der Daten und die freundliche Bereitstellung des STMs und den damit verbundenen Materialien.

- Genauso beim gesamten AK Schuster, vor allem bei Marcel Lang, für Hilfe, Reperaturen, das Auswertungsprogramm, die Musik- und Spiele-Tipps und einfach für eine schöne Zeit.
- Bei Damian, Sersch und Uli für die freundliche Aufnahme in 403 und Wiedereinführung in die OC nach 3-jähriger Abwesenheit. Auch wenn es euch einige Nerven gekostet hat.
- Lara für die Synthesehilfe, die Analytik von ESI und IR sowie die Schoko-Kiosk-Fortführung von Damian.
- Dave für teils abgefahrene und interessante Diskussionen und für seine mitreißende Begeisterung für Chemie.
- Dem gesamten Erdgeschoss für die schönen Mittagspausen und interessanten Gespräche dabei.
- Daniel mit dem 007 verdammt viel Spaß gemacht hat. Besonders für die vielen Chemie-Diskussionen, das Metal-Musik-Raten, Assi-o'clock, ESOC 2019 und vieles mehr.
- Folgerichtig bei Manuel Schupp dafür, dass er während seiner Masterarbeit einfach immer für gute Laune, die „Reaction of the day“ und für die gemeinsame Tagung in Wien gesorgt hat.
- Meinen Kommilitonen Ben und Bantle für die vielen Mittagessen und lustigen Abende; Christoph und Jonas für viel guten Doppelkopf; Christian-Carl und Julian für die abgefahrenen Philosophierstunden.
- Damian Ploschik für extrem viele Gespräche und Diskussionen während der gesamten Promotion. Dafür, dass du immer ein offenes Ohr hattest und immer mit Rat und Tat zur Seite standest, genauso wie bei der Korrektur dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinen Eltern Toni und Gudrun, meiner Schwester Conny und meiner gesamten Familie bedanken, die mich immer unterstützt haben. Ohne euch hätte ich es nicht soweit geschafft. Ich möchte mich besonders bei Hans-Walter und Monika für die Korrektur, eine schöne Zeit und die Versorgung mit allem bedanken, so dass das vieles leichter wurde.

Zuletzt bei Esther für die schöne und unvergessliche Zeit, die Unterstützung, Korrektur, das Aufmuntern, die fachlichen Diskussionen, Verständnis und so vieles mehr!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Themenstellung	1
Themenstellung.....	3
2. Theoretischer Hintergrund	7
2.1. DNA und Modifikationen	7
2.1.1. Allgemeines.....	7
2.1.2. DNA-Modifikationen	8
2.2. Rastertunnelmikroskopie und ihre Anwendung	17
2.3. Untersuchungen von Leitfähigkeit der DNA	21
3. Hauptteil	29
3.1. Metallionen als DNA-Modifikationen	29
3.1.1. Synthese und Anbindung des Porphyrins 1	29
3.1.2. Synthese und Charakterisierung des 8-Hydroxychinolins 3	34
3.2. Leitfähigkeitsmessungen am Rastertunnelmikroskop.....	47
3.2.1. Aufbau und Messmethode	47
3.2.2. STM MCBJ-Messungen an HC-modifizierter DNA.....	52
3.3. Linkerabhängigkeit der STM MCBJ-Messungen.....	63
3.4. Interkalationsverbindungen als DNA-Modifikation	76
3.4.1. Porphyrine.....	76
3.4.2. Spiropyran	84
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	95
5. Experimenteller Teil	99
5.1. Verwendete Chemikalien und Geräte.....	99
5.1.1. Analytik.....	99
5.1.2. Reagenzien und Präparatives Arbeiten.....	101

5.2. Synthesevorschriften und Analytik	106
5.2.1.1. Synthese des Gold(III)-5-(3-Azidopropyl)-10,15,20-trimethyl-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin (1)	106
5.2.1.2. Synthese der metallierten 5,10,15,20-trimethyl-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrine (35-Au und 35-Cu).....	107
5.2.3. Synthese des Click-C (2)	108
5.2.4. Synthese des 8-Hydroxychinolin-Basensurrogates 3	109
5.2.5. Synthese des Uridin-Linkers 4	110
5.2.6. Synthese der Photoschalter 5	117
5.3. Festphasensynthese und Sequenzen der Oligonukleotide.....	122
6. Abkürzungsverzeichnis	129
7. Literaturverzeichnis.....	137
8. Appendix	145
9. Ehrenwörtliche Erklärung	147

1. Einleitung und Themenstellung

Das Moorsche Gesetz geht auf Gordon E. Moore aus dem Jahre 1965 zurück. In diesem wird vorhergesagt, dass sich mit geringen Komponentenkosten die Anzahl der elektronischen Bauteile einer integrierten Schaltung alle ein bis zwei Jahre verdoppeln.^[1] Eine der Voraussetzungen dafür ist die von Moore einige Zeit später erwähnte intelligente Integration der Bauteile und gleichzeitige Verkleinerung der Schaltelemente. Ein zukünftiges Ziel dieser Entwicklung liegt im Schritt vom Nanobereich zum molekularen Bereich. Schon bei der Verwendung von Nanopartikeln können im Vergleich zu ihren Bulkstoffen eklatante Veränderungen in den Stoffeigenschaften auftreten. So ist zum Beispiel Gold nicht direkt toxisch für den Körper und ist in Form von Blattgold essbar. Goldnanopartikel wie Au₅₅ weisen eine erhebliche Zelltoxizität und eine starke Koordination an die Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) auf.^[2] Daher muss die Frage gestellt werden, ob diese Unterschiede beim Schritt von den Nanopartikeln hin zu molekularen Leitern für Schaltkreiselemente im Zuge der Miniaturisierung ebenso zu beobachten sein werden. Zusätzlich stellt sich in Zeiten der Überproduktion auch die Frage der Abhängigkeit und Nachhaltigkeit von Metallen zur Produktion von Elektronik. Einige organische Moleküle zeigen bereits heute, dass elektrische Leiter nicht nur aus Metallen bestehen müssen. Kohlenstoff-Nanoröhrchen haben eine hervorragende Leitfähigkeit und können über Dotierungen sogar noch verbessert werden.^[3] Über die Verwendung organischer Liganden und konjugierten π -Systemen kann ein geringerer Verbrauch von Metallen für Dioden erzielt werden, wie es in OLEDs bereits der Fall ist.^[4] Molekulare Drähte in Form von Polythiophen und Polypyrrol besitzen hervorragende elektrische Eigenschaften.^[5] ^[6] Unter Nutzung eines molekularen Photoschalters, der an ein Polymermaterial gebunden war, war es möglich einen optischen 3D-Datenspeicher herzustellen.^[7] Organische Moleküle können ganz offensichtlich viele Aufgaben eines elektrischen molekularen Schaltkreises übernehmen. Es bleibt jedoch das Problem der räumlichen Auflösung. Während die Bearbeitung von Oberflächen in Dimensionen kleiner als 0.1 μm möglich ist, ist die Positionierung der Schaltkreiselemente zueinander eine Herausforderung.^[8] Hier könnte ein Material die Lösung sein, welches sich bereits als molekularer Draht bewiesen hat: DNA. Aufgrund der effektiven π -Stapelung ist diese leitfähig.^[9] DNA hat ein enormes Potential in Bezug auf ihre Anwendbarkeit für molekular-

lare Schaltkreise, da die Selbstassemblierung aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen sehr gut vorhergesagt werden kann. Dies geht soweit, dass sich DNA-Sequenzen berechnen lassen, mit denen 3D-Strukturen auf Oberflächen mit einer Präzision im Ångströmbereich gebildet werden können.^[10] DNA bietet neben der räumlichen Auflösung noch ein zusätzliches Potential durch vielfältige exakt inkorporierbare Modifikationsmöglichkeiten. Durch Grundlagenforschung müssen dafür Ergebnisse erarbeitet werden, mit denen DNA als valider Werkstoff auf molekularer Ebene etabliert werden kann.

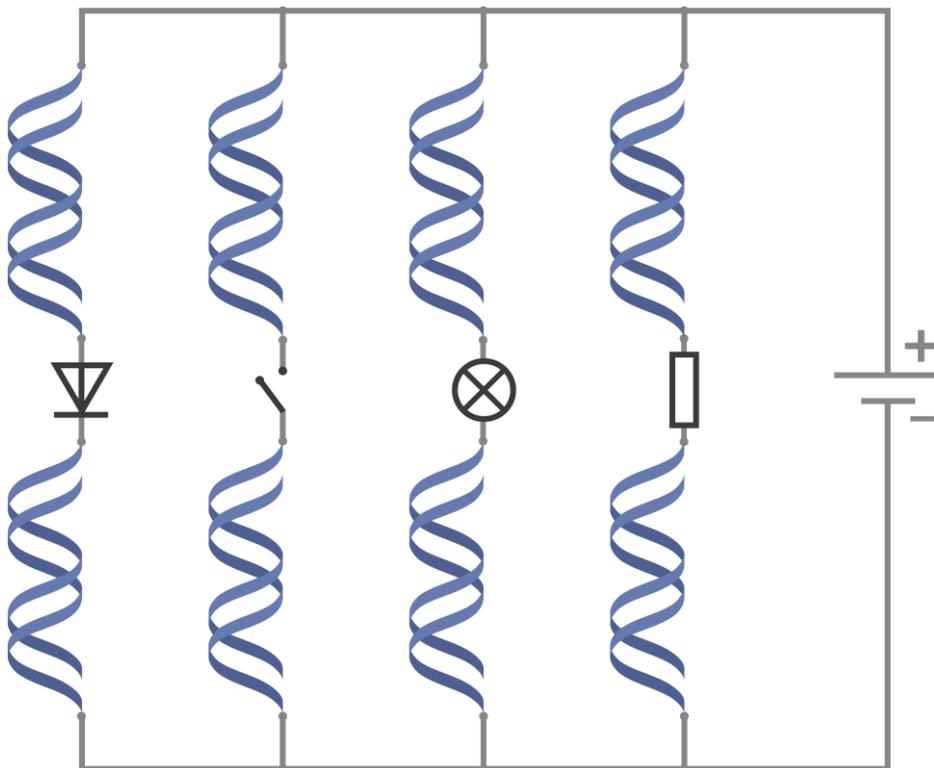


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines molekularen Schaltkreises mit DNA als Schaltelementen.

Themenstellung

In dieser Dissertation sollte die Leitfähigkeit der DNA untersucht und mit Hilfe von inkorporierten Metallionen verbessert werden. Dazu sollte ein Metallkomplex in Form des polykationischen Porphyrins **1** per kupferkatalysierter Alkin-Azid Zykloaddition (engl. *copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*, CuAAC) kovalent an das alkinmodifizierte Cytidinderivat **2** in einer speziell designten Basensequenz angeknüpft werden. Als Alternative sollte das Hydroxychinolin **3** als Basensurrogat per Festphasensynthese in ein Oligonukleotid inkorporiert werden, welches das Metallion während der Hybridisierung als artifizielles Basenpaar komplexiert. Die drei Zielbausteine werden in Abbildung 2 gezeigt.

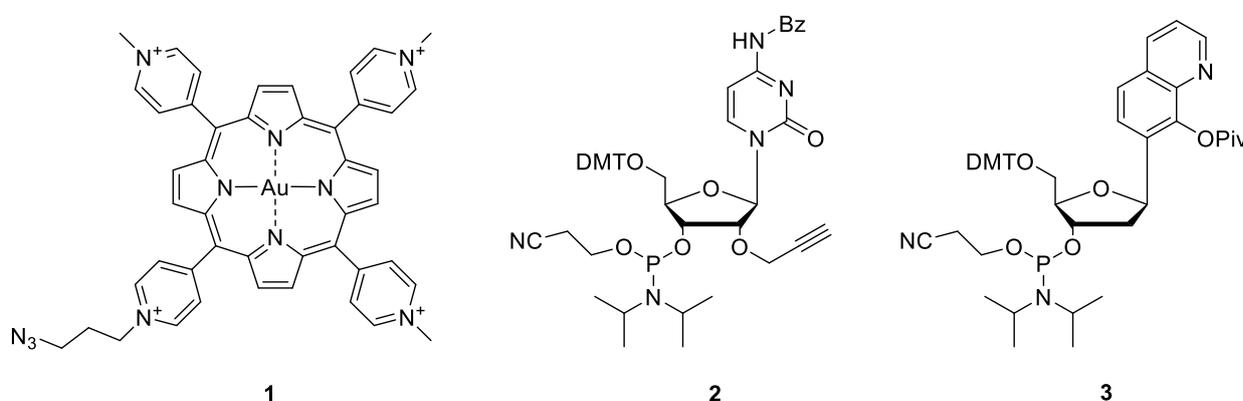


Abbildung 2 Darstellung der Zielmoleküle für die metallionen-vermittelte Leitfähigkeitssteigerung der DNA (von links nach rechts): polykationische Porphyrin **1**, alkin-modifiziertes Cytidinderivat **2** und das Basensurrogat Hydroxychinolin **3**.

Neben den Metallionenmodifikationen sollte eine Thiol-Linkereinheit an beiden Enden des Duplexes eingeführt werden, um mit dem Rastertunnelmikroskop (engl. *scanning tunneling microscope*, STM) über die mechanisch-kontrollierte Bindungsbruch-Methode (engl. *mechanically controlled break junction*, MCBJ) die Leitfähigkeit der modifizierten Duplexe zu bestimmen. Diese Ergebnisse sollten dann mit DNA-Sequenzen, die neben den Thiol-Linkern keine weiteren Modifikationen tragen, verglichen werden, um die Verbesserung durch die Metallionen einschätzen zu können.

Darüber hinaus sollte der Einfluss der Linker-Einheit optimiert und das 2'-Desoxyuridinderivat **4** synthetisiert und mittels Phosphoramiditmethode inkorporiert werden, dargestellt in Abbildung 3. Des Weiteren sollte getestet werden, ob die Nukleobasen selbst zur Kontaktbildung im STM MCBJ geeignet sind.

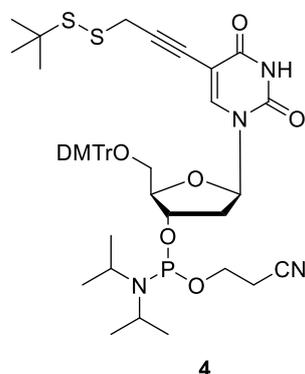


Abbildung 3 Darstellung des Zielmoleküls 2'-Desoxyuridinderivat **4** zur Optimierung der Linkereigenschaften.

Zuletzt sollte ein Photoschalter synthetisiert werden, der über eine CuAAC kovalent an DNA angeknüpft wird. Hierzu wurde Spiropyran **5** in Abbildung 4 ausgewählt, welches über eine lichtgesteuerte Interkalation die Leitfähigkeit der DNA beeinflussen sollte. Die Änderung sollte in STM MCBJ-Experimenten untersucht werden.

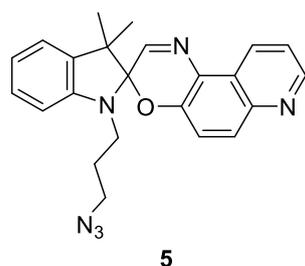


Abbildung 4 Darstellung des Spiropyran **5** zur lichtgesteuerten Interkalation in den Nukleobasensteinapfel.

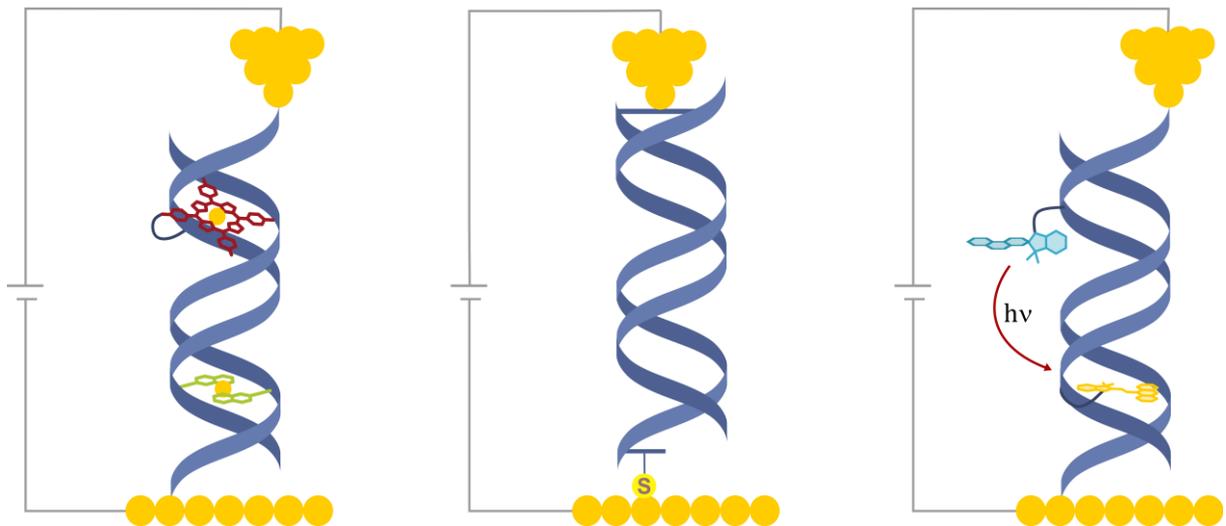


Abbildung 5 Schematische Darstellung der drei verschiedenen Projekte als STM MCBJ-Experiment (von links nach rechts): Leitfähigkeitsverbesserung durch Metallioneninkorporation, Metall-Komplex- (rot) und Basensurrogat-vermittelt (grün); Optimierung der Linkereinheit über Nutzung der Basen oder der modifizierten Base; lichtgesteuerte Interkalation in den Nukleobasenstapel.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. DNA und Modifikationen

2.1.1. Allgemeines

Als Speicher der Erbinformation ist die DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) einer der grundlegenden Bausteine in der belebten Natur. Die Struktur des Biopolymers wurde 1953 von R. Franklin, J. Watson und F. Crick aufgeklärt.^[11] In der Veröffentlichung wurde die DNA als doppelsträngige (engl. *double stranded, ds*) rechtsgängige Helix identifiziert und die Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Guanotin und Cytidin sowie Adenosin mit Thymin etabliert, wie in Abbildung 6 gezeigt.

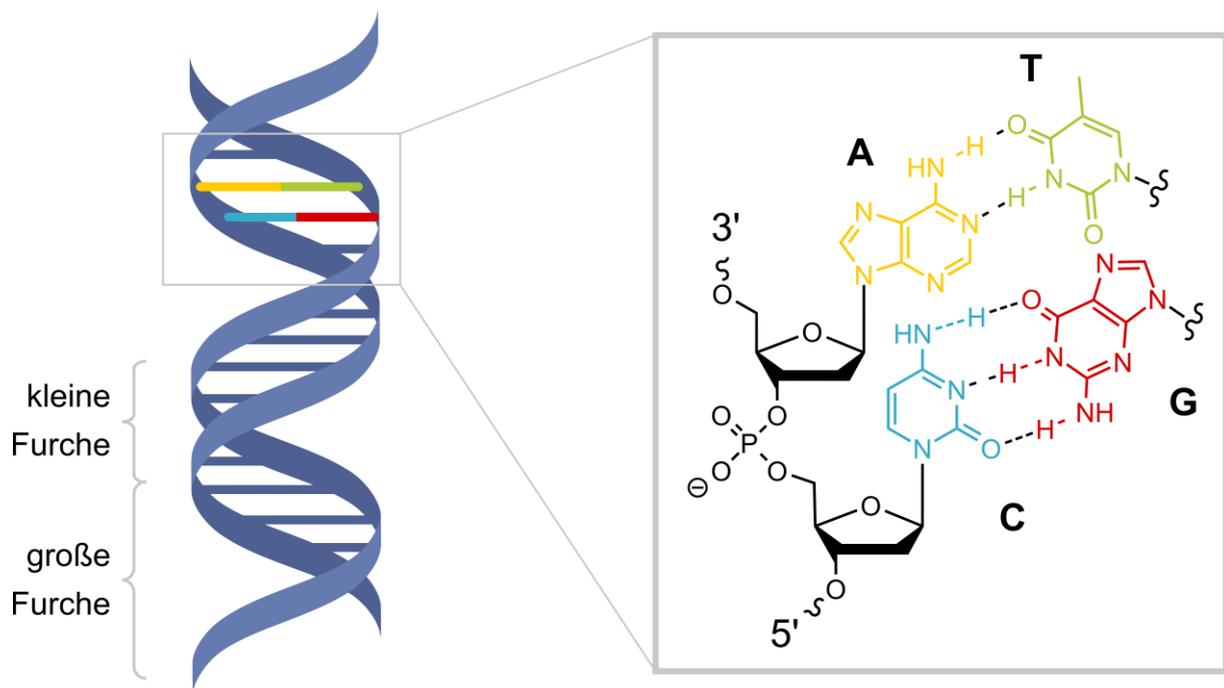


Abbildung 6 Schematische Darstellung eines DNA-Duplexes und der Strukturen der jeweiligen Watson-Crick-Basenpaarungen aus den Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) und den Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C).

Durch die repulsive Coulombwechselwirkung und die C2'-endo-*anti*-Konfiguration des 2'-Desoxyribofuranosid formt die ds-DNA eine rechtsgängige Helix mit einem Durchmesser von

2.00 nm. Eine Windung ist nach zehn Basenpaaren mit einem Anstieg von 3.40 nm abgeschlossen. Durch die Windungen entstehen eine kleine und eine große Furche, an welcher Moleküle, wie beispielsweise die meisten sequenzspezifisch DNA-bindenden Proteindomänen, aber auch Farbstoffe, über eine Anlagerung binden können. Die beschriebenen Eigenschaften sind dabei auf die unter physiologischen Bedingungen typischerweise vorliegende B-Form der ds-DNA bezogen; daneben existieren unter anderem noch die A- und Z-Form.^{[12] [13]}

Die Basenpaarung erfolgt über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, wobei AT-Basenpaare zwei und GC-Paare drei Bindungen ausbilden und so die außergewöhnliche Spezifität der Duplexbildung ermöglichen. Diese Wechselwirkungen sind jedoch nicht die Triebkraft für die Bildung der Helix, dies wird bei der Betrachtung der freien Enthalpie erkennbar. Während GC-Paare mit $\Delta G^{GC} = -0.46$ kJ/mol noch leicht stabilisieren, destabilisieren AT-Paare mit $\Delta G^{AT} = 1.93$ kJ/mol.^{[14] [13]} Der eigentliche Energiegewinn entsteht durch die Basenstapelung, welche durch π,π -Wechselwirkungen der aromatischen Nukleobasen geformt wird. Auch hier stabilisieren GC- ($\Delta_R G^{GC} = -6.20$ kJ/mol) im Mittel mehr als AT-Paare ($\Delta_R G^{AT} = -4.23$ kJ/mol).^{[14] [13]} Durch diese Eigenschaften lässt sich die Struktur der DNA sehr gut vorhersagen, wodurch auch andere geometrische Formen durch Selbstassemblierung der DNA möglich sind. N. Seeman gelang es unter Nutzung definierter Watson-Crick-Basenpaarungen eine Gitterstruktur zu erzeugen.^{[15] [16]} Diese Technik wurde von P. W. K. Rothemund weiterentwickelt, wodurch das Themengebiet der gerüstbasierten DNA-Origami-Technik entstand und den Weg zur DNA-basierten Nanotechnologie ebnete.^[10]

2.1.2. DNA-Modifikationen

Die Festphasensynthese, die durch Caruthers und Letsinger *et al.* entwickelt wurde, ermöglichte erstmals eine effiziente und ökonomische vollsynthetische Darstellung von DNA.^[17] Dadurch können nahezu beliebig modifizierte Nukleosidbausteine eingesetzt werden, solange diese unter den feststehenden Reaktionsbedingungen stabil sind. Das Nukleosid wird häufig als Phosphoramidit eingeführt. Abbildung 7 zeigt dessen Struktur anhand des Phosphoramidits des natürlichen Guanins.

2. Theoretischer Hintergrund

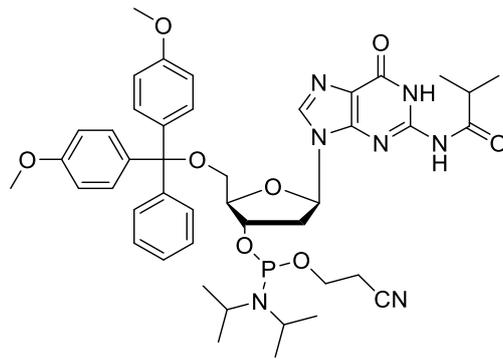


Abbildung 7 Struktur des *N*(2)-isobutyrylgeschützten Guanodin-Phosphoramiditbausteins.

Entscheidend ist, dass alle funktionellen Gruppen, welche nukleophil reagieren könnten, geschützt vorliegen und sich die verwendeten Schutzgruppen unter basischen Bedingungen abspalten lassen. Einzig die 5'-OH-Gruppe ist mit einer säurelabilen Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT) versehen, um eine Sequenz definiert aufzubauen zu können. Der Strang wird dadurch sequenzspezifisch *de-novo* in 3'→5'-Richtung aufgebaut, entgegengesetzt der Richtung der stets semikonservativen DNA-Replikation in biologischen Systemen.^[12]

In Abbildung 8 sind Möglichkeiten für Modifikationen der DNA dargestellt.

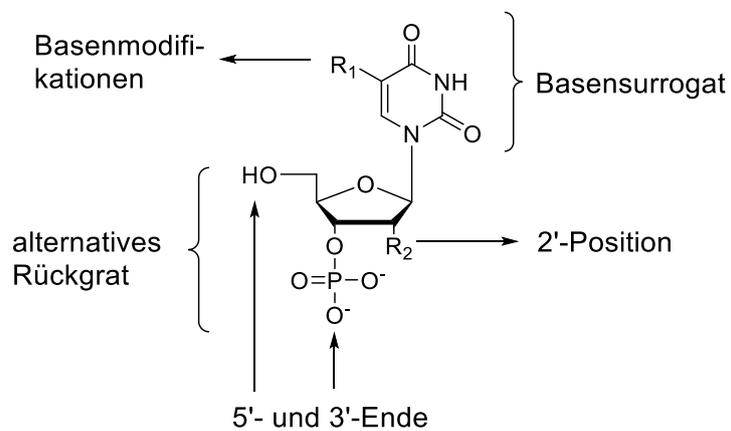


Abbildung 8 Schematische Darstellung verschiedener Modifikationsmöglichkeiten eines Nucleotids.

2. Theoretischer Hintergrund

Die natürlichen Nukleoside können zum Teil an der Base selbst modifiziert werden. So kann 2'-Desoxyuridin kommerziell als 5-Iod-2'-desoxyuridin erhalten werden. Die Iodfunktionalität kann beispielsweise in einer Kreuzkupplung substituiert werden.^[18] Die Purinbasen können als 7-Deaza-Verbindung modifiziert werden, wobei diese Modifikationen keinen Einfluss auf die Basenpaarung haben, da die Modifikation an der gegenüberliegenden Seite der Wasserstoffbrückenbindung eingeführt werden.^[19] Die Modifikationen zeigen dadurch in die Furchenregion. Im Gegensatz dazu können die natürlichen Basen auch über die Aminfunktionalitäten modifiziert werden.^[20] Hierdurch wird jedoch die Wasserstoffbrückenbindung und damit die Basenpaarung massiv gestört.^[21]

Statt der natürlichen Basen können andere aromatische Systeme wie Farbstoffe, Spinsysteme oder Metallliganden verwendet werden. Diese werden als artifizielle Nukleobasen oder auch Basensurrogate bezeichnet. Als Ausgangsmaterial für ein Basensurrogat kann unter anderem ein Glykal verwendet werden, welches in einer Heck-Kupplung mit der gewünschten halogenierten Modifikation umgesetzt wird.^[22] Ein Vorteil bei der Verwendung von Basensurrogaten ist, dass die exakte räumliche Positionierung der DNA-Modifikation innerhalb der Helix gewählt werden kann.

Bei Verwendung eines Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA)-Bausteins ist eine Modifikation über die 2'-OH-Gruppe möglich. Per nukleophiler Substitution kann eine Alkinfunktion eingeführt werden, welche anschließend in einer postsynthetischen CuAAC zum modifizierten Produkt führt.^[23] ^[24] ^[25] Die so integrierte Modifikation kann in den Basenstapel interkalieren, sich entlang der Furchen anordnen oder ohne größere Wechselwirkung mit dem Duplex in den Raum hineinragen. Die Flexibilität eines mit eingeführten Linkers besitzt dabei einen erheblichen Einfluss auf die Position im späteren DNA-Duplex.

Das Rückgrat ist unter anderem für die Form und Stabilität des DNA-Duplexes verantwortlich. Daher sind auch hier Modifikationen von Interesse. Peptid-Nukleinsäure (engl. *peptide nucleic acid*, PNA) verfügt über ein Peptid-Rückgrat statt eines Zucker-Phosphat-Rückgrats. Der Austausch des Zuckers bildet eine weitere Möglichkeit.^[26] Beispielsweise kann ein azyklischer Linker verwendet werden, welcher die Konformation des Ribofuranosids nachahmt.^[27]

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Modifikation kovalent an die 3'- bzw 5'-OH-Gruppe der DNA angeknüpft wird. Auch für diese Anbindung ist die Modifikation deutlich von der Beschaffenheit des Linkers abhängig. Einen guten Überblick über die verschiedenen Modifikationen gibt auch D.H. Apella in seinem Übersichtsartikel.^[28]

Metallionen

Metallionen als DNA-Modifikationen können Eigenschaften wie Leitfähigkeit oder Magnetismus beeinflussen und damit vielfältig genutzt werden. Metallionen können weiterhin von außen durch Licht, elektrochemisches Potential oder Magnetismus manipuliert werden und sind somit für Sensorik oder als Schaltelemente sehr gut geeignet.

Bei der Verwendung von Metallionen besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass diese an das negativ geladene Rückgrat koordinieren und nicht in die DNA interkalieren. Daher werden Liganden mit den oben beschriebenen Methoden als Modifikation eingeführt, um in der Endanwendung einen Metallkomplex innerhalb der Helix zu bilden.

Der erste Metallkomplex, der in Verbindung mit DNA verwendet wurde, wurde von W. Bannwarth und F. Müller publiziert. Ein Ruthenium(III)-Komplex wurde mit dem Farbstoff Lumazin als Hybridisierungssonde verwendet.^[29] Während der Metallkomplex über einen Alkanlinker am Phosphatrückgrat eines Einzelstrangs angebracht wurde, wurde der Farbstoff als Basensurrogat am Gegenstrang eingeführt. Ziel war es, dass nur nach einer erfolgreichen Hybridisierung der Einzelstränge nach Anregung ein Energietransfer vom Farbstoff auf den Metallkomplex erfolgen konnte. Dieser war in der Folge als Fluoreszenz des Ruthenium(III)-Komplexes zu beobachten. Barton *et al.* untersuchten die Leitfähigkeit der DNA an Hand des Elektronentransfers von einem interkaliertem Ruthenium(II)-Komplex auf einen interkalierten Ruthenium(III)-Komplex.^[30] Der photoinduzierte Prozess wurde zeitaufgelöst spektroskopisch untersucht. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Metallionen und DNA erfolgreich im Zusammenspiel miteinander verwendet werden können.

Um Metallionen nicht über Interkalationen oder Komplexe außerhalb des DNA-Duplexes einzubringen, sondern innerhalb der Helix nutzbar zu machen, sind gezielte Modifikationen wie

2. Theoretischer Hintergrund

Basensurrogate notwendig. Deren Verwendung ging hin bis zur Bildung eines monoatomaren Drahts aus Metallionen über die Selbstassemblierung der DNA.^[31]

Dabei wurde eine ausschließlich aus Komplexliganden bestehende Sequenz synthetisiert, welche nur unter dem Einfluss von Metallionen hybridisieren konnte. Da, wie im folgenden Abschnitt 2.3 beschrieben, die DNA selbst interessante Eigenschaften bezüglich des Transfers von Ladung oder Energie besitzt, wäre die gemeinschaftliche Nutzung von DNA mit Metallionen zusammen erstrebenswert. Wagenknecht *et al.* inkorporierten mehrere Hydroxychinoline in eine DNA-Sequenz, welche bei der Hybridisierung Kupfer(II)-Ionen komplexierten, und konnten dadurch die Elektronentransferrate gegenüber der natürlichen Basenpaarung deutlich erhöhen.^[32] Es wurde nachgewiesen, dass hierbei nicht jeder Komplex ein Metallion trägt.^[33] Die Basensurrogate können dabei auch mehr als ein Metallion binden. Obika *et al.* verwendeten ein 1,3,9-Triaza-2-oxophenoxazin, um drei Silber(I)-Ionen zu binden.^[34] Die Interaktionen zwischen Basensurrogaten kann nicht nur zur Ausbildung einer Helix verwendet werden, sondern auch zu einer 3-Wege-Bindung (engl. *three-way-junction*) genutzt werden, um mehrdimensionale Objekte zu bilden.^[35] Auch eines der bekanntesten Motive der G-Quadruplex wurde metallionen-vermittelt gebildet und konnten so eine artifizielle Peroxidase formen.^[36]

Einen bereits gebildeten Metallkomplex als Modifikation zu verwenden, kann Vorteilhaft sein. Ein sehr gutes Beispiel dafür stellen Porphyrine dar, welche in Abbildung 9 dargestellt sind.

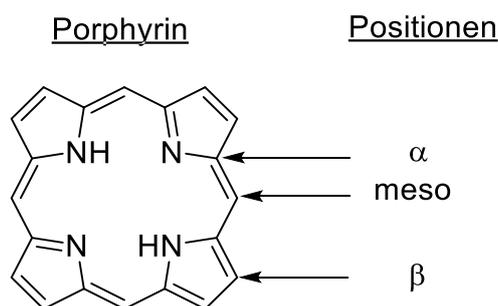


Abbildung 9 Darstellung des Porphyrinkerns mit Nomenklatur der Positionen im Zyklus.

Diese können über jede der weiter oben erwähnten Modifikationsmöglichkeit in die DNA eingeführt werden. Durch die Tendenz der polykationischen Porphyrine in DNA zu interkalieren,

wird eine verlässliche Inkorporation des Metallions garantiert.^[37] Viele Metalle können einen sehr stabilen Komplex mit Porphyrinen bilden. Die Stabilität wird durch die Vierfachkoordination bewirkt.^[38] Hierdurch sind für Metalle, wie Eisen, eine Oxidation und Reduktion möglich, ohne dabei den Komplex zu zerstören. Das Eisen wechselt dabei lediglich die Oxidationstufe sowie die Koordination.^[38] Weiterhin können die Porphyrine für Interaktionen mit Licht genutzt werden, wie es in der Natur in Form des Chlorophylls zu beobachten ist.^[38] Der Zugang zu funktionalisierten Derivaten ist über die sogenannte *meso*-Positionen gegeben, wodurch beispielsweise der Einbau in DNA in vielfältiger Weise möglich ist.^[39]

Photoschalter

Da Metallionen in erster Linie zur Verbesserung des Energie- bzw. Ladungstransfers verwendet werden, wären weitere DNA-Modifikationen, welche von außen manipuliert werden können, erstrebenswert. Daher wäre eine photoresponsive DNA eine sinnvolle Erweiterung im Sinne der Sensorik. Im Zusammenhang von DNA mit Metallionen wurde bereits mehrfach Licht verwendet. Das Licht induziert hierbei einen Ein-Elektronen-Transfer (engl. *single electron transfer*, SET), der analysiert wurde. Stattdessen könnte das Licht aber genutzt werden, um eine stabile bzw. metastabile Veränderung der DNA zu bewirken. Zu diesem Zweck wären Photoschalter ein geeignetes Mittel. Photoschalter führen photoinduziert eine strukturelle Änderung durch. Diese Änderung ist reversibel und die Relaxation aus diesem Zustand kann sowohl durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge als auch thermisch erfolgen. Eine der möglichen Transformationen ist die E/Z-Isomerisierung. Die Photoschalter, die diese strukturelle Änderung durch Bestrahlung mit UV-Licht eingehen, werden in drei Substanzklassen unterteilt: Azobenzole und Stilbene. Abbildung 10 zeigt ausgewählte Beispiele dieser Klassen.^[40]

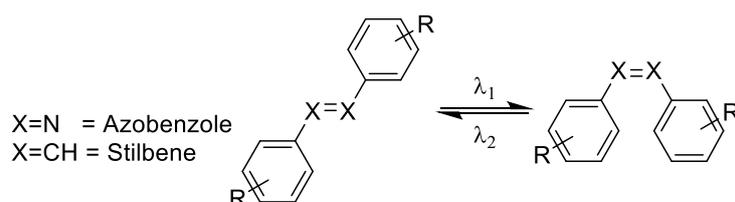


Abbildung 10 Schematische Darstellung der E/Z-Isomerisierung ausgewählter Photoschalter.

2. Theoretischer Hintergrund

Eine weitere mögliche strukturelle Änderung ist die photoinduzierte Elektrozyklisierung. Thiophenfulgide und Diarylethene, wie in Abbildung 11 dargestellt, stellen Vertreter dieser Photochrome dar.^[40]

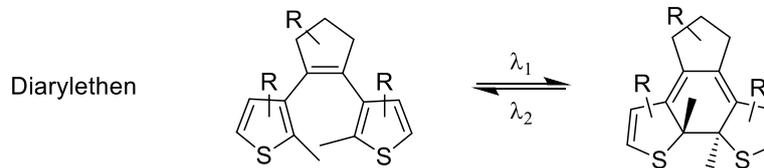


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Elektrozyklisierung eines Diarylethens.

Nicht nur die Zyklisierung kann das aromatische System erweitern, auch der Bindungsbruch einer Zykloreversion kann das konjugierte System vergrößern. Dieser Effekt wird bei der Klasse der Spiropyrane genutzt. Spiroverbindungen zeichnen sich dadurch aus, dass zwei zyklische Verbindungen über genau ein Kohlenstoffatom miteinander verbunden sind. Hierdurch stehen beide Ringe verdrillt zueinander. Durch eine heterolytische Bindungsspaltung am Spiro-Kohlenstoff planarisiert das Molekül und bildet, wie in Abbildung 12 illustriert, im Fall von Spiropyranen ein konjugiertes System aus.

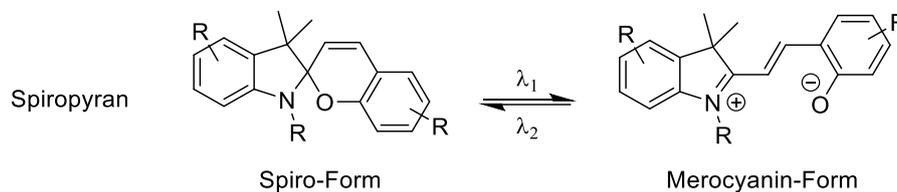


Abbildung 12 Schematische Darstellung einer Elektrozykloreversion des Spiropyrans.

Die geschlossene Form wird als Spiro-Form bezeichnet, weist in der Regel nur eine geringe Polarität auf und absorbiert im UV-Bereich. Durch den oben angesprochenen Bindungsbruch wird die offene Merocyanin-Form gebildet. Diese kann als Zwitterion vorliegen und ist daher relativ polar. Durch die Konjugation des Indols mit dem gegenüberliegenden aromatischen System absorbiert die Merocyanin-Form im sichtbaren bis infraroten Bereich. Sowohl das Öffnen als auch das Schließen des Spiropyrans kann thermisch erfolgen.^[40]

Die Anknüpfung der Photoschalter an DNA ist, ähnlich wie bei den Porphyrinen, auf vielfältige Art und Weise möglich. Die erste Anwendung geht auf Letsinger und Wu zurück. Sie verknüpften über ein Stilbenderivat eine kurze poly-A- mit einer poly-T-Sequenz.^[41] Wenn das Stilben in der *trans*-Konfiguration vorlag, bildete die ss-DNA (Einzelsträngige DNA, engl. *single-stranded DNA*) eine Haarnadelstruktur aus, sodass Duplexe und Triplexen gebildet wurden. Diese waren so stark stabilisiert, dass Schmelztemperaturen von über $T_m \geq 80$ °C erreicht werden konnten. In der *cis*-Konfiguration stört die Geometrie des Photoschalters die Stapelung der darunterliegenden Nukleobasen und führt so zu einer Destabilisierung der Helix. Weiterhin wurde beobachtet, dass das Schaltverhalten von den benachbarten Basen beeinflusst wurde. So hinderte ein GC-Paar in direkter Nachbarschaft das Stilben an der E/Z-Isomerisierung. Eine Erklärung könnte sein, dass ein Energieübertrag nach der Anregung des Photoschalters auf das GC-Paar stattfand. Ein Hinweis dafür könnte sein, dass das Schaltverhalten bei einer nicht-kanonischen GG-Basenpaarung erhalten bleibt.^[42]

Generell wurden Photoschalter eingesetzt, um die Hybridisierung räumlich- und zeitaufgelöst steuern und analysieren zu können. So konnte durch eine Thiophosphatmodifikation des DNA-Rückgrats gezielt ein Azobenzol eingeführt werden. Hierdurch gelang es, die Stabilität des Duplexes durch die Isomerisierung des Photoschalters in die Z-Konfiguration um $\Delta T_m = -7$ °C zu senken.^[43] Ähnliche Versuche wurden mit DNA/RNA-Hybriden durchgeführt, wobei durch das Schaltverhalten die zeitaufgelöste Freisetzung von RNA ermöglicht wurde.^[44] Neben zusätzlich eingeführten Photoschaltern können die Nukleobasen selbst zu Photoschaltern erweitert werden. Dazu wurden von Jäschke *et al.* 2-Desoxyuridin und 7-Deaza-2-desoxyadenosin zu Diarylethenen erweitert und untersucht.^{[45] [46]} Ausgehend von den Purinbasen können Stilbenderivate synthetisiert werden. Bei Vorliegen der Z-Konfiguration des Photoschalters wurde eine Destabilisierung des Duplexes um $\Delta T_m = -7.9$ °C beobachtet. Dieser Effekt wurde auf die veränderte Konformation der Nukleobase von *anti* zu *syn* relativ zum Zucker zurückgeführt. Infolgedessen war die Bildung des Duplexes gehindert.^[47] In Form von Basensurrogaten konnten Enzyme wie T7 Pol I oder die RNaseH in ihrer Aktivität blockiert werden, indem ein sogenannter Antisense-Strang mit einer Zielsequenz hybridisiert wurde. Durch Bestrahlung mit anschließender Isomerisierung der verwendeten Azobenzole konnte die Zielsequenz freigesetzt und durch die Enzyme prozessiert werden.^{[48][49]}

2.2. Rastertunnelmikroskopie und ihre Anwendung

Der Effekt, welcher zur Bestimmung der elektronischen Eigenschaften eines einzelnen Moleküls genutzt wird, ist der quantenmechanische Tunneleffekt. Dieser beschreibt den Vorgang, in dem ein Teilchen eine Potentialbarriere von endlicher Höhe passiert, obwohl das Teilchen nicht über die nötige Energie verfügt, um die Barriere klassisch zu durchdringen. Unter bestimmten Voraussetzungen, wie einer sehr kleinen Masse, ist der Tunneleffekt in der Quantenmechanik zu beobachten. Elektronen können zwischen zwei Elektroden durch ein Vakuum tunneln. Sobald eine ausreichend hohe Vorspannung U_B (engl. *bias*) zwischen den Elektroden angelegt wird, wird aus dem ungerichteten Tunneln ein Elektronenfluss, der als Tunnelstrom I_T gemessen werden kann. Dieser Effekt wird in STM-Messungen genutzt. Hierzu werden eine Metallspitze und eine Metallprobe bis auf wenige Å angenähert, dabei wird der Tunnelstrom I_T bei einem bestimmten *Bias* U_B gemessen. Der Tunnelstrom kann durch die Störungstheorie erster Ordnung und unter den Annahmen von geringer Spannung und Temperatur, wie in Gleichung 1 gezeigt, beschrieben werden.^[50]

$$I_T = \frac{4\pi^2 e}{h} \sum_{S,P} [f(E_S) - f(E_P)] |M_{S,P}|^2 \delta(E_S - E_P) \quad \text{Gleichung 1}$$

Gleichung 1 beschreibt den Tunnelstrom I_T in Abhängigkeit von der Elementarladung e , dem Planck'schen Wirkungsquantum h , der jeweiligen Fermi-Dirac-Verteilungsfunktion der Wellenfunktion an der Spitze $f(E_S)$ und der Probe $f(E_P)$, dem Tunnelmatrixelement $|M_{S,P}|$, welches die Übergangswahrscheinlichkeit eines Elektrons von der Spitze zur Probe und der Delta-Funktion δ wiedergibt.^{[51] [52] [53]}

Dabei ist der quantenmechanische Tunneleffekt nicht nur auf das Vakuum als Barriere reduziert, sondern wird auch bei Molekülen beobachtet, die zwischen Spitze und Probe eine quasi leitende Verbrückung bilden, eine sogenannte Metall-Molekül-Metall Bindung (engl. *metal-molecule-metal junction*, MBM junction).

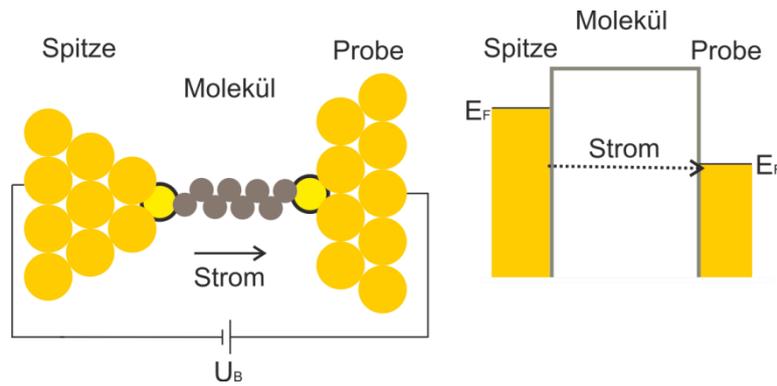


Abbildung 13 Schematische Ansicht einer MBM Junction (links) und schematische Potentialansicht (rechts).

Abbildung 13 zeigt schematisch die Anordnung einer MBM junction und der dazugehörigen schematischen Potentialansicht. Für den Fall kann der Tunnelstrom I_T in Abhängigkeit von dem Bias U_B mit der Simmons Näherung beschrieben werden, siehe Gleichung 2.^[54] In der Simmons Näherung wird von einer rechteckigen Potentialbarriere ausgegangen. Eine Veränderung des Bias führt zu einer Verzerrung der Potentialbarriere, zu sehen in Abbildung 14 a) – c), und der Tunnelprozess verläuft durch eine verzerrte Barriere.

$$I_T = \frac{eA}{2\pi\hbar d^2} \left\{ \left(\Phi - \frac{eU_B}{2} \right) \exp \left(-\frac{4\pi d \sqrt{2m_e}}{\hbar} \sqrt{\Phi - \frac{eU_B}{2}} \right) - \left(\Phi + \frac{eU_B}{2} \right) \exp \left(-\frac{4\pi d \sqrt{2m_e}}{\hbar} \sqrt{\Phi + \frac{eU_B}{2}} \right) \right\}$$

Gleichung 2

In Gleichung 2 entspricht A der Bindungsfläche, d der Barrierenbreite, m_e der effektiven Elektronenmasse, Φ der Barrierenhöhe und e der Elementarladung. Die Barrierenbreite d ist in diesem Fall mit der Moleküllänge gleich zu setzen. Die Barrierenhöhe Φ kann als energetischer Unterschied zwischen dem Fermi-Niveau der Elektrode und dem energetisch ähnlichsten Molekülorbital genähert werden. Damit ist sowohl die Lochleitung durch das höchste besetzte Molekülorbital (engl. *highest occupied molecular orbital*, HOMO), als auch die Elektronenleitung durch das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) möglich. Durch den angelegten Bias U_B kann das Energieniveau der Elektrode angehoben oder abgesenkt werden. Dies führt zu einer Veränderung der Barrierenform und damit zu einer Veränderung des Transportprozesses und kann durch das Simmons Modell, wie in Abbildung 14 gezeigt, beschrieben werden.^[55]

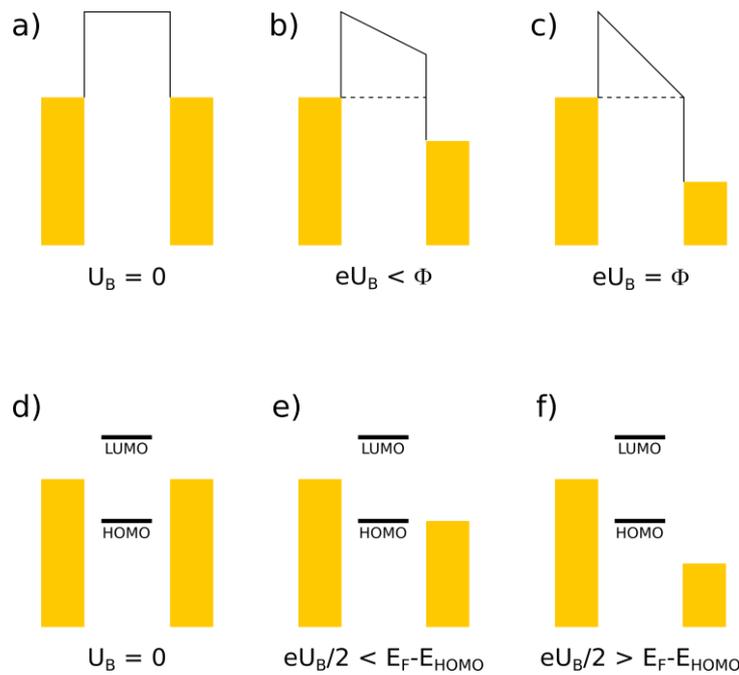


Abbildung 14 Schematische Darstellung des Simmons Modells für das Tunneln bei verschiedenen *Bias* U_B .

Abbildung 14 zeigt drei verschiedene Transportprozesse mit jeweiligem *Bias* U_B , wobei ausschließlich die Transportprozesse für Elektronen gezeigt werden. a)-c) zeigen die Veränderungen der Barrierenformen. In a) wird bei einem *Bias* von $U_B = 0$ V die Barriere als rechteckig angenommen. Durch eine Erhöhung des *Bias* U_B wird in b) die Barriere gekippt und somit trapezoidal. In beiden Fällen wird direktes Tunneln als Transportprozess angenommen. In c) entspricht der angelegte *Bias* U_B der Potentialhöhe und das Potential wird triangular. Das direkte Tunneln geht bei $eU_B = \Phi$ vom direkten Tunneln in die Feldemission über, auch Fowler-Nordheim-Tunneln genannt. In Abbildung 14 entsprechen d)-f) dem resonanten Tunnelmodell. Dabei ist zu beachten, dass aus der Barrierenhöhe Φ die effektive Barrierenhöhe $\Phi_{\text{eff}} = E_F - E_{\text{LUMO}}$ wird. Von d) zu e) wird der *Bias* U_B erhöht und die Elektronen tunneln direkt zwischen den Elektroden durch das Molekül. In f) ist im Vergleich zu c) das resonante Tunneln ein möglicher Transportprozess, da ein Energiezustand des Moleküls zwischen den Fermi-Energien der Elektroden liegt.^[55]

Das Modell nach Simmons wurde so erweitert, dass ein Molekül als Serie von Kontakten behandelt wird, das sogenannte Multibarrientunneln. Das Molekül wird nicht als homogene

Tunnelbarriere angenommen, sondern in homogene Bereich unterteilt und jeder Übergang dieser Bereiche innerhalb eines Moleküls einzeln betrachtet, z.B. von Alkanketten auf π -Systeme. So können die theoretische Beschreibung bzw. Berechnung des Systems präzisiert werden.^[56]

Durch die Anwendung des oben beschriebenen Tunneleffektes kann nun unter bestimmten Bedingungen Einzelmolekülspektroskopie durchgeführt werden. Hierfür werden STMs oder leitfähige Rasterkraftmikroskope (engl. *atomic force microscopes*, AFMs) genutzt, indem diese mechanische *Break-Junction*-Messungen (engl. *mechanically controlled break junction*, MCBJ) produzieren. Bei einer MCBJ Messung wird mechanisch kontinuierlich der Abstand zwischen zwei Elektroden verändert, bis ein einzelnes Molekül in diese Lücke zwischen den Elektroden migriert und auf diese Weise einen leitenden Kontakt herstellt. Sobald dies der Falls ist, kann das Molekül spektroskopiert werden. Die Umsetzung der MCBJ Methode ist mit einem STM möglich. Dabei wird die Spitze des STMs der Probenoberfläche bis auf wenige Ångström und teilweise sogar bis zum physischen Kontakt der Spitze mit der Oberfläche angenähert. Danach wird die Spitze zurückgezogen. Bei einem passenden Abstand kann ein Molekül den Kontakt zwischen Oberfläche und Spitze bilden und so eine Leitfähigkeit herstellen, die sich vom Tunneln durch den Raum unterscheidet. Nach weiterer Entfernung der Spitze bricht der Kontakt ab. Falls die Spitze zu Beginn des Zurückziehens einen Metall-Metall-Kontakt, beispielsweise Gold-Gold, gebildet hat, würde die erste messbare Leitfähigkeit durch diesen Kontakt entstehen. Dieser kann als Referenzpunkt für abstandsabhängige Messungen genutzt werden.

Alternativ steht dazu noch ein weiterer Messmodus zur Verfügung, bei dem die Spitze bei einem bestimmten Abstand relativ zur Oberfläche, gehalten wird. Dafür wird die Regelung in z-Richtung deaktiviert (engl. *gating*) und der Strom kontinuierlich gemessen. Solange keine laterale Bewegung vorhanden ist, sollte der Strom bei einem konstanten Wert bleiben. Abweichungen würden nur dann eintreten, falls ein Molekül einen leitenden Kontakt herstellt. Dies würde bei einem aufgezeichneten Zeit-Strom-Diagramm als weiteres Niveau sichtbar werden.

2.3. Untersuchungen von Leitfähigkeit der DNA

Die Frage nach dem Leitfähigkeitsverhalten von DNA war bis in die frühen 2000er Jahre ein kontroverses und viel umstrittenes Thema. Die Interpretation der Resultate reichte dabei von Isolator^[57], über Halbleiter^[58], Leiter^[9] bis hin zum Supraleiter.^[59] Die ersten Untersuchungen wurden bereits 1963 von Eley *et al.* durchgeführt, wobei das beobachtete Verhalten als Halbleiter interpretiert wurde.^[60] Die Leitfähigkeit wurde schon damals auf die ausgeprägte π,π -Wechselwirkung zwischen den Nukleobasen zurückgeführt.^[61]

Neben der Debatte um die generelle Fähigkeit der DNA, Ladungen zu transportieren, wurde auch der Mechanismus vielfach diskutiert. Grundsätzlich gesehen kann die Leitfähigkeit durch zwei Modelle beschrieben werden: inkohärentes Tunneln oder kohärenter Hüpf-Mechanismus (engl. *hopping*).^[62] ^[63] ^[64]

Beim inkohärenten Tunneln wird das Elektron durch die besetzten Zustände geleitet. Im Falle von organischen Molekülen wie der DNA entspricht dies dem HOMO.^[65]

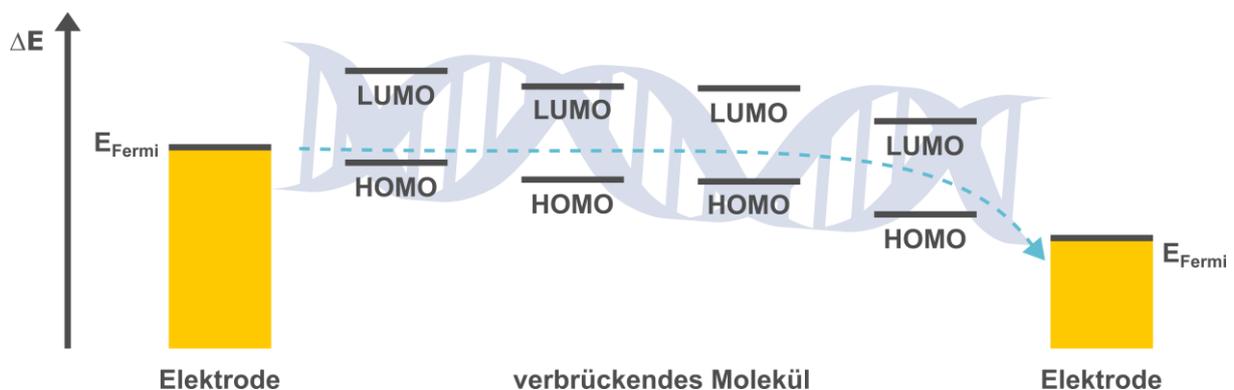


Abbildung 15 Vereinfachte schematische Darstellung des Tunnelprozesses in einem verbrückenden DNA-Molekül zwischen zwei Elektroden.

In Abbildung 15 ist die schematische Darstellung des Tunnelprozesses zu sehen. Hierbei bildet ein Molekül, hier ds-DNA, einen verbrückenden Kontakt zwischen zwei Elektroden. Insbesondere die äußeren Molekülorbitale werden durch das Feld der Elektroden beeinflusst und entsprechend angehoben, beziehungsweise abgesenkt.

Hingegen wird beim kohärenten *Hopping* das unbesetzte LUMO genutzt. Diese Zustände sind im Gegensatz zum inkohärenten Tunneln spektroskopisch nachweisbar, da das Elektron in einem entsprechenden Zustand lokalisierbar ist.^{[66] [67]}

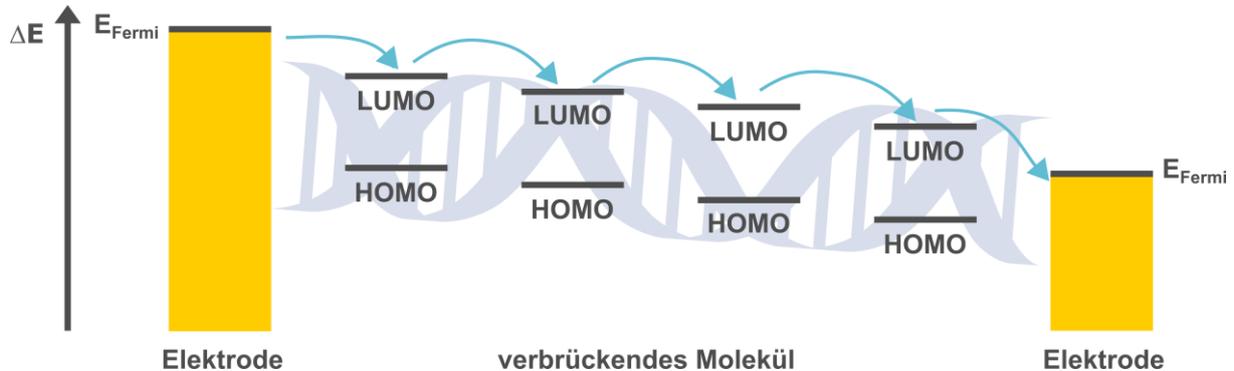


Abbildung 16 Vereinfachte schematische Darstellung des *Hopping* Mechanismus in einem verbrückenden DNA-Molekül zwischen zwei Elektroden.

Eine der ersten Methoden zur Untersuchung der Leitfähigkeit bestand im SET durch einen DNA-Duplex. Hierzu wurden sowohl ein Donor- als auch ein Akzeptorfarbstoff kovalent in die DNA eingebracht. Nachdem der Donorfarbstoff durch Bestrahlung angeregt wurde, wurde ein Elektron durch die DNA auf den Akzeptorfarbstoff übertragen und die Fluoreszenz des Akzeptors beobachtet.^[29] Eine gute Übersicht über die Messbedingungen und die Ergebnisse bieten die Übersichtsartikel von Barton^[68] und Treadway.^[69]

Ein Nachteil dieser Analytik ist, dass sich einzelne Elektronen anders verhalten können als ein Strom aus Elektronen. Als Weiterentwicklung dieser Methode wurde die DNA für den Ladungstransfer auf einer leitfähigen Oberfläche immobilisiert und der Ladungstransfer durch Licht oder eine Potentialveränderung induziert.^{[70] [71] [72] [73]} Dabei konnten von Barton *et al.* eine Distanz von 34 nm überwunden werden.^[74]

Um die Nutzbarkeit von DNA als Werkstoff für Computerchips oder Sensortechnik voranzutreiben, muss ihr Verhalten unter elektrischen Strömen weiter intensiv erforscht werden. Nanospalten zwischen Metallen oder lithographisch gespaltene Kohlenstoff-Nanoröhren haben sich als wirksame Analysewerkzeuge erwiesen.^{[75] [76] [77] [78] [58] [59]} Diese Techniken konnten um MCBJ Messungen erweitert werden.^{[58] [79] [80] [81]} Der Spalt zwischen den Elektroden kann mit einem piezoelektrischen Element auf eine Genauigkeit von wenigen Ångström

eingestellt werden. Mit diesen analytischen Methoden kann DNA als Schaltelement unter den verschiedensten Bedingungen beobachtet werden. Gleichermaßen lassen sich verschiedene Charakteristika der DNA untersuchen, wie z.B. Widerstand, Stabilität oder Diodenverhalten.

MCBJ Messungen können mit einem STM oder leitfähigen AFM durchgeführt werden. Sie können in Lösung eingesetzt werden und weisen daher eine Reihe von Vorteilen gegenüber Techniken auf, die im Hochvakuum durchgeführt werden. So können Oligonukleotide unter nahezu physiologischen Bedingungen gemessen werden, wodurch die in Kapitel 2.1. beschriebenen Eigenschaften erhalten bleiben. Erste Versuche mit dem STM an DNA reduzierten sich jedoch auf die Abbildung von Oligonukleotiden.^[82] Die anfängliche Intention hinter der Nutzung von STM und AFM bestand in der Sequenzierung und Erkennung von DNA-Schäden. Zu diesen zählen ein Einzelstrangbruch in einem DNA-Duplex (engl. *nicked DNA*), die Methylierung von Cytosin oder Basenfehlpaarung.^{[83] [84] [85] [86] [87]} Für die Sequenzierung wurden zuvor meist Nanolücken hergestellt, durch die DNA als Einzelstrang migrierte. Während dieses Prozesses wurde der Strom kontinuierlich gemessen und so die Sequenz anhand ihrer elektronischen Singnatur identifiziert.^{[88] [89] [90]} Ein STM kann ebenfalls eine solche Nanolücke erzeugen und per Einzelmolekül-Spektroskopie (engl. *scanning tunneling spectroscopy*, STS) untersucht werden. Wenn ein Molekül einen leitenden Kontakt zwischen Spitze und Oberfläche herstellt, wird die Spitze angehalten und spannungsabhängig der Stromfluss beobachtet. Dies entspricht einer Einzelmolekül-Cyclovoltammetrie. Dazu wurde unmodifizierte^[91] sowie mit Fulleren funktionalisierte^[92] DNA auf einer Goldoberfläche assembliert und entlang des Duplex vermessen. Ähnlich zu den Nanolücken wurde dabei die elektronische Signatur zur Sequenzierung verwendet. Um eine definierte Umgebung und Orientierung zur Sequenzierung zu schaffen, wurde eine Goldoberfläche mit 2-Aminoethanthiol beschichtet. Unter den Messbedingungen lag die Aminfunktion protoniert vor. Durch die Coulombwechselwirkung der positiv geladenen Ammoniumgruppe und der negativ geladenen Phosphatgruppe der DNA wurde eine Anlagerung ermöglicht. Die so assemblierte einzelsträngige DNA konnte untersucht und sequenziert werden.^[93]

Obwohl die physiologischen Bedingungen die Vorhersage bezüglich Form und Eigenschaften der DNA ermöglichen, bleibt die Untersuchung der DNA eine Herausforderung. DNA, molekular betrachtet, verfügt über eine hohe Flexibilität. Dies führt zu einer breiten Verteilung der

Messwerte, die ein Molekül während einer MCBJ Messung annehmen kann.^[94] Dieses Verhalten wurde schon in einer der ersten *in situ* Messung von Tao *et al.* beobachtet.^[95] Zalinge *et al.* untersuchten ss-DNA von Homooligonukleotiden und ds-DNA. Die Resultate deuteten auf eine komplexere Leitfähigkeits-Distanz-Beziehungen für die ss-DNA als für die ds-DNA hin.^[96] ss-DNA wies eine grundsätzlich geringere Leitfähigkeit auf.^[97] Die Flexibilität der DNA lässt sich durch die Wahl des Probenmediums manipulieren, wobei die Salzkonzentration und –zusammensetzung die thermische Stabilität erheblich beeinflussen.^[98] Daher wurde die mögliche Einflussnahme des Messmediums auf die DNA untersucht. In STM MCBJ Studien wurde der Einfluss der Gegenionen auf die Flexibilität bestimmt und als wenig relevant interpretiert.^[95] Welche Rolle die Gegenionen beim Ladungstransport einnehmen, ist Teil von Simulationen und ist noch nicht exakt geklärt.^[99] [45]

Zu beachten ist, dass eine erhöhte Salzkonzentration das Messfenster in Form von Leckstrom erheblich limitieren kann. Das Salz in der Messumgebung kann durchaus Einfluss auf das Leitfähigkeitsverhalten der DNA nehmen. Bei einer ausreichend hohen Salzkonzentration verändert die DNA ihre Form von der unter physiologischen Bedingungen vorliegenden B-Form zur Z-Form. In den Leitfähigkeitsmessungen zeigte die Z-Form eine um zwei Größenordnungen geringere Leitfähigkeit. In einer Studie wurde konnte durch eine kontinuierliche Erhöhung der Salzkonzentration diese Transformation erreicht und verfolgt werden.^[100] In einem ähnlichen Experiment wurde die Überführung der DNA von der A- zur B-Form beobachtet, indem der Ethanolgehalt in Wasser-Ethanol-Gemischen immer weiter erhöht wurde. Für die A-Form wurde eine zehnfach höhere Leitfähigkeit gemessen.^[101] Dass die Form maßgebend für die Eigenschaften der DNA beteiligt ist, wurde durch Versuche im Ultrahochvakuum verdeutlicht. Unter diesen Umständen konnten lediglich Halbleitereigenschaften beobachtet werden. Dies wird bei der Überlegung deutlich, dass die Basenstapelung und deren Effektivität sich mit der Form der DNA ändert.^[102] [103] In einem anderen Experiment wurde versucht, den Einfluss des wässrigen Mediums auf die DNA zu minimieren, um eine definiertere Leitfähigkeit zu messen. Dazu wurde die DNA in einer Pufferlösung auf die Goldoberfläche aufgebracht und die nicht chemisorbierte DNA sowie die Puffersalze mit ddH₂O (doppelt deionisiertes Wasser) heruntergespült. Die auf diese Weise präparierte Probe wurde zum einen an Luft gemessen und zum

anderen vor der Messung mit n-Decan überschichtet. In Lösung wurde eine geringere Barrierrhöhe im Vergleich zur Messung an Luft festgestellt und auf diese Weise eine deutliche Umgebungsabhängigkeit gezeigt werden.^[104]

Die Temperatur ist ein zusätzlicher Aspekt, der die Stabilität der DNA stark beeinflusst. Sie hat nicht nur über das Schmelzverhalten einen direkten Einfluss auf die DNA, sondern auch auf den möglicherweise thermisch induzierten *Hopping*-Mechanismus. Infolgedessen wurden einige Experimente durchgeführt, die jedoch zeigten, dass die Temperatur bei ausreichender Stabilität der DNA-Helix nahezu keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit ausübt.^{[105] [67] [106]} Folgerichtig spielt die Sequenz der DNA eine erhebliche Rolle. Neben der höheren Gesamtstabilität der DNA bewirkt ein hoher GC-Anteil in der Sequenz eine deutlich bessere Leitfähigkeit. Die Beziehung der Leitfähigkeitsabnahme pro GC-Paar wurde als reziprok zur Länge gemessen, während die Leitfähigkeit durch AT-Paare exponentiell abnimmt.^[107]

Die Entwicklung des Themengebietes zeigt, dass viele Umgebungsparameter Einfluss auf die Effektivität der Stapelung nehmen, wodurch das Verhalten der Oligonukleotide manipulierbar ist. Hieraus wird ersichtlich, warum die frühen Untersuchungen in ihren Ergebnissen so deutlich variierten.

Um darüber hinaus DNA-Eigenschaften zu modulieren, wurden neben den natürlichen Basen auch Basensurrogate eingesetzt. Tao *et al.* nutzten beispielsweise ein Anthrachinon, das als redoxaktives Molekül über eine elektrochemische Potentialkontrolle zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand geschaltet werden kann. In dem elektrochemischen Fenster, in dem DNA stabil ist, ist lediglich eine geringe Potentialabhängigkeit zu beobachten.^[105] Über die Anthrachinon-Modifikation konnte reversibel zwischen zwei Leitfähigkeiten geschaltet werden. Lag das Anthrachinon oxidiert vor, wurde eine geringere Leitfähigkeit als in der reduzierten Form gemessen.^[108]

Das Rückgrat stellt eine zusätzliche Möglichkeit für Modifikationen an Oligonukleotiden dar. Eine naheliegende Variation ist RNA. Hybride aus DNA und RNA wurden untersucht, um den Einfluss der veränderten Form des Duplexes zu untersuchen. Die Leitfähigkeit des RNA/DNA-Duplex war höher als der vergleichbare DNA-Homoduplex, jedoch zeigt der Heteroduplex eine

stärkere Zunahme des Widerstands pro zusätzlicher Base.^{[109] [110]} Neben den klassischen Zucker-Phosphat-Rückgraten der DNA und RNA können hier z.B. auch artifizielle Rückgrate eingesetzt werden. PNA verfügt über ein deutlich starreres Rückgrat. Hierdurch ist eine effektivere Stapelung der Basen möglich und konnte in STM MCBJ Messungen in Form einer höheren Leitfähigkeit beobachtet werden.^{[111] [112]} Für diese Experimente wurde ein DNA-Homoduplex, Heteroduplexe aus DNA/PNA und verschiedene PNA-Homoduplexe gemessen.^[113]

Nicht nur kovalente Modifikationen wurden genutzt, um die Eigenschaften der DNA zu beeinflussen. Interkalierende Modifikationen wie Farbstoffe können während oder nach der Hybridisierung der Probe zugesetzt werden und ordnen sich selbstständig an die DNA an. Kiguchi und Nishino verwendeten einen Interkalationsfarbstoff, Ethidiumbromid, und Höchst33258, das in die kleine Furche der DNA bindet.^[114] Der Höchstfarbstoff und die reine DNA wiesen das gleiche Verhalten auf. Mit Ethidiumbromid konnte eine erhöhte Leitfähigkeit festgestellt werden. So konnte bewiesen werden, dass die Farbstoffmoleküle nur einen Einfluss auf die Leitfähigkeit haben, wenn sie in die Stapelung interkalieren. An die Furchen angelagerte Farbstoffe zeigten dagegen keinen Einfluss.

In Zusammenhang mit diesen Resultaten stehen Messungen mit *nicked* DNA. Durch den Einzelstrangbruch wurde gezeigt, dass der Tunnelstrom nicht über das Rückgrat, sondern durch den Basenstapel floß.^{[86] [85]} Durch den Einsatz eines anderen Interkalationsfarbstoffs, *Coralyne*, konnte ein dioden-ähnliches Verhalten induziert werden.^[115] Neben Farbstoffen können auch Metallionen in die DNA interkalieren bzw im Basenstapel komplexiert werden, falls entsprechende Basensurrogate in der DNA-Sequenz vorhanden sind. So haben Fernandes *et al.* einen molekularen Draht aus Silberionen geformt. Dazu wurden reine Polycytosin-Stränge genutzt, welche nur durch Komplexierung der Silberionen eine Helix ausbilden konnten. Dieser Strang, welcher schematisch in Abbildung 17 gezeigt wird, wurde mit dem korrespondierenden GC-Duplex verglichen und zeigte eine Steigerung der Leitfähigkeit um zwei Größenordnungen.^[116]

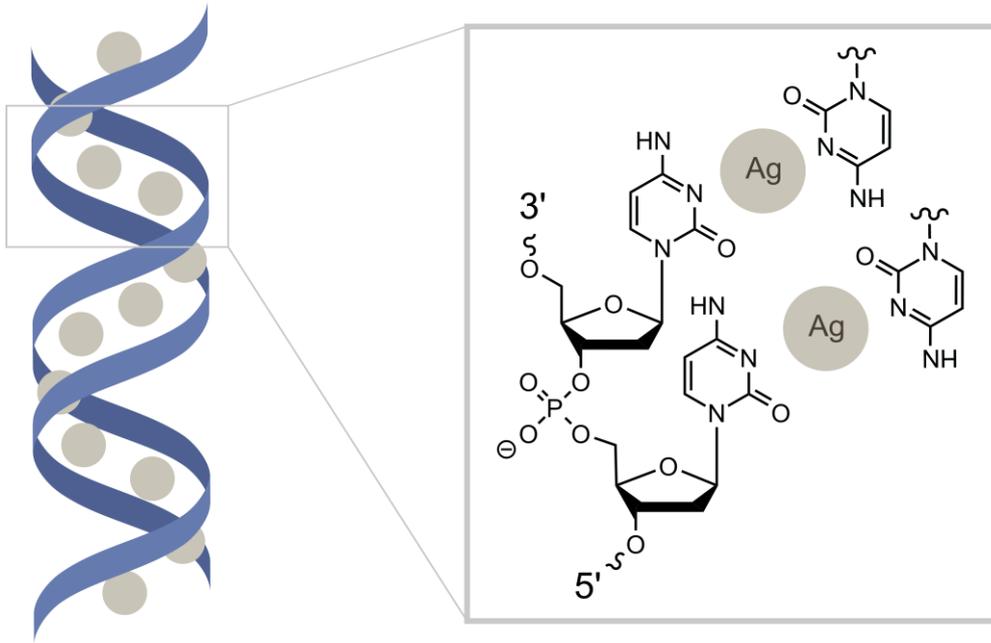


Abbildung 17 Schematische Darstellung eines molekularen Silberdrahts durch metallvermittelte C-C-Basenfehlpaarung.

3. Hauptteil

3.1. Metallionen als DNA-Modifikationen

In früheren Forschungsarbeiten wurde die Leitfähigkeit ausgiebig diskutiert, wie in Kapitel 2.3. gezeigt wurde. In den MBM-Untersuchungen wurde starke Hinweise gefunden, dass DNA über die gestapelten Nukleobasen leitfähig ist.^{[58] [96] [105] [106]} Diese Eigenschaft des DNA-Duplexes ist zwar potent, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei metallischen Leitern.^[116] Die Leitfähigkeit der DNA sollte in dieser Arbeit analysiert und durch verschiedene Modifikationen manipuliert werden. Durch die erste Veränderung des DNA-Verhaltens sollte die Steigerung Leitfähigkeit durch inkorporierte Metallionen erreicht werden.

3.1.1. Synthese und Anbindung des Porphyrins 1

Die Wahl der ersten Modifikation fiel auf ein polykationisches Porphyrin mit insertiertem Gold **1**, da für dieses mehrfach die Interkalation bereits nachgewiesen wurde.^{[117] [118]} Die Wahl des Metallions fiel auf Gold, da dieses über eine der höchsten Leitfähigkeit verfügt und einen stabilen Porphyrin-Komplex bildet.^[119] Metallionen-tragende Komplexe können durch eine postsynthetische CuAAC in DNA eingeführt werden.^[120] Um Porphyrine gerichtet in eine DNA-Sequenz integrieren zu können, mussten die dafür benötigten Bausteine zunächst etabliert werden. Dafür wird eine Azid-Funktion an der Metallionenmodifikation und das Alkin an einer RNA-Nukleobase eingeführt. Als RNA-Baustein wurde ein Cytidinderivat ausgewählt, da eine GC-reiche DNA-Sequenz konzipiert wurde, um eine möglichst thermisch stabilen und leitfähigen Duplex im STM-Experiment zu haben. Abbildung 18 zeigt das mögliche Reaktionsprodukt der postsynthetischen CuAAC.

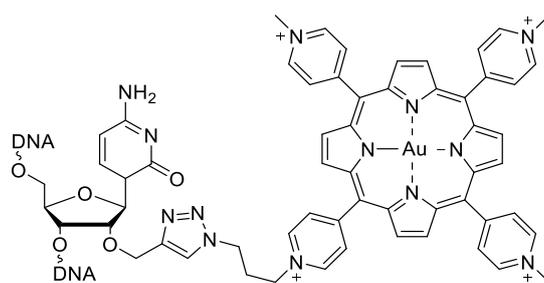


Abbildung 18 Schematische Darstellung eines Oligonukleotidausschnitts nach der postsynthetischen Anknüpfung des metallierten Porphyrins **1** per CuAAC.

Das polykationische Porphyrin **1** konnte entsprechend der von Wagenknecht *et al.* entwickelten Methode in den literaturbekannten Ausbeuten dargestellt werden.^[120] Das Syntheschema ist in Abbildung 19 dargestellt.

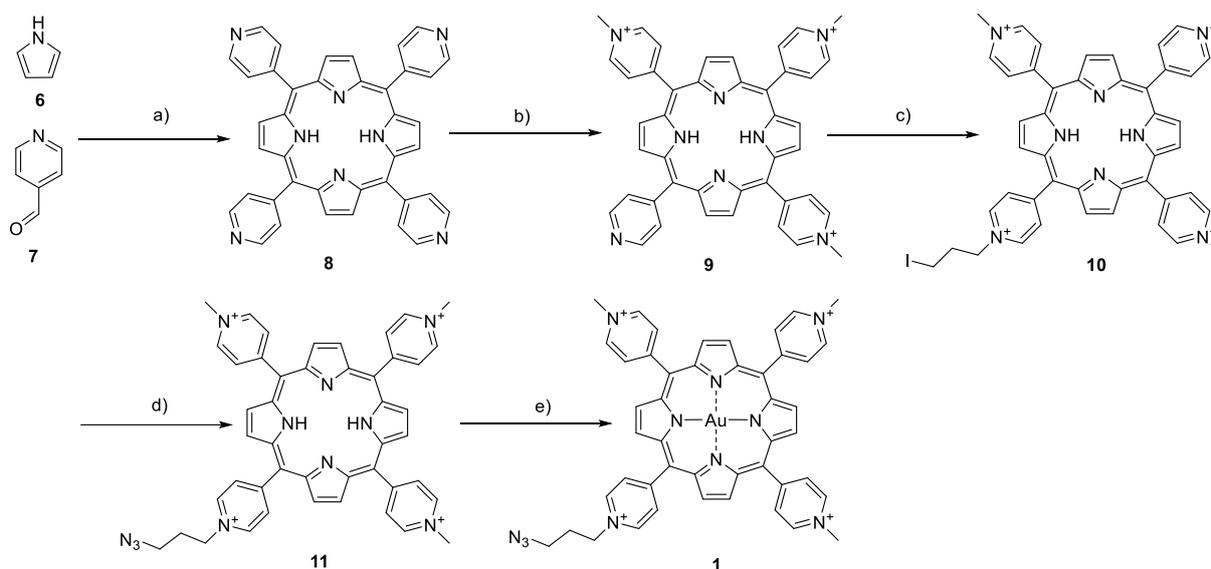


Abbildung 19 Synthese des goldmetallierten Porphyrins **1**: a) Salicylsäure, Xylol, 145 °C, 2.5 h, 10 %; b) MeI, DMF, 160 °C, 3-10 min, 13 %; c) 1,3-Diiodpropan, DMF, 120 °C, 8 h, 62 %; d) NaN₃, ACN, 85 °C, ü.N., 85 %; e) HAuCl₄•3H₂O, LiCl, H₂O, Pyridin, Rt, ü.N., 86 %.

Der erste Reaktionsschritt stellte die säurekatalysierte Kondensationsreaktion von je vier Pyrroleinheiten mit vier Pyridin-4-carbaldehyd zum Porphyrin **8** dar.^[121] Die geringe Ausbeute von 10 % resultiert aus der Konkurrenzreaktion, in der statt des Ringschlusses eine lineare Polymerisation stattfindet. Anschließend wurden drei Pyridineinheiten an der Stickstoffposition

methyliert und das dreifach kationische **9** erhalten.^[122] Dabei wurde der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch kontrolliert, um die Reaktion so zu stoppen, dass das dreifach methylierte Produkt in der höchstmöglichen Ausbeute und nur wenig überreagiertes vierfach methyliertes Porphyrin erhalten wurde. Das vierfach methylierte Porphyrin fand in Vorexperimenten der STM-Versuche Verwendung. Durch die konsekutive Alkylierung mit 1,3-Diodpropan konnte die selektive Einführung einer Linkereinheit realisiert und **10** in einer Ausbeute von 63 % erhalten werden. Für die spätere Einführung des Porphyrins in die DNA wurde das Iod in einer S_N2 -Reaktion durch ein Azid substituiert und **11** in 85 %iger Ausbeute erhalten. In der abschließenden Metallinsertion von Gold konnte der Azid-Baustein mit der literaturbekannten Ausbeute von 86 % isoliert werden.^[119]

Da GC-reiche Sequenzen sowohl eine höhere thermische Stabilität, als auch Leitfähigkeit im Vergleich zu AT-reichen Strängen aufweisen, wurde für dieses Projekt ein Konzept mit hohem GC-Anteil erarbeitet. Für die postsynthetische Anknüpfung der finalen Azid-Komponente wurde deshalb das 2'-O-alkylierte Cytidin-Derivat **2**, das sogenannte Click-C, als mögliche Alkin-Komponente ausgewählt und entsprechend des Syntheschemas in Abbildung 20 synthetisiert.

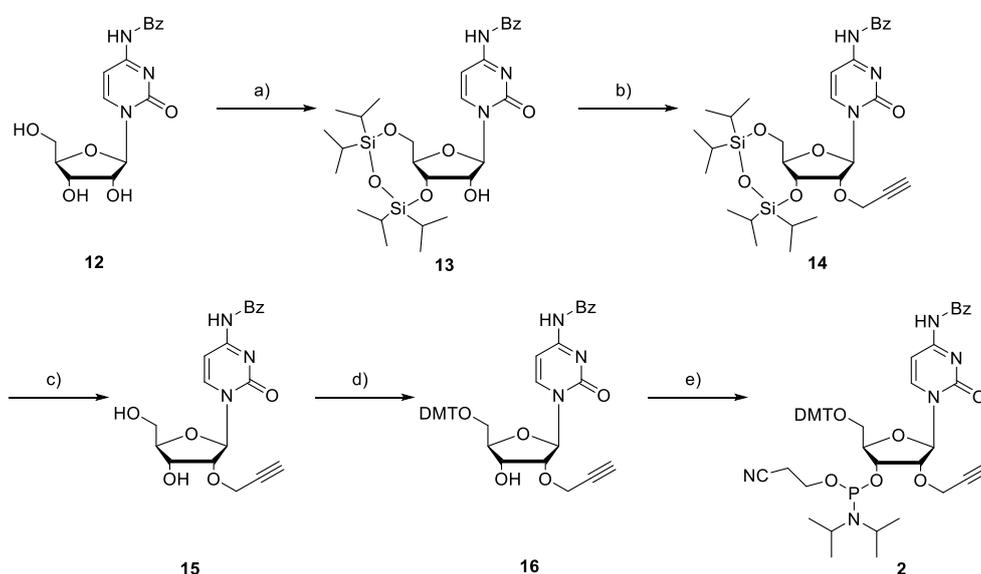


Abbildung 20 Synthese des Click-C Bausteins **2**: a) TIPDSCI₂, Pyridin, Rt, 6 h, 90 %; b) Propargylbromid, NaH, TBAI, DMF, 0 °C→Rt, ü.N., 70 %; c) TBAF (1 M in THF), AcOH, THF, Rt, 40 min, 94 %; d) DMTCl, DMAP, Pyridin, Rt, 6 h, 54 %; e) 2-Cyanoethoxy-N,N-di-iso-propylaminochlorophosphoramidit, DIPEA, 1,2-Dichlorethan, Rt, 3 h, 92 %.

Die Synthese des Phosphoramidit-Bausteins von Click-C (**2**) wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von Sproat *et al.* durchgeführt. Es wurde jedoch vom N-Benzoyl-geschützten Cytidin (**12**) ausgegangen.^[123] Zu Beginn wurden die 5'- und 3'-Hydroxyfunktionen selektiv mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra-*iso*-propyldisiloxan geschützt (**13**). Danach wurde die benötigte Alkin-Funktion in einer S_N2-Reaktion von **13** als Nukleophil mit Propargylbromid zu **14** eingeführt. Nach Abspaltung der Silylschutzgruppe zu **15** wurden zwei für die Festphasensynthese wichtige Reaktionen durchgeführt. Zuerst wurde die 5'-OH-Gruppe dimethoxytrityliert (**16**) und die 3'-OH-Gruppe im letzten Schritt in das entsprechende Phosphoramidit **2** überführt.

Die anschließende automatisierte Festphasensynthese mit dem Baustein **2** konnte erfolgreich durchgeführt werden. Hierfür wurde das Phosphoramidit **2** als 0.1 M Lösung in ACN mit einer sechsminütigen Kopplungszeit verwendet.

Um den Einfluss der metallierten Porphyrine auf das Leitfähigkeitsverhalten der ds-DNA zu prüfen, wurden die in Abbildung 21 gezeigten Einzelstränge als Modellsysteme ausgewählt. Der Abstand von drei Basen zwischen den Click-Modifikationen wurde gewählt, statistisch gesehen erst nach drei Basenpaaren wieder ein polykationisches Porphyrin interkalieren kann.^[124]

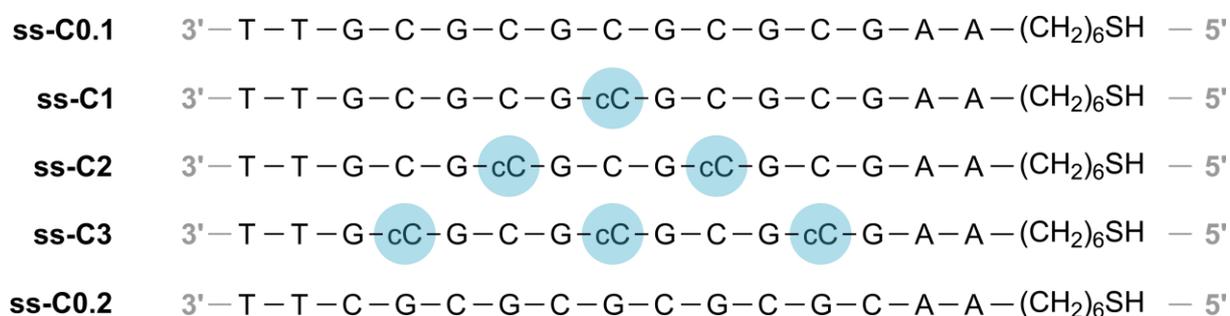


Abbildung 21 Übersicht über die mit **2**-modifizierten Einzelsträngen (**ss-C1-C3**), des Gegenstrangs (**ss-C0.2**) und Kontrollstrangs (**ss-C0.1**).

Die Einzelstränge **ss-C1-3** besitzen eine entsprechende Anzahl an Click-Modifikationen, um Porphyrine in genau definierter Anzahl und Position einzuführen. Nach Hybridisierung von **ss-C1-3** mit **ss-C0.2** wäre so ein möglichst genau definiertes Messsystem vorhanden. Für ein weitergehendes Verständnis des Verhaltens der DNA unter diesen Messbedingungen sollte ebenfalls ein weitgehend unmodifizierter DNA-Einzelstrang **ss-C0.1** in den Messungen betrachtet werden.

Um so den Einfluss der Metallionen vom Eigenverhalten der DNA-Sequenz abgrenzen zu können, wurde daher der Duplex **ds-C0** aus den kommerziell erhaltenen Einzelsträngen **ss-C0.1** und **ss-C0.2** als Referenz verwendet. Alle verwendeten Einzelstränge verfügen zusätzlich über einen kommerziell erhältlichen n-Hexanthiol-Linker am 5'-Terminus der ss-DNA. Diese Modifikation soll eine verlässliche Kontaktbildung mit der Gold-Spitze und –Oberfläche des STMs garantieren. Dazu wurde das kommerziell erhältliche Phosphoramidit als 0.1 M Lösung in ACN angelöst und mit der maximalen Kopplungszeit des Synthesizers (21 min) eingeführt.

Die so synthetisierten ss-DNA **ss-C1-3** wurden anschließend in einer CuAAC mit dem Porphyrin **1** umgesetzt. Bei Auftrag des Reaktionsansatzes auf die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) konnte am Photodiodenzeilen-detektor (engl. *diode array detector*, DAD) der HPLC ein vielversprechendes Verhältnis der Absorptionen zwischen DNA und Porphyrin beobachtet werden, zudem verlief die Aufreinigung laut Chromatogramm erfolgreich, siehe Abbildung 22.

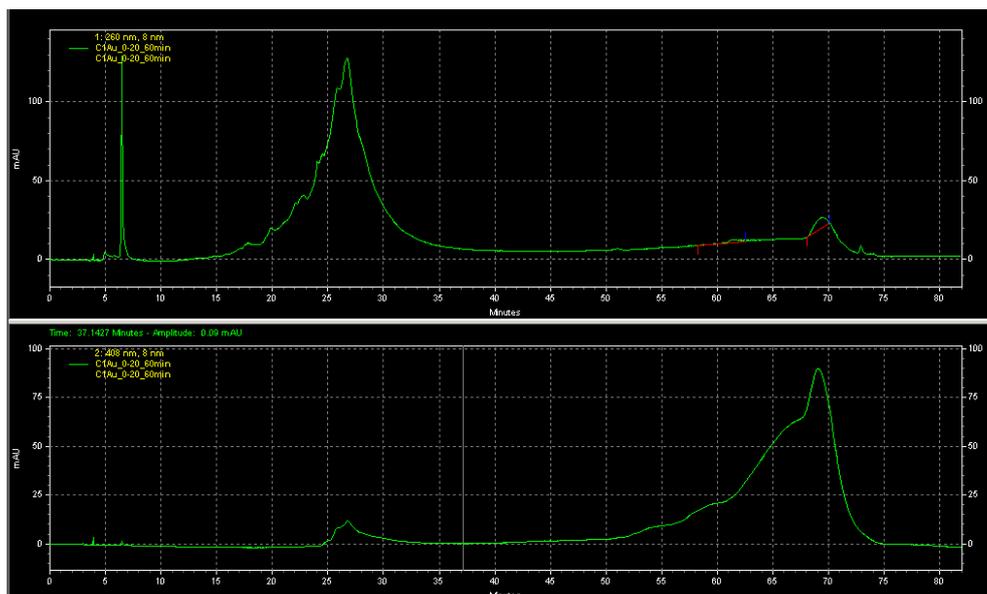


Abbildung 1 HPLC-Chromatogramm der CuAAC-Reaktion von **ss-C1** und **1**, oberes Chromatogramm mit Absorption bei $\lambda = 260$ nm und das untere Absorption bei $\lambda = 408$ nm.

Im Anschluss an die chromatographische Aufreinigung tendierten die polykationischen Porphyrine dazu, über π -Stapelung zu aggregieren und dabei zum Teil DNA per Coulombwechselwirkung an sich zu binden und infolgedessen zu präzipitieren.^[125] Ein Nachweis für die erfolgreiche kovalente Bindungsknüpfung über die Massenspektrometrie war nicht erfolgreich. Aufgrund dessen wurde nach einem alternativen Konzept für ein metalltragendes System gesucht.

3.1.2. Synthese und Charakterisierung des 8-Hydroxychinolins 3

8-Hydroxychinolin (HC) wie in Abbildung 23 dargestellt, ist ein literaturbekanntes Basensurrogat und wurde bereits im Arbeitskreis Wagenknecht auf dessen Eigenschaften in ds-DNA untersucht.^[33] Da für Kupfer ein stabiler Komplex nachgewiesen wurde und die Münzmetalle eine hohe Leitfähigkeit besitzen, wurde Cu^{2+} als Metallion für die Untersuchung ausgewählt.

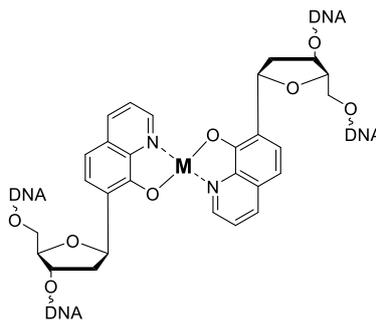


Abbildung 23 Schematische Darstellung der inkorporierten HC-Modifikation mit Metallion in ds-DNA.

Außerdem ist ein direkter Einbau in die Sequenz per Festphasensynthese möglich. Das Syntheseschema ist in Abbildung 24 dargestellt.

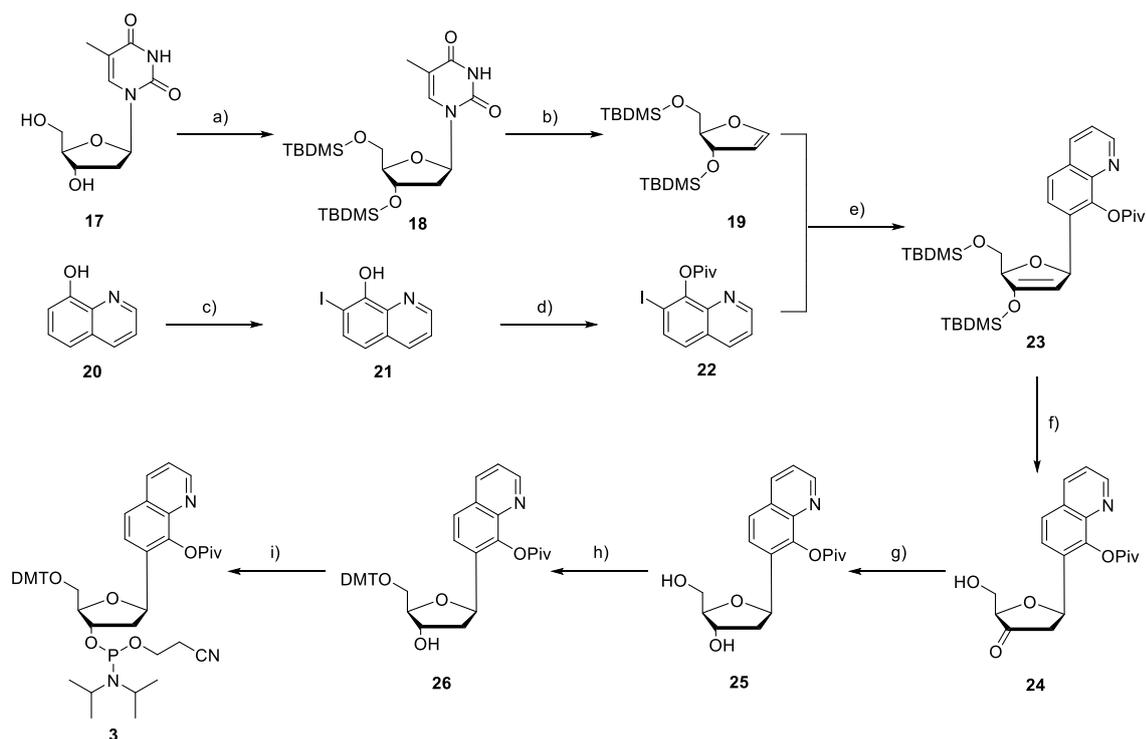


Abbildung 24 Synthese des HC-Basensurrogats **3**: a) TBDMSCl, Imidazol, DMF, Rt, ü.N., quant., b) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Reflux, 3.5 h, 71 %; c) NIS, CHCl_3 , 40 °C, ü.N., 76 %; d) Pivaloylchlorid, DMAP, Pyridin, 16 h, Rt, 89 %; e) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, AsPh_3 , Net_3 , ACN, 60 °C, 20 h, 38 %; f) $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$, THF, 16 h, 0 °C \rightarrow Rt, quant.; g) $\text{Na}[\text{BH}(\text{OAc})_3]$, AcOH, ACN, 0 °C, 20 min, 93 %; h) DMTCl, DMAP, Pyridin, Rt, 48 h, 72 %; i) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorphosphoramidit, DIPEA, DCM, Rt, 6 h, 93 %.

Zur Darstellung des HC-Bausteins **3** für die Festphasensynthese wurde nach der Veröffentlichung von Wagenknecht *et al.* verfahren.^[33] Für die Synthese des Glycals **19** wurden die 3'- und 5'-OH-Gruppen von Thymidin mit TBDMS-Gruppen geschützt und die Nukleobase im nächsten Schritt durch den Einsatz von HMDS vom Zucker abgespalten.^[22] Das 8-Hydroxychinolin (**20**) wurde mit NIS in der 7-Position iodiert und anschließend wurde die Hydroxyfunktion mit Pivaloylchlorid geschützt und das Chinolin **22** erhalten.^[126] Zwischen Glycal **19** und Chinolin **22** wurden anschließend in einer Heck-Kupplung eine C-C-Bindung geknüpft.^[127] Die Silylschutzgruppen der Zuckereinheit wurden per $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ entfernt. Nach anschließender Reduktion mit $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ konnte das Basensurrogat **25** erhalten werden. Zuletzt wurden die für die Festphasensynthese benötigten Gruppen am Zucker eingeführt. Die 5'-OH-Gruppe wurde mit einer DMT-Gruppe geschützt, die 3'-OH-Gruppe phosphoryliert und das HC **3** in den literaturbekanntesten Ausbeuten erhalten.^[33]

Der nachfolgende Einbau des synthetisierten Basensurrogatbausteins **3** über die automatisierte Festphasensynthese konnte erfolgreich durchgeführt werden. Hierfür wurde das Phosphoramidit als 0.1 M Lösung in ACN sowie die Kopplungszeit auf 6 min verlängert.

Des Weiteren wurde aufgrund der Linkereigenschaften des *n*-Hexanthiols für die neuen Modellsysteme das kürzere und somit weniger isolierende *n*-Propanthiol eingesetzt. Dieses ist nur als Modifikation an der Festphase erhältlich, wodurch die Position von 5' auf 3' geändert wurde. Die Modellsysteme für die Basensurrogat-vermittelte Metallioneninkorporation werden in Abbildung 25 dargestellt.

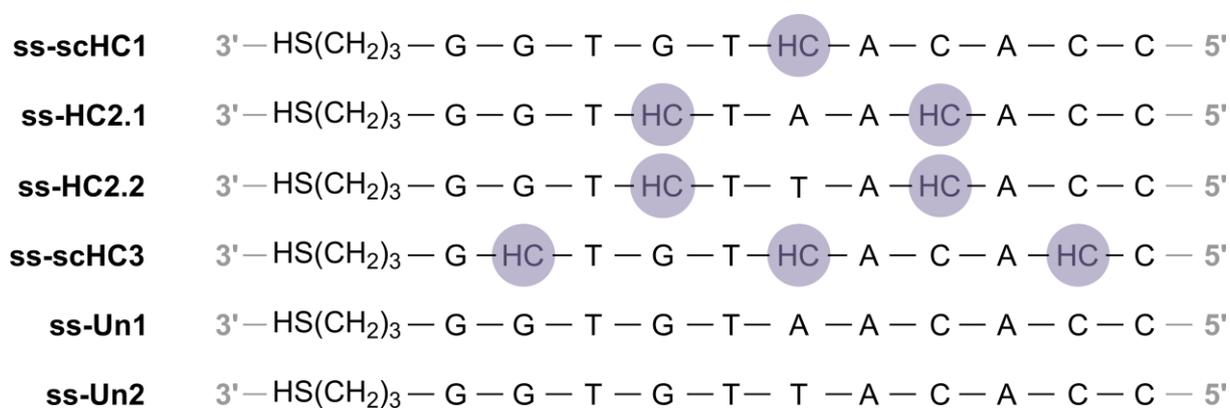


Abbildung 25 Übersicht über die mit **3**-modifizierten Einzelstränge (**ss-scHC1-3**) und das Kontrollsystem (**ss-Un1-2**).

In Analogie zu dem in 3.1.1 beschriebenen Modellsystem wurde ein Abstand von drei unmodifizierten Basen zwischen den einzelnen Modifikationen eingestellt. Dabei wurden mehr AT-Paare verwendet, damit eine effektivere Basenstapelung erhalten wird. Um einen möglichen höheren Widerstand durch die AT-Paar entgegenzuwirken, wurden die die Gesamtlänge der ss-DNA wurde dabei von einem 15mer auf ein 11mer reduziert. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die Leitfähigkeit in einem Bereich liegt, der unter den Versuchsbedingungen optimal im STM gemessen werden kann. Daher ist neben den neuen Modellsystemen auch ein neues Kontrollsystem notwendig, hier als **ds-Un** bezeichnet. Der Duplex von **ds-Un** wird aus den Einzelsträngen **ss-Un1** und **ss-Un2** gebildet. Die ds-DNA Systeme werden folgendermaßen benannt: Da die Einzelstränge von **ss-scHC1** und **ss-scHC3** selbstkomplementär sind, werden ihre Duplexe als **ds-scHC1** und **ds-scHC3** bezeichnet. Aufgrund des logischen Designs kann **ds-HC2** nicht selbstkomplementär sein und wird aus den Einzelsträngen **ss-HC2.1** und **ss-HC2.2**

gebildet. Durch die Verkürzung der Sequenz ändern sich neben der Leitfähigkeit weitere Parameter des Messsystems. Da weniger Basen vorhanden sind und die Anzahl der GC-Paare verringert wurde, ändert sich die Stabilität des Duplexes. Dies sollte eine Schmelztemperaturerniedrigung nach sich ziehen. Um dies zu testen, wurden Schmelztemperaturmessungen vorgenommen. Dazu wurden $2.50 \mu\text{M}$ DNA-Lösungen in 10 mM PBS Puffer präpariert und temperaturabhängig bei $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$ gemessen. Die so erhaltenen Schmelztemperaturkurven sind in Abbildung 26 dargestellt.

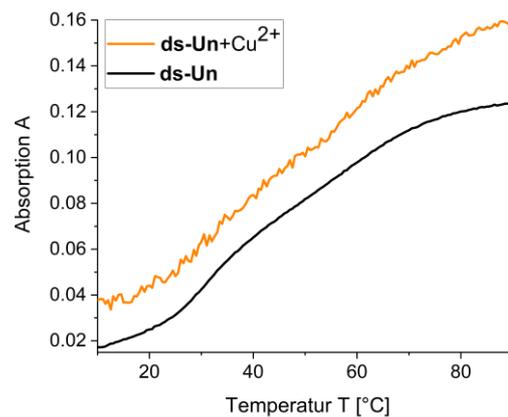


Abbildung 26 Temperaturabhängige Absorptionsänderungsmessung der **ds-Un** ohne (schwarz) und mit 4.5 eq Kupferionen (rot). Bedingungen: $2.50 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM PBS $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$.

In Abbildung 26 sind Schmelztemperaturkurven der **ds-Un** mit und ohne Zusatz von CuCl_2 gezeigt. Die **ds-Un** weist einen näherungsweise sigmoidalen Verlauf mit einem Wendepunkt bei $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Dieser Wendepunkt wird als Schmelztemperatur T_m der DNA definiert. Bei dieser Temperatur liegen jeweils 50% der DNA als Einzel- bzw. Doppelstrang vor. Die Schmelztemperatur kann als ein Maß für die Stabilität des DNA-Duplexes angesehen werden. Des Weiteren ist ein Plateau bei $T = 78 \text{ }^\circ\text{C}$ zu sehen, welches auf eine vollständige Dehybridisierung des Duplexes hinweist. Bei der Messung, welche unter Einfluss von 4.5 Äquivalenten Kupfer durchgeführt wurde, ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten. Drei Unterschiede im Vergleich zur Messung ohne Kupfer bestehen im Offset, im Rauschen und in einem neuen möglichen Wendepunkt bei $T = 56 \text{ }^\circ\text{C}$. Dieser neue Punkt kann nicht eindeutig einem Phänomen zugeschrieben werden und wird deshalb nicht weiter betrachtet. Das erhöhte Rauschen in der Messung mit Kupferionen könnte auf eine mögliche Interaktion der Kupferionen mit der DNA

zurückgeführt werden. Ein Cu^{2+} -Ion kann per Coulombsche Wechselwirkung an das negative geladene Phosphatrückgrat koordinieren oder alternativ durch die funktionellen Gruppen der Nucleobasen, vor allem durch die freien Amine, komplexiert werden. Festzuhalten ist, dass dieser Effekt marginal ist und der Einfluss der Kupferionen auf das im Folgenden zu untersuchende Verhalten der Helix vernachlässigt werden kann. Somit können mögliche Veränderungen des Schmelzverhaltens zum Großteil auf die Interaktion der Modifikation mit den Metallionen zurückgeführt werden können. Da sich das Basensurrogat von den natürlichen Basen strukturell unterscheidet, muss auch dieser mögliche Effekt auf die Schmelztemperaturmessungen und die damit verbundene Stabilität des Duplexes berücksichtigt werden. Dafür wurden Messungen ohne Zugabe einer Kupferquelle durchgeführt.

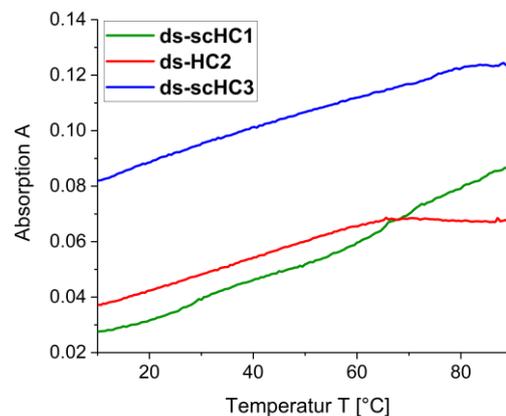


Abbildung 27 Temperaturabhängige Absorptionsänderungsmessung der Messsysteme **ds-scHC1** (grün), **ds-HC2** (rot) und **ds-scHC3** (blau) ohne Kupferionen. Bedingungen: 2.50 μM Duplex in 10 mM PBS, $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$.

In der Abbildung 27 sind die Kurven der Schmelztemperaturmessungen der **ds-scHC1** (schwarz), **ds-HC2** (rot) und **ds-scHC3** (blau) gezeigt. Der Kurvenverlauf der einfach modifizierten ds-DNA (**ds-scHC1**) ähnelt dem Verhalten, welches zuvor bei der **ds-Un** beobachtet werden konnte. Für diesen Duplex wurden zwei Wendepunkte bei $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ und $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt. Der erste Wendepunkt bei $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ wird in Anlehnung an **ds-Un** als Schmelztemperatur für **ds-scHC1** angenommen. Die um $2 \text{ }^\circ\text{C}$ erniedrigte Schmelztemperatur kann durch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung im Duplex erklärt werden. Die HC-Modifikation im **ds-scHC1** ersetzt ein AT-Paar von **ds-Un**. Die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen

bleibt erhalten, jedoch wird die Akzeptoreigenschaft verändert. Während beim AT-Paar jeweils ein primäres Amin mit einer Carbonylgruppe wechselwirkt, bildet bei der HC-Modifikation ein tertiäres Amin mit einem Alkohol die Wasserstoffbrückenbindung. Die HC-Modifikation scheint die schwächere Wechselwirkung zu auszubilden, wodurch die geringere Schmelztemperatur erklärt werden kann. Zuletzt zeigt die Kurve des **ds-scHC1** eine minimale Sättigung bei ca. $T = 90\text{ °C}$. Konträr zu **ds-scHC1** weisen weder **ds-HC2** noch **ds-scHC3** einen Wendepunkt auf. Dagegen weisen beide mehrfach modifizierten Doppelstränge ein gut sichtbares Plateau bei hohen Temperaturen auf, für **ds-HC2** bei $T = 65\text{ °C}$ und für **ds-scHC3** bei $T = 89\text{ °C}$. Diese Plateaus entsprechen auch hier der vollständigen Dehybridisierung der DNA-Duplexe. Eine mögliche Erklärung des Hybridisierungsverhaltens von **ds-HC2** könnte durch die Position der Modifikation gegeben werden. Bei **ds-HC2** befinden sich die Hydroxychinoline an Position 4 und 6 der Stränge. Anscheinend führt diese Positionierung zu einer ausgeprägteren Destabilisierung als die bei der dreifachen Inkorporation (**ds-scHC3**). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sich innerhalb der Schmelztemperaturmessungen eine vollständige Dehybridisierung erzielen ließ, jedoch konnten die Schmelztemperaturen der entsprechenden Duplexe nicht genau bestimmt werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass ein konsekutiver Mehrfacheinbau der HC-Modifikation in die Sequenz bei zentraler Position zu keinem weiteren Verlust von thermischer Stabilität führt. Jedoch wurde hierbei keine native Basenpaarung gegen die Modifikation ausgetauscht, sondern die Modifikationen zusätzlich in die Sequenz hinzugefügt, sodass diese um ein Basenpaar verlängert wurde.^[33] In den hier durchgeführten Experimenten wurde ein Austausch vorgenommen. Bei **ds-HC2** wurden im Vergleich zum Kontrollsystem **ds-Un** zwei GC-Paare und bei **ds-scHC3** zwei GC- und ein AT-Paar ersetzt. Dies weist auf den Effekt der Wasserstoffbrückenbindungen auf die thermische Stabilität hin. Das zeigt, dass die HC-Modifikation die Duplexstabilität stärker senken könnte als bisher angenommen und die mehrfach modifizierten Oligonukleotide keinen stabile Duplexe bei Raumtemperatur bilden. Ein hypothetisch gebildeter DNA-Duplex würde auf die mechanische Einwirkung der bei einer STM MCBJ Messung mit Dehybridisierung reagieren und so zu keiner einheitlichen Leitfähigkeit führen. Daher scheinen diese Messsysteme ohne Metall für Leitfähigkeitsmessungen ungeeignet. Ob die Wirkung von Metallionen das beobachtete Verhalten der Messsysteme beeinflussen kann, wird

im Folgenden betrachtet. Dazu wurden alle Systeme bei der Hybridisierung mit entsprechenden Äquivalenten an CuCl_2 versetzt und die Schmelztemperaturen bestimmt.

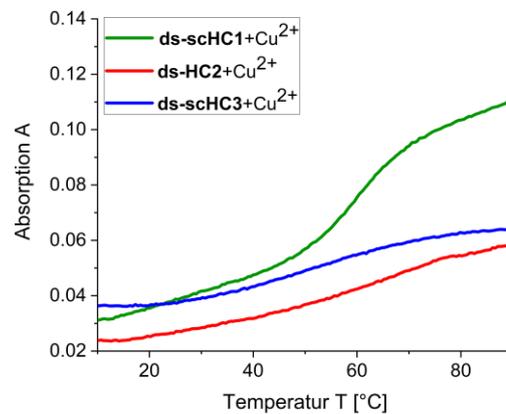


Abbildung 28 Temperaturabhängige Absorptionsänderungsmessung der DNA **ds-schHC1** mit 1.5 eq Cu^{2+} (grün), **ds-HC2** mit 3.0 eq Cu^{2+} (rot) und **ds-schHC3** mit 4.5 eq Cu^{2+} (blau). Bedingungen: 2.50 μM Duplex in 10 mM PBS, $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$.

Abbildung 28 zeigt den Absorptionsverlauf der ds-DNA unter dem Einfluss von Cu^{2+} -Ionen während der Schmelztemperaturbestimmung. Die Kurve von **ds-schHC1** zeigt im Vergleich zur Messung ohne Kupfer einen deutlich stabilisierten Verlauf. Der Einfluss der Kupferionen bewirkt eine Verschiebung der Schmelztemperaturen um $\Delta T_m = 30 \text{ °C}$ auf $T_m = 58 \text{ °C}$. Der DNA-Duplex wird also dank den Kupferionen, auch im Vergleich zum Kontrollsystem, deutlich stabilisiert. Die Kurven der mehrfach modifizierten Doppelstränge sind im Vergleich zur Messung ohne Kupferzugabe ebenfalls verändert. Für **ds-HC2** ist bei $T = 80 \text{ °C}$ eine leichte verringerte Steigung zu beobachten. Da die Schmelztemperaturmessungen nur bis 90 °C aufgenommen wurden, sind zu wenig Datenpunkte in diesem Bereich vorhanden, um einen Sattelpunkt und damit eine Schmelztemperatur definieren zu können. Insgesamt weist die Kurve einen näherungsweise linearen Verlauf ohne größere Charakteristika auf.

Der Verlauf der Schmelztemperaturkurve von **ds-schHC3** zeigt ein Plateau bei niedrigen Temperaturen $T \leq 25 \text{ °C}$ und flacht bei Temperaturen $T \geq 75 \text{ °C}$ leicht ab. Als möglicher Wendepunkt könnte dementsprechend $T_m = 52 \text{ °C}$ interpretiert werden. Diese Schmelztemperatur von **ds-schHC3** könnte so interpretiert werden, dass der Duplex, der in der Mitte der Sequenz ein Cu^{2+} komplexiert, thermisch geöffnet wird. Eigentlich wäre hierbei ein ähnlich ausgeprägter Verlauf wie für **ds-schHC1** mit Cu^{2+} zu erwarten. Dass **ds-schHC3** ein anderes Verhalten zeigt,

könnte durch den Einbau der zusätzlichen HC-Modifikationen begründet sein. Diese bewirken im Vergleich zu den GC-Paaren des **ds-scHC1** eine Destabilisierung der Sequenz. Die Modifikation mit komplexiertem Kupfer stabilisiert dagegen den Duplex. Ist das Kupferion in der Mitte der Sequenz komplexiert, könnten die Enden der Helix immer wieder aufgeschmolzen werden und darüber zu einer geringeren Absorption führen. In Abbildung 29 wird der Vorgang des Aufschmelzens gezeigt.

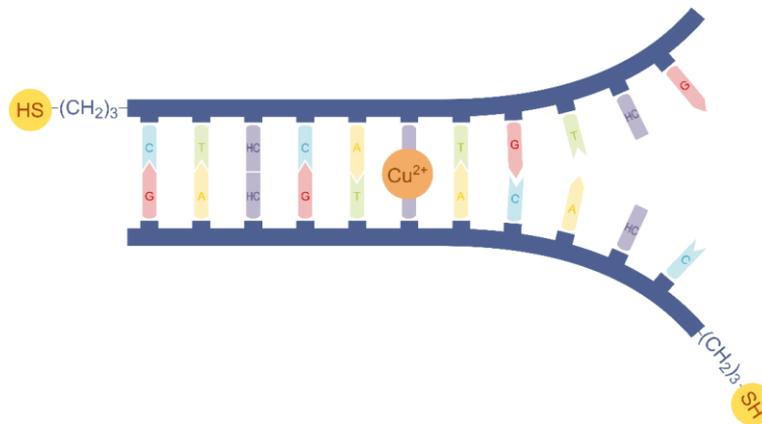


Abbildung 29 Schematische Darstellung des Dehybridisierungsprozesses von **ds-scHC3** mit einem komplexiertem Cu^{2+} .

Um das Verhalten der modifizierten Oligonukleotide weiter zu charakterisieren, wurden weitere spektroskopische Untersuchungen vorgenommen. Zunächst wurde die Absorption aller ds-DNA bei Raumtemperatur gemessen. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 30 gezeigt. Für die Absorptionsmessungen wurden die gleichen Bedingungen wie für die Schmelztemperaturmessungen verwendet.

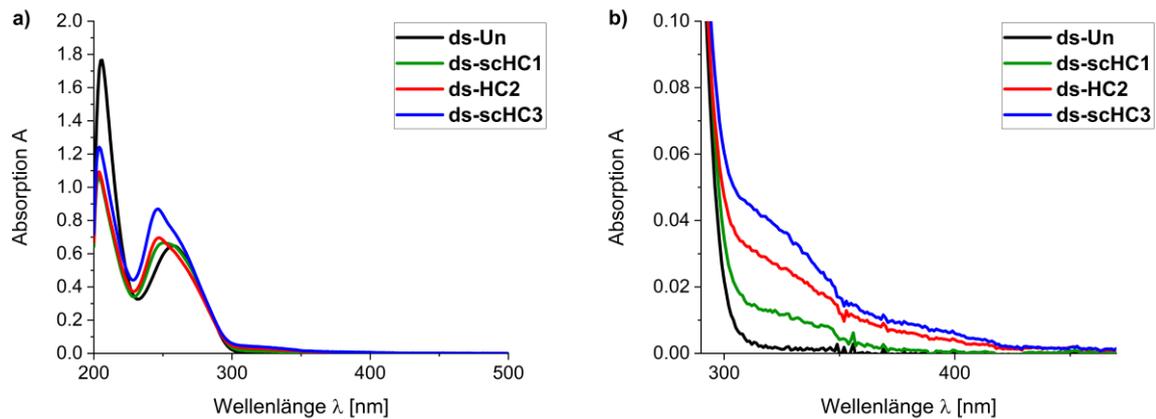


Abbildung 30 Absorptionsspektrum der ds-DNAs: **ds-Un** (schwarz), **ds-scHC1** (grün), **ds-HC2** (blau) und **ds-scHC3** (rot). Bedingungen: 2.50 μ M Duplex in 10 mM PBS. b) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Absorptionsspektren.

In Abbildung 30 a) werden die Absorptionsspektren der vier verschiedenen ds-DNAs von $\lambda = 210$ - 420 nm gezeigt, für b) wurde der in diesem Kontext relevante Bereich von $\lambda = 280$ - 420 nm vergrößert. Das erste lokale Maximum zwischen $\lambda = 230$ - 280 nm ist auf die natürlichen Nucleobasen zurückzuführen.^[128] Bei den Absorptionen der modifizierten Duplexe wird ein neues Maximum bei ungefähr $\lambda = 240$ nm sichtbar. Dieses kann auf das Absorptionsmaximum von Hydroxychinolin mit $\lambda_{\text{max}} = 242$ nm zurückgeführt werden.^[129] Eine Betrachtung von $\lambda = 310$ nm illustriert die modifikationsbedingten Veränderungen jedoch besser, da die Nucleobasen in diesem Bereich nur noch schwach absorbieren. Analog zu den Schmelztemperaturmessungen ist auch hier eine deutliche Auswirkung der HC-Modifikation auf das Verhalten der Oligonukleotide zu beobachten.

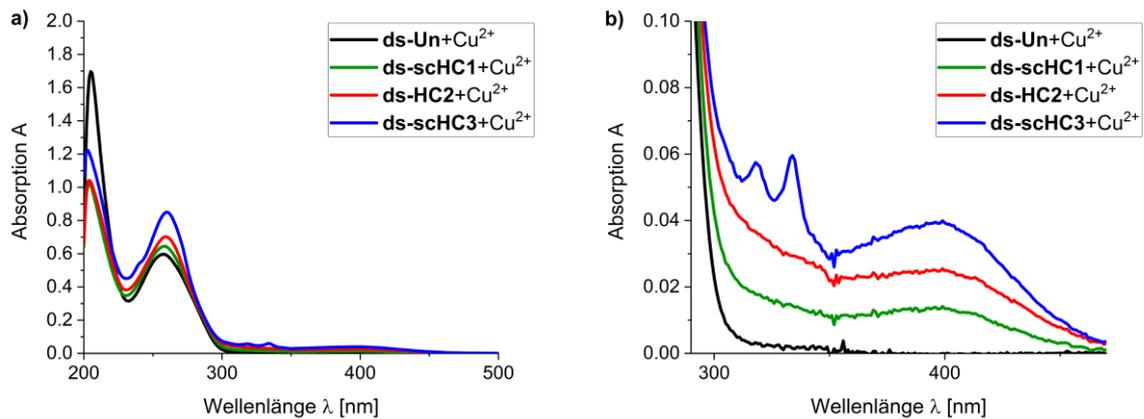


Abbildung 31 Absorptionsspektrum der ds-DNAs: **ds-Un** mit 4.5 eq Cu^{2+} (schwarz), **ds-scHC1** mit 1.5 eq Cu^{2+} (grün), **ds-HC2** mit 3.0 eq Cu^{2+} (rot) und **ds-scHC3** mit 4.5 eq Cu^{2+} (blau). Bedingungen: 2.50 μM Duplex in 10 mM PBS. b) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus den Absorptionsspektren.

In Abbildung 31 werden die Absorptionsspektren der ds-DNA unter dem Einfluss von Cu^{2+} -Ionen dargestellt. Die Kupferionen scheinen keinen Einfluss auf das Absorptionsverhalten von **ds-Un** zu nehmen. Im Gegensatz dazu zeigen die modifizierten Doppelstränge deutliche Veränderungen. Das lokale Maximum bei $\lambda = 240$ nm ist deutlich reduziert. So ist dieses nur noch als Schulter im Graph von **ds-scHC3** sichtbar. Hingegen nimmt die Bande bei $\lambda = 260$ nm deutlich zu. Es ist anzunehmen, dass die maximale Absorption der HC-Modifikation von $\lambda_{\text{max}} = 242$ nm in Richtung des Bereichs um $\lambda = 260$ nm rotverschoben wird. Die Absorption um $\lambda = 310$ nm wird durch die Anwesenheit der Cu^{2+} -Ionen nicht beeinflusst. Die neue Bande um $\lambda = 400$ nm wird durch den Kupfer(II)-Hydroxychinolin-Komplex hervorgerufen. Dabei findet ein Metall zu Liganden Energie-Transfer (engl. *metal to ligand energy transfer*, MLT) statt.^[130] Außerdem weist **ds-scHC3** bei $\lambda = 320$ nm und $\lambda = 335$ nm lokale Maxima auf, die Ursache für diese Beobachtung konnte jedoch nicht geklärt werden. Eine Vermutung wäre, dass diese neuen Maxima als kooperativer Effekt durch mehrere inkorporierte Kupferionen entstehen. Eine möglichst geringe Kupfersalz-Konzentration für die STM Experimente von Vorteil ist, um einen möglichst geringen Leckstrom zu erhalten. Daher wurde ein Titrationsexperiment mit zunehmender CuCl_2 -Konzentration durchgeführt. Hierzu wurde **ds-scHC3** als 2.50 μM Lösung in 10 mM PBS hybridisiert und die Absorption zwischen $\lambda = 180$ -500 nm in Abhängigkeit der zugegebenen Äquivalenten an Kupfer(II)ionen untersucht. Eine 1 μM Kupferlösung wurde in Schritten von jeweils 0.5 eq hinzugegeben, die Probe wurde invertiert und für 30 min unter

Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut invertiert und die Absorption sowie der Circular dichroismus (CD) gemessen. Dieses Experiment wurde nur mit **ds-scHC3** durchgeführt, da die MLT-Bande im vorangegangenen Experiment die höchste Absorption aufwies.

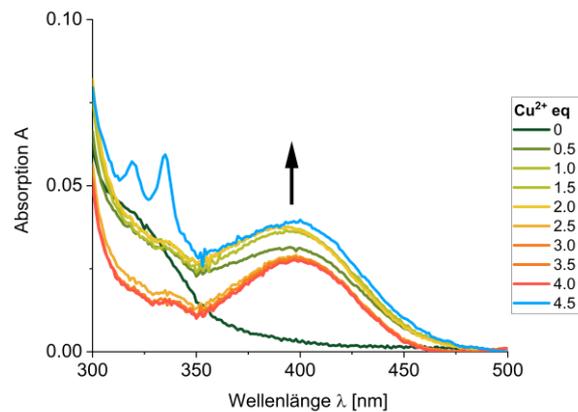


Abbildung 32 Absorptionsspektren der **ds-scHC3** im Bereich der MLT-Bande in Abhängigkeit der Cu²⁺-Konzentration. Bedingungen: 2.50 μM Duplex in 10 mM PBS.

Abbildung 32 zeigt die Absorptionsmessung der DNA **ds-scHC3** mit steigenden Äquivalenten von Kupfer(II)ionen. In Abwesenheit der Metallionen ist nur die Absorption des Hydroxychinolins $\lambda = 310$ nm messbar. Bereits bei 0.5 Äquivalenten Kupfer(II)ionen entsteht ein neues lokales Maximum bei $\lambda = 400$ nm. Durch die weitere Erhöhung der Kupfer(II)konzentration auf 1.0 Äquivalente steigt die Absorption an diesem neu gebildeten Maximum weiter an. Eine weitere Zugabe von Kupfer(II)ionen auf 2.0 Äquivalente führte diesen Trend nicht fort, sodass mit nur einem Kupferäquivalent offenbar eine Sättigung erreicht wurde. Die Absorption bei 2.5 Äquivalenten weist eine geringere Intensität als die der vorherigen Konzentrationen auf. Dies steht im starken Kontrast zu dem bisherigen Trend, nach dem die Absorption für 2.5 Äquivalente ähnlich zur der von 1.0 Äquivalenten sein sollte. Für die Äquivalente 2.5 bis 4.0 kann das exakt gleiche Absorptionsverhalten beobachtet werden. Nicht nur der Verlauf, sondern auch Intensität der Absorption ist für alle Konzentrationen gleich. Aus dem vorhergehenden Experiment, in dem ebenfalls die Absorption der DNA unter Kupferioneneinfluss beobachtet wurde, ist das Absorptionsverhalten von **ds-scHC3** mit 4.5 eq Cu²⁺ bekannt und in Abbildung 32 blau eingezeichnet. Ein Vergleich mit dieser Messung zeigt, dass die Intensität der Absorption im Vergleich zur 1.0 Äquivalenten marginal gesteigert wurde. Somit widerspricht dieses

Absorptionsverhalten dem der Äquivalente 2.5 bis 4.0 der aktuellen Messung. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die DNA **ds-scHC3** in dem ersten Experiment zusammen mit den 4.5 eq CuCl_2 hybridisiert wurde. Daher sollte diese Probe die optimale Koordination der Kupferionen an und in dem Duplex aufweisen.

Eine mögliche Erklärung für das Verhalten ab 2.5 Äquivalente Cu^{2+} könnte die Probenbehandlung sein. Die Inkubationszeit für 2.5 eq war um 1.5 h höher als bei den anderen Messungen. Während dieser Zeit könnte sich die **ds-HC3** an den Küvettenwänden abgesetzt haben.

Die gemessenen Absorptionen von 2.0 Äquivalenten und von 4.5 Äquivalenten Kupfer sind nahezu identisch. Möglicherweise wird die Helix durch die Komplexbildung eines Cu^{2+} so stark stabilisiert, dass die Helix bei Raumtemperatur nicht mehr aufgeschmolzen werden konnte und keine weitere Komplexbildung stattfand.

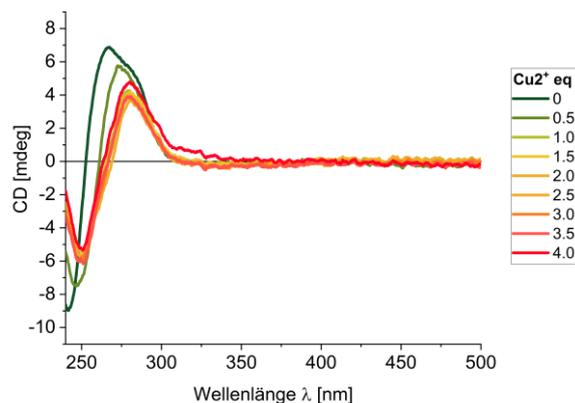


Abbildung 33 CD-Spektren der **ds-scHC3** in Abhängigkeit der Cu^{2+} -Konzentration. Bedingungen: 2.50 μM Duplex in 10 mM PBS.

Die CD-Spektren der Titration von **ds-scHC3** mit CuCl_2 -Lösung ist in Abbildung 33 dargestellt und weist das zu erwartende CD-Signal bei $\lambda = 260$ nm auf. Ausgehend von höheren Wellenlängen sind die Werte vor dem Nulldurchgang positiv und danach negativ. Dies spricht für einen positiven Cotton-Effekt und damit für eine rechtsgängige Helix.^[131] Neben dem CD-Signal der Nucleobasen ist nur bei 4.0 Äquivalenten eine kleine Schulter bei $\lambda = 310$ nm zu beobachten. Die MLT-Bande bei $\lambda = 400$ nm ist im Spektrum nicht nachweisbar. Dies könnte auf experimentelle Ursachen wie eine geringere Sensitivität des CD-Spektrometers zurückgeführt werden, da die Absorption, wie in den UV/Vis-Absorptionsspektren gesehen, nur sehr gering

ist. Auf molekularer Ebene könnte der Hydroxychinolin-Kupfer-Komplex auch so in der Helix orientiert sein, dass kein CD-Signal erzeugt wird.

Aus diesem Unterkapitel lassen sich wichtige Aspekte zum Verständnis der DNA als Molekül für die Anwendung der STM MCBJ zusammenfassen. Aus den Schmelztemperaturbestimmungen der Duplexe gehen einige wichtige Sachverhalte hervor. Zunächst hat das Kontrollsystem **ds-Un** eine Schmelztemperatur von $T_m = 30\text{ °C}$, ist unter Standardbedingungen stabil und ist daher für STM MCBJ Messungen geeignet. Des Weiteren wird durch Einführung der Modifikation die Helix destabilisiert. Dieser Effekt nimmt durch den weiteren Einbau der Modifikation stärker als in der Literatur angenommen zu.^[33] Lediglich die einfach modifizierte **ds-scHC1** zeigte eine entsprechende thermische Stabilität mit einer Schmelztemperatur von $T_m = 28\text{ °C}$, da die Leitfähigkeitsmessung ohne Temperaturkontrolle bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Cu^{2+} -Ionen haben nur einen geringen Einfluss auf das Verhalten der unmodifizierten ds-DNA. Im Gegensatz dazu werden die modifizierten DNA-Duplexe durch die Zugabe enorm stabilisiert. Die mehrfach modifizierten **ds-HC2** und **ds-scHC3** zeigen ein schwer deutbares Schmelzverhalten, weswegen Aussagen dazu hypothetischer Natur sind. Die Schmelztemperaturkurven wurden nur mit Hilfe der Trends, die aus dem Vergleich von **ds-scHC1** mit **ds-Un** gezogen werden können, interpretiert. Die UV/Vis-Absorptionsmessungen weisen den erfolgreichen Einbau der HC-Modifikation nach. Durch die Zugabe von Cu^{2+} -Ionen ist im Absorptionsspektrum zu sehen, dass die für die freien Hydroxychinoline typische Absorptionsbande bei $\lambda = 240\text{ nm}$ verschwindet und der Metall-Ligand-Komplex eine Bande bei $\lambda = 400\text{ nm}$ bildet. Dadurch ist auch spektroskopisch ein Einfluss der Modifikation im Zusammenspiel mit Kupfer zu erkennen. In Relation zur dominanten DNA-Absorption lag diese jedoch im unteren Sensitivitätsbereich des Spektrometers. Deshalb wurde die Titration lediglich für die **ds-scHC3** durchgeführt, da für dieses Konstrukt die höchste Absorption festgestellt wurde, die direkt auf die Modifikation zurückgeführt werden konnte. Dabei wurde beobachtet, dass für **ds-scHC3** nach bereits nach einem Äquivalent des Kupfer(II)ions keine Veränderung der Absorption mehr stattfand. Ein ähnliches Verhalten wurde durch die Schmelztemperaturmessungen beobachtet und stützt die Hypothese, dass nur ein Kupferion komplexiert wird. Durch die CD-Messungen konnte nicht bestimmt werden, wie stark der Metall-Ligand-Komplex an der Basenstapelung beteiligt ist. Darüber könnten die Leitfähigkeitsmessung an einem STM Aufschluss geben.

3.2. Leitfähigkeitsmessungen am Rastertunnelmikroskop

Um die DNA und die Auswirkungen der in dieser Arbeit eingeführten Modifikationen einzelmolekülspektroskopisch zu charakterisieren, wurde die Technik der mechanisch-kontrollierten Bindungsbruch-Messungen gewählt. In diesem Kapitel werden der Aufbau mit Probenpräparation sowie die Messmethode und deren Auswertung exemplarisch für die HC-modifizierte DNA-Stränge in An- und Abwesenheit von Cu^{2+} -Ionen detailliert erläutert. Ziel war eine mögliche Steigerung der Leitfähigkeit über die HC-Kupfer-Komplexe zu bestimmen.

3.2.1. Aufbau und Messmethode

Zunächst soll der Aufbau eines STMs erläutert werden. Hierzu wird in Abbildung 34 eine Photographie der Messapparatur und Messzelle mit Probe gezeigt.

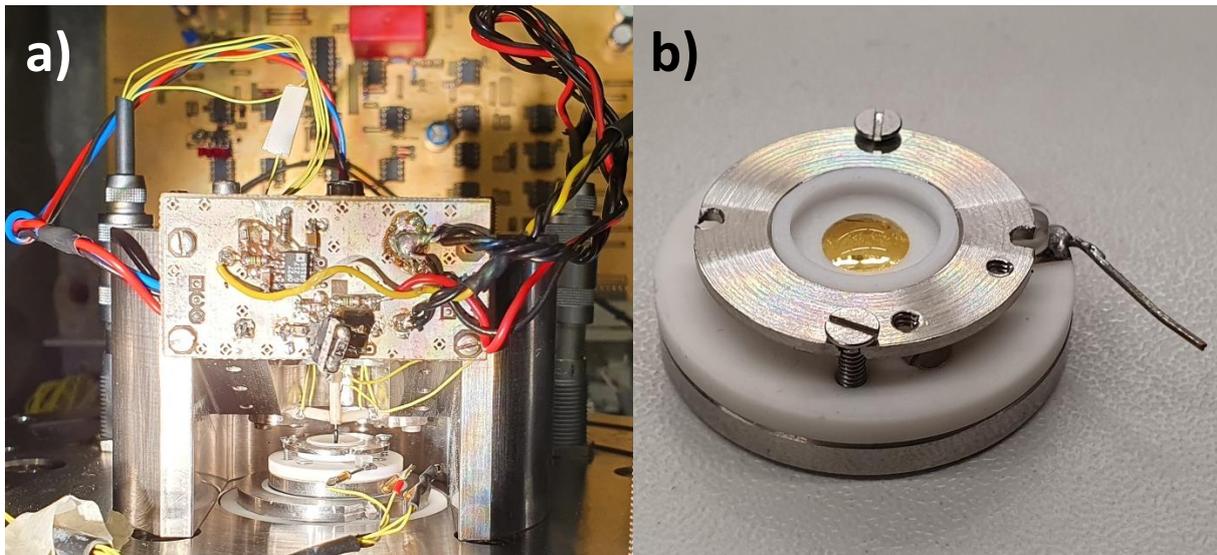


Abbildung 34 Photographien der Messapparatur a) und –zelle mit Probe b).

In a) ist der Gesamtaufbau gezeigt. Das STM ist ein Eigenbau des Arbeitskreises Schuster. Die ausgesprochen sensiblen Komponenten des STM machen es anfällig für thermische, mechanische und elektromagnetische Einflüsse. Rund um die Messapparatur wurden daher Vorkehrungen getroffen, um das STM bestmöglich von Umwelteinwirkungen abzuschirmen. Damit

frei von Vibrationen gearbeitet werden kann, steht das STM auf einer eigens ausgesägten Betonplatte. Zusätzlich ist die Apparatur an drei Seiten von Betonplatten umgeben, wobei der Messaufbau selbst über eine schwingungsdämpfende Aufhängung montiert ist. Zum Schutz vor elektromagnetischen Wellen und Konvektion sowie Vibration der Umgebungsatmosphäre wird ein Stahldeckel über die Messapparatur gestülpt. Die STM-Experimente finden in einer Flüssigkeitszelle statt, die in Abbildung 34 b) zu sehen ist. Durch die beschriebenen Maßnahmen verfügt das System über eine hohe mechanische Stabilität. Die Spitze wird im STM über ein Dreibein mit drei Piezoelementen bewegt, wie in der schematischen Ansicht in Abbildung 35 zu sehen ist. Für ein typisches Experiment wurde ein Probenträger, welcher aus einem mit 200 nm Au bedampften Saphirplättchen (8 x 8 mm und 50 μm Dicke) besteht, in einer Butan- gasflamme getempert, um eine Au-Oberfläche (111) zu erhalten. Danach wurden ein O-Ring und eine Messzelle, beide aus KEL-F™ gefertigt, über der Probe positioniert und mittels eines Stahlrings mit Schrauben verpresst und fixiert. Nach erfolgter Montage dieser Messzelle wurden 50 μL einer zuvor hybridisierten 10 μM DNA auf die Goldoberfläche aufgetragen und für 1 h inkubiert. Für Messungen unter Einfluss von Kupfer wurden die entsprechenden Äquivalente einer 100 μM CuCl_2 -Lösung vor der Hybridisierung zu der in PBS gelösten DNA zugegeben. In dieser Zeit sollte eine maximale Bedeckung der Oberfläche erreicht werden.^{[132] [133]} Die Goldspitzen des STMs wurden durch einen "Zieh-Schneide"-Vorgang aus einem Golddraht (0,25 mm Durchmesser, $\geq 99,9\%$ Reinheit) hergestellt. Der Golddraht wurde dabei unter starkem Zug und in einem sehr spitzen Winkel mit einer Feinblechschere geschnitten. Da die DNA im wässrigen Medium gemessen wurde, musste für einen definierten Tunnelstrom I_T die Spitze vor dem Experiment elektrisch isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde die Spitze durch geschmolzenes Apiezon™ getaucht, sodass eine möglichst kleine Fläche am Apex unter einem Mikroskop zu erkennen war. Nach Einstellung eines adäquaten Abstands zwischen Spitze und Probenoberfläche unter Nutzung einer Dummy-Zelle, wurde die fertig inkubierte Probe analog zu Abbildung 35 eingebaut.

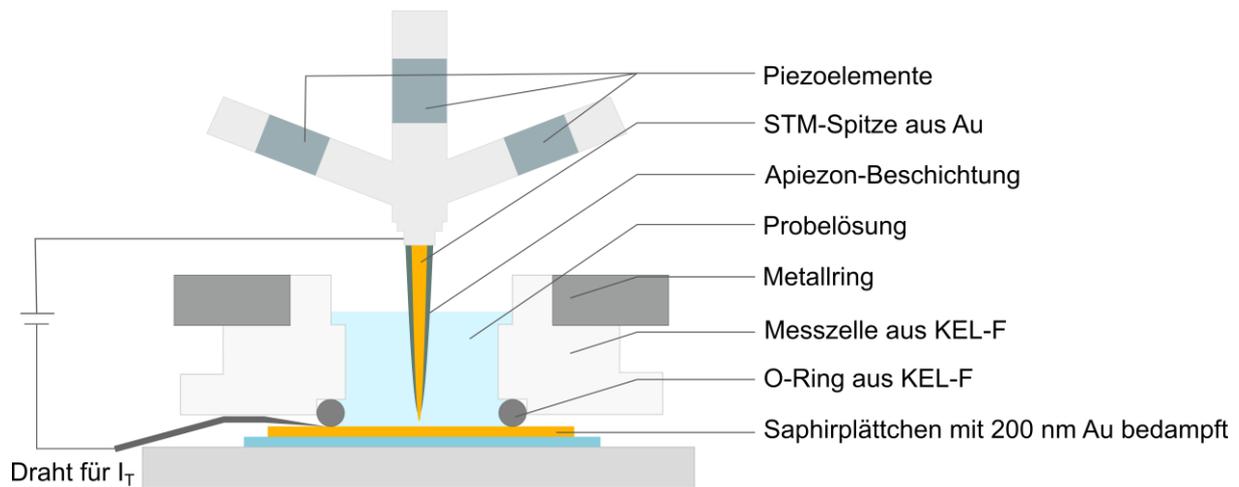


Abbildung 35 Schematische Anordnung von STM-Spitze und Flüssigkeitsmesszelle.

Nachdem der Aufbau und die Probenpräparation erläutert wurden, wird im Folgenden auf die Messmethode und deren Auswertung eingegangen. Das dabei verwendete Mess- und Auswertungsprogramm für diese Experimente wurde im Arbeitskreis Schuster entwickelt und durch diesen zur Verfügung gestellt. Das Messprogramm bewegt die Spitze solange in Richtung der Oberfläche, bis ein voreingestellter Sollstrom erreicht ist. Sobald der Maximalstrom erreicht wird, wird die Spitze kontinuierlich zurückgezogen bis ein vorgestellter Minimalstrom erreicht wird. Die Geschwindigkeit, mit der die Spitze zurückgezogen wird, kann im Messprogramm eingestellt und der Probe angepasst werden. Während des Zurückziehens wird der Tunnelstrom kontinuierlich aufgezeichnet. Der Vorgang eines einzelnen Zurückziehens der Spitze wird im weiteren Verlauf als Einzelmessung bezeichnet. Um später eine fundierte Aussage über die Leitfähigkeit eines Moleküls treffen zu können, muss eine aussagekräftige Statistik erstellt werden. Die Gesamtheit aller Einzelmessungen wird als Messung eines Moleküls bezeichnet. Für eine Messung wurden 500 Einzelmessungen aufgenommen, um eine Fehlinterpretation der von Störquellen erzeugten Daten zu minimieren. Solche Fehler können extern durch zufällige Ereignisse wie Vibrationen verursacht werden oder als intrinsische Fehler, wie ein ungleichmäßiges Abreißen des Golddrahtes, die Eigenbewegung der Spitze oder andere auftreten. Zur Vermeidung der Fehlerquellen wurde die Messmethode zunächst nur mit dem Lösungsmittel durchgeführt, um eine sogenannte Hintergrundmessung (engl. *blank measure-*

ment, *Blank*-Messung) zu erhalten. Damit können später bei der Auswertung mögliche Einflüsse des Lösungsmittels und der Messmethode selbst, wie z.B. Messartefakte, berücksichtigt werden. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass messbare Effekte auf das Zielmolekül zurückgeführt werden können. Die Kombination aus Molekülmessung und der dazugehörigen *Blank*-Messung wird als Experiment bezeichnet. Für die weitere Verfahrensweise wird aus dem Tunnelstrom I_T die Leitfähigkeit G berechnet, Gleichung 3.

$$G = \frac{I_T}{U_B} \quad \text{Gleichung 3}$$

In Gleichung 3 stellt I_T den Tunnelstrom und U_B den *Bias* dar. Beim Zurückziehen ohne Molekül müsste $\log(G)$ linear mit dem Abstand sinken. Der *Bias* stellt die Potentialdifferenz zwischen der Spitze und der Probenoberfläche des STMs dar. Die Barrierenbreite entspricht dem Abstand d von der Spitze zur Oberfläche in einer Einzelmessung, siehe Gleichung 2. Da der absolute Abstand zur Oberfläche schwierig festzustellen ist, wird d durch den relativen Abstand zur Oberfläche Δz ersetzt. Der relative Abstand zur Oberfläche Δz bezieht sich auf die zurückgelegte Strecke ausgehend von der Position, an der $I_{T,\max}$ erreicht wurde. Der gesamte gemessene logarithmierte Leitfähigkeitsbereich wird in gleich große Intervalle, sogenannte *bins*, unterteilt. Die Anzahl und damit die Größe dieser *bins* (bG) wird vor der Auswertung festgelegt. Die Datenpunkte innerhalb dieser *bins* werden aufsummiert. Diese aufsummierten Datenpunkte werden im Folgenden als *counts* bezeichnet und der jeweiligen Leitfähigkeit zugeordnet. Auf diese Weise lässt sich ein Einzelhistogramm der logarithmierten Leitfähigkeit einer Einzelmessung erstellen. Eine repräsentative Kurve, die während des Zurückziehens der Spitze aufgezeichnet wurde, ist zusammen mit dem zugehörigen Einzelhistogramm in Abbildung 36 dargestellt.

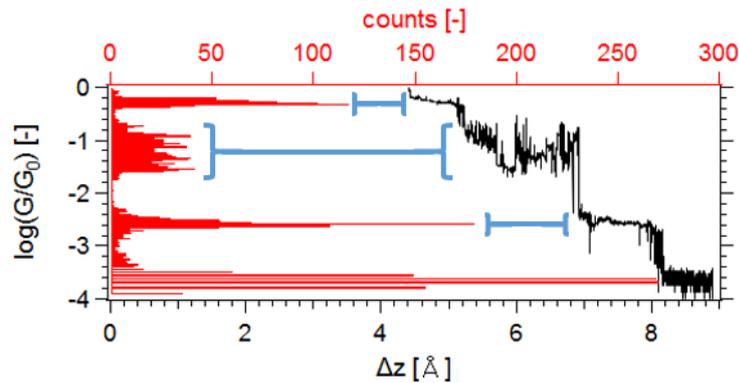


Abbildung 36 Exemplarische Einzelmessung (schwarz) mit resultierendem Einzelhistogramm (rot) einer DNA-Messung.

Die logarithmierte Leitfähigkeit als Vielfaches von Leitfähigkeitsquant $G_0 = 77.5 \mu\text{S}$ (engl. *conductance quantum*) in Abhängigkeit von Δz ist in Schwarz abgebildet und das daraus resultierende Einzelhistogramm ist in Rot dargestellt. G_0 ist die quantisierte elektrische Leitfähigkeit und bezogen auf einen monoatomaren Gold-Gold-Kontakt. Für diese Auftragung wäre für das Tunneln durch den Raum eine Gerade zu erwarten, wie oben beschrieben. Sobald ein leitfähiger Kontakt zwischen Spitze und Probenoberfläche hergestellt wird, sollte die Leitfähigkeit näherungsweise konstant bleiben und in der Einzelmessung als Parallele zur x-Achse zu sehen sein. Ein weiteres Merkmal für die Kontaktierung durch ein Molekül sollte eine abrupte Änderung in der Leitfähigkeit sein, wenn der Kontakt durch das Zurückziehen der Spitze gebrochen wird. Die Kombination beider Prozesse kann als Stufe in der Einzelmessung beobachtet werden, wie sie vielfach in der exemplarischen Messung von Abbildung 36 zu sehen ist. Diese Stufen führen im resultierenden Einzelhistogramm zu Leitfähigkeitsbereichen mit erhöhten *counts* oder sogar zu definierten Maxima. Die erhaltenen Einzelhistogramme werden aufsummiert. Die Summe aller Einzelhistogramme eines Experiments wird im Weiteren Leitfähigkeits-histogramm genannt. Die Leitfähigkeitshistogramme der folgenden Kapitel werden nur die relevanten Ausschnitte der Messungen enthalten.

3.2.2. STM MCBJ Messungen an HC-modifizierter DNA

Der erste Teil eines Experimentes ist die *Blank*-Messung. Damit die DNA in einer möglichst definierten Form vorlag, wurde 10 mM PBS als Medium verwendet. Daher wurde der Puffer als *Blank* dieser Reihe verwendet und auf die gleiche Weise präpariert, wie auch mit den Oligonukleotiden verfahren wurde. Das zugehörige Leitfähigkeitshistogramm ist in Abbildung 37 gezeigt.

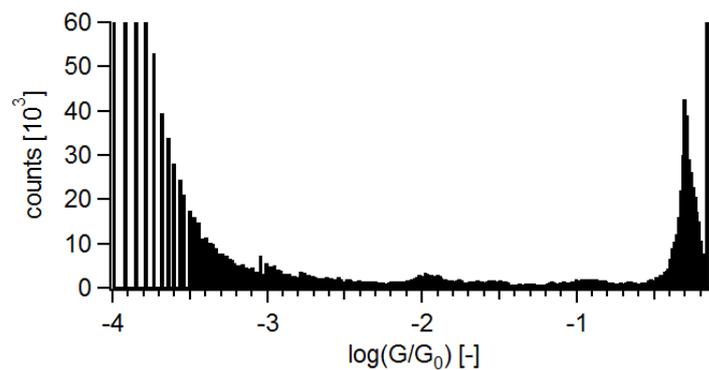


Abbildung 37 Leitfähigkeitshistogramm von Puffer, 500 Messungen. Bedingungen: 10 mM PBS, *Bias* $U_B = -0.20$ V, $R = 1$ M Ω , $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

Im Leitfähigkeitshistogramm des Puffermediums sind wenige charakteristische Merkmale zu verzeichnen. Für die Leitfähigkeiten $\log(G/G_0) \leq -3.50$ sind Leitfähigkeiten nur in unregelmäßigen Abständen gemessen worden, dennoch wurden vereinzelte Leitfähigkeiten vergleichsweise häufig gefunden. Von $\log(G/G_0) = -3.50$ bis $\log(G/G_0) = -3.00$ nehmen die *counts* bis auf unter $2 \cdot 10^3$ ab. Dieses Niveau wird bis $\log(G/G_0) = -0.50$ mit geringen Abweichungen gehalten. Um $\log(G/G_0) = -0.30$ sowie bei $\log(G/G_0) = -0.15$ sind zwei ausgeprägte Maxima zu beobachten.

Die ungewöhnliche Verteilung für $\log(G/G_0) \leq -3.50$ ist wahrscheinlich ein Digitalisierungsartefakt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Veränderung der Spitze und ihrer Isolierung dar. Wenn die Spitze beim Erreichen des Maximalstroms $I_{T,max}$ mit der Oberfläche in physischen Kontakt kommt, kann sich die Spitze verformen und darüber die Isolierung schädigen. Hierüber wären mit der Zeit verschiedene Ionenleitfähigkeiten durch die Lösung messbar. Der Anstieg der

Messwerte kann auf das Rauschen, verursacht durch den Tunnelstromverstärker, zurückgeführt werden. Die leicht erhöhten *counts* bei $\log(G/G_0) = -3.50$ werden als relativ häufiger Endpunkt der Einzelmessungen interpretiert. Die beiden ausgeprägten Maxima im Bereich $\log(G/G_0) \geq -0.50$ werden als häufige Startpunkte gedeutet. Diese Bereiche werden in den Diskussionen der Leitfähigkeitshistogramme verkürzt als Start- und Endpunkte bezeichnet. Folglich werden die Alternanz und die lokalen Maxima mit einer Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) \geq -0.50$ und $\log(G/G_0) \leq -3.50$ nicht weiter diskutiert.

Anhand der *Blank*-Messung konnte für dieses Messfenster gezeigt werden, dass der Puffer nur im Form von Leckstrom messbar ist. Als Leckstrom wird der Teil des Stroms bezeichnet, welcher im Gegensatz zum Tunnelstrom ungerichtet durch die Lösung fließt und zum Hintergrundsignal beiträgt. Des Weiteren ist daraus ersichtlich, dass die Spitze der Oberfläche sehr nah kommt, da $\log(G/G_0) = 0$ der theoretischen atomaren Leitfähigkeit eines monoatomaren Goldkontaktes entspricht. Der Vorteil, den Gold-Gold-Kontakt in der Messung direkt beobachten zu können, liegt darin, dass es darüber möglich ist, den Abstand zur Oberfläche abzuschätzen.

DNA bildet auf der Oberfläche keine perfekte monomolekulare Schicht aus, sondern aggregiert in kleinen Gruppen.^[132] Deshalb musste die Oberfläche auf Anhäufungen von Oligonukleotiden hin untersucht werden. Ein mit dem STM aufgenommenes Höhenprofil ist in Abbildung 38 gezeigt.

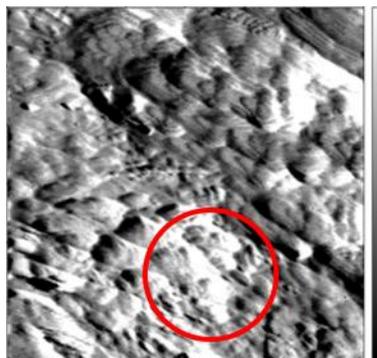


Abbildung 38 Delta eines STM-Bilds (200 nm x 200 nm) von Oligonukleotiden ds-schHC1 auf Au (111). Bedingungen: 10 μM Duplex mit 1.5 eq CuCl_2 in 10 mM PBS; *Bias* $U_B = -0.10$ V, $R = 1$ M Ω .

Dargestellt ist eine mit dem STM aufgenommene Abbildung der Goldoberfläche, welche genutzt wurde, um Bereiche mit agglomerierten Oligonukleotiden zu lokalisieren. Eine solche Stelle mit einem für die Messung interessanten Höhenprofil ist rot markiert. Die Spitze kann dann über das Bildgebungsprogramm an dieser Stelle positioniert und die STM MCBJ Messungen durchgeführt werden.

Zu Beginn der DNA-Experimente wurde das Kontrollsystem **ds-Un** gemessen, um die Leitfähigkeit der Sequenz des Kontrollsystems abschätzen zu können.

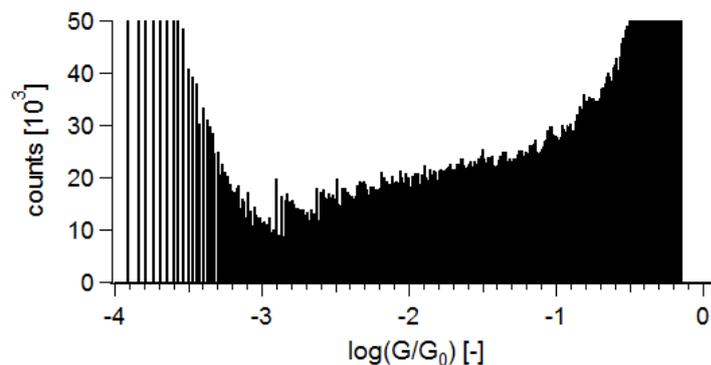


Abbildung 39 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-Un**, 500 Messungen. Bedingungen: 10 μ M Duplex, 10 mM PBS, *Bias* $U_B = -0.30$ V, $R = 1$ M Ω , $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

Im Leitfähigkeitshistogramm von **ds-Un** nehmen die *counts* von den Startpunkten an ab. Bei $\log(G/G_0) = -2.90$ wird ein lokales Minimum erreicht. Danach nehmen die *counts* der Leitfähigkeiten zu den Endpunkten hin wieder zu. Im Bereich $-2.92 \leq \log(G/G_0) \leq -2.10$ sind mehrere kleine Charakteristika in der Messwertverteilung zu beobachten. Diese Ausprägung kann am deutlichsten im Bereich zwischen $\log(G/G_0) = -2.65$ und $\log(G/G_0) = -2.92$ beobachtet werden. Von $\log(G/G_0) = -2.65$ ausgehend nehmen die *counts* zu und erreichen bei $\log(G/G_0) = -2.84$ ein lokales Maximum. Daran anschließend treten die beobachteten Leitfähigkeiten weniger häufig auf.

Der Bereich um $-2.92 \leq \log(G/G_0) \leq -2.10$ wird als potentielle Leitfähigkeitsbereich der DNA **ds-Un** angenommen, da dieser Bereich in dem *Blank* nicht in dieser Ausprägung zu beobachten war. Eine präzisere Angabe der Leitfähigkeit, wie sie in der Literatur häufig zu finden ist, kann

für dieses Experiment nicht getroffen werden. Die relativ breite Verteilung kann unter anderem mit der enormen Flexibilität der DNA begründet werden. In Abbildung 40 zeigt a) den idealen Zustand während einer STM MCBJ Messung. Daneben kann die DNA auch eine direkte Koordination mit einer oder beiden Elektroden wie in b) eingehen, wodurch entweder einer oder beide Linker nicht an der Leitung involviert wären. Durch die Bewegung der Spitze könnte die Helix verformt werden. In c) ist eine mögliche Stauchung gezeigt, während im Gegensatz dazu in d) die Streckung bis hin zur lokalen Dehybridisierung zu sehen ist.

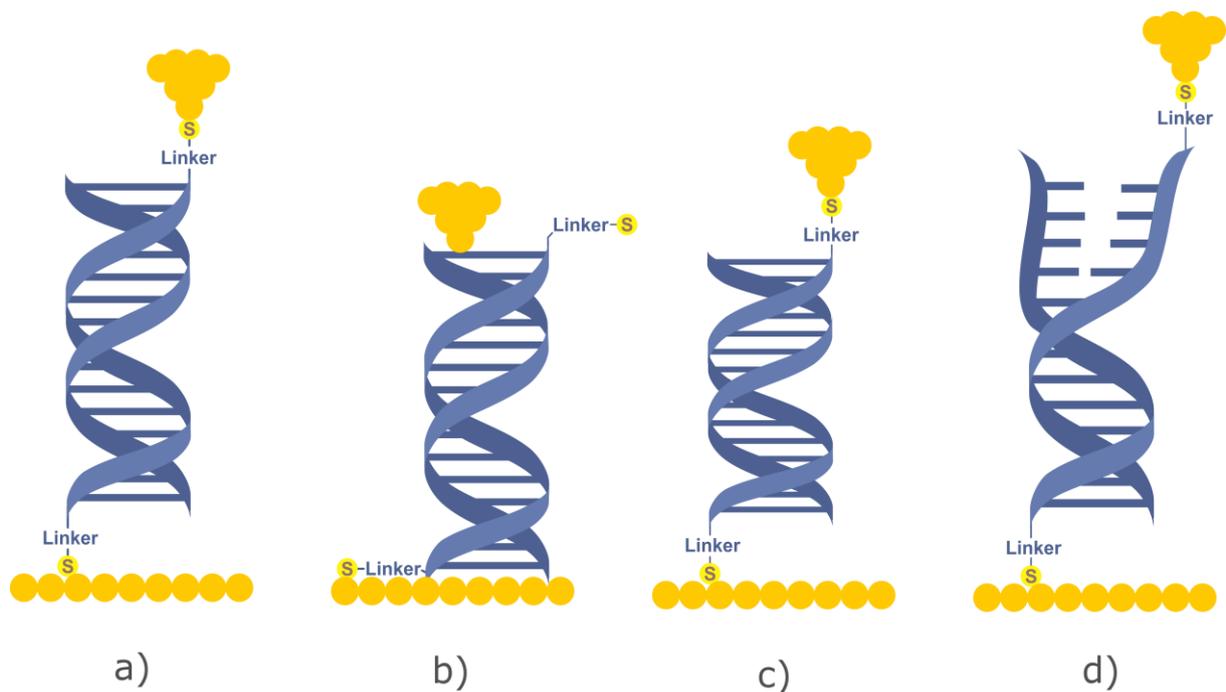


Abbildung 40 Schematische Darstellung verschiedener Orientierungen der DNA während der Kontaktbildung mit beiden Gold-Elektroden.

Um den Effekt der Cu^{2+} -Ionen auf die DNA zu untersuchen, wurde das Kontrollsystem **ds-Un** vor der Hybridisierung mit 4.5 eq CuCl_2 versetzt und mit der STM MCBJ Methode untersucht.

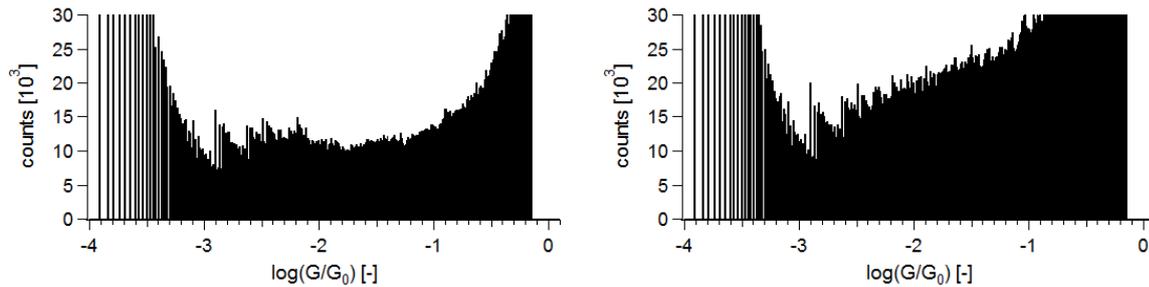


Abbildung 41 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-Un** mit a) und ohne b) Cu^{2+} , 500 Messungen. Bedingungen: je $10 \mu\text{M}$ Duplex, 10 mM PBS, a) 0 eq CuCl_2 , b) 4.5 eq CuCl_2 , Bias $U_B = -0.30 \text{ V}$, $R = 1 \text{ M}\Omega$, $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

Abbildung 41 zeigt in a) die Messung von $10 \mu\text{M}$ **ds-Un** in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen und zum Vergleich in b) die auch Abbildung 41 zugrundeliegende Messung ohne zusätzliche Additive. Aus dem Vergleich wird ersichtlich, dass das Hintergrundsignal in dem Experiment mit Kupfer deutlich geringer ist und sich über einen weiten Verlauf bei einem näherungsweise konstanten Wert von etwa $11 \cdot 10^3 \text{ counts}$ befindet. Die lokalen Maxima konnten reproduziert werden und sind im Vergleich zur vorherigen Messung etwas prägnanter. Das Ausbleiben neuer Charakteristika führt zu dem Schluss, dass die Cu^{2+} -Ionen keinen direkten Einfluss auf das Leitfähigkeitsverhalten der DNA nehmen.

Im Rahmen der Experimente mit **ds-Un** konnte sowohl das Eigenverhalten der Helix mit beiden *n*-Propanthiol-Linkern, als auch die Verhaltensänderung durch Cu^{2+} -Ionen untersucht werden. Da die Einführung der HC-Modifikation in den Schmelztemperaturmessungen Auswirkungen auf die Stabilität des Duplexes zeigte, wurde auch **ds-scHC1** ohne Kupferionen vermessen.

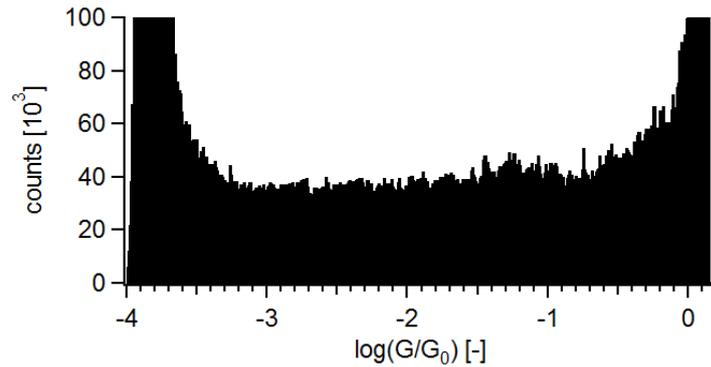


Abbildung 42 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-scHC1**, 500 Messungen. Bedingungen: 10 μ M Duplex, 10 mM PBS, Bias $U_B = -0.30$ V, $R = 1$ M Ω , $b_G = 0.009 \log(G/G_0)$.

Im Leitfähigkeitshistogramm von **ds-scHC1** in Abbildung 42 sind zwischen $\log(G/G_0) = -3.50$ und $\log(G/G_0) = -0.50$ keine ausgeprägten Maxima zu beobachten. Einzig die konstanten und relativ hohen *counts* von $38 \cdot 10^3$ sind bemerkenswert. Dies wird so interpretiert, dass das System im Raum zwischen Spitze und Oberfläche durch viele verschiedene Zustände beschrieben werden kann, wodurch die unterschiedlichen Leitfähigkeiten bei gleichzeitig hohen *counts* erklärt werden können. Basierend auf der Schmelztemperaturmessung von **ds-scHC1** wurde die Annahme getroffen, dass unter den Messbedingungen die DNA ausreichend stabil sei. Da in den zu erwartenden Bereichen von $\log(G/G_0) = -3.50$ bis $\log(G/G_0) = -2.50$ keine Charakteristika beobachtet werden konnten, gelang es nicht einen Leitfähigkeitsbereich für **ds-scHC1** zu bestimmen. Dieses Verhalten suggeriert, dass die DNA **ds-scHC1** unter den Messbedingungen nicht ausreichend stabil ist. Die Helix könnte während des Zurückziehens der Spitze aufschmelzen und so statt einer definierten Leitfähigkeit eine kontinuierliche Verteilung an Leitfähigkeiten erzeugen, wodurch das Verhalten kaum vom Tunneln durch den Raum unterschieden werden kann. Leider konnte kein Vergleich der Leitfähigkeiten zwischen **ds-Un** und **ds-scHC1** gezogen werden. Der Einfluss des Basensurrogatpaares auf die Helix kann daher nur unter dem Einfluss von Cu^{2+} -Ionen betrachtet werden.

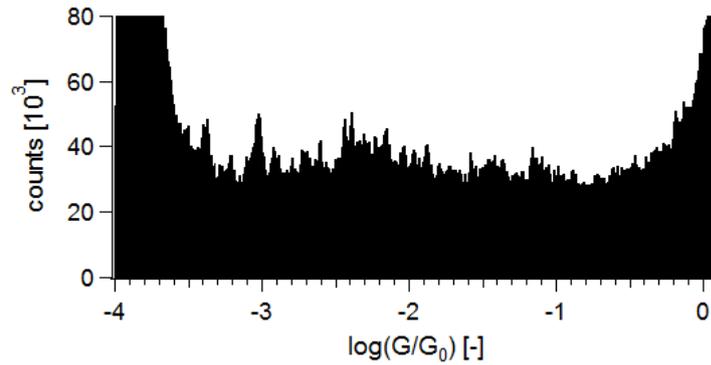


Abbildung 43 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-schHC1** mit Cu^{2+} , 500 Messungen. Bedingungen: 10 μM Duplex, 10 mM PBS, 1.5 eq CuCl_2 , Bias $U_B = -0.30$ V, $R = 1$ M Ω , $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

Abbildung 43 stellt das Histogramm von **ds-schHC1** mit 1.5 eq CuCl_2 dar. Das Hintergrundsignal liegt bei $32 \cdot 10^3$ counts und ist damit um $6 \cdot 10^3$ counts geringer als in der Messung ohne CuCl_2 , während die Verteilung der Leitfähigkeiten im Vergleich zum vorherigen Experiment stärker variiert. Bei $\log(G/G_0) = -3.38$ sowie $\log(G/G_0) = -3.04$ sind scharfe lokale Maxima zu sehen. Diese weisen im Maximum jeweils eine gemessene Häufigkeit von $\sim 48 \cdot 10^3$ counts auf und unterscheiden sich damit vom Hintergrundsignal um $16 \cdot 10^3$ counts. Der Leitfähigkeitsbereich von $\log(G/G_0) = -2.50$ bis $\log(G/G_0) = -1.85$ wurde ebenfalls signifikant häufiger gemessen. Das mit $51 \cdot 10^3$ counts höchste lokale Maximum liegt bei $\log(G/G_0) = -2.48$. Das Profil dieses Leitfähigkeitsbereiches ähnelt dem Messsignal, das für **ds-Un** beobachtet wurde. Auch hier nehmen von höheren zu niedrigeren Leitfähigkeiten die counts zu, bis das Signal einbricht. Für **ds-schHC1** mit 1.5 eq CuCl_2 ist dieser Sprung in der Signalintensität bei ungefähr $\log(G/G_0) = -2.49$ zu sehen.

Mit diesem Versuch gelang es durch Verwendung von **ds-schHC1** mit 1.5 eq CuCl_2 zwei neue ausgeprägte Maxima bei $\log(G/G_0) = -3.39$ sowie $\log(G/G_0) = -3.04$ zu messen. Die Interpretation dieser beiden Charakteristika ist nicht eindeutig. Maxima für $\log(G/G_0) \leq -2.90$ wurden in den vorherigen Messungen zwar bislang nicht detektiert, könnten jedoch im Zusammenhang mit **ds-schHC1** stehen, sollte die DNA kein Kupfer komplexiert haben. Zur Stützung dieser Interpretation wären Charakteristika in **ds-schHC1**-Messung ohne Kupfer notwendig gewesen. Der Leitfähigkeitsbereich von **ds-Un** konnte nicht eindeutig reproduziert werden.

Zuletzt zeigt die Betrachtung des Bereiches $-2.50 \leq \log(G/G_0) \leq -1.85$, dass hier sowohl im Vergleich zum Hintergrundsignal als auch zu den bisherigen Experimenten häufiger Leitfähigkeiten gemessen wurden.

In einem weiteren Experiment mit **ds-scHC2** sollte durch Zugabe von 3.0 eq CuCl_2 getestet werden, ob der zusätzliche HC-Kupfer-Komplex zu einem weiteren Leitfähigkeitsbereich mit erhöhten *counts* führen würde.

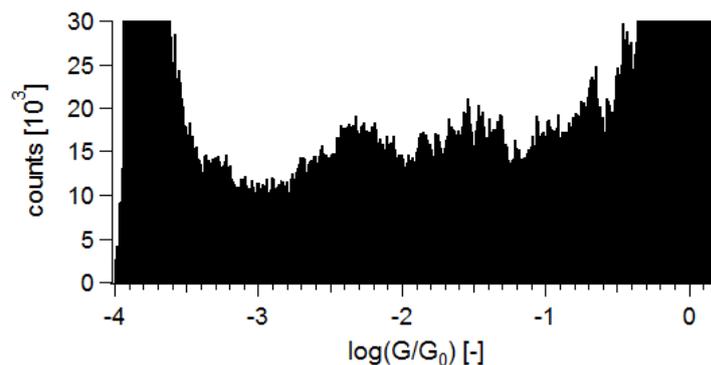


Abbildung 44 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-scHC2** mit Cu^{2+} , 500 Messungen. Bedingungen: 10 μM Duplex, 10 mM PBS, 3.0 eq CuCl_2 , Bias $U_B = -0.30$ V, $R = 1$ M Ω , $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

In Abbildung 44 ist das Hintergrundsignal bei $12 \cdot 10^3$ counts. Erhöhte Leitfähigkeitsbereiche können um $\log(G/G_0) = -3.30$, zwischen $\log(G/G_0) = -2.70$ und $\log(G/G_0) = -2.00$ sowie zwischen $\log(G/G_0) = -2.00$ und $\log(G/G_0) = -1.26$ verzeichnet werden. In diesem Experiment konnten zwei der drei Leitfähigkeitsbereiche von **ds-scHC1** mit 1.5 eq CuCl_2 reproduziert werden, während der erhöhte Bereich um $\log(G/G_0) = -3.04$ hier nicht beobachtet werden konnte. Daneben wurde ein zusätzlicher Leitfähigkeitsbereich mit erhöhten *counts* zwischen $\log(G/G_0) = -2.00$ und $\log(G/G_0) = -1.26$ detektiert. In Kontrast zu den vorherigen Experimenten zeigen die beiden dominanten Leitfähigkeitsbereiche einen gleichmäßigen Verlauf um das jeweilige lokale Maximum. Für den Bereich mit der geringeren Leitfähigkeit liegt das Maximum bei $\log(G/G_0) = -2.34$ und für den anderen Bereich bei $\log(G/G_0) = -1.55$. In dieser Versuchsreihe wurden Leitfähigkeiten über $\log(G/G_0) \geq -1.81$ nicht erwartet. Über eine Abschätzung, welche später in Kapitel 3.3. in Form der Gleichung 4 diskutiert wird, wurde eine Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) = -1.81$ berechnet.

Dieser Fall kann dahingehend interpretiert werden, dass eine der Linkereinheiten nicht am Tunnelprozess beteiligt ist, wie in Abbildung 40 in b) gezeigt.

Das Leitfähigkeitshistogramm lässt sich wie folgt interpretieren: Die schwach ausgebildete Schulter bei $\log(G/G_0) = -3.30$ wird der Leitfähigkeit der Helix ohne komplexiertes Kupfer zugeordnet. Der nächste Leitfähigkeitsbereich $-2.50 \leq \log(G/G_0) \leq -2.00$ wird als einfach komplexiertes Kupfer, und der Bereich von $-2.00 \leq \log(G/G_0) \leq -1.26$ der vollständigen Besetzung durch Kupfer interpretiert. Die Wahrscheinlichkeit, die einfache und die zweifache Komplexierung von Kupfer zu erfassen, ist in dieser Messung gleich hoch. Daher wurde mit dem System **ds-scHC3** überprüft, ob das beobachtete Verhalten intensiviert werden kann.

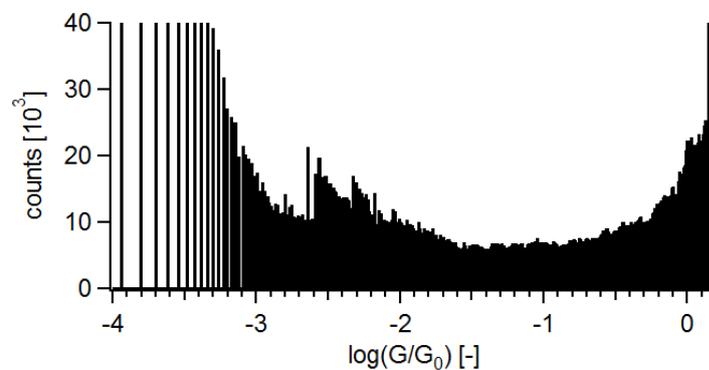


Abbildung 45 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-scHC3** mit Cu^{2+} , 500 Messungen. Bedingungen: 10 μM Duplex, 10 mM PBS, 4.5 eq CuCl_2 , Bias $U_B = -0.30$ V, $R = 1$ M Ω , $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

Das in Abbildung 45 dargestellte Leitfähigkeitshistogramm zeigt in Verbindung mit einem geringen Hintergrundsignal von $8 \cdot 10^3$ counts, lediglich einen Bereich mit erhöhten counts. Dieser Bereich liegt zwischen $-2.60 \leq \log(G/G_0) \leq -2.20$. Des Weiteren sind zwei eindeutige Maxima innerhalb dieser Grenzen zu sehen, $\log(G/G_0) = -2.57$ und $\log(G/G_0) = -2.30$.

Die Lage des Leitfähigkeitsbereichs wurde in den vorherigen Messungen auf den Einfluss eines komplexierten Kupfers zurückgeführt. Die Hypothese wird durch das Titrationsexperiment von **ds-scHC3** bestätigt, da auch hier nach einem Cu^{2+} -Äquivalent keine Änderung in der Absorption mehr zu beobachten war. Der Unterschied der beiden Maxima beträgt ungefähr $\Delta \log(G/G_0) = 0.30$ und entspricht der doppelten Leitfähigkeit. Auf molekularer Ebene könnten hier zwei Moleküle den Kontakt zwischen Spitze und Oberfläche herstellen.

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, Oligonukleotide über STM MCBJ Messungen zu analysieren und ihre Leitfähigkeit durch inkorporierte Cu^{2+} -Ionen zu erhöhen. Über die sukzessive Änderung einzelner Parameter konnte jeder einzelne Einfluss auf den Duplex nachvollzogen werden. Der Puffer nimmt im gewählten Messfenster keinen Einfluss. Das Kontrollsystem **ds-Un** weist unabhängig von der Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen einen Leitfähigkeitsbereich von $-2.92 \leq \log(G/G_0) \leq -2.10$ auf. Für den Doppelstrang **ds-scHC1**, der eine HC-Modifikation trägt, konnte ohne Addition von CuCl_2 kein Leitfähigkeitsbereich definiert werden. Dagegen wurden unter dem Einfluss von Kupfer mehrere Bereiche mit erhöhten Leitfähigkeiten festgestellt, der höchste lag bei $-2.50 \leq \log(G/G_0) \leq -1.85$. Die Messung des Duplexes mit zwei HC-Modifikationen, **ds-scHC2**, konnte zwei der drei Leitfähigkeiten von **ds-HC1** mit Cu^{2+} -Ionen reproduzieren und wies darüber hinaus noch einen zusätzlichen Leitfähigkeitsbereich bei $-2.00 \leq \log(G/G_0) \leq -1.26$ auf. Dagegen zeigte **ds-scHC3** lediglich einen Bereich mit erhöhten *counts* für $-2.60 \leq \log(G/G_0) \leq -2.20$ und glich in seinem Verhalten der Messung von **ds-scHC1** mit Kupfer. Dieser Befund steht im Einklang mit den im vorherigen Kapitel 3.1.2 beschriebenen spektroskopischen Titrationsexperimenten.

Aus dieser Studie kann folglich geschlossen werden, dass das hier verwendete 11mer mit *n*-Propanthiol-Linker unabhängig der HC-Modifikationen eine Leitfähigkeit zwischen $\log(G/G_0) = -3.38$ und $\log(G/G_0) = -2.90$ besitzt. Durch die Komplexierung von Cu^{2+} -Ionen im Inneren des Basenstapels konnte die Leitfähigkeit um ungefähr eine halbe Größenordnung auf $-2.50 \leq \log(G/G_0) \leq -2.00$ verbessert werden. Bei zwei komplexierten Cu^{2+} -Ionen wurde die Leitfähigkeit nochmals um die gleiche Größenordnung verbessert. Eine der wesentlichen Erkenntnisse, die aus dieser Arbeit hervorgehen, ist, dass Cu^{2+} -Ionen das Leitfähigkeitsverhalten beeinflussen und deutlich verbessern können. Des Weiteren stabilisieren freie Cu^{2+} -Ionen die Helix und führen zu einer besseren Messbarkeit der Oligonukleotide. Die gemessenen Leitfähigkeitsbereiche der verschiedenen Duplexe werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Übersicht der gemessenen Leitfähigkeiten der DNA-Duplexe.

Duplex	Anzahl HC-Basensurrogatpaare	Äquivalente CuCl ₂	Gemessene Leitfähigkeiten [log(G/G ₀)]
ds-Un	0	0.0	$-2.92 \leq X \leq -2.10$
ds-Un	0	4.5	$-2.92 \leq x \leq -2.10$
ds-scHC1	1	0.0	n.b.
ds-scHC1	1	1.5	-3.38 -3.04 $-2.50 \leq X \leq -1.85$
ds-scHC2	2	3.0	-3.30 $-2.50 \leq X \leq -2.00$ $-2.00 \leq X \leq -1.55$
ds-scHC3	3	4.5	$-2.60 \leq X \leq -2.20$

3.3. Linkerabhängigkeit der STM MCBJ Messungen

Der in Kapitel 2.2. beschriebene Kontakt zu den Metallelektroden, namentlich Spitze und Oberfläche, kann durch eine funktionelle Gruppe hergestellt werden. Zu diesen funktionellen Gruppen gehören Thiole, Amine oder Carbonsäuren.^[134] Für die Experimente werden häufig Goldspitzen und -oberflächen verwendet, da Goldspitzen eine ausreichend gute Stabilität für die Messmethode aufweisen. Entsprechend wird das gleiche Metall für die Oberfläche verwendet, um keine Asymmetrie in das Messsystem einzuführen. Durch eine eventuelle Asymmetrie würde der *Bias* stark beeinflusst werden.

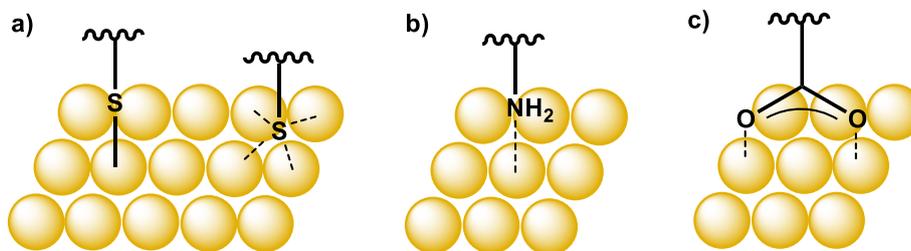


Abbildung 46 Schematische Darstellung der Ankergruppen mit ihren möglichen Bindungsmodi: a) Thiol, b) Amin und c) Carboxylat.

In Abbildung 46 werden die Ankergruppen und ihre möglichen Bindungsmodi dargestellt. Für Gold stellt die Thiol-Gruppe aus zwei verschiedenen Gründen eine geeignete Ankergruppe dar. Zum einen weist Schwefel eine große Affinität gegenüber Metall auf, wie beispielsweise Gold, zum anderen sind zwei verschiedene Bindungsmodi für die Schwefel-Gold-Bindung möglich, in a) zu sehen. Der Bindungsmodus des Moleküls hat einen beträchtlichen Einfluss auf die Leitfähigkeit. Im ersten Fall wird eine σ -Bindung ausgebildet, die beiden Atome befinden sich auf einer Bindungsachse. In dem alternativen Bindungsmodus ist das Schwefelatom zwischen mehreren Goldatomen koordiniert.^[135] Liegt diese Art der Bindung vor, ist eine höhere Leitfähigkeit im Vergleich zur σ -Bindung zu messen.^[134]

Amine hingegen weisen im Vergleich mit Thiolen eine schwächere Gold-Bindung auf und können nur einen Bindungsmodus ausbilden, wie in b) gezeigt. Gleichzeitig kann es von Vorteil für

die Messung sein, da nur eine Leitfähigkeit möglich ist und so zu einer schärferen Verteilung der Leitfähigkeit des Moleküls führt. Die schwächste Wechselwirkung mit Gold weisen Carbonsäuren auf, c).

Die Ankergruppe kann sich direkt am zu untersuchenden Molekül befinden oder über einen Linker verknüpft sein. Einer der gebräuchlichsten Linker ist dabei der *n*-Hexyllinker. Dieser Linker verfügt über eine gewisse Flexibilität und erlaubt für alle Ankergruppen eine vielfältige synthetische Anknüpfung, da kürzere Analoga aufgrund ihres niedrigen Siedepunktes meist schwierig in der Handhabung sind. So ist *n*-Hexanthiol als Standardmodifikation für DNA als Phosphoramidit oder an der Festphase gebunden kommerziell erhältlich. Das kürzere *n*-Propanthiol ist dagegen nur als Festphasenmodifikation verfügbar. Empirisch konnte im Zuge dieser Arbeit festgestellt werden, dass ein Einbau dieser Alkanthiol-Linker am Anfang der Sequenz zu Komplikationen führt. Durch die Mobilität des *n*-Hexyl-Linkers ist eine deutlich verlängerte Kupplungszeit notwendig, um die Kupplungseffizienz hoch zu halten.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Linker und zwei verschiedene Ankergruppen verwendet, um die Auswirkung auf die Messbarkeit der Leitfähigkeit in einem Experiment und die Leitfähigkeit an sich zu untersuchen. Zu Beginn wurde *n*-Hexanthiol verwendet, da diese Modifikation kommerziell erhältlich und unter den Immobilisationsstrategien weitverbreitet ist. Um das Messfenster entsprechend der Leitfähigkeit anzupassen, wurde unter Zuhilfenahme der Gleichung 3 aus einer Veröffentlichung von Tao *et al.* die Leitfähigkeit des *n*-Hexanthiol-Linker abgeschätzt.^[134]

$$G = A_N * \exp(-\beta_N N) \quad \text{Gleichung 4}$$

Gleichung 4 beschreibt die Leitfähigkeit G in Abhängigkeit der Molekül-Elektroden-Kopplungsstärke A_N , welche den Kontaktwiderstand widerspiegelt, der Tunnelstrom-Abnahme-Konstanten (engl. *tunneling decay constant*) β_N und der Anzahl an Methylenheiten N . Diese Gleichung 4 wird in der Publikation zur Berechnung von Alkandithiolen verwendet. Der Tunnelstrom I_T wird im Idealfall durch das gesamte Molekül, also durch beide Linker, geleitet, so dass bei ohmschen Verhalten die Leitfähigkeit der Linkereinheit halbiert wird. Auf diese Weise lassen sich die Leitfähigkeiten der Linker abschätzen.

Damit wurde eine Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) \geq -3.14$ für **ds-C0** abgeschätzt. Das Messfenster wurde für diese Leitfähigkeit angepasst, indem der Messwiderstand auf $R = 10 \text{ M}\Omega$ erhöht wurde. Auch in dieser Experimentreihe wurde PBS unter den veränderten Einstellungen gemessen und ein Leitfähigkeitshistogramm erstellt.

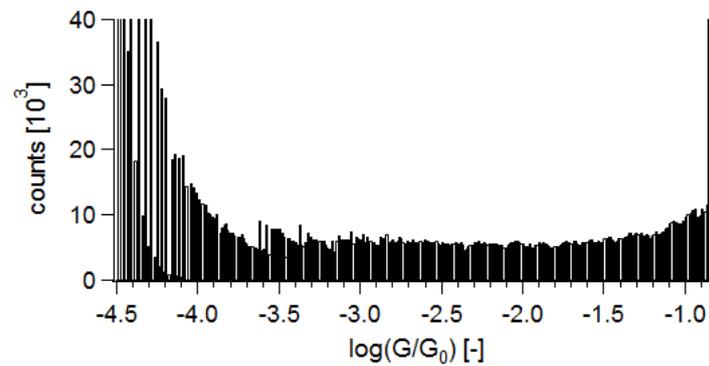


Abbildung 47 Leitfähigkeitshistogramm von Puffer, 100 Messungen. Bedingungen: 10 mM PBS, Bias $U_B = -0.10 \text{ V}$, $R = 10 \text{ M}\Omega$, $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

Abbildung 47 zeigt das Leitfähigkeitshistogramm der *Blank*-Messung in reinem Puffer bei einem Bias $U_B = -0.10 \text{ V}$. Zu sehen ist ein relativ konstantes Hintergrundsignal von $8 \cdot 10^3 \text{ counts}$. Für $\log(G/G_0) = -4.30$ ist eine leicht erhöhte Anzahl an *counts* sowie die in Kapitel 3.2.2 beschriebene Alternanz sichtbar. Die vermehrt festgestellten Leitfähigkeiten von $\log(G/G_0) \geq -0.85$ wurden als Startpunkt vieler Messungen interpretiert. Darüber hinaus weist dieses Leitungshistogramm keine Charakteristika auf. Die Erkenntnis aus diesem Experiment besteht darin, dass die Leitfähigkeit des Puffers in diesem Messfenster nicht relevant ist. Im Bereich der berechneten Leitfähigkeit der kombinierten Linker ist $\log(G/G_0) \geq -3.14$ ist keine Auffälligkeiten im Histogramm zu erkennen.

In Abbildung 48 ist die zu untersuchende Sequenz **ds-C0** abgebildet. Sie wurde so konzipiert, dass die Sequenz möglichst GC-reich ist, um eine hohe Leitfähigkeit und thermische Stabilität zu erreichen.

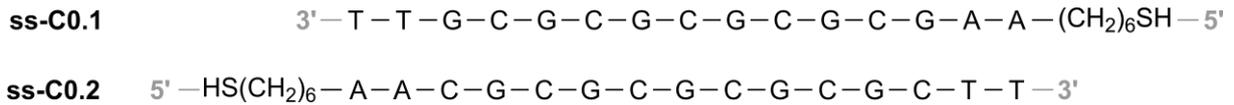


Abbildung 48 Sequenz des Doppelstrangs **ds-C0** aus den kommerziell erhaltenen DNA **ss-C0.1** und **ss-C0.2**.

Die DNA **ds-C0** wurde entsprechend der Vorgehensweise aus Kapitel 3.2. als STM-Probe präpariert, vermessen und ausgewertet. Das daraus erstellte Leitfähigkeitshistogramm ist in Abbildung 49 zu sehen.

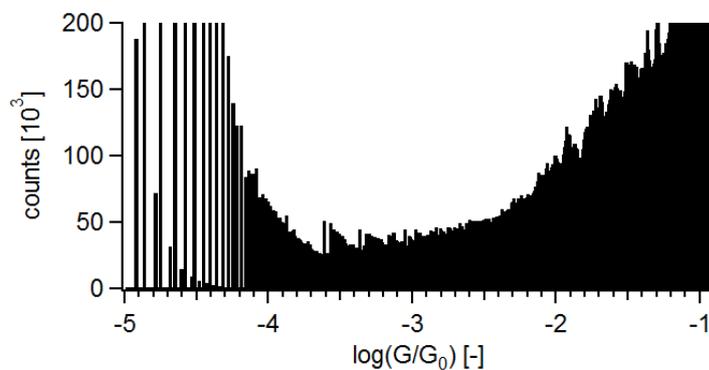


Abbildung 49 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0**, 500 Messungen. Bedingungen: 10 μ M Duplex, 10 mM PBS, *Bias* $U_B = -0.10$ V, $R = 10$ M Ω , $bG = 0.009 \log(G/G_0)$.

In der Abbildung 49 wird das Leitfähigkeitshistogramm des Duplex **ds-C0** gezeigt. Die Messwerte für höhere Leitfähigkeiten $\log(G/G_0) \geq -1.70$ sind stark erhöht. Zwischen $\log(G/G_0) = -1.70$ und $\log(G/G_0) = -2.70$ nimmt die Anzahl der gemessenen Leitfähigkeitswerte ab. Für Leitfähigkeiten $\log(G/G_0) \leq -2.70$ ist die Abnahme stetiger, aber geringer. Der Graph zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf wie die Puffermessung. Einzig zwischen $\log(G/G_0) = -3.30$ und $\log(G/G_0) = -3.55$ sind kleinere lokale Maxima zu erahnen, deren Signifikanz jedoch nicht ausreicht, um sie als DNA-Leitfähigkeit zu interpretieren. Ein möglicher Grund könnte die hohe Flexibilität der Linker mit sechs Methyleneinheiten sein. Bedingt durch die im Verlauf der **ds-C0**-Messungen aufgetretenen Probleme wurde die Position eines Thiol-Linkers verändert.

Die Sequenz des Gegenstrangs wurde folglich verändert und der Linker wurde nicht am 5'-, sondern am 3'-Ende des Doppelstrangs angebracht. Der resultierende Doppelstrang **ds-C0r** wird in Abbildung 50 dargestellt.

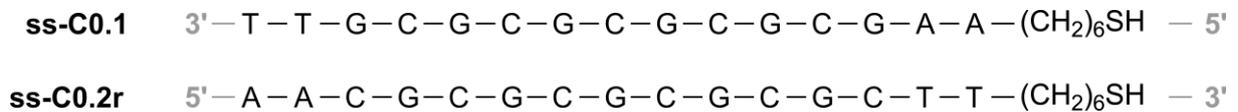


Abbildung 50 Sequenz des Doppelstrangs **ds-C0r** aus den kommerziellen DNA **ss-C0.1** und **ss-C0.2r**.

Die Tatsache, dass sich beide Thiol-Linker auf der gleichen Seite der Helix befinden, sollte sowohl die Flexibilität verringern als auch die Leitfähigkeit erhöhen. Die Leitfähigkeit würde sich auf diese Weise bei ohmschen Verhalten verdoppeln. Die Realisierung für eine STM MCBJ wäre jedoch nur unter der Bedingung gegeben, dass die Nukleobasen an dem den Linkern entgegengesetzten Terminus mit der Spitze einen Kontakt bilden können. Diese Annahme wird durch zwei Publikationen gestützt. In der ersten wurde das Leitfähigkeitsverhalten von Terephthalsäure und einem ihrer Derivate untersucht, wobei zwei verschiedene Leitfähigkeiten gemessen wurde. Eine der Leitfähigkeiten wurde der Kontaktbildung über die Carboxylgruppe und die zweite der Leitung durch das aromatische π -System zugeschrieben.^[136] In der zweiten Publikation wurde DNA mit einem einzigen terminalen Thiol-Linker im UHV analysiert, wodurch die zweite Kontaktbildung über die endständigen Nukleobasen erfolgt sein musste.^[102]

Auch für **ds-C0r** wurden die Leitfähigkeiten über die Gleichung 4 abgeschätzt. Die Berechnung eines Tunnelstroms durch einen Linker ergibt eine Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) = -2.83$ und bei Kontaktierung über beide Linker eine Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) = -2.57$. Da das zuvor verwendete Messfenster geeignet zu sein scheint, wurden die STM MCBJ mit **ds-C0r** mit denselben Parametern durchgeführt und die folgende Abbildung 51 als Leitfähigkeitshistogramm erhalten.

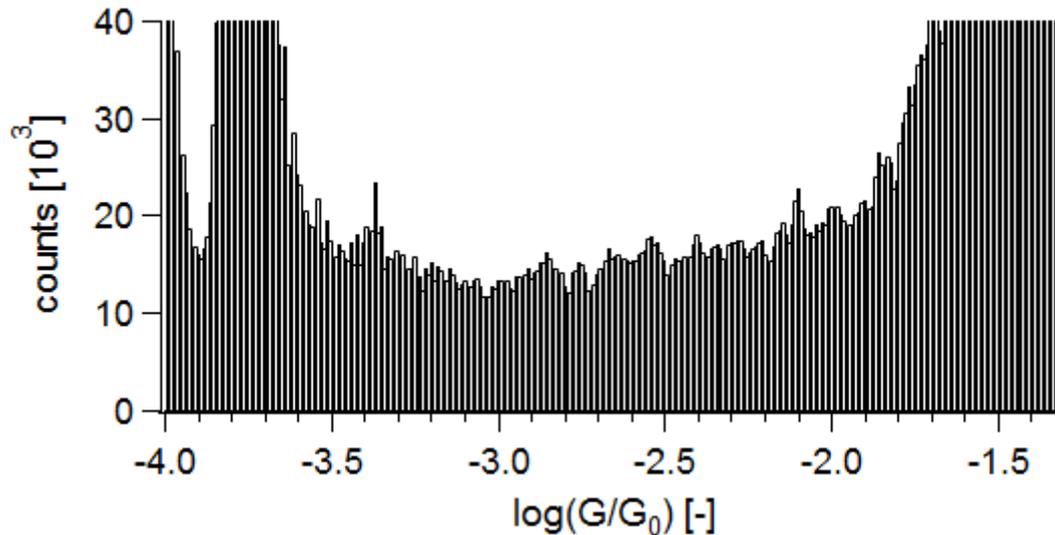


Abbildung 51 Leitfähigkeitshistogramm **ds-C0r**, 100 Messungen. Bedingungen: 10 μ M Duplex, 10 mM PBS, Bias $U_B = -0.30$ V, $R = 10$ M Ω , $bG = 0.005 \log(G/G_0)$.

Das Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0r** weist einige häufig gemessenen Leitfähigkeiten um $\log(G/G_0) = -3.70$, $\log(G/G_0) = -3.35$ und $\log(G/G_0) = -1.30$ auf. Das häufigere Auftreten der Leitfähigkeiten bei $\log(G/G_0) = -3.70$ und $\log(G/G_0) = -1.30$ werden als häufig auftretende Start- und Endpunkt interpretiert. Das lokale Maximum bei $\log(G/G_0) = -3.35$ wurde in der Puffer-Messung nicht beobachtet und wird daher als Leitfähigkeit von **ds-C0r** interpretiert. Die Leitfähigkeit steht in guter Übereinstimmung mit der berechneten Leitfähigkeit von einer Linkereinheiten von $\log(G/G_0) = -2.83$. Für die zweite berechnete Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) = -2.53$ sind zwei Leitfähigkeitsbereiche vorhanden, die sich jedoch kaum vom Hintergrundsignal abheben. Diese beiden Bereiche liegen bei $-2.50 \geq \log(G/G_0) \geq -2.70$ und $-2.80 \geq \log(G/G_0) \geq -3.00$. Die Differenz von $\Delta \log(G/G_0) = 0.30$ zwischen den Leitfähigkeitsbereichen könnte durch die Leitung des Tunnelstroms I_T durch zwei verbrückende Duplexe erklärt werden. Die geringen Intensitätsunterschiede im Vergleich zum Hintergrundsignal kann für dieses Messsystem durch den Kontakt des DNA-Moleküls mit der Spitze verursacht werden. Dabei sind mehrere Szenarien denkbar. Die Art der Kontaktbildung von Spitze und Nukleobase ist nicht definiert, es bieten sich mehrere mögliche Optionen, die in Abbildung 52 dargestellt werden.

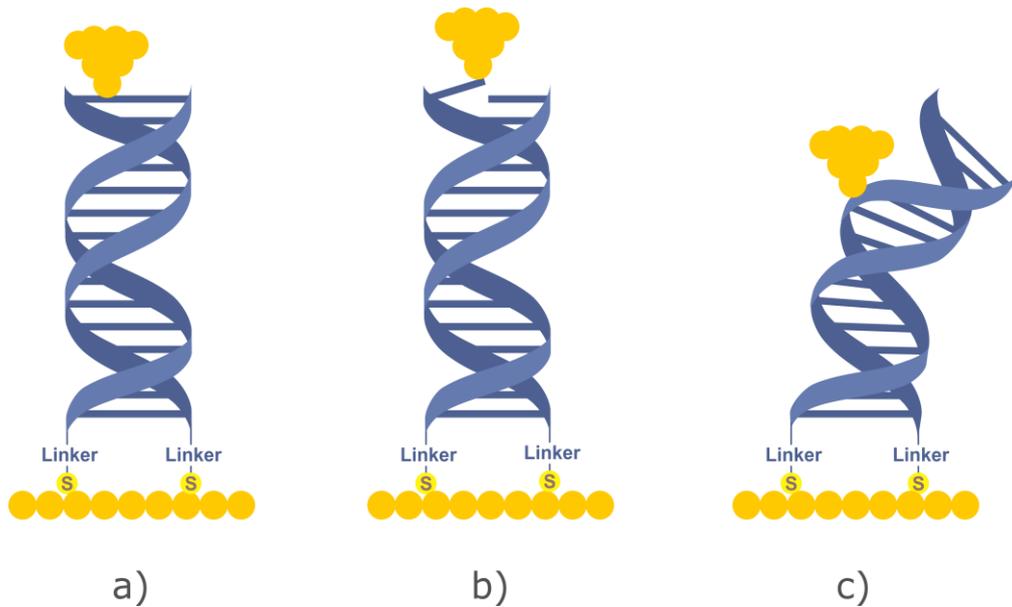


Abbildung 52 Schematische Darstellung verschiedener Koordinationsmöglichkeiten der Spitze an die Helix von **ds-C0r**.

In a) der Abbildung 52 wird der Kontakt zwischen Spitze und DNA-Molekül durch die Koordination der Spitze mit dem π -System gezeigt. Die Kontaktbildung entspräche hier der literaturbeschriebenen Interaktion zwischen Aromat und Spitze.^{[96] [137]} Im zweiten Fall, b), ist eine eher spekulative Möglichkeit dargestellt, in der der Duplex für eine Kontaktbildung zeitweise lokal dehybridisiert wird und so eine Wasserstoffbrückenbindung gebrochen wird. Dadurch würde eine Amin-Gruppe frei werden, welche anschließend einen Stickstoff-Gold-Kontakt bildet. Zuletzt besteht die Möglichkeit c), dass eines der Phosphate im Rückgrat an die Spitze koordiniert und einen Kontakt herstellt. Auf welche Art und Weise der Kontakt durch das Molekül geformt wird, könnte durch eine Messung mit einem leitfähigen AFM untersucht und über die erhaltenen Kraftkonstanten Aussagen über die Art des Kontakts getroffen werden. Abschließend ist festzuhalten, dass die Messbarkeit der Leitfähigkeit zugenommen, aber die Definition des Messsystems deutlich verloren hat. Um die Wirkung von Metallionen abzuschätzen, wurden weitere Probenmessungen mit diesem Duplex durchgeführt. Diese werden im späteren Abschnitt dieses Kapitels 3.4.1. besprochen.

Um die Flexibilität des Linkers einzuschränken, wurde von *n*-Hexanthiol auf *n*-Propanthiol verkürzt, wodurch und die Ergebnisse aus Kapitel 3.2. erhalten wurden. Die verkürzten Linker erleichterten die Messbarkeit und reduzierten den Widerstand.

Daher stellte sich die Frage, inwieweit dieser Trend noch weiter ausgebaut werden kann, wo für der in Abbildung 53 gezeigte Linker aus der Publikation von Benner *et al.* ausgewählt wurde.^[138]

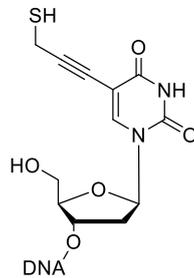


Abbildung 53 Schematische Darstellung des Linkerbaustein ULink (**4**) in einer ds-DNA.

Als 2-Desoxyuridinderivat weist **4** alle gewünschten Eigenschaften auf. Der Linker ist als Propargylthiol relativ kurz, jedoch mit ausreichendem Abstand zur Base, um eine sterisch weitgehend ungestörte Kontaktbildung zu ermöglichen. Darüber hinaus ist eine Thiol-Gruppe für die stabile Kontaktbildung vorhanden und aufgrund der Dreifachbindung sollte der neue Linker eine geringere Barrierenhöhe im Vergleich zu zwei Methyleneinheiten gewährleisten. Zuletzt wird durch die direkte Anbindung an die Nucleobase der Umweg über die Phosphatgruppe und der 2'-Desoxyribose vermieden. Durch diesen Linker sollte die Effizienz der Ladungsleitung wesentlich gesteigert werden. Die Syntheseroute für den Linker **4** ist in Abbildung 54 illustriert.

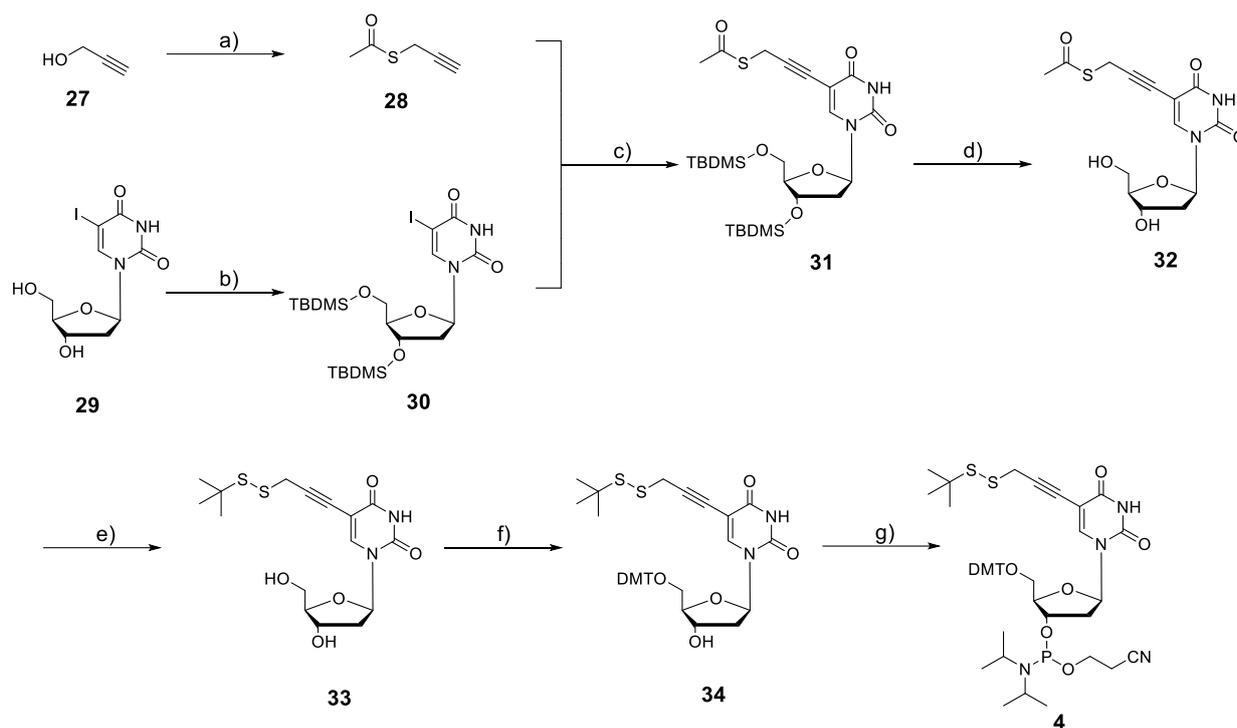


Abbildung 54 Synthese des Linkerbausteins ULink (**4**): a) PPh_3 , DIAD, Propargylalkohol, Thioessigsäure, THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{Rt}$, 7 h, 93 %; b) TBDMSCl, Imidazol, DMF, Rt , ü.N., quant.; c) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, NEt_3 , DMF, lichtgeschützt, Rt , ü.N., 49 %; d) $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$, THF, 16 h, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{Rt}$, 92 %; e) Di-*tert*-butyl-1-(*tert*-butylthio)-1,2-hydrazindicarboxylat, Lithiumhydroxid, MeOH, Rt , 1.5 h, 63 %; f) DMTCl, DMAP, Pyridin, Rt , ü.N., 54 %; g) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-*iso*-propylaminochlorphosphoramidit, DIPEA, DCM, Rt , 3 h, 68 %.

Zunächst wird Propargylalkohol (**27**) in einer Mitsunobu-Reaktion in den Thioester **28** überführt.^[138] Trotz des hohen Siedepunkts verfügt das Produkt über einen sehr gut wahrnehmbaren üblen Geruch. In der zweiten Reaktion wird von der in Syntheseroute von Benner *et al.* abgewichen und das 5-Iod-2'-desoxyuridin (**29**) mit TBDMSCl an der 3'- und 5'-Hydroxylfunktion geschützt. Darauffolgend wurde die Linkereinheit **28** durch eine Sonogashira Kreuzkupplung an das geschützte Nucleosid **30** geknüpft und so die Grundstruktur des Linkers erhalten. Die Abweichung von der Literatur wird dadurch begründet, dass unter den Reaktionsbedingungen das gewünschte Reaktionsprodukt nicht isolierbar war. Stattdessen wurde das Nucleosid **30** und das Glaser-Produkt von **28** erhalten. Durch die Schutzgruppen konnte die säulenchromatographische Aufreinigung mit *n*-Hexan/Ethylacetat (3:1) unter optimierten Bedingungen durchgeführt werden, wodurch eine effizientere Aufreinigung erzielt wurde. Hierbei un-

terschieden sich Edukt und Produkt deutlich in ihrer Retention bei der Dünnschichtchromatographie um $\Delta R_f = 0.3$. Nachdem die Schutzgruppen mit Hilfe des $\text{NEt}_3 \cdot 3 \cdot \text{HF}$ -Komplexes entfernt wurden, konnte entsprechend der Publikation verfahren werden. Im nächsten Schritt wurde eine spezifische Disulfidschutzgruppe für das Thiol eingeführt. Dazu wurde der Methylthioester mit Lithiumhydroxid verseift und durch den Zerfall eines Schwefeltransferreagenzes ein *tert*-Butylthiolrest auf das unter diesen Bedingungen frei vorliegende Thiol übertragen. Daran schlossen sich die bereits erläuterten DMT-Schätzung der 5'-OH-Gruppe sowie die 3'-terminale Einführung der Phosphorgruppe an. Die anschließende automatisierte Festphasensynthese konnte mit dem finalen Phosphoramidit **4** erfolgreich durchgeführt werden. Hierfür wurde das Phosphoramidit als 0.1 M Lösung in ACN sowie eine Kopplungszeit von sechs Minuten verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Systeme untereinander zu erhalten, wurde die Sequenz von **ds-Un** gewählt. Während der *n*-Propanthiol-Linker am Zucker-Phosphat-Rückgrat angebracht wurde, wurde die Modifikation **4** als weitere Base am 5'-Ende der Sequenz angefügt. Dies hat den Vorteil, dass die Modifikation nicht bei der Festphasensynthese stören kann, da sie die letzte Erweiterung in Syntheserichtung darstellt, wie in Abbildung 55 zu sehen ist.

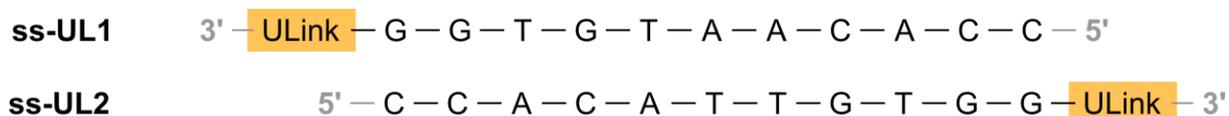


Abbildung 55 Sequenz des Duplexes **ds-UL** aus **ss-UL1** und **ss-UL2**.

Üblicherweise wird ULink **4** in der Sequenz in Paarung mit einem 2'-Desoxyadenosin inkorporiert. In diesem Fall jedoch wurde eine Oligonukleotidsequenz gewählt, in der die Modifikation als Überhang eingebaut wird und die daher im Vergleich zur basengepaarten Variante flexibler ist. Das kleine Zugeständnis zugunsten der Flexibilität sollte später die Wahrscheinlichkeit erhöhen, einen leitfähigen Kontakt zu bilden.

Bei der Hybridisierung wurde eine verminderte Temperatur von $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ verwendet, um die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Thiol-In-Reaktion zu minimieren. Diese Additionsreaktion kann durch UV-Strahlung, Wärmeenergie oder radikalisch gestartet werden und wird aufgrund der effektiven Umsatzraten häufig zu den Click-Reaktionen gezählt.^[139]

Weil die DNA **ds-Un** mit Kupfer(II)ionen eine etwas verbesserte Stabilität in den STM Messungen aufwies, wurde für dieses Experiment nach der Hybridisierung ebenfalls ein divalentes Metallion Mg^{2+} hinzugegeben und mit dem doppelsträngigen Oligonukleotid für 30 min inkubiert. Das Magnesiumion besitzt gegenüber dem Kupfer(II)ion den Vorteil, dass es unter Standardbedingungen nicht redoxaktiv ist und daher die unerwünschte Thiol-In-Reaktion nicht begünstigen sollte. Für die STM Probe wurden unter den gleichen Bedingungen 50 μ L einer 10 μ M DNA-Lösung in 10 mM PBS mit 10 mM Magnesiumacetat präpariert.

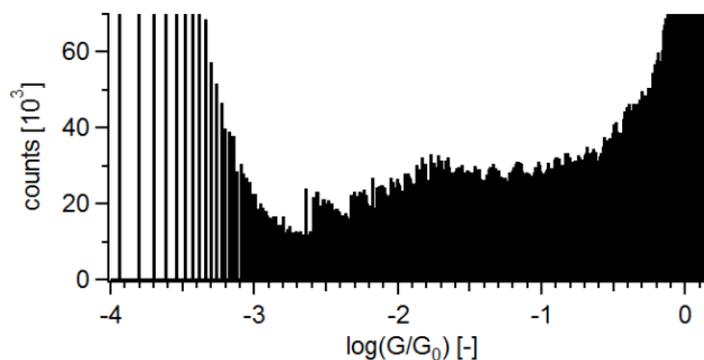


Abbildung 56 Leitfähigkeitshistogramme von **ds-UL**, 500 Messungen. Bedingungen: 10 μ M Duplex, 10 mM PBS, 10 mM $Mg(OAc)_2$, Bias $U_B = -0,30$ V $R = 10$ M Ω , $bG = 0,009 \log(G/G_0)$.

In Abbildung 56 ist das Leitfähigkeitshistogramm von **ds-UL** zu sehen. Bei Messwerten $\log(G/G_0) \leq -3,20$ sind die gemessenen Leitfähigkeitswerte unregelmäßig verteilt und steigen stark an. Von $\log(G/G_0) = -2,80$ bis $\log(G/G_0) = -1,70$ ist eine Zunahme von $12 \cdot 10^3$ counts auf $30 \cdot 10^3$ counts zu verzeichnen. Bis $\log(G/G_0) = -0,60$ herrscht eine gleichmäßige Verteilung der gemessenen Leitfähigkeiten. Danach ist bis $\log(G/G_0) = 0,15$ ein steiler Anstieg zu beobachten. Des Weiteren ist die Form der Zunahme hochinteressant, da sie aus vielen kleinen lokalen Maxima zu bestehen scheint. Das lokale Maximum mit der geringsten gemessenen Leitfähigkeit liegt zwischen $\log(G/G_0) = -2,65$ und $\log(G/G_0) = -2,40$. Der Trend der Leitfähigkeit zwischen $\log(G/G_0) = -2,80$ bis $\log(G/G_0) = -1,70$ wurde in dieser Form weder in dem PBS- noch in anderen DNA-Experimenten beobachtet.

Die unregelmäßige Verteilung für Leitfähigkeiten $\log(G/G_0) \leq -3.20$ ist vermutlich auf die Regelung des Messsystems beim Verstärken des geringen Tunnelstroms zurückzuführen. Der Messbereich zwischen $\log(G/G_0) = -2.80$ bis $\log(G/G_0) = -1.70$ wird als Leitfähigkeit der DNA **ds-UL** gewertet. Die vielen kleineren Spitzen im diesen Bereich könnten für unterschiedliche Konformationen stehen, die das Molekül während der Kontaktbildung einnehmen könnte. Da die Linkereinheit bewusst als Überhang in der Sequenz eingebaut wurde, konnte hierdurch das Konzept bestätigt werden. Jedoch zeigt dieses Histogramm, dass die modifizierte Base für weitere Versuche besser mit einem Adenosin als Basenpaar vorliegen sollte, um eine klarer definierte Struktur zu liefern. Ein weiteres Ergebnis des Experiments ist, dass Magnesiumacetat die Helix stabilisiert. Die Wahrscheinlichkeit, einen Doppelstrang so zu messen, dass ein verwertbares Messsignal erhalten wird, wurde dadurch erhöht. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.. Hier konnte der Leitfähigkeitsbereich der DNA **ds-Un** bei Zugabe von CuCl_2 besser vom Hintergrundsignal unterschieden werden.

In diesem Kapitel wurde der Effekt der Linkereinheiten auf die Duplexe analysiert. Als kontaktbildende Gruppen wurden Thiole und, im Fall von **ds-C0r**, das aromatische System einer Nukleobase verwendet. Darüber hinaus wurde die Anknüpfung der Linker an die DNA variiert. Einerseits wurde für **ds-C0** und **ds-Un** die konventionelle Methode angewandt, bei der die Linkereinheiten jeweils an einem Einzelstrang an den gegenüberliegenden Enden der Helix angeknüpft waren. Zum anderen hatten für **ds-C0r** beide Linker die selbe Orientierung, sodass eine Nukleobase den Kontakt zur Spitze ausbildete. Mit diesem Konzept konnten mit nur wenigen Messungen gut definierte Leitfähigkeitsbereiche für die DNA identifiziert werden. Die vielfältigen Möglichkeiten zur Kontaktbildung zeigen jedoch, dass das Messsystem nicht ausreichend definiert ist. Daneben wurde die Linkerlänge von sechs Methylenheiten, **ds-C0** und **ds-C0r**, auf drei für **ds-Un** reduziert. Die Verkürzung führte zu einem geringeren Widerstand innerhalb des Linkers und bei gleicher Anzahl an Einzelmessungen zu einem besseren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Die letzte Variation beinhaltet die Synthese des für die STM MCBJ Methode neuen Linkers **ULink**. Dieser konnte in den literaturbekannten Ausbeuten erhalten werden. Für die Sonogashira-Kreuzkupplung wurde von der literaturbeschriebenen Syntheseroute durch Verwendung des TBDMS-geschützten Nukleosid **30** abgewichen. Das Phosphoramidit **4** wurde erfolgreich in der Festphasensynthese in die Sequenz inkorporiert.

Mit diesem Linker konnte die Leitfähigkeit gegenüber dem n-Propanthiol-Linker verbessert werden, wie aus dem Vergleich von **ds-UL** mit **ds-Un** klar hervorgeht. Die Ergebnisse dieses Kapitels werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht der Linker und ihrer Eigenschaften.

ds-DNA	Sequenz	Ankergruppen	Anknüpfung	log(G/G ₀) (ber.)	log(G/G ₀) (gef.)	Signalstärke
ds-C0	AA(GC) ₆ GTT	n-Hexanthiol	Rückgrat	-3.14	-3.55 -3.30	sehr schwach
ds-C0r	AA(GC) ₆ GTT	n-Hexanthiol (zweifach) + π-System	Rückgrat (gleiche Orientierung)	1x = -2.83 2x = -2.57	-3.35 von -3.00 bis -2.50	schwach
ds-Un	G ₂ TGTACAC ₂	n-Propanthiol	Rückgrat	-1,81	von -2.89 bis -2.20	schwach
ds-UL	G ₂ TGTACAC ₂	Propargylthiol	Basen- modifikation	-/-	von -2.65 bis -2.40	gut

3.4. Interkalationsverbindungen als DNA-Modifikation

Bereits in Kapitel 2.1.2. wurde die Interkalation von Verbindungen in die Helix als Modifikationsstrategie neben dem kovalenten Einbau in die DNA eingeführt. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die Zielverbindung vergleichsweise unkompliziert durch Inkubation mit der hybridisierten DNA eingebracht werden kann und nicht über entsprechende Phosphoramidite während der Festphasensynthese in die Sequenz integriert werden muss. Doch nicht jede Verbindung erfüllt die Voraussetzungen für eine Interkalation in die π -Basenstapelung. In Kapitel 2.3. wurde anhand von Ethidiumbromid und Hoechst-Farbstoff^[114,140] sowie *Coralyne*^[115] gezeigt, dass nur die Interkalation in die π -Basenstapelung einen Effekt bezüglich der Leitfähigkeit aufweist. Nachteil der Interkalation ist, dass das System nicht vollständig definiert ist in Bezug auf die Anzahl der interkalierten Verbindungen. In diesem Kontext soll das Verhalten eines polykationischen metallierten Porphyrins und eines Spiropyrans untersucht und diskutiert werden.

3.4.1. Porphyrine

Die Porphyrine, welche in dieser Untersuchung verwendet wurden, konnten in der Reaktion von **8** zu **9** isoliert werden. Die Reaktion ist in Abbildung 57 dargestellt.

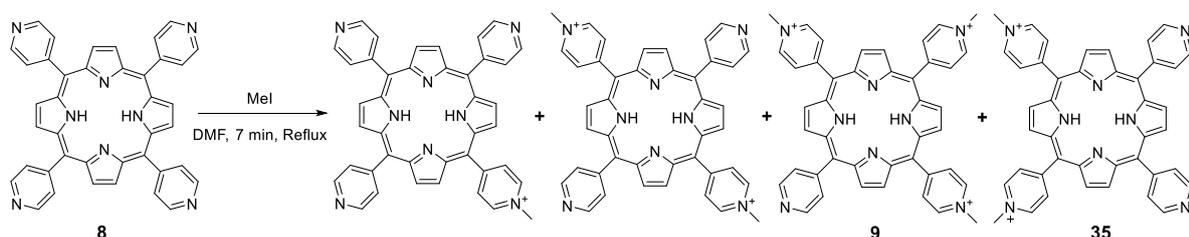


Abbildung 57 Methylierung von **8** zu **9** samt den Nebenprodukten.

Durch eine verlängerte Reaktionszeit wurde der Anteil an vierfach methyliertem Porphyrin erhöht. Durch die Isolation dieses Produkts ist nach erfolgreicher Metallierung, ähnlich zu der kovalenten Modifikation, der Einsatz des Porphyrins als Interkalationsverbindung möglich.

In Abbildung 58 sind die in dieser Arbeit verwendeten metallierten Porphyrine gezeigt. Sowohl Gold(III) als auch Kupfer(II) wurden wegen ihrer Leitfähigkeit und stabilen Porphyrinkomplexe ausgewählt.

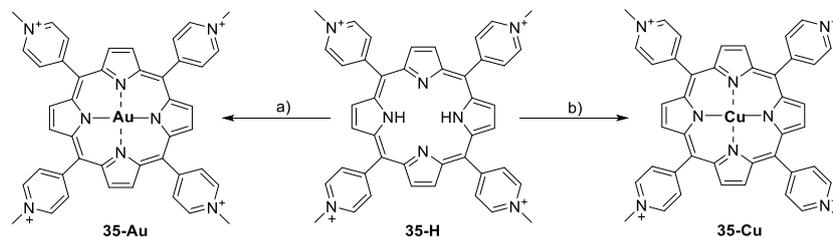


Abbildung 2 Metallierung des Porphyrins **35**: a) $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, H_2O , Pyridin, 80°C , ü.N., quant.; b) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, DMF, 80°C , ü.N., quant..

Die Metallierung beider Porphyrine verlief bei entsprechend langer Reaktionszeit quantitativ. Um eine möglichst hohe Löslichkeit und ein einheitliches Gegenion zu erzielen, wurden die Porphyrine jeweils in Methanol gelöst und mit dem Ionenaustauscher DOWEX 1x8-200 Cl^- ™ versetzt und konnten dann in STM MCBJ Experimenten untersucht werden.

Die hier beschriebenen Untersuchungen dienten als Vorarbeiten für die kovalent eingebauten Porphyrine **11** und **1**. Daher wurde für diese Experimente **ds-C0r** als Modellsystem verwendet, welche die Ankergruppen auf der gleichen Seite trägt. Für die Interkalationsexperimente wurde mit den jeweiligen Porphyrinen stets gleich verfahren. Die **ds-C0r** wurde zunächst ohne Porphyrin in PBS hybridisiert und anschließend auf die Oberfläche gegeben, um eine größtmögliche Belegungsdichte zu erhalten. Nach einer Stunde wurde das jeweilige Porphyrin hinzugegeben und nochmals für durchschnittlich eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Probe, wie in Kapitel 3.2. beschrieben, analysiert. Mit diesen Experimenten sollten primär die Programme zur Datenerhebung und Auswertung sowie die Einstellung des Messfensters auf ihre Funktionalität hin getestet werden. Die grundlegenden Verfahren zur Bestimmung der Leitfähigkeit und der Erstellung der Histogramme entsprechen den in Kapitel 3.2 beschriebenen Methoden. Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass diese Untersuchungen nur als Prüfung für den Messaufbau durchgeführt wurden und daher deutlich weniger Einzelmessungen vorgenommen wurden. Des Weiteren wurde noch eine vorläufige Messmethode verwendet, bei der sowohl die Bewegung der Spitze hin zur als auch von der Oberfläche weg in einer Einzelmessung ausgewertet wurde. Folglich können die Ergebnisse dieses

Kapitels als Tendenzen, nicht aber als Beweis für eventuelle molekulare Eigenschaften angesehen werden. Für die Porphyrine wurde eine weitere *Blank*-Messung durchgeführt, da Porphyrine zur Selbstassemblierung auf Goldoberflächen tendieren.^[141] Als Aromat zeigt Mesitylen eine Schichtenbildung auf einer Goldoberfläche^[137], ein Verhalten, welche mit der STM MCBJ Methode vermessen und eine Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) = -1.00$ bestimmt worden ist. Daher wurde das Porphyrin **35-Au** in PBS Puffer gemessen, um den Einfluss des Porphyrins in den Messungen zu bestimmen.

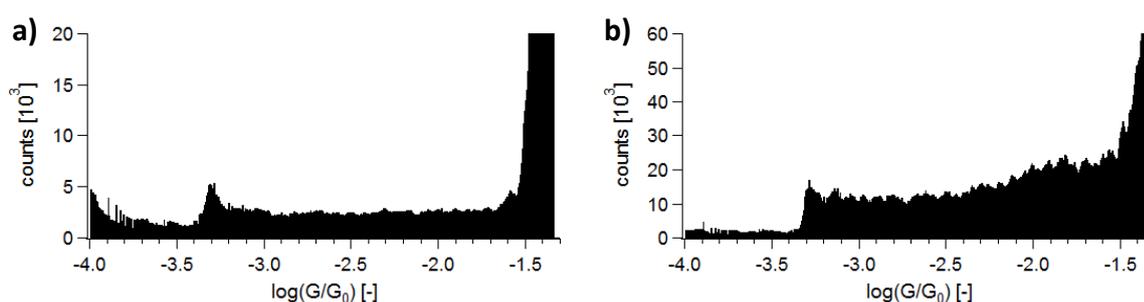


Abbildung 59 Leitfähigkeitshistogramme von **35-Au** in Puffer a) und Puffer b), je 50 Messungen. Bedingungen: a) 2.5 mM Porphyrin mit 10 mM PBS, b) 10 mM PBS, *Bias* $U_B = -0.30$ V, $R = 10$ M Ω , $bG = 0.005 \log(G/G_0)$.

Da die PBS Messung bereits in Kapitel 3.3. besprochen wurde, wird dieses Histogramm in b) lediglich aus Vergleichsgründen gezeigt. Das Leitfähigkeitshistogramm mit Porphyrin ist in Abbildung 59 a) dargestellt. Die Leitfähigkeit um $\log(G/G_0) = -1.50$ ist sehr ausgeprägt. Die erhöhte Leitfähigkeit bei $\log(G/G_0) = -3.30$ wurde als Umkehrpunkt der Spitzenbewegung zugeschrieben. Zwischen diesen beiden Punkten wurden die Leitfähigkeiten in nahezu gleicher Anzahl von circa $3 \cdot 10^3$ gemessen. Im Vergleich zur Puffer-Messung ist sowohl der Start- als auch der Endpunkt der **35-Au** Messung deutlich ausgeprägter. Während in der PBS Messung das Hintergrundsignal $12 \cdot 10^3$ counts beträgt, ist dieses in der **35-Au** Messung mit $12 \cdot 10^3$ counts vergleichsweise gering. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass beim Zurückziehen der Raum zwischen Spitze und Oberfläche bei der Puffermessung weniger definiert ist als bei der Porphyrin-Messung. Eine Hypothese ist, dass sich durch die oben beschriebene Adsorption der Porphyrine ein Schichtsystem aus **35-Au** auf der Oberfläche bildet, welches das Tunnelverhalten durch die Lösung über diese Schicht beeinflusst. In dem angegebenen Messfenster werden dadurch jedoch keine Charakteristika erzeugt.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass in diesem Messfenster weder PBS noch die Porphyrine einen signifikanten Einfluss auf die Messung nehmen und daher für die Versuchsreihe geeignet sind.

Die Leitfähigkeit des Duplex **ds-C0r** wurde bereits in Kapitel 3.2. (Abbildung 57) besprochen. Deshalb wird hier direkt die Messung dieser DNA unter dem Einfluss von **35-H** beschrieben. Obwohl der Fokus auf dem Effekt der interkalierten Metallionen liegt, muss hierfür zunächst der Einfluss des Porphyrins selbst auf die DNA beleuchtet werden. Sowohl Ethidiumbromid als auch *Coralyne* konnten das Leitfähigkeitsverhalten des Duplex beeinflussen.^[115] Die Interkalation erhöhte die Leitfähigkeit der doppelsträngigen DNA und im Falle von *Coralyne* wurde ein Diodenverhalten in einer STS Messungen beobachtet.

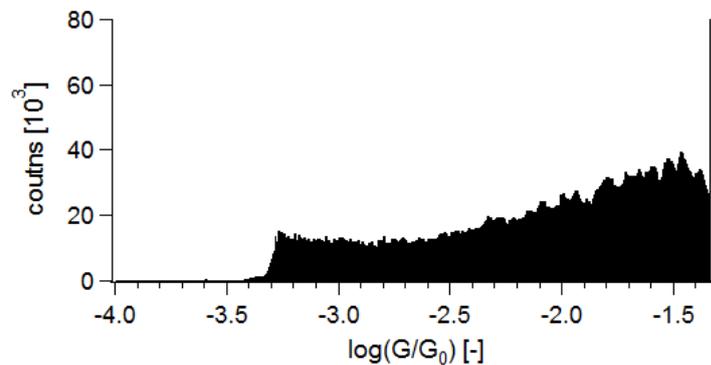


Abbildung 60 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0r** mit **35-H**, 50 Messungen. Bedingungen: 5.0 μM Duplex, 10 mM PBS, 2.5 mM Porphyrin, Bias $U_B = -0.30\text{ V}$, $R = 10\text{ M}\Omega$, $bG = 0.005 \log(G/G_0)$.

In Abbildung 60 ist das Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0r** mit dem Porphyrin **35-H** gezeigt, welches einen ähnlichen Verlauf wie die *Blank*-Messung aufweist und sich damit von der Porphyrin-PBS Messung unterscheidet. Generell sind nach 50 Messungen keine ausgeprägten Charakteristika zu beobachten. Die Anzahl der gemessenen Leitfähigkeiten des Experiments mit DNA und Porphyrin liegt im Bereich von $\log(G/G_0) = -2.00$ bis $\log(G/G_0) = -1.50$ zwischen $23 \cdot 10^3$ und $40 \cdot 10^3$ counts. Die Messung des Porphyrins liegt in diesem Bereich bei $\sim 3 \cdot 10^3$ counts. Dies wird als erhöhtes Auftreten einer Leitfähigkeit interpretiert, die auf Interaktion mit der DNA zurückgeführt werden kann. Um den genauen Einfluss des Porphyrins

auf die DNA zu bestimmen, ist ein Vergleich zwischen den Messungen der DNA in An- und Abwesenheit des Porphyrins von Nöten, wie in Abbildung 61 gezeigt.

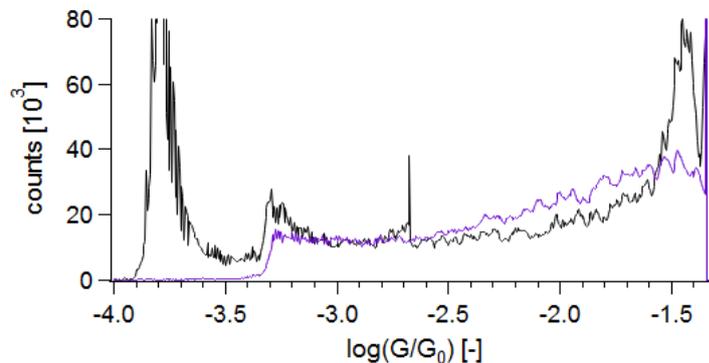


Abbildung 61 Vergleich der Leitfähigkeitshistogramme von **ds-C0r** ohne (schwarz) und mit Porphyrin **35-H** (lila), je 50 Messungen. Bedingungen: je 5.0 μM Duplex, 10 mM PBS, 2.5 mM Porphyrin, $Bias U_B = -0.30 \text{ V}$, $R = 10 \text{ M}\Omega$, $bG = 0.005 \log(G/G_0)$.

Der Vergleich zeigt, dass der Startpunkt um $\log(G/G_0) = -3.30$ und der Wendepunkt um $\log(G/G_0) = -1.4$ in der Messung von reiner **ds-C0r**, schwarzer Graph, signifikant häufiger gemessen wurden als in der Messung der DNA mit Porphyrin, lila Graph. Während der Leckstrom in der Messung ohne Porphyrin bei $\log(G/G_0) = -3.8$ noch deutlich sichtbar ist, kann dieser mit Porphyrin nicht mehr beobachtet werden. Zum einen sind im Vergleich beider Messungen die Signale der Messung von DNA ohne Porphyrin bei $\log(G/G_0) = -2.75$ und $\log(G/G_0) = -2.59$ in der Messung mit Porphyrin nicht mehr zu sehen. Zum anderen kann der Bereich von $\log(G/G_0) = -2.0$ bis $\log(G/G_0) = -1.5$ bei der Messung mit Porphyrin als vergleichsweise erhöht beschrieben werden. Durch den Vergleich der Messungen von **ds-C0r** mit **35-H** mit Messungen von Puffer, Puffer mit Porphyrin und DNA ohne Porphyrin wird das erhöhte Auftreten der höheren Leitfähigkeit von $\log(G/G_0) = -2.0$ bis $\log(G/G_0) = -1.5$ als Leitfähigkeitsverhalten der DNA interpretiert, die durch das Porphyrin **35-H** beeinflusst worden ist. Somit kann festgehalten werden, dass die Leitfähigkeit der DNA durch die Interkalation des tetrakationischen Porphyrins zu höheren Werten verschoben wird.

Weiterhin ist zu beobachten, dass die Signale des Duplex **ds-C0r** ohne Porphyrin bei $\log(G/G_0) = -2.75$ und $\log(G/G_0) = -2.59$ nicht in der Häufigkeit gemessen worden sind. Prinzipiell konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines tetrakationischen Porphyrins zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit führt.

Das Porphyrin selbst bewirkt durch Interkalation in den Basenstapel der DNA eine bessere π -Stapelung, wodurch das beobachtete Verhalten erklärt werden kann.

Die so erhaltenen Daten zeigten, dass die tetrakationischen Porphyrine für die Messungen geeignet sind und welchen Einfluss sie durch den aromatischen Zyklus auf die Helix ausüben. Die metallierten polykationischen Porphyrine konnten nun dafür eingesetzt werden, die Wirkung des komplexierten Metalls auf das Verhalten der DNA zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die beiden metallierten Porphyrine **35-Au** und **35-Cu** verwendet.

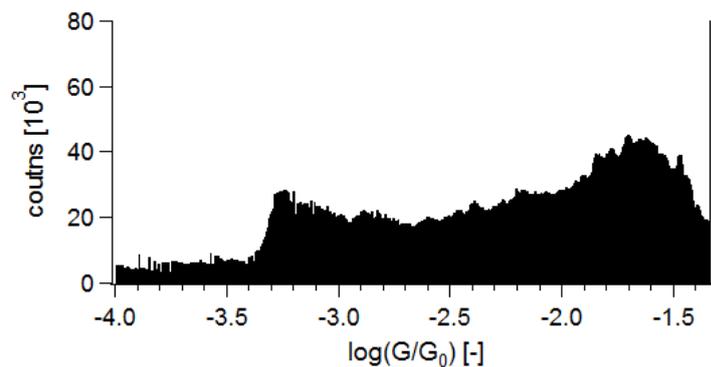


Abbildung 62 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0r** mit **35-Au**, 50 Messungen. Bedingungen: 5.0 μ M Duplex, 10 mM PBS, 2.5 mM Porphyrin, Bias $U_B = -0.30$ V, $R = 10$ M Ω , $bG = 0.005$ $\log(G/G_0)$.

Abbildung 62 zeigt das Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0r** mit dem Porphyrin **35-Au**. Der gemessene Tunnelstrom und die daraus resultierenden Leitfähigkeiten weisen die gleiche Verteilung wie die Messung der DNA mit metallfreien Porphyrin **35-H** auf. Auch für diese Messung sind die Signale der DNA bei $\log(G/G_0) = -2.75$ und $\log(G/G_0) = -2.59$ nicht mehr detektierbar, während der Bereich von $\log(G/G_0) = -1.90$ bis $\log(G/G_0) = -1.40$ erhöht ist. Das lokale Maximum mit dem Gold-Porphyrin **35-Au** ist etwas schmaler sowie um rund $2 \cdot 10^3$ counts höher als bei dem metallfreien Porphyrin. Die Annahme, dass ein Großteil des Porphyrins nicht metalliert vorliegen könnte, wurde über eine massenspektrometrische Analyse per ESI MS widerlegt. Dort wurden lediglich m/z -Signale der metallierten Spezies gefunden.

Darüber hinaus wurde **35-Cu** gemessen, da das Kupferanalogon leicht zugänglich ist. Durch eine entsprechende Anpassung der Kupferäquivalente in der CuAAC für eine kovalente Modifizierung, kann Kupfer beispielsweise in Porphyrin **11** insertiert werden.

Dieses Porphyrin wurde unter identischen Bedingungen vermessen, das dadurch erhaltene Leitfähigkeitshistogramm ist in Abbildung 63 zu sehen.

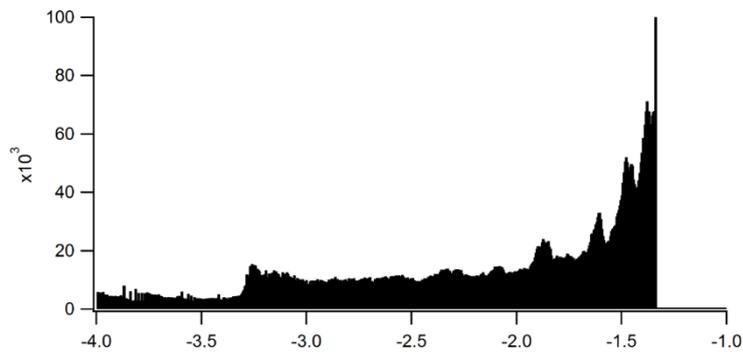


Abbildung 63 Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0r** mit **35-Cu**, 50 Messungen. Bedingungen: 5.0 μM Duplex, 10 mM PBS, 2.5 mM Porphyrin, *Bias* $U_B = -0.30$ V, $R = 10$ M Ω , $bG = 0.005 \log(G/G_0)$.

Im Leitfähigkeitshistogramm von **ds-C0r** mit **35-Cu** als Interkalationsverbindung sind weiterhin die Endpunkte des Experiments bei $\log(G/G_0) = -1.40$ zu sehen. Im Gegensatz zum goldmodifizierten Porphyrin sind bei der Verwendung des Kupferanalogons deutliche lokale Maxima bei $\log(G/G_0) = -1.90, -1.60, -1.45$ und -1.38 zu beobachten. Die beiden letzt genannten Maxima sind jedoch sehr nahe am Wendepunkt der Spitzenbewegung und sollten mit Vorbehalt betrachtet werden, da diese durchaus durch Messartefakte oder Veränderung der Spitze entstanden sein können. Das lokale Maximum, welches im Leitfähigkeitshistogramm der **ds-C0r** ohne Interkalationsverbindung noch sichtbar war, ist auch hier nicht zu sehen.

Abschließend werden die Leitfähigkeitshistogramme dieser Versuchsreihe gemeinsam in Abbildung 64 dargestellt.

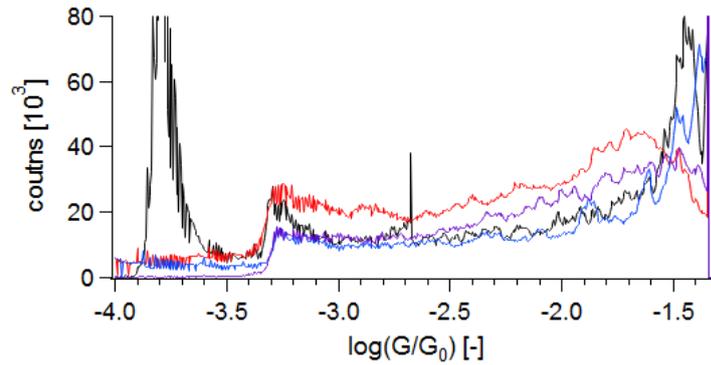


Abbildung 64 Zusammenfassung der Messungen der **ds-C0r** ohne (schwarz), mit **35-H** (lila), **35-Au** (rot) und **35-Cu** (blau), je 50 Messungen. Bedingungen: *Bias* $U_B = -0.30$ V, $R = 10$ M Ω , $bG = 0.005 \log(G/G_0)$.

In diesem Unterkapitel wurde der Einfluss verschiedener polykationischer Porphyrine als Interkalationsverbindungen auf das Leitfähigkeitsverhalten einer doppelsträngigen DNA untersucht. Aufgrund der geringen Anzahl an Einzelmessungen und der nicht optimierten Mess- und Auswertungseinstellungen muss angemerkt werden, dass alle hier dargestellten Ergebnisse nur als Tendenzen betrachtet werden können. Um uneingeschränkt valide Aussagen treffen zu können, müsste eine wesentlich größere Statistik erstellt und unter den optimierten Bedingungen durchgeführt und ausgewertet werden. Grundsätzlich lässt sich für alle Porphyrine feststellen, dass die Leitfähigkeit, welche für die **ds-C0r** bestimmt wurde, in keiner Messung als charakteristisch detektierbar ist. Diese Beobachtung lässt sich so interpretieren, dass die polykationischen Porphyrine erfolgreich in den π -Basenstapel interkalieren und das Verhalten der DNA beeinflussen. Dies wurde hier in Form eines nicht genauer definierten Leitfähigkeitsanstiegs beobachtet. Dabei ist zu beachten, dass dieser Effekt metallunabhängig ist. Das metallfreie Porphyrin **35-H** vermag bereits, die Leitfähigkeit um circa 1.5 Größenordnungen zu verbessern.

Abschließend lässt sich sagen, dass polykationische Porphyrine grundsätzlich für die Manipulation von DNA geeignet sind. Da in diesen Experimenten nur STM MCBJ als Analysemethode verwendet wurde, müssten weitere Experimente folgen, um das Ausmaß der Einflussnahme vollständig beurteilen zu können. So könnten in STS Experimenten unterschiedliche Redoxstufen der Metalle untersucht werden, sofern diese im Porphyrinkomplex auftreten können.

Weitere Messungen unter dem Einfluss von Licht oder Magnetismus sind grundsätzlich ebenfalls von Interesse. Dadurch könnte das Spektrum, mit dem DNA als Werkstoff beeinflusst werden kann, deutlich erweitert werden.

3.4.2. Spiropyran

Die Grundlage für dieses Unterkapitel bildet eine Veröffentlichung von Andersson *et al.*, in der das Interkalationsverhalten von Spiropyranen in Oligonukleotide über Absorptionsmethoden, UV/Vis und Lineardichroismus (LD) im Durchfluss beobachtet wurde. Für interkalierte Spiropyrane konnte eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums der offenen Merocyanin-Form festgestellt werden.^[142] Diese Wechselwirkung zwischen dem geöffneten Photoschalter und dem ausgebildeten π -System der gestapelten Nucleobasen sollte nicht nur Auswirkungen auf das Absorptions-, sondern auch auf das Leitfähigkeitsverhalten zeigen. Bei STM MCBJ Messungen mit Ethidiumbromid^[114] und *Coralyne*^[115] konnte DNA in ihrer Leitfähigkeit und Stabilität verbessert werden. Im Rahmen des vorangegangenen Kapitels dieser Thesis wurde dieser Effekt bereits für polykationische Porphyrine angewandt und analysiert.

Die Entwicklung einer derartigen photoschaltbaren Modifikation impliziert einige grundlegende Anforderungen. Deshalb wurde für die Untersuchung des Systems ein Spiropyran so konzipiert, dass es den Nucleobasen möglichst ähnelt, um eine effiziente Interkalation zu ermöglichen. Weiterhin sollte das Spiropyran elektronenreich sein, damit durch die Interkalation einen größtmöglichen Unterschied in der Einzelmolekülspektroskopie messbar wird. Als weitere Anforderung soll das Spiropyran eine kovalente Anknüpfungsmöglichkeit an die DNA bieten, um ein definiertes System zu erlangen. Zuletzt sollte der Photoschalter in seiner geschlossenen Form deutlich stabiler sein, um eine dauerhafte Interkalation zu vermeiden. Bei einer labilen offenen Form des Photoschalters sollte das π -System der Helix das interkalierte Moleküle stabilisieren und einen metastabilen Zustand herstellen. Dieser Effekt sollte sich im Schaltverhalten des Spiropyrans widerspiegeln und so für ein statisches Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Form sorgen. Durch Belichtung sollte das Gleichgewicht verschoben werden, wie in Abbildung 65 gezeigt wird.

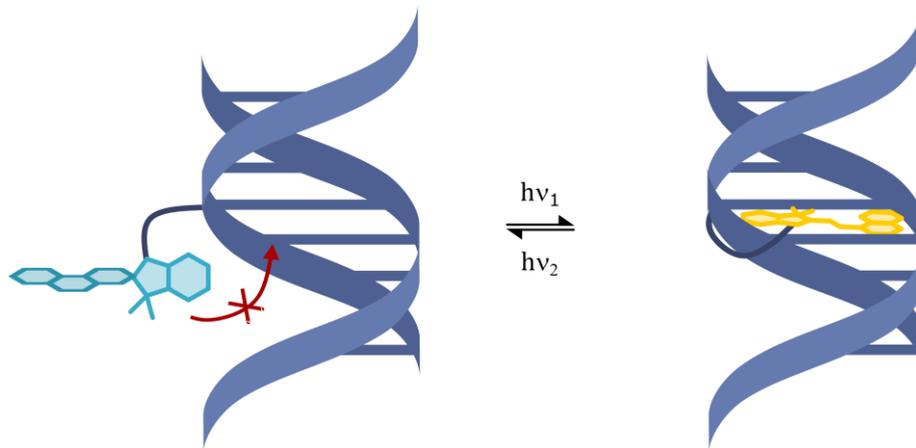


Abbildung 65 Schematische Darstellung zur lichtgesteuerten Interkalation eines Spiropyrans in einen Basenstapel.

Hierdurch ist ein perfekt manipulierbares Schaltelement auf molekularer Ebene möglich. Das Konzept sah auf Seiten der DNA vor, eine möglichst simple und kommerziell erhältliche Komponente wie Click-U zu verwenden. Daher wurde auf die CuAAC als Anknüpfungsmethode zurückgegriffen. Die Struktur des finalen Schaltmoduls ist in Abbildung 66 gezeigt.

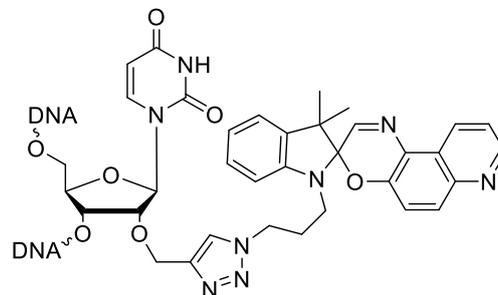


Abbildung 66 Schematische Darstellung eines Oligonukleotidausschnitts nach der postsynthetischen Anknüpfung des Spiropyrans **5** per CuAAC.

Die Grundstruktur des Spiropyrans **5** wurde entsprechend einer Publikation von Minkin *et al.* synthetisiert.^[143] In der Spiro-Form sollte es wegen der Verdrillung beider Zyklen nicht zur Interkalation kommen, wie links in Abbildung 65 zu sehen ist. Das konjugierte π -System der Merocyanin-Form sollte den Basenstapel beeinflussen können. In Acetonitril wurde für die offene Form eine Lebensdauer von nur $\tau = 6$ s bestimmt, woraus eine entsprechende Labilität

abgeleitet werden kann. Bei Bestrahlung der geschlossenen Spiro-Form mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{exc}} = 365, 300$ oder 260 nm wird das Spiropyran geöffnet und liegt anschließend planarisiert vor.^[143] Des Weiteren bilden der Indol- und der Chinolin-Teil des Moleküls ein konjugiertes π -System, welches zwitterionisch und ungeladenen als mesomere Grenzstruktur formuliert werden kann, wie in Abbildung 67 dargestellt ist. Es sei hier angemerkt, dass jeweils nur ein Konformationsisomer dargestellt wurde, aber noch zahlreiche weitere Konformere existieren. Für die ungeladene Merocyanin-Form wurden neun verschiedene Konformationsisomere vorgeschlagen, welche in Dichte-Funktional-Theorie-Studien bestätigt wurden.^[144] Die Zyklisierung von der Merocyanin- zur Spiro-Form kann mit sichtbarem Licht mit $\lambda_{\text{exc}} = 562$ und 600 nm oder thermisch bei Raumtemperatur induziert werden, wie in Abbildung 67 zu sehen ist.^[143]

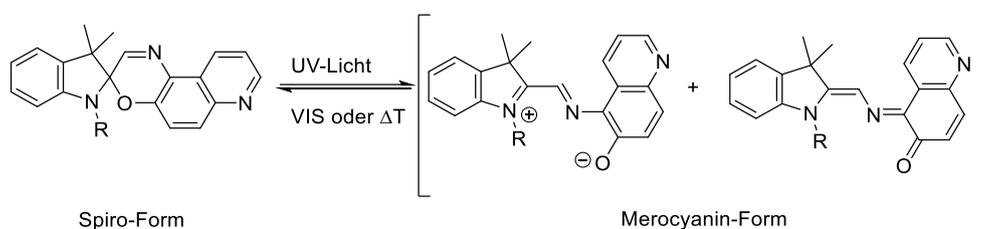


Abbildung 67 Schematische Darstellung der Zyklereversion und Zyklisierung des Spiropyrans.

Die Zugänglichkeit für eine Anknüpfung ist über eine Alkylierung des Stickstoffs des Indol-Teils gegeben. Das Spiropyran **5** wurde entsprechend des Syntheschemas in Abbildung 68 hergestellt.

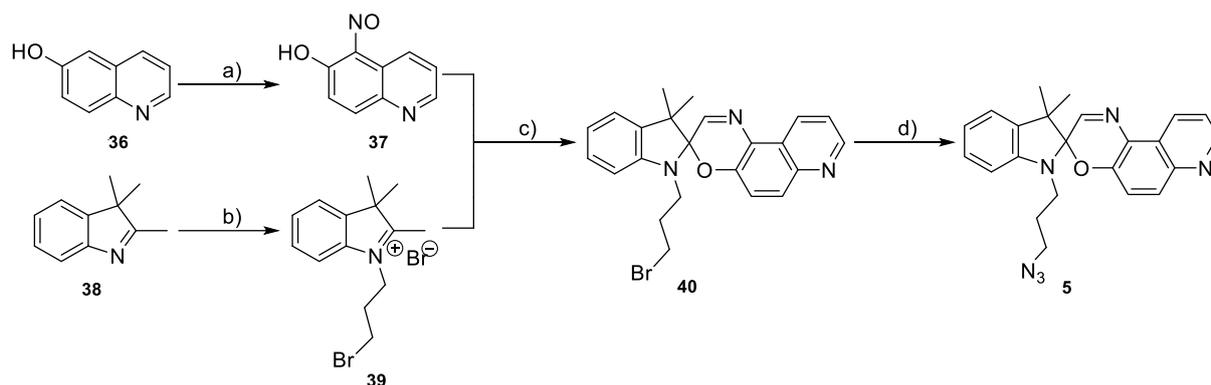


Abbildung 68 Syntheschema des Spiropyrans **5** zur CuAAC: a) NaNO_2 , AcOH, H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{Rt}$, 2 h, 93 %; b) 1,3-Dibrompropan, EtOH, Reflux, 5 h, 16 %; c) NEt_3 , Toluol, 2-Propanol, $105\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h, 11 %; d) NaN_3 , ACN, Rt, ü.N, 67 %.

Im ersten Schritt wird eine Nitrosyl-Gruppe in einer elektrophilen aromatischen Substitution in 8-Hydroxychinolin (**36**) eingeführt und **37** in einer sehr guten Ausbeute von 92 % isoliert.^[140] Der Indol-Teil des Spiropyrans wird durch die Alkylierung von 2,3,3-Trimethylindol (**38**) mit 1,3-Dibrompropan in 16 %iger Ausbeute erhalten.^[142] Daneben wurde ebenfalls das Iod-Derivat von **39** hergestellt, welches sich in den Folgeraktionen analog zu **39** verhielt.^[145] Das Spiropyran **40** wird in einer basen-vermittelten Zylokondensationsreaktion gebildet. Die Aufreinigung des Produktes gestaltete sich schwierig, da das Produkt immer wieder zwischen geschlossenem und offenem Zustand schaltet und in der offenen Konformationen eine starke Interaktion mit dem Säulenmaterial aufweist. Die Wahl eines möglichst unpolaren Laufmittelgemisches (*n*-Hexan:EE 3:1) für die säulenchromatographische Aufreinigung sollte die geschlossene Spiro-Form favorisieren, dadurch wurde das Produkt jedoch in lediglich 11 %iger Ausbeute isoliert. Zuletzt wurde die Azid-Funktion über die zuvor beschriebene Methode eingeführt und das Edukt **5** für die CuAAC in einer Ausbeute von 76 % erhalten werden.

Um das Messsystem mit den bereits durchgeführten Experimenten, wie CD- oder STM-MCBI Messungen, vergleichbar zu halten, wurde die Sequenz auf der Basis von **ds-Un** entworfen. Dafür wurde in **ss-Un2.2** ein Thymidin durch ein kommerziell erhaltenes Click-U ersetzt und für die STM Experimente der bereits verwendete *n*-Propanthiol-Linker eingesetzt, wie in Abbildung 69 zu sehen ist.

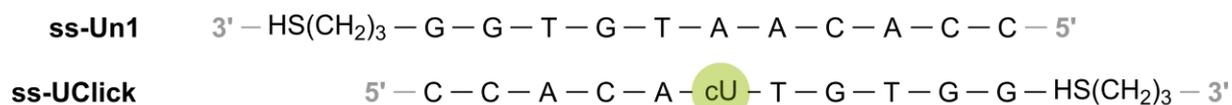


Abbildung 69 Schematische Darstellung des Duplex **ds-UClick** bestehend aus den Einzelsträngen **ss-Un1** und **ss-UClick**.

In der CuAAC-Reaktion mit **ss-UClick** und dem Spiropyran **5** konnte kein Produkt isoliert werden. Der erste Versuch wurde über 48 h bei Rt im Rüttler durchgeführt. Auch die Erhöhung der Temperatur auf T = 60 °C für 3 h im zweiten Versuch führte zu keinem Produkt. Um zu überprüfen, ob mit der Azid-Komponente eine CuAAC möglich ist, wurde das mit Alkin-modifizierte Nucleosid **2** im ersten Versuch in *tert*-Butanol/DMSO (3:1), dargestellt in Abbildung 70 a), und im zweiten Versuch in abs. ACN bei 60 °C über Nacht, in b), zur Reaktion gebracht.

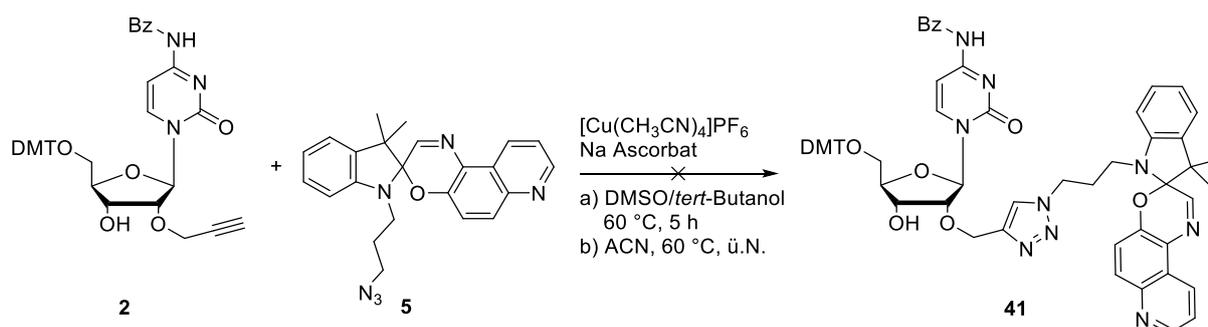


Abbildung 70 Testreaktion der Konjugation mittels CuAAC mit dem Spiropyran **5** und dem Alkin-Nucleosid **2**.

In beiden Versuchen konnte 85 % des Spiropyrans **5** reisoliert werden. Die Stoffmenge an Spiropyran, welche nicht reisoliert werden konnten, korrespondiert näherungsweise mit den eingesetzten Äquivalenten des Cu-Katalysators. Möglicherweise kann das Spiropyran das Kupfer komplexieren und den Katalysator so aus der Reaktion entfernen. Das Nucleosid **2** konnte nicht reisoliert werden. Aus diesen insgesamt vier Versuchen kann geschlossen werden, dass die CuAAC für das Spiropyran keine geeignete Anknüpfungsmöglichkeit darstellt. Um dennoch das Interkalationsverhalten des Spiropyrans zu untersuchen, wurde auf die Variante von Andersson *et al.* zurückgegriffen. Hierbei wurde das Spiropyran nicht kovalent angebunden, sondern über die Einführung eines quartären Amins eine Anlagerung an das Phosphatrückgrat

erreicht. Durch die Iod-Funktion von **40** konnte in einer nukleophilen Substitution die in Abbildung 71 gezeigte Verbindung **42** synthetisiert werden.

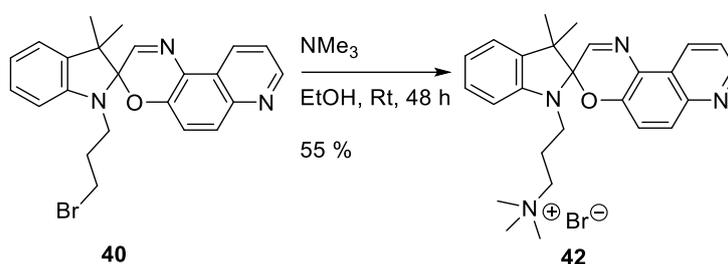


Abbildung 71 Reaktion zum Spiropyran **42** für Interkalationsversuche mit **ds-Un**.

Die Interkalationsexperimente wurden mit **ds-Un** und dem Spiropyran **42** durchgeführt. Dazu wurden die Einzelstränge hybridisiert, anschließend wurde der Photoschalter hinzugegeben und spektroskopisch vermessen. Um spätere Effekte der Wechselwirkung zwischen Helix und Photoschalter von reinem Spiropyran zu differenzieren, wurde der Farbstoff zunächst separat betrachtet. Die Absorption des Farbstoffs ist in Abbildung 72 zu sehen.

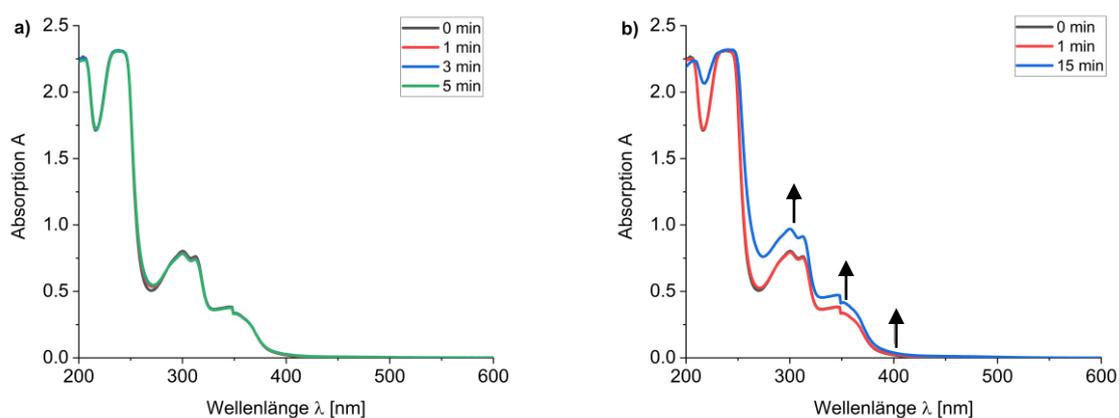


Abbildung 72 Absorptionsspektren von **42** nach unterschiedlichen Belichtungszeiten mit a) $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ und b) $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$. Bedingungen: $50 \mu\text{M}$ Spiropyran, ddH₂O, 24 mM NaCl.

Um das Schaltverhalten des Spiropyrans **42** beurteilen zu können, wurde unter den angegebenen Bedingungen ein Absorptionsspektrum ohne Belichtung (0 min) aufgenommen, welches

jeweils als schwarzer Graph in beiden Spektren dargestellt wird. Dieser zeigt ein mit der Literatur konformes Absorptionsverhalten.^[143] Danach wurde in a) der Farbstoff in den konsekutiven Intervallen 1, 3 und 5 min mit $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm angeregt, um die geöffnete Merocyanin-Form zu erhalten. Bei der Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm wurde keine ausreichende Menge Merocyanin-Form erzeugt, um die offene Form durch Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} \geq 400$ nm nachweisen zu können. Daher wurde die Messung bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm wiederholt. Nach 1-minütiger Belichtung konnte keine Veränderung festgestellt werden. Nach weiteren 15 min Belichtung mit $\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm konnte eine leichte Veränderung des Signals beobachtet werden, allerdings zeigte sich nicht die in der Literatur beschriebene Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 600$ nm (Maximum) oder $\lambda_{\text{abs}} = 562$ nm (Schulter).^{[40] [143]} Die marginale Veränderung des Absorptionsspektrums wird darauf zurückgeführt, dass die 15-minütige Bestrahlung unter Rühren stattfand und die 1-minütige Bestrahlung nur einmal nach 30 s invertiert wurde. Die bessere Durchmischung könnte den Unterschied im Absorptionsspektrum erklären. Dass keine Absorption für die offene Form unter den Messbedingungen gemessen wurde, könnte durch die bereits erwähnte kurze Lebensdauer der Merocyanin-Form mit $\tau = 6$ s erklärt werden.^[143] Eine Anregung mit geringerer Wellenlänge $\lambda_{\text{exc}} < 300$ nm wurde nicht in Betracht gezogen, um die Nukleobasen in der Helix nicht direkt anzuregen. Das unregelmäßige Verhalten bei $\lambda = 340$ nm ist auf den Lampenwechsel des Absorptionsspektrometers zurückzuführen und kann vernachlässigt werden.

Für die gemeinsame Untersuchung der DNA mit dem Photoschalter wurde **42** zur bereits hybridisierten **ds-Un** in einem äquimolaren Verhältnis hinzugegeben und die Absorptionsspektren in Abhängigkeit der Belichtungszeit mit einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Belichtungsreihe sind in Abbildung 73 dargestellt.

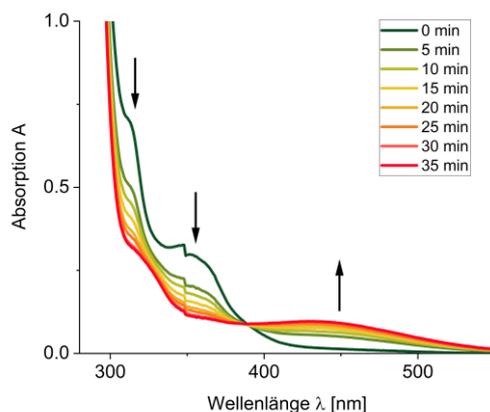


Abbildung 73 Absorptionsspektren von **ds-Un** mit **42** in Abhängigkeit zur Belichtungsdauer mit $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$. Bedingungen: $50 \mu\text{M}$ Duplex, $50 \mu\text{M}$ Spiropyran, 24 mM NaCl.

Die Schulter bei $\lambda = 310 \text{ nm}$ ist die Chinolin-Absorption, welche bereits in Kapitel 3.1.2. diskutiert wurde. Daneben ist eine weitere Schulter des Photoschalters bei $\lambda = 365 \text{ nm}$ zu beobachten. Weitere Absorptionen konnten für die Probe ohne Belichtung nicht beobachtet werden. Nach Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ kann eine neue Bande beobachtet werden, welche im Bereich von $\lambda = 390 - 500 \text{ nm}$ absorbiert und bei $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ ein Maximum erreicht. Nach weiterer Anregung gewinnt diese Bande weiter an Intensität, während die Absorptionen für $\lambda = 365 \text{ nm}$ und $\lambda = 310 \text{ nm}$ geringer werden. Für diese Veränderung ist ein isosbestischer Punkt bei $\lambda = 387 \text{ nm}$ zu sehen, woraus folgt, dass die beobachtete Reaktion ohne UV/Vis-aktive Nebenproduktbildung und ohne Intermediate verläuft. Nach insgesamt 30-minütiger Belichtung ändert sich das Absorptionsverhalten nicht mehr. Die neue Absorptionsbande zwischen $\lambda = 390 - 500 \text{ nm}$ wird als Absorption des interkalierten Spiropyrans in der Merocyanin-Form interpretiert. Das neue Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ ist deutlich hypsochrom gegenüber den literaturbekannten Absorptionen des Spiropyrans mit $\lambda_{\text{max}} = 597 \text{ nm}$ in Acetonitril verschoben.^[143] Dies wird als Interaktion mit der DNA interpretiert und könnte durch die Wechselwirkung mit der π -Stapelung begründet werden. Das wäre ein Indikator für eine erfolgreiche Interkalation und dafür, dass die offene Merocyanin-Form durch die Interaktion mit dem Basenstapel stabilisiert wird.

Im Anschluss daran wurde die Zyklisierung der gebildeten Merocaynin-Form zur Spiro-Form durch Belichtung untersucht. Zunächst sollte getestet werden, wie stabil die Interkalation gegenüber Umgebungslicht und Raumtemperatur ist. Die Probe wurde Tageslicht ausgesetzt und anschließend vermessen, wobei keine Änderung des Absorptionverhaltens beobachtet wurde. Dies spricht für einen stabilen Zustand, der durch die Belichtung mit $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ erreicht wurde. Infolgedessen sollte die Zyklisierung durch Anregung mit einer LED forciert werden. Dafür wurde Licht einer Wellenlänge verwendet, die dem für das Merocyanin bestimmten Absorptionsmaximum bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ entspricht und zur Zyklisierung führen sollte. Nach 15-minütiger Belichtung konnte, wie auch für das Tageslicht, keine Änderung der Absorption festgestellt werden. Daran anschließend wurde **42** mit der Absorptionswellenlänge des freien Merocyanins aus der Literatur bestrahlt, auch hier kam es zu keiner Änderung des Absorptionverhaltens. Die Ergebnisse des Zyklisierungsversuchs von Spiropyran **42** in Anwesenheit von **ds-Un** sind in Abbildung 74 zusammengefasst.

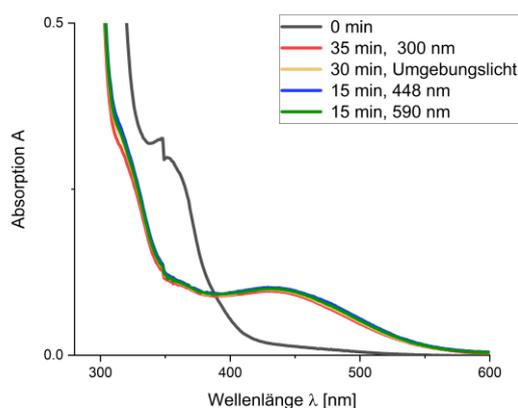


Abbildung 74 Absorptionsspektren von **ds-Un** mit **42** für Schaltversuche. Die Probe (schwarz) wurde nach einer Bestrahlung bei 300 nm über 35 min (rot) nacheinander verschiedenen Wellenlängen ausgesetzt. Bedingungen: 50 μM Duplex, 50 μM Spiropyran, 24 mM NaCl.

In Abbildung 74 wurde zu Vergleichszwecken das Absorptionsspektrum der Probe nach 0 min Anregung, in schwarz, und nach 35-minütiger Bestrahlung mit $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$, bei dem sich die Probe im photostationären Zustand befand, in rot eingezeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine Veränderung in der Absorption durch die Belichtung mit Umgebungslicht, mit $\lambda_{\text{exc}} = 448 \text{ nm}$ oder mit $\lambda_{\text{exc}} = 590 \text{ nm}$ bewirkt werden konnte. Dies kann zwei Gründe haben.

Zum einen könnte das Interkalationsprodukt stark stabilisiert vorliegen, zum anderen könnte sich das Spiropyran durch die längere Belichtung irreversibel verändert haben. Gegen die zweite These spricht das Absorptionsspektrum des Photoschalters nach 15 min Belichtung mit $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ in Abwesenheit der DNA. Für diese Messung trat keine Änderung der Absorption ein, wie in Abbildung 74 gesehen werden kann. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Schaltverhalten bei Interkalation durch ein GC-Paar unterdrückt wird, indem das angeregte Merocyanin einen Energietransfer auf ein benachbartes GC-Paar durchführt.^[42] Um festzustellen, ob dies der Fall ist, müssten andere Sequenzen für die Interkalation und eine kovalente Anknüpfung verwendet werden.

In diesem Kapitel wurde das Spiropyran **5** mit Azid-Funktion erfolgreich synthetisiert und in CuAAC-Reaktionen eingesetzt. Das Azid konnte nach der Reaktion fast vollständig isoliert werden. Die Differenz in der Stoffmenge entsprach hier annähernd den Äquivalenten an Kupfer-Katalysator, was zu der These führte, dass das Spiropyran möglicherweise das Kupfer komplexiert und darüber der Katalyse entzieht. Aus diesen Gründen wurde ein kationisches Trimethylammonium-Derivat **42** des Spiropyrans synthetisiert und in Interkalationsexperimenten eingesetzt, welche entsprechend der Publikation von Andersson *et al.* durchgeführt wurden.^[142] Diese beobachtete deutliche Blauverschiebung der Absorptionsbande für die Merocyanin-Form stellt einen Hinweis für eine mögliche Interkalation dar. Nachdem der photostationäre Zustand für das System mit $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ nach 30 min erreicht wurde, konnte das Spiropyran jedoch nicht mehr in seine geschlossene Spiro-Form per Belichtung mit Umgebungslicht, $\lambda_{\text{exc}} = 448$ oder 590 nm überführt werden. Die Interkalation stabilisiert die Merocyanin-Form wahrscheinlich derart, dass die Zyklisierung nicht mehr abläuft. In den CD-Spektren wurden Hinweise auf die Merocyanin-Form und deren wahrscheinliche Aggregatbildung gefunden. Die genaue Anordnung des geöffneten Photoschalters an oder in die Helix konnte nicht abschließend geklärt werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Leitfähigkeitsmessungen an modifizierter DNA mittels STM MCBJ Methode spektroskopisch untersucht.

Es wurden zwei polykationische Porphyrine in den Literatursausbeuten erfolgreich synthetisiert und als eine kovalent Modifikation **1** sowie als nicht-gebundene Modifikation **35** verwendet. Des Weiteren wurde für die kovalente Anbindung Click-C **2**, ein Cytidinderivat, synthetisiert und erfolgreich in die Zielsequenz durch Festphasensynthese eingebracht. Die kovalente Anknüpfung an einen Einzelstrang wurde per CuAAC durchgeführt. Das Reaktionsprodukt konnte nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden, weshalb dieses Oligonukleotid nicht für die STM MCBJ Messung geeignet war. Daher wurde für die STM Messungen das tetramethylierte Porphyrin **35** mit Gold(III), Kupfer(II) und ohne Metallion eingesetzt. Das Ergebnis dieser Versuche sind Hinweise auf die Erhöhung der Leitfähigkeit durch die interkalierten Porphyrine unabhängig des Metallions. Die beobachtete Verbesserung wird hauptsächlich durch das π -System des Porphyrins bewirkt. Die graphische Zusammenfassung ist in Abbildung 75 zu sehen. In Zukunft könnten die polykationischen Porphyrine als Interkalationsprobe ohne kovalente Anbindung unter verbesserten Messeinstellungen in einer vollständigen Studie untersucht werden. Interessant wäre hierfür ein Metall, welches nachweislich in verschiedenen Oxidationsstufen im Porphyrin vorliegen kann, unter Potentialkontrolle zu betrachten.

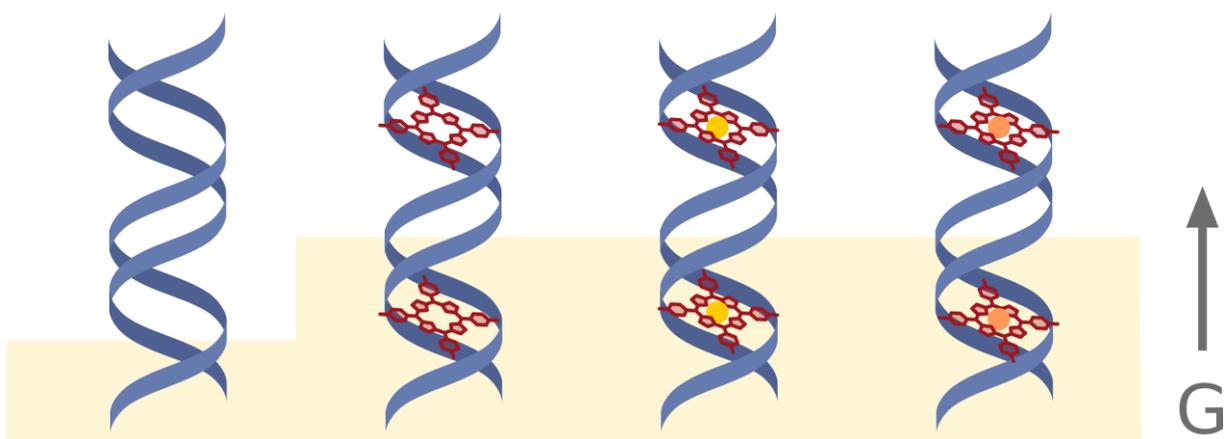


Abbildung 75 Schematische Darstellung der DNA-Leitfähigkeiten in Abhängigkeit von polykationischen Porphyrinen.

Die HC-Modifikation **3** wurde ebenfalls in den Literaturliteraturausbeuten synthetisiert und erfolgreich in DNA inkorporiert. Spektroskopische Untersuchungen in Form der Schmelztemperaturmessung zeigten, dass die mehrfach modifizierten Duplexe stärker durch die Hydroxyhionolin-Basenpaare destabilisiert wurden, als in der Literatur angenommen wurde. In den STM MCBJ Messungen wurde zunächst die mit Thiol-Linker ausgestattete DNA ohne HC-Modifikation gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass nicht inkorporierte Cu^{2+} -Ionen zwar die Stabilität der Helix erhöht, aber die Leitfähigkeit nicht beeinflusst. Dies stimmt ebenfalls mit den Schmelztemperaturmessungsergebnissen überein. Die Vermessung von DNA mit Linker und HC-Modifikation ohne Kupfer lässt keine Interpretation eines möglichen Leitfähigkeitsbereichs zu. Die Messungen unter Kupfereinfluss deuten daraufhin, dass mit jedem inkorporierten Basensurrogatpaar, das ein Cu^{2+} -Ion komplexiert, die Gesamtleitfähigkeit des Duplex um ungefähr eine halbe Größenordnung erhöht wird. Im Fall der zweifach modifizierten DNA wurde die abgeschätzte Leitfähigkeit der Linker erreicht. Im Gegensatz dazu steht die Messung des Doppelstrangs mit drei Basensurrogatpaaren, da hier ein Leitfähigkeitsbereich gemessen wurde, welcher auf nur ein komplexiertes Cu^{2+} -Ion hinweist. Dies konnte in der Schmelztemperaturmessung und dem Titrationsexperiment bestätigt werden. Um die Glaubwürdigkeit der erarbeiteten Messergebnisse zu stützen, wäre ein statistisches Kriterium, wie das Wurzel-n-Gesetz sowie DFT-Berechnungen notwendig. Zusätzlich wäre ein Metall mit veränderlichen Oxidationsstufe für potentialabhängige Messungen von Interesse.

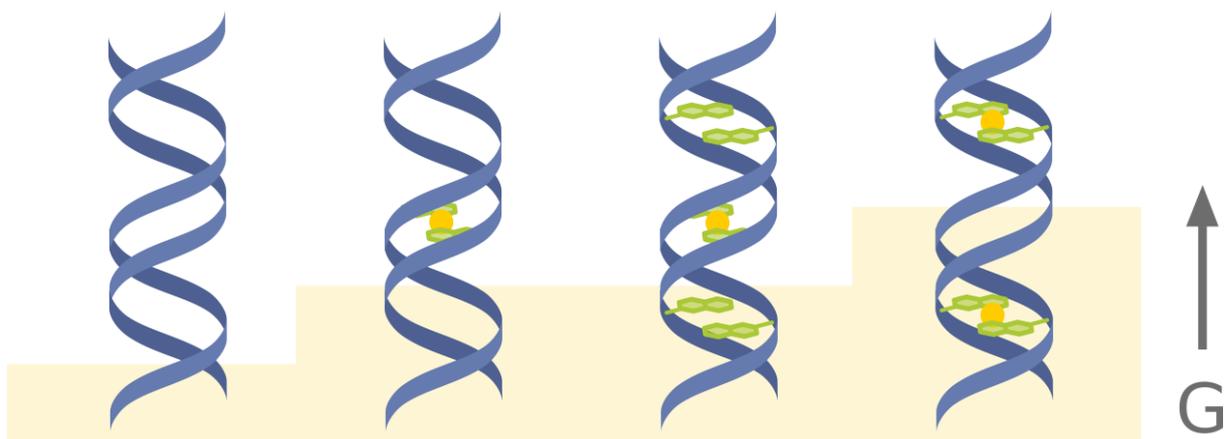


Abbildung 76 Schematische Darstellung der DNA-Leitfähigkeiten in Abhängigkeit von HC-Modifikationen und komplexierten Cu^{2+} -Ionen.

Für die Optimierung der Linker wurden verschiedene Längen, Ankergruppen und Anknüpfungspunkte an die DNA untersucht. Eine Verkürzung der Linker führte neben der erwarteten Verringerung des Widerstands zu einer verbesserten Messbarkeit in den STM MCBJ Messungen. Als weitere Ankergruppe wurden Nukleobasen verwendet. In diesem Experiment wurden Thiol-Linker in nur einer Orientierung und zur andern Seite das π -System einer Nukleobase verwendet. Die Resultate wiesen scharfe Messsignale auf, aber das Konzept zeichnet sich durch eine geringe Definition des leitenden Kontaktes aus. Zuletzt wurde erfolgreich eine Base mit einem Thiol modifiziert und der Abstand zwischen Base und Thiol auf ein Propargylrest reduziert. Diese modifizierte Base **4** wurde als Überhang in der Zielsequenz verwendet und der entsprechende Duplex konnte erfolgreich im STM gemessen werden. Dabei konnte die Leitfähigkeit im Vergleich zum kürzeren verwendeten Thiol-Linker bei gleichzeitiger Verbesserung der Signalschärfe erreicht werden. Im Vergleich dazu könnte in einem weiteren Experiment die Modifikation basengepaart mit Adenosin gemessen werden, um Flexibilität einzuschränken.

Zuletzt wurde die Interaktion zwischen einem Photoschalter und der DNA untersucht. Dazu ist ein Spiropyran **5** mit Azid-Funktion synthetisiert und in CuAAC-Reaktionen eingesetzt worden. Die Anknüpfung über die CuAAC Reaktion verlief nicht erfolgreich und es konnte das Spiropyran fast vollständig reisoliert werden. Daher wurde von einer kovalenten auf eine koordinative Strategie gewechselt und das Spiropyran mit einem quartären Amin (**42**) statt eines Azids synthetisiert. In den darauffolgenden Absorptions- und CD-Messungen war zu beobachten, dass der Photoschalter **42** kaum in der geöffneten Form unter den Messbedingungen vorzufinden war. In Messungen mit DNA jedoch wurde die offene Form entsprechend stabilisiert und konnte zeitaufgelöst mit Belichtung mit $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ in ein photostationäres Gleichgewicht gebracht werden. In diesem Projekt bleiben einige Fragen offen, die meisten könnten durch eine kovalente Anbindung des Photoschalters beantwortet werden. Hierzu könnte weiterhin das kommerzielle Click-U verwendet und in einer Thiol-In-clickartigen Reaktion an den Einzelstrang geknüpft werden. Der Vorteil dieser Reaktion sind die kurze Reaktionszeiten und keinerlei Zusatz von weiteren Chemikalien und die daher einfache Aufreinigung. Durch den kovalenten Einbau könnte die Basensequenz so definiert werden, dass kein Energietransfer

auf ein GC-Paare möglich ist. Der Linker sollte etwas länger als der in dieser Arbeit häufig verwendete *n*-Propan-Linker sein, damit das Spiropyran in der Zykloreversion keine sterische Hinderung erfährt. Mit der kovalent modifizierten DNA könnten dann Messungen mit indirekter Lichtnutzung durchgeführt werden. Während der Messungen wird aufgrund der stabilen Zustände des Spiropyrans keine Lichtquelle benötigt, zusätzlich könnte zwischen den STM Messungen zwischen Spiro- und Merocyanin-Form geschaltet werden.

5. Experimenteller Teil

5.1. Verwendete Chemikalien und Geräte

5.1.1. Analytik

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die kernresonanzspektroskopischen Messungen wurden mit einem *Avance 500* der Firma BRUKER bei Raumtemperatur aufgenommen. Zur Aufnahme der Spektren wurden folgende Messfrequenzen verwendet:

- ^1H : 500.13 MHz
- ^{13}C : 125.77 MHz
- ^{31}P : 202.45 MHz

Routinemessungen wurden an einem BRUKER *Avance 300* (300.17 MHz) durchgeführt. Die zu messenden Substanzen wurden in etwa 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel der Firma EURISOTOP in Messröhrchen mit einem Außendurchmesser von 5 mm gelöst. Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte anhand der chemischen Verschiebungen δ und wurde in *parts per million* (ppm) angegeben. Als Referenz wurde das Signal des nicht vollständig deuterierten Lösungsmittels verwendet, wobei im Rahmen dieser Arbeit die Folgenden verwendet wurden:

- CDCl_3 : ^1H : $\delta = 7.26$ ppm ^{13}C : $\delta = 77.16$ ppm
- $[\text{d}_4]\text{-MeOH}$: ^1H : $\delta = 3.31$ ppm ^{13}C : $\delta = 49.00$ ppm
- $[\text{d}_6]\text{-DMSO}$: ^1H : $\delta = 2.50$ ppm ^{13}C : $\delta = 39.52$ ppm
- $[\text{d}_6]\text{-ACN}$: ^1H : $\delta = 1.93$ ppm ^{13}C : $\delta = 118.69$ und 1.39 ppm
- CD_2Cl_2 : ^1H : $\delta = 5.32$ ppm ^{13}C : $\delta = 54.00$ ppm

Die Signale wurden nach ihrer Aufspaltung charakterisiert, wobei die ermittelten Kopplungskonstanten als J in Hz angegeben wurden. Die Multiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt:

s = Singulett, brs = breites Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qd = Quartett vom Dublett, m = Multiplett.

Massenspektrometrie (MS)

Die massenspektrometrischen Messungen wurden durch die analytische Abteilung des Instituts für Organische Chemie des KIT. Zur Ionisierung wurden die folgenden Methoden und Geräte verwendet.

- MALDI-TOF: BRUKER *Biflex S/N BT-2724*
SHIMADZU *AXIMA Confidence*
- ESI-MS: THERMO FISCHER SCIENTIFIC *Q Exactive Orbitrap*

Für die Messungen am MALDI-TOF wurden die folgenden Matrizen verwendet:

- 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP): 0.3 M in Ethanol
- 6-Aza-2-thiothymin (ATT): gesättigte Lösung in Acetonitril
- Hydroxypicolinsäure (HPA): 9:1 Mischung aus HPA (gesättigte Lösung in ACN:H₂O) und Dihydrogencitrat (gesättigte Lösung in H₂O)

Die Molekülfragmente wurden entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z und die Intensitäten jeweils in Prozent relativ zum Basispeak (100 %) angegeben. Die Signale wurden im Masse/Ladungsverhältnis (m/z) angegeben und das Molekülion als $[M^+]$, beziehungsweise die protonierte Form als $[MH^+]$ dargestellt.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die infrarotspektroskopischen Messungen wurden durch die analytische Abteilung des Instituts für Organische Chemie am KIT mittels eines BRUKER *Alpha* aufgenommen. Zur Messung wurde die ATR-Methode verwendet. Die Intensität der Signale wurde wie folgt eingeteilt: vs = sehr stark 0 – 10 % Transmission, s = stark 10 – 30 % Transmission, m = mittel 30 – 70 % Transmission, w = schwach 70 – 90 % Transmission, vw = sehr schwach 90 – 100 % Transmission.

5.1.2. Reagenzien und Präparatives Arbeiten

Die verwendeten Lösungsmittel wurden kommerziell von den Firmen ACROS ORGANICS, SIGMA ALDRICH und THERMO FISHER in der Qualitätsstufe p.a. (*pro analysi*) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Absolutierte Lösungsmittel wurden unter Argon aufbewahrt und gehandhabt. Technische Lösungsmittel für säulenchromatographische Reinigungen wurden vor Gebrauch bei 50 °C und folgenden Drücken vordestilliert: *n*-Hexan ($p = 300$ mbar), Ethylacetat ($p = 250$ mbar), Dichlormethan und Diethylether ($p = 750$ mbar). Für HPLC-Trennungen wurden Lösungsmittel der Firma MERCK (LiChrosolv) und Wasser verwendet, welches zuvor in einer MERCK *Millipore*-Q8-Anlage gereinigt und entionisiert wurde.

Die zur Synthese verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, ACROS ORGANICS, ALFA AESAR, MERCK, SIGMA ALDRICH, TCI und VWR bezogen. Die Qualitätsstufe war dabei mindestens „zur Synthese“. Bei Bedarf wurden die Chemikalien unter Argon-Atmosphäre und niedrigen Temperaturen gelagert. DNA-Stränge wurden von der Firma METABION in HPLC-aufgereinigten und lyophilisierten Zustand bezogen. Sie wurden in entionisiertem Wasser gelöst und ihre Konzentration über die Absorption bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Beide Alkanthiol-Linker wurden beide von GLEN RESEARCH erhalten.

Durchführung der Synthesen

Für die Durchführung wasser- und luftempfindlicher Reaktionen wurden Schlenk-Reaktionsgefäße zusammen mit einem Rührfisch durch ein Gummiseptum verschlossen, unter Hochvakuum mehrfach mit einer Heißluftpistole ausgeheizt und zwischendurch mehrfach mit Argon (Argon 4.0 der Firma AIR LIQUIDE) geflutet. Sowohl absolute Lösungsmittel, als auch luft- bzw. wasserempfindliche Reagenzien wurden entsprechend der Standard-Schlenk-Technik gehandhabt.

Zum Überführen und Dosieren von Flüssigkeiten wurden Kunststoffspritzen mit Teflon-Kanülen, oder Einkanalpipetten der Firma EPPENDORF oder GILSON verwendet. Feststoffe wurden in

pulverisierter Form eingesetzt und mittels Wägebepapier überführt. Zum Destillieren und Entfernen von Lösungsmitteln wurden Rotationsverdampfer der Firma BÜCHI und HEIDOLPH verwendet. Der Vorgang wurde bei verringertem Druck und einer Wasserbadtemperatur von 40 °C durchgeführt.

Reaktionskontrolle

Der Reaktionsfortschritt wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) kontrolliert. Die hierzu verwendeten Aluminiumfolien der Firma MERCK waren mit Kieselgel beschichtet (Kieselgel 60, F 254, Schichtdicke 0.25 mm). Zur Detektion der Substanzen wurden UV-Lampen mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$ (Fluoreszenzlöschung) und $\lambda_{exc} = 366 \text{ nm}$ (Fluoreszenzanregung) verwendet. Des Weiteren wurden folgende Reagenzlösungen zum Anfärben genutzt:

- 5 %ige Schwefelsäure in EtOH
- KMnO_4 -Lösung: 2.5 g K_2CO_3 , 1.0 g KMnO_4 , 0.1 g NaOH, 100 mL H_2O

Die anzufärbende Aluminiumplatte wurde in die Lösung eingetaucht und durch Erwärmen mittels Heißluft entwickelt.

Produktreinigung

Die synthetisierten Produkte wurden mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Als stationäre Phase wurde hierbei Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 μm) der Firma SIGMA ALDRICH verwendet, die Glassäulen mit Fritte nass gepackt und mit Quarzsand (geglüht, mit HCl gereinigt, RIEDEL DE HAËN) bedeckt. Zum Auftragen wurde eine Portion Kieselgel mit dem Rohprodukt beschichtet (*dry load*) oder dieses in gelöster Form auf die feste Phase gegeben. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde mit zuvor destillierten Lösungsmitteln volumetrisch angefertigt. Es wurde mit einem leichten Überdruck von 0.2–0.3 bar eluiert, welcher mit einer Handpumpe erzeugt wurde.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Trennungen der synthetisierten Oligonukleotide mittels Umkehrphase wurde ein THERMO FISHER HPLC-System Ultimate 30000. Die präparativen Trennungen wurden mit einer *Supercosil* LC-C18-Säule (25 cm × 10.0 mm ID, 5 µm, *Supelco*) durchgeführt.

Als Laufmittel wurde für die synthetisierten Oligonukleotide wurden mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (Komponente A, pH 6.5) und ACN (Komponente B) (von 0 % bis 20 % B in 20 min) getrennt. Hierzu wurde eine Flußgeschwindigkeit von 2.5 mL/min angewandt. Die Detektion der und DNA-Stränge erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 260$ nm und der charakteristischen Absorption der jeweiligen Modifikationen.

Sublimationstrocknung

Wässrige Lösungen der Oligonukleotide wurde mithilfe einer Gefriertrocknungsanlage *Alpha 1-2 LD* oder eines Rotationskonzentrators *Alpha 1-2* der Firma MARTIN CHRIST gefriergetrocknet. Reaktionsprodukte wurden zum Lyophilisieren in absolutem Benzol der Firma THERMO FISHER aufgenommen, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und am Hochvakuum getrocknet.

Optische Spektroskopie

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

Pufferzusammensetzung

Für alle spektroskopischen Untersuchungen wurde 10 mM PBS eingesetzt mit der Zusammensetzung: 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, pH = 7.4.

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, Durchschnitszeit 0.1 s, Datenintervall 1.0, Lampenwechsel 350 nm.

Schmelztemperaturmessungen

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.

Circulardichroismus (CD)

Gemessen wurde an einem JASCO J-810 Spectropolarimeter mit einem Peltier-Element PTC-423S und einem AC 200 Thermostat von THERMO SCIENTIFIC. Dazu wurde die Software SpectraManager mit konstanten Einstellungen (Scanning speed: 100 nm/min, Accumulations: 4, D.I.T.: 4 s, Band width: 1,00 nm) verwendet. Um die Bildung von Ozon zu verhindern, wurde die Probenkammer mit N₂-Gas konstant gespült.

Konzentrationsbestimmung Oligonukleotidstränge

Die Konzentration der Triphosphat-Stammlösungen wurde durch Absorptionsmessungen mit einem *ND-1000* Spektrophotometer der Firma NANODROP im Nukleinsäuremodus mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 260$ nm bestimmt. Die Messungen wurden mit je 1 μL Stammlösung durchgeführt und die Konzentrationen mittels Lambert-Beerschem Gesetz berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient für unmodifizierte Nukleinsäuren setzt sich dabei wie folgt zusammen:

$$\epsilon_{260} = (A \cdot \epsilon_{260}(A) + T \cdot \epsilon_{260}(T) + G \cdot \epsilon_{260}(G) + C \cdot \epsilon_{260}(C) + X \cdot \epsilon_{260}(X)) \cdot 0.9$$

A: Anzahl der Adeninbasen $\epsilon_{260}(A) = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

T: Anzahl der Thyminbasen $\epsilon_{260}(T) = 8.80 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

G: Anzahl der Guaninbasen $\epsilon_{260}(G) = 11.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

C: Anzahl der Cytosinbasen $\epsilon_{260}(C) = 7.30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

X: Anzahl der Modifikationen $\epsilon_{260}(\text{Click-U}) = 11.01 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

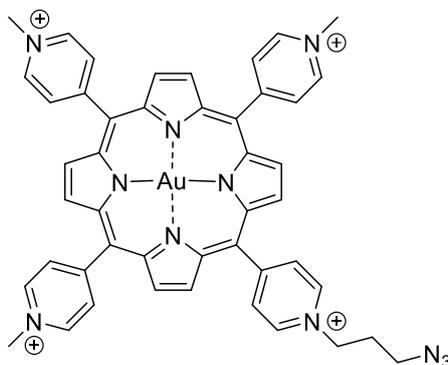
$$\epsilon_{260}(\text{Click-C}) = 7.30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{260}(\text{HC-Modifikation}) = 1.50 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Mit dem Faktor 0.9 wird die Hypochromizität berücksichtigt, die durch den Aufbau des DNA-Basenstapels auftritt.

5.2. Synthesevorschriften und Analytik

5.2.1.1. Synthese des Gold(III)-5-(3-Azidopropyl)-10,15,20-trimethyl-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin (**1**)

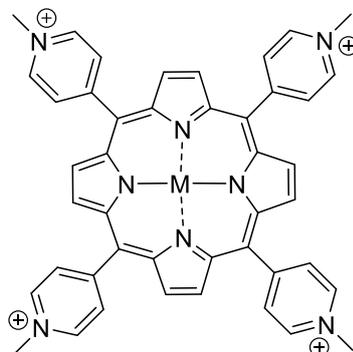


Chemical Formula: $C_{46}H_{39}AuN_{11}^{4+}$
Exact Mass: 942,30

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)porphyrin (**8**) wurde analog zu einer von *LU et al.* veröffentlichten Synthesevorschrift dargestellt.^[121] Die mehrfache Methylierung zu erfolgte unter den Literaturbedingungen von *Schneider et al.*^[122] Die Umsetzung zum vierfachalkyliertem Porphyrin und der Iod-Azid-Austausch zur Verbindung **11** erfolgte nach einer Veröffentlichung von *Wagenknecht et al.*^[120] Die Metallierung mit Gold (III) orientiert sich an einer Veröffentlichung von *Harriman et al.*^[119]

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein. ^[119,146,147]

5.2.1.2. Synthese der metallierten 5,10,15,20-trimethyl-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrine (35-Au und 35-Cu)



M = Au³⁺

Chemical Formula:

C₄₄H₃₆AuN₈⁴⁺

Exact Mass: 873,27

M = Cu²⁺

Chemical Formula:

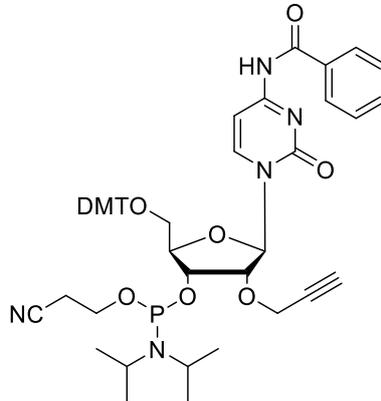
C₄₄H₃₆CuN₈⁴⁺

Exact Mass: 739,23

Als Startmaterial für die Metallierung wurde das Überreaktionsprodukt der Synthese des dreifachmethylierten Porphyrin **9** verwendet. Die Synthese für **35-Au** orientierte sich an einer Veröffentlichung von Harriman *et al.*^[119] Die Darstellung für **35-Cu** erfolgte nach Literaturbedingungen.^[146]

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[119,146,147]

5.2.2. Synthese des Click-C (2)

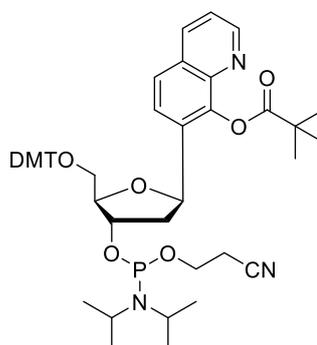


Chemical Formula: $C_{49}H_{54}N_5O_9P$
Exact Mass: 887,37

Die Synthese des Click-C-Bausteins orientiert sich an der Veröffentlichung von Sproat *et al.*, wobei hier von dem N⁴-Benzoylcytidin ausgegangen wurde.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[123]

5.2.3. Synthese des 8-Hydroxychinolin-Basensurrogates (3)



Chemical Formula: $C_{49}H_{58}N_3O_8P$
Exact Mass: 847,40

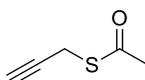
Die Darstellung des Glykals **18** erfolgte in zwei Stufen ausgehend von Thymin.^[22] Die Iodierung zum 8-Hydroxy-7-iodochinolin wurde nach Literaturbedingungen durchgeführt.^[126] Die weitere Synthese des 8-Hydroxychinolin-Basensurrogates erfolgte nach der Veröffentlichung von Wagenknecht *et al.*^[33]

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[33]

5.2.4. Synthese des Uridin-Linkers (4)

Die Synthese des ULink **4** wurde analog zu der Veröffentlichung von Benner *et al.* durchgeführt.^[138]

3-Acetylthio-1-propin (**28**)



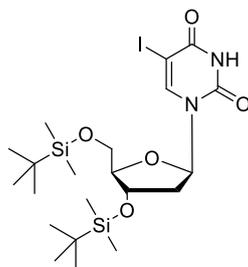
Chemical Formula: C₅H₆OS
Exact Mass: 114,0139

Unter Argonatmosphäre wird eine Lösung aus 4.33 g Triphenylphosphan (16.5 mmol, 1.50 eq) in 40 mL trockenem THF auf 0 °C gekühlt und tropfenweise 3.25 mL Azodicarbonsäurediisopropylester (3.34 g, 16.5 mmol, 1.50 eq) über 20 min hinzugegeben. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wird eine Lösung bestehend aus 1.18 mL Thioessigsäure (1.26 g, 16.5 mmol, 1.50 eq), 0.640 mL Propargylalkohol (616 mg, 11.0 mmol, 1.00 eq) und 20 mL trockenem THF über 15 min bei 0 °C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht weitergerührt, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wurde mit 2 mL MeOH gestoppt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatografischer Aufreinigung (SiO₂, n-Pentan:DEE 0->5%) wurde das Produkt **28** (1.17 g, 10.2 mmol, 93 % d. Th.) als gelbes, unangenehmriechendes Öl erhalten.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[138]

Das TBDMS-geschützte 5-Iodo-2'-desoxyuridin wurde ähnlich zu der im Arbeitskreis etablierten Methode geschützt, die aus der Literatur von Saito *et al.* entwickelt wurde.^[148]

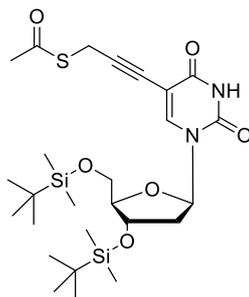
3'-5'-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxyuridin (**30**)



Chemical Formula: $C_{21}H_{39}IN_2O_5Si_2$
Exact Mass: 582,14

In einem Kolben wurden 2.00 g 5-Iodo-2'-desoxyuridin (5.65 mmol, 1.00 eq.) und 1.54 g Imidazol (22.6 mmol, 4.00 eq) in 40 ml trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 2.13 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (14.1 mmol, 2.50 eq) zugegeben und die Rohmischung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Rohprodukt wurde mit DCM extrahiert, mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach einer säulenchromatografischer Aufreinigung (SiO_2 , DCM) konnte das Produkt **30** (3.13 g, 5.38 mmol, 95 % d. Th.) als ein weißer Feststoff erhalten werden.

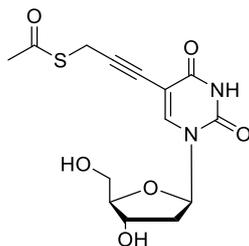
Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[148]

5-(3-Acetylthio-1-propynyl)-3'-5'-bis-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyuridin (31)

Chemical Formula: C₂₆H₄₄N₂O₆SSi₂
Exact Mass: 568,25

In einem ausgeheiztem Kolben wird unter Argonatmosphäre werden 1.63 g des geschützten 5-Iod-Uridins **30** (2.80 mmol, 1.00 eq) in 70 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurde in der folgenden Reihenfolge die Komponenten im Argongegenstrom hinzugefügt. Zuerst werden 324 mg Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.280 mmol, 0.01 eq) und solange gerührt bis alles gelöst ist, anschließend werden 775 µL TEA (566 mg, 5.60 mmol, 2.00 eq), 800 mg Alkins **28** (7.01 mmol, 2.50 eq) und 107 mg Kupfer(I)iodid (0.560 mmol, 0.02 eq) hinzugegeben und der Kolben vor Licht geschützt. Nach 14 h Rühren bei Raumtemperatur werden weiter 234 mg Palladium(0)-Katalysator (0.202 mmol) und 107 mg Kupfer(I)iodid (0.560 mmol) hinzugegeben und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und Aufziehen auf 6 g SiO₂ wurde das Rohprodukt per säulenchromatografischer Aufreinigung (SiO₂, n-Hexan:EE 3:1, R_f = 0.20) aufgereinigt. **31** (776 mg, 1.37 mmol, 49 % d. Th.) konnte als gelblicher Schaum isoliert werden.

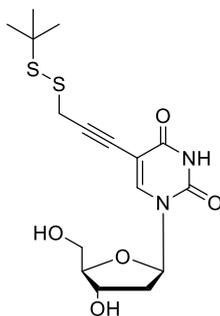
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.27 (s, 1 H), 7.97 (s, 1H), 6.27 (dd, *J* = 7.6, 5.8 Hz, 1H), 4.42 - 4.36 (m, 1H), 3.99 – 3.95 (m, 1H), 3.93 – 3.85 (m, 3 H), 3.76 (dd, *J* = 11.4, 2.2 Hz, 1H), 2.36 – 2.25 (m, 2H), 2.01 (ddd, *J* = 13.3, 7.7, 5.9 Hz, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 0.14 (d, *J* = 3.2 Hz, 6H), 0.08 (d, *J* = 2.3 Hz, 6H).

5-(3-Acetylthio-1-propynyl)-2'-desoxyuridin (32**)**

Chemical Formula: C₁₄H₁₆N₂O₆S
Exact Mass: 340,07

Unter Argonatmosphäre wurden 770 mg **31** (1.35 mmol, 1.00 eq) in THF vorgelegt. Anschließend wurden 5.50 mL einer frisch zubereiteten 1 M TBAF-THF Lösung (1.50 g, 5.40 mmol) hinzugegeben und 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde auf 3 g SiO₂ gezogen für die anschließende säulenchromatografischer Aufreinigung (SiO₂, DCM:MeOH 0->10%, R_f = 0.20 mit DCM:MeOH 9:1) vorbereitet. Die Verbindung **32** (266 mg, 782 μmol, 58 % d. Th.) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

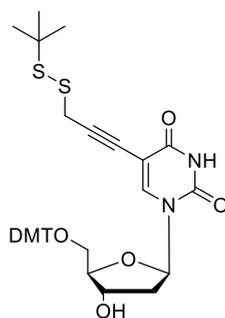
Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[138]

5-(propynyl)-2'-desoxyuridin-*tert*-butyldisulfid (33)

Chemical Formula: C₁₆H₂₂N₂O₅S₂
Exact Mass: 386,10

Unter Argonatmosphäre wurden 146 mg **32** (429 µmol, 1.00 eq) in 10 mL trockenem MeOH gelöst und gleichzeitig mit 15,4 mg Lithiumhydroxid (644 µmol, 1.50 eq) und 165 mg Di-*tert*-butyl-1-(*tert*-butylthio)-1,2-hydrazindicarboxylat (515 µmol, 1.20 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel wurde per säulenchromatografischer Aufreinigung (SiO₂, DCM:MeOH 95:5, R_f = 0.20) aufgereinigt. Das Produkt **33** (85 mg, 219 µmol, 54 % d. Th.) wurde als gelblicher Schaum isoliert.

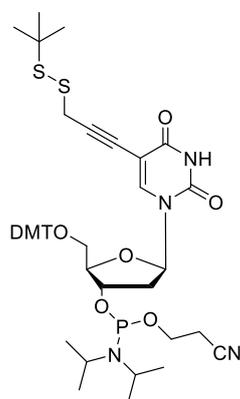
Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[138]

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(propynyl)-2'-desoxyuridin-*tert*-butyldisulfid (34)

Chemical Formula: $C_{37}H_{40}N_2O_7S_2$
Exact Mass: 688,23

244 mg lyophilisiertes **33** (632 μmol , 1.00 eq) wurde in 2.50 mL trockenem Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. 19,3 mg 4-(Dimethylamino)-pyridin (158 μmol , 0.250 eq), 321 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (948 μmol , 1.50 eq) und 95 μL TEA (130 mg, 1.26 mmol, 2.00 eq) werden hinzugegeben. Die Kühlung wird nach 10 min entfernt und das Gemisch für über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt per säulenchromatografischer Aufreinigung (SiO_2 , DCM:MeOH:TEA 98:2:1%, $R_f = 0.70$) aufgereinigt. Das Produkt **34** (246 mg, 357 μmol , 57 % d. Th.) wurde nach Lyophilisation als weißer Feststoff erhalten.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[138]

3'-O-(*N,N*-Diisopropyl- β -cyanoethylphosphoramidite)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(propynyl)-2'-desoxyuridine-*tert*-butyl disulfide (4**)**

Chemical Formula: $C_{46}H_{57}N_4O_8PS_2$
Exact Mass: 888,34

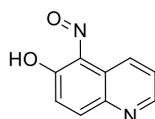
Es wurden 140 mg lyophilisiertes **34** (203 μ mol, 1.00 eq) in 3.00 mL abs. DCM gelöst. Danach wurden 200 μ L DIPEA (145 mg, 1.12 mmol, 5.50 eq) und 48 μ L PA-Cl (50.6 mg, 2.14 mmol, 1.05 eq) hinzugegeben und für 3 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf ungefähr 10 mL DCM verdünnt und mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung (1 x 15 mL) gewaschen. Nach der Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt aus Benzol lyophilisiert. Das Produkt **4** (123 mg, 139 μ mol, 68 % d. Th.) wurde nach Lyophilisation als weißer Feststoff erhalten.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[138]

5.2.5. Synthese der Photoschalter (5)

Die Synthese von Photoschalter **5** wurde analog zu den Literaturbedingungen einer Veröffentlichung von Minkin *et al.*^[143]

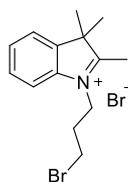
5-Nitrosochinolin-6-ol (**37**)



Chemical Formula: C₉H₆N₂O₂
Exact Mass: 174,04

570 mg 6-Hydroxychinolin (3.93 mmol, 1.00 eq) werden in 5 mL H₂O und 5 mL Essigsäure gelöst und auf 0 °C gekühlt. Über 30 min wird eine Lösung aus 300 mg Natriumnitrit (4.33 mmol, 1.10 eq) in 5 mL H₂O hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit H₂O nachgewaschen. Nach Trocknung unter Hochvakuum wurde die Nitrosoverbindung **37** (621 mg, 3.57 mmol, 91 % d. Th.) als gelber Feststoff erhalten.

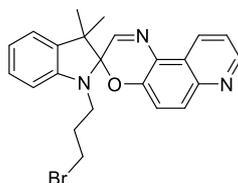
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 14.57 (br, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.68 (dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.2, 4.7 Hz, 1H), 6.65 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H).

1-(3-Brompropyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-ium (39)

Chemical Formula: C₁₄H₁₉Br₂N
Exact Mass: 358,98

In einem ausgeheiztem Kolben unter Argonatmosphäre wurden 10,0 mL 2,3,3-Trimehtylindol (10,0 g, 62.0 mmol, 1.00 eq) in 30 mL Ethanol gelöst und 19.0 mL 1,3-Dibrompropan (38.8 g, 188 mmol, 3.00 eq) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h bei 80 °C refluxiert. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der violette Rückstand wurde solange mit DEE:Aceton (1:1) und ACN gewaschen, bis der Rückstand nahezu weiß war. Das Indolium **39** (3.52 g, 9.81 mmol, 16 % d. Th.) konnte als weißer Feststoff isoliert werden.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[142]

1-(3-Brompropyl)-3,3-dimethylspiro[indoline-2,3'-[1,4]oxazino[3,2-f]quinoline] (40)

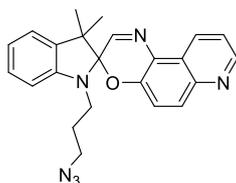
Chemical Formula: C₂₃H₂₂BrN₃O
Exact Mass: 435.0946

760 mg Indolium **39** (2.00 mmol, 1.00 eq) und 350 mg Nitrosochinolin **37** (2.00 mmol, 1.00 eq) werden in 18 mL HPLC-grade Toluol und 2 mL HPLC-grade 2-Propanol gelöst und auf 110 °C erhitzt. Während das Reaktionsgemisch erwärmt wurde, wurde 500 µL TEA (202 mg, 2.00 mmol, 1.00 eq) hinzugefügt. Danach wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei 110 °C refluxiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der schwarze Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂, n-Hexan:EE 2:1, R_f = 0.50) aufgereinigt. Das Spiropyran **40** (379 mg, 871 µmmol, 11 % d. Th.) wurde als bläulicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.87 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.83 (dd, *J* = 4.2, 1.7 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.47 (dd, *J* = 8.5, 4.2 Hz, 1H), 7.25 - 7.19 (m, 2H), 7.09 (dt, *J* = 5.7, 2.9 Hz, 1H), 6.92 (td, *J* = 7.5, 0.7 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.39 - 3.26 (m, 2H), 3.21 - 3.11 (m, 2H), 2.32 - 2.19 (m, 1H), 2.17 - 2.06 (m, 1H), 1.36 (s, 3H), 1.34 (s, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 152.8 (CH), 149.8 (CH), 146.4 (C_q), 144.7 (C_q), 144.4 (C_q), 143.5 (C_q), 135.2 (C_q), 131.2 (CH), 129.5 (CH), 128.0 (CH), 125 (C_q), 122.3 (CH), 121.8 (CH), 120.0 (CH), 119.5 (CH), 106.7 (CH), 99.1 (C_q), 53.1 (C_q), 51.9 (CH₂), 42.9 (CH₂), 31.1 (CH₂), 25.2 (CH₃), 20.4 (CH₃).

HR-MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₃H₂₂BrN₃O⁺ [M⁺] = 435.0946; gef. = 436.1017.

1-(3-Azidpropyl)-3,3-dimethylspiro[indolin-2,3'-[1,4]oxazino[3,2-f]chinolin] (5)

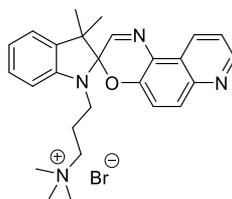
Chemical Formula: C₂₃H₂₂N₆O
Exact Mass: 398,19

155 mg Spiropyran **40** (355 μ mol, 1.00 eq) wurden unter Argonatmosphäre in 7.50 mL trockenem DMF gelöst, 92.0 mg Natriumazid (1.42 mmol, 4.00 eq) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatografisch (SiO₂, DCM, R_f = 0.60) aufgereinigt. Nach Lyophilisation aus Benzol wurde das Produkt **5** (95 mg, 238 μ mol, 67 % d. Th.) als gelb- bis bräunlicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.83 (dd, *J* = 4.2, 1.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.48 (dd, *J* = 8.5, 4.2 Hz, 1H), 7.29 - 7.13 (m, 2H), 7.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 15.6, 8.2 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.39 - 3.33 (m, 2H), 3.33 - 3.23 (m, 2H), 2.04 - 1.94 (m, 1H), 1.90 - 1.80 (m, 1H), 1.36 (s, 3H), 1.34 (s, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 152.8 (CH), 149.8 (CH), 146.4 (C_q), 144.7 (C_q), 144.4 (C_q), 143.5 (C_q), 135.2 (C_q), 131.2 (CH), 129.5 (CH), 128.0 (CH), 125 (C_q), 122.3 (CH), 121.8 (CH), 120.0 (CH), 119.5 (CH), 106.7 (CH), 99.1 (C_q), 52.1 (C_q), 48.2 (CH₂), 41.1 (CH₂), 27.4 (CH₂), 25.2 (CH₃), 20.4 (CH₃).

HR-MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₃H₂₂N₆O⁺ [M⁺] = 398.1855; gef. = 399.1924.

1-(3-3-Triemthylammonium)-3,3-dimethylspiro[indolin-2,3'-[1,4]oxazino[3,2-f]chinolin] (42)

Chemical Formula: C₂₆H₃₁BrN₄O
Exact Mass: 494.16

160 mg Spiropyran **40** (331 μ mol, 1.00 eq) wurden unter Argonatmosphäre in einem Überschuss von 5.00 mL 4.2M Trimethylamin in Ethanol (33 %) gelöst und für 48 h bei Rt gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel entfernt und aus THF umkristallisiert. Das Produkt **42** (82 mg, 151 μ mol, 46 % d. Th.) als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.85 (dd, J = 8.5, 0.9 Hz, 1H), 8.83 (dd, J = 4.2, 1.6 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.47 (dd, J = 8.5, 4.2 Hz, 1H), 7.23 (td, J = 7.7, 1.0 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 17.2, 9.9 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.78 (td, J = 12.6, 4.5 Hz, 1H), 3.58 (td, J = 12.5, 4.7 Hz, 2H), 3.48 (dt, J = 14.5, 7.2 Hz, 1H), 3.36 – 3.29 (m, 10 H), 2.18 (qd, J = 12.1, 7.0 Hz, 1H), 1.99 (qd, J = 12.4, 5.9 Hz, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.32 (s, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 152.8 (CH), 149.8 (CH), 146.4 (C_q), 144.7 (C_q), 144.4 (C_q), 143.5 (C_q), 135.2 (C_q), 131.2 (CH), 129.5 (CH), 128.0 (CH), 125 (C_q), 122.3 (CH), 121.8 (CH), 120.0 (CH), 119.5 (CH), 106.7 (CH), 99.1 (C_q), 64,5 (CH₂), 53.6 (3 CH₃), 52.1 (C_q), 41.1 (CH₂), 27.4 (CH₂), 25.2 (CH₃), 20.4 (CH₃).

HR-MS (ESI): m/z ber. für C₂₆H₃₁N₄O⁺ [M⁺] = 415.2492; gef. = 415.2491.

5.3. Festphasensynthese und Sequenzen der Oligonukleotide

Kupplungsprotokolle

Die Festphasensynthese der modifizierten Einzelstränge erfolgte an einem H-6 Syntheseautomaten der Firma K&A-Laborgeräte. Die kommerziell erhaltenen natürlichen Basen C, G, A und T wurden als Phosphoramidite in Acetonitril gelöst und in einer 0,067 M Lösung zur Synthese verwendet. Die synthetisierten Phosphoramidite der Modifikationen wurden in wasserfreiem Acetonitril gelöst und in einer 0,1 M Lösung zur Festphasensynthese genutzt. Als Trägermaterial wurden mit CPG (*controlled pore glass*) gepackte Säulen einer Belegungsdichte von 1 μmol verwendet. Das zum Bau des Oligonukleotidstrangs verwendete Syntheseprotokoll ist in **Tabelle 3** dargestellt. Für den Einbau des modifizierten Bausteins wurde die Subroutine verändert. Das Protokoll ist in **Tabelle 4** aufgeführt.

Zur Synthese verwendete Reagenzien:

- TCA: 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan (*Deblocker*)
- ACN: Acetonitril (Waschreagenz)
- TET: 0,45 M Tetrazol in Acetonitril (*Activator*)
- CP_A: Acetanhydrid in THF/Pyridin (*Capping*)
- CP_B: N-Methylimidazol in THF/Pyridin (*Capping*)
- OXI: Iod in Wasser/THF/Pyridin (*Oxidizer*)
- AMD: Phosphoramidit

Zur Erklärung der Tabellen:

- Time: Die Zeiteinheit ist 0,1 s ($10 = 1$ s)
- Source: Quelle aus welcher das Reagenz verwendet wird.
- Mixed: Legt fest aus welchem Gefäß ein Reagenz kommt, welches mit dem Reagenz aus der Quelle gemischt wird.
- Destin: Zielort des Reagenzes.
- S. Col. Ptr.: (*single coloumn pointer*) zeigt die serielle Ausführung des jeweiligen Teils der Subroutine an.
- Delay: in diesem Zeitraum wird nichts ausgeführt.
- Branch: in diesem Feld wird die Branch Subroutine aufgerufen.

Tabelle 3: Syntheseprotokoll mit den jeweiligen Schritten für die Festphasensynthese von Oligonukleotidsträngen nach der Phosphoramiditmethode.

	Time (0,1s)	Source	Mixed	Destin	S. Col. Ptr.	Delay (1 s)	Branch
DEPROTECTION							
1	4	TCA		COL			
2	20	TCA		TRM	ON		
3					ON		
4						15	
5	15	TCA		TRM	ON		
6					ON		
7						15	
8	15	TCA		TRM	ON		
9					ON		
10						15	
11	15	TCA		TRM	ON		
12					ON		
13						15	
14	15	TCA		TRM	ON		
15					ON		
16						15	
17	30	GAS		TRM			
18	10	ACN		W_M			
19	20	ACN		COL	ON		
COUPLING I							
1	15	GAS		COL		2	
2	2	TET		COL	ON		
3					ON		
4						2	1
5	10	ACN		M_W		50	
6	10	ACN		Col	ON		
7					ON		
8	35	GAS		Col			
9	20	GAS		M_W			
BRANCH							
1	4	TET		COL	ON		
2	8	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						20	
5	4	AMD	TET	COL	ON		
6					ON		
7						20	
8	10	ACN		M_W			
9	10	GAS		M_W			

	Time (0,1s)	Source	Mixed	Destin	S. Col. Ptr.	Delay (1 s)	Branch
COUPLING II							
5	10	ACN		M_W		50	
6		WMO				90	
7		WMO				90	
8	10	ACN		COL	ON		
9					ON		
10	35	GAS		COL			
11	20	GAS		M_W			
CAPPING							
1	20	CP_A	CP_B	COL	ON		

5. Experimenteller Teil

2					ON		
3						15	
4	3	CP_A	CP_B	COL	ON		
5					ON		
6						15	
7	20	GAS		COL			
8	2	ACN		M_W			
9	12	ACN		COL	ON		
10					ON		
11	10	GAS		M_W		2	
12	30	GAS		COL			
OXIDATION							
1	20	OXI		COL	ON		
2					ON		
3	10	ACN		M_W		9	
4						9	
5	WTH					150	
6	WTH					150	
7	30	GAS		COL			
8	2	ACN		M_W			
9	16	ACN		COL	ON		
10					ON		
11	20						
12	30	GAS		COL			
13	2	ACN		M_W			
14	15	ACN		COL	ON		
15					ON		
16	40						

Tabelle 4: Syntheseprotokoll für den Einbau der synthetisierten Phosphoramidit der Modifikationen.

	Time (0,1s)	Source	Mixed	Destin	S. Col. Ptr.	Delay (1 s)	Branch
METHOD							
1	4	TET		COL	ON		
2	6	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6						99	
7						99	
8	6	AMD	TET	COL	ON		
9					ON		
10						99	
11						99	
12						99	
13						99	
14	6	AMD	TET	COL	ON		
15					ON		
16						99	
17						99	
18						99	
19						99	
20	6	AMD	TET	COL	ON		6
21					ON		
22						99	
23						99	

24						99	
25						99	
26	4	TET		COL	ON		
27					ON		
28	20	ACN		M_W		20	
29	20	ACN		M_W		20	
30	20	GAS		M_W			

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 im Hochvakuum getrocknet und mittels *reversed-phase* HPLC aufgereinigt (Methode siehe Kapitel 5.3.2).

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 5.3.2).

Entfernung der Thiol-Gruppen

Alle synthetisierten Einzelstränge enthielten Thiol-Gruppen, welche als Disulfid geschützt vorlagen. Um das freie Thiol zu erhalten, wurde die lyophilisierte DNA mit 500 μL 100 mM DTT in 50 mM TEAB-Puffer bei pH = 8.5 für 30 min bei Rt entschützt. Die Aufreinigung der DNA wurde per GE Healthcare illustra™ NAP™-5 Säule affinitätschromatographisch durchgeführt, als Eluent wurde dafür ddH₂O verwendet.

Sequenzen synthetisierter Oligonukleotide

ss-C1	5'-HS(CH ₂) ₆ -A-A-G-C-G-C-G-cC-G-C-G-C-G-T-T-3'
ss-C2	5'-HS(CH ₂) ₆ -A-A-G-C-G-cC-G-C-G-cC-G-C-G-T-T-3'
ss-C3	5'-HS(CH ₂) ₆ -A-A-G-cC-G-C-G-cC-G-C-G-cC-G-T-T-3'
ss-HC1	5'-C-C-A-C-A-HC-T-G-T-G-G-(CH ₂) ₃ SH-3'
ss-HC2.1	5'-C-C-A-HC-A-A-T-HC-T-G-G-(CH ₂) ₃ SH-3'
ss-HC2.2	5'-C-C-A-HC-A-T-T-HC-T-G-G-(CH ₂) ₃ SH-3'
ss-HC3	5'-C-HC-A-C-A-HC-T-G-T-HC-G-(CH ₂) ₃ SH-3'
ss-UL1	5'-ULink-C-C-A-C-A-A-T-G-T-G-G-3'
ss-UL2	5'-ULink-C-C-A-C-A-T-T-G-T-G-G-3'

Tabelle 5 Übersicht der Massen und Extinktionskoeffizienten bei $\lambda = 260$ nm der synthetisierten Oligonukleotide

DNA	Ber. Masse [g/mol]	Gef. Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
ss-C1	4706	4706	134.5
ss-C2	4759	4758	129.5
ss-C3	4812	4815	124.3
ss-HC1	3492	3491	96.4
ss-HC2.1	3511	3513	91.2
ss-HC2.2	3502	3502	87.3
ss-HC3	3522	3522	82.3
ss-UL1	3687	3607	116.6
ss-UL2	3678	3598	11.1

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ATT	6-Aza-2-thiothymin
Au	Gold
ber.	Berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl
br s	breites Singulett
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CDCl ₃	deutertes Chloroform
cm	Zentimeter
cm ⁻¹	Wellenzahl
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Cu(I)	Kupfer der Oxidationsstufe +1
Cu ²⁺	Kupferionen der Oxidationsstufe +2

δ	chemische Verschiebung
Δ	Delta
d	Dublett
d	Tag
dA	2'-Desoxyadenosin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichloromethan
dd	Dublett vom Dublett
ddH ₂ O	doppelt-deionisiertes Wasser
DEE	Diethylether
DTT	Dithiothreitol
dG	2'-Desoxyguanosin
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DMSO-d ₆	deutertes Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
ΔE	Energiedifferenz
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxynucleic acid)

D ₂ O	deutერიertes Wasser
dT	2'-Desoxythymidin
E	Energie
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
eq	Äquivalent (<i>equivalent</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	und andere (<i>et alii / aliae</i>)
etc.	et cetera
eV	Elektronenvolt
FAB	fast atom bombardment
FTIR	fouriertransformierte Infrarot-Spektroskopie (<i>fourier transformation infrared spectroscopy</i>)
g	Gramm
dG	Guanin
G	Leitfähigkeit
gef.	gefunden
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
hν	Licht
HF	Hydrofluorid

HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HPA	Hydroxypicolinsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectroscopy</i>)
Hz	Hertz
<i>in situ</i>	vor Ort
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
kJ	Kilojoule
kV	Kilovolt
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
LM	Lösungsmittel
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
M ⁺	Molekülion
m	Masse
m	Multipllett
MALDI	matrixunterstützte Laser Desorption/Ionisation (<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
mbar	Millibar

mg	Milligramm
MeOH	Methanol
MeOH-d ₆	deuteriertes Methanol
Mg ²⁺	zweiwertiges Magnesiumion
MH ⁺	protoniertes Molekülion
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mmol	Millimol
μmol	Mikromol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse pro Ladungszahl
n	Stoffmenge
NaPi	Natriumphosphatpuffer (pH 7)
n.b.	nicht bestimmt
NEt ₃	Triethylamin
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid

nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OAc	Acetat
OLED	organische Leuchtdiode (<i>organic light-emitting diode</i>)
p	Druck
p.A.	<i>pro analysi</i> (analysenrein)
Piv	Pivaloyl
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphan)palladium(0)
PPh ₃	Triphenylphosphan
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
R	Widerstand
R _f	Retentionsfaktor
R _t	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
s	Singulett
s	Sekunde
SiO ₂	Kieselgel
t	Triplett
t	Zeit
T	Thymidin

TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat-Puffer
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
THF	Tetrahydrofuran
Tof	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
U	Spannung
u. a.	Unter anderem
UHV	Ultrahochvakuum
ULink	5-(3-Thiol-1-propinyl)-2'-desoxyuridin
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volumen
W	Watt

7. Literaturverzeichnis

- [1] P. Rechenberg, G. Pomberger, K. Pirklbauer (Hrsg.) *Informatik-Handbuch*, Hanser, München, **2006**.
- [2] M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche, G. Schmid, *Small* **2005**, *1*, 841.
- [3] J. Alvarenga, P. R. Jarosz, C. M. Schauerman, B. T. Moses, B. J. Landi, C. D. Cress, R. P. Raffaele, *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *97*, 182106.
- [4] V. A. Montes, C. Pérez-Bolívar, N. Agarwal, J. Shinar, P. Anzenbacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12436.
- [5] A. Laforgue, P. Simon, C. Sarrazin, J.-F. Fauvarque, *J. Power Sources* **1999**, *80*, 142.
- [6] S. Machida, S. Miyata, A. Techagumpuch, *Synthetic Metals* **1989**, *31*, 311.
- [7] A. S. Dvornikov, E. P. Walker, P. M. Rentzepis, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13633.
- [8] Johnson, Thywissen, Dekker, Berggren, Chu, Younkin, Prentiss, *Science* **1998**, *280*, 1583.
- [9] H. W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407.
- [10] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [11] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [12] Berg, *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, **2018**.
- [13] E. Leary, C. Roche, H.-W. Jiang, I. Grace, M. T. González, G. Rubio-Bollinger, C. Romero-Muñiz, Y. Xiong, Q. Al-Galiby, M. Noori et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 710.
- [14] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564.
- [15] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237.
- [16] N. R. Kallenbach, R.-I. Ma, N. C. Seeman, *Nature* **1983**, *305*, 829.
- [17] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859.
- [18] T. B. Johnson, C. O. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1905**.
- [19] F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1781.
- [20] M. P. Wallis, I. D. Spiers, C. H. Schwalbe, W. Fraser, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3759.
- [21] F. Seela, K. Kaiser, U. Bindig, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 868.
- [22] M. A. Cameron, S. B. Cush, R. P. Hammer, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065.
- [23] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [24] L. Zhang, J. Zhang, J. Ulstrup, *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *4*, 166.

- [25] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [26] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.
- [27] G. F. Joyce, A. W. Schwartz, S. L. Miller, L. E. Orgel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4398.
- [28] D. H. Appella, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 687.
- [29] W. Bannwarth, W. Pfliederer, F. Müller, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1991.
- [30] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025.
- [31] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12494.
- [32] E. Bätzner, Y. Liang, C. Schweigert, A.-N. Unterreiner, H.-A. Wagenknecht, *Chemphyschem* **2015**, *16*, 1607.
- [33] T. Ehrenschwender, W. Schmucker, C. Wellner, T. Augenstein, P. Carl, J. Harmer, F. Breher, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur.* **2013**, *19*, 12547.
- [34] A. Fujii, O. Nakagawa, Y. Kishimoto, T. Okuda, Y. Nakatsuji, N. Nozaki, Y. Kasahara, S. Obika, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 7443.
- [35] J.-L. H. A. Duprey, Y. Takezawa, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 1212.
- [36] P. M. Punt, G. H. Clever, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 2513.
- [37] M. A. Sari, J. P. Battioni, D. Dupré, D. Mansuy, J. B. Le Pecq, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4205.
- [38] K. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, *The Porphyrin Handbook*, Elsevier Science, **2000**.
- [39] E. Stulz, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 823.
- [40] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114.
- [41] R. L. Letsinger, T. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7323.
- [42] F. D. Lewis, Y. Wu, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12165.
- [43] S. Patnaik, P. Kumar, B. S. Garg, R. P. Gandhi, K. C. Gupta, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7840.
- [44] S. Keiper, J. S. Vyle, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 3306.

- [45] M. Singer, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8372.
- [46] T. Buckup, C. Sarter, H.-R. Volpp, A. Jäschke, M. Motzkus, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 4717.
- [47] S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 8839.
- [48] H. Asanuma, T. Takarada, T. Yoshida, D. Tamaru, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2671.
- [49] A. Yamazawa, X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2446.
- [50] J. Tersoff, D. R. Hamann, *Phys. Rev. Lett.* **1983**, *50*, 1998.
- [51] C. Bai, *Scanning tunneling microscopy and its applications*, 2. Aufl., Springer, Berlin, **2000**.
- [52] D. A. Bonnell (Hrsg.) *Scanning probe microscopy and spectroscopy. Theory, techniques, and applications*, Wiley-VCH, New York, NY, **2001**.
- [53] R. Wiesendanger, H.-J. Güntherodt, *Scanning Tunneling Microscopy III. Theory of STM and Related Scanning Probe Methods*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1993**.
- [54] J. G. Simmons, *J. Appl. Phys.* **1963**, *34*, 1793.
- [55] E. H. Huisman, C. M. Guédon, B. J. van Wees, S. J. van der Molen, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3909.
- [56] H. Jeong, Y. Jang, D. Kim, W.-T. Hwang, J.-W. Kim, T. Lee, *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 3564.
- [57] D. D. Dunlap, R. García, E. Schabtach, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7652.
- [58] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635.
- [59] A. Y. Kasumov, M. Kociak, S. Guéron, B. Reulet, V. T. Volkov, D. V. Klinov, H. Bouchiat, *Science* **2001**, *291*, 280.
- [60] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411.
- [61] D. D. Eley, R. B. Leslie, *Nature* **1963**, *197*, 898.
- [62] M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11713.
- [63] V. Sartor, E. Boone, G. B. Schuster, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11057.
- [64] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 409.
- [65] M. Hjort, S. Stafström, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87*, 228101.

- [66] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 791.
- [67] Y. Li, L. Xiang, J. L. Palma, Y. Asai, N. Tao, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11294.
- [68] J. C. Genereux, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1642.
- [69] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 409.
- [70] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15010.
- [71] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 31.
- [72] M. Zhang, J. Chen, X. Pi, C. Deng, J. Xiang, *Electroanalysis* **2019**, *31*, 477.
- [73] L. Kékedy-Nagy, E. E. Ferapontova, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 3048.
- [74] J. D. Slinker, N. B. Muren, S. E. Renfrew, J. K. Barton, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 228.
- [75] H. M. J. Al-Ta'ii, V. Periasamy, Y. M. Amin, *Sensor Actuat. B-Chem.* **2016**, *232*, 195.
- [76] K.-Y. Lin, A. Burke, N. B. King, D. Kahanda, A. Mazaheripour, A. Bartlett, D. J. Dibble, M. A. McWilliams, D. W. Taylor, J.-M. Jocson et al., *ChemPlusChem* **2019**, *84*, 416.
- [77] S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X. Guo, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 8886.
- [78] X. Guo, A. A. Gorodetsky, J. Hone, J. K. Barton, C. Nuckolls, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 163.
- [79] T. Himuro, S. Tsukamoto, Y. Saito, *J. Electron. Mater.* **2019**, *48*, 1562.
- [80] D. Dulić, S. Tuukkanen, C.-L. Chung, A. Isambert, P. Lavie, A. Filoramo, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 115502.
- [81] S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X. Guo, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 8886.
- [82] D. M. Ceres, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14964.
- [83] J. Hihath, B. Xu, P. Zhang, N. Tao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16979.
- [84] J. Hihath, S. Guo, P. Zhang, N. Tao, *J. Phys.: Condens. Matter* **2012**, *24*, 164204.
- [85] C. Bruot, L. Xiang, J. L. Palma, Y. Li, N. Tao, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13933.
- [86] E. Beall, A. Sargun, S. Ulku, Y. Bae, E. Wierzbinski, C. Clever, D. H. Waldeck, C. Achim, *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 7533.
- [87] C. Bruot, L. Xiang, J. L. Palma, Y. Li, N. Tao, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13933.
- [88] M. Zwolak, M. Di Ventra, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 421.

- [89] T. Furuhata, T. Ohshiro, G. Akimoto, R. Ueki, M. Taniguchi, S. Sando, *ACS nano* **2019**, *13*, 5028.
- [90] K. Liu, C. Pan, A. Kuhn, A. P. Nievergelt, G. E. Fantner, O. Milenkovic, A. Radenovic, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3.
- [91] H. Tanaka, M. Taniguchi, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2017**, *56*, 08LB02.
- [92] K. L. Jiménez-Monroy, N. Renaud, J. Drijkoningen, D. Cortens, K. Schouteden, C. van Haesendonck, W. J. Guedens, J. V. Manca, L. D. A. Siebbeles, F. C. Grozema et al., *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121*, 1182.
- [93] S. Afsari, L. E. Korshoj, G. R. Abel, S. Khan, A. Chatterjee, P. Nagpal, *ACS nano* **2017**, *11*, 11169.
- [94] E. Wierzbinski, J. Arndt, W. Hammond, K. Slowinski, *Langmuir* **2006**, *22*, 2426.
- [95] Xu, Zhang, Li, Tao, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1105.
- [96] H. van Zalinge, D. J. Schiffrin, A. D. Bates, W. Haiss, J. Ulstrup, R. J. Nichols, *Chemphyschem* **2006**, *7*, 94.
- [97] I. Kratochvílová, K. Král, M. Bunčák, S. Nešpůrek, T. Todorciuc, M. Weiter, J. Navrátil, B. Schneider, J. Pavluch, *Open Phys.* **2008**, *6*, 128.
- [98] C. Schildkraut, *Biopolymers* **1965**, *3*, 195.
- [99] R. N. Barnett, C. L. Cleveland, A. Joy, U. Landman, G. B. Schuster, *Science* **2001**, *294*, 567.
- [100] K. Wang, J. M. Hamill, B. Wang, C. Guo, S. Jiang, Z. Huang, B. Xu, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3425.
- [101] J. M. Artés, Y. Li, J. Qi, M. P. Anantram, J. Hihath, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8870.
- [102] M. S. Xu, S. Tsukamoto, S. Ishida, M. Kitamura, Y. Arakawa, R. G. Endres, M. Shimoda, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*, 83902.
- [103] R. Pawlak, J. G. Vilhena, A. Hinaut, T. Meier, T. Glatzel, A. Baratoff, F. Moreno-Herrero, E. Gnecco, R. Perez, E. Meyer, *Conformation And Mechanical Response of Spray Deposited Single Strand DNA on Gold*, **2017**.
- [104] H. Matsuura, H. Hokonohara, T. Sugita, A. Takagi, K. Suzuki, T. Matsumoto, T. Kawai, *J. Appl. Phys.* **2011**, *109*, 34701.
- [105] J. Hihath, F. Chen, P. Zhang, N. Tao, *J. Phys.: Condens. Matter* **2007**, *19*, 215202.

- [106] H. van Zalinge, D. J. Schiffrin, A. D. Bates, E. B. Starikov, W. Wenzel, R. J. Nichols, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5625.
- [107] L. Xiang, J. L. Palma, C. Bruot, V. Mujica, M. A. Ratner, N. Tao, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 221.
- [108] L. Xiang, J. L. Palma, Y. Li, V. Mujica, M. A. Ratner, N. Tao, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14471.
- [109] Y. Li, J. M. Artés, J. Qi, I. A. Morelan, P. Feldstein, M. P. Anantram, J. Hihath, *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 1888.
- [110] Y. Li, J. M. Artés, J. Hihath, *Small* **2016**, *12*, 432.
- [111] E. Wierzbinski, A. de Leon, K. L. Davis, S. Bezer, M. A. Wolak, M. J. Kofke, R. Schlaf, C. Achim, D. H. Waldeck, *Langmuir* **2012**, *28*, 1971.
- [112] E. Beall, S. Ulku, C. Liu, E. Wierzbinski, Y. Zhang, Y. Bae, P. Zhang, C. Achim, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6726.
- [113] E. Beall, S. Ulku, C. Liu, E. Wierzbinski, Y. Zhang, Y. Bae, P. Zhang, C. Achim, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6726.
- [114] T. Harashima, C. Kojima, S. Fujii, M. Kiguchi, T. Nishino, *Chem Commun (Camb)* **2017**, *53*, 10378.
- [115] C. Guo, K. Wang, E. Zerah-Harush, J. Hamill, B. Wang, Y. Dubi, B. Xu, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 484.
- [116] E. Toomey, J. Xu, S. Vecchioni, L. Rothschild, S. Wind, G. E. Fernandes, *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 7804.
- [117] L. M. Scolaro, A. Romeo, R. F. Pasternack, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7178.
- [118] T. Uno, K. Aoki, T. Shikimi, Y. Hiranuma, Y. Tomisugi, Y. Ishikawa, *Biochemistry* **2002**, *41*, 13059.
- [119] Z. Abou-Gamra, A. Harriman, P. Neta, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1986**, *82*, 2337.
- [120] C. Wellner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1692.
- [121] Y. Liu, H.-J. Zhang, Y.-Q. Cai, H.-H. Wu, X.-L. Liu, Y. Lu, *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 848.
- [122] V. Malinovski, L. Tumir, I. Piantanida, M. Zinic, H.-J. Schneider, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 3785.
- [123] M. Grøtli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899.
- [124] R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, J. J. Villafranca, *Biochemistry* **1983**, *22*, 2406.

- [125] K.-P. S. Dancil, L. F. Hilario, R. G. Khoury, K. U. Mai, C. K. Nguyen, K. S. Weddle, A. M. Shachter, *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, *34*, 749.
- [126] F. Babudri, A. Cardone, C. Cioffi, G. Farinola, F. Naso, R. Ragni, *Synthesis* **2006**, *2006*, 1325.
- [127] K. W. Wellington, S. A. Benner, *Nucleos Nucleot Nucl.* **2006**, *25*, 1309.
- [128] M. Barbatti, A. J. A. Aquino, H. Lischka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4959.
- [129] *Absorption Spectra in the Ultraviolet and Visible Region*. Data from NIST Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook, Budapest, **1961**.
- [130] K. Sone, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5207.
- [131] D. G. Lewis, W. C. Johnson, *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 91.
- [132] Z.-L. Zhang, D.-W. Pang, R.-Y. Zhang, J.-W. Yan, B.-W. Mao, Y.-P. Qi, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 104.
- [133] S. N. Patole, A. R. Pike, B. A. Connolly, B. R. Horrocks, A. Houlton, *Langmuir* **2003**, *19*, 5457.
- [134] F. Chen, X. Li, J. Hihath, Z. Huang, N. Tao, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15874.
- [135] H. Häkkinen, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 443.
- [136] P. Yasini, S. Afsari, H. Peng, P. Pikma, J. P. Perdew, E. Borguet, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 10109.
- [137] Y. Komoto, S. Fujii, T. Nishino, M. Kiguchi, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 2431.
- [138] H. A. Held, A. Roychowdhury, S. A. Benner, *Nucleos Nucleot Nucl.* **2003**, *22*, 391.
- [139] A. B. Lowe, C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4745.
- [140] A. N. Kost, A. P. Stankevichus, L. N. Zhukauskaite, I. I. Shulyakene, *Chem Heterocycl Compd* **1971**, *7*, 474.
- [141] B. Duong, R. Arechabaleta, N.J. Tao, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *447*, 63.
- [142] J. Andersson, S. Li, P. Lincoln, J. Andréasson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11836.
- [143] A. V. Metelitsa, N. A. Voloshin, S. O. Besuglyi, E. V. Solov'eva, K. E. Shepelenko, Y. R. Abubikerova, V. I. Minkin, *Russ. Chem. Bull.* **2013**, *62*, 529.
- [144] F. Maurel, J. Aubard, P. Millie, J. P. Dognon, M. Rajzmann, R. Guglielmetti, A. Samat, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 4759.
- [145] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2752.
- [146] K. Groves, A. J. Wilson, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12833.

[147] S. S. ERDEM, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1998**, 02, 61.

[148] H. Sugiyama, S. Matsuda, K. Kino, Q.-M. Zhang, S. Yonei, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 9067.

8. Appendix

8.1 Publikationen, Posterbeiträge und Konferenzen

- 09/2016 III. Doktorandenseminar der Deutschen Nucleinsäuregemeinschaft der DNG,
Bad Herrenalb, Poster
- 10/2017 VIII. Nucleinsäurechemietreffen der DNG, Mainz, Poster
- 07/2019 European Symposium on Organic Chemistry (ESOC), Wien, Poster

9. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Karlsruhe, den

.....