

**ENTWICKLUNG NEUARTIGER FLUORESZENZSONDEN
ZUR VISUALISIERUNG VON RNA
UND ALS NANOTHERMOMETER**

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)



genehmigte
DISSERTATION
von
M. Sc. Fabian Lang
aus Karlsruhe

Karlsruhe, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Manfred Wilhelm
Referent:	Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Korreferentin:	Prof. Dr. Ute Schepers
Tag der mündlichen Prüfung:	21.07.2021

Meinen Eltern

*„Pragmatismus ist nicht das Gegenteil von
Perfektionismus, sondern der Weg dorthin.“*

– Uğur Şahin (BIONTECH) –

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2018 bis Juni 2021 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die Aufnahme in den Arbeitskreis, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die stets offene Tür. Durch die abwechslungsreiche Themenstellung wurden mir viele Einblicke in naturwissenschaftliche Bereiche außerhalb der Chemie ermöglicht.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen für die tolle Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft und die unvergessliche Zeit im AKW bedanken: Dr. Christoph Bickmann, Anke Culetto, Dr. Larissa Doll, Dorothée Ganz, Benjamin Felker, Elena Foitzik, Dr. Yannic Fritz, Julian Gebhard, Philipp Geng, Lisa Gramespacher, Dennis Harijan, Dr. Sergej Hermann, Lara Hirsch, Annette Hochgesand, Dr. Robert Hofsäß, Sina Jaschik, Joana Krämer, Dr. Katja Krell, Arthur Kuhlmann, Dr. Benjamin Lehmann, Rita Michenfelder, Michaela Mijic, Karen Möbius, Kerstin Müller, Dr. Sara Müller, Bastian Pfeuffer, Dr. Damian Ploschik, Dr. Ulrike Reisacher, Lisa Rieger, Dr. David Rombach, Dr. Franziska Rönicke, Daniel Sack, Maren Schrödter, Manuel Schupp, Dr. Christian Schwechheimer, Maximilian Seifermann, Nicola Seul, Dr. Fabienne Seyfert, Dr. Jeannine Steinmeyer, Desirée Steuernagel, Claudia Sommer, Hülya Ucar, Fabienne Urbanek, Fabian Weick, Judith Winsauer, Dr. Samantha Wörner.

Im Speziellen möchte ich mich auch bedanken bei:

- dem *Graduiertenkolleg 2039* (DFG) für die wissenschaftliche, interdisziplinäre Vielfalt, die finanzielle Unterstützung meiner Promotion und die Möglichkeit zum Erlangen von nicht fachlichen Kompetenzen (*Soft Skills*).
- Prof. Dr. Heike Allgayer (Universitätsklinikum Mannheim / Universität Heidelberg), Prof. Dr. Christoph Cremer und Dr. Maria Contreras (Institut für Molekular Biologie, Mainz) für die gemeinsame Arbeit zur miRNA-Detektion in Tumorgewebe.
- Prof. Dr. Uwe Strähle, Dr. Sepand Rastegar und Luisa Lübke (Institut für Biologische und Chemische Systeme, KIT) für die interessanten Einblicke in Zebrafische und deren Gehirne. Vielen Dank Luisa für den Unterricht im Sezieren, Sektionieren und Präparieren von Zebrafisch-Gehirnschnitten.

- Dr. Wolfgang Greffrath (Universitätsklinikum Mannheim) für die Zusammenarbeit im Nanothermometer-Projekt.
- Dr. Patrick Weis und Aron Veenstra aus dem Arbeitskreis Kappes (Institut für Physikalische Chemie, KIT) für die Nano-ESI-Messungen meiner Molecular Beacons.
- Lara Hirsch und Angelika Möhle für die Messung der analytischen Proben.
- Richard von Budberg für die schnelle Reparatur von Glasgeräten sowie Anfertigung neuer Säulen und Säulenkugeln.
- Jakob Mayer für die Reparatur der Elektrogeräte und dem kurzfristigen Löten von Kabelbrüchen.
- Dr. Andreas Rapp für die Unterstützung beim Umzug der AKW-Daten auf den SCC-Server und die Instandhaltung des NMRs.
- Dr. Norbert Foitzik für die Unterstützung in Praktikumsangelegenheiten.
- Claudia Sommer, der besten Sekretärin der Welt, für die Hilfe in allen organisatorischen Angelegenheiten, den Kampf mit dem Finanzmanagement für diverse Nicht-SAP-Bestellungen und die regelmäßigen Schwätzle zwischendurch.
- Annette Hochgesand für das MALDI-Messen meiner schier endlosen Anzahl von DNA-Proben, die vielen Bestellungen und das Nachhaken bei Lieferverzögerungen.
- Dr. Franziska Röncke für die Einführung in Zellexperimente, die Unterstützung bei der Mikroskopie und das Anfertigen des Zelllysats.
- Dr. Larissa Doll, Julian Gebhard, Hülya Ucar und Luisa Lübke für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- „Mama Bär“ Sara für die wunderbare gemeinsame Zeit als Schreibtisch-, Abzug- und Benchnachbarn, dein offenes Ohr, die unterhaltsamen und vielseitigen Gespräche sowie die Versorgung des AKW mit Kinderschokolade-, Toffifee- und Eierlikör.
- „Baby Bär“ Samantha, dass du Sara und mich immer auf Trab gehalten hast, die Unterhaltung mit Hörspielen aller Art und die regelmäßigen Stimmungsaufheller in Form von Seifenblasen.
- Nicola und Maren, die als Schreibtischnachbarinnen ein schweres Erbe anzutreten hatten. Eure ruhige und ausgeglichene Art hat mir in den finalen Labormonaten sehr geholfen, wenn mal wieder die entscheidende DMT-Schätzung nicht wollte oder es die nächste kryptische E-Mail zu verstehen galt.
- Hülya für den gewissenhaften Support der Fluoris, deine direkte und liebevolle Art sowie die stets unvorhergesehenen, aber immer wieder lustigen Krachersprüche.

- Julian für dein gutmütiges und humorvolles Wesen, das zuverlässige Ausführen deiner Aufgabe als Frühstücksbeauftragter und vor allem jegliche Unterstützung bei der HPLC.
- Anke, der letzten Peptidianerin, für deine herzliche und hilfsbereite Art.
- Arthur für den langen gemeinsamen Weg vom Quali-Praktikum bis zum Ende der Promotion als AK-Opas, den geteilten Ordnungs- und Organisationsdrang und die gleiche unerschütterbare positive Einstellung zur Praktikumsbetreuung.
- Yannic, meinem Lehrmeister als Admin, für den zusammen vollzogenen Umzug der AKW-IT ins 21. Jahrhundert und das Eröffnen sämtlicher Buffets, die ohne dich länger warten müssen bis sich endlich jemand traut.
- Unseren siamesischen Zwillingen Fabse und (kleiner) Fabian (aka Premium) für diverse unterhaltsame, kuriose und manchmal auch fragwürdige Momente auf meiner Abkürzung durch 203.
- Lari, mit ihrem „Sonnenaufgangslächeln“ und der goldenen Stimme, für die gesungenen Erinnerungen, doch mal wieder Blau zu machen, die Einweisung in RNase-freies Arbeiten und die Fernunterstützung zur RNA-Synthese.
- Katja aka Katschimedia für die regelmäßigen Battles in unnützem Wissen, unseren gemeinsamen Seilbahn-Survival-Trip und den selbst extrahierten Kehlschneider.
- Rita für den neuen Schwung, den du in den AKW gebracht hast, und die immer wieder neuen Unterhaltungsthemen, so dass es mit dir nie langweilig wird.
- Max, der uns leider viel zu früh wieder verlassen musste, sich jedoch in der kurzen Zeit als Mottotagsbeauftragter-Anwärter mit dem „Not so casual friday“ trotzdem ein Denkmal gesetzt hat.
- Basti und Lisa, die offensichtlich regelmäßig Sport machen, für eure erfrischende und positive Art.
- dem gesamten Erdgeschoss für die immer wieder unterhaltsame gemeinsame Zeit, auch wenn diese speziell durch Corona zu kurz geraten ist.
- Damian und Christoph für die Unterstützung während der Masterarbeit und auf dem Weg zum Antritt der Promotion.
- David und Jeannine für die Betreuung meiner Bachelor- bzw. Vertiefearbeit, durch die ich zum AKW und für mich das richtige Thema gefunden habe.
- meiner Bachelorandin Katharina, die ihre großspurige Ankündigung wahrgemacht und einen wichtigen Beitrag zu dieser Dissertation geleistet hat.

- meiner Uni-Crew Boey, Daniel, Dave, Felix, Kev, Mareen, Maxi und Ted für das gemeinsame Durchbeißen durch das Studium, diverse Spieleabende, die regelmäßigen Mittagessen und viele lustige sowie schöne Momente während des Studiums und der Promotion.
- Janis und Manu für den erhalten gebliebenen Kontakt trotz getrennter Weg und die alljährlichen Gartenfeiern.
- meinen ehemaligen Chemie- und Biologielehrern Herr Ziegler und Frau Vincent, deren Unterricht mein Interesse an diesen Naturwissenschaften bestärkt hat.

Abschließend gilt mein größter Dank meinen Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen, das Aushalten so mancher Launen und den stetigen Rückhalt, ohne den das alles nicht möglich gewesen wäre.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Motivation und Themenstellung	1
2 Theoretischer Hintergrund	4
2.1 Bioorthogonale Markierungen.....	4
2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET).....	8
2.3 Intrazelluläre Thermometer	12
2.4 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	15
2.5 Fluoreszente Basensurrogate	18
3 L-konfigurierte <i>Molecular Beacons</i> als potentielle intrazelluläre Thermometer.....	22
3.1 Synthese des L-cU Bausteins	22
3.1.1 Synthese von L-Uridin (5).....	22
3.1.2 Synthese des L-cU-Phosphoramidites (1).....	23
3.2 Synthese und Modifikation der <i>Molecular Beacons</i>	25
3.3 Spektroskopische Untersuchungen.....	26
3.3.1 Absorption.....	26
3.3.2 Fluoreszenz.....	27
3.3.3 Zyklische Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Stabilität.....	29
3.3.4 Temperaturabhängiger Vergleich mit D-konfigurierten <i>Molecular Beacons</i>	29
3.3.5 Untersuchungen der Stabilität in Zellysat	30
3.3.6 Temperaturabhängige Emissionsmessungen in Zellysat	31
3.4 Zellexperimente	32
3.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	37
4 FISH-Sonden zur Detektion von miRNA in humanem Darmkrebsgewebe	38
4.1 Synthese der FISH-Sonden.....	39
4.2 Spektroskopische Untersuchungen.....	40
4.2.1 Spektroskopie der Cy5-modifizierten FISH-Sonden.....	40

4.2.2	Spektroskopie der <i>AF448</i> -modifizierten FISH-Sonden	41
4.2.3	Messung und Vergleich der Schmelztemperaturen.....	41
4.3	FISH-Experimente.....	42
4.3.1	Konfokalmikroskopie.....	42
4.3.2	Quantifizierung der FISH-Experimente	46
4.3.3	Einzelmolekülmikroskopie.....	47
4.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	48
5	FISH-Sonden zur Detektion von miRNA und mRNA in Zebrafisch Gehirnschnitten	49
5.1	FISH-Sonden zur Detektion von miRNA.....	49
5.1.1	Synthese der FISH-Sonden	50
5.1.2	Spektroskopische Untersuchungen	51
5.1.3	FISH-Experimente	54
5.2	FRET-basierte FISH-Sonden zur Detektion von miRNA	58
5.2.1	Aufbau und Synthese der FRET-Sonden	58
5.2.2	Spektroskopische Untersuchungen	59
5.3	Multiple FISH-Sonden zur Detektion der mRNA von <i>prdm12b</i>	64
5.3.1	Aufbau und Synthese der FISH-Sonden	64
5.3.2	Spektroskopische Untersuchungen	65
5.3.3	FISH-Experimente	67
5.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	69
6	Aminophthalimid-Basensurrogate für RNA	71
6.1	Syntheseübersicht	72
6.1.1	Synthese des o-4API-Phosphoramidites (20).....	72
6.1.2	Synthese des DMAPi-Phosphoramidites (28).....	74
6.2	Synthese der RNA	76
6.3	Spektroskopische Untersuchungen.....	78
6.3.1	Optische Charakterisierung der o-4API-RNA	78

6.3.2	Optische Charakterisierung der DMAPI-RNA	81
6.4	Vergleich von o-4API und DMAPI in RNA	82
6.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	83
7	Zusammenfassung.....	84
8	Experimenteller Teil	86
8.1	Materialien und Methoden.....	86
8.2	Synthesevorschriften	91
8.2.1	Synthese von 2'-O-Propargyl-L-uridin und dessen Phosphoramidit.....	91
8.2.2	Synthese der o-4API- und DMAPI-Phosphoramidite	100
8.2.3	Synthese des DAPym-Phosphoramidites	101
8.3	Oligonukleotide	102
8.3.1	Synthese modifizierter DNA.....	102
8.3.2	Synthese modifizierter RNA	109
8.3.3	HPLC-Methoden	113
8.3.4	Charakterisierung der Oligonukleotide	113
8.4	FISH-Experimente in humanen Darmgewebeschnitten	117
8.5	FISH-Experimente an Zebrafisch-Gehirnschnitten	118
8.6	Zellexperimente der <i>Molecular Beacons</i>	119
8.7	Zusätzliche Spektren und Daten	120
8.7.1	Molecular Beacons	120
8.7.2	t-FISH-Sonden	121
9	Literaturverzeichnis.....	122
10	Appendix	130
10.1	Publikationen	130
10.2	Konferenzen und Posterbeiträge	130
10.3	Lehre	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ø	Durchschnitt	DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
°	Grad	DMF	Dimethylformamid
°C	Grad Celsius	DMSO	Dimethylsulfoxid
%	Prozent	DMTr	Dimethoxytrityl
Δ	Hitze, Delta	DNA	Desoxyribonukleinsäure
®	registrierte Warenmarke	ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
Å	Ångström	dT	2'-Desoxythymidin
A	Akzeptor, Absorption	δ	chemische Verschiebung
Abb.	Abbildung	E	Energietransfereffizienz
abs	Absorption	ε ₂₆₀	Extinktionskoeffizient bei 260 nm
abs.	absolut	ECHO	<i>exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotides</i>
a.u.	willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BHQ	<i>black hole quencher</i>	EE	Essigsäureethylester
bzw.	beziehungsweise	EI	Elektronenstoßionisation
ca.	circa	eq.	Äquivalente
cm	Zentimeter	ESI	Elektronensprayionisation
CPG	<i>controlled pore glas</i>	et al.	und andere (<i>et alii</i>)
cU	2'- <i>O</i> -Propargyluridin	Et ₃ N	Triethylamin
CuAAC	kupfer(I)katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition	EtOH	Ethanol
Cy3	Cyanine 3	F	Fluoreszenz
Cy5	Cyanine 5	FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>
D	Donor	FC	<i>Flash</i> Säulenchromatographie
d	Dublett	FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
Da	Dalton	FIT	<i>forced intercalation</i>
dA	2'-Desoxyadenosin	FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
DC	Dünnschichtchromatographie	Φ _F	Fluoreszenzquantenausbeute
dC	2'-Desoxycytidin		
DCM	Dichlormethan		
dG	2'-Desoxyguanosin		
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser		

G	Guanosin	λ_{exc}	Anregungswellenlänge
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	M	molar
h	Stunde	m	Multiplett
H ₂ O	Wasser	MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
HeLa	Henrietta Lacks		
h ν	planksches Wirkungsquantum	MB	<i>Molecular Beacon</i>
	h mit Frequenz ν	MeCN	Acetonitril
HOMO	höchst besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)	MeOH	Methanol
		mg	Milligramm
HPA	Hydroxypicolinsäure	MHz	Megahertz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)	Min	Minute
		miRNA	<i>micro RNA</i>
		mL	Milliliter
		mM	millimolar
		mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
HR	hochauflösend (<i>high resolution</i>)	MS	Massenspektroskopie
I	Intensität	μL	Mikroliter
I ₂	Iod	μm	Mikrometer
IC	Innere Umwandlung (<i>internal conversion</i>)	μM	mikromolar
iEDDA	Diels-Alder mit inversem Elektronenbedarf (<i>inverse electron demand Diels-Alder</i>)	N ₂	Stickstoff
		Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
		NaCl	Natriumchlorid
ISC	<i>intersystem crossing</i>	NaOH	Natriumhydroxid
J	Kopplungskonstante	NaP _i	Natriumphosphatpuffer
konz.	konzentriert	NEt ₃ ·HF	Triethylamintrihydrofluorid
κ	Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor	NH ₃	Ammoniak
		nm	Nanometer
L	Liter	nM	nanomolar
L-cU	2'-O-Propargyl-L-uridin	nmol	Nanomol
LNA	<i>locked Nukleinsäure</i>	NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
Lsg.	Lösung	ns	Nanosekunde
λ_{em}	Emissionswellenlänge	ν	Brechungsindex

P	Phosphoreszenz		(<i>strain promoted azide-</i>
p.a.	pro analysi		<i>alkyne-cycloaddition</i>)
Pd(OAc) ₂	Palladiumacetat	ss	einzelsträngig (<i>single</i>
PEG	Polyethylenglykol		<i>stranded</i>)
pH	pondus Hydrogenii	STED	<i>stimulated emission depletion</i>
pmol	Pikomol	t	Zeit, Triplett
pos.	positiv	t _{1/2}	Halbwertszeit
PPh ₃	Triphenylphosphan	TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
ppm	<i>parts per million</i>	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
pri	<i>primary</i>	TBDMS-	Tert-butyldimethylsilylchlorid
quant.	quantitativ	Cl	
quart.	quarternär	TBTA	Tris(benzyltriazolymethyl)a
r	Radius		min
rA	Adenosin	THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
rC	Cytidin	THF	Tetrahydrofuran
R _f	Retentionsfaktor	™	unregistrierte Warenmarke
rG	Guanosin	T _m	Schmelztemperatur
RNA	Ribonukleinsäure	T _n	Triplett-Zustand n
RP	Umkehrphase (<i>reversed</i>	ts	dreifachsträngig (<i>triple</i>
	<i>phase</i>)		<i>stranded</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i>	τ	Fluoreszenzlebenszeit
RT	Raumtemperatur	usw.	und so weiter
rU	Uridin	UV	Ultraviolett
s	Sekunde, Singulett	vgl.	vergleiche
s.	siehe	Vis	sichtbarer
sm	<i>single molecule</i>		Wellenlängenbereich des
S _n	Singulett-Zustand n		Lichtes (<i>visible</i>)
SPAAC	ringspannungsgesteuerte	vs.	versus
	Azid-Alkin-Cycloaddition	z.B.	zum Beispiel

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und den von der *IUPAC-IUB-Kommission*² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden kursiv dargestellt.

¹ *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

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

1 MOTIVATION UND THEMENSTELLUNG

„Halten Sie die Moleküle einfach ruhig und lassen Sie nur wenige zu Wort kommen. Eine einfache Lösung für ein vermeintlich unlösbares Problem. Sie machte die Auflösungsgrenze zur Geschichte.“^[1] – Mit diesen Worten beschrieb der deutsche Physiker STEFAN HELL in seiner Nobel-Bankettrede die Idee und den Erfolg hinter der Entwicklung der STED-Mikroskopie (engl. *stimulated emission depletion*), für die er 2014 zusammen mit WILLIAM MOERNER und ERIC BETZIG 2014 den Nobelpreis in Chemie „für die Entwicklung von supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie“ erhielt. Diese nun gebrochene Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie beschrieb ERNST ABBE rund 140 Jahre zuvor im Jahr 1873. Sie besagt, dass die maximale Auflösung bzw. der Abstand, mit dem zwei Linien noch als getrennt erkannt werden, der halben Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes entspricht.^[2] MOERNER *et al.* gelang 1989 die optische Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle in Festkörpern und machten damit die ersten Schritte hin zur Entwicklung der supraauflösenden Fluoreszenzmikroskopie.^[3] Im Jahr 1994 publizierten HELL *et al.* die Idee des STED-Mikroskops, dessen Realisierung fünf Jahre später 1999 gelang und damit erstmals das ABBE-Limit unterschritten werden konnte. Bei der STED-Mikroskopie werden zunächst Fluorophore in einem bestimmten Bereich angeregt und anschließend mit einem zweiten Laser Moleküle ringförmig im Außenbereich des Fokus gezielt ausgeschaltet, wodurch nur die Emission der Fluorophore im Zentrum übrig bleibt und somit das ABBE-Limit umgangen wird.^[4-5] Neben der STED-Mikroskopie wurden viele weitere Methoden zur supraauflösenden Fluoreszenzmikroskopie entwickelt wie z.B. *Photoactivated localization microscopy* (PALM), *Spatially modulated illumination microscopy* (SMI) oder *Points accumulation for imaging in nanoscale topography* (PAINT).^[6-8] Mithilfe dieser neuartigen Mikroskopiemethoden wurden tiefere Einblicke in die biochemischen Prozesse innerhalb von Zellen möglich, wobei auch die optische Bildgebung von Nukleinsäuren eine entscheidende Rolle spielt. Hierfür sind jedoch auch die entsprechenden Fluoreszenzsonden wichtig, die eine Detektion erst ermöglichen, wozu unter anderem Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs- (FISH) oder auch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Sonden (FRET) zählen. Derartige Sonden sollten eine ausgeprägte Spezifität gegenüber ihrem Zielmolekül aufweisen und einen Fluorophor mit hoher Fluoreszenz sowie Photostabilität besitzen.^[9-10]

Um einen Beitrag dazu zu leisten, beschäftigte sich die Forschung in dieser Arbeit mit der Entwicklung verschiedener Architekturen für die fluoreszente Bildgebung von Oligonukleotiden *in vitro* und *in vivo* mittels Konfokal- und Einzelmolekülmikroskopie.

Ziel des ersten Projekts dieser Arbeit war die Synthese von 2'-*O*-Propargyl-L-uridin (**L-cU**) und dessen Phosphoramidit **1** (Abb. 1). Anschließend sollte der Baustein mittels automatisierter Festphasensynthese zweifach in L-konfigurierte *Molecular Beacons* (**LMB**) eingebaut und mit Farbstoff-Aziden modifiziert werden. Die doppelt modifizierten *Molecular Beacons* sollten danach in spektroskopischen Untersuchungen und in Zellexperimenten auf eine potentielle Anwendung als intrazelluläre Thermometer untersucht werden.

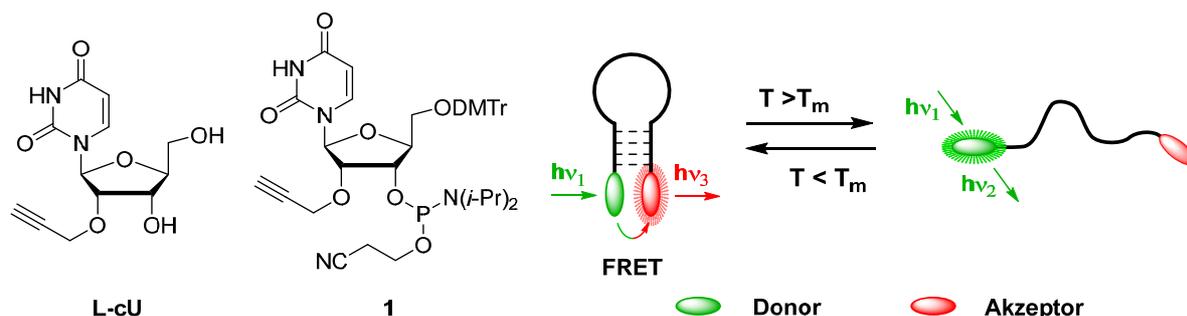


Abbildung 1: Struktur von **L-cU** und dessen Phosphoramidit **1** sowie Konzept eines wellenlängenverschiebenden, intrazellulären Thermometers basierend auf einem doppelt modifizierten *Molecular Beacon*.

Das zweite Projekt beschäftigte sich mit der Entwicklung von FISH-Sonden zur Detektion und Visualisierung ausgewählter miRNA in humanem Darmgewebe. Hierfür sollten komplementäre DNA-Stränge mit 2'-*O*-Propargyluridin modifiziert und postsynthetisch mittels kupferkatalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit Farbstoff-Aziden verknüpft werden (Abb. 2). Nach anschließender spektroskopischer Charakterisierung sollten die Sonden in FISH-Experimenten mit normalem sowie Tumorgewebe in der Konfokal- und Einzelmolekülmikroskopie eingesetzt werden.

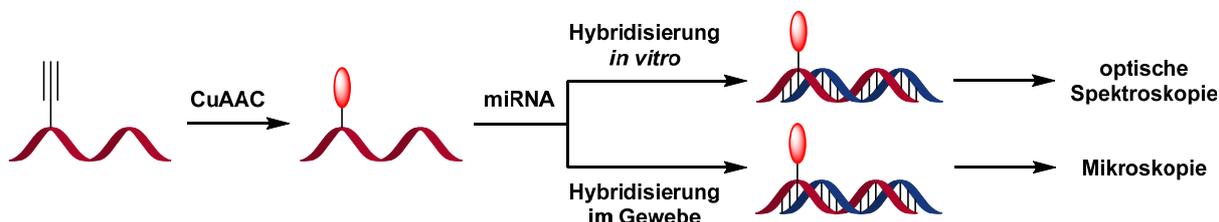


Abbildung 2: Konzept der Synthese und Anwendung von FISH-Sonden zur Detektion von miRNA *in vitro* und in humanem Darmgewebe.

Aufbauend auf dem zweiten Projekt war das Ziel des dritten Projekts die Entwicklung verschiedener FISH-Sonden zur Detektion von miRNA und mRNA in Schnitten des Zebrafisch-Telencephalons (Abb. 3). Hierfür sollten FISH-Sonden für die direkte Markierung

(A), FISH-Sonden basierend auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) (B) und multiple FISH-Sonden (C) synthetisiert werden. Die Sonden sollten ebenfalls nach der spektroskopischen Untersuchung in FISH-Experimenten zur Detektion ihrer Zielmoleküle eingesetzt werden.

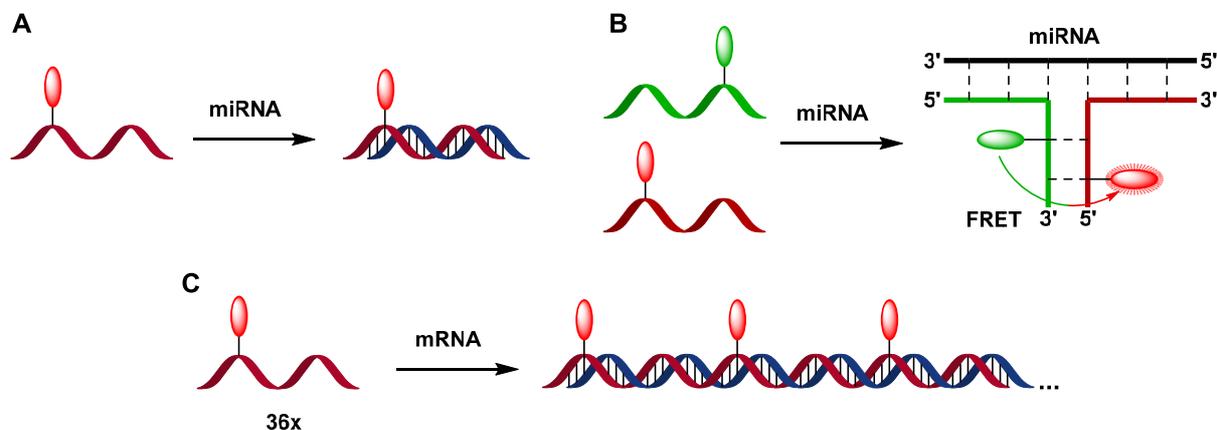


Abbildung 3: Drei Konzepte für FISH-Sonden zur Detektion von miRNA und mRNA in Zebrafisch-Gehirnschnitten. A: Detektion von miRNA mittels direkter Markierung; B: Detektion von miRNA mittels FRET-Sonden; C: Detektion von mRNA mithilfe von multiplen FISH-Sonden.

Ziel des letzten Projekts war die Synthese der 4-Aminophthalimid-Derivate **o-API** sowie **DMAPI** und deren Einbau als Phosphoramidite in RNA mittels automatisierter Festphasensynthese. (Abb. 4). In spektroskopischen Untersuchungen sollten anschließend die photophysikalischen Eigenschaften der Bausteine in Abhängigkeit verschiedener Gegenbasen untersucht werden.

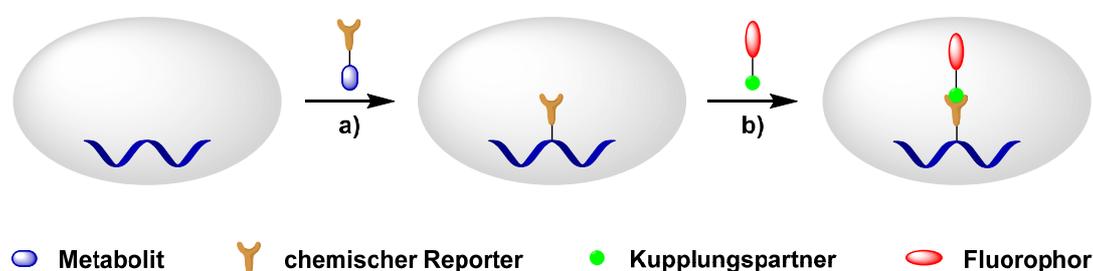


Abbildung 4: Struktur der 4-Aminophthalimid-Derivate **o-API** und **DMAPI** sowie Sequenzen der zu synthetisierenden RNA.

2 THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 Bioorthogonale Markierungen

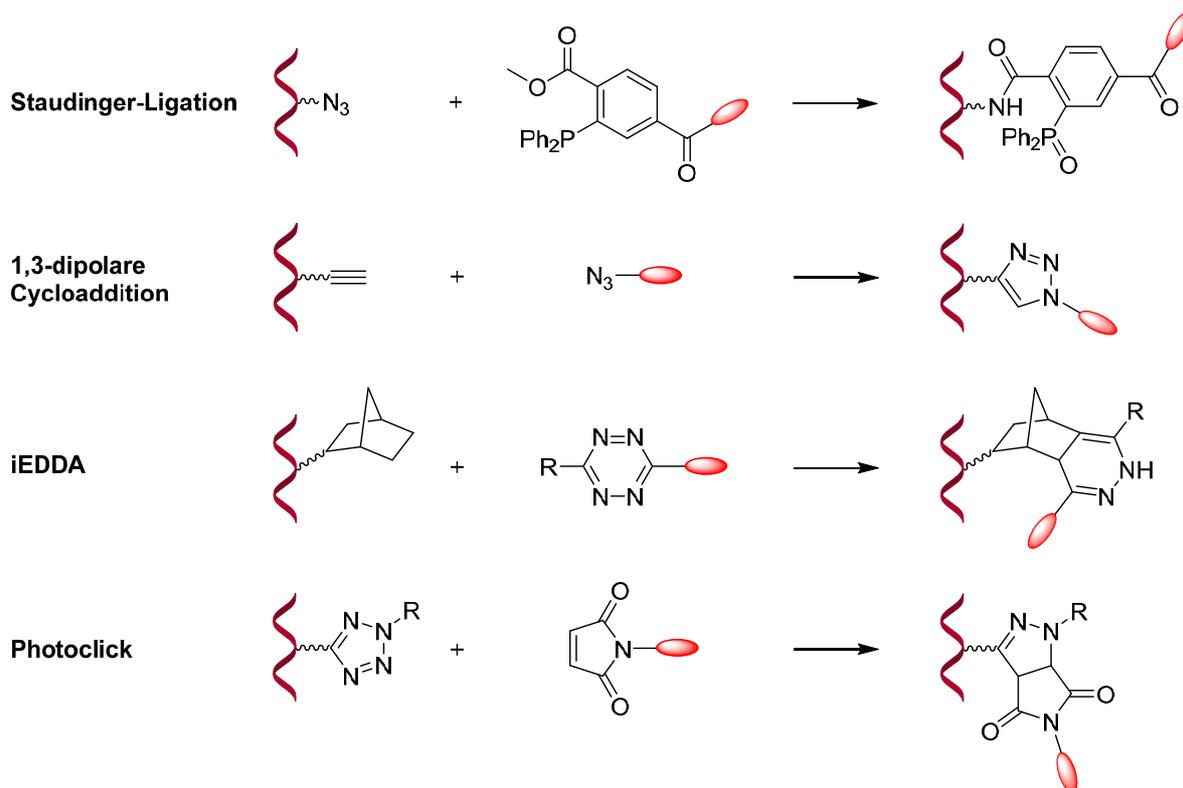
Die Visualisierung von Proteinen in lebenden Zellen, Gewebe oder Organismen ist relativ einfach durch genetisch codierte Marker wie dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) möglich, welches im Jahr 1962 von SHIMOMURA *et al.* erstmals beschrieben wurde.^[11-12] Für Nucleinsäuren sind solche Methoden jedoch schwerer zugänglich, weswegen sich die bioorthogonalen Reaktionen für die Markierung von Nucleinsäuren etabliert haben. Hierbei wird ein Baustein, welcher mit einem chemischen Reporter als funktionelle Gruppe versehen ist, in die Zielsequenz eingebaut und reagiert anschließend mit einem komplementären Kupplungspartner, welcher mit einem Fluorophor für die Visualisierung verknüpft ist.^[13-14]



Schema 1: Schematische Darstellung einer bioorthogonalen Markierung von Nucleinsäuren: a) Einbau des chemischen Reporters; b) Anbindung eines Fluorophors über einen Kupplungspartner.

Für bioorthogonale Reaktionen ist es entscheidend, dass diese nicht in biologische Prozesse eingreifen und chemisch inert gegenüber anderen Biomolekülen sind. Des Weiteren sollten sie unter physiologischen Bedingungen, d.h. in wässrigem Medium, unter Sauerstoffatmosphäre und bei Körpertemperatur, chemoselektiv, mit hohen Ausbeuten sowie hohen Reaktionsgeschwindigkeiten ablaufen.^[15-16] Da diese Reaktionen häufig einer Kinetik zweiter Ordnung folgen und somit von der Konzentration beider Reaktionspartner abhängig sind, ist es zudem wichtig, dass die Markierungsreagenzien eine gute Löslichkeit sowie eine niedrige Toxizität aufweisen, damit sie den Organismus nicht schädigen.^[17]

Zu den wichtigsten Vertretern der bioorthogonalen Reaktionen gehören heute u.a. die STAUDINGER-Ligation, Weiterentwicklungen der 1,3-dipolare Cycloaddition nach HUISGEN, wie die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) oder die ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC), die DIELS-ALDER-Reaktion mit normalem sowie inversem Elektronenbedarf (iEDDA) und die „Photoclick“-Reaktion (Schema 2).^[18-23]



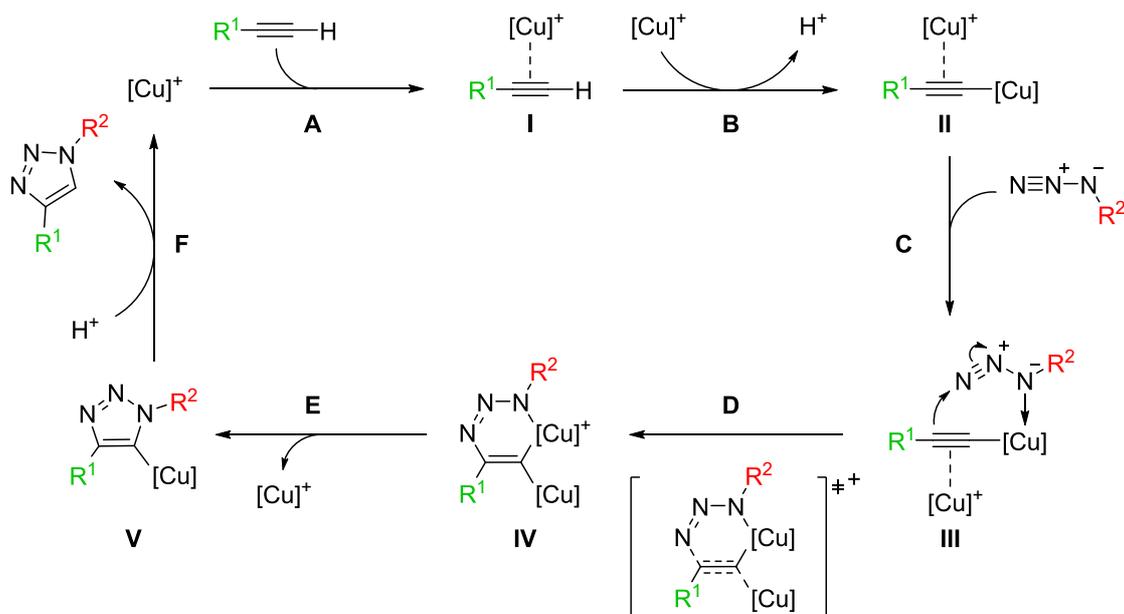
Schema 2: Übersicht ausgewählter bioorthogonaler Reaktionen zur postsynthetischen Modifikationen von Nukleinsäuren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich die CuAAC zur Modifikation der fluoreszenten Sonden verwendet, weswegen auf diese nachfolgend näher eingegangen werden soll.

Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)

Die CuAAC gehört zu den am meisten verwendeten Verfahren zur Markierung von Nukleinsäuren. Die Reaktion basiert auf der ursprünglich von HUISGEN entwickelten 1,3-dipolaren Cycloaddition, bei der selektiv 1,2,3-Triazole gebildet werden.^[19, 24-25] SHARPLESS und MELDAL publizierten unabhängig voneinander im Jahr 2002, dass durch Zugabe eines Kupfer(I)-Katalysators die harschen Reaktionsbedingungen abgemildert, die Reaktionsgeschwindigkeit um bis zu sieben Größenordnungen erhöht sowie die 1,4-Regioselektivität verbessert werden können.^[20, 26] Mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von $k = 10 - 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gehört die CuAAC zu den schnellsten bioorthogonalen Reaktionen und weist eine hohe Effizienz unter physiologischen Reaktionsbedingungen sowie eine große Toleranz gegenüber verschiedenen funktionellen Gruppen auf.^[17] Die Arbeit von SHARPLESS prägte den Begriff der „Click“-Chemie, wodurch die CuAAC auch als „die Click-Reaktion“ bekannt ist.^[27]

Der Mechanismus der CuAAC ist jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Der jüngste postulierte Mechanismus nach STRAUB und FOKIN unter Beteiligung von zwei Kupfer(I)-Atomen ist in Schema 3 dargestellt.^[28-29] Hierbei wird zunächst (A) ein π -Komplex **I** zwischen dem Alkin und einem Kupfer(I)-Kation ausgebildet. Im nächsten Schritt (B) erfolgt die Deprotonierung des Alkins und ein zweites Kupfer(I)-Kation wird gebunden, wodurch der katalytisch aktive Kupfer(I)acetylid-Komplex **II** gebildet wird. Anschließend reagiert der Komplex mit einem Azid, wobei die Cycloaddition nicht konzertiert, sondern schrittweise verläuft. Im ersten Teilschritt (C) koordiniert das Azid an den Kupfer(I)acetylid-Komplex, wodurch es aktiviert wird. Es folgt ein nukleophiler Angriff des Alkins und die Ausbildung eines sechsgliedrigen Übergangszustandes. Im zweiten Teilschritt (D) kommt es zum Ringschluss **IV** und daraufhin (E) wird das Triazol-Kupfer-Derivat **V** gebildet. Abschließend (F) erfolgt die Deprotonierung und die Rückgewinnung des Katalysators.



Schema 3: Postulierter Mechanismus der CuAAC nach STRAUB und FOKIN.^[28-29]

Die Kupferkatalyse bringt jedoch den Nachteil der Toxizität mit sich. Kupfer(I) ist in der Lage durch Redoxreaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden, die wiederum zu oxidativem Stress in der Zelle oder zu Strangbrüchen der Oligonukleotide führen können.^[30-31] Deshalb wurden mit der Zeit verschiedene Liganden entwickelt, die Kupfer(I) stabilisieren, um die Oxidation zu verhindern. Zu den etabliertesten Liganden gehören u.a. Tris(benzyltriazolmethyl)amin (TBTA) oder Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethylamin (THPTA).^[32-33] Die Liganden führten zusätzlich zu einer besseren Wasserlöslichkeit und

Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Des Weiteren wurde die *in-vivo* Anwendung der CuAAC ermöglicht.^[34]

Die Modifikation einer Nukleinsäure über eine CuAAC kann an der Nukleobase, am Zuckergerüst oder am Rückgrat erfolgen (Abb. 5).^[35] Die Gruppe um CARELL entwickelte das erste funktionalisierte Nucleosid (**NS1**), indem sie zwei verschiedene Alkin-Linker an die 5-Position von 2'-Desoxyuridin knüpfte. Diese wurden anschließend über Phosphoramidit-Festphasensynthese oder PCR in Oligonucleotide eingebaut und auf ihre Anwendbarkeit in der CuAAC untersucht.^[36-37] SEELA *et al.* modifizierten Cytosin-, Adenosin- und Guanosin-Derivate (**NS2-4**) mit den gleichen Alkin-Linkern.^[38-39] Den Weg über die Modifikation am Zuckerrest wählten WAGENKNECHT *et al.*, indem sie 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**) in Oligonucleotide einbauten, um den Einfluss der Modifikation auf die Struktur und Stabilität der Doppelhelix zu verringern.^[40]

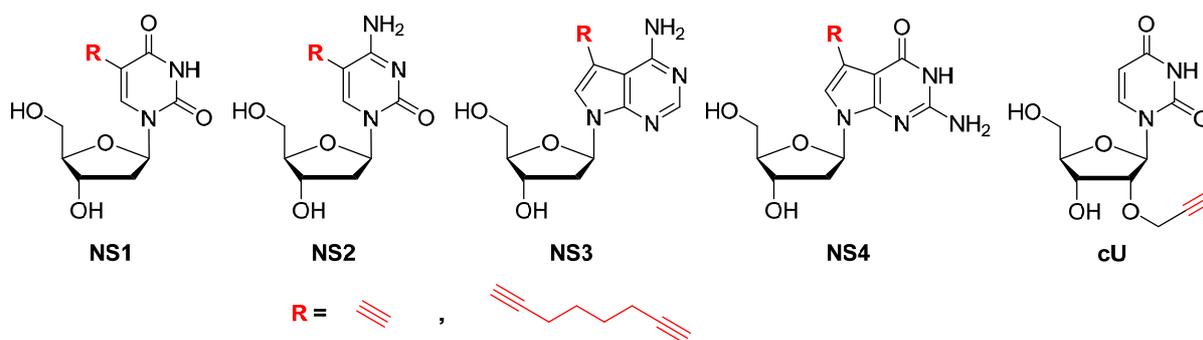


Abbildung 5: Übersicht ausgewählter Alkin-modifizierter Nucleoside für die postsynthetische CuAAC von Oligonucleotiden.

Azidmodifikationen an Nucleinsäuren sind im Gegensatz zu den Alkinmodifikationen nicht kompatibel mit der Phosphoramidit-Festphasensynthese. Dies liegt neben der Instabilität von Aziden gegenüber verschiedenen Reagenzien während der Synthese und der Aufreinigung auch daran, dass diese mit der Phosphor(III)-Spezies eine STAUDINGER-Ligation eingehen können.^[41] Um dies zu umgehen, verwendeten WAGENKNECHT *et al.* 5-Iod-2'-desoxyuridin in der Phosphoramidit-Festphasensynthese und modifizierten dieses nach dem Einbau mit einem Überschuss Natriumazid zum 5-Azid-2'-desoxyuridin. Im Anschluss erfolgte noch auf der festen Phase die CuAAC mit einem Farbstoff-Alkin.^[42] MICURA *et al.* konnten 2'-azidmodifizierte Nucleoside durch die Kombination von Phosphoramidit- und Phosphordiester-Synthese erfolgreich in Oligonucleotide einbauen. Hierzu wurde die Festphasensynthese vor der Position des modifizierten Nucleosides unterbrochen und dieses manuell gekuppelt.^[43-44]

2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Im Jahr 1946 postulierte THEODOR FÖRSTER erstmals den Mechanismus für einen strahlungslosen Energietransfer, bei dem ein elektronisch angeregter Donor (**D**) seine Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen sich im Grundzustand befindenden Akzeptor (**A**) überträgt.^[45-46] Hierbei kehrt der Donor in den Grundzustand zurück und der Akzeptor wird in einen angeregten Zustand angehoben (Abb. 6). Dadurch wird die Fluoreszenzlebenszeit des Donors verkürzt und der Akzeptor kann wiederum durch Emission in einer anderen Wellenlänge oder strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren.

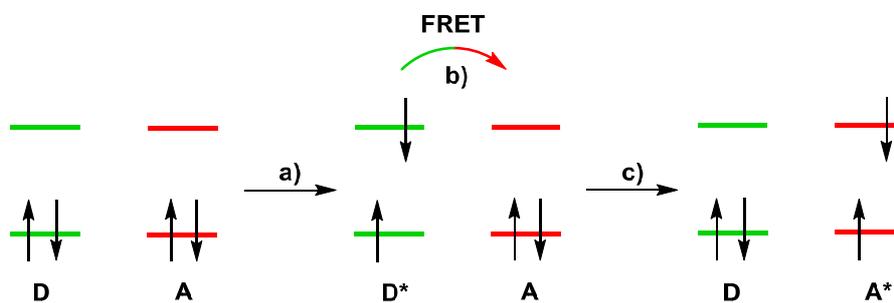


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET): a) Anregung des Donors, b) Energietransfer auf den Akzeptor, c) Rückkehr des Donors in den Grundzustand und Anregung des Akzeptors.

Es müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein, damit dieser Energietransfer möglich ist. So muss das Emissionsintegral des Donors mit dem Absorptionsintegral des Akzeptors überlappen, wobei das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ nicht Null sein darf. Des Weiteren muss der Abstand zwischen Donor und Akzeptor 1 – 10 nm betragen, damit die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen stattfinden können. Zuletzt müssen für einen effizienten Energietransfer die Dipole von Donor und Akzeptor parallel zueinander ausgerichtet und die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Φ_D sollte möglichst hoch sein. Für diese Voraussetzungen formulierte THEODOR FÖRSTER die Gleichung für die Geschwindigkeit k_{FRET} , weswegen der Vorgang auch als Förster-Resonanz-Energietransfer bezeichnet wird.^[46-48]

$$k_{\text{FRET}} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (1)$$

$$\text{mit: } R_0 = \left(\frac{8.79 \cdot 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{n^4}\right)^{\frac{1}{6}} [\text{\AA}] \quad (2)$$

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

Die FRET-Effizienz E stellt einen weiteren wichtigen Faktor für die quantitative Analyse dar. Sie gibt die Anzahl der Quanten, die vom Donor auf den Akzeptor übertragen wurden, im Verhältnis zur Anzahl der Quanten wieder, die vom Donor absorbiert wurden. Die Bestimmung der Effizienz ist auf verschiedenen Wegen möglich. Sie kann entweder über den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, über die Fluoreszenzintensitäten des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptors oder über die Fluoreszenzlebenszeiten des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptors berechnet werden. Der letzte Ansatz bietet dabei den Vorteil, dass die Fluoreszenzlebenszeiten unabhängig von der Konzentration der Chromophore sind.^[48-50]

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} = 1 - \frac{F_{\text{DA}}}{F_{\text{D}}} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_{\text{D}}} \quad (3)$$

- r : Abstand zwischen Donor und Akzeptor
 R_0 : Förster-Radius (Abstand bei 50 % FRET-Effizienz)
 F_{DA} : Fluoreszenzintensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
 F_{D} : Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
 τ_{DA} : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
 τ_{D} : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

Aufgrund der Abstandsabhängigkeit zwischen Donor und Akzeptor wird der FRET häufig als „spektroskopisches Lineal“ eingesetzt, um die Distanz zwischen interagierenden Molekülen zu untersuchen.^[51-52] Neben der Anwendung zum Messen von Abständen eignet sich der FRET auch zur Untersuchung von Strukturen und Interaktion zwischen Biomolekülen. Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten für die Anwendung von FRET-basierten Biosensoren (Abb. 7). Die ersten beiden Möglichkeiten basieren auf der Interaktion zwischen zwei Molekülen, wobei

das FRET-Signal dabei intermolekular erzeugt wird oder verloren geht. Einerseits kommt es durch die Interaktion zweier Moleküle zur Minimierung des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor, wodurch ein FRET-Signal erhalten wird. Andererseits können intermolekulare Prozesse, wie die Proteolyse von Proteinen, dafür sorgen, dass der Abstand zwischen Donor und Akzeptor vergrößert wird, weswegen daraufhin das FRET-Signal abbricht. Die dritte Möglichkeit sind intramolekulare Konformationsänderungen durch z.B. Anregung eines Liganden oder Bindung an ein Substrat, wodurch das FRET-Signal gewonnen oder gesteigert wird.^[53]

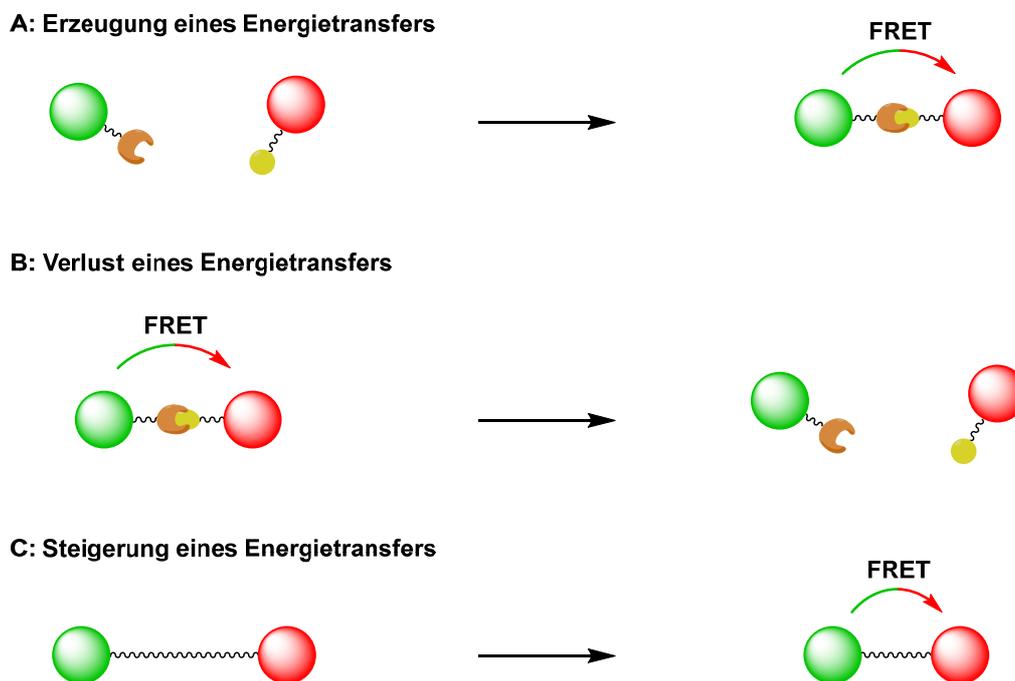


Abbildung 7: Möglichkeiten für die Anwendung FRET-basierter Sonden. A: Erzeugung eines Energietransfers durch Verknüpfung zweier Moleküle; B: Verlust eines Energietransfers durch Spaltung einer Verbindung; C: Steigerung eines Energietransfers durch intramolekulare Konformationsänderung.

FRET-basierte Nukleinsäure-Sonden

In der dritten Gruppe von FRET-basierten Biosensoren sind auch Nukleinsäure-Sonden zu finden, die sich wiederum in zwei Klassen einteilen lassen. Zum einen gibt es Fluorophor-*Quencher*-Paare, bei denen die Änderung des Fluoreszenzsignals durch eine Intensitätsänderung verursacht wird und zum anderen Fluorophor-Fluorophor-Paare, bei denen eine Änderung des Fluoreszenzsignals auf dem Wechsel der Emissionswellenlänge beruht.^[54-55] Als Fluoreszenzlöcher werden häufig *Black hole quencher* (BHQ) oder 4-(4'-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL) verwendet.^[56] Für FRET-Paare sind die Anforderungen an Fluorophore vielfältiger. Neben der optimalen Überlappung der

Donoremission mit der Akzeptorabsorption, sollten diese auch spektroskopisch deutlich unterscheidbar sein und ihre Emission nicht zu eng beieinanderliegen. Des Weiteren sollten die Fluorophore eine hohe Fluoreszenzintensität und –quantenausbeute aufweisen, photostabil sein und im sichtbaren Bereich des Lichts emittieren.^[57-58] Zu den etablierten Fluorophoren gehören die Gruppen der Cyanin- und der Xanthenfarbstoffe, BODIPY-Derivate oder industriell entwickelte Farbstoffe wie *Alexa Fluor*[®]- oder *ATTO*-Farbstoffe.^[59-61] Zu den am häufigsten verwendeten Nukleinsäure-Sonden, in denen diese Fluorophore Anwendung finden, gehören u.a. *Molecular Beacons*. Dabei handelt es sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die aus einer Stamm- sowie einer Schleifenregion bestehen. Die beiden komplementären Arme der Stammregion sind über die Schleifenregion miteinander verbunden, welche wiederum die Erkennungssequenz für einen Zielstrang enthält. In Abwesenheit des Zielstrangs liegt die Struktur geschlossen vor und wird erst durch Hybridisieren mit dem Zielmolekül geöffnet.^[62-63] TYAGI und KRAMER modifizierten die Stammregion eines *Molecular Beacons* mit einem Fluorophor auf der einen und einem Fluoreszenzlöcher auf der anderen Seite. In der geschlossenen Struktur wird die Emission des Fluorophors aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Moleküle durch einen Energietransfer gelöscht. Bindet der Zielstrang an die Schleifenregion, kommt es zur Konformationsänderung, wodurch der Energietransfer nicht mehr stattfinden und der Fluorophor emittieren kann.^[54] Um den Nachteil zu umgehen, dass das Auslesen des Fluoreszenzsignal lediglich über die Intensität nur einer Wellenlänge möglich ist, entwickelten TYAGI und KRAMER das Konzept wellenlängenverschiebender *Molecular Beacons*. Hierbei wurde die bisherige Struktur mit einem Fluorophor (Fluorescein) und einem Fluoreszenzlöcher (DABCYL) um einen Emitter erweitert (TAMRA, Texas Red). In der geschlossenen Form findet weiterhin ein Energietransfer auf den Fluoreszenzlöcher statt, während in der geöffneten Form nach Hybridisierung mit dem Zielstrang ein FRET auf den zusätzlichen Emitter erfolgt (Abb. 8).^[55]

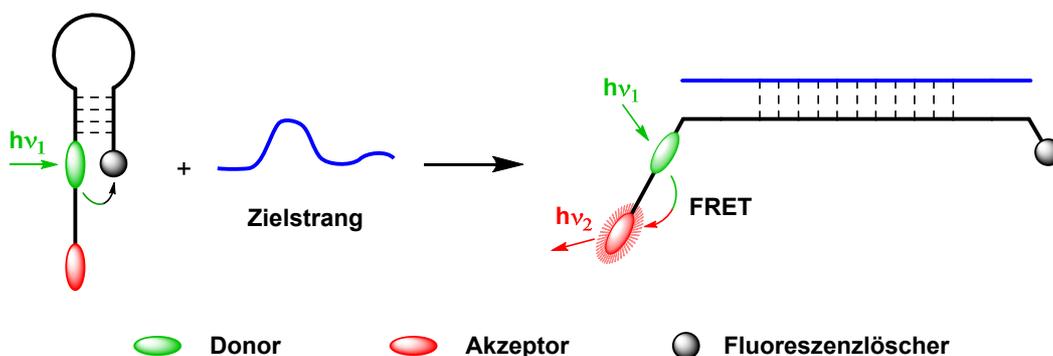


Abbildung 8: Prinzip eines wellenlängenverschiebenden *Molecular Beacons* nach TYAGI und KRAMER.^[55]

ZHANG *et al.* optimierten den Aufbau der wellenlängenverschiebenden Molecular Beacons und ersetzten den Fluoreszenzlöcher direkt durch einen Akzeptorfarbstoff. In der geschlossenen Form ist nun ein FRET vom Donor auf den Akzeptor möglich. Wird die Struktur durch den Zielstrang geöffnet, ist der Abstand zwischen den Fluorophoren zu weit für einen FRET, was dann als Änderung der Emissionswellenlänge detektiert werden kann.^[64] In Verbindung mit dem FRET-basierten Konzept der *DNA Traffic Lights* wurden in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT u.a. *Molecular Beacons* für die selektive und parallele Detektion von miRNA-21 und -31 in Krebszellen entwickelt.^[65-66]

2.3 Intrazelluläre Thermometer

Temperatur ist ein wichtiger Parameter in allen chemischen oder physikalischen Prozessen lebender Organismen. Oftmals ist eine Veränderung der Temperatur in einem Organismus mit Krankheitspathologien verbunden.^[67-68] Medizinische Studien zeigten eine verstärkte Wärmeproduktion bei Krebserkrankungen, lokalen Infektionen, Fieberkrämpfen oder maligner Hyperthermie.^[69-72] Zudem hilft eine Überwachung der Temperatur auf Einzelzellebene bei der Wärmetherapie gegen Krebs, um deren Mechanismus und therapeutische Wirksamkeit besser zu untersuchen.^[73] Ein ideales intrazelluläres Thermometer muss dabei mehrere Anforderungen erfüllen. Zunächst sollte es nicht toxisch gegenüber der Zelle sein, um Langzeitmessungen zu ermöglichen. Des Weiteren sollte das Signal des Thermometers nicht von der komplexen zellulären Umgebung beeinflusst werden, um eine exakte Messung der Temperatur zu ermöglichen. Abschließend sind zusätzliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie eine hohe Orts- und Temperaturauflösung, eine ausgeprägte temperaturabhängige Reversibilität oder eine schnelle Reaktion auf Temperaturveränderungen vorteilhaft.^[74]

Die Ursprünge intrazellulärer Temperaturmessungen gehen auf CHAPMAN *et al.* zurück, welche die Fluorophore 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (**NBD**) und 6-Dodecanoyl-2-dimethylamino-naphthalin (**LAURDAN**) in die Membran lebender Zellen einschleusten (Abb. 9). Die thermische Empfindlichkeit von **NBD** geht dabei auf wärmeinduzierte, elektronische Veränderungen in der Membran zurück, wodurch die Änderung der Fluoreszenzintensität und -lebensdauer des Fluorophors direkt mit der zellulären Temperatur in Verbindung gebracht werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt **LAURDAN** eine ausgeprägte apparente STOKES-Verschiebung, wenn die Membran ab einer bestimmten Temperatur von einer fluiden zu einer gelartigen Struktur der Lipiddoppelschicht übergeht.^[75]

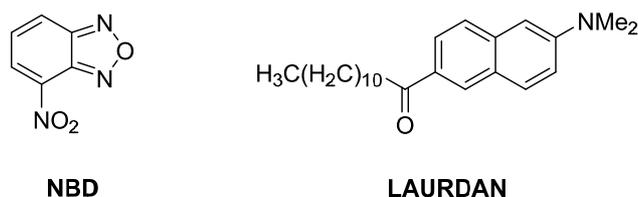


Abbildung 9: Strukturen der Fluorophore **NBD** und **LAURDAN**.

UCHIYAMA *et al.* entwickelten die ersten polymerbasierten Thermometer durch den Einbau von unterschiedlich substituierten **NBD**-Derivaten in **PNIPAM** (Poly-N-isopropylacrylamid). Bei einer Phasenseparationstemperatur von ca. 32 °C wechselt das Polymer vom offenkettigen Knäuel zum kompakten Globuli (engl. *coil-to-globuli transition*). In einer wässrigen Lösung wird dadurch die Polaritätsabhängigkeit der **NBD**-Derivate beeinflusst, was sich durch einen Anstieg der Emission bemerkbar macht.^[76] Den erstmaligen Einsatz von thermosensitiven Polymeren zur Visualisierung der Temperaturänderung in Zellen publizierten TSEEB *et al.* im Jahr 2009 bei der Untersuchung der intrazellulären Ca²⁺-Verteilung und deren Temperaturabhängigkeit.^[77] OKABE *et al.* nutzen als erste die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) zur intrazellulären Temperaturmessung. Dabei verwendeten sie ein fluoreszentes Polymer-Thermometer (FTP) bestehend aus *N-n*-Propylacrylamid (**NNPAM**), welches strukturell durch den Einbau einer 3-Sulfopropylacrylat-Einheit (**SPA**) optimiert wurde (Abb. 10). Dieser zusätzliche hydrophile Baustein verhindert im offenkettigen Zustand unterhalb der Phasenseparationstemperatur interpolymere Aggregation, welche zu einem unerwünschten Anstieg der Emission führen würde.^[78]

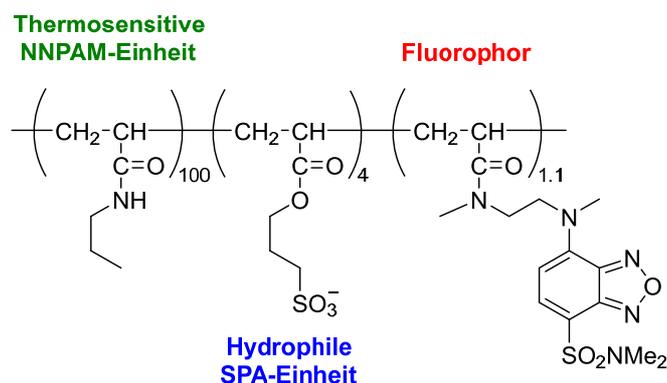


Abbildung 10: Grundstruktur des thermoresponsiven Polymers von OKABE *et al.*

Neben langkettigen Polymeren eignen sich auch Oligonukleotide für die Visualisierung der intrazellulären Temperatur durch Konformationsänderung. Die ersten intrazellulären

Thermometer dieser Art wurden von YANG *et al.* im Jahr 2012 publiziert. Sie synthetisierten unter Verwendung von L-DNA verschiedene *Molecular Beacons*, welche mit einem Fluorophor und einem Fluoreszenzlöscher modifiziert wurden.^[74] Die Visualisierung der Temperaturänderung beruht dabei auf dem Öffnungsverhalten der Stamm-Schleifen-Struktur des *Molecular Beacons*.^[79] Unterhalb der Schmelztemperatur liegt die Stammregion geschlossen vor, wodurch nach Anregung des Fluorophors die Emission durch den benachbarten *Quencher* gelöscht wird. Steigt die Temperatur an und überschreitet die Schmelztemperatur, die als der Punkt definiert ist, an dem die Hälfte des Doppelstranges in Einzelstränge dissoziiert ist, kommt es zur räumlichen Trennung des Fluorophors und des Fluoreszenzlöschers, wodurch die Emission ansteigt (Abb. 11 links).^[74] Durch die Verwendung von L-DNA wird zudem eine Resistenz gegenüber der zellulären Umgebung erhalten. Bei L-DNA handelt es sich um das Spiegelbild der natürlichen D-DNA (Abb. 11 rechts), weshalb diese einerseits nicht toxisch für die Zelle ist und andererseits nicht an Proteine oder D-DNA-Stränge binden oder von Enzymen abgebaut werden kann.^[80-82]

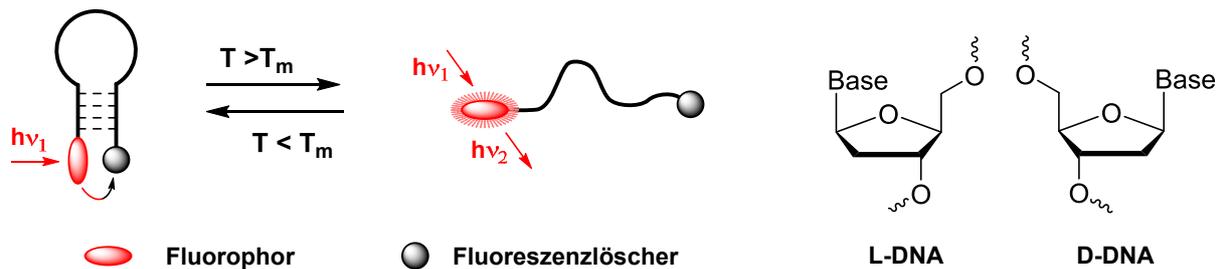


Abbildung 11: links: Prinzip eines intrazellulären Thermometers basierend auf einem *Molecular Beacon*; rechts: Struktur von L-DNA im Vergleich zu D-DNA.

Weiterführende Studien zum Einfluss der Haarnadel-Struktur und der Pufferlösung auf die Hybridisierungskinetik wurden von ANDERSEN *et al.* durchgeführt.^[83] KOMPANY-ZAREH *et al.* markierten Gold-Nanopartikel mit drei unterschiedlichen *Molecular Beacons*, welche verschiedene Schmelztemperaturen aufweisen und mit *FAM*, *Texas Red* bzw. *ATTO425* modifiziert sind. Die Gold-Nanopartikel fungieren dabei gleichzeitig als Träger der *Molecular Beacons* und als Fluoreszenzlöscher für die Fluorophore. Mit steigender Temperatur öffnen sich die drei *Molecular Beacons* nacheinander, wodurch zunächst die grüne, nachfolgend die rote und abschließend die blaue Emission zunimmt. Hierdurch wird über einen Temperaturbereich von 40 °C ein detektierbarer Farbverlauf erhalten.^[84] Methoden für die gezielte „Programmierung“ der Schmelztemperatur und damit des Emissionsanstiegs wurden von VALLÉE-BÉLISLE *et al.* entwickelt. Durch Hinzufügen eines Stabilisatorstranges, der

Konstruktion eines Trimeres sowie der Kombination mehrerer *Molecular Beacons* mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen wurden Thermometer mit gezielten Schmelzbereichen, einer extra schmalen oder einer extra breiten Schmelzkurve erhalten.^[85]

Neben den bisher vorgestellten Systemen gibt es viele weitere intrazelluläre Thermometer, die u.a. auf Quantenpunkten, Lanthanoid-Komplexen oder Gold-Nanopartikeln basieren.^[68, 86-88]

2.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die *in-situ*-Hybridisierung (ISH) ist eine Methode zur Detektion und Lokalisation von Oligonukleotiden wie DNA oder RNA in Zellen oder Gewebe. Dieses Verfahren beruht auf der Hybridisierung der Zielsequenz mit einer markierten Sonde, über die anschließend die Visualisierung erfolgt. Die ersten Marker wurden 1969 von GALL und PARDUE publiziert und basierten auf der Verwendung von radioaktiver, Tritium-markierter RNA bzw. DNA, die nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz mittels Autoradiographie visualisiert wurde.^[89-90] Diese Methode brachte jedoch einige Nachteile mit sich. Neben der Gefährlichkeit radioaktiver Moleküle, wodurch spezielle Sicherheitsmaßnahmen notwendig sind, verhindert auch der Zerfall der instabilen Isotope die Möglichkeit eines konstanten Signalnachweises. Des Weiteren sind die radioaktiven Sonden mit hohen Kosten verbunden und die Autoradiographie bietet trotz hoher Sensitivität nur eine geringe Auflösung.^[91] Moderne ISH-Methoden basieren daher häufig auf dem Prinzip der Antikörperfärbung. Hierbei werden mit Hapten wie z.B. Digoxigenin (DIG) modifizierte Oligonukleotide als Sonden verwendet. Diese werden durch spezifische Antikörper, die an farbstoffbildende Reporterenzyme gebunden sind, erkannt. Das Reporterenzym wie z.B. Alkalische Phosphatase sorgt nach Zugabe eines chromogenen Substrats anschließend für eine Blaufärbung, die sogar mit dem bloßen Auge erkannt werden kann.^[92] Eine Weiterentwicklung der klassischen ISH stellt die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dar. Bei dieser Methode werden fluoreszente Marker verwendet, wodurch neben der Verbesserung der Auflösung und der Geschwindigkeit auch quantitative Analysen, die Detektion von mehreren Zielsequenzen sowie die Bildgebung in lebenden Zellen ermöglicht wurde.^[93] Die Markierung mit dem Fluorophor kann dabei indirekt oder direkt stattfinden (Abb. 12). RUDKIN und STOLLAR veröffentlichten im Jahr 1977 Sonden zur Detektion von Polytänchromosomen der *Drosophila Melanogaster*, indem sie DNA-RNA-Hybride mit 5S rRNA bildeten, diese mit Antikörpern anfärbten und anschließend mittels Immunofluoreszenz visualisierten.^[94] Den Weg der direkten Markierung wählten 1980 erstmals BAUMAN *et al.* durch die kovalente Anbindung eines Fluorophors an die als Sonde verwendete RNA.^[95]

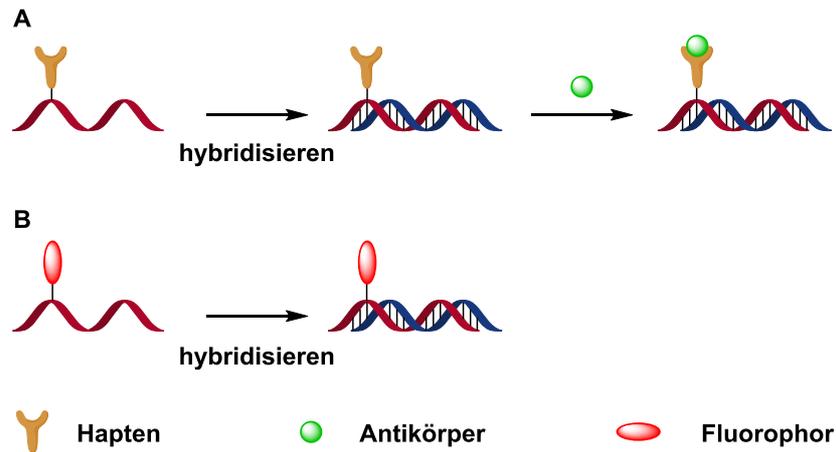


Abbildung 12: Möglichkeiten der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). A: Indirekte Markierung über Hapten und Antikörper; B: Direkte Markierung durch kovalent verknüpfte Fluorophore.

Ursprünglich wurden mit der FISH ganze Chromosome visualisiert, weswegen die Sequenzen der verwendeten Sonden sehr lang waren.^[96] Die Markierung der Fluoreszenzsonden erfolgte u.a. über die *Nick*-Translation oder die Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Primern (DOP-PCR).^[97] Mit der Zeit erweckten jedoch auch kürzere Zielsequenzen wie nicht-codierende RNA größeres Interesse in der Forschung.^[98] Diese liegen jedoch oftmals nur in sehr geringer Konzentration in Zellen vor, so dass sich ihre Detektion schwieriger gestaltet.^[99] Durch die Entwicklung hochauflösender Mikroskopie sowie optimierter Algorithmen zur Signalauswertung konnten jedoch auch schwache Signale besser detektiert werden. Des Weiteren wurden auch die FISH-Sonden stetig verbessert, so dass Hintergrundrauschen oder unspezifische Bindung verringert wurden. So wurde die Spezifität und die Hybridisierungsstärke durch Modifikationen mit z.B. PNA oder LNA optimiert.^[100-101] NEDERLOF *et al.* synthetisierten FISH-Sonden mit drei Fluorophoren unterschiedlicher Emissionswellenlänge für die parallele Detektion verschiedener Oligonukleotide.^[102-103] Dadurch entwickelten sich immer mehr FISH-Methoden mit unterschiedlichen Optimierungen und Anwendungsbereichen. Die Benennung erfolgt dabei im Regelfall durch das Hinzufügen des jeweiligen Präfixes wie z.B. PNA-FISH, LNA-FISH oder smFISH (*single molecule FISH*).^[104]

SINGER *et al.* publizierten 1998 erstmals FISH-Sonden, durch deren Sensitivität einzelne mRNA-Stränge detektiert und analysiert werden konnten. Hierzu wurden die Sonden mit bis zu fünf Fluorophoren modifiziert, um durch die Erhöhung der Emission eine bessere Visualisierung zu ermöglichen (Abb. 13 A). Dies führte jedoch auch zu Problemen, da die Signale von ungebundenen Sonden nicht von den erfolgreich hybridisierten Sonden unterschieden werden konnte.^[105-106] RAJ *et al.* entwickelten deswegen multiple FISH-Sonden,

um dieses Problem zu umgehen. Sie modifizierten bis zu 48 Stränge, die jeweils zu unterschiedlichen Abschnitten der Ziel-mRNA komplementär sind, mit je einem Fluorophor (Abb. 13 B).^[107] Das Emissionssignal wird dadurch erst detektierbar, wenn mindestens zehn Sonden an der Ziel-mRNA gebunden sind, wodurch falsch positive Signale verringert werden.^[108] Einen Zwischenweg wiederum wählten CARELL *et al.*, indem sie für die Detektion einer mRNA zehn dreifach modifizierte Sonden synthetisierten. Im Vergleich zu 30 einfach modifizierten Sonden konnte dadurch das Hintergrundrauschen weiter reduziert werden.^[109]

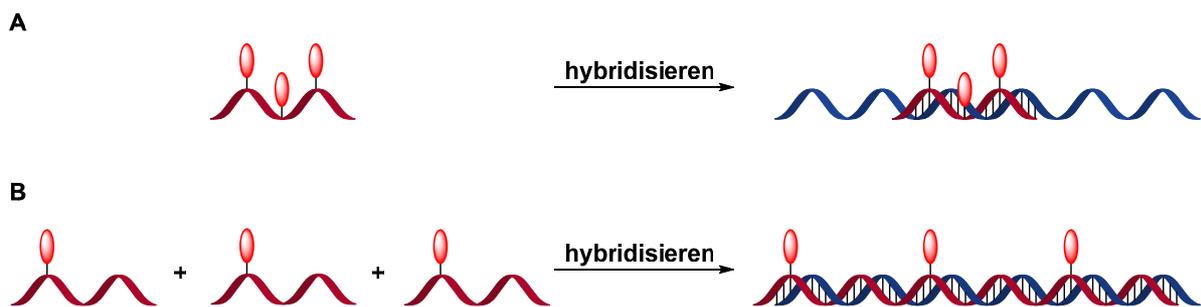


Abbildung 13: Single-molecule-FISH (smFISH) nach SINGER (A) und RAJ (B).

Trotzdem bleibt das Hintergrundrauschen durch nicht ausgewaschene, ungebundene Sonden ein Problem, welches ermittelte Ergebnisse verfälschen kann. Deshalb wurden Sonden entwickelt, die sich durch einen Emissionsanstieg nach der Hybridisierung auszeichnen, so genannte *light up* oder *forced intercalation* Sonden. Dabei interkaliert der Fluorophor in die Doppelhelix, wodurch eine Erhöhung der Emission und der Fluoreszenzquantenausbeute erhalten wird. Hierzu verknüpften SVANVIK *et al.* den Farbstoff *Thiazolorange* über einen Linker mit PNA-FISH-Sonden, während SEITZ *et al.* den Weg über die Synthese eines *Thiazolorange*-Basensurrogates wählten.^[110-112] Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion des Hintergrundrauschens sind exzitonkontrollierte hybridisierungssensitive Oligonukleotide (ECHO), welche von OKAMOTO entwickelt wurden.^[113] Hierfür wurde ein 2'-Desoxyuridin mit zwei Amino-Linkern an der 5-Position modifiziert, anschließend in DNA eingebaut und postsynthetisch mit zwei *Thiazolorange*-Farbstoffen markiert. Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Fluorophore zueinander findet im Einzelstrang eine Exziton-Wechselwirkung statt, wodurch die Emission gelöscht wird. Erfolgt die Hybridisierung der Sonde mit dem Zielstrang, interkalieren die beiden Fluorophore in die Doppelhelix und es kommt zur räumlichen Trennung mit einem rapiden Anstieg der Fluoreszenz.

2.5 Fluoreszente Basensurrogate

Neben den in Kapitel 2.1 vorgestellten bioorthogonalen Markierungen zur kovalenten Anbindung von Farbstoffen an Nukleinsäuren können auch isomorphe, fluoreszente Basensurrogate für die Visualisierung von Oligonukleotiden verwendet werden. Hierbei ersetzt der Fluorophor direkt die Nukleobase, weswegen es wichtig ist, dass das Basensurrogat die Ausbildung der Doppelhelix nicht zu stark beeinflusst.^[114-115] Eines der ersten isomorphen Basensurrogate ist das 2-Aminopurin (**2-AP**), welches sich vom natürlichen Adenin ableitet und mit Thymidin sowie Uridin Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann (Abb. 14).^[116] Das **2-AP** besitzt eine zusätzliche Absorptionsbande bei $\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$ und eine Emissionsbande bei $\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ nm}$. Jedoch kommt es in polarer Umgebung zu einer bathochromen Verschiebung der Absorptions- sowie Emissionsmaxima und durch Einbettung in den Basenstapel wird die hohe Fluoreszenzquantenausbeute des freien **2-AP** gelöscht.^[117-118]

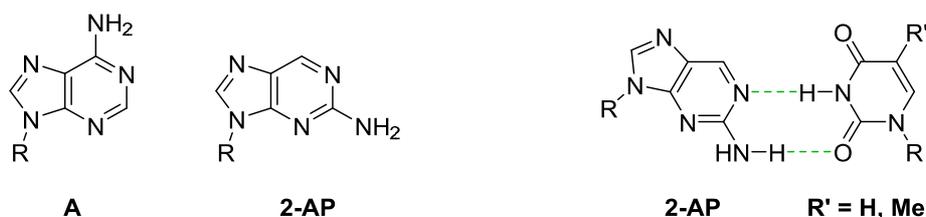


Abbildung 14: links: Struktureller Vergleich von **A** und **2-AP**; rechts: Wasserstoffbrückenbindung von **2-AP** mit U/T; R = Ribose oder 2'-Desoxyribose.

Alternativen zu **2-AP** entdeckte HAWKINS in den natürlich vorkommenden, fluoreszenten Pteridinen, welche vielversprechende Analoga zu Adenin und Guanin darstellten (Abb. 15).^[119-120] Sie weisen deutlich abgrenzbare Absorptionsbanden bei $\lambda_{\text{exc}} = 330 - 350 \text{ nm}$ auf und die Emission ist mit $\lambda_{\text{em}} \approx 430 \text{ nm}$ in den sichtbaren Bereich verschoben. Die Methylsubstituenten führen jedoch zu einer Destabilisierung der Doppelhelix und es kommt wie bei **2-AP** ebenfalls zu einer Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute.^[114, 121] Dennoch fanden die Pteridine Anwendung in unterschiedlichen analytischen Bereichen.^[115, 122]

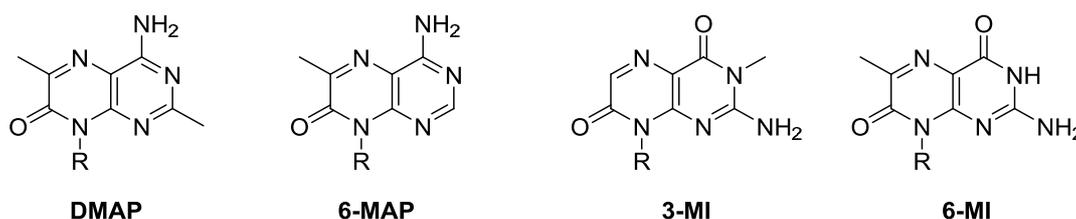


Abbildung 15: Fluoreszente Adenin- (**DMAP**, **6-MAP**) und Guanin-Analoga (**3-MI**, **6-MI**) aus der Gruppe der Pteridine; R = 2'-Desoxyribose.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der photophysikalischen Eigenschaften ist das Hinzufügen aromatischer Ringe an die natürlichen Purin- und Pyrimidinbasen. Dadurch lassen sich bathochrome Verschiebungen der Absorption, Emissionsbanden im sichtbaren Bereich oder höhere Fluoreszenzquantenausbeuten erhalten, wobei die Vergrößerung der Nukleobase jedoch die Struktur der Doppelhelix stören kann.^[115] Anfang der 1970er entwickelten LEONARD *et al.* die beiden Adenin-Analoga etheno-A (**εA**) und benzo-A (Abb. 16 links).^[123-124] **εA** zeichnet sich durch eine große STOKES-Verschiebung mit einem rot-verschobenen Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{exc}} = 294 \text{ nm}$ und einer hohen Emissionsbande im sichtbaren Bereich bei $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$ aus. Die kondensierte Struktur führt jedoch zum Verlust der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, wobei das Triphosphat ϵATP dennoch von ATP-bindenden Enzymen als Substrat erkannt wird.^[125] Benzo-A besitzt hingegen weiterhin die Wasserstoffbrücken-Struktur von Adenin. Im Vergleich zu **εA** weist benzo-A mit dem zusätzlichen Benzolring im Purinkern eine geringere STOKES-Verschiebung und eine schlechtere Quantenausbeute auf. MATTEUCCI *et al.* entwickelten das Cytosin-Analogon **tC**, welches im sichtbaren Bereich bei $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ emittiert (Abb. 16 rechts).^[126] **tC** ist in der Lage, mit Guanin Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, und weist dabei im Gegensatz zu vielen anderen vergrößerten Basenanaloga keine Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute in der Doppelhelix auf.^[127-128]

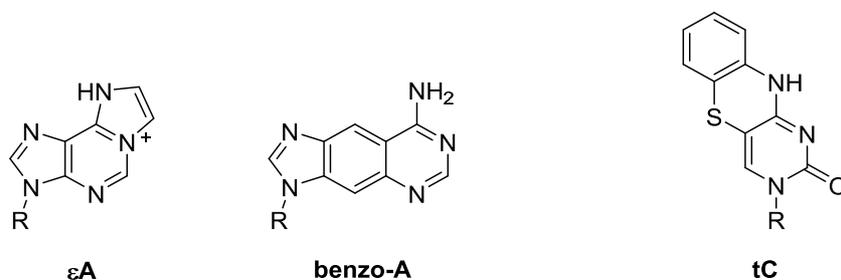


Abbildung 16: links: Fluoreszente A-Analoga **εA** und benzo-A; rechts: Fluoreszentes C-Analogon **tC**.

Neben der Erweiterung des π -Systems lassen sich die photophysikalischen Eigenschaften auch durch Substituenten beeinflussen. CASTELLANO *et al.* modifizierten das Purin-Grundgerüst mit verschiedenen elektronenschiebenden- und ziehenden Substituenten, um ein *Push-Pull*-System zu erhalten (Abb. 17). Hierdurch wurde eine Bibliothek unterschiedlicher Nukleosid-Derivate mit einem Absorptionsmaximum bis $\lambda_{\text{exc}} \approx 360 \text{ nm}$ und einem Emissionsmaximum bis $\lambda_{\text{em}} \approx 500 \text{ nm}$ synthetisiert.^[129-130]



Abbildung 17: Grundstruktur des *Push-Pull*-Systems am Purin-Grundgerüst; R = Benzyl

4-Aminophthalimid als Basensurrogat in DNA

Ein *Push-Pull*-System stellt auch die Struktur des Fluorophors 4-Aminophthalimid (**4API**) dar (Abb. 18). **4API** besitzt eine Absorptionsbande bis $\lambda_{\text{exc}} > 400$ nm, die somit gut von der Eigenabsorption von Biopolymeren abgegrenzt ist, eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute und eine lange Fluoreszenzlebensdauer. Des Weiteren weist die Absorption und Emission von **4API** eine ausgeprägte Lösungsmittelabhängigkeit von bis 110 nm zu auf, wodurch **4API** der zweitstärkste solvatochrome Fluorophor ist.^[131-132] In spektroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrücken einen großen Einfluss auf den angeregten Zustand von **4API** und damit auf dessen photophysikalische Eigenschaften besitzt.^[133-136] Durch diese Möglichkeit, verschiedene Umgebungen über die Änderung der Emissionswellenlänge visualisieren zu können, fanden **4API**-Derivate u.a. Anwendung in der Markierung von Proteinen, der Untersuchung von Mizellen oder der Detektion von Transmembranpeptiden.^[137-140]

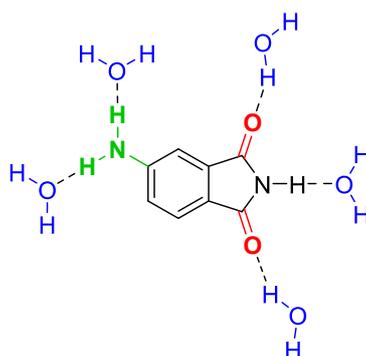


Abbildung 18: Grundstruktur von 4-Aminophthalimid (**4API**) mit dem elektronenschiebenden Aminosubstituenten (grün) und den elektronenziehenden Carbonylgruppen der Imid-Einheit (rot) sowie mögliche Wasserstoffbrückenbindungen.

Die erstmalige Anwendung von **4API** in Nukleinsäuren erfolgte jedoch relativ spät.^[141] Aufgrund seiner geringen Größe ist **4API** zu den natürlichen Purin-Basen isoster, weshalb die Arbeitsgruppen um WAGENKNECHT und ERNSTING ein neues fluoreszentes Basenpaar mit **m-4API**, bei dem der Zuckerrest dabei in *meta*-Position zur Aminogruppe angebracht ist, sowie

2,4-Diaminopyrimidin (**DAPym**) entwickelten und erfolgreich in DNA einbauten (Abb. 19).^[142] In spektroskopischen Untersuchungen wurde ermittelt, dass in der Doppelhelix je nach Gegenbase die Fluoreszenzquantenausbeute bis auf das 2.7-fache und die Emission bis auf das Doppelte ansteigt. Zudem erfolgt eine hypsochrome Verschiebung der Emissionsmaxima durch die Einbettung in den hydrophoben Basenstapel.^[142]

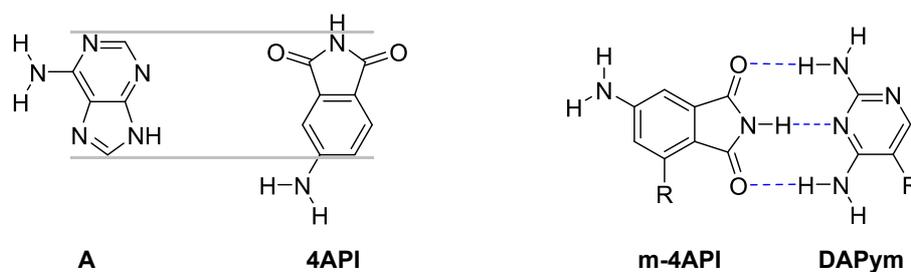


Abbildung 19: links: struktureller Vergleich von Adenin und **4API**; rechts: neues isosteres und fluoreszentes Basenpaar **m-4API:DAPym**.

In weiteren Untersuchungen der Struktur des Basenpaares in der Doppelhelix wurde jedoch festgestellt, dass die Geometrie der beiden Basen zueinander nicht optimal ist. Es zeigte sich, dass zwei Konformationen vorliegen, die durch die Temperatur beeinflusst werden.^[143] Aus diesem Grund wurden von WAGENKNECHT *et al.* **o-4API**, mit der glykosidischen Bindung in *ortho*-Position zur Aminogruppe, sowie das dimethylierte **DMAPI** (siehe Kap. 6) als weitere Derivate synthetisiert.^[144] In spektroskopischen Untersuchungen wurde ermittelt, dass die geänderte Anknüpfung von **o-4API** am Zuckergerüst zur Verbesserung der Basenpaarung mit **DAPym** führt. Jedoch zeigte sich auch, dass durch die geringe Größe des Fünfrings der Imid-Einheit abwechselnd nur zwei von drei möglichen Wasserstoffbrücken mit **DAPym** ausgebildet werden. Dennoch reichte das Wasserstoffbrückenmuster aus, um die beiden **4API**-Derivate als Triphosphate in Primerverlängerungsexperimenten erfolgreich als Gegenbasen zu **DAPym** einzubauen.^[144]

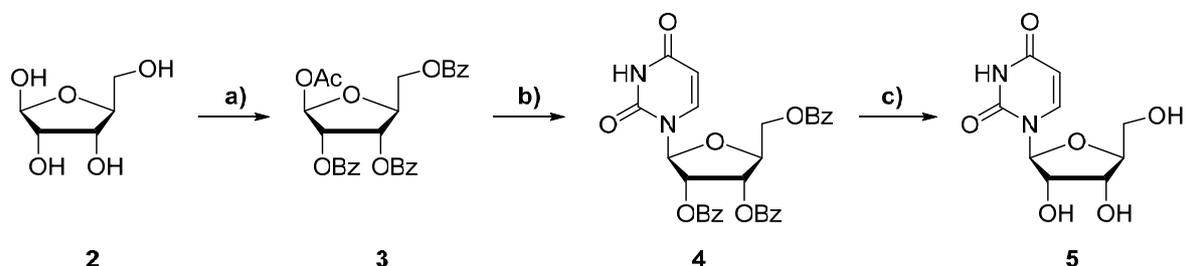
3 L-KONFIGURIERTE *MOLECULAR BEACONS* ALS POTENTIELLE INTRAZELLULÄRE THERMOMETER

In Kapitel 2.3 wurde gezeigt, dass die Messung intrazellulärer Temperatur eine wichtige Rolle in der Biologie sowie der Medizin spielt. Bisher entwickelte Nukleinsäure-Architekturen auf Basis von *Molecular Beacons* beschränkten sich auf Fluorophor-*Quencher*-Systeme, bei denen die Temperaturänderung durch einen Anstieg der Intensität visualisiert wird.^[74] Dadurch wird das Auslesen des Fluoreszenzsignals jedoch auf eine Wellenlänge eingeschränkt und stark vom Emissionsanstieg des Fluorophors abhängig. Wie ZHANG *et al.* zeigten, sollten Fluorophor-Fluorophor-Systeme als wellenlängenverschiebende *Molecular Beacons* die Auslesung eines temperaturabhängigen Fluoreszenzsignals verbessern können (siehe Kap. 2.2).^[64] Des Weiteren gelang YANG *et al.* der Nachweis, dass sich *Molecular Beacons* auf Basis von L-DNA durch eine ausgeprägte Stabilität in Zellen auszeichnen.^[74]

Deshalb wurden in diesem Projekt in Kooperation mit DR. WOLFGANG GREFFRATH (Universitätsmedizin Mannheim, Lehrstuhl für Neurophysiologie) doppelt modifizierte *Molecular Beacons* auf Basis von L-DNA als potentielle intrazelluläre Thermometer entwickelt. Hierzu wurde zunächst 2'-*O*-Propargyl-L-uridin (**L-cU**) aus L-Ribose synthetisiert, anschließend als Phosphoramidit mittels automatisierter Festphasensynthese in L-konfigurierte *Molecular Beacons* (**LMB**) eingebaut und mittels CuAAC mit dem FRET-Paar Cy3- und Cy5-Azid modifiziert. Danach folgten optische Charakterisierungen sowie Zellexperimente, um die **LMBs** auf ihre Eignung als potentielle intrazelluläre Thermometer zu untersuchen.

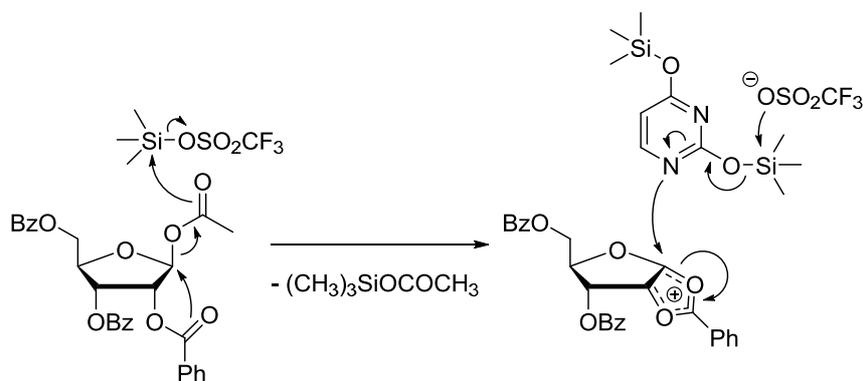
3.1 Synthese des L-cU Bausteins

3.1.1 Synthese von L-Uridin (5)



Scheme 4: Synthese von L-Uridin **5**. a) 1. 1.25 M HCl/MeOH, MeOH, ü.N., RT; 2. Benzoylchlorid, Pyridin, CHCl₃, ü.N., RT; 3. AcOH, Ac₂O, H₂SO₄, ü.N., RT, **68 %** (über drei Stufen); b) Uracil, BSA, TMSOTf, MeCN, ü.N., 65 °C, **91 %**; c) NaOMe, MeOH, 2 h, RT, **84 %**.

Die Synthese von L-Uridin erfolgte nach Literatur.^[145] Zu Beginn wurde kommerziell erworbene L-Ribose **2** über drei Stufen vollständig geschützt. Hierbei erfolgte im ersten Schritt die selektive Methylierung am anomeren Zentrum. Daraufhin wurden die Hydroxygruppen an den 2'-, 3'- und 5'-Positionen mit Benzoyl-Schutzgruppen versehen. Final wurde die Acetylierung des zuvor methylierten anomeren Zentrums durchgeführt, wobei Produkt **3** mit einer Ausbeute von 68 % erhalten wurde. Um Uracil an **3** anknüpfen zu können, wurde dieses *in situ* mithilfe von *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) mit Trimethylsilyl-Schutzgruppen versehen. Anschließend wurde **3** durch Zugabe von Trimethylsilyltriflat (TMSOTf) aktiviert, um das gewünschte β -Produkt **4** zu erhalten. In dieser SILYL-HILBERT-JOHNSON-Reaktion nach VORBRÜGGEN fungiert TMSOTf als Lewis-Säure, wodurch die 1'-Acetylgruppe abgespalten und ein Oxonium-Intermediat erhalten wird.^[146] Die 2'-Benzoyl-Schutzgruppe stabilisiert dieses Intermediat und dient gleichzeitig als sterisches Schild, wodurch die Anknüpfung des TMS-geschützten Uracils primär an der β -Position erfolgt (Schema 5). Abschließend wurden die Benzoyl-Schutzgruppen von **4** mit Natriummethanolat in Methanol abgespalten, mit Dowex[®] 50WX8 Ionentauscher-Harz neutralisiert und nach säulenchromatographischer Aufreinigung L-Uridin **5** mit einer Gesamtausbeute von 52 % erhalten.

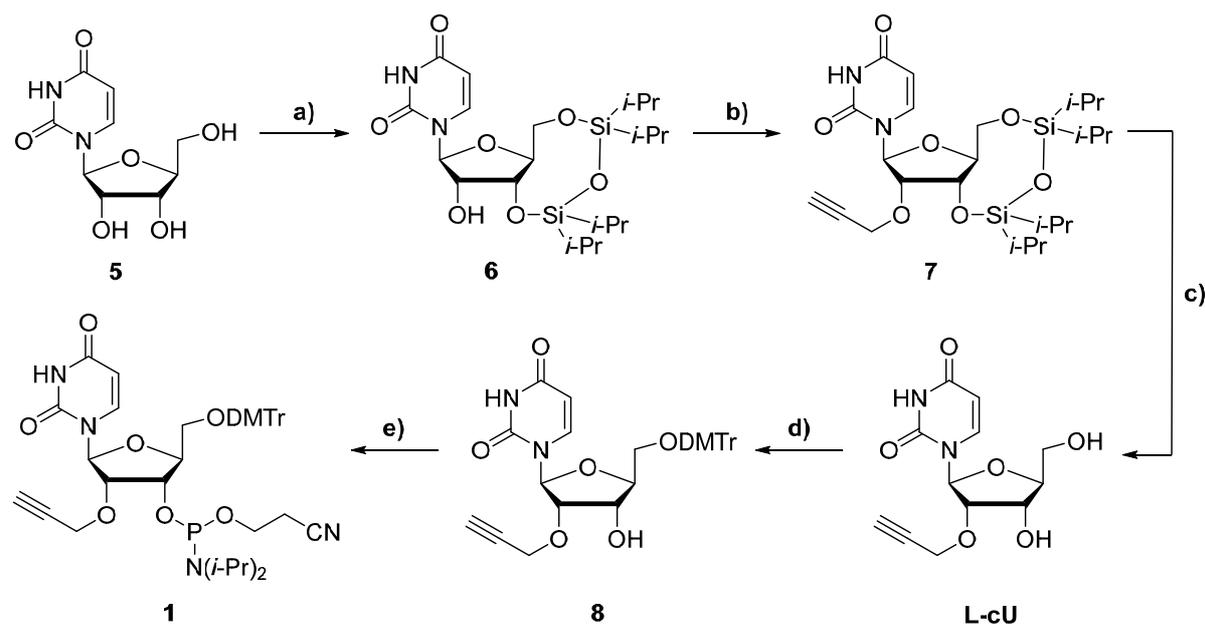


Schema 5: Postulierter Mechanismus der SILYL-HILBERT-JOHNSON-Reaktion nach VORBRÜGGEN.^[146]

3.1.2 Synthese des L-cU-Phosphoramidites (**1**)

Die Synthese von L-cU wurde analog zu Synthesen von 2'-*O*-propargyl-modifizierten Uridin-Derivaten aus der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT durchgeführt.^[147-148] Im ersten Schritt wurden die 3'- und 5'-Hydroxygruppen des L-Uridins **5** selektiv mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan (MARKIEWICZ-Reagenz) geschützt. Anschließend erfolgte unter Verwendung von Propargylbromid die Anknüpfung der Alkingruppe an die 2'-Position. Diese dient später als Anknüpfungsstelle für die Farbstoff-Azide in der „Click“-Reaktion. Die 2'-Hydroxygruppe von **6** wurde durch Zugabe von Natriumhydrid deprotoniert und anschließend

mit Propargylbromid in einer nukleophilen Substitution zum Produkt **7** alkyliert. Wichtig hierbei war das Herabsetzen der Reaktionstemperatur auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowie die portionsweise Zugabe des Natriumhydrids, um eine Abspaltung des Uracils und damit eine Zersetzung von **6** zu verhindern. Im Vergleich zur herkömmlichen Synthese von 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**) konnte durch die Verwendung von Natriumhydrid auf die teure Phosphazenenbase BEMP sowie den dafür notwendigen Einbau einer zusätzlichen Pivaloyloxymethyl-Schutzgruppe (POM) verzichtet werden.^[149] Im nächsten Schritt wurde die MARKIEWICZ-Schutzgruppe mit 1 M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (TBAF) in THF mit quantitativer Ausbeute zum **L-cU** abgespalten. Um einen Einbau über die automatisierte Festphasensynthese zu ermöglichen, wurde die 5'-Hydroxygruppe mit 4,4-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin selektiv DMTr-geschützt und das erhaltene Produkt **8** mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und Diisopropylethylamin (DIPEA) in DCM umgesetzt. Das **L-cU**-Phosphoramidit **1** wurde ausgehend von L-Uridin **5** mit einer Gesamtausbeute von 29 % erhalten.



Schema 6: Synthese von **L-cU** und dessen Phosphoramidit **1**. a) TIPDSiCl₂, Pyridin, 2 h, 0 °C + ü.N., RT, **80 %**; b) 1. NaH (in Paraffinöl), THF, 15 Min, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2. Propargylbromid, ü.N. RT, **54 %**; c) 1 M TBAF/THF, THF, 5 Min, RT, **quant.**; d) DMTr-Cl, Pyridin, ü.N. RT, **80 %**; 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, DCM, 3 h, RT, **85 %**.

3.2 Synthese und Modifikation der *Molecular Beacons*

Die Synthese der *Molecular Beacons* **LMB1** – **LMB4** sowie der Einbau des **L-cU**-Phosphoramidites **1** wurde mittels automatisierter Festphasensynthese durchgeführt. Für die Schleifenregion wurde ein Abschnitt von 15 L-Thymidinen (T_{15}) in die *Molecular Beacons* eingebaut. Die Sequenzen der Stammregion wurden so gewählt, dass verschiedene Stränge mit Schmelztemperaturen in einem Bereich von 40 – 50 °C erhalten werden und orientierten sich an einer Arbeit aus der Gruppe WAGENKNECHT (Abb. 20).^[150] Für die Fluorophormodifikation wurden die Cyanin-Farbstoffe *Cy3* und *Cy5* gewählt. Die beiden Fluorophore sind in der Konfokalmikroskopie etabliert und bilden ein erprobtes FRET-Paar. Des Weiteren ist *Cy3* stabil gegenüber den *UltraFast*-Abspaltbedingungen, weswegen die CuAAC noch auf der festen Phase erfolgen kann. Dies ermöglicht die doppelte Farbstoffmodifikation der synthetisierten Oligonukleotide.

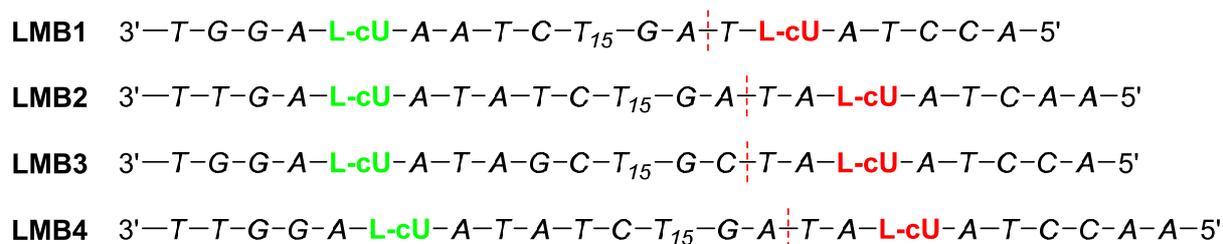


Abbildung 20: Sequenzen der synthetisierten L-DNA-Stränge **LMB1** – **LMB4**; kursiv: „natürliche“ L-Nukleoside, grün: *Cy3*-Modifikation, rot: *Cy5*-Modifikation.

Die Synthese der Stränge wurde in zwei Abschnitten durchgeführt. Zunächst erfolgte die Synthese bis zur Base vor dem zweiten Einbau des **L-cU**-Phosphoramidites **1**. Anschließend wurde das CPG-Säulchen aus dem Synthesizer entfernt und getrocknet, so dass das erste eingebaute **L-cU** auf der festen Phase mit *Cy3*-Azid in einer CuAAC modifiziert werden konnte. Das CPG-Säulchen wurde gespült, wieder in den Synthesizer eingesetzt und die Synthese des zweiten Abschnittes durchgeführt. Nach anschließender Abspaltung der synthetisierten L-DNA von der festen Phase wurde postsynthetisch die zweite „Click“-Reaktion mit *Cy5*-Azid durchgeführt. Zuletzt erfolgte die Aufreinigung der doppelt modifizierten L-DNA mittels RP-HPLC.

Im weiteren Verlauf dieses Projekts wurden für spektroskopische und mikroskopische Vergleiche zusätzlich die d-konfigurierten *Molecular Beacons* **DMB1** und **DMB4** synthetisiert. Die Synthese erfolgte analog zur Synthese von **LMB1** – **LMB4** in zwei Teilschritten, wobei für die Farbstoffmodifikation kommerziell erhältliches **cU** eingebaut wurde (Abb. 21).

DMB1 3'-T-G-G-A-cU-A-A-T-C-T₁₅-G-A-T-cU-A-T-C-C-A-5'

DMB4 3'-T-T-G-G-A-cU-A-T-A-T-C-T₁₅-G-A-T-A-cU-A-T-C-C-A-A-5'

Abbildung 21: Sequenzen der synthetisierten D-DNA-Stränge **DMB1** und **DMB4**; grün: Cy3-Modifikation, rot: Cy5-Modifikation.

3.3 Spektroskopische Untersuchungen

3.3.1 Absorption

In den Absorptionen von **LMB1** – **LMB4** sind deutlich die charakteristischen Banden von Cy3 mit dem Maximum bei 552 nm und einer Schulter bei ca. 520 nm sowie Cy5 mit dem Maximum bei 647 nm und einer Schulter bei ca. 600 nm zu erkennen. Während bei **LMB1**, **LMB2** und **LMB4** im Vergleich das Verhältnis der Absorptionsmaxima der beiden Fluorophore zueinander gleich ist, weist **LMB3** eine verringerte Absorption von Cy5 auf.

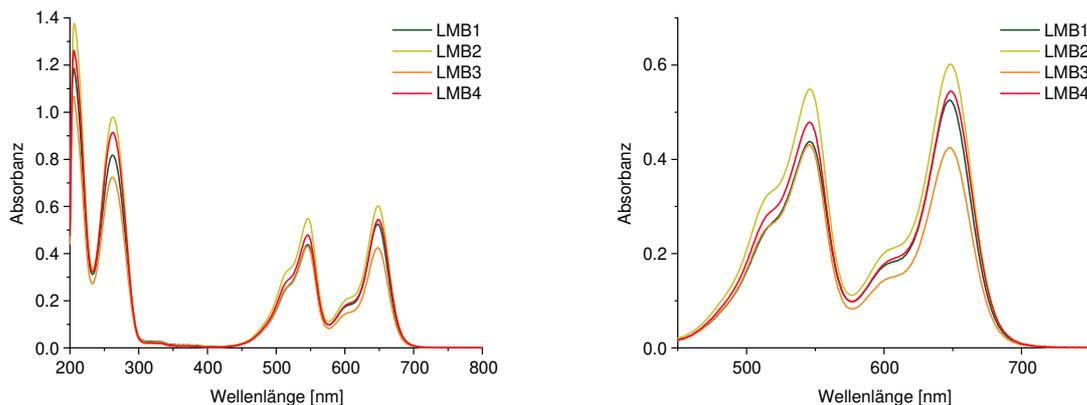


Abbildung 22: Absorption von **LMB1** - **LMB4**; 2.5 μ M DNA, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^{\circ}$ C.

Zusätzlich wurden die Schmelztemperaturen von **LMB1** – **LMB4** bestimmt (Tab. 1). **LMB2** besitzt hierbei die niedrigste Schmelztemperatur mit $T_m = 42$ $^{\circ}$ C, obwohl es um ein Basenpaar länger ist als **LMB1**. Das kürzere **LMB1** liegt mit $T_m = 43$ $^{\circ}$ C leicht darüber, was darauf hinweist, dass der Austausch eines AT-Paares mit einem GC-Paar die Stammregion mehr stabilisiert als die Verlängerung um ein AT-Paar. Dies bestätigt auch die Schmelztemperatur von **LMB3**, die mit $T_m = 54$ $^{\circ}$ C am höchsten ist. Bei **LMB3** wurden im Vergleich zu **LMB2** zwei AT-Paare mit zwei GC-Paaren ausgetauscht, wodurch die Schmelztemperatur um fast 13 $^{\circ}$ C erhöht wurde. Der längste Strang **LMB4** liegt mit einer Schmelztemperatur von $T_m = 49$ $^{\circ}$ C rund 5 $^{\circ}$ C unter **LMB3**. Auch im Vergleich dieser beiden zeigt sich, dass ein zusätzliches GC-Paar zu einer größeren Erhöhung der Schmelztemperatur führt als die

Verlängerung der Sequenz um ein AT-Paar. Die Verlängerung um ein GC-Paar führt zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur von **LMB2** zu **LMB4** um ca. 7.5 °C. Die beiden D-konfigurierten *Molecular Beacons* **DMB1** und **DMB4** weisen mit $T_m = 43$ °C und $T_m = 49$ °C die gleichen Schmelztemperaturen auf wie **LMB1** und **LMB4**. Die Schmelztemperaturen liegen damit im gewünschten Bereich um 40 – 50 °C, weshalb hier die größte Emissionsänderung durch das Öffnungsverhalten der *Molecular Beacons* zu erwarten sein sollte.

Tabelle 1: Schmelztemperaturen der *Molecular Beacons*.

DNA	T_m [°C]
LMB1	43
LMB2	42
LMB3	54
LMB4	49
DMB1	43
DMB4	49

3.3.2 Fluoreszenz

Nach den Absorptionmessungen wurde von **LMB1 – LMB4** die Emission im Temperaturbereich von 20 – 70 °C detektiert, um das Änderungsverhalten des Energietransfers zu untersuchen. Als Anregungswellenlänge wurde $\lambda_{exc} = 518$ nm gewählt, die im Schulterbereich der Absorption von Cy3 und außerhalb der Absorption von Cy5 liegt, um eine direkte Anregung des Akzeptorfarbstoffes zu vermeiden. In Abbildung 23 sind exemplarisch die Emissionen von **LMB1** und **LMB4** dargestellt, die den stärksten FRET zeigten. Bei der Anfangstemperatur von 20 °C ist die Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffes Cy5 bei **LMB1 – LMB4** am höchsten und nimmt mit steigender Temperatur ab. Jedoch nimmt mit steigender Temperatur auch die Fluoreszenz des Donorfarbstoffes Cy3 ab anstatt, wie es zu erwarten wäre, mit abnehmendem Energietransfer zu steigen. Diese Abnahme ist auf thermische Fluoreszenzlöschung zurückzuführen, welche durch Zunahme der *Inneren Umwandlung* (engl. *internal conversion*, IC) bei steigenden Temperaturen verursacht wird. Dabei kommt es zu einer erhöhten Anzahl an Zusammenstößen mit Molekülen in der Messlösung oder erhöhter Vibration des Fluorophors. Hierdurch treten mehr strahlungslose Übergänge innerhalb des Fluorophors von einem elektronisch angeregten in den darunterliegenden elektronischen Zustand auf.^[151]

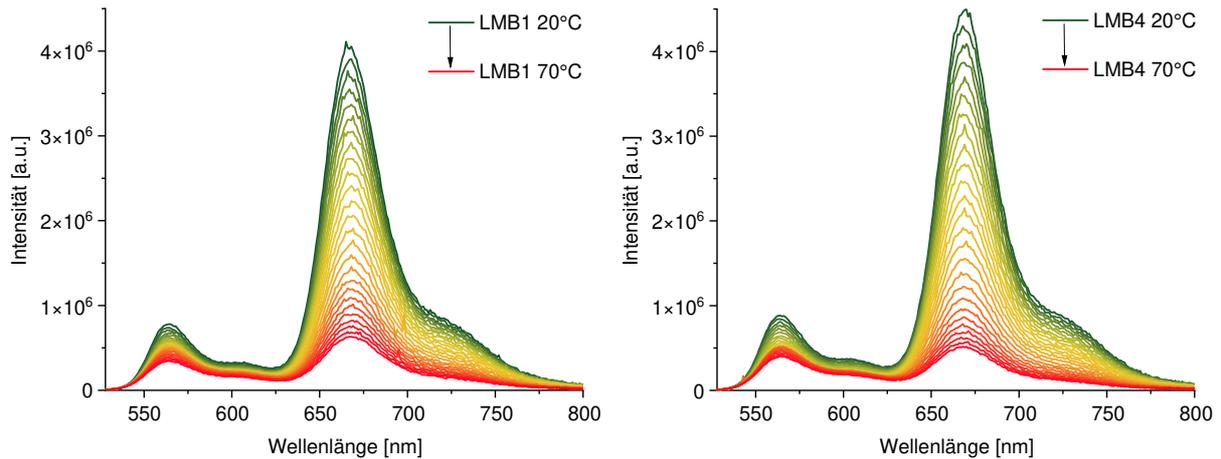


Abbildung 23: Temperaturabhängige Emission von **LMB1** und **LMB4** im Bereich von 20 – 70 °C; 2.5 μ M DNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, λ_{exc} = 518 nm, Spaltbreite 3/3 nm.

Zur besseren Visualisierung wurden die Intensitätsverhältnisse $R_{FRET} = I_{A668}/I_{D565}$ von **LMB1** – **LMB4** berechnet und gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 24). Hierbei ist zu erkennen, dass bei allen *Molecular Beacons* die Abnahme des Energietransfers dem sigmoidalen Verlauf der Schmelzkurve folgt. **LMB1** und **LMB4** weisen in geschlossenem Zustand das höchste Intensitätsverhältnis mit $R_{FRET} \approx 5$ auf. Im Vergleich dazu liegt R_{FRET} von **LMB2** und **LMB3** bei 20 °C deutlich darunter. Im offenen Zustand bei 70 °C liegen die Intensitätsverhältnisse von **LMB2** – **4** auf einem ähnlichen Niveau mit $R_{FRET} \approx 1.2$. Das Intensitätsverhältnis von **LMB1** liegt mit $R_{FRET} \approx 1.8$ leicht darüber. Auffallend ist, dass bei **LMB3** bei steigender Temperatur R_{FRET} zunächst schwach zunimmt und erst ab 40 °C beginnt abzunehmen. Dies könnte auf die hohe Schmelztemperatur zurückzuführen sein, wodurch R_{FRET} durch die thermische Fluoreszenzlöschung beeinflusst wird oder auch eine leichte Stabilisierung der hybridisierten Stammregion erfolgt.

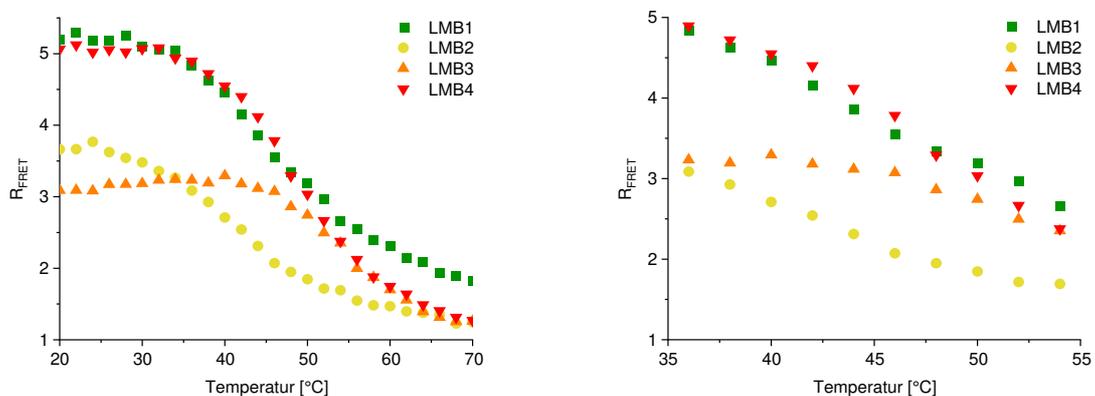


Abbildung 24: Temperaturabhängigkeit des Intensitätsverhältnisses R_{FRET} von **LMB1** – **LMB4**.

3.3.3 Zyklische Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Stabilität

Mit **LMB1** und **LMB4** wurden im Anschluss Stabilitätsmessungen durch wiederholtes Aufwärmen und Abkühlen durchgeführt. Hierfür wurde über sechs Zyklen die Emission bei 20, 50, 80 und erneut 50 °C aufgenommen. Anschließend wurde R_{FRET} berechnet und gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Die Heiz- bzw. Abkühlrate betrug ca. 2 °C/Min und die Proben wurden nach Erreichen der jeweiligen Zieltemperatur für 10 Min inkubiert. Während bei beiden R_{FRET} bei 80 und 50 °C auch nach mehreren Zyklen nahezu konstant bleibt, ist jedoch im geschlossenen Zustand bei 20 °C eine Abnahme von R_{FRET} zu erkennen. Diese beträgt nach sechs Zyklen bei **LMB1** rund 9 % und bei **LMB4** rund 8 %. Ursache hierfür könnte ein Ausbleichen der Fluorophore durch die wiederholte Anregung sein. Jedoch zeigt sich, dass eine mehrfache Anwendung der L-konfigurierten *Molecular Beacons* in einem potentiellen Einsatz als intrazelluläre Thermometer gegeben ist.

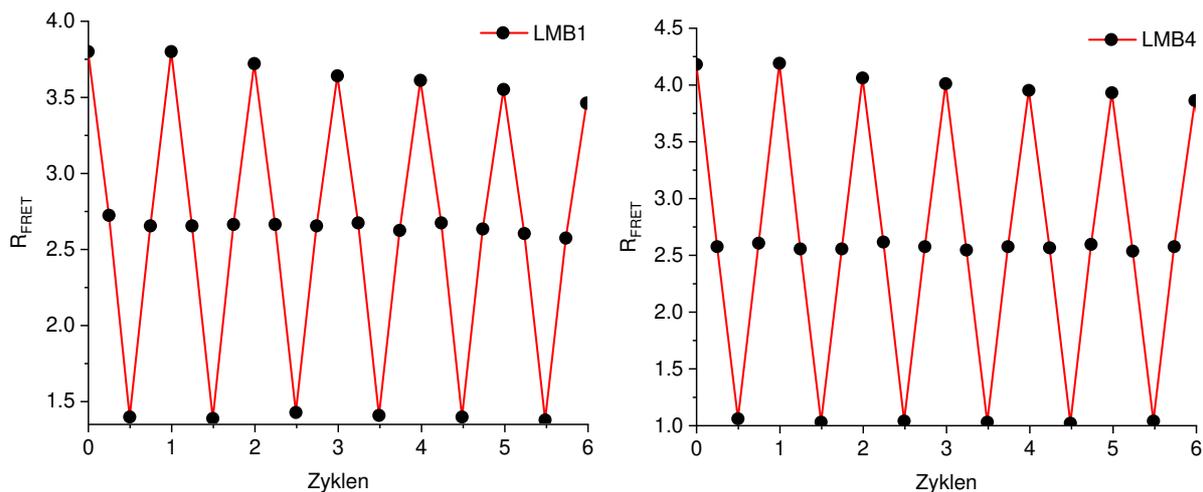


Abbildung 25: R_{FRET} von **LMB1** und **LMB4** in Abhängigkeit von der Temperatur nach mehrfachem Aufwärmen auf 50 °C und 80 °C sowie Abkühlen auf 20 °C.

3.3.4 Temperaturabhängiger Vergleich mit D-konfigurierten *Molecular Beacons*

Für **DMB1** und **DMB4** wurde ebenfalls R_{FRET} berechnet und gegen die Temperatur aufgetragen. Es zeigt sich, dass bei **DMB1** und **DMB4** im Vergleich zu **LMB1** und **LMB4** das Intensitätsverhältnis bei der Starttemperatur deutlich höher ist. Bei **DMB1** ist R_{FRET} bei 20 °C sogar mehr als doppelt so hoch wie bei **LMB1**. Dies könnte auf die Position der Farbstoffe zurückzuführen sein, wodurch diese in den d-konfigurierten *Molecular Beacons* besser zueinander ausgerichtet sind und damit der FRET verstärkt wird. Mit steigender Temperatur

zeigt R_{FRET} bei **DMB1** und **DMB4** einen ähnlichen Verlauf wie bei **LMB1** und **LMB4**, wobei die Endpunkte der jeweiligen Analoga nahezu übereinstimmen.

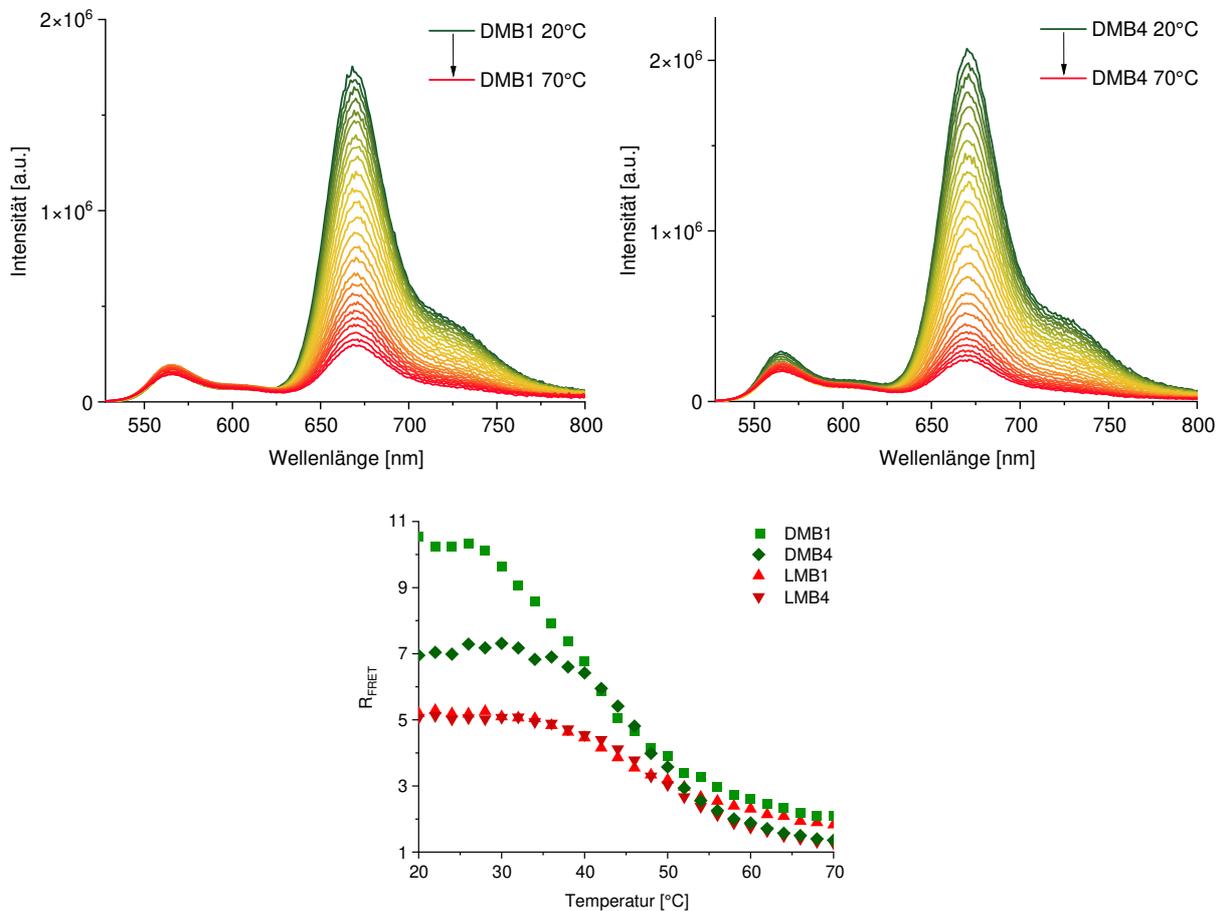


Abbildung 26: oben: Temperaturabhängige Emission von **DMB1** und **DMB4** im Bereich von 20 – 70 °C; unten: Temperaturabhängigkeit des Intensitätsverhältnisses R_{FRET} von **DMB1**, **DMB4**, **LMB1** und **LMB4**; 2.5 μM DNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, $\lambda_{\text{exc}} = 518$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

3.3.5 Untersuchungen der Stabilität in Zelllysate

Mit **DMB1**, **DMB4**, **LMB1** und **LMB4** wurden Messungen der Emission in Zelllysate aus HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 480 Min bei 37 °C durchgeführt, um die Stabilität der *Molecular Beacons* in zellulärer Umgebung zu untersuchen. Exemplarisch sind in Abbildung 27 die Emissionen von **DMB1** und **LMB1** dargestellt. Die erste Messung erfolgte jeweils direkt nach Zugabe der DNA in die Küvette mit dem auf 37 °C vorgewärmten Zelllysate. Zwischen den Messungen wurden die Proben konstant bei 37 °C inkubiert. In den Emissionen der *Molecular Beacons* sind die charakteristischen Banden der beiden Fluorophore Cy3 und Cy5 zu erkennen. Bei **DMB1** und **DMB4** zeigt sich eine starke Abnahme der Cy5-Fluoreszenz, während die Emission von Cy3 mit der Zeit zunimmt. Dies deutet darauf hin, dass diese im

Zelllysate geöffnet werden, wodurch sich der Abstand zwischen den Fluorophoren vergrößert und der FRET verringert wird. Ursache für die Öffnung könnten Wechselwirkungen der D-konfigurierten *Molecular Beacons* mit den Bestandteilen des Zelllysats oder sogar deren Abbau durch Nukleasen sein. Im Gegensatz dazu zeigen **LMB1** und **LMB4** über den gesamten Zeitraum nahezu keine Veränderung in der Emission. Das deutet darauf hin, dass die L-konfigurierten *Molecular Beacons* vollständig geschlossen vorliegen und es zu keinen irreversiblen Wechselwirkungen der L-DNA mit den Bestandteilen des Zelllysats oder deren Abbau kommt. Zur besseren Visualisierung des Emissionsverhaltens wurde erneut R_{FRET} berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Hierbei zeigt sich, dass R_{FRET} bei **DMB1** und **DMB4** exponentiell abfällt, während der Wert bei **LMB1** und **LMB4** konstant bleibt.

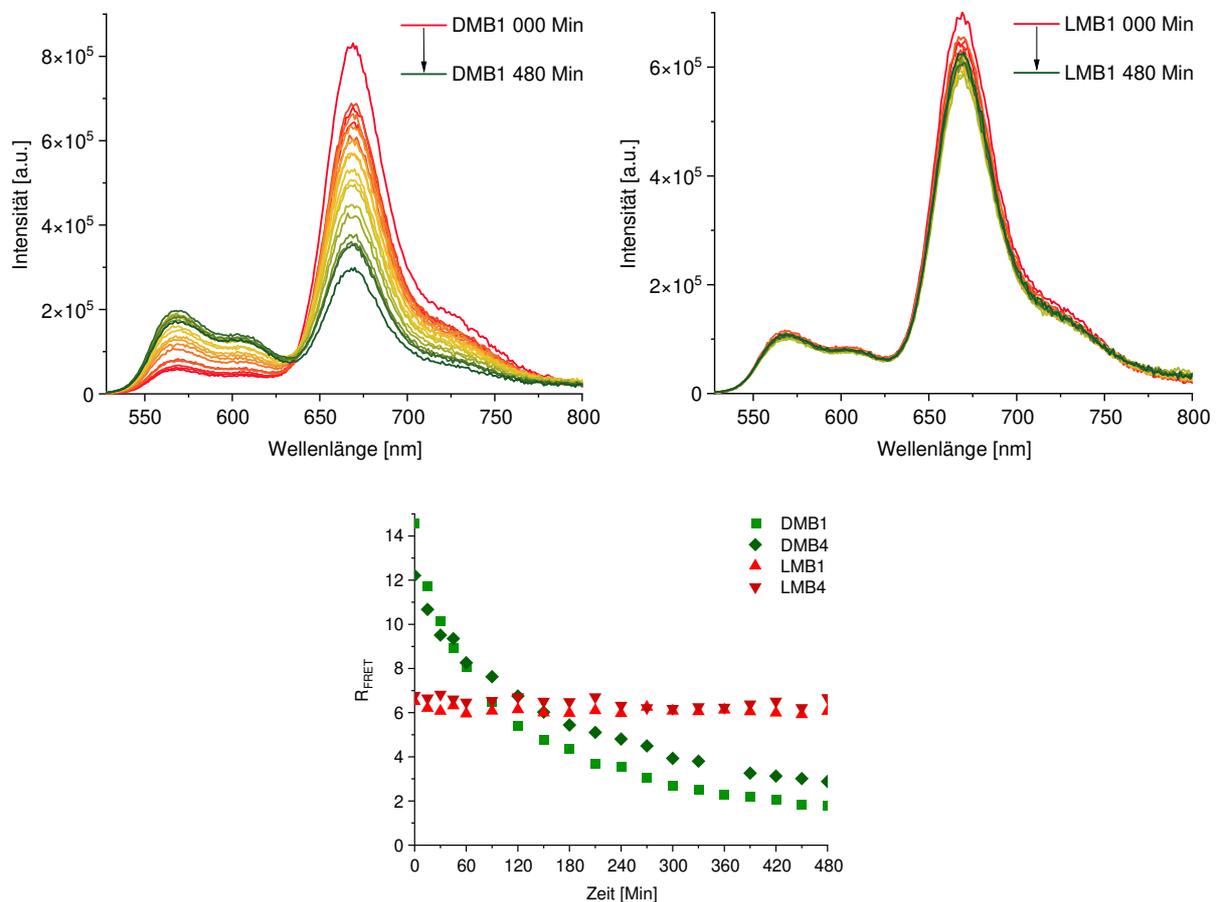


Abbildung 27: oben: Zeitabhängige Emission von **DMB1** und **LMB1** in Zelllysate; unten: Zeitabhängigkeit von R_{FRET} von **DMB1**, **DMB4**, **LMB1** und **LMB4**; 2,5 μM DNA, 37 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 518$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

3.3.6 Temperaturabhängige Emissionsmessungen in Zelllysate

Nachdem die Stabilität in Zelllysate nachgewiesen werden konnte, wurden zusätzlich Emissionsmessungen von **LMB1** und **LMB4** bei 20 – 70 °C durchgeführt, um das FRET-

Verhalten genauer zu untersuchen (Abb. 28). Bei der Starttemperatur 20 °C ist bei beiden *Molecular Beacons*, wie zuvor in den Messungen in Pufferlösung, ein deutlicher FRET zu erkennen, welcher ebenso mit steigender Temperatur abnimmt. Ein Vergleich der ermittelten R_{FRET} -Werte in Pufferlösung (**P**) und Zelllysate (**ZL**) zeigt, dass diese in Zelllysate über den gesamten Temperaturbereich höher liegen, was auf die veränderte elektronische Umgebung durch die Messlösung zurückzuführen ist. Dennoch ist der sigmoidale Verlauf der Kurve ähnlich zu den Messungen in Pufferlösungen, was für einen Einsatz der L-konfigurierten *Molecular Beacons* als intrazelluläre Thermometer spricht.

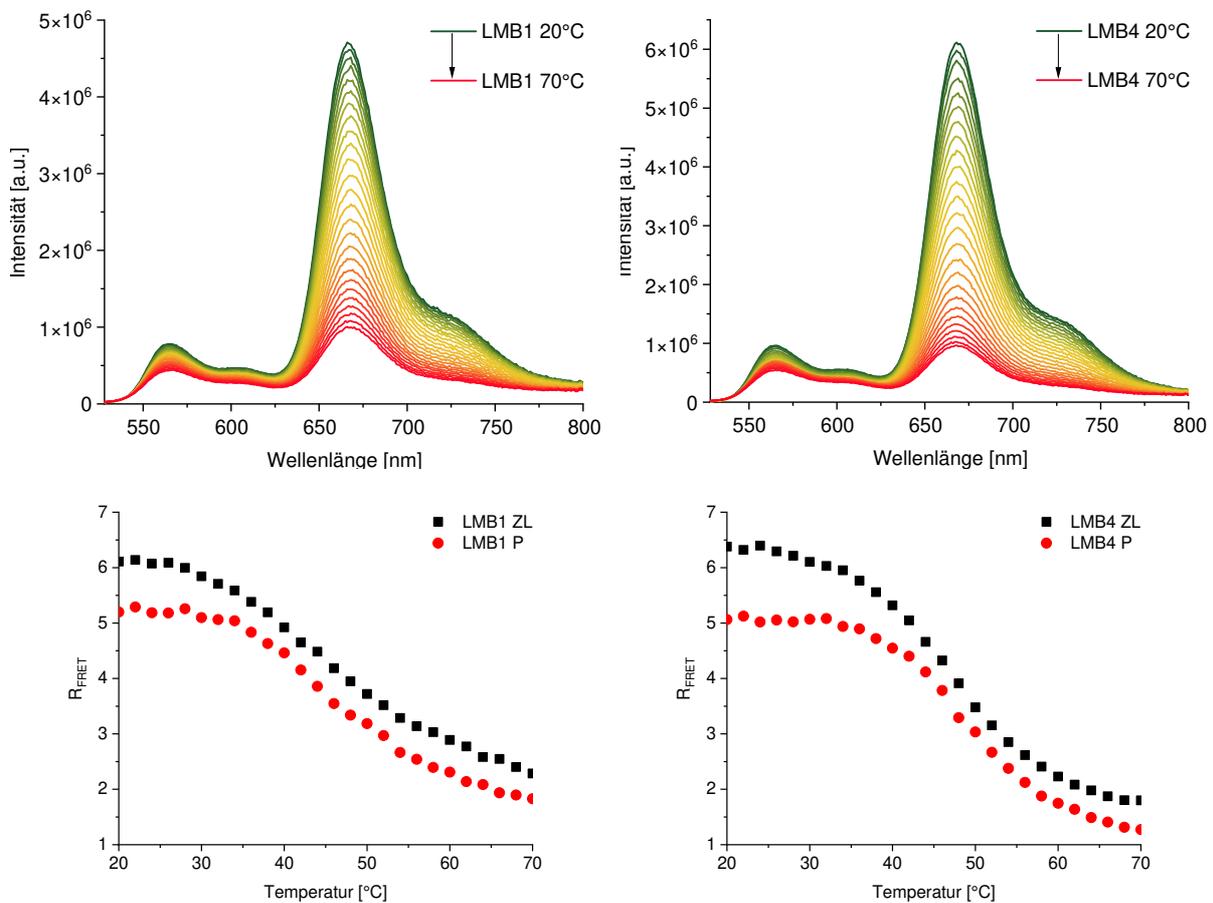


Abbildung 28: oben: Temperaturabhängige Emission von **LMB1** und **LMB4** im Bereich von 20 – 70 °C in Zelllysate; unten: Temperaturabhängigkeit von R_{FRET} von **LMB1** und **LMB4**; ZL: Zelllysate; P: Pufferlösung; 2.5 μM DNA, λ_{exc} = 518 nm, Spaltbreite 3/3 nm.

3.4 Zellexperimente

Nach den erfolgreichen spektroskopischen Stabilitätsuntersuchungen von **LMB1** und **LMB4** in Zelllysate wurden mit der Unterstützung von DR. FRANZISKA RÖNICKE Zellexperimente durchgeführt. In diesen sollten die zuvor gewonnen Erkenntnisse *in vivo* bestätigt werden. Für

die Transfektion von je 100 ng **DMB1**, **DMB4**, **LMB1** und **LMB4** in HeLa-Zellen wurde *Lipofectamine*TM als Transfektionsreagenz verwendet. Die ersten mikroskopischen Aufnahmen der Zellen wurden direkt nach Zugabe des *Lipofectamine*TM/DNA-Gemisches durchgeführt. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C inkubiert und stündlich neue Aufnahmen der Zellen erstellt. Um bei jeder Aufnahme möglichst den gleichen Bereich zu visualisieren, wurde beim ersten Mal die Position des Detektors gespeichert und anschließend automatisiert abgefahren. Die selektive Anregung des Donorfarbstoffes Cy3 erfolgte bei $\lambda_{exc} = 488$ nm und die Detektion bei $\lambda_{em} = 545 - 585$ nm für Cy3 sowie $\lambda_{em} = 650 - 690$ nm für den Akzeptorfarbstoff Cy5.

In Abbildung 29 sind die Aufnahmen von **DMB1** und **LMB1** dargestellt. Direkt nach der Zugabe ist bei beiden *Molecular Beacons* primär eine diffuse grüne Emission zu erkennen, während kaum rote Emission sichtbar ist. Die Fluoreszenz ist hauptsächlich an den Zellrändern zu sehen, was bedeutet, dass die *Molecular Beacons* sich vermutlich noch in den Liposomen der Transfektionsreagenz befinden. Nach einer Stunde zeigen sich bei beiden Proben vermehrt die ersten deutlichen Fluoreszenzsignale innerhalb der Zellen, was für eine erfolgreiche Transfektion spricht. Auch wenn im roten Detektionskanal bei beiden Proben eine erhöhte Fluoreszenz zu erkennen ist, überwiegt die grüne Emission in der Überlagerung noch deutlich. Bei **DMB1** sind nach zwei Stunden klare Fluoreszenzsignale innerhalb dreier Zellkerne sichtbar, die sich auch im roten Detektionskanal zeigen. Die gelbgrüne Emission in der Überlagerung deutet darauf hin, dass die Proben die Liposome verlassen haben könnten und vermehrt in einer geschlosseneren Form vorliegen. Auch bei **LMB1** zeigt sich eine stärkere rote Emission, die in der Überlagerung durch eine gelborange Farbe innerhalb der Zellen deutlich wird und für ein Vorliegen der geschlossenen Form spricht. Nach drei Stunden ist die rote Fluoreszenz von **DMB1** innerhalb der drei Zellkerne im Vergleich zur Aufnahme nach zwei Stunden verringert. Dies wird auch bei der Überlagerung deutlich, in der primär grüne Fluoreszenzsignale erkennbar sind, was darauf hindeutet, dass die *Molecular Beacons* wieder hauptsächlich geöffnet vorliegen. Dagegen nimmt bei **LMB1** die Emission des Akzeptors mehr zu, wodurch in der Überlagerung vermehrt orange Fluoreszenzsignale erhalten werden. Bei **DMB1** ist nach vier Stunden primär grüne Fluoreszenz erkennbar, was darauf hinweist, dass die Proben in der offenen Form vorliegen. Im Vergleich dazu nimmt bei **LMB1** die rote Emission weiter zu und die Fluoreszenzsignale von **LMB1** sind zunehmend in Zellkernen sichtbar. Nach fünf und sechs Stunden scheinen sich die Fluoreszenzsignale von **DMB1** immer weiter in den Zellen zu verteilen und die grüne Emission überwiegt weiterhin. Wie durch die Fluoreszenzmessungen in Zelllysate zu erwarten war, wird **DMB1** durch Interaktion mit Zellbestandteilen oder durch möglichen Abbau von Nukleasen geöffnet. Dagegen zeigt **LMB1**

nach fünf und sechs Stunden weiterhin eine deutliche rote Emission und scheint vermehrt in die Zellkerne transportiert zu werden. Des Weiteren sind über den zeitlichen Verlauf der Aufnahmen eine Zunahme toter Zellen bei **DMB1** zu erkennen, während bei **LMB1** weniger tote Zellen vorliegen.

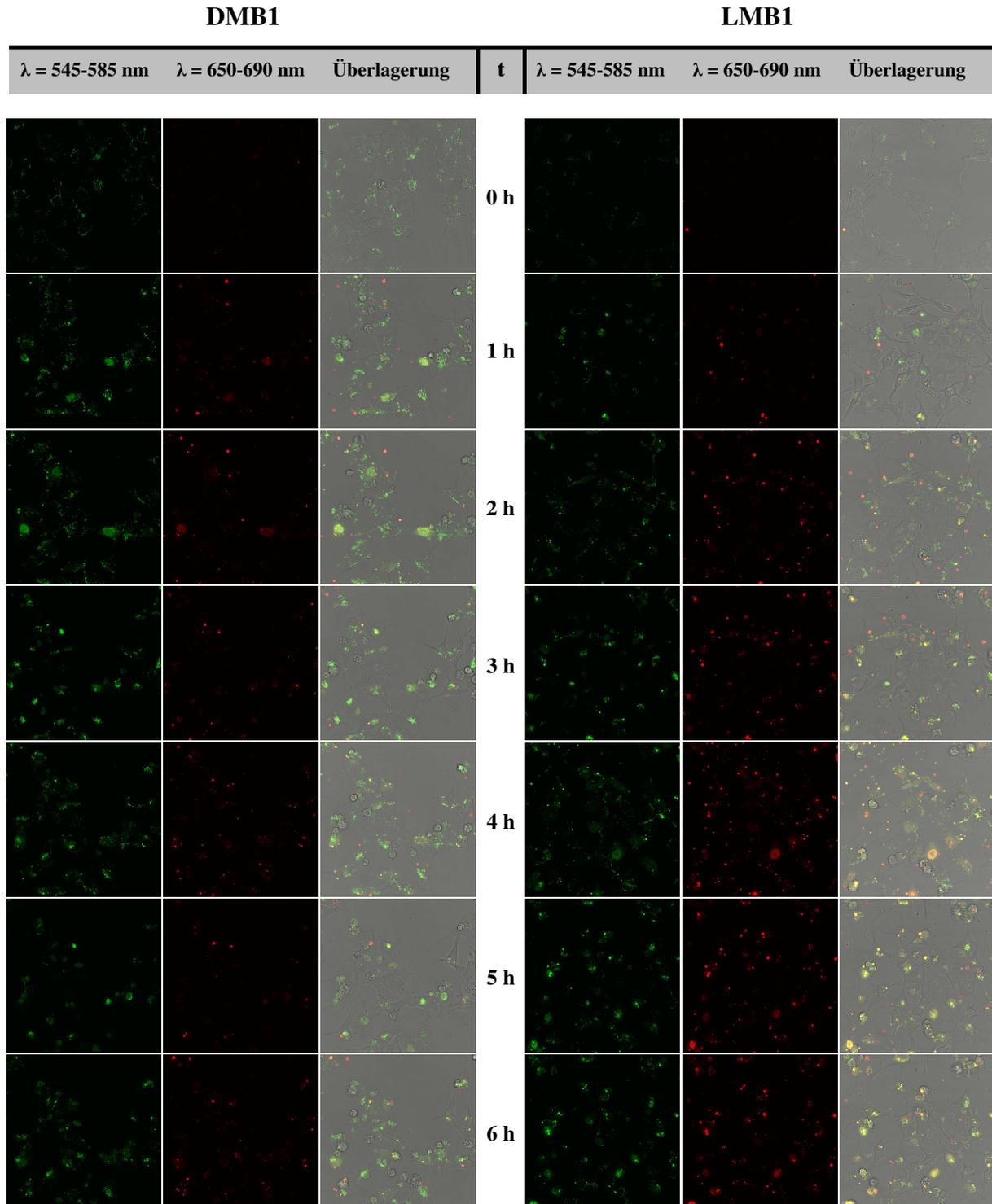


Abbildung 29: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der Zellexperimente mit **DMB1** (links) und **LMB1** (rechts).

In Abbildung 30 sind die Aufnahmen von **DMB4** und **LMB4** dargestellt. Wie bei **DMB1** und **LMB1** sind direkt nach der Zugabe nur schwache Fluoreszenzsignale der Proben sichtbar, die sich bei **LMB4** jedoch schon innerhalb der Zellen befindet. Nach einer Stunde zeigt sich bei **DMB4** weiterhin eine diffuse grüne Emission. Dagegen sind bei **LMB4** bereits Fluoreszenzsignale mit starkem Rotanteil in zwei Zellkernen sichtbar, was für eine erfolgreiche Transfektion und ein Vorliegen der geschlossenen Form spricht. Bei **DMB4** zeigen sich nach zwei Stunden ebenfalls deutliche Fluoreszenzsignale in vier Zellkernen. Bei drei davon ist eine erhöhte rote Emission zu erkennen, während der vierte Zellkern primär grüne Emission zeigt. Auch dies deutet auf eine erfolgreiche Transfektion hin, jedoch scheint **DMB4** im Vergleich zu **LMB4** nicht vollständig geschlossen vorzuliegen. Bei **LMB4** zeigt sich dagegen in der Überlagerung vermehrt deutliche orange Emission in den Zellkernen. Bereits nach drei Stunden ist bei **DMB4** wie bei **DMB1** ein Rückgang der roten Emission zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die *Molecular Beacons* geöffnet werden. Im Vergleich dazu nimmt die rote Emission bei **LMB4** immer weiter zu und die Probe ist in einer zunehmenden Anzahl an Zellkernen deutlich sichtbar. Bei **DMB4** ist nach vier Stunden ein weiterer Zellkern mit einer leicht höheren roten Emission zu sehen, während in den anderen Zellkernen das grüne Fluoreszenzsignal deutlich überwiegt. Dagegen nimmt bei **LMB4** die Zahl der Zellkerne mit Fluoreszenzsignal weiter zu. Auch überwiegt weiterhin die rote Emission, was für ein stabiles Vorliegen der geschlossenen Form spricht. Wie bei **DMB1** werden bei **DMB4** nach fünf und sechs Stunden die primär grünen Fluoreszenzsignale immer diffuser und liegen verteilt in den Zellen vor, während die Zahl der toten Zellen ebenfalls zunimmt. Auch bei **LMB4** sind im Vergleich zu **LMB1** mehr tote Zellen sichtbar. Jedoch sind bei **LMB4** auch mehr erfolgreich transfizierte Proben mit deutlichem Fluoreszenzsignal in den Zellkernen sichtbar. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen somit die Stabilität der **LMBs** gegenüber Wechselwirkungen mit der zellulären Umgebung.

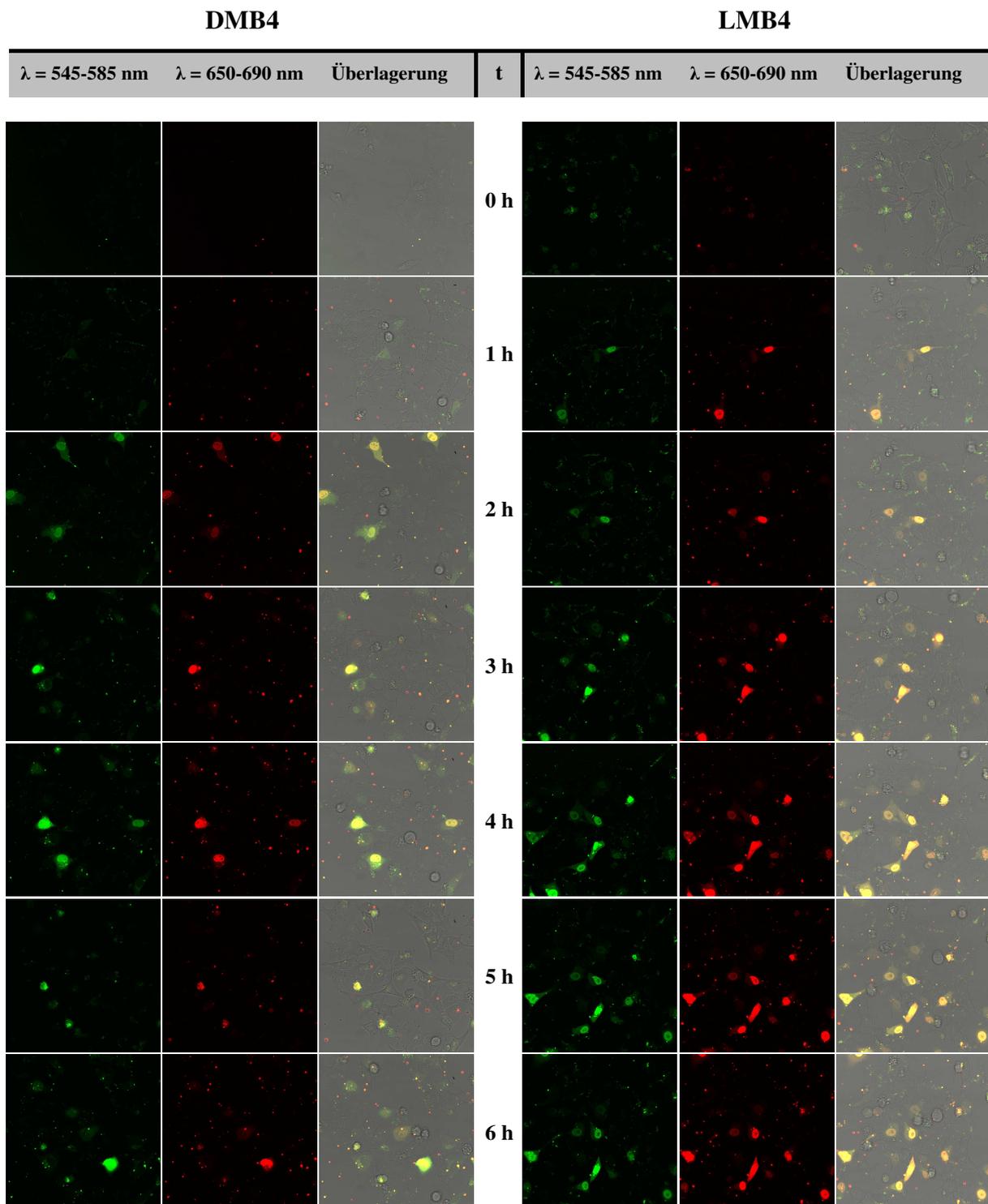


Abbildung 30: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der Zellexperimente mit DMB4 (links) und LMB4 (rechts).

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Teil der Arbeit wurde 2'-*O*-Propargyl-L-uridin (**L-cU**) erfolgreich aus L-Ribose synthetisiert und als Phosphoramidit **1** mittels automatisierter Festphasensynthese in *Molecular Beacons* mit L-DNA Konfiguration eingebaut. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden erfolgreich mit den Farbstoff-Aziden Cy3 und Cy5 doppelt modifiziert, wobei die Cy3-Modifikation noch auf der feste Phase erfolgte. Im Anschluss an die Synthese und Aufreinigung wurden **LMB1** – **LMB4** spektroskopisch charakterisiert. Hierbei zeigten **LMB1** und **LMB4** bei temperaturabhängigen Messungen die größte Abnahme des FRET-Intensitätsverhältnisses R_{FRET} . In weiteren spektroskopischen Untersuchungen wurde die Stabilität der L-konfigurierten *Molecular Beacons* nach mehreren Heiz- und Kühlzyklen sowie in Zelllysats nachgewiesen. Im Vergleich dazu zeigten D-konfigurierte *Molecular Beacons* eine rapide Abnahme des FRET in Zelllysats, was durch eine Öffnung der Oligonukleotide verursacht wird. Dies wurde in Zellexperimenten mittels Konfokalmikroskopie bestätigt. Bei **LMB1** und **LMB4** war über mehrere Stunden eine deutliche Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffes Cy5 erkennbar, wohingegen **DMB1** und **DMB4** bereits nach kurzer Zeit primär die Fluoreszenz des Donorfarbstoffes Cy3 zeigten. Des Weiteren wurden **LMB1** und **LMB4** bis in die Zellkerne transfiziert.

In weiteren Experimenten werden **LMB1** – **LMB4** nun von DR. WOLFGANG GREFFRATH in ihrer Funktion als potentielle intrazelluläre Thermometer untersucht. Die Verwendung einer *VAHEAT Dynamic Thermal Control* der Firma INTERHERENCE soll für mikroskopische Experimente eine exakte Temperatureinstellung ermöglichen. Dabei handelt es sich um ein System, bei dem eine Kontrolleinheit über Elektroden die Temperatur des Objektträgers reguliert.

Zur weiteren Optimierung der L-konfigurierten *Molecular Beacons* sollten die Sequenzen angepasst werden. Wie sich in den Schmelztemperaturen zeigte, führt der Austausch eines AT-Paares für ein GC-Paar zu einer größeren Stabilisierung der Stammregion als die Verlängerung um ein zusätzliches AT-Paar. Ausgehend von **LMB1** sollten durch den Austausch eines GC-Paares für ein AT-Paar oder die Verkürzung um ein AT-Paar Sequenzen mit Schmelztemperaturen im Bereich 35 – 40 °C erhalten werden, die damit innerhalb der optimalen „Arbeitstemperatur“ von Zellen liegen. Durch eine Spiegelung der **L-cU**-Position, um eine Anordnung wie bei den D-konfigurierten *Molecular Beacons* zu erhalten, oder eine Vergrößerung des Abstandes um eine Base (siehe Kap. 5.2) könnte die FRET-Effizienz verbessert werden.

4 FISH-SONDEN ZUR DETEKTION VON MIRNA IN HUMANEM DARMKREBSGEWEBE

Schätzungen zu Folge werden 90 % der Krebstode durch Metastasen verursacht.^[152] Aus diesem Grund ist ein besseres Verständnis der wichtigsten strukturellen und molekularen Akteure in der Regulierung dieses Prozesses von großem Interesse. Bösartige Tumore haben typischerweise einen klonalen Ursprung, d.h. sie gehen oftmals von wenigen mutierten Zellen aus.^[153] Daher ist es bedeutend, diese bösartigen Zellen von gutartigen unterscheiden und nachweisen zu können. Dafür ist die Entwicklung von Methoden erforderlich, die die Heterogenität des Kerngenoms in Gewebeschnitten in Angriff nehmen. Frühere *in vitro* Studien in fixierten Zelllinien zeigten, dass bestimmte microRNA (miRNA, miR) in Exosomen metastatischer Zellen im Vergleich zu nichtmetastatischen Zellen in deutlich höherer Anzahl vorkommen.^[154-155] Dies deutet darauf hin, dass diese miRNA als sog. metastatische Marker vorliegen. miRNA gehören zur Klasse der nicht-kodierenden RNA und besitzen eine durchschnittliche Länge von 22 Nukleotiden. Sie binden an die 3'-untranslatierte Region (UTR) ihres Ziels und unterdrücken die Translation der mRNA.^[156]

Aus diesem Grund fokussierte sich dieses Projekt der Arbeit auf die Synthese fluoreszenter Sonden zur Detektion von miRNA mittels Konfokal- sowie Einzelmolekülmikroskopie. Hierbei gehört die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zu den am weitesten verbreiteten Methoden. Für fünf verschiedene miRNA-Zielmoleküle wurden FISH-Sonden synthetisiert, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert wurden. Anschließend wurden die Sonden in normalen Darm- sowie Darmkrebs-Gewebeschnitten zur Detektion der miRNA eingesetzt und mikroskopisch untersucht. Für miR-21, -31, -135b und -210 wurde von einer pro-metastatischen und für miR-218 von einer anti-metastatischen Wirkung ausgegangen.

miR-21 5'-u-a-g-c-u-u-a-u-c-a-g-a-c-u-g-a-u-g-u-u-g-a-3'
miR-31 5'-a-g-g-c-a-a-g-a-u-g-c-u-g-g-c-a-u-a-g-c-u-3'
miR-135b 5'-u-a-u-g-g-c-u-u-u-u-c-a-u-u-c-c-u-a-u-g-u-g-a-3'
miR-210 5'-c-u-g-u-g-c-g-u-g-u-g-a-c-a-g-c-g-g-c-u-g-a-3'
miR-218 5'-u-u-g-u-g-c-u-u-g-a-u-c-u-a-a-c-c-a-u-g-u-3'

Abbildung 31: Sequenzen der fünf Ziel-miRNA, pro-metastatische Aktivität rot, anti-metastatische Aktivität grün.

4.1 Synthese der FISH-Sonden

Die FISH-Sonden wurden mittels Phosphoramidit-Festphasensynthese hergestellt. Neben den Sequenzen zur Detektion der fünf Ziel-miRNA wurden zusätzlich eine Negativkontrolle mit einer gemischten Sequenz sowie eine Positivkontrolle komplementär zu U6 snRNA synthetisiert. Bei U6-snRNA (engl. *small nuclear RNA*) handelt es sich um eine nicht kodierende RNA, welche im Zellkern lokalisiert ist. In allen synthetisierten Strängen wurde das zentralste Thymidin gegen 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**) ausgetauscht, um eine Modifikation mit Azid-Farbstoffen zu ermöglichen.

h-FISH-21	5'-T-C-A-A-C-A-T-C-A-G- cU -C-T-G-A-T-A-A-G-C-T-A-3'
h-FISH-31	5'-A-G-C-T-A-T-G-C-C-A-G-C-A- cU -C-T-T-G-C-C-T-3'
h-FISH-135b	5'-T-C-A-C-A-T-A-G-G-A-A- cU -G-A-A-A-A-G-C-C-A-T-A-3'
h-FISH-210	5'-T-C-A-G-C-C-G-C-T-G- cU -C-A-C-A-C-G-C-A-C-A-G-3'
h-FISH-218	5'-A-C-A-T-G-G-T-T-A-G-A- cU -C-A-A-G-C-A-C-A-A-3'
pos. Kon.	5'-C-A-C-G-A-A-T-T-T-G-C-G- cU -G-T-C-A-T-C-C-T-T-3'
neg. Kon.	5'-G-T-G-T-A-A-C-A-C-G- cU -C-T-A-T-A-C-G-C-C-C-A-3'

Abbildung 32: Sequenzen der **cU**-modifizierten Oligonukleotide zur Detektion von miRNA in humanen Darmgewebeschnitten.

In der 1. Generation der FISH-Sonden wurde Cy5-Azid für die Modifikation der synthetisierten Oligonukleotide gewählt. Bei Cy5 handelt es sich um einen Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff, der in der Konfokalmikroskopie etabliert und weit verbreitet ist. Nach den ersten erfolgreichen FISH-Experimenten und dem konzeptionellen Beweis des Projekts wurde eine 2. Generation der FISH-Sonden mit AF488-Azid modifiziert. AF488 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff mit besseren *Blinking*-Eigenschaften und höherer Photostabilität im Vergleich zu Cy5, wodurch er geeigneter für die Einzelmolekülmikroskopie ist.^[157] Die Farbstoff-Azide wurden postsynthetisch in einer CuAAC an die DNA-Stränge angebunden. Abschließend wurden die modifizierten Oligonukleotide über RP-HPLC aufgereinigt und Stränge ohne Farbstoff sowie überschüssiger Farbstoff entfernt.

4.2 Spektroskopische Untersuchungen

Nach erfolgreicher Synthese und Aufreinigung der FISH-Sonden wurden diese als Einzelstränge sowie als hybridisierte Doppelstränge mit ihren jeweiligen RNA-Gegensträngen spektroskopisch auf ihre optischen und physikalischen Eigenschaften untersucht.

4.2.1 Spektroskopie der Cy5-modifizierten FISH-Sonden

Im Vergleich der Einzelstränge zu den Doppelsträngen mit RNA sind bei allen **h-FISH**-Sonden in den Absorptionen nur geringe Abweichungen zu erkennen. Die Absorptionen zeigen den charakteristischen Verlauf des Cy5-Fluorophors mit ausgeprägter Schulter bei ca. 600 nm. Auffallend ist jedoch, dass in den Doppelsträngen eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums der Einzelstränge bei 647 nm um 3 – 4 nm auftritt. Für die Anregungswellenlänge bei der Aufnahme der Emissionen wurde, wie auch für die spätere Konfokalmikroskopie, $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$ gewählt. In den Emissionen ist im Vergleich der Einzel- und Doppelstränge jedoch ein deutlicher Unterschied zu erkennen. So zeigen alle **h-FISH**-Sonden bis auf **h-FISH-135b** einen leichten „*light down*“-Effekt und damit eine ungewünschte Abnahme der Fluoreszenz in den Doppelsträngen. Diese Abnahme könnte neben der Verschiebung des Absorptionsmaximums auch auf Wechselwirkungen des Cy5-Fluorophors in der Doppelhelix oder den Einfluss der Nachbarbasen zurückzuführen sein.

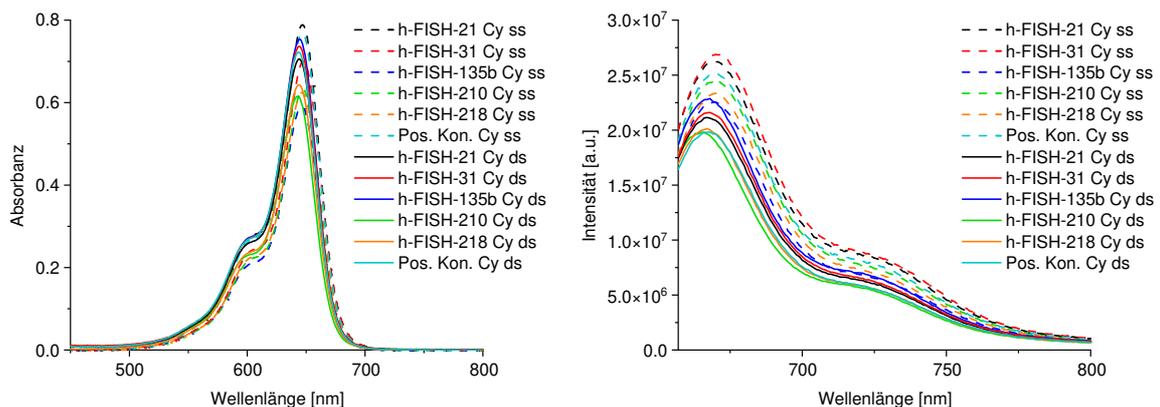


Abbildung 33: Absorption (links) und Emission (rechts) der Cy5-modifizierten FISH-Sonden im Einzel- sowie im Doppelstrang; $2.5 \mu\text{M}$ DNA, $2.5 \mu\text{M}$ RNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$, Spaltbreite 3/3 nm. Die Abbildung wurde zuvor publiziert. ^[158]

4.2.2 Spektroskopie der AF448-modifizierten FISH-Sonden

Wie bei den Cy5-modifizierten Strängen sind auch bei den AF488-modifizierten FISH-Sonden in den Absorptionen nur geringe Unterschiede zwischen den Einzel- und Doppelsträngen zu erkennen. Die Absorptionen zeigen ebenfalls die charakteristischen Banden des AF488-Fluorophors. Auffällig sind jedoch der Doppelstrang von **h-FISH-21**, der eine leicht höhere Absorption besitzt, sowie der Doppelstrang von **h-FISH-135b**, welcher eine bathochrome Verschiebung um 4 nm aufweist. Bei den Emissionsspektren wurde ebenfalls die Anregungswellenlänge für die spätere Mikroskopie $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ gewählt. Bis auf den Doppelstrang von **h-FISH-135b** zeigen alle FISH-Sonden einen „light up“-Effekt und damit eine Zunahme der Fluoreszenz. Der **h-FISH-135b**-Doppelstrang weist hingegen eine Abnahme der Fluoreszenz auf. Diese könnte auf die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums zurückzuführen sein, während die Wechselwirkungen des AF488-Fluorophors in der Doppelhelix die Zunahme der Fluoreszenz bei den anderen FISH-Sonden begünstigen.

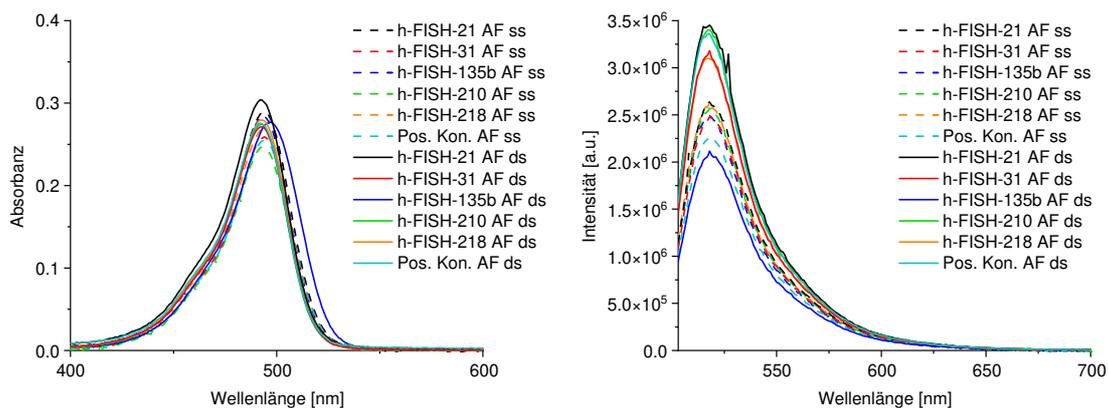


Abbildung 34: Absorption (links) und Emission (rechts) der AF488-modifizierten FISH-Sonden im Einzel- sowie im Doppelstrang; 2.5 μM DNA, 2.5 μM RNA, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, Spaltbreite 3/3 nm. Die Abbildung wurde zuvor publiziert.^[158]

4.2.3 Messung und Vergleich der Schmelztemperaturen

Zusätzlich wurden die Schmelztemperaturen der Doppelstränge bestimmt, um die optimalen Hybridisierungstemperaturen für die FISH-Experimente zu ermitteln, aber auch den Einfluss des Farbstoffes zu untersuchen (Tab. 2). Es zeigt sich, dass die Schmelztemperatur deutlich mit dem Anteil an GC-Paaren korreliert. So besitzt **h-FISH-135b** mit 23 Nukleotiden zwar die längste Sequenz, liegt jedoch zusammen mit **h-FISH-21** nur im unteren Bereich der Schmelztemperaturen. Dagegen verfügen **h-FISH-31** und **h-FISH-210** mit einem GC-Anteil $>50 \%$ über die höchsten Schmelztemperaturen. Zudem zeigt sich, dass der Einfluss der

Farbstoffe auf die Schmelztemperaturen nur gering ist. Bis auf Abweichungen bei **h-FISH-21** und **h-FISH-135b** um 2 – 4 °C sind die Schmelztemperaturen bei beiden Farbstoffmodifikationen vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass die Farbstoffe nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität der Doppelhelices haben.

Tabelle 2: Schmelztemperaturen der Cy5- und AF488-modifizierten **h-FISH**-Sonden mit der jeweiligen miRNA.

FISH-Sonde	T_m [°C] Cy5	T_m [°C] AF488
h-FISH-21	60	56
h-FISH-31	74	74
h-FISH-135b	57	59
h-FISH-210	77	78
h-FISH-218	60	61
Pos. Kon.	68	67

4.3 FISH-Experimente

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden von DR. MARÍA CONTRERAS aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. CHRISTOPH CREMER am Institut für Molekulare Biologie (IMB) in Mainz durchgeführt. Hierfür wurden menschliche Darmgewebeschnitte aus normalem sowie Krebsgewebe mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Im Anschluss wurde das eingebettete Gewebe in 10 µm große Sektionen geschnitten und mit einem der Sondenstränge sowie SYTOX™ Orange inkubiert. SYTOX™ Orange dient hierbei zur Anfärbung der Zellkerne im Gewebe. Um überschüssige Marker zu entfernen, wurden die Sektionen abschließend gewaschen. Die Visualisierung der fluoreszenten Sonden sowie der Kernfärbung erfolgte mittels Laser-Scanning-Mikroskopie. Als Anregungswellenlängen wurden $\lambda_{exc} = 647$ nm für Cy5 sowie $\lambda_{exc} = 488$ nm für SYTOX™ Orange verwendet. Die Einzelmolekülmikroskopie wurde ohne SYTOX™ Orange Kernfärbung durchgeführt. Als Anregungswellenlängen wurde $\lambda_{exc} = 488$ nm für AF488 verwendet.

4.3.1 Konfokalmikroskopie

Zur Optimierung der Hybridisierungsmethode und der Waschschrte wurden Kontrollexperimente durchgeführt (Abb. 35). In der Negativkontrolle ist hierbei keine Fluoreszenz des Cy5 zu erkennen, was auf erfolgreiche Waschschrte und dem vollständigen Entfernen ungebundener Sonden hinweist. Dagegen zeigt die Positivkontrolle gegen

U6 snRNA eine deutliche Fluoreszenz, die im Wesentlichen mit der *SYTOX™ Orange* Kernfärbung übereinstimmt und somit auf eine erfolgreiche Hybridisierung mit den Zielmolekülen hindeutet.

Kontrollexperimente

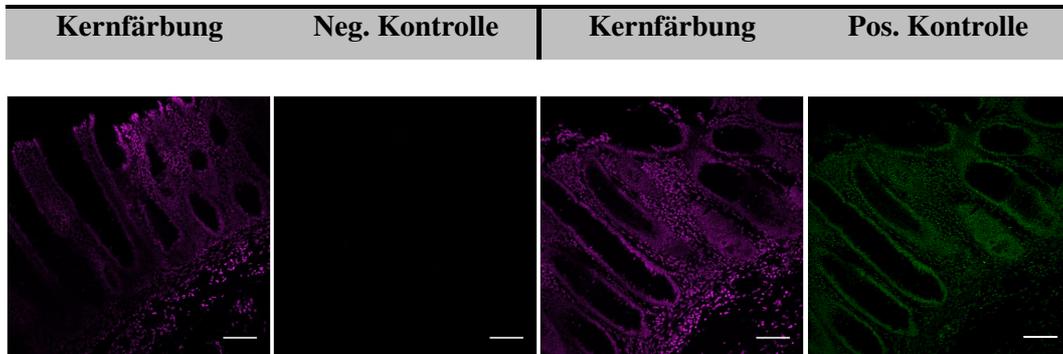


Abbildung 35: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der Kontrollexperimente in humanem Darmgewebe; *SYTOX™ Orange* lila, Cy5 grün; Maßstab: 100 µm. Die Abbildung wurde zuvor publiziert.^[158]

Mit den synthetisierten Sonden wurden daraufhin FISH-Experimente mit normalem sowie Tumorgewebe durchgeführt. In Abbildung 36 sind exemplarisch ausgewählte Aufnahmen aus den FISH-Experimenten dargestellt. Für **h-FISH-21**, **-31** und **-135b** ist in den Aufnahmen des normalen Darmgewebes nahezu keine Fluoreszenz sichtbar, während in den Aufnahmen des Tumorgewebes eine deutliche Fluoreszenz der Sonden sichtbar ist. Bei **h-FISH-210** ist im normalen Darmgewebe bereits eine leichte Fluoreszenz zu erkennen, die in der Aufnahme des Tumorgewebes jedoch stärker auftritt. Dies bestätigt für miR-21, -31, -135b und -210 die pro-metastatische Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigt **h-FISH-218** im normalen Darmgewebe eine deutlich stärkere Fluoreszenz im Vergleich zum Tumorgewebe, wodurch ebenfalls die anti-metastatische Aktivität bestätigt wird.

In Abbildung 37 sind vergrößerte Aufnahmen aus den Schnitten des Tumorgewebes dargestellt. Im Vergleich zur *SYTOX™ Orange*-Kernfärbung ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz der verschiedenen FISH-Sonden nicht in allen Zellen innerhalb des Gewebes auftritt. Während die Fluoreszenzsignale von **h-FISH-135b** eher verteilt vorliegen, treten bei den anderen miRNA mit pro-metastatischer Aktivität von den Sonden **h-FISH-21**, **-31** und **-210** kleinere Akkumulationen der Fluoreszenzsignale auf. Des Weiteren zeigt sich auch hier eine deutlich geringere Fluoreszenz der Sonde **h-FISH-218** für die anti-metastatische miR-218. Bei allen FISH-Sonden ist jedoch auffällig, dass die Fluoreszenzsignale um den Zellkern herum auftreten.

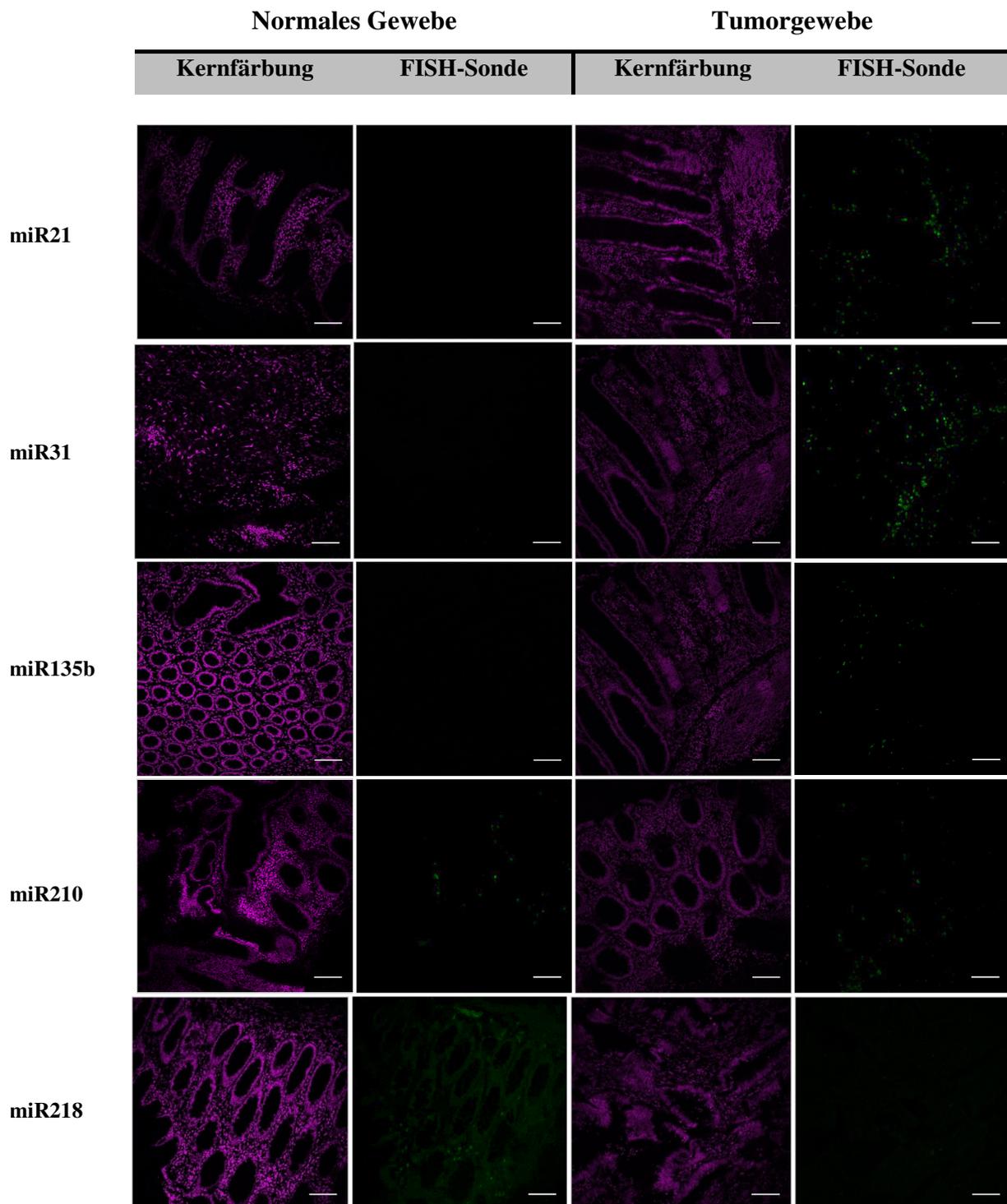


Abbildung 36: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der FISH-Sonden in normalem Darm- sowie Darmkrebsgewebe; SYTOX™ Orange lila, Cy5 grün; Maßstab: 100 µm. Die Abbildung wurde zuvor publiziert.^[158]

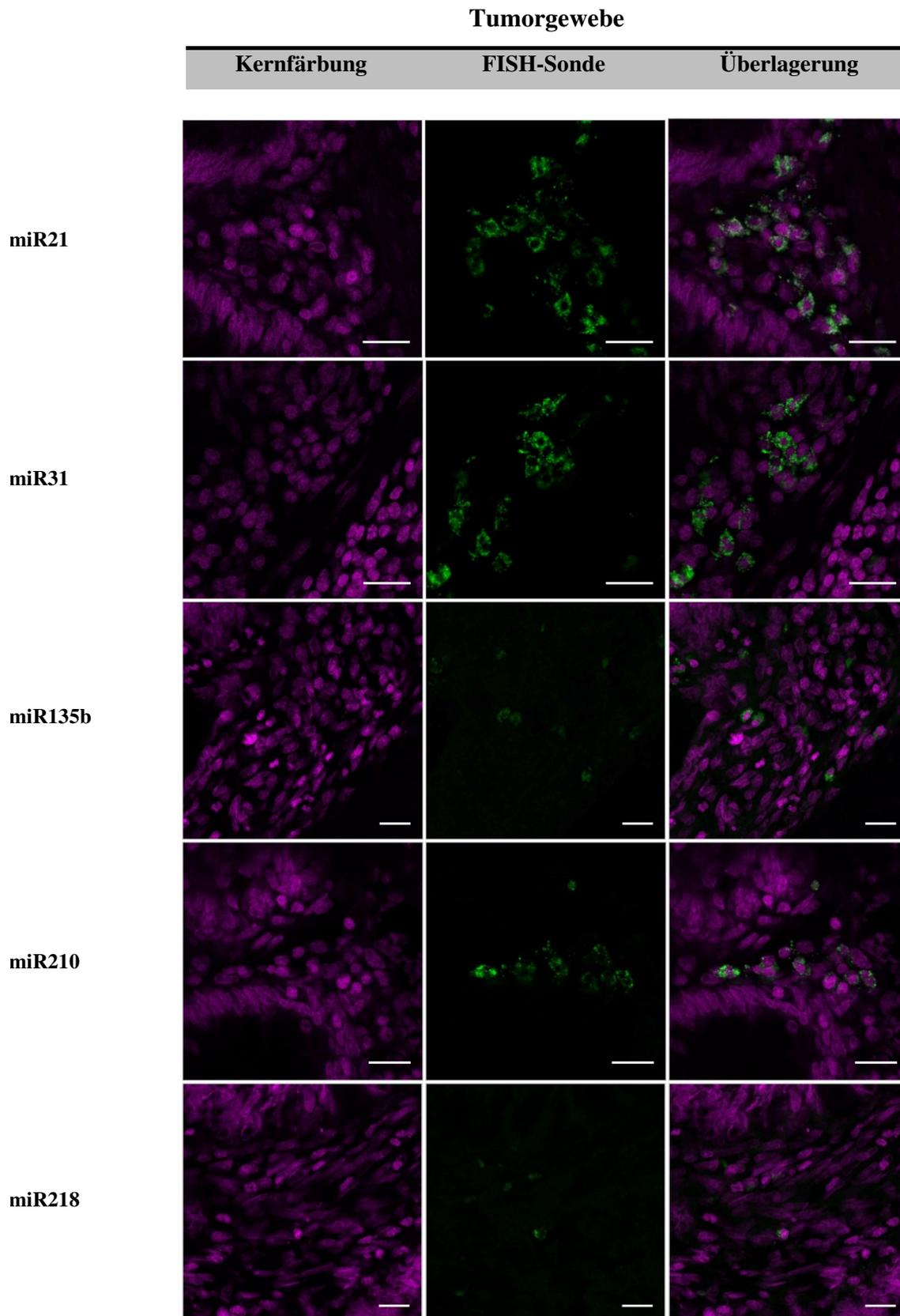


Abbildung 37: Vergrößerte Aufnahmen der FISH-Sonden in Darmkrebsgewebe; SYTOX™ Orange lila, Cy5 grün; Maßstab: 20 µm. Die Abbildung wurde zuvor publiziert.^[158]

4.3.2 Quantifizierung der FISH-Experimente

Anschließend wurden mit den erhaltenen Ergebnissen aus der Konfokalmikroskopie zusätzlich Berechnungen zur Quantifizierung von Zellen mit Fluoreszenzsignal der FISH-Sonden durchgeführt (Abb. 38). Hierzu wurde zunächst eine repräsentative Aufnahme ausgewählt (A). Anschließend wurden darin die Zellkerne identifiziert sowie markiert (B) und dazu die zytoplasmatischen Regionen definiert (C). Im nächsten Schritt wurden die Intensitäten der miRNA-Signale berechnet und die Zellkerne hervorgehoben, deren Signale einen definierten Schwellenwert übersteigen (D). Abschließend wurde daraus der Prozentsatz der Zellen mit miRNA-Signal in Bezug auf die Gesamtzellzahl in der Aufnahme berechnet.

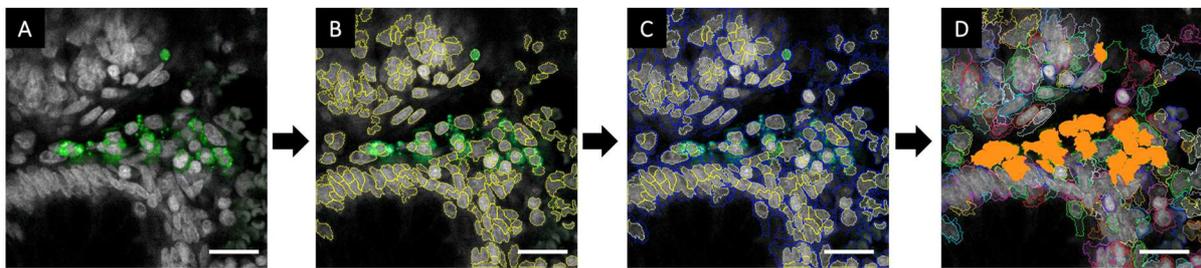


Abbildung 38: A: Ausgewählte repräsentative Aufnahme; B: Identifizierung und Markierung der Zellkerne (gelb); C: Definition der zytoplasmatischen Regionen (blau); D: Hervorheben der Zellkerne mit positivem miRNA-Signal. Die Abbildung wurde zuvor publiziert.^[158]

In Abbildung 39 sind je drei berechnete Prozentsätze der Zellen mit positivem miRNA-Signal in normalem (N) und in Tumorgewebe (T) grafisch dargestellt. Die Berechnungen zeigen einen deutlichen Anstieg positiver Zellen für miR-31 und -135b mit rund 10 %. Für miR-21 und -210 fällt diese Zunahme mit ca. 4 – 5 % geringer aus. Dagegen weist miR-210 bereits in normalem Darmgewebe positive Signale der FISH-Sonden auf, während die Werte der anderen pro-metastatischen miRNA bei ungefähr null liegen. Für die anti-metastatische miR-218 sind in normalem Darmgewebe, wie zu erwarten, mehr positive Zellen gefunden worden. Im Tumorgewebe verringert sich im Mittel der Wert der positiven Zellen mit Signal der FISH-Sonden. Jedoch zeigen die Berechnungen sowohl in normalem Gewebe als auch in Tumorgewebe einen relativ großen Fehler auf. Zur Verifikation der Ergebnisse sind daher weitere Experimente von Gewebeproben unterschiedlicher Patienten notwendig. Dennoch geben die erhaltenen Resultate erste Hinweise darauf, dass das Expressionsmuster dieser miRNA für die Früherkennung metastasierender Zellen genutzt werden könnte.

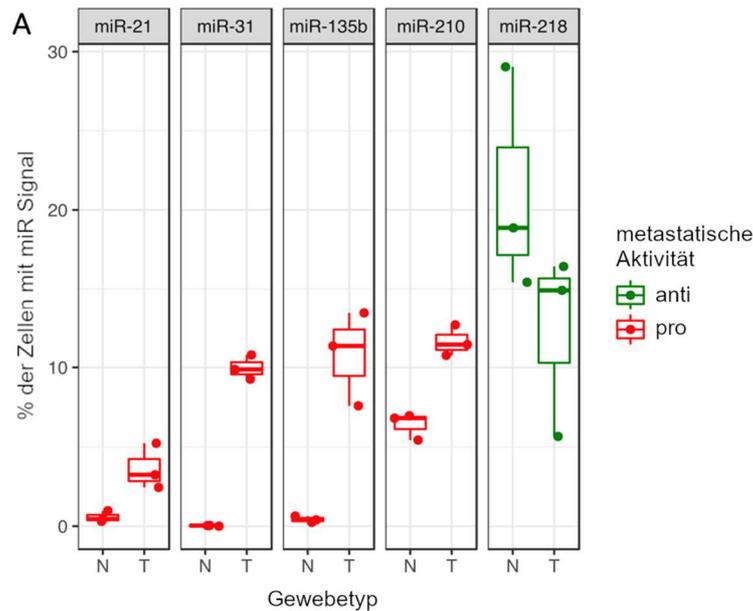


Abbildung 39: Grafische Darstellung der berechneten Ergebnisse der Zellen mit positivem FISH-Sonden-Signal; N: normales Gewebe, T: Tumorgewebe. Die Abbildung wurde zuvor publiziert.^[158]

4.3.3 Einzelmolekülmikroskopie

Nach den erfolgreichen miRNA-Detektionen in der Konfokalmikroskopie wurden mit den AF488-modifizierten FISH-Sonden erstmalig Experimente in der Einzelmolekülmikroskopie mit Tumorgewebeschnitten eines regulären Krebspatienten durchgeführt (Abb. 40). Erste erfolgreiche Ergebnisse konnten bei der Detektion von miR-21 erhalten werden. Eine Akkumulation der Fluoreszenzsignale zeigte sich am Rand des Zellkerns, aber auch darin. Des Weiteren sind runde, vesikelartige Strukturen außerhalb des Zellkerns erkennbar. In neueren Studien gibt es Hinweise darauf, dass verschiedene miRNA sich im Zellkern befinden und dort für andere Biomoleküle als Lokalisierungssignale agieren, mit denen diese Aufnahmen in Einklang stehen würden.^[159]

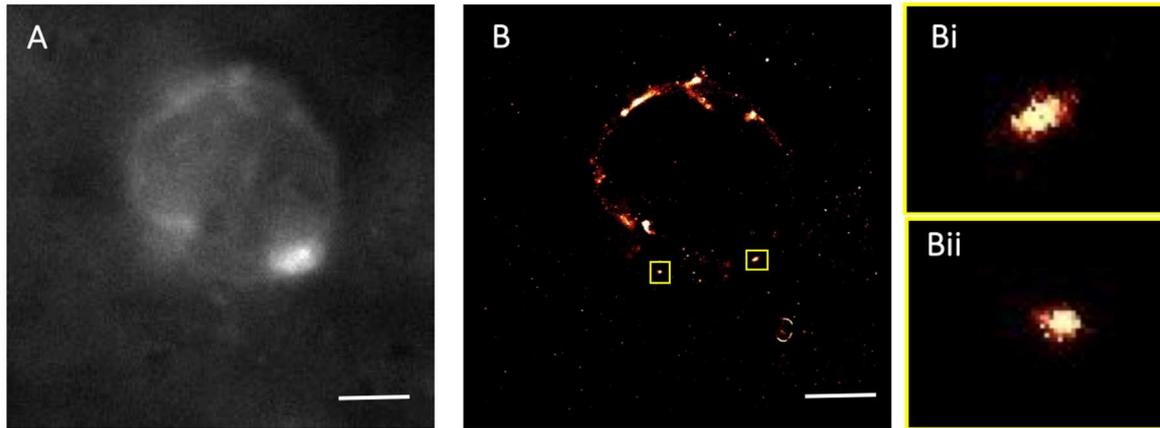


Abbildung 40: A: Herkömmliche Weitfeldmikroskopie-Aufnahme eines Zellkerns in Tumorgewebezelle; B: Rekonstruierte Einzelmolekülmikroskopie-Aufnahme mittels *Single molecule localization microscopy* (SMLM); Bi/ii: Vergrößerung zweier vesikelartiger Strukturen; Maßstab: 3 μm . Die Abbildung wurde zuvor publiziert.^[158]

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden erfolgreich fluoreszente Sonden zur Detektion ausgewählter miRNA synthetisiert, mit denen erstmals FISH-Experimente in normalem Darm- sowie Darmkrebsgewebe durchgeführt werden konnte.

Hierfür wurden cU-modifizierte Oligonukleotide komplementär zu verschiedenen Ziel-miRNA miR-21, -31, -135b, -210 und -218 synthetisiert und postsynthetisch mit Farbstoff-Aziden kovalent mittels CuAAC verknüpft. Die FISH-Sonden wurden anschließend spektroskopisch untersucht und in Mikroskopie-Experimenten in Schnitten von Patientengewebe eingesetzt. Hierbei konnte mit Konfokalmikroskopie-Aufnahmen die Quantifizierung der Ziel-miRNA in normalem sowie Tumorgewebe und Verifizierung der metastatischen Aktivität durchgeführt werden. In Einzelmolekülmikroskopie-Aufnahmen gelang die Visualisierung der Akkumulation von miR-21 um den Zellkern, wobei erstmals Tumorgewebe eines regulären Krebspatienten verwendet wurde.

In biologischer und medizinischer Hinsicht sollten weitere FISH-Experimente in Gewebeschnitten verschiedener Patienten durchgeführt werden. Mit einer größeren Datenmenge kann eine Optimierung der Quantifizierung sowie eine Reduktion des statistischen Fehlers erfolgen. Zusätzlich sollten weitere Einzelmolekülmikroskopie-Aufnahmen mit den anderen FISH-Sonden durchgeführt werden, um einen besseren Einblick in die Lokalisation der miRNA in Zellen zu erhalten.

5 FISH-SONDEN ZUR DETEKTION VON miRNA UND mRNA IN ZEBRAFISCH GEHIRNSCHNITTEN

Dem Zebrafisch (*Danio rerio*) wurde bei der Erforschung der Neurogenese in den vergangenen Jahren eine immer wichtigere Rolle zuteil.^[160] So weist das Gehirn eines adulten Zebrafisches die bemerkenswerte Fähigkeit auf, eine Vielzahl von Neuronen neu bilden zu können.^[161] Dadurch ist der Zebrafisch in der Lage, Verletzungen des zentralen Nervensystems zu regenerieren. Diese Regeneration wird durch verschiedene Mechanismen und Moleküle wie Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren, Gene oder auch nicht-kodierende RNA beeinflusst.^[162] Die Aufklärung der beteiligten Mechanismen könnte entscheidende Hinweise im Kampf gegen neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson liefern, welche ein immer größer werdendes Problem in unserer Gesellschaft darstellen. Ein wichtiger Faktor bei der Regeneration sind Stammzellen, die in Stammzellnischen lokalisiert sind und von dort aus in das Zielgewebe emigrieren können, wo sie zu Neuronen reifen und verloren gegangene ersetzen. Im Zebrafisch befindet sich eine wichtige Stammzellnische in der ventrikulären Zone des Telencephalons.^[163]

Dieser Teil der Arbeit fokussierte sich auf die Detektion und Visualisierung ausgewählter miRNA sowie der mRNA *prdm12b*, die in diesen Regenerationsprozessen eine Rolle spielen. Hierzu wurden verschiedene fluoreszente Sonden für diese Zielmoleküle synthetisiert und anschließend von LUISA LÜBKE aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. UWE STRÄHLE / DR. SEPAND RASTEGAR in FISH-Experimenten in Schnitten des Telencephalons als Fluoreszenzmarker eingesetzt.

5.1 FISH-Sonden zur Detektion von miRNA

In früheren Studien konnte die Arbeitsgruppe STRÄHLE verschiedene Gene identifizieren, die an neurogenen Prozessen beteiligt sind.^[162] Ausgehend davon wurden verschiedene miRNA identifiziert, die als negative Regulatoren auf die Genexpression wirken. Es wurden sieben Kandidaten ausgewählt, die in diesem Projekt mittels FISH untersucht werden sollten: miR-9, -31, -96, -146a, -182, -183 und -726 (Abb 41). Diese zeichnen sich durch eine erhöhte Expression nach Verletzung des Zebrafisch-Gehirnes aus.^[164]

miR-9	5'-u-c-u-u-u-g-g-u-u-a-u-c-u-a-g-c-u-g-u-a-u-g-a-3'
miR-31	5'-u-g-g-c-a-a-g-a-u-g-u-u-g-g-c-a-u-a-g-c-u-g-3'
miR-96	5'-u-u-u-g-g-c-a-c-u-a-g-c-a-c-a-u-u-u-u-u-g-c-u-3'
miR-146a	5'-u-g-a-g-a-a-c-u-g-a-a-u-u-c-c-a-u-a-g-a-u-g-g-3'
miR-182	5'-u-u-u-g-g-c-a-a-u-g-g-u-a-g-a-a-c-u-c-a-c-a-3'
miR-183	5'-u-a-u-g-g-c-a-c-u-g-g-u-a-g-a-a-u-u-c-a-c-u-g-3'
miR-726	5'-u-u-c-a-c-u-a-c-u-a-g-c-a-g-a-a-c-u-c-g-g-3'

Abbildung 41: Sequenzen der sieben ausgewählten Ziel-miRNA.

5.1.1 Synthese der FISH-Sonden

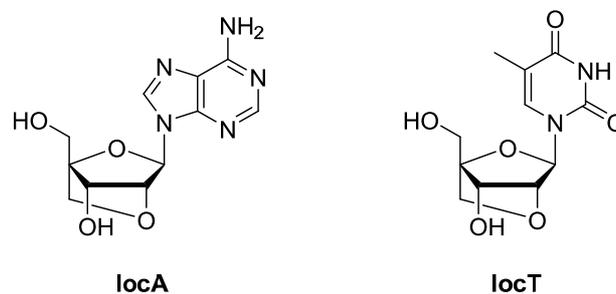
Das Design der 1. Generation FISH-Sonden folgte dem erfolgreichen Konzept aus Kapitel 4. Die Synthese der Sonden wurde mithilfe der Phosphoramidit-Festphasensynthese durchgeführt. Es wurden sieben Sequenzen komplementär zu den verschiedenen Ziel-miRNA synthetisiert, wobei jeweils das zentralste Thymidin mit **cU** für die anschließende CuAAC mit Cy5-Azid ausgetauscht wurde (Abb. 42).

f-FISH-9	5'-T-C-A-T-A-C-A-G-C- cU -A-G-A-T-A-A-C-C-A-A-A-G-A-3'
f-FISH-31	5'-C-A-G-C-T-A- cU -G-C-C-A-A-C-A-T-C-T-T-G-C-C-A-3'
f-FISH-96	5'-A-G-C-A-A-A-A-A-T-G- cU -G-C-T-A-G-T-G-C-C-A-A-A-3'
f-FISH-146a	5'-C-C-A-T-C-T-A-T-G-G-A-A- cU -T-C-A-G-T-T-C-T-C-A-3'
f-FISH-182	5'-T-G-T-G-C-G-T-T-A- cU -A-C-C-A-T-T-G-C-C-A-A-A-3'
f-FISH-183	5'-C-A-G-T-G-A-A-T-T-C- cU -A-C-C-A-G-T-G-C-C-A-T-A-3'
f-FISH-726	5'-C-C-G-A-G-T-T-C-T-G-C- cU -A-G-T-A-G-T-G-A-A-3'

Abbildung 42: Sequenzen der **cU**-modifizierten **f-FISH**-Sonden zur Detektion von miRNA in Zebrafisch-Gehirnschnitten.

In den ersten FISH-Experimenten konnten jedoch keine spezifischen Signale der FISH-Sonden erhalten werden (Kap. 5.1.3). Neben der Optimierung des FISH-Protokolls wurde daher zusätzlich eine 2. Generation der FISH-Sonden synthetisiert. Um eine Verbesserung der Hybridisierung zu erreichen, wurden LNA-Nukleoside (engl. *locked nucleic acid*) in die Sequenzen eingebaut. Bei LNA-Nukleosiden handelt es sich um modifizierte RNA-Nukleoside,

in denen der 2'-Sauerstoff und der 4'-Kohlenstoff miteinander verbrückt sind. Durch diese Verknüpfung wird die Zuckereinheit in die C3'-endo-Konformation „gesperrt“ (engl. *locked*).^[165] Mithilfe des QIAGEN GENEGLOBE T_M Calculator wurde ermittelt, dass durch den Einbau von vier LNA-Nukleosiden die Schmelztemperaturen der FISH-Sonden, hybridisiert mit ihrer jeweiligen Ziel-miRNA, um rund 15 – 20 °C erhöht werden sollten.^[166] Aus diesem Grund wurden einige der „schwachen“ Basen dA und T mit loc-Adenosin (locA) und loc-Thymidin (locT) ausgetauscht, wobei die vier LNA-Nukleoside möglichst gleichmäßig innerhalb der Sequenzen verteilt wurden. Zusätzlich wurden die FISH-Sonden postsynthetisch mit *Atto647N*-Azid anstatt *Cy5*-Azid modifiziert. *Atto647N* ist ein Fluorophor der Firma ATTO-TEC mit einer besseren Photostabilität und hoher Quantenausbeute.^[167]



I-FISH-9	5'-T-C-A-T- A -C-A-G-C- cU - A -G-A-T-A- A -C-C-A-A- A -G-A-3'
I-FISH-31	5'-C- A -G-C-T- A - cU -G-C-C- A -A-C-A-T-C- T -T-G-C-C-A-3'
I-FISH-96	5'-A-G-C- A -A-A-A- A -T-G- cU -G-C-T- A -G-T-G-C-C- A -A-A-3'
I-FISH-146	5'-C-C- A -T-C-T- A -T-G-G-A- A - cU -T-C-A-G- T -T-C-T-C-A-3'
I-FISH-182	5'-T-G- T -G-C-G-T-T- A - cU -A-C-C- A -T-T-G-C-C- A -A-A-3'
I-FISH-183	5'-C- A -G-T-G-A-A- T -T-C- cU -A-C-C- A -G-T-G-C-C- A -T-A-3'
I-FISH-726	5'-C-C-G- A -G-T-T-C- T -G-C- cU -A-G- T -A-G-T-G- A -A-3'

Abbildung 43: Strukturen von loc-Adenosin sowie loc-Thymidin (oben) und Sequenzen der LNA-modifizierten **I-FISH**-Sonden (unten), blau: LNA-Nukleoside.

5.1.2 Spektroskopische Untersuchungen

Die Absorptionen der **f-FISH**-Sonden-Einzelstränge zeigen die charakteristischen Banden des *Cy5*-Fluorophors mit einer Schulter bei ca. 600 nm und dem Maximum bei 647 nm. Bei den Absorptionen der Doppelstränge mit der jeweiligen Ziel-miRNA ist für alle **f-FISH**-Sonden eine leichte Erhöhung des Maximums zu erkennen. Wie bereits in den spektroskopischen Untersuchungen der **h-FISH**-Sonden in Kapitel 4.2.1 weisen die Doppelstränge eine

hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von Cy5 um 3 – 4 nm auf. Als Anregungswellenlänge für die Messung der Emission wurde ebenfalls $\lambda_{exc} = 647$ nm gewählt. Die **f-FISH**-Sonden weisen, wie auch die **h-FISH**-Sonden, als Doppelstränge mit der Ziel-miRNA in der Emission einen unerwünschten „light down“-Effekt und damit eine Verringerung der Fluoreszenz auf. So nimmt für **f-FISH-31** und **f-FISH-96** die Emission um rund ein Drittel ab, für **f-FISH-726** verringert sich diese sogar um rund 40 % (Abb. 44).

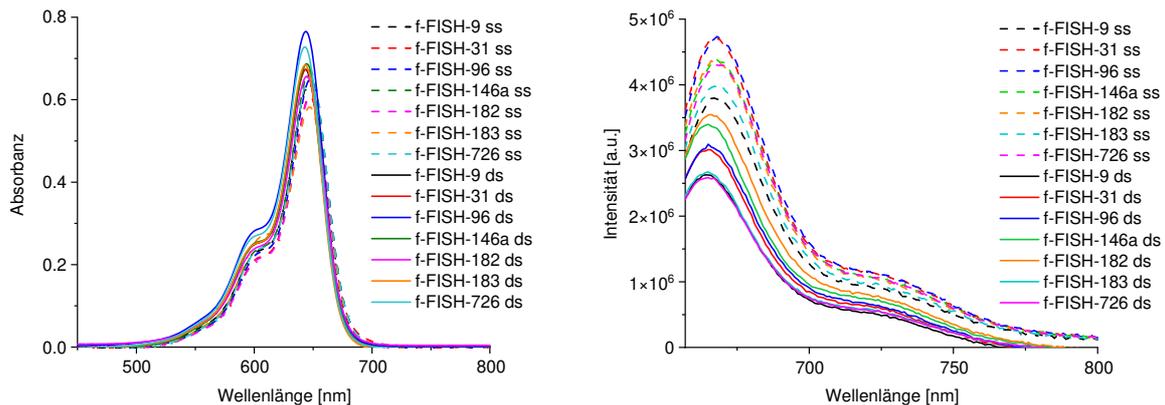


Abbildung 44: Absorption (links) und Emission (rechts) der **f-FISH**-Sonden; 2.5 μ M Sonde, 2.5 μ M RNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{exc} = 647$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Bei den LNA-modifizierten **I-FISH**-Sonden sind ebenfalls die charakteristischen Banden der Absorption des *Atto647N* mit einer Schulter bei ca 600 nm und dem Maximum bei 647 nm zu erkennen. Auffallend ist die Absorption der Einzelstränge von **I-FISH-9** und **I-FISH-726**. Diese zeigen eine Verringerung des Maximums bei 647 nm und die Erhöhung der Absorption bei 603 nm, die speziell bei **I-FISH-726** stark ausgeprägt ist. Diese Veränderung der Absorption tritt in den Doppelsträngen jedoch nicht auf und könnte daher auf die Ausbildung eines H-Aggregates des *Atto647N* im Einzelstrang zurückzuführen sein, das jedoch im Doppelstrang aufgebrochen wird. Die Absorption der Doppelstränge unterscheidet sich kaum zwischen den verschiedenen **I-FISH**-Sonden. Für die Messung der Emission wurde als Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 647$ nm gewählt. Die Emissionen der **I-FISH**-Sonden zeigen im Vergleich der Einzel- und Doppelstränge keinen solchen Effekt. Einzige Ausnahme stellt wie zu erwarten **I-FISH-726** dar. Durch die Veränderung der Absorptionsmaxima im Einzelstrang, ist auch die Emission im Vergleich zu den anderen **I-FISH**-Sonden um rund ein Drittel niedriger. Im Doppelstrang befindet sich die Emission von **I-FISH-726** jedoch auf dem gleichen Niveau der anderen **I-FISH**-Sonden und zeigt damit einen „light up“-Effekt (Abb. 45).

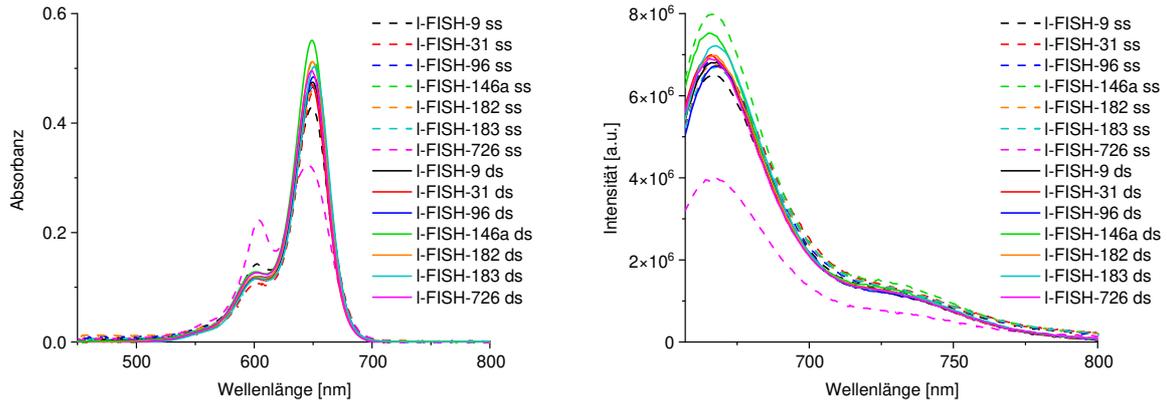


Abbildung 45: Absorption (links) und Emission (rechts) der **I-FISH**-Sonden; 2.5 μM Sonde, 2.5 μM RNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc}} = 647$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Zusätzlich wurden die Schmelztemperaturen der **f-FISH**- und **I-FISH**-Doppelstränge ermittelt, um die optimalen Hybridisierungstemperaturen für die FISH-Experimente zu identifizieren (Tab. 3). Hierbei zeigte sich die gewünschte Erhöhung der Schmelztemperaturen und es wurde bestätigt, dass der Einbau der LNA-Nukleoside zur Stabilisierung der DNA-RNA-Doppelhelices führt. Mit rund 10 – 16 $^\circ\text{C}$ ist der Temperaturanstieg zwar etwas geringer als ursprünglich mit ca. 15 – 20 $^\circ\text{C}$ berechnet wurde, jedoch handelte es sich dabei nur um einen theoretischen Wert.

Tabelle 3: Ermittelte Schmelztemperaturen der **f-FISH**- (links) und **I-FISH**-Sonden (rechts) mit der jeweiligen Ziel-miRNA.

Sonde	T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔT_m [$^\circ\text{C}$]	T_m [$^\circ\text{C}$]	Sonde
f-FISH-9	57	+ 11	68	I-FISH-9
f-FISH-31	70	+ 14	84	I-FISH-31
f-FISH-96	62	+ 12	74	I-FISH-96
f-FISH-146a	62	+ 12	74	I-FISH-146a
f-FISH-182	53	+ 11	64	I-FISH-182
f-FISH-183	68	+ 10	78	I-FISH-183
f-FISH-726	64	+ 16	80	I-FISH-726

5.1.3 FISH-Experimente

Im Anschluss an die optische Charakterisierung wurden jeweils mit beiden Generationen der FISH-Sonden mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. In Abbildung 46 sind auf der linken Seite die Aufnahmen der **f-FISH**-Sonden und auf der rechten Seite die Aufnahmen der **I-FISH**-Sonden dargestellt. Als Vergleich dienen ISH-Experimente der Arbeitsgruppe STRÄHLE, die in der Mitte abgebildet sind und von LUISA LÜBKE zur Verfügung gestellt wurden. Für miR-9 handelt es sich dabei um eine ISH der reifen miRNA, während es sich bei den anderen miRNA um ISH-Experimente von noch ungeschnittener pri-miRNA handelt.

Bei allen **f-FISH**-Sonden ist in den Aufnahmen der FISH-Experimente jeweils nur unspezifische Fluoreszenz sichtbar. Es zeigen sich keine Übereinstimmungen mit den ISH-Experimenten, weshalb nicht von einer erfolgreichen Detektion der jeweiligen miRNA ausgegangen werden kann. Dagegen sind bei den **I-FISH**-Sonden spezifischere Fluoreszenzsignale erkennbar. Bei **I-FISH-9** ist eine höhere Fluoreszenz in der ventrikulären Zone zu erkennen, die mit der ISH übereinstimmt, was auf eine erfolgreiche Detektion von miR-9 schließen lässt. Zusätzlich ist ein Fluoreszenzsignal im oberen Bereich des Hirnschnitts sichtbar, wo auch die ISH eine leichte Blaufärbung zeigt. Die starke Fluoreszenz am unteren Rand ist auf Hintergrundrauschen zurückzuführen. Im Vergleich dazu zeigt **I-FISH-31** keine Fluoreszenz in der ventrikulären Zone, obwohl bei der ISH an dieser Stelle die deutlichste Blaufärbung zu erkennen ist. Dagegen weist diese FISH-Sonde eine schwache Fluoreszenz im oberen und äußeren Bereich des Gehirnschnittes auf, was auf eine Detektion von miR-31 hinweisen könnte, da auch die ISH dort eine schwache Blaufärbung zeigt. **I-FISH-96** zeigt von allen FISH-Sonden im Vergleich zur ISH das beste Ergebnis. So ist ein klar abgrenzbares Fluoreszenzsignal in der ventrikulären Zone sichtbar, das mit der ISH übereinstimmt. Zusätzlich zeigt sich am Rand der rechten Hemisphäre eine Fluoreszenz, wo auch die ISH in beiden Hemisphären eine Blaufärbung aufweist. Die Fluoreszenzsignale von **I-FISH-146a** sind leider nur unspezifisch. Auch von **I-FISH-182** deuten die Fluoreszenzsignale ebenfalls nicht auf eine vollständig erfolgreiche Detektion hin. Es zeigt sich zwar eine leicht erhöhte Emission im Randbereich des Hirnschnittes, welche mit der ISH-Färbung übereinstimmt, jedoch gibt es keinerlei erhöhte Fluoreszenz in der ventrikulären Zone. Bei **I-FISH-183** ist eine schwache Fluoreszenz in der ventrikulären Zone zu erkennen, die bis zum unteren Rand verläuft und der ISH entspricht, was auf eine erfolgreiche Detektion der miR-183 hindeutet. **I-FISH-726** zeigt primär Fluoreszenzsignale in der ventrikulären Zone, die ähnlich breit verlaufen wie die Blaufärbung der ISH und somit für eine erfolgreiche Detektion sprechen. Dagegen fehlen jedoch Fluoreszenzsignale im Randbereich des Hirnschnittes.

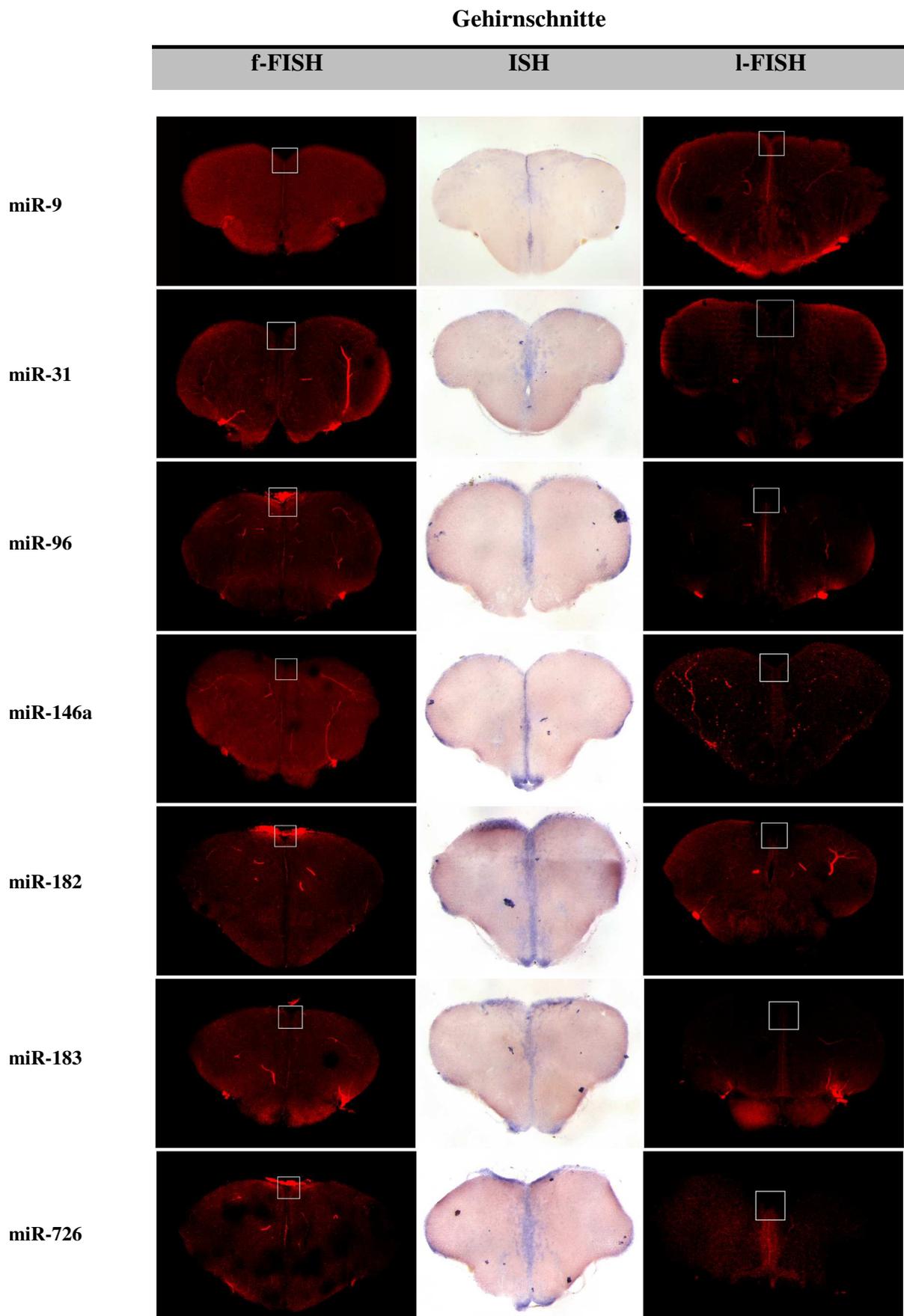


Abbildung 46: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der FISH-Experimente mit den **f-FISH**- (links) und **I-FISH**-Sonden (rechts) in Zebrafisch-Gehirnschnitten; Mitte: ISH als Vergleich.

Die ersten FISH-Experimente zeigten bei den **I-FISH**-Sonden bereits vielversprechende Ergebnisse. Deswegen wurden zusätzlich FISH-Experimente mit Hirnschnitten fünf Tage nach einer Stichverletzung durchgeführt. Durch die Verletzung wird der Regenerationsprozess des Zebrafischgehirns in Gang gesetzt, wodurch es zu einer erhöhten Expression der Ziel-miRNA kommt. Dies sollte zu einer verbesserten Detektion durch die **I-FISH**-Sonden führen. Die Stichwunde wurde dabei der linken Hemisphäre des Zebrafischgehirns zugefügt, wodurch die erhöhte miRNA-Expression in dieser Hirnhälfte beobachtbar sein sollte. In Abbildung 47 sind als Vergleich auf der linken Seite die ISH-Aufnahmen dargestellt und auf der rechten Seite die Aufnahmen der FISH-Experimente nach Verletzung.

Bei **I-FISH-9** ist eine deutliche spezifische Fluoreszenz im oberen Teil der ventrikulären Zone zu erkennen. Diese ist, wie in der vergrößerten Aufnahme zu sehen, ähnlich scharf abgegrenzt wie die ISH, was für eine erfolgreiche Detektion spricht. **I-FISH-31** zeigt ebenfalls eine spezifische Fluoreszenz entlang der ventrikulären Zone, die wie die Blaufärbung der ISH leicht verläuft. Auch diese weist auf eine erfolgreiche Detektion der miR-31 hin. Für **I-FISH-96** sind die Aufnahmen weniger aussagekräftig. In der ventrikulären Zone zeigt sich zwar ein erhöhtes Fluoreszenzsignal, dennoch gibt es ein deutliches Hintergrundrauschen. Dagegen weist **I-FISH-146a** wieder eine spezifische Fluoreszenz im oberen Bereich der ventrikulären Zone auf, die wie die ISH scharf abgegrenzt ist. Dies deutet auf eine erfolgreiche Detektion von miR-146a hin. **I-FISH-182** und **-183** zeigen beide eine starke Fluoreszenz im Bereich des Stichkanals. miR-182 und -183 gehören zu einem Gen-Cluster und besitzen daher ein ähnliches Expressionsmuster. Die beiden starken Fluoreszenzsignale sprechen für eine erfolgreiche Detektion der beiden miRNA in proliferierenden Zellen, die für die Schließung der Stichwunde sorgen. Zusätzlich weisen **I-FISH-182** und **-183** Fluoreszenzsignale entlang der ventrikulären Zone auf, die mit der ISH übereinstimmen. Abschließend zeigt auch **I-FISH-726** eine deutliche Fluoreszenz entlang der ventrikulären Zone bis zum unteren Rand des Hirnschnittes. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass diese ähnlich in die Breite verläuft wie die Blaufärbung der ISH. Dies deutet ebenfalls auf eine erfolgreiche Detektion von miR-726 hin.

Wie erhofft, konnte durch die gezielte Verletzung des Gehirnes eine Erhöhung der Expression erzeugt werden, wodurch spezifischere Fluoreszenzsignale der **I-FISH**-Sonden erhalten wurden. Dies bestätigt die Eignung der **I-FISH**-Sonden als Marker für die Detektion von miRNA. In den Vergrößerungen zeigt sich zudem deutlich die verbesserte Auflösung gegenüber herkömmlichen ISH-Experimenten. Dennoch sind weitere FISH-Experimente nötig, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, da die Expression stark tierabhängig ist.

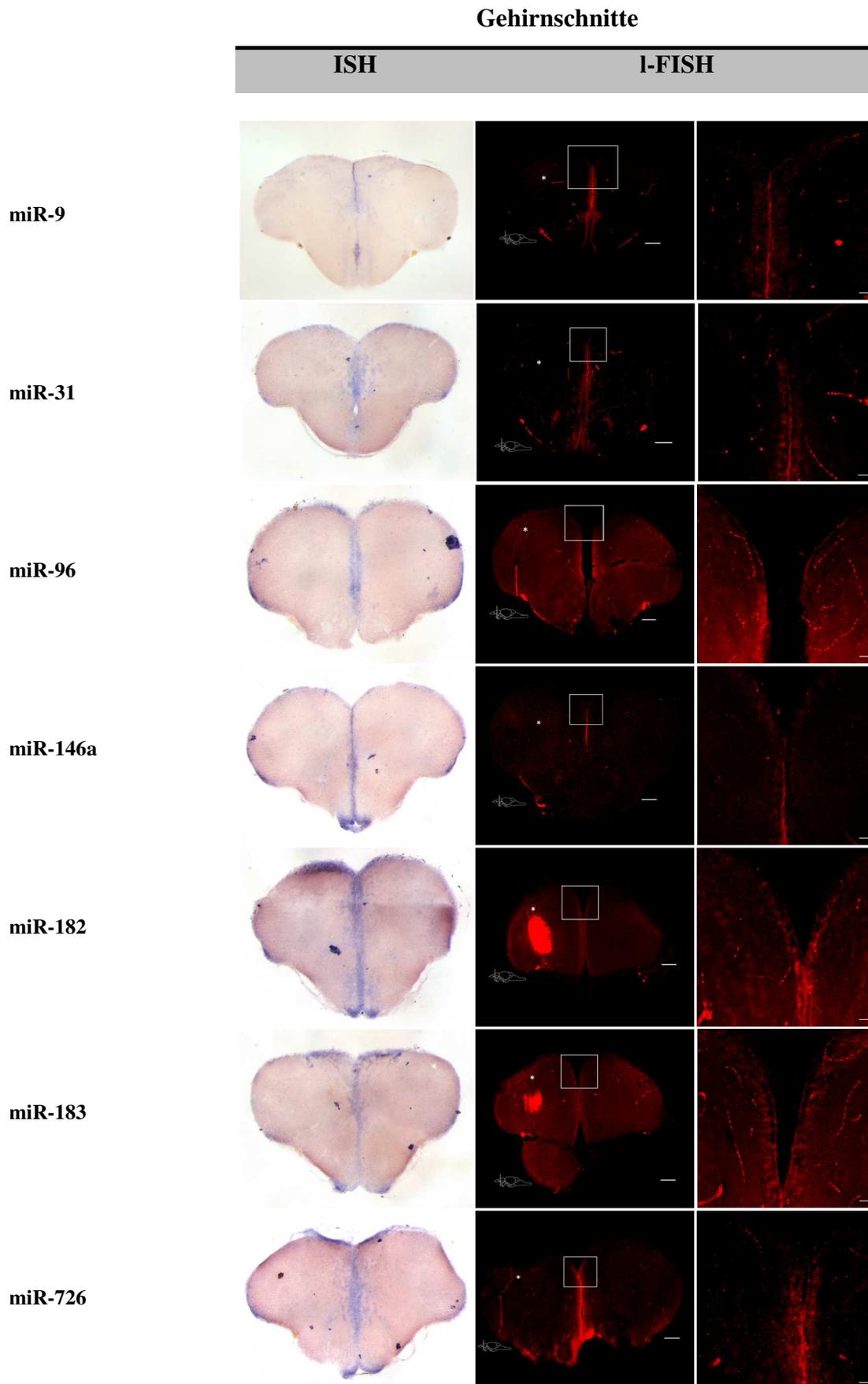


Abbildung 47: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der FISH-Experimente mit den I-FISH-Sonden (rechts) in Zebrafisch-Gehirnschnitten fünf Tage nach Verletzung; $\lambda_{exc} = 635 \text{ nm}$; ISH links als Vergleich

5.2 FRET-basierte FISH-Sonden zur Detektion von miRNA

In Anlehnung an JIN *et al.* wurden neben dem Konzept aus Kapitel 5.1 FISH-Sonden für miR-9 entwickelt, bei denen die Detektion der Ziel-miRNA auf einem FRET und damit einer Farbänderung der Fluoreszenz basiert (Abb. 48).^[168] In Anwesenheit von miR-9 soll eine Dreiwegeverbindung ausgebaut werden, wodurch die Fluorophore der beiden Sondenstränge in räumliche Nähe kommen und so nach Anregung des Donorfarbstoffes ein Energietransfer auf den Akzeptorfarbstoff möglich wird. Als Farbstoffe wurden wie in Kapitel 3.2 das etablierte FRET-Paar Cy3 und Cy5 gewählt.

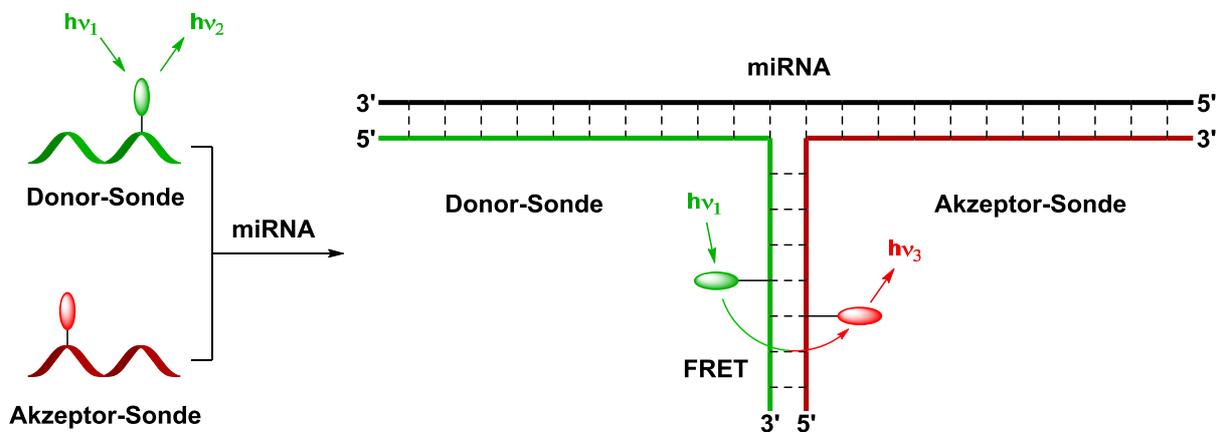


Abbildung 48: Schematische Darstellung des Konzepts zur Detektion von miRNA mithilfe von binären FRET-Sonden durch Ausbildung einer Dreiwegeverbindung.

5.2.1 Aufbau und Synthese der FRET-Sonden

Damit die Ausbildung der Dreiwegeverbindung möglich ist, mussten die Sequenzen der Sonden so gewählt werden, dass diese mit einem Abschnitt untereinander und mit dem anderen Abschnitt mit der Ziel-miRNA hybridisieren können. Die Größe der jeweiligen Abschnitte musste dabei so gewählt werden, dass bei Raumtemperatur keine fehlerhafte Hybridisierung zwischen den Sonden stattfindet. Angelehnt an die Arbeit aus der Gruppe JIN wurde für den zu miR-9 komplementären Teil eine Länge von elf Nukleosiden und für den untereinander komplementären Teil eine Länge von sieben Nukleosiden gewählt. Um die FRET-Effizienz bei verschiedenen Abständen zwischen den Fluorophoren untersuchen zu können, wurden drei verschiedene Sonden für zwei Sonden-Paare synthetisiert. Beim FRET-Paar **t-FISH1/3** grenzen die Fluorophore direkt aneinander, wohingegen beim FRET-Paar **t-FISH2/3** eine Base dazwischenliegt (Abb. 49).

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte mithilfe der Phosphoramidit-Festphasensynthese. Anschließend wurden die Stränge postsynthetisch mittels CuAAC jeweils mit dem Donorfarbstoff Cy3 bzw. dem Akzeptorfarbstoff Cy5 modifiziert, so dass von jedem Strang eine Donor- (**D**) und eine Akzeptorvariante (**A**) dargestellt wurde. Nach abschließender Aufreinigung mittels RP-HPLC wurden somit sechs Stränge für vier mögliche FRET-Sonden (**t-FISH1D/3A**, **t-FISH1A/3D**, **t-FISH2D/3A**, **t-FISH2A/3D**) erhalten.

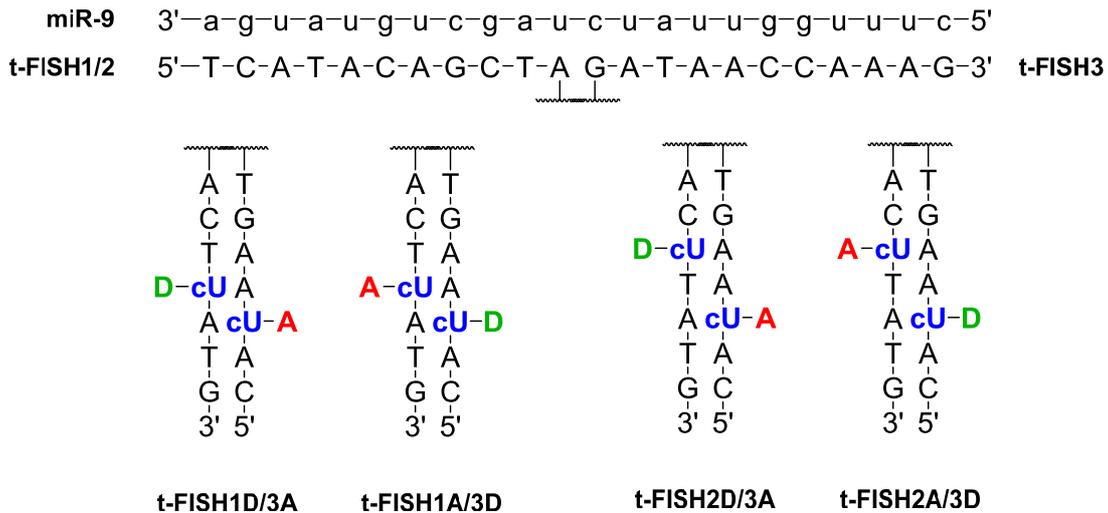


Abbildung 49: Sequenzen der FRET-Paare **t-FISH1D/3A**, **t-FISH1A/3D**, **t-FISH2D/3A**, **t-FISH2A/3D** mit Darstellung der komplementären Abschnitte zu miR-9 und untereinander.

5.2.2 Spektroskopische Untersuchungen

Zunächst wurden die Schmelztemperaturen der FRET-Sonden als Orientierung für die späteren FISH-Experimente ermittelt. Hierbei konnten die Schmelztemperaturen erst nach Zugabe der Ziel-RNA zu den FRET-Sonden bestimmt werden (Tab. 4). Dies bestätigt ein erfolgreiches Design der Sequenzen, wobei ohne miR-9 keine Hybridisierung zwischen den FRET-Sonden stattfindet. Es zeigt sich, dass durch die Erweiterung des Abstandes zwischen den Modifikationen um eine Base die Schmelztemperaturen um rund 1 – 2 °C erhöht werden konnten.

Tabelle 4: Ermittelte Schmelztemperaturen der FRET-Sonden mit 1 eq. RNA

Sonden	T _m [°C]
t-FISH-1D/3A ts 1.0eq	35
t-FISH-1A/3D ts 1.0eq	34
t-FISH-2D/3A ts 1.0eq	36
t-FISH-2A/3D ts 1.0eq	36

Anschließend wurden die Absorption und Emission der FRET-Sonden mit steigenden Äquivalenten des RNA-Gegenstranges gemessen. Zunächst wurden die FRET-Sonden jeweils ohne miRNA vermessen. Daraufhin erfolgte eine schrittweise Zugabe von miR-9 in 0.05 eq. bzw. 0.1 eq. Schritten mit einer Inkubationszeit von 5 Min bei Raumtemperatur vor der jeweiligen Messung. Exemplarisch sind in Abbildung 50 und 51 die Absorption und Emission der FRET-Sonden **t-FISH-1D/3A** und **t-FISH-2D/3A** in Abhängigkeit der zugegebenen Äquivalente miR-9 dargestellt (weitere Spektren siehe Kap. 8.7).

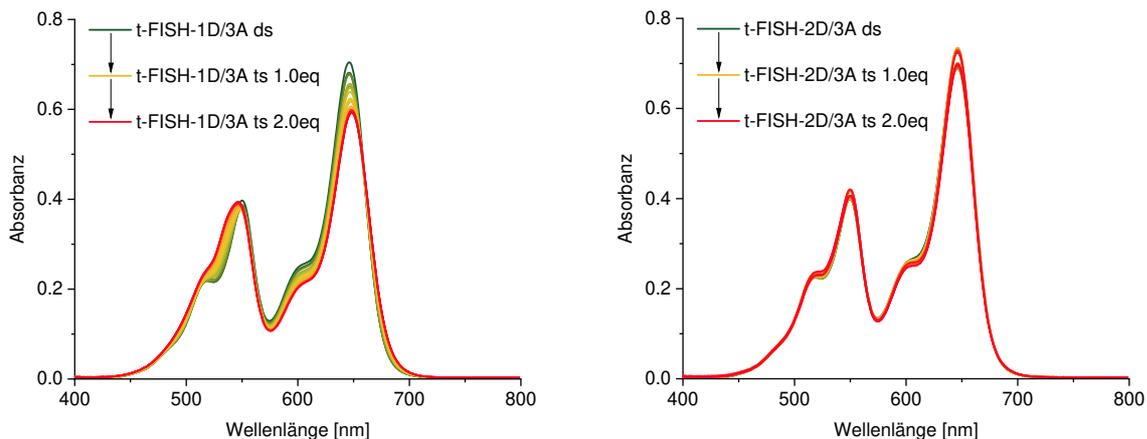


Abbildung 50: Absorption von **t-FISH-1D/3A** (links) und **t-FISH-2D/3A** (rechts) in Abhängigkeit der Äquivalente miR-9; 2.5 µM Sonden, 0 – 5 µM RNA, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

In den Absorptionen sind die charakteristischen Banden von Cy3 mit dem Maximum bei 552 nm und einer Schulter bei ca. 520 nm sowie Cy5 mit dem Maximum bei 647 nm und einer Schulter bei ca. 600 nm zu erkennen. Bei **t-FISH-2D/3A** ist mit zunehmendem Anteil der miRNA keine Veränderung im Absorptionsverhalten zu erkennen. Dagegen zeigen **t-FISH-1D/3A** sowie die beiden FRET-Paare mit umgekehrter Anordnung der Fluorophore **t-FISH-1A/3D** und **t-FISH-2A/3D** eine Veränderung der Absorption. Mit steigendem Anteil miRNA sinkt das Absorptionsmaximum des Cy5 ab und das Maximum des Cy3 nimmt zu. Zusätzlich kommt es beim Absorptionsmaximum des Cy3 zu einer hypsochromen Verschiebung um ca.

4 nm und einem Verschwinden der ausgeprägten Schulter bei 520 nm. Ursache hierfür könnten entstehende Wechselwirkungen der beiden Fluorophore untereinander sein, da mit steigendem Anteil miR-9 mehr Dreivegeverbindungen ausgebaut und die beiden Cyanin-Farbstoffe in räumliche Nähe gebracht werden. Der größere Abstand zwischen den Modifikationen und die Anordnung der Farbstoffe könnte bei **t-FISH-2D/3A** diese Wechselwirkungen einschränken.

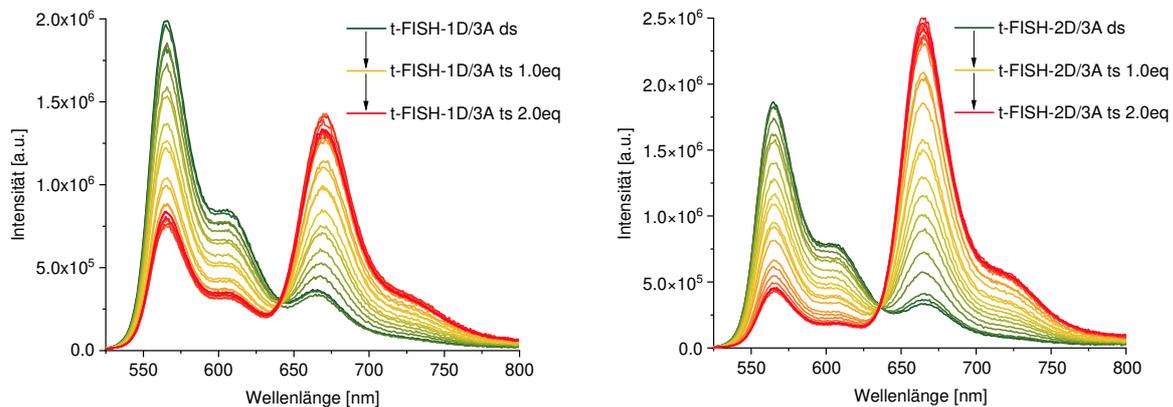


Abbildung 51: Emission von **t-FISH-1D/3A** (links) und **t-FISH-2D/3A** (rechts) in Abhängigkeit der Äquivalente miR-9; 2,5 μ M Sonden, 0 – 5 μ M RNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Als Anregungswellenlänge für die Messungen der Emission wurde $\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm gewählt, um möglichst außerhalb des Absorptionsbereiches des Akzeptorfarbstoffes Cy5 zu sein. Wie zu erwarten war, ist ohne Zugabe der Ziel-miRNA eine hohe Emission von Cy3 und nur eine sehr geringe Emission von Cy5 sichtbar. Mit zunehmenden Äquivalenten von miR-9 sinkt die Cy3-Fluoreszenz ab und die Cy5-Fluoreszenz nimmt zu. Den größten Anstieg der Emission von Cy5 auf das rund Siebenfache zeigt **t-FISH-2D/3A**. Im Gegensatz dazu steigt die Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffes bei **t-FISH-1D/3A** nur auf das ca. Vierfache an. Des Weiteren nimmt bei **t-FISH-2D/3A** die Cy3-Fluoreszenz um rund Dreiviertel ab, während bei **t-FISH-1D/3A** die Emission des Donorfarbstoffes nur um etwas mehr als die Hälfte sinkt. Somit zeigt sich, dass durch den größeren Abstand zwischen den Modifikationen die FRET-Effizienz gesteigert werden konnte. Im Vergleich der FRET-Paare mit umgekehrter Anordnung der Fluorophore **t-FISH-1A/3D** und **t-FISH-2A/3D** nimmt bei beiden die Akzeptoremission mit steigendem miRNA-Anteil ähnlich zu. Dagegen weist **t-FISH-2A/3D** die deutlich größere Abnahme der Cy3-Fluoreszenz auf. Diese nimmt wie bei **t-FISH-2D/3A** um rund Dreiviertel ab, während die Abnahme bei **FISH-1A/3D** nur knapp der Hälfte der Ursprungsemission entspricht. Auch bei diesen FRET-Paaren zeigt sich damit, dass die FRET-Effizienz durch den um eine Base vergrößerten Abstand zwischen den Fluorophoren verbessert wurde.

Zur besseren Visualisierung wurden die Intensitätsverhältnisse $R_{\text{FRET}} = I_{A668}/I_{D565}$ der FRET-Sonden berechnet und gegen die Äquivalente miR-9 aufgetragen (Abb. 52). Hierbei ist zu erkennen, dass bei allen FRET-Sonden die Zunahme des Energietransfers einem eher sigmoidalen Verlauf folgt. Im Vergleich dazu beobachteten JIN *et al.* einen linearen Verlauf der FRET-Zunahme. Die Intensitätsverhältnisse steigen zunächst mit zunehmender Menge miR-9 exponentiell an, werden dann aber in einem Bereich von 1.4 – 1.6 Äquivalenten entweder konstant (**t-FISH-1D/3A** und **t-FISH-2D/3A**) oder nehmen wieder leicht ab (**t-FISH-1A/3D** und **t-FISH-2A/3D**). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Ausbildung der Dreivegeverbindung aus miR-9 und **t-FISH**-Sonden bis zur vollständigen Hybridisierung einem Gleichgewicht unterliegt. Dieses Gleichgewicht könnte erst durch einen Überschuss der Ziel-miRNA vollständig zur Dreivegeverbindung verschoben werden, da die FRET-Paare ohne Ziel-miRNA nicht in der Lage sind, miteinander zu hybridisieren. Die potentielle Funktionalität der Sonden in FISH-Experimenten sollte das jedoch weniger einschränken, da im Waschschrift nach der Hybridisierung ungebundene Sonden entfernt werden und im Idealfall nur diejenigen übrigbleiben, die mit der Ziel-miRNA hybridisiert sind.

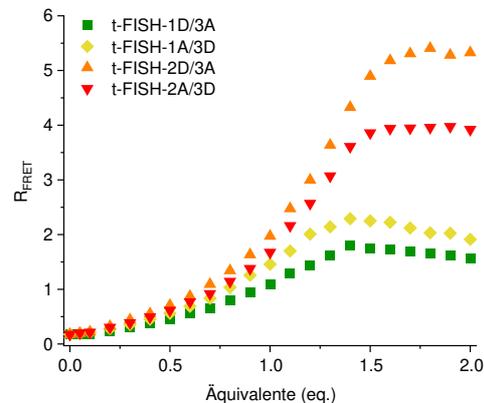


Abbildung 52: Berechnete Intensitätsverhältnisse R_{FRET} der FRET-Sonden in Abhängigkeit der Äquivalente zugegebener miR-9.

Zusätzlich wurden auch die Quantenausbeuten der sechs **t-FISH**-Einzelstränge sowie der vier Dreivegeverbindungen mit 1.0 eq. miR-9 bestimmt. Quantenausbeuten geben das Verhältnis der Anzahl von emittierten zu absorbierten Photonen an. Eine Quantenausbeute von 1 würde bedeuten, dass alle absorbierten Photonen auch wieder emittiert werden. Die ermittelten Werte bestätigen die Ergebnisse der Emissionsmessungen. Es zeigt sich, dass die Donorquantenausbeuten in den Dreivegeverbindungen mit $\Phi_D = 0.05 - 0.09$ im Vergleich zu den Einzelsträngen **t-FISH-1D ss** - **t-FISH-3D ss** mit $\Phi_D = 0.22 - 0.28$ deutlich niedriger sind, was auf einen erfolgreichen FRET auf den Akzeptor hinweist. Zudem sind die Akzeptor-

quantenausbeuten in den Dreiwegeverbindungen mit $\Phi_A = 0.17 - 0.34$ ähnlich hoch wie die der Einzelstränge **t-FISH-1A ss** - **t-FISH-3A ss** mit $\Phi_A = 0.32 - 0.36$ nach direkter Anregung. Des Weiteren zeigen die FRET-Paare **t-FISH-2D/3A** und **-2A/3D** in den Dreiwegeverbindungen niedrigere Donor- sowie höhere Akzeptorquantenausbeuten im Vergleich zu **t-FISH-1D/3A** und **-1A/3D**. Die Vergrößerung des Abstandes zwischen den Fluorophoren hat somit einen positiven Einfluss auf die FRET-Effizienz. **t-FISH-2D/3A ts** weist dabei von allen Dreiwegeverbindungen die höchste Akzeptorquantenausbeute auf, was mit den ermittelten Intensitätsverhältnissen der Emissionen übereinstimmt.

Tabelle 5: Gemessene Quantenausbeuten der **t-FISH**-Einzelstränge und der FRET-Paare mit 1.0 eq. RNA; 2.5 μ M Sonden, 2.5 μ M RNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc(Donor)}} = 515$ nm, $\lambda_{\text{exc(Akzeptor)}} = 605$ nm.

Sonden	Φ_D (530 nm – 636 nm)	Φ_A (636 nm – 800 nm)
t-FISH-1D ss	0.25	
t-FISH-2D ss	0.28	
t-FISH-3D ss	0.22	
t-FISH-1A ss		0.34
t-FISH-2A ss		0.36
t-FISH-3A ss		0.33
t-FISH-1D/3A ts 1.0eq	0.09	0.20
t-FISH-1A/3D ts 1.0eq	0.08	0.17
t-FISH-2D/3A ts 1.0eq	0.06	0.34
t-FISH-2A/3D ts 1.0eq	0.05	0.26

5.3 Multiple FISH-Sonden zur Detektion der mRNA von *prdm12b*

In einer vorherigen Kooperation der Arbeitsgruppen WAGENKNECHT und STRÄHLE konnte DR. LARISSA DOLL erfolgreich FISH-Sonden zur Detektion der mRNA von *sox9a* synthetisieren.^[169] Mit diesem Konzept wurden nun FISH-Sonden zur Detektion der mRNA von *prdm12b* synthetisiert.

5.3.1 Aufbau und Synthese der FISH-Sonden

Es wurden 36 modifizierte Einzelstränge synthetisiert, die zu unterschiedlichen Abschnitten der Ziel-mRNA komplementär sind. Die Sequenzen wurden so gewählt, dass der erste Strang am Startcodon (ATG) beginnt und zwischen den verschiedenen FISH-Sonden jeweils ein Abstand von zehn Nukleotiden besteht. Für die einzelnen Oligonukleotide wurde eine Länge von 20 Basen gewählt, damit die Hybridisierung mit der Ziel-mRNA ausreichend stark ist. Bei jedem Einzelstrang wurde das zentralste Thymidin gegen cU ausgetauscht (Abb. 54).

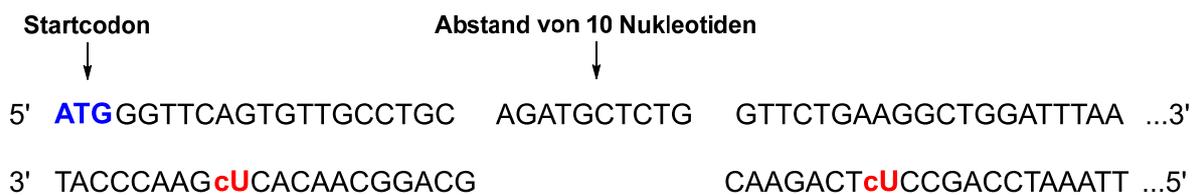


Abbildung 53: Schematische Darstellung der mRNA *prdm12b* mit den komplementären cU-modifizierten FISH-Sonden.

Mithilfe der Phosphoramidit-Festphasensynthese wurden die 36 Oligonukleotide „DMTr-on“ synthetisiert. Anschließend wurde die DNA von der festen Phase abgespalten und die Schutzgruppen der Nukleobasen entfernt. Im nächsten Schritt wurden die synthetisierten Oligonukleotide über *Glen-Pak*TM-Säulchen aufgereinigt und Abbruchstränge abgetrennt. Es wurde von jedem Strang die Konzentration bestimmt und im Anschluss je 20 nmol zu einem Sonden-Mix vereinigt. Dieser Sonden-Mix wurde anschließend postsynthetisch mit Cy5-Azid mittels CuAAC modifiziert. Zuletzt wurden die modifizierten Oligonukleotide über RP-HPLC aufgereinigt und DNA ohne Farbstoff sowie überschüssiger Farbstoff entfernt. Neben dem Sonden-Mix wurden zusätzlich die ersten drei FISH-Sonden **m-FISH1 – m-FISH3** für spektroskopische Untersuchungen einzeln mit Cy5 modifiziert und aufgereinigt.

5.3.2 Spektroskopische Untersuchungen

Exemplarisch für alle Sonden wurden die ersten drei FISH-Sonden spektroskopisch untersucht. Hierzu wurden die Absorption und Emission dieser Sonden als Einzelstränge (**m-FISH1 ss**, **m-FISH2 ss**, **m-FISH3 ss**), als Sonde-DNA-Duplexe (**m-FISH1 ds DNA**, **m-FISH2 ds DNA**, **m-FISH3 ds DNA**) sowie als Sonde-RNA-Duplexe (**m-FISH1 ds RNA**, **m-FISH2 ds RNA**, **m-FISH3 ds RNA**) gemessen.

In den gemessenen Absorptionen ist das charakteristische Maximum des Cy5 bei $\lambda = 647$ nm mit einer Schulter bei $\lambda = 605$ nm zu erkennen. Des Weiteren zeigt sich eine leicht erhöhte Absorption der **m-FISH-RNA-Duplexe**. In den Emissionen zeigt sich bei den **m-FISH-RNA-Duplexen** jedoch eine Abnahme im Vergleich zu den Einzelsträngen, während bei den **m-FISH-DNA-Duplexen** eine Zunahme der Fluoreszenz zu erkennen ist.

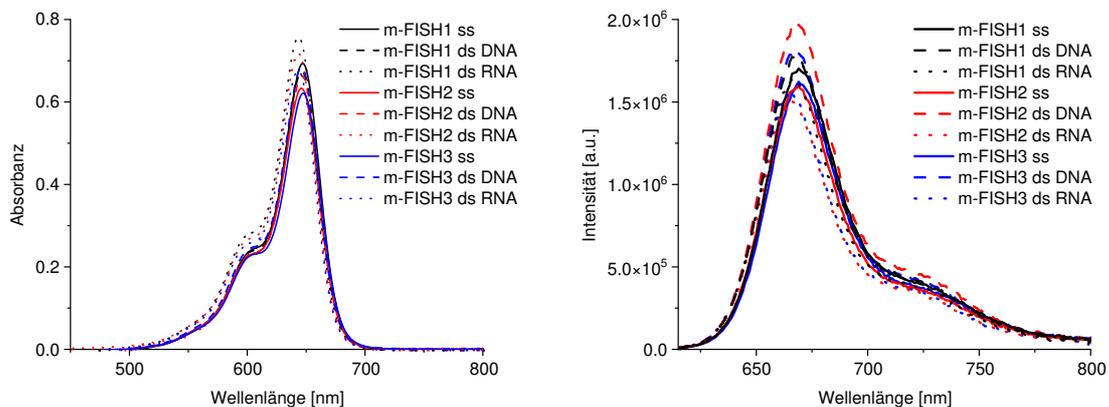


Abbildung 54: Absorption und Emission der Sonden **m-FISH1 – m-FISH3**; 2.5 μ M Sonde, 2.5 μ M DNA/RNA, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{exc} = 605$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Um das Hybridisierungsverhalten der **m-FISH**-Sonden gegenüber einer langen Sequenz zu untersuchen, wurden die ersten drei **m-FISH**-Sonden zusätzlich mit einem käuflich erworbenen DNA-Gegenstrang (**GS80**) hybridisiert, dessen Sequenz den ersten 80 Basen der Ziel-mRNA *prdm12b* entspricht (Abb. 56). Dieser wurde aus Kostengründen anstatt eines ca. 10-fach teureren RNA-Gegenstranges verwendet.

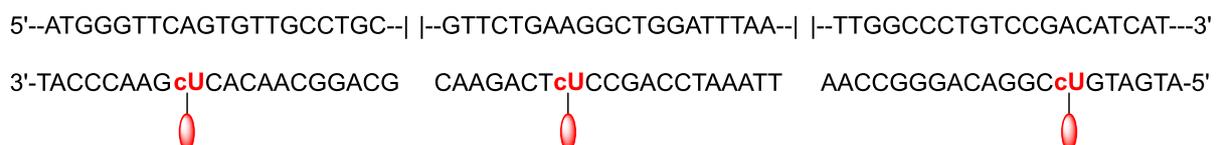


Abbildung 55: Schematische Darstellung des 80 Basen langen DNA-Gegenstranges **GS80** mit den hybridisierten ersten drei FISH-Sonden.

In den Absorptionen und Emissionen sind ebenfalls die charakteristischen Maxima von Cy5 zu erkennen. Bei der Absorption und Emission ist in den Einzelsträngen nahezu kein Unterschied festzustellen, dagegen zeigt sich in den Doppelsträngen das gewünscht additive Verhalten. Während sich das Absorptions- und Emissionsmaximum von **m-FISH1 GS80** zu **m-FISH1+2 GS80** wie zu erwarten verdoppelt, fällt die Zunahme bei **m-FISH1+2+3 GS80** geringer aus. Des Weiteren zeigt sich eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums von **m-FISH1 GS80** zu **m-FISH1+2+3 GS80** um ca. 4 nm. Dennoch bekräftigt der summierte Anstieg der Emission das Konzept der multiplen FISH-Sonden zur Verstärkung des Detektionssignals für die mikroskopischen Experimente, auch wenn dieser, wie gezeigt, in einem Sonde-RNA-Duplex etwas geringer ausfallen sollte als im Sonde-DNA-Duplex.

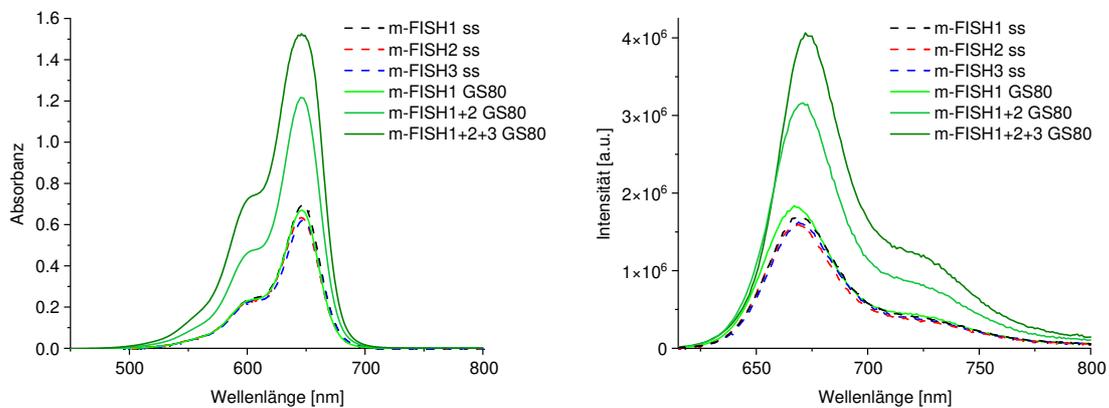


Abbildung 56: Absorption und Emission der Sonden **m-FISH1 – m-FISH3** als Einzelstränge und als Duplexe mit dem Gegenstrang **GS80**; 2.5 μ M Sonden, 2.5 μ M DNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 605$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Zusätzlich wurden die Schmelztemperaturen ermittelt, um Auskunft über das Hybridisierungsverhalten für die nachfolgenden FISH-Experimente zu erhalten (Tab. 6). Hierfür wurden **m-FISH1 – m-FISH3** jeweils als Sonde-DNA- sowie Sonde-RNA-Duplexe vermessen. Des Weiteren wurde das Hybridisierungsverhalten der drei Sonden gegen den langen Gegenstrang (**GS80**) sowie dessen Eigenkomplementarität untersucht. Die Schmelztemperaturen der Sonde-DNA- und Sonde-RNA-Duplexe liegen im Bereich um 60 – 70 °C, wobei die Schmelztemperaturen der Sonde-DNA-Duplexe im Vergleich rund 2 – 5 °C über den Sonde-RNA-Duplexen liegt. Für **GS80** wurden mit $T_m = 35$ °C und $T_m = 64$ °C bereits zwei Schmelztemperaturen ohne Sonden erhalten. Dies lässt darauf schließen, dass **GS80** in Teilen selbstkomplementär ist. Auch im Duplex **m-FISH1 GS80** wurden mit $T_m = 38$ °C und $T_m = 72$ °C zwei Schmelztemperaturen erhalten. Die zweite Schmelztemperatur ist dabei gleich zu der von **m-FISH1 ds DNA**, was darauf hindeutet, dass **m-FISH1** an einen

selbstkomplementären Teil von **GS80** bindet. Bei Zugabe der zweiten Sonde ist beim Doppelstrang **m-FISH1+2 GS80** nur eine Schmelztemperatur $T_m = 62\text{ °C}$. vorhanden. Nach Zugabe der dritten Sonde steigt diese für **m-FISH1+2+3 GS80** auf $T_m = 62\text{ °C}$. Es ist daher davon auszugehen, dass mit steigender Sondenanzahl eine Durchschnittsschmelztemperatur erhalten wird, welche für die nachfolgenden FISH-Experimente als Orientierung für die Hybridisierung dient.

Tabelle 6: Ermittelte Schmelztemperaturen der **m-FISH**-Sonden

Sonden	T_m [°C]
m-FISH1 ds DNA	72
m-FISH2 ds DNA	62
m-FISH3 ds DNA	72
m-FISH1 ds RNA	67
m-FISH2 ds RNA	59
m-FISH3 ds RNA	70
GS80	35 + 64
m-FISH1 GS80	38 + 72
m-FISH1+2 GS80	62
m-FISH1+2+3 GS80	64

5.3.3 FISH-Experimente

Die synthetisierten Sonden wurden anschließend in FISH-Experimenten als Fluoreszenzmarker zur Detektion der mRNA von *prdm12b* eingesetzt. Zuvor aufgenommene *in-situ*-Hybridisierungen (ISH) der Gruppe STRÄHLE dienten als Vergleichsmöglichkeit. In diesen zeigt die blaue Anfärbung, dass die Expression von *prdm12b* primär im unteren ventralen Bereich des Telencephalons stattfindet (Abb. 58).

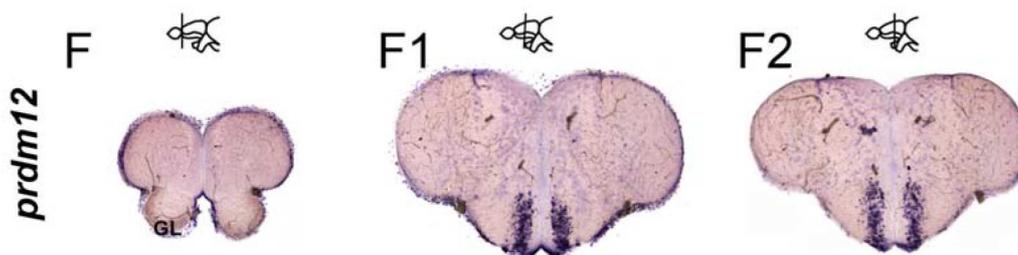


Abbildung 57: ISH der mRNA *prdm12b* im Telencephalon eines Zebrafisches.

Für die FISH-Experimente wurden die zuvor sektionierten Gehirnschnitte in eine Hybridisierungslösung mit den FISH-Sonden gegeben. Aufgrund der ermittelten hohen Schmelztemperatur von **m-FISH1 – m-FISH3** mit dem langen Gegenstrang und dessen Selbstkomplementarität wurde eine Hybridisierungstemperatur von 72 °C gewählt. Die Anregung von Cy5 erfolgte bei $\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$ und von der *DAPI*-Kernfärbung bei $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$. *DAPI* wird hierbei zur Visualisierung der Zellkerne verwendet, da mRNA im Gegensatz zu miRNA in diesen lokalisiert ist. Erste Aufnahmen zeigen eine Fluoreszenz im gewünschten unteren Bereich der ventralen Zone (A/A'), wo auch in den ISH-Experimenten eine Färbung zu erkennen ist (Abb. 59). In den vergrößerten Aufnahmen (B/B') ist die rote Fluoreszenz der FISH-Sonden deutlicher zu sehen. Diese Übereinstimmung der Signale mit den ISH-Experimenten weist auf eine erfolgreiche Detektion der mRNA von *prdm12b* mit den FISH-Sonden hin. Jedoch ist zusätzlich noch eine starke Fluoreszenz im Ventrikel des Telencephalons zu erkennen, die nicht mit der ISH-Anfärbung übereinstimmt. Diese kann darauf zurückzuführen sein, dass das Gen *prdm12b* zu einer ganzen Genfamilie gehört und innerhalb dieser Genfamilie können Sequenzabschnitte sehr ähnlich sein.^[170] Die 36 FISH-Sonden sind mit einer Länge von 20 Nukleotiden im Vergleich zu normalen ISH-Sonden sehr kurz, welche eine Länge von rund 600 Nukleotiden besitzen. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass sie auch mit anderen Sequenzen aus der Genfamilie hybridisieren können. Aus diesem Grund werden neben der Ziel-mRNA vermutlich noch andere *prdm*-Gene markiert und visualisiert. Durch eine Verlängerung der Sequenzen mit mehrfacher Farbstoffmodifikation könnte die Spezifität erhöht werden.^[109]

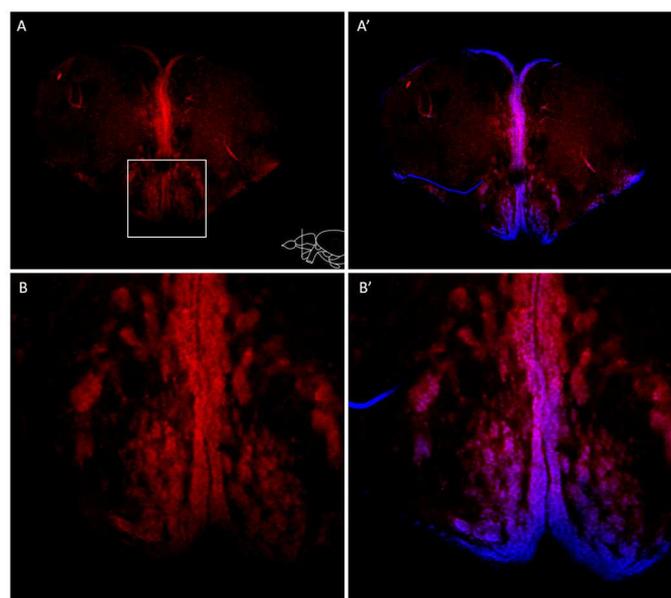


Abbildung 58: Erste Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der FISH-Experimente zur Detektion der mRNA *prdm12b* in Zebrafisch-Gehirnschnitten; rot: **m-FISH**-Sonden, $\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$; blau: *DAPI*, $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden in diesem Teil der Arbeit erfolgreich verschiedene FISH-Sonden zur Detektion ausgewählter miRNA und der mRNA *prdm12b* in Zebrafisch-Gehirnschnitten synthetisiert und von LUISA LÜBKE aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. UWE STRÄHLE / DR. SEPAND RASTEGAR in FISH-Experimenten als Fluoreszenzmarker eingesetzt.

Im ersten Teilprojekt wurde das Konzept der **h-FISH**-Sonden aus Kapitel 4 zur Detektion von miR-9, -31, 96, -146a, -182, -183 sowie -726 des Zebrafisches übertragen und durch den Einbau zusätzlicher LNA-Nukleoside weiter optimiert. Im Anschluss an spektroskopische Untersuchungen wurden mit den LNA-modifizierten **I-FISH**-Sonden erfolgreich FISH-Experimente in unverletzten sowie verletzten Zebrafisch-Gehirnschnitten durchgeführt. Hierbei wurde speziell in den verletzten Schnitten des Telencephalons spezifische Fluoreszenz der **I-FISH**-Sonden erhalten, die mit den entsprechenden *in-situ*-Hybridisierungen Übereinstimmungen zeigten. Dennoch sollten weitere FISH-Experimente durchgeführt werden, um die Ergebnisse zu verifizieren, da die Expression tierabhängig ist und dementsprechend stark variieren kann.

Im zweiten Teilprojekt wurden FRET-Sonden zur Detektion von miR-9 entwickelt, die sich an einer Arbeit von JIN *et al.* orientierten.^[168] Hierzu wurden **cU**-modifizierte Stränge synthetisiert, die zum einen Teil komplementär zueinander und zum anderen Teil komplementär zur Ziel-miRNA sind. In den spektroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese ohne Anwesenheit der Ziel-miRNA keinen stabilen Duplex ausbilden können. Erst nach Zugabe von miR-9 wird eine Dreiwegeverbindung gebildet, wodurch die beiden Fluorophore Cy3 und Cy5 in räumliche Nähe kommen und ein FRET möglich wird. Zudem zeigte sich, dass eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den Fluorophoren um eine Base die FRET-Effizienz erhöht. Die FISH-Experimente mit den FRET-Sonden sind derzeit noch nicht abgeschlossen.

Im dritten Teilprojekt wurden nach dem Konzept von DR. LARISSA DOLL 36 **cU**-modifizierte FISH-Sonden zur Detektion der mRNA von *prdm12b* synthetisiert und in einem Ansatz als Sonden-Mix postsynthetisch mit Cy5 modifiziert. In optischen Charakterisierungen wurde mit den ersten drei Sonden **m-FISH1 – m-FISH3** exemplarisch das Hybridisierungsverhalten gegen einen Gegenstrang untersucht, der den ersten 80 Nukleotiden der mRNA von *prdm12b* entspricht. Hierbei wurde gezeigt, dass der Gegenstrang in Teilen selbstkomplementär und für die FISH-Experimente eine hohe Hybridisierungstemperatur notwendig ist. Des Weiteren konnte das gewünschte additive Verhalten der Farbstoffemission bestätigt werden. In den FISH-Experimenten wurden mit ISH-Aufnahmen der mRNA von *prdm12b* vergleichbare

Fluoreszenzsignale der **m-FISH**-Sonden erhalten. Jedoch zeigte sich zusätzlich noch unspezifische Fluoreszenz in der ventrikulären Zone, die auf andere mRNA aus der Genfamilie *prdm* zurückzuführen sein könnte. Das Konzept scheint daher primär für mRNA ohne viele Homologe geeignet zu sein. Eine Möglichkeit zur Optimierung der Sonden könnte die Verlängerung der Sequenzen zur Erhöhung der Spezifität sein sowie der mehrfache Einbau von **cU** für eine multiple Farbstoff-modifikation einer Sequenz. Dadurch könnte die Anzahl der Sonden z.B. von 36 einfach modifizierten auf zwölf dreifach modifizierte reduziert werden, während die Zahl der Fluorophore gleichbleibt.^[109]

6 AMINOPHTHALIMID-BASENSURROGATE FÜR RNA

In vorherigen Arbeiten aus der Gruppe WAGENKNECHT wurden 4-Aminophthalimid-Derivate bereits erfolgreich als Basensurrogate in DNA-Oligonukleotide eingebaut. DR. MICHAEL WEINBERGER und DR. MARCUS MERKEL synthetisierten die Nucleoside **m-4API** bzw. **o-4API** sowie **DMAPI** und untersuchten diese spektroskopisch mit verschiedenen natürlichen Gegenbasen sowie dem in der Gruppe ERNSTING als komplementäre Gegenbase entwickelten **DAPym**-Nucleosid (Abb. 60).^[142, 144]

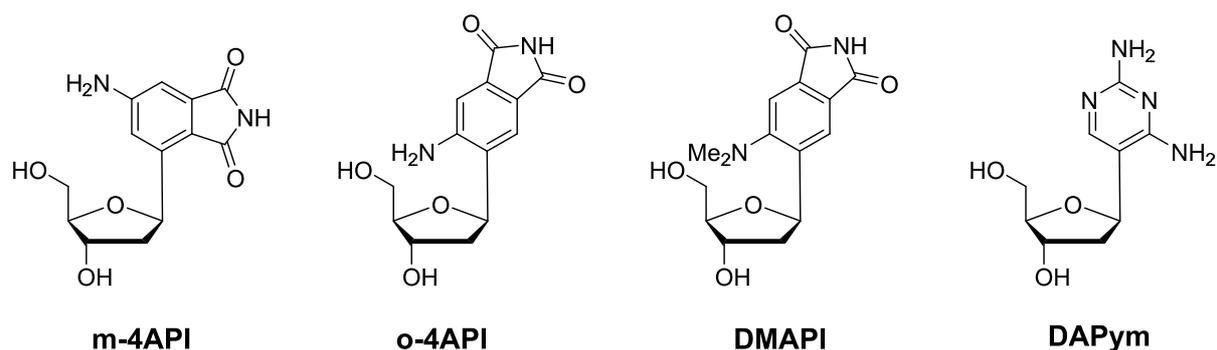


Abbildung 59: Strukturen der in den Arbeitsgruppen WAGENKNECHT und ERNSTING entwickelten Basensurrogate für DNA.

Wie in Kapitel 2.5 bereits dargestellt, zeigten NMR-Strukturaufklärungen jedoch, dass die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen den artifiziellen **API:DAPym** Basenpaaren nicht wie erhofft erfolgt. Während beim **m-4API** von DR. MICHAEL WEINBERGER die Anknüpfung an den Zuckerrest eine optimale Ausrichtung des Basenpaares verhinderte, zeigte sich beim **o-4API** von DR. MARCUS MERKEL, dass aufgrund der kleineren Größe des Fünfringes der Imid-Einheit abwechselnd nur zwei der drei möglichen Wasserstoffbrücken mit dem **DAPym** ausgebildet werden. Für das **DMAPI** wurde sowohl im Einzel- als auch in den Doppelsträngen eine gelöschte Fluoreszenz erhalten, deren primäre Ursache im sogenannten TICT-Zustand (engl. *twisted intramolecular charge transfer*) liegt.^[171-172]

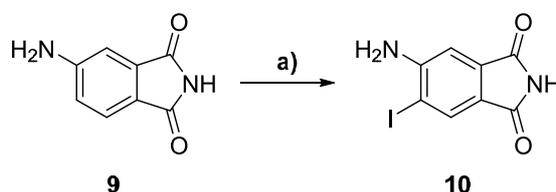
Um das Basenpaarungsverhalten von **o-4API** und **DMAPI** in der RNA-Doppelhelix sowie den Einfluss der Umgebung darauf zu untersuchen, wurden diese Nucleoside resynthetisiert, in RNA-Oligonukleotide eingebaut und anschließend spektroskopisch untersucht. RNA-Nucleoside weisen im Gegensatz zu DNA-Nucleosiden eine C3'-endo-Konformation auf, wodurch eine sogenannte A-Helix in einem Doppelstrang ausgebildet wird. Diese ist im Vergleich zu der DNA B-Helix gestauchter und die Nucleobasen sind geneigt zur Helixachse ausgerichtet, was die Basenstapelung begünstigt.

6.1 Syntheseübersicht

Nachfolgend sind die einzelnen Schritte der Synthesen für die Nukleoside **o-4API** und **DMAPI** und ihrer Phosphoramidite dargestellt. Die Synthesen erfolgten dabei nach den Routen, die von DR. MARCUS MERKEL entwickelt wurden, und konnten an einigen Stellen optimiert werden.^[144]

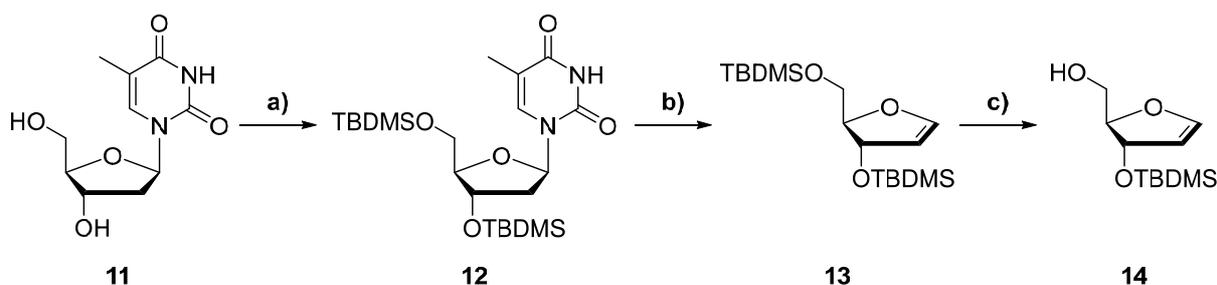
6.1.1 Synthese des o-4API-Phosphoramidites (20)

Ausgehend von kommerziell erhältlichem 4-Aminophthalimid **9** wurde das iodierte Produkt **10** nach literaturbekannter Vorgehensweise in einer nukleophilen Substitution durch NIS in DMF mit einer Ausbeute von 85 % dargestellt.^[173]



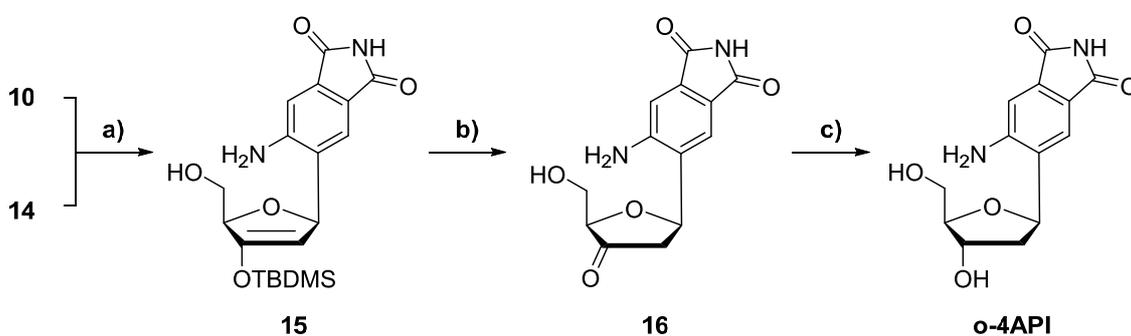
Schema 7: Synthese des iodierten Amiophthalimids **10**. a) NIS, DMF, ü.N., 45 °C, **85 %**.

Das für die HECK-Reaktion mit **10** notwendige Glykal **14** ist ebenfalls literaturbekannt und wurde über drei Stufen aus Thymidin **11** synthetisiert.^[174] Hierfür wurde zunächst **11** an den beiden Hydroxygruppen mit TBDMS-Cl und Imidazol mit quantitativer Ausbeute als Silylether geschützt. Anschließend wurde von **12** die Nukleobase mit HMDS silyliert und *in situ* eliminiert, wodurch das Glykal **13** erhalten wurde. Zuletzt wurde die 5'-TBDMS-Schutzgruppe selektiv mit TBAF in THF abgespalten. Über eine niedrige Reaktionstemperatur und langsames Zutropfen der TBAF-Lösung wird hierbei eine Entschützung beider TBDMS-Gruppen verhindert. Durch Herabsetzen der Reaktionstemperatur von 0 °C auf -10 °C konnte die Ausbeute von **14** auf 88 % gesteigert werden.



Schema 8: Synthese des teilentschützten Glykals **14**. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, ü.N., RT, **quant.**; b) HMDS, 4 h, 130 °C, **42 %**; c) 1 M TBAF/THF, THF, 1 h, -10 °C, **88 %**.

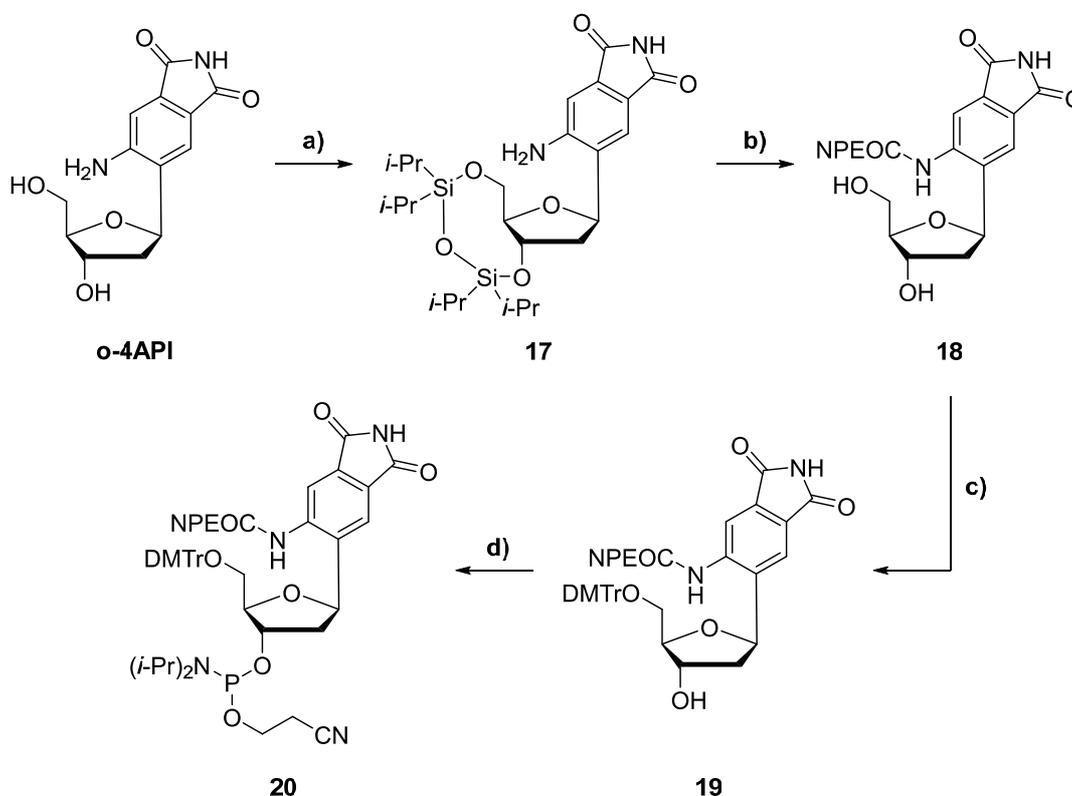
Im nächsten Schritt wurden die beiden zuvor synthetisierten Bausteine **10** und **14** in einer palladiumkatalysierten HECK-Reaktion miteinander verknüpft. Hierbei wurde neben dem TBDMS-geschützten Produkt **15** mit einer Ausbeute von 58 % auch das entschützte Produkt **16** mit 18 % isoliert. Die vorzeitige Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe ist dabei auf nicht vollständig wasserfreie Reaktionsbedingungen zurückzuführen. Die nachfolgende Entschützung von **15** mit $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ zu **16** erfolgte mit quantitativer Ausbeute. Durch eine zusätzliche säulenchromatographische Aufreinigung von **16** konnte die anschließende Reduktion mit Natriumtriacetoxyborhydrid in Essigsäure/Methanol zu **o-4API** auf eine Ausbeute von 81 % gesteigert werden.



Schema 9: Synthese von **o-4API**. a) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, TTBP· HBF_4 , *N,N*-Dicyclohexylmethylamin, Dioxan, ü.N., 75 °C, 58 % + 18 %; b) $\text{NEt}_3 \cdot \text{HF}$, THF, ü.N., RT, quant.; c) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH/MeCN, 1 h, 0 °C, 81 %.

Für die Phosphoramidit-Festphasensynthese ist die Schützung der Aminogruppe des **o-4API** zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen notwendig. DR. MICHAEL WEINBERGER verwendete für die Synthese seines **m-4API**-Bausteins die Phenoxyacetyl-Schutzgruppe.^[142] Diese wurde jedoch unter den *UltraMild*-Abspaltbedingungen, welche aufgrund der Labilität des Aminophthalimid-Gerüsts gegenüber Nukleophilen unter basischen Bedingungen notwendig sind, nur unzureichend wieder entfernt. Aus diesem Grund verwendete DR. MARCUS MERKEL die von PFLEIDERER et al. entwickelte *p*-Nitrophenylethoxycarbonyl-Schutzgruppe (NPEOC), welche im Anschluss an die Oligonukleotidsynthese in einem zusätzlichen Entschützungsschritt mit Diazabicycloundecen (DBU) abgespalten wird.^[175] Um diese Schutzgruppe einführen zu können, wurden die 3'- und 5'-Hydroxygruppen regioselektiv mit der MARKIEWICZ-Gruppe geschützt. Die anschließende Carbamat-Synthese erfolgte durch Umsetzung von **17** mit Triphosgen und 4-Nitrophenylethanol. Direkt im Anschluss wurde die MARKIEWICZ-Gruppe mit 1 M TBAF in THF abgespalten, wodurch **18** über zwei Stufen mit einer Ausbeute von 32 % erhalten wurde. Im nächsten Schritt wurde die 5'-Hydroxygruppe

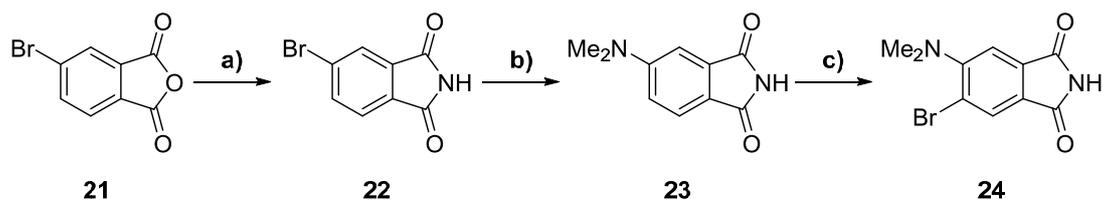
selektiv mit der Dimethoxytritylgruppe (DMTr) geschützt. Die abschließende Synthese des Phosphoramidit-Bausteins **20** konnte auf eine quantitative Ausbeute gesteigert werden.



Schema 10: Synthese des **o-4API**-Phosphoramidites **20**. a) TIPDSiCl₂, Pyridin, ü.N., RT, **53 %**; b) 1. Triphosgen, CHCl₃, 2-(4-Nitrophenyl)ethanol, ü.N., 0 °C – RT, 2. 1 M TBAF/THF, THF, 15 Min, 0 °C, **32 %** (über 2 Stufen); c) DMTr-Cl, NEt₃, Pyridin, ü.N., RT, **52 %**; d) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, DCM, 4 h, RT, **quant**.

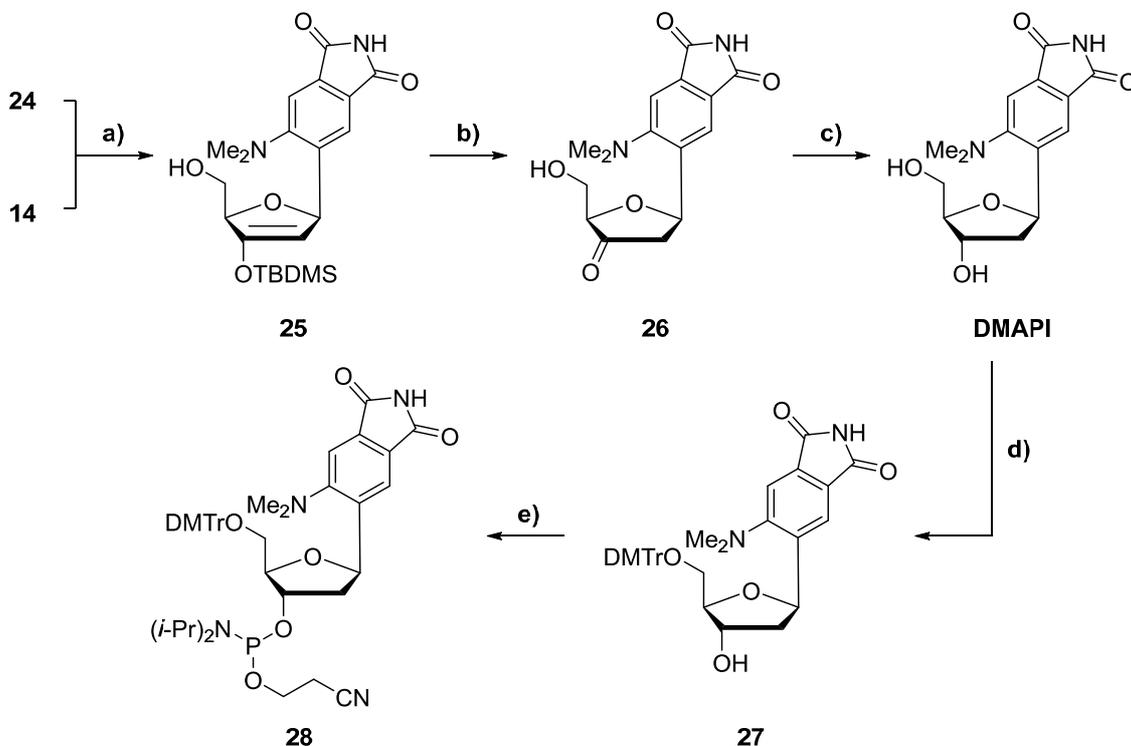
6.1.2 Synthese des DMAPI-Phosphoramidites (**28**)

Das bromierte 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimid **24** wurde über drei Stufen aus 4-Bromphthalsäureanhydrid **21** synthetisiert. Dazu wurde **21** zunächst in einer Kondensationsreaktion mit Harnstoff in DMF zu **22** umgesetzt. Anschließend wurde eine HARTWIG-BUCHWALD-Aminierung durchgeführt, um **23** mit einer Ausbeute von 56 % zu erhalten. Im letzten Schritt erfolgte die selektive Bromierung der 5-Position mit NBS in DMF zu **24** mit einer Ausbeute von 81 %.



Schema 11: Synthese des bromierten 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimides **24**. a) Harnstoff, DMF, 20 Min, 140 °C, **82 %**; b) Pd₂(dba)₃, XPhos, 2 M Dimethylamin/THF, 1 M LiHMDS/THF, 24 h, 65 °C, **56 %**; c) NBS, DMF, 2 h, 0 °C, **81 %**.

Die HECK-Reaktion von **24** und **14** wurde analog zur Synthese von **15** durchgeführt. Hierbei wurde ebenfalls neben dem TBDMS-geschützten Produkt **25** mit einer Ausbeute von 46 % das entschützte Produkt **26** mit 11 % erhalten. Bei der nachfolgenden Entschützung von **25** mit NEt₃·3HF wurde **26** mit quantitativer Ausbeute hergestellt. Die anschließende Reduktion mit Natriumtriacetoxyborhydrid in Essigsäure/Methanol zu **DMAPI** erfolgte auch mit quantitativer Ausbeute. Da die Aminogruppe durch die beiden Methylreste bereits geschützt ist, konnte im Vergleich zum **o-4API** direkt die DMTr-Schützung durchgeführt werden, wobei das Produkt **27** mit einer Ausbeute von 49 % synthetisiert wurde. Die abschließende Synthese des **DMAPI**-Phosphoramidites **28** konnte auf eine quantitative Ausbeute gesteigert werden.



Schema 12: Synthese des **DMAPI**-Phosphoramidites **28**. a) Pd₂(dba)₃, TTBP·HBF₄, *N,N*-Dicyclohexylmethylamin, Dioxan, ü.N., 75 °C, **46 % + 11 %**; b) NEt₃·HF, THF, ü.N., RT, **quant.**; c) NaBH(OAc)₃, AcOH/MeCN, 1 h, 0 °C, **quant.**; d) DMTr-Cl, NEt₃, Pyridin, ü.N., RT, **49 %**; e) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, DCM, 4 h., RT, **quant.**

6.2 Synthese der RNA

Zusätzlich zu den Phosphoramidit-Bausteinen von **o-4API** und **DMAPI** wurde auch das Phosphoramidit des **DAPym** aus einer DMTr-geschützten Vorstufe von DR. MARCUS MERKEL synthetisiert (Kap. 8.2.4). Alle Bausteine wurden anschließend mittels automatisierter Festphasensynthese in RNA-Oligonukleotide eingebaut (Abb. 61). Hierbei wurden zur besseren Vergleichbarkeit die gleichen Sequenzen gewählt, mit denen bereits **m-4API**, **o-4API** und **DMAPI** in DNA in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT untersucht wurden.

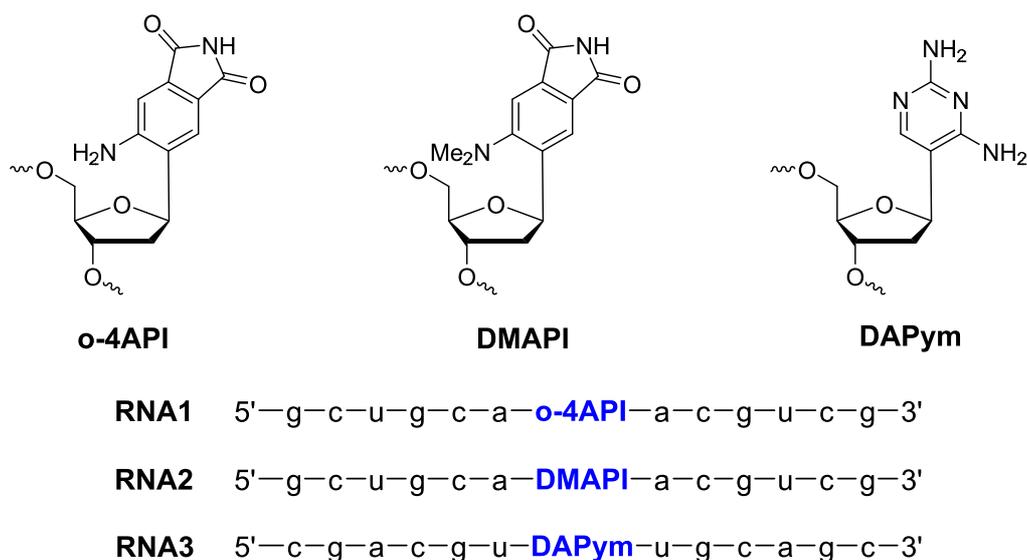


Abbildung 60: Die drei synthetisierten Bausteine o-4API, DMAPI und DAPym (oben) sowie die daraus synthetisierten RNA-Sequenzen **RNA1** – **RNA3** (unten).

Die automatisierte RNA-Festphasensynthese ist unter Standardbedingungen nicht möglich, da im Abspaltungs- und Entschützungsschritt eine 1:1 Lösung aus wässrigem Ammoniak und Methylamin in Methanol zum Einsatz käme. Das Phthalimid-Grundgerüst ist unter diesen Bedingungen jedoch nicht stabil und würde durch einen nukleophilen Angriff zerstört werden. Aus diesem Grund muss auf die *UltraMild*-Methode zur Entschützung zurückgegriffen werden. Im Vergleich zur Standardmethode erfolgt die Abspaltung von der festen Phase sowie die Entschützung der Standardbasen mit einer 0.05 M Kaliumcarbonatlösung in Methanol.^[176] Für die *UltraMild*-Methode sind jedoch weitere Anpassungen bei den Schutzgruppen der Standardbasen notwendig. Die Schützung der Aminogruppe von Adenosin erfolgt durch einen Phenoxyacetylrest und von Guanin durch den davon abgeleiteten Isopropylphenoxyacetylrest, während die Aminogruppe von Cytosin durch einen Acetylrest geschützt wird (Abb. 62). Dazu muss im *Capping*-Schritt des Synthesesyklus Phenoxyacetylsäureanhydrid anstatt

Essigsäureanhydrid verwendet werden, um einen Schutzgruppenwechsel an Guanin zu verhindern.

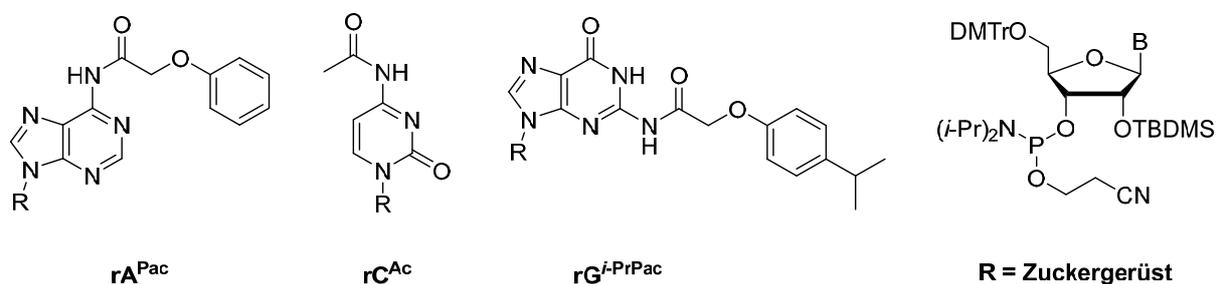
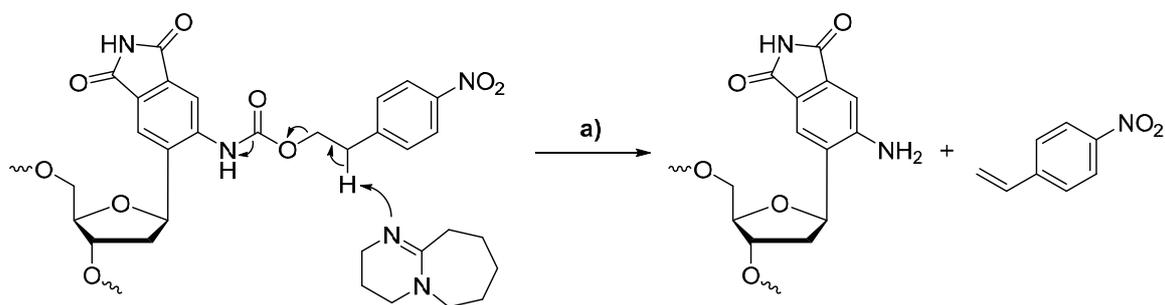


Abbildung 61: Phosphoramidit-Bausteine rA^{Pac} , rC^{Ac} , $rG^{i-PrPac}$ für die RNA-Synthese nach der *UltraMild*-Methode.

Für die Synthese von **RNA1-3** wurden die jeweiligen artifiziellen Phosphoramidit-Bausteine in Acetonitril (0.1 M) gelöst. Um einen effizienten Einbau zu gewährleisten, wurde die Kupplungszeit im Vergleich zu den Standardbasen von 400 s auf 1600 s erhöht. Nach erfolgreicher Synthese wurden die drei RNA-Stränge nach verschiedenen Methoden entschützt und abgespalten. Bevor die **RNA1** von der festen Phase abgespalten werden konnte, musste zunächst die NPEOC-Schutzgruppe entfernt werden. Hierzu wurde Diazabicycloundecen (DBU) in Pyridin verwendet, welches das NPEOC-Carbamat in einer β -Eliminierung von der Aminogruppe entfernt (Schema 13). Da das dabei entstehende Nitrostyrol in der Lage ist, die Nucleobasen zu alkylieren, wurde der Entschützungslösung zusätzlich Thymin als sogenannter *Scavenger* hinzugefügt.^[177]



Schema 13: Abspaltung der NPEOC-Schutzgruppe. a) DBU, Pyridin.

Nach Entfernung der NPEOC-Schutzgruppe wurde **RNA1** und **RNA2** mithilfe der *UltraMild*-Methode von der festen Phase abgespalten. Da für den **DAPym**-Baustein keine *UltraMild*-Bedingungen notwendig sind, wurde **RNA3** nach der *UltraFast*-Methode mit einer 1:1 Lösung

aus wässrigem Ammoniak und Methylamin in Methanol von der festen Phase abgespalten sowie die Benzoyl-Schutzgruppen am **DAPym** entfernt. Abschließend wurden die TBDMS-Schutzgruppen durch Inkubation der drei RNA-Stränge in $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ entfernt. Dieser Schritt wurde als letztes durchgeführt, da die RNA aufgrund der freien 2'-Hydroxygruppen durch RNasen angreifbar wird, die den RNA-Abbau katalysieren. Die Aufreinigung der synthetisierten RNA erfolgte mittels RP-HPLC unter RNase-freien Bedingungen.

6.3 Spektroskopische Untersuchungen

Für die optische Charakterisierung der **o-4API**- und **DMAPI**-RNA-Stränge wurden neben dem synthetisierten **DAPym**-Gegenstrang weitere RNA-Gegenstränge mit rA (**a**), rC (**c**), rG (**g**), U (**u**) und einer abasischen Stelle (**rS**) kommerziell erworben (Abb.63). Beide RNA-Stränge wurden als Einzelstrang und als Doppelstrang mit den jeweiligen RNA-Gegensträngen optisch vermessen.



Abbildung 62: Sequenzen der kommerziell erworbenen RNA-Gegenstränge.

6.3.1 Optische Charakterisierung der **o-4API**-RNA

In den Absorptionen des **RNA1**-Einzelstranges ist das Maximum von **o-4API** bei rund 385 nm zu erkennen. In den Doppelsträngen verschiebt sich dieses Maximum jedoch bathochrom je nach Gegenbase. Die größte Verschiebung um 15 nm auf ca. 400 nm weist dabei der **o-4API:DAPym**-Doppelstrang auf. Auch in den Emissionsspektren zeigt sich die Abhängigkeit der Gegenbase. Die niedrigste Fluoreszenz besitzt der **RNA1**-Einzelstrang, während die Emission in den Doppelsträngen stark von der Gegenbase abhängig ist (Abb. 64).

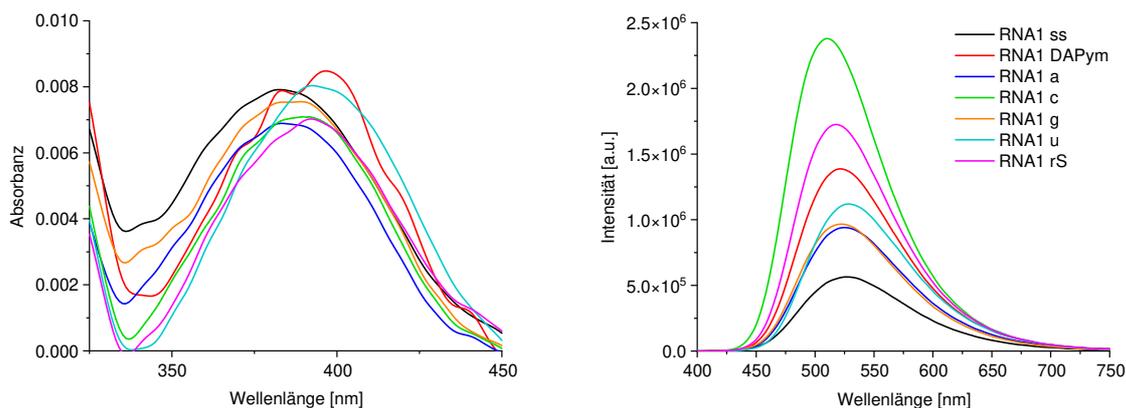


Abbildung 63: Absorption (links) und Emission (rechts) von **RNA1** im Einzel- und Doppelstrang in Abhängigkeit der Gegenbase; 2.5 μM RNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc}} = 385$ nm, Spaltbreite 3/3 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Im Vergleich zum Einzelstrang steigt die Fluoreszenzintensität in allen Doppelsträngen deutlich an, was auf die Einbettung des **o-4API** in die Doppelhelix zurückzuführen ist. Den größten Anstieg auf das Fünffache der ursprünglichen Intensität und zusätzlich eine hypsochrome Verschiebung um 15 nm weist dabei der **o-4API:c**-Doppelstrang auf, wohingegen der **o-4API:DAPym**-Doppelstrang nur die dritthöchste Fluoreszenz mit einem Anstieg auf das Dreifache zeigt. Die Ursache hierfür könnte die ideale Ausrichtung des RNA-Bausteins **c** zum **o-4API** in der Doppelhelix sein, wodurch die zwei möglichen Wasserstoffbrücken optimal ausgebildet werden können, ohne dass die beiden freien Carbonylgruppen repulsiv miteinander wechselwirken. Dahingegen besitzt das **DAPym** als DNA-Baustein eine C2'-endo-Konformation, die eine ideale Ausrichtung zum **o-4API** in der RNA-Helix verhindern könnte, wodurch bei keiner der beiden Aminogruppen des **DAPym** eine vollständige Wasserstoffbrückenbindung zum **o-4API** erfolgt (Abb. 65).

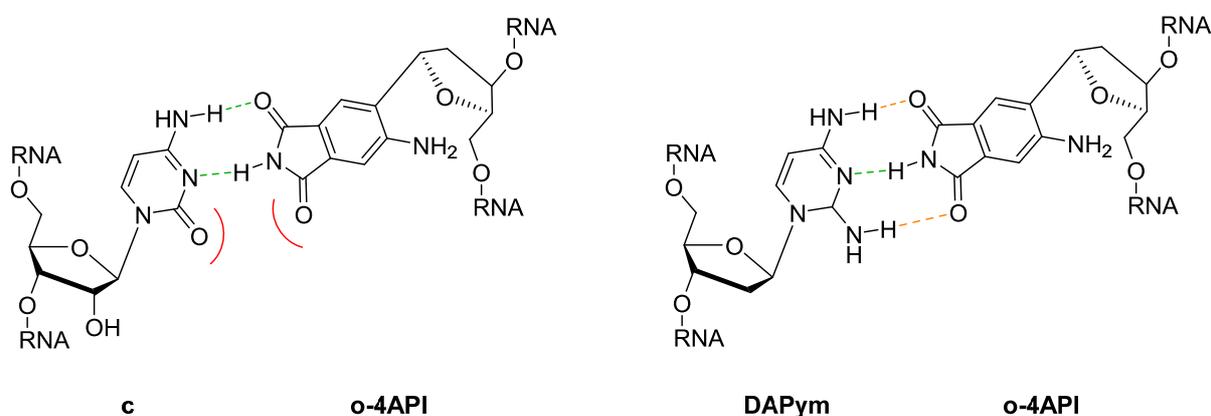


Abbildung 64: Mögliche Basenpaarung von **o-API** mit **c** (links) und **DAPym** (rechts).

Da durch die abasische Stelle keine Wasserstoffbrückenbildung möglich ist, kann sich das Aminophthalimid in den Basenstapel der Doppelhelix schieben, wodurch sich der starke Fluoreszenzanstieg des **o-4API:rS**-Doppelstranges erklären lässt. Begünstigt wird dies durch die geneigte Ausrichtung der Nucleobasen in der RNA A-Helix, die eine bessere Basenstapelung ermöglicht. Vergleichsweise gering fällt dagegen die Fluoreszenz im **o-4API:u**-Doppelstrang aus, was auf repulsive Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Obwohl **u** als Pyrimidin größenkomplementär zu **o-4API** wäre, stehen sich die Imidfunktionen der beiden Nucleobasen direkt gegenüber, wodurch keine Wasserstoffbrückenbildung möglich ist und sich die Nucleoside deshalb gegenseitig abstoßen (Abb. 66). Zudem könnte das Aminophthalimid dadurch auch aus der Basenstapelung gedrängt werden.

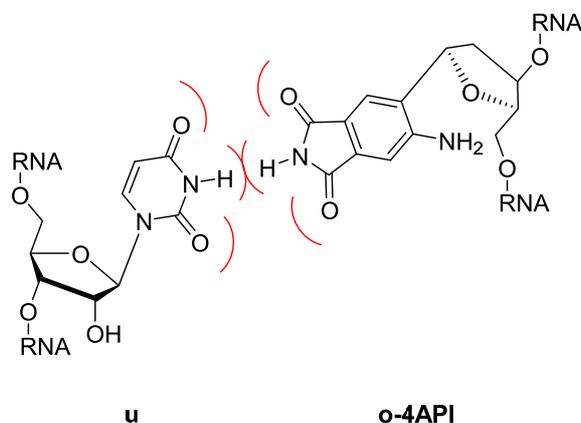


Abbildung 65: Mögliche Basenfehlpaarung von **o-4API** und **u**.

Den niedrigsten Fluoreszenzanstieg weist **o-4API** in den Doppelsträngen mit den Purinen **a** und **g** auf. Diese könnten aufgrund ihrer Größe das Aminophthalimid aus dem Basenstapel verdrängen, wodurch attraktive oder repulsive Wechselwirkungen sowie die Stapelung mit den Nachbarbasen verringert werden. Dies würde den geringen Anstieg im **o-4API:a**-Doppelstrang erklären, obwohl die Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken möglich wäre, wohingegen im **o-4API:g**-Doppelstrang eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwei repulsiven Wechselwirkungen gegenübersteht (Abb. 67).

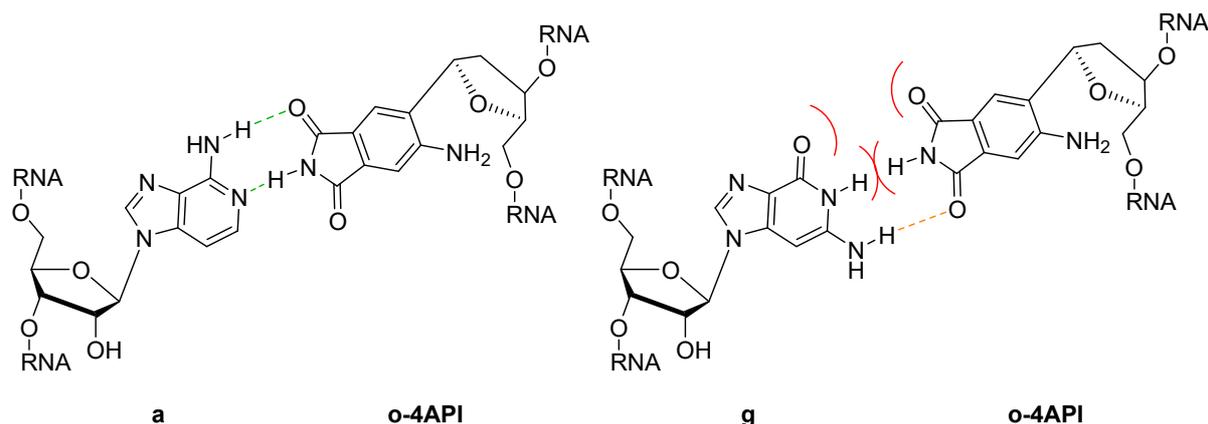


Abbildung 66: Mögliche Basen(Fehl)paarungen von **o-4API** mit **a** (links) und **g** (rechts).

6.3.2 Optische Charakterisierung der DMAPi-RNA

In den Absorptionsspektren ist bei den **RNA2**-Einzel- und Doppelsträngen das Absorptionsmaximum von **DMAPI** bei rund 405 nm zu erkennen, das im Vergleich zum **o-4API** bathochrom verschoben ist. Diese Verschiebung ist auf die beiden Methylreste zurückzuführen, deren induktiver Effekt zu einer Erhöhung der Elektronendichte im Aromaten führt. Wie bereits bei den spektroskopischen Untersuchungen von **DMAPI** in DNA-Oligonukleotiden ist die Fluoreszenz des Chromophores im Vergleich zum **o-4API** auch in den RNA-Oligonukleotiden extrem gelöscht, wodurch eine aussagekräftige Interpretation der Emissionsspektren kaum möglich ist. Die Ursache hierfür sind primär strahlungslose Energieverluste durch den TICT-Zustand und zusätzlich die sterische Hinderung der Methylreste, die eine Interkalation in den Basenstapel behindern.^[171-172]

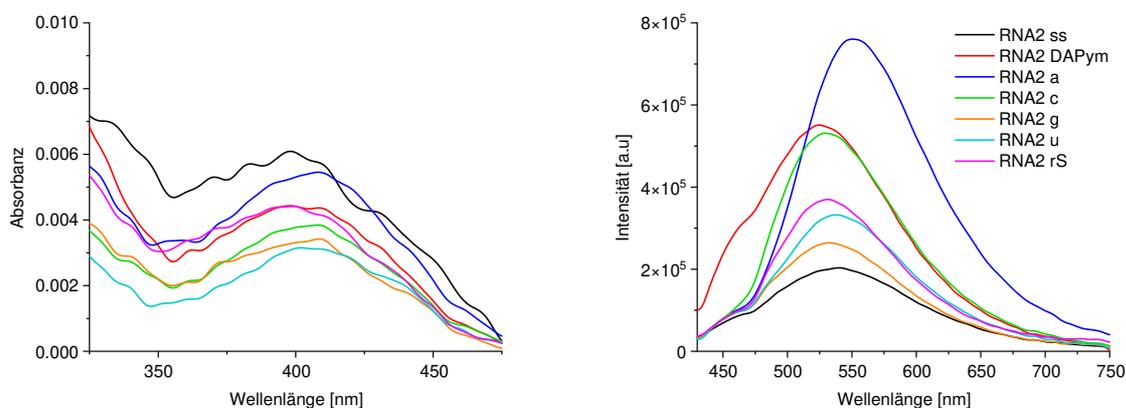


Abbildung 67: Absorption (links) und Emission (rechts) von **RNA2** im Einzel- und Doppelstrang in Abhängigkeit der Gegenbase; 2.5 μM RNA, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, Spaltbreite 9/9 nm; Glättung mit FFT-Filter.

6.4 Vergleich von o-4API und DMAPI in RNA

Nach den spektroskopischen Untersuchungen wurden zusätzlich die Schmelztemperaturen der verschiedenen RNA-Doppelstränge bestimmt (Tab. 7).

Für **o-4API** wurde bei den Gegenbasen mit dem höchsten Fluoreszenzanstieg **c** und **DAPym** ebenfalls die höchsten Schmelztemperaturen erhalten, was die vermuteten Strukturen in der Doppelhelix bestätigen würde. Danach folgt wie bei der Emission der **o-4API:u**-Doppelstrang im mittleren Bereich. Die beiden Purin-Nukleoside **a** und **g** weisen die niedrigsten Schmelztemperaturen aller Gegenbasen auf, was, wie der geringe Fluoreszenzanstieg, ebenfalls für eine Destabilisierung der Doppelhelix durch die Größeninkompatibilität spricht. An letzter Stelle ist der **o-4API:rS**-Doppelstrang aufgrund der Destabilisierung des Basenstapels durch die abasischen Stelle. Im Vergleich zum **o-API** zeigt sich, wie zu erwarten, bei den **DMAPI**-Doppelsträngen eine Verringerung der Schmelztemperaturen durch die sterische Hinderung der beiden Methylreste. Die zweithöchste Schmelztemperatur weist dabei überraschend der **DMAPI:a**-Doppelstrang auf, der jedoch auch den höchsten Fluoreszenzanstieg besitzt. Die eigentlich komplementären **c**- und **DAPym**-Doppelstränge besitzen dagegen im Vergleich zum **o-4API** rund 5 °C geringere Schmelztemperaturen. Aufgrund der fehlenden Gegenbase, wurde die niedrigste Schmelztemperatur ebenfalls beim **DAPI:rS**-Doppelstrang erhalten.

Tabelle 7: Schmelztemperaturen von **RNA1** bzw **RNA2**-Doppelsträngen in Abhängigkeit der Gegenbasen.

Gegenbase	T_m [°C]	
	RNA1 (o-4API)	RNA2 (DMAPI)
DAPym	65	60
a	62	61
c	64	59
g	60	58
u	63	62
rS	59	57

6.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Nucleoside **o-4API**, **DMAPI** und **DAPym** konnten über die Phosphoramidit-Festphasensynthese erfolgreich in RNA-Oligonucleotide eingebaut werden. Im Anschluss wurde in Abhängigkeit von der Gegenbase das Basenpaarungsverhalten der beiden Aminophthalimid-Derivate in optischen Charakterisierungen untersucht. Hierbei konnte im Vergleich zu den DNA-Oligonucleotiden von DR. MARCUS MERKEL leichte Unterschiede im Verhalten der Chromophore festgestellt werden. So zeigt **o-4API** das beste Basenpaarungsverhalten mit **c** als Gegenbase, während das komplementäre **DAPym** dahinter folgt. Aufgrund der Imidstruktur wird mit diesen beiden Gegenbasen in der RNA vermutlich je zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Mit den anderen Gegenbasen war das Basenpaarungsverhalten deutlich schlechter. Ursachen hierfür sind fehlende Möglichkeiten zum Ausbau von Wasserstoffbrückenbindungen (**u** und **g**) sowie Inkompatibilität der Größe zueinander (**a** und **g**). Wie auch bei den DNA-Oligonucleotiden konnten für **DMAPI** in RNA die Ergebnisse der optischen Spektroskopie nicht zuverlässig interpretiert werden, da durch den TICT-Zustand die Fluoreszenz zu stark gelöscht wird.

Für weitere spektroskopische Untersuchungen sollten die RNA-Bausteine von **o-4API** und **DAPym** synthetisiert werden. Aufgrund der zusätzlichen 2'-Hydroxygruppe sind diese Bausteine jedoch nicht über eine HECK-Reaktion zugänglich. Eine Möglichkeit der Synthese könnte die Reaktion als Aryllithium-Verbindung mit einem Ribono-Lacton und anschließender Desoxygenierung des entstehenden sekundären Alkohols über eine BARTON-MCCOMBIE-Reaktion sein.

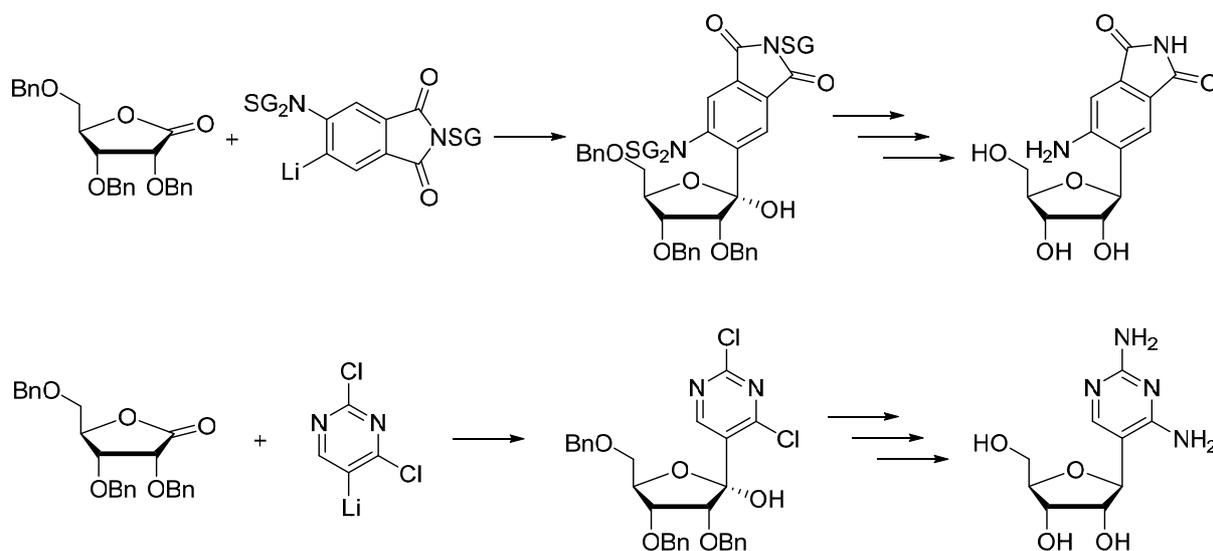


Abbildung 68: Mögliche Syntheserouten zur Darstellung von **o-4API** und **DAPym** RNA-Bausteinen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Fluoreszenzsonden für die Visualisierung von Oligonukleotiden *in vitro*, in Zellen, in humanem Darmgewebe und in Zebrafisch-Gehirnschnitten entwickelt.

Im ersten Projekt gelang die Synthese von 2'-*O*-Propargyl-L-uridin und dessen Einbau in doppelt modifizierte L-konfigurierte *Molecular Beacons*. Mit diesen wurden anschließend in spektroskopischen Untersuchungen und Zellexperimenten eine temperaturabhängige Änderung der Emissionswellenlänge sowie die Stabilität gegenüber zellulärer Umgebung für einen potentiellen Einsatz als intrazelluläre Thermometer nachgewiesen (Abb. 70).

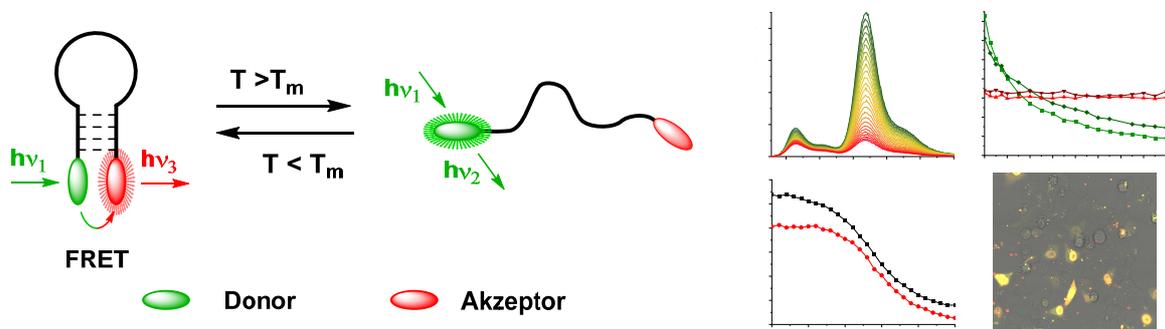


Abbildung 69: Schematische Darstellung der entwickelten intrazellulären Thermometer basierend auf doppelt modifizierten L-konfigurierten *Molecular Beacons*.

Des Weiteren wurden Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungssonden für die Detektion von miRNA in humanem Darmgewebe synthetisiert. Mit diesen konnten in FISH-Experimenten von normalem sowie Tumorgewebe mittels Konfokalmikroskopie erfolgreich ausgewählte miRNA visualisiert, anschließend quantifiziert und ihre metastatische Aktivität bestätigt werden (Abb. 71). Zusätzlich gelangen die ersten Einzelmolekülmikroskopie-Aufnahmen in Tumorgewebe eines regulären Patienten.

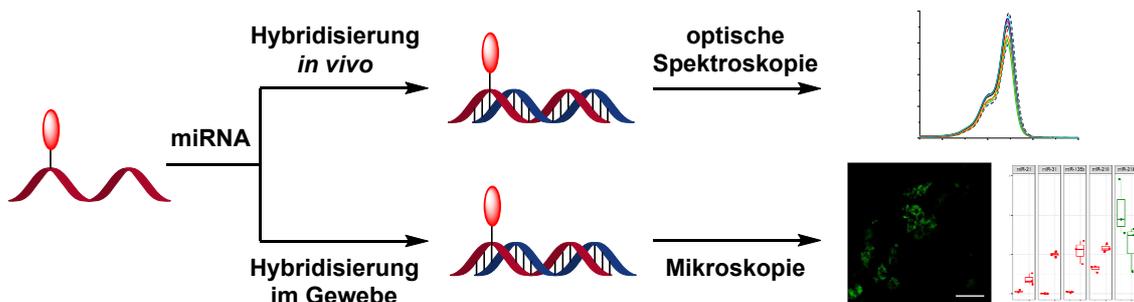


Abbildung 70: Schematische Darstellung der FISH-Sonden und der erfolgreichen Detektion von miRNA *in vitro* und in humanem Darmgewebe.

Darauf aufbauend wurden weitere FISH-Sonden zur Detektion von miRNA und mRNA in Zebrafisch-Gehirnschnitten entwickelt (Abb. 72). Hierbei wurden LNA-modifizierte FISH-Sonden erfolgreich für die Markierung ausgewählter miRNA in unverletztem sowie durch eine Stichwunde verletztem Zebrafisch-Telencephalon eingesetzt (A). Die Detektion von miR-9 mithilfe von FRET-Sonden zeigte in spektroskopischen Untersuchungen erste vielversprechende Ergebnisse, erfordert jedoch FISH-Experimente zur Verifizierung (B). Mit multiplen FISH-Sonden gelang zwar der Nachweis der mRNA von *prdm12b*, zeigte jedoch auch weiteren Optimierungsbedarf bei mRNA aus einer größeren Genfamilie (C).

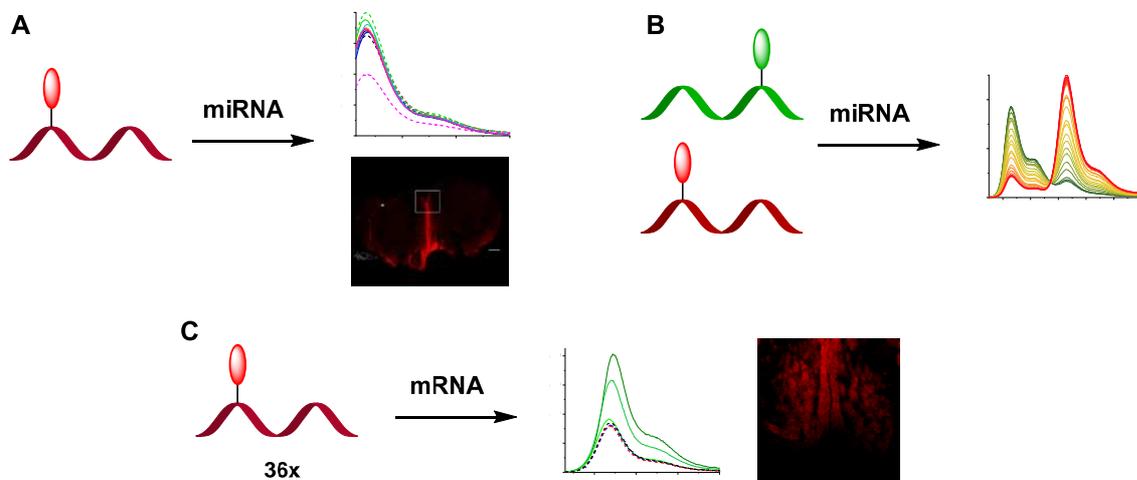


Abbildung 71: Schematische Darstellung dreier Typen von FISH-Sonden zur Detektion von miRNA und mRNA im Zebrafisch-Telencephalon; A: direkte Markierung; B: wellenlängenverschiebende FRET-Sonden; C: multiple FISH-Sonden.

Abschließend wurden erfolgreich die Phosphoramidit-Bausteine von **o-4API**, **DMAPI** sowie **DAPym** synthetisiert und mittels automatisierter Festphasensynthese in RNA eingebaut. In spektroskopischen Untersuchungen wurde die starke Emissionsabhängigkeit der 4-Aminophthalimid-Derivate von der Gegenbase gezeigt, wobei die Ergebnisse von **DMAPI** aufgrund der Fluoreszenzlöschung durch den TICT-Zustand nur eingeschränkt interpretierbar waren (Abb. 73).

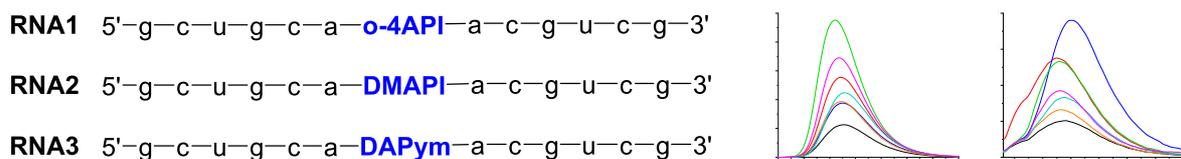


Abbildung 72: Sequenzen der synthetisierten RNA und schematische Darstellung der spektroskopischen Ergebnisse.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Materialien und Methoden

Reagenzien und Lösungsmittel

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, ALFA AESAR, FLUKA, MERCK, SIGMA ALDRICH, ROTH, TCI und VWR kommerziell erworben. Diese wiesen mindestens die Qualitätsstufe „zur Synthese“ auf. Die Farbstoff-Azide wurden von den Firmen LUMIPROBE, JENA BIOSCIENCE sowie ATTO-TEC bezogen. Die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe „*pro analysis*“ (p.a.). Trockene Lösungsmittel wurden dabei von ACROS ORGANICS bezogen und über Molekularsieb sowie unter Argonatmosphäre gelagert. Für die Aufreinigung an der RP-HPLC wurden hochreine organische Lösungsmittel (HPLC *grade*) von der Firma FISHER SCIENTIFIC sowie entionisiertes Wasser aus einer MERCK *Milli-Q Direct 8* Entsalzungsanlage verwendet. Deuterierte Lösungsmittel wurden von EURISOTOP erworben.

Reaktionsführung

Bei Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden die verwendeten Glasgeräte zuvor im Hochvakuum evakuiert, mit einem Heißluftföhn ausgeheizt und mehrfach mit Schutzgas (Argon 5.0, 99.999 % rein) geflutet. Feste Reagenzien wurden im Argongegenstrom und flüssige Reagenzien sowie Lösungsmittel mit Kunststoffspritzen und Teflonkanülen oder Mikroliterspritzen zugegeben.

Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurden mit den nachfolgenden Kältemischungen gekühlt:

0 °C	Eis / Wasser
-10-20 °C	NaCl / Eis
-78 °C	Trockeneis / Isopropanol

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten der Firma MERCK verwendet (60 F₂₅₄ Kieselgel, Schichtdicke 0.25 mm). Die Detektion erfolgte dabei durch Anregung mit UV-Lampen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm (Fluoreszenzlöschung) und $\lambda = 366$ nm (Fluoreszenzanregung). Nukleoside bzw. Zucker wurden mit einer schwefelsauren Methanol-Lösung (3 % H₂SO₄) angefärbt. Aromatische Verbindungen wurden mit einer Kaliumpermanganat-Lösung (450 mg KMnO₄, 630 mg

K₂CO₃, 45.0 mL H₂O, 750 µL 5 % NaOH-Lösung) angefärbt. Die DC-Platte wurde in die jeweilige Färbelösung eingetaucht und mit einem Heißluftföhn erhitzt.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Für die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma SIGMA ALDRICH (Porengröße 60 Å, Partikelgröße 40 – 60 µm) verwendet. Das zu reinigende Rohprodukt wurde entweder gelöst in wenig Laufmittel nass oder auf Kieselgel adsorbiert trocken aufgetragen und anschließend mit Seesand (reinst, mit HCl gereinigt) der Firma BERND KRAFT bedeckt. Der nötige Überdruck wurde mit einer Handpumpe erzeugt.

NMR-Spektroskopie

Die Analysen der Kernspinresonanz wurden an einem BRUKER *Avance Neo 400* oder *Avance 500* (Messfrequenz: ¹H = 500.13 MHz, ¹³C = 125.77 MHz, ³¹P = 202.45 MHz) durchgeführt. Hierfür wurden ca. 5 - 10 mg Probe in 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst und in ein Messröhrchen (Ø = 5 mm) überführt. Die chemische Verschiebung δ, referenziert auf Tetramethylsilan (TMS), wurde in *parts per million* (ppm) angegeben. Das Spektrum wurde mithilfe folgender Referenzwerte der unvollständig deuterierten Lösungsmittel kalibriert:

CD₂Cl₂	¹ H-NMR: d = 5.32 ppm	¹³ C-NMR: d = 54.00 ppm
CDCl₃	¹ H-NMR: d = 7.26 ppm	¹³ C-NMR: d = 77.16 ppm
DMSO-d₆	¹ H-NMR: d = 2.50 ppm	¹³ C-NMR: d = 39.52 ppm
MeOD-d₄	¹ H-NMR: d = 3.31 ppm	¹³ C-NMR: d = 49.00 ppm

Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben und die Multiplizitäten wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dublett), t (Triplet), dt (Dublett von Triplet), ddd (Dublett von Dublett von Dublett), m (Multiplet).

DNA/RNA-Festphasensynthese

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte unter Argonatmosphäre an einem *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE. Als feste Phase wurde *Controlled Pore Glass* (CPG) mit einer Belegung von 1 µmol (500 Å) verwendet. Alle Reagenzien, Phosphoramidite, Lösungsmittel und CPG-Säulchen wurden von CHEMGENES, GLEN RESEARCH / EUROGENTEC und SIGMA ALDRICH bezogen. Unmodifizierte Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt und lyophilisiert von METABION erworben. Diese wurden in einer definierten Menge entionisiertem

bzw. RNase-freiem Wasser gelöst und anschließend die Konzentration über die Absorption bei $\lambda = 260$ nm bestimmt.

RNase-freies Arbeiten

Für das Arbeiten mit RNA wurden zertifizierte RNase-freie Gebrauchsmaterialien (EPPENDORF-Gefäße, Pipettenspitzen, Falcons) verwendet. Glasgeräte wurden über Nacht in einem Trockenschrank bei 200 °C ausgeheizt. Handschuhe und Oberflächen wurden zuvor mit Ethanol desinfiziert. Für die Herstellung von RNase-freiem Wasser wurde entionisiertes Wasser mit 0.1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) für ca. 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zur Vernichtung von überschüssigem DEPC für weitere 2 h zum Sieden erhitzt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung der synthetisierten Oligonukleotide erfolgte an einem THERMO FISHER SCIENTIFIC System (*Dionex UltiMate3000* mit Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, RS Fluoreszenzdetektor, Fraktionssammler) unter Verwendung der Software *Chromeleon 7*). Für die semipräparative Trennung wurde eine *reversed-phase Supelco Discovery® BIO Wide Pore C18*-Säule (250 x 10 mm, 5 μ m) oder eine *VDSpher OptiBio PUR 300 S18-SE*-Säule (250 x 10 mm, 5 μ m) mit einer Flussrate von 2.5 mL/min verwendet. Zur analytischen Chromatographie wurde eine *VDSpher OptiBio PUR 300 S18-SE*-Säule (250 x 4.6 mm, 5 μ m) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.0 mL/min verwendet. Als mobile Phase für die Aufreinigung von DNA wurde ein 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5, Komponente A) verwendet, während RNA mit einem 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (Komponente A, RNase-frei, DEPC behandelt) aufgereinigt wurde. Die jeweilige Probe konnte mit steigendem Acetonitril-Gradienten (Komponente B) eluiert werden. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und der jeweiligen Wellenlänge der verwendeten Farbstoffe (Kap. 8.3.3).

Sublimationstrocknung

Wässrige Proben wurden an einem CHRIST *Alpha RVC* Vakuumkonzentrator oder eingefroren an einer CHRIST *Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage getrocknet.

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektrometrische Messungen wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie (IOC) sowie im Arbeitskreis *KAPPES* des Instituts für Physikalische Chemie (IPC) durchgeführt. Hierfür wurde ein *Finnigan MAT 95* der Firma THERMO ELECTRON CORP. verwendet, wobei die Probe durch *Fast Atom Bombardment* (FAB) ionisiert wurde. Für die Elektronensprayionisation (ESI) wurden eine *Q Exactive Orbitrap* sowie eine *LTQ Orbitrap XL* von THERMO FISHER SCIENTIFIC verwendet. Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) wurde an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von SHIMADZU durchgeführt. Nachfolgend sind die verwendeten Matrizen aufgeführt:

Oligonukleotide: 3-Hydroxypicolinsäure (ges. in Acetonitril/Wasser 1:1) /
Diammoniumhydrogencitrat (0.44 M in Wasser) = 9:1 (HPA)

Kleine Moleküle: 6-Aza-2-thiothymin (ATT ges. in Acetonitril)

Die Peaks wurden im Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) angegeben.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Oligonukleotid-Stammlösungen wurden an einem *ND-100 Spectrophotometer* der Firma NANODROP durchgeführt. Hierfür wurde der Modus *Nucleic Acid* bei $\lambda = 260$ nm verwendet. Die Berechnung der Konzentrationen aus den erhaltenen Messwerten erfolgte unter Verwendung des LAMBERT-BEER-Gesetzes.

Stationäre optische Spektroskopie

Die optischen Charakterisierungen der synthetisierten Oligonukleotide wurden in Quarzglasküvetten von STARNA (Schichtdicke 1 cm, Probenvolumen 1 mL) bei einer Temperatur von 20 °C bzw. 20 – 70 °C und an Sauerstoffatmosphäre durchgeführt. Die Spektren wurden mithilfe des jeweiligen Lösungsmittels basislinienkorrigiert.

UV/Vis-Absorptionsmessungen

Absorptionsspektren wurden an einem VARIAN *Cary 100 Bio* Spektrometer mit temperiertem Küvettenhalter (*Cary 100 temperature controller*) unter Verwendung der Software *Cary WinUV Scan Application* gemessen. Es wurden folgende Parameter ausgewählt: Durchschnittszeit 0.1 s, Datenintervall 1.0 nm, Scangeschwindigkeit 600 nm/Min, Lampenwechsel 350 nm.

Schmelztemperaturen

Die Messungen der Schmelztemperaturen von Oligonukleotid-Doppelsträngen wurden am selben Gerät wie die UV/Vis-Absorptionsmessungen durchgeführt, wobei als Software das Programm *Thermal* verwendet wurde. Dabei wurde die Absorptionsänderung der Oligonukleotide bei 260 nm in einem Temperaturbereich von 10-90 °C (Heiz- bzw. Kühlrate 0.7 °C/Min, Aufzeichnung der Messdaten pro 0.5 °C) detektiert. Die Temperatur am Start- und Endpunkt wurde jeweils für 10 min gehalten.

Fluoreszenzmessungen

Alle Emissionsspektren wurden an einem JOBIN-YVON *Fluoromax-3* mit Peltier Element (*LFI-3751*) bzw. einem *Fluoromax-4* vermessen. Es erfolgte eine Korrektur der Spektren durch die Raman-Streuung des reinen Lösungsmittels. Folgende Parameter wurden für die Messungen verwendet: Schrittweite 1.0 nm, Inkrementzeit 0.2 s, Integrationszeit 0.1 s, Spaltbreiten 2 nm, 3 nm bzw. 9 nm.

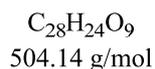
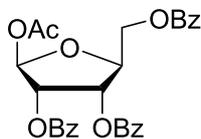
Fluoreszenzquantenausbeuten

Fluoreszenzquantenausbeuten wurden an einem *Quantaaurus QY C11347* der Firma HAMAMATSU in 5 mL Quarzglasküvetten gemessen.

8.2 Synthesevorschriften

8.2.1 Synthese von 2'-*O*-Propargyl-L-uridin und dessen Phosphoramidit

1-*O*-Acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-L-ribose (**3**)



Zu einer Lösung aus 3.00 g L-Ribose **2** (20.0 mmol, 1.00 eq) in 50 mL MeOH wurden 3.0 mL einer 1.25 M HCl/MeOH-Lösung gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, R_f = 0.3) nachgewiesen. Anschließend wurden 5 mL Pyridin hinzugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Prozess wiederholt.

Der gelbliche Rückstand wurde in 30 mL Pyridin und 15 mL Chloroform gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 11.6 mL Benzoylchlorid (100 mmol, 5.00 eq) hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels DC (Hexan/EE 7:3, R_f = 0.6) nachgewiesen. Die Reaktionsmischung wurde unter Rühren auf Eiswasser gegeben und anschließend mit Chloroform (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ca. 100 mL Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit Toluol versetzt und das Lösungsmittel erneut unter vermindertem Druck entfernt.

Der ölige Rückstand wurde in 12 mL Essigsäureanhydrid und 5.2 mL Eisessig (86.0 mmol, 4.30 eq) gelöst, im Eisbad tropfenweise mit 1.5 mL konz. Schwefelsäure versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels DC (Hexan/EE 7:3, R_f = 0.5) nachgewiesen. Die Reaktionsmischung wurde unter Rühren auf Eiswasser gegeben und mit Chloroform (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ca. 100 mL Wasser sowie ca. 100 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand aus ca. 180 mL Isopropanol umkristallisiert und das Produkt **3** (6.89 g, 15.7 mmol, 68 %) als weißer, kristalliner Feststoff erhalten.

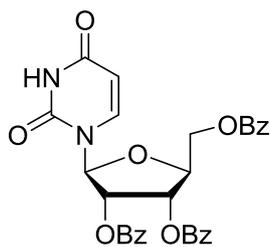
Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[145]

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.16 – 7.29 (m, 15H, Ph), 6.43 (s, 1H, H-1'), 5.91 (dd, $J = 7.0$ Hz, 4.8 Hz, 1H, H-3'), 5.79 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-2'), 4.82 – 4.74 (m, 2H, H-4', H-5'), 4.56 – 4.46 (m, 1H, H-5'), 2.00 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 169.2 (CH₃CO), 166.1 (C_{arom}CO), 165.5 (C_{arom}CO), 165.2 (C_{arom}CO), 133.8 – 129.0 (C_{arom}), 98.5 (C-1'), 80.1 (C-4'), 75.1 (C-2'), 71.5 (C-3'), 63.9 (C-5'), 21.0 (CH₃).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet [M-H]⁻: 503.1337, gefunden: 503.1338.

2',3',5'-O-Tribenzoyl-uracil-1-β-L-ribofuranosid (4)



$C_{30}H_{24}N_2O_9$
556.15 g/mol

2.50 g **3** (5.00 mmol, 1.00 eq) und 1.67 g Uracil (15.0 mmol, 3.00 eq) wurden unter Argonatmosphäre mit 60 mL Acetonitril sowie 5.70 mL BSA (22.5 mmol, 4.50 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei 65 °C bis zur vollständigen Lösung des Uracils gerührt. Anschließend wurde 0.87 mL TMSOTf (7.50 mmol, 1.50 eq) zugegeben und über Nacht bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde mit 300 mL DCM verdünnt, mit ca. 100 mL gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Hexan/EE 1:1) aufgereinigt. Das Produkt **4** (2.54 g, 4.57 mmol, 91 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

DC (Hexan/EE 1:1): $R_f = 0.3$

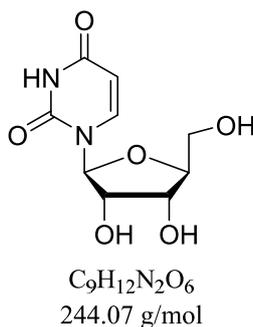
Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[145]

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 11.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, NH), 8.05 – 7.41 (m, 16H, Ph, H-6), 6.16 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1'), 5.97 – 5.88 (m, 2H, H-3', H-2'), 5.68 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2.1 Hz, 1H, H-5), 4.78 – 4.67 (m, 2H, H-4', H-5'), 4.64 (dd, $J = 11.9$ Hz, 5.5 Hz, 1H, H-5').

^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 165.5 ($C_{arom}CO$), 164.6 ($C_{arom}CO$), 164.6 ($C_{arom}CO$), 163.1 (C-4), 150.3 (C-2), 139.6 (C-6), 134.0 – 129.3 (C_{arom}), 102.3 (C-5), 89.6 (C-1'), 78.7 (C-4'), 73.2 (C-2'), 70.5 (C-3'), 63.7 (C-5').

HR-MS (FAB) m/z : berechnet $[M+H]^+$: 557.1555, gefunden: 557.1556.

L-Uridin (5)



2.00 g **4** (3.60 mmol, 1.00 eq) wurden mit 60 mL Methanol versetzt und unter Rühren 778 mg Natriummethanolat (14.4 mmol, 4.00 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und mit Dowex® 50WX8 neutralisiert. Anschließend wurde das Ionentauscher-Harz abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatografie (DCM/MeOH 5:1) aufgereinigt. Das Produkt **5** (739 mg, 3.03 mmol, 84 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

DC (DCM/MeOH 5:1): $R_f = 0.3$

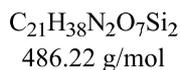
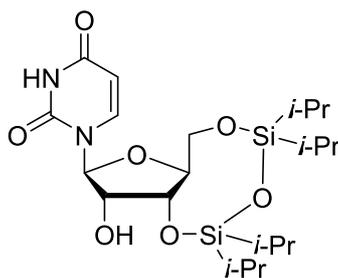
Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[145]

¹H NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄): δ (ppm) = 8.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6), 5.90 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-1'), 5.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 4.20 – 4.13 (m, 2H, H-3', H-2'), 4.01 (dt, $J = 4.6$ Hz, 3.0 Hz, 1H, H-4'), 3.84 (dd, $J = 12.3$ Hz, 2.7 Hz, 1H, H-5'), 3.73 (dd, $J = 12.9$ Hz, 3.2 Hz, 1H, H-5').

¹³C NMR (126 MHz, MeOD-*d*₄): δ (ppm) = 166.2 (C-4), 152.5 (C-2), 142.7 (C-6), 102.6 (C-5), 90.7 (C-1'), 86.3 (C-4'), 75.7 (C-2'), 71.3 (C-3'), 62.3 (C-5').

HR-MS (FAB) m/z : berechnet $[M+H]^+$: 245.0768, gefunden: 245.0770.

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-uracil-1-β-L-ribofuranosid (6)



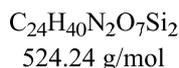
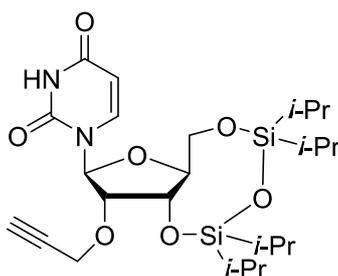
670 mg **5** (2.75 mmol, 1.00 eq) wurden unter Argonatmosphäre in 10 mL trockenem Pyridin gelöst. Es wurden 1.07 mL TIPDSiCl₂ (1.05 g, 3.32 mmol, 1.20 eq) unter Kühlung im Eisbad hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (DCM/EE 2:1) aufgereinigt. Das Produkt **6** (1.07 g, 2.20 mmol, 80 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

DC (DCM/EE 5:1): $R_f = 0.6$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 11.36 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, NH), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6), 5.58 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, OH-2'), 5.56 – 5.47 (m, 2H, H-1', H-5), 4.18 – 4.09 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.97 (dt, $J = 8.7$ Hz, 2.5 Hz, 1H, H-4'), 3.91 (dd, $J = 13.2$ Hz, 2.7 Hz, 1H, H-5'), 1.13 – 0.91 (m, 28H, CH₃, CH).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 163.2 (C-4), 150.1 (C-2), 139.8 (C-6), 100.9 (C-5), 90.5 (C-1'), 80.9 (C-4'), 73.5 (C-2'), 68.8 (C-3'), 60.2 (C-5'), 17.6 – 16.5 (CH₃), 12.9 – 11.7 (CH).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet $[M+H]^+$: 487.2290, gefunden: 487.2292.

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-propargyl-uracil-1-β-L-ribofuranosid (7)

730 mg **6** (1.50 mmol, 1.00 eq) wurden unter Argonatmosphäre in 20 mL trockenem THF gelöst und auf -10 °C gekühlt. Anschließend wurden 120.0 mg Natriumhydrid (60%ig in Paraffinöl) (3.00 mmol, 2.00 eq) in drei Portionen im Abstand von 15 Min zugegeben und anschließend für weitere 15 Min gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt, über 15 Min 0.67 mL Propargylbromid (80%ig in Toluol) (714 mg, 6.00 mmol, 4.00 eq) langsam zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mL Wasser gestoppt und anschließend mit EE (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ca. 100 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Hexan/EE 3:2) aufgereinigt. Das Produkt **7** (425 mg, 0.81 mmol, 54 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

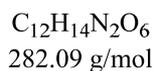
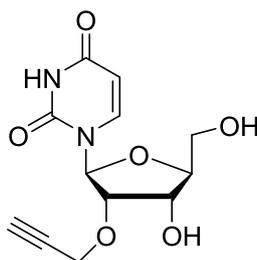
DC (Hexan/EE 1:1): $R_f = 0.6$

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 8.24 (s, 1H, NH), 7.89 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6), 5.74 (s, 1H, H-1'), 5.68 (dd, $J = 8.2$ Hz, 2.3 Hz, 1H, H-5), 4.60 – 4.51 (m, 2H, OCH₂), 4.27 – 4.22 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.16 – 4.10 (m, 2H, H-4', H-5'), 3.97 (dd, $J = 13.6$ Hz, 2.4 Hz, 1H, H-5'), 2.46 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, C≡CH), 1.13 – 0.94 (m, 28H, CH₃, CH).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 163.0 (C-4), 149.7 (C-2), 139.6 (C-6), 101.7 (C-5), 89.3 (C-1'), 81.9 (C-4'), 80.5 (C-2'), 79.4 (C≡CH), 75.4 (C≡CH), 68.3 (C-3'), 59.5 (C-5'), 58.2 (OCH₂), 18.4 – 16.4 (CH₃), 13.8 – 11.8 (CH).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet [M+H]⁺: 525.2447, gefunden: 525.2445.

2'-*O*-Propargyl-L-uridin (L-cU)



420 mg **7** (0.80 mmol, 1.00 eq) wurden in 16 mL trockenem THF gelöst und mit 1.00 mL TBAF-Lösung (1 M in THF) (523 mg, 2.00 mmol, 2.50 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 5 Min bei Raumtemperatur gerührt, anschließend auf eine kurze Kieselgel-Säule gegeben und mit DCM/MeOH 5:1 eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:1) aufgereinigt. Das Produkt **L-cU** (226 mg, 0.80 mmol, quant.) wurde als weißer Feststoff erhalten.

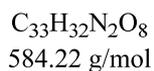
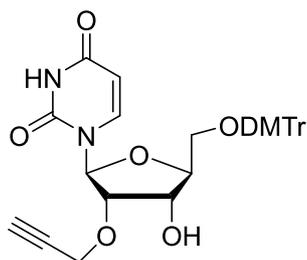
DC (DCM/MeOH 9:1): $R_f = 0.3$

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.36 (s, 1H, NH), 7.93 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6), 5.88 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 5.25 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, OH-3'), 5.17 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, OH-5'), 4.30 (dd, $J = 15.9$ Hz, 2.4 Hz, 1H, O-CH₂), 4.23 (dd, $J = 16.0$ Hz, 2.4 Hz, 1H, O-CH₂), 4.15 – 4.12 (m, 1H, H-3'), 4.09 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-2'), 3.87 (q, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4'), 3.63 (ddd, $J = 12.1$ Hz, 5.1 Hz, 3.0 Hz, 1H, H-5), 3.56 (ddd, $J = 12.1$ Hz, 4.9 Hz, 3.0 Hz, 1H, H-5'), 3.44 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, C≡CH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 163.1 (C-4), 150.6 (C-2), 140.5 (C-6), 102.0 (C-5), 85.8 (C-1'), 85.4 (C-4'), 79.9 (C-2'), 79.8 (C≡CH), 77.6 (C≡CH), 68.4 (C-3'), 60.6 (C-5'), 56.9 (OCH₂).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet $[M+H]^+$: 283.0925, gefunden: 283.0923.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-propargyl-uracil-1-β-L-ribofuranosid (8)



85 mg **L-cU** (0.30 mmol, 1.00 eq) wurden in 5 mL trockenem Pyridin gelöst, anschließend mit 132 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (0.39 mmol, 1.30 eq) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 2 mL MeOH zum Abstoppen der Reaktion zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 99:1 + 0.1 % NEt_3) aufgereinigt. Das Produkt **8** (140 mg, 0.24 mmol, 80 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

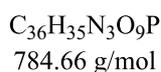
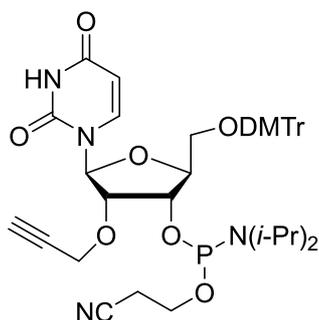
DC (DCM/MeOH 50:1 + 0.1% NEt_3): $R_f = 0.3$

1H NMR (500 MHz, MeOD- d_4): δ (ppm) = 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6), 7.46 – 7.21 (m, 9H, DMTr), 6.92 – 6.85 (m, 4H, DMTr), 5.97 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-1'), 5.23 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 4.48 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 4.44 (s, 1H, O-CH₂), 4.43 (s, 1H, O-CH₂), 4.29 (dd, $J = 5.2$ Hz, 3.5 Hz, 1H, H-2'), 4.11 – 4.05 (m, 1H, H-4'), 3.79 (s, 6H, OCH₂), 3.52 – 3.43 (m, 2H, H-5'), 2.92 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, C≡CH).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD- d_4): δ (ppm) = 166.1 (C-4), 160.4 (C_{arom}), 152.0 (C-2), 146.0 (C_{arom}), 142.4 (C-6), 142.4 (C_{arom}), 136.8 (C_{arom}), 136.5 (C_{arom}), 131.5 (C_{arom}), 131.4 (C_{arom}), 129.3 (C_{arom}), 129.9 (C_{arom}), 128.1 (C_{arom}), 114.3 (C_{arom}), 102.5 (C-5), 88.8 (C-1'), 88.4 (C-4'), 84.9 (C-2'), 76.7 (C≡CH), 70.2 (C≡CH), 63.4 (C-3'), 58.6 (C-5'), 55.8 (OCH₂).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet $[M]^+$: 584.2153, gefunden: 584.2152.

3'-O-((2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-propargyl-uracil-1-β-L-ribofuranosid (1)



105 mg **8** (0.18 mmol, 1.00 eq) wurden unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem DCM gelöst und anschließend mit 95.0 μL *N,N*-Diisopropylethylamin (70.0 mg, 0.54 mmol, 3.00 eq) sowie 60.0 μL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (63.6 mg, 0.27 mmol, 1.50 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend direkt, ohne Entfernen des Lösungsmittels, mittels Säulenchromatographie (DCM/Aceton 5:1 + 0.1% NEt_3) aufgereinigt. Das Produkt **1** (120 mg, 0.15 mmol, 85 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

DC (DCM/Aceton 5:1 + 0.1% NEt_3): $R_f = 0.7$

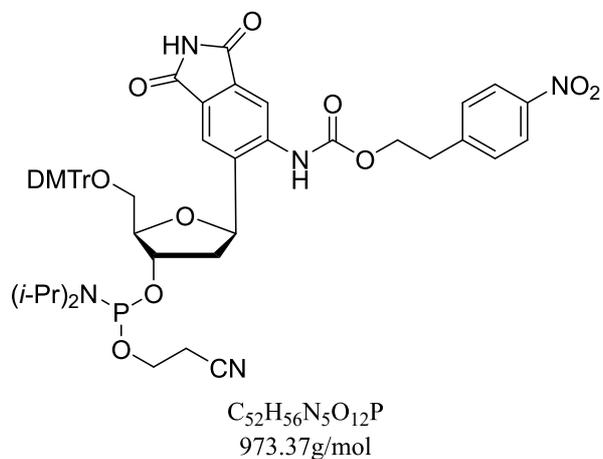
^{31}P NMR (202 MHz, CD_2Cl_2): $\delta(\text{ppm}) = 150.5$

MS (MALDI) m/z : 783.37 $[MH]^+$

8.2.2 Synthese der o-4API- und DMAPI-Phosphoramidite

o-4API-Baustein

Das **o-4API** und dessen Phosphoramidit **20** wurden nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert.

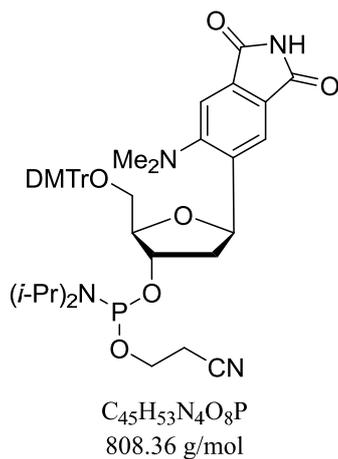


Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[144]

MS (MALDI) m/z: 970.71 [MH]⁺

DMAPI-Baustein

Das **DMAPI** und dessen Phosphoramidit **28** wurden nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert.



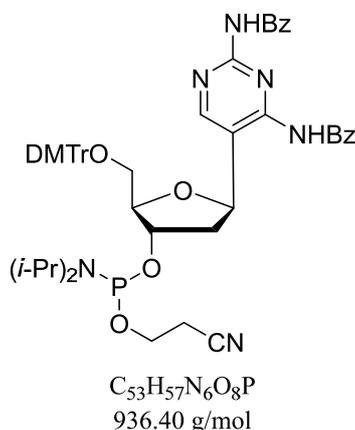
Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[144]

MS (MALDI) m/z: 806.71 [MH]⁺

8.2.3 Synthese des DAPym-Phosphoramidites

1 β -[2,4-Bis(benzoylamino)pyrimidin-5-yl]-1,2-dideoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*D*-ribofuranose-3-[(2-cyanoethyl)(*N,N*-diisopropyl)]-phosphoramidit (**30**)

Als Edukt für die Synthese wurde die DMTr-geschützte Vorstufe **29** aus dem Bestand von DR. MARCUS MERKEL verwendet.



74.0 mg **29** (0.10 mmol, 1.00 eq) wurden unter Argonatmosphäre in 3 mL trockenem DCM gelöst und anschließend mit 52.0 μ L *N,N*-Diisopropylethylamin (39.5 mg, 0.54 mmol, 3.00 eq) sowie 52 μ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (36.5 mg, 0.27 mmol, 1.50 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend direkt, ohne Entfernen des Lösungsmittels, mittels Säulenchromatographie (Hexan/Aceton 2:1 + 0.1 % NEt_3) aufgereinigt. Das Produkt **30** (73.0 mg, 0.078 mmol, 78 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[142]

MS (MALDI) m/z : 934.86 $[MH]^+$

8.3 Oligonukleotide

8.3.1 Synthese modifizierter DNA

Allgemein

Die synthetisierten artifiziellen Bausteine wurden mit der Phosphoramidit-Festphasensynthese unter Verwendung eines *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE in die Oligonukleotide eingebaut. Alle Phosphoramidite wurden in Acetonitril (0.067 M natürliche Phosphoramidite von SIGMA ALDRICH bzw. GLEN RESEARCH, 0.1 M käuflich erworbenes **cU**-Phosphoramidit von CHEMGENES, 0.1 M artifizielle Bausteine) in den Synthesizer eingesetzt. Als feste Phase dienten CPG-Säulchen von SIGMA ALDRICH mit einer Belegungsdichte von 1 μ M.

Syntheseprotokoll

Im Syntheseprotokoll können die einzelnen Teilschritte des Synthesesyklus festgelegt und bei Bedarf angepasst werden. Für den Einbau von Phosphoramiditen nicht-natürlicher Nukleoside ist es wichtig, die Menge der Reagenzien sowie die Kupplungsdauer im Kupplungsprotokoll anzupassen.

Tabelle 8: Standardsyntheseprotokoll.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
DEPROTECTION							
1	4	TCA		COL			
2	30	TCA		TRM	ON		
3					ON		
4						15	
5	25	TCA		TRM	ON		
6					ON		
7						15	
8	25	TCA		TRM	ON		
9					ON		
10						15	
11	25	TCA		TRM	ON		
12					ON		
13						15	
14	25	TCA		TRM	ON		

Experimenteller Teil

15					ON		
16						15	
17	30	GAS		TRM			
18	10	ACN		M_W			
19	20	ACN		COL	ON		
20					ON		
21						4	
22	30	GAS		COL			
23	2	ACN		M_W			
24	20	ACN		COL	ON		
25					ON		
COUPLING							
1	15	GAS		COL		2	
2	2	TET		COL	ON		
3					ON		
4						2	1
BRANCH							
1	4	TET		COL	ON		
2	8	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						10	
5	6	AMD	TET	COL	ON		
6					ON		
7						5	
8	10	ACN		M_W			
9	10	GAS		M_W			
COUPLING							
1	10	ACN		M_W		50	
2	10	ACN		COL	ON		
3					ON		
4	35	GAS		COL			
5	20	GAS		M_W			
CAPPING							
1	20	CP_A	CP_B	COL	ON		
2					ON		
3						15	

Experimenteller Teil

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	35	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						
17	15	ACN		COL	ON		
18					ON		
19	50						
20	10	GAS		M_W			
21	30	GAS		COL			

Experimenteller Teil

Wie bereits beschrieben wurde für den Einbau des **cU**-Phosphoramidites sowie der LNA-Phosphoramidite das Kupplungsprotokoll modifiziert.

Tabelle 9: Kupplungsprotokoll für **cU**-Phosphoramidit und LNA-Phosphoramidite.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
BRANCH							
1	4	TET		COL	ON		
2	4	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						60	
5						60	
6	4	AMD	TET	COL	ON		
7					ON		
8						60	
9						60	
10	10	ACN		M_W			
11	10	GAS		M_W			

Für den Einbau der L-DNA-Phosphoramidite und **1** wurde die Kupplungszeit nochmals erhöht.

Tabelle 10: Kupplungsprotokoll für L-DNA-Phosphoramidite und **1**.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
BRANCH							
1	4	TET		COL	ON		
2	4	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6	4	AMD	TET	COL	ON		
7					ON		
8						99	
9						99	
10	10	ACN		M_W			
11	10	GAS		M_W			

„Click“-Reaktion auf der festen Phase

Nach erfolgreicher Synthese des ersten Teils der *Molecular Beacon* Sequenz wurde die CPG-Säule im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde für die „Click“-Reaktion eine Reaktionslösung aus 228 µL Cy3-Azid-Lösung (10 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1), 34 µL Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1), 50 µL Natriumascorbat-Lösung (400 mM in ddH₂O) und 130 µL Acetonitril angesetzt. Diese Reaktionslösung wurde mithilfe von zwei 1 mL Spritzen gleichmäßig im CPG-Säulchen verteilt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 2 h bei 60 °C erhitzt und regelmäßig im Abstand von 30 Min durchmischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung entfernt und die CPG-Säule mit je 3 mL Acetonitril, ddH₂O, Na₂EDTA-Lösung (40 mM in ddH₂O), ddH₂O, Ethanol und abschließend 10 mL Acetonitril gespült bis keine Färbung der Spüllösung mehr zu erkennen war. Anschließend wurde die CPG-Säule im Hochvakuum getrocknet, wieder in den *H-6 DNA/RNA-Synthesizer* eingesetzt und der zweite Teil der *Molecular Beacon* Synthese durchgeführt.

Aufarbeitung

Nach erfolgreicher Synthese wurden die CPG-Säulchen im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Granulat in EPPENDORF-Gefäße mit *Safe-Lock-Deckel* überführt und mit 750 µL Ammoniumhydroxid-Lösung (>25 %, *trace select*, FLUKA) versetzt, um die Stränge von der festen Phase abzuspalten sowie Schutzgruppen zu entfernen. Die Suspension wurde über Nacht bei 55 °C im Heizblock erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und der Ammoniak im Vakuumkonzentrator (60 Min, 35 °C, 100 mbar) entfernt. Die überstehende Lösung wurde in ein weiteres EPPENDORF-Gefäß überführt und das Granulat dreimal mit je 200 µL ddH₂O gewaschen. Die vereinigte Lösung wurde abschließend lyophilisiert (25 °C, 0.1 mbar).

Voraufreinigung mittels *Glen-Pak*TM

Die Voraufreinigung der DMTr-on synthetisierten DNA-Stränge und die Abspaltung der Schutzgruppe wurde mit *Glen-Pak*TM *DNA Purification Cartridges* der Firma GLEN RESEARCH durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 0.5 mL Acetonitril gefolgt von 1.0 mL 2M Triethylaminacetat-Lösung äquilibriert. Die zuvor lyophilisierte DNA-Probe wurde in 1.0 mL ddH₂O sowie 1.0 mL 100 mg/mL NaCl-Lösung gelöst und auf die Säule gegeben. Anschließend wurden Abbruchstränge mit 2.0 mL Salzwashlösung (100 mg/mL NaCl in ddH₂O, 5 % MeCN) entfernt und durch Zugabe von 2 mL 2 %-iger TFA-Lösung die DMTr-Schutzgruppe abgespalten. Im nächsten Schritt wurde mit 2.0 mL ddH₂O eluiert, um

überschüssige Salze und TFA-Reste zu entfernen. Abschließend wurde mit 1.5 mL einer Lösung aus 1:1 Acetonitril/Wasser mit 0.5 % Ammoniak die aufgereinigte DNA von der Säule gespült. Die erhaltene DNA wurde anschließend lyophilisiert (25 °C, 0.1 mbar).

Postsynthetische „Click“-Reaktion

Zur Anknüpfung der Farbstoff-Azide an die Alkin-modifizierte Bausteine wurde eine „Click“-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden die lyophilisierten DNA-Stränge in 100 µL ddH₂O gelöst und nacheinander mit 114 µL Farbstoff-Azid-Lösung (10 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1), einem Gemisch aus 34 µL TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1) und 17 µL Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1) sowie 25 µL Natriumascorbat-Lösung (400 mM in ddH₂O) versetzt und für 2 h in einem Heizblock auf 60 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde regelmäßig im Abstand von 30 Min an einem Vortexmischer durchmischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in ein Falcon überführt und zum Ausfällen der DNA 150 µL Na₂EDTA-Lösung (40 mM in ddH₂O) sowie 450 µL Natriumacetat-Lösung (300 mM in ddH₂O) zugeben. Anschließend wurde das Falcon auf 8 mL mit Ethanol aufgefüllt und über Nacht bei -28°C im Gefrierfach aufbewahrt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert (5 Min, 4000 rpm), zweimal mit je 1 mL 80 %-igem Ethanol gewaschen und das DNA-Pellet im Hochvakuum getrocknet.

Reinigung modifizierter DNA mittels semipräparativer HPLC

Die Trennung der modifizierten DNA von unmodifizierten Strängen, Abbruchsträngen sowie überschüssigem Farbstoff wurde an einer semipräparativen RP-HPLC durchgeführt. Dazu wurde die unreine Probe in ca. 300 µL ddH₂O aufgenommen. Das Produkt konnte über die jeweilige Wellenlänge der angeknüpften Farbstoffe sowie der charakteristischen Absorptionswellenlänge von Oligonukleotiden detektiert und fraktionsweise aufgesammelt werden. Die verwendeten Gradienten sind in Kapitel 8.3.3 aufgelistet.

Charakterisierung durch Massenspektrometrie

Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels MALDI-TOF verifiziert. Die Massenspektren wurden wie in Kapitel 8.1 beschrieben vermessen. Alle reinen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der DNA-Proben nach dem LAMBERT-BEER-Gesetz zu berechnen, wurde die optische Dichte bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines Oligonukleotides bei 260 nm in Wasser ergibt sich dabei aus der Formel:

$$\epsilon_{260} = (A \cdot \epsilon_A + C \cdot \epsilon_C + G \cdot \epsilon_G + T \cdot \epsilon_T + cU \cdot \epsilon_{cU}) \cdot 0.9 \quad (4)$$

$$\epsilon_A = 15.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad \epsilon_C = 7.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_G = 11.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad \epsilon_T = 8.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

ϵ molarer Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 260$ nm

X Anzahl der Nukleoside im DNA-Strang

Faktor 0.9 berücksichtigt Hypochromizität der DNA

Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel 8.3.4 aufgeführt.

Tabelle 11: Molare Extinktionskoeffizienten der DNA-Modifikationen bei $\lambda = 260$ nm.

Modifikation	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
L-cU / cU	10.1
Cy3	4.9
Cy5	10.0
AF488	21.3

Hybridisierung

Die Hybridisierung der modifizierten Einzelstränge mit 1.00 eq. des komplementären Gegenstranges wurde in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP_i ; pH 7.0) und 250 mM Natriumchlorid-Lösung für 10 Min bei 90 °C durchgeführt. Um eine vollständige Hybridisierung zu gewährleisten, wurde anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Spektroskopie

Absorptions- und Emissionsmessungen einer 2.5 μM DNA-Lösung wurden in ddH₂O mit 10 mM NaP_i -Puffer (pH 7.0) und 250 mM NaCl-Lösung durchgeführt.

8.3.2 Synthese modifizierter RNA

Allgemein

Die Synthese der modifizierten RNA erfolgte an einem *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE, wobei die natürlichen Phosphoramidite sowie CPG-Säulchen von GLEN RESEARCH erworben wurden. Um eine effektivere Kupplung zu gewährleisten, wurde der reaktivere Activator 42[®] verwendet. Für ein RNase-freies Arbeiten wurden zudem alle Schläuche der Phosphoramidite mit Ethanol und Acetonitril gespült.

Syntheseprotokoll

Im Vergleich zur DNA-Synthese wurden aufgrund der sterisch anspruchsvollen 2'-*O*-TBDMS-Schutzgruppe die Kupplungszeiten erhöht.

Tabelle 12: Standardkupplungsprotokoll für RNA.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
COUPLING							
1	15	GAS		COL		2	
2	4	TET		COL	ON		
3					ON		
4						2	1
BRANCH							
1	4	TET		COL	ON		
2	6	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6	6	AMD	TET	COL	ON		
7					ON		
8						99	
9						99	
10	6	AMD	TET	COL	ON		
11					ON		
12						99	
13						99	
14	5	TET		COL	ON		
15					ON		

Experimenteller Teil

16	20	ACN		M_W			
17	20	GAS		M_W			
COUPLING							
1						90	
2	10	ACN		M_W		90	
3	10	ACN		COL	ON		
4					ON		
5	35	GAS		COL			
6	20	GAS		M_W			

Für einen möglichst effizienten Einbau der Phosphoramidite von **o-4API**, **DMAPI** und **DAPym** wurden die Kupplungszeiten nochmals stark erhöht.

Tabelle 13: Kupplungsprotokoll für **o-API**, **Me-API** und **DAPym**.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
BRANCH							
1	4	TET		COL	ON		
2	4	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6						99	
7						99	
8						99	
9						99	
10						99	
11						99	
12	4	AMD	TET	COL	ON		
13					ON		
14						99	
15						99	
16						99	
17						99	
18						99	
19						99	
20						99	

Experimenteller Teil

21						99	
22	5	TET		COL	ON		
23					ON		
24	20	ACN		M_W			
25	20	GAS		M_W			

Abspaltung nach der *UltraFast*-Methode

Im Anschluss an die RNA-Synthese wurden die CPG-Säulchen am Hochvakuum getrocknet und die RNA direkt auf dem CPG-Säulchen abgespalten. Hierzu wurde mithilfe von zwei 1 mL Spritzen eine 1:1 (v/v) Mischung aus konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (>25 %, *trace select*, FLUKA) und Methylamin-Lösung (33 % in Ethanol) gleichmäßig im CPG-Säulchen verteilt. Die Lösung wurde für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Abspalllösung in ein 2 mL EPPENDORF-Gefäß überführt, das CPG-Säulchen mit 0.5 mL Lösung nachgespült und für 10 Min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Ammoniak im Vakuumkonzentrator entfernt (60 Min, 34 °C, 100 mbar) und die RNA lyophilisiert (25 °C, 0.1 mbar).

Abspaltung nach der *UltraMild*-Methode

Im Anschluss an die RNA-Synthese wurden die CPG-Säulchen im Hochvakuum getrocknet, geöffnet und das CPG in ein EPPENDORF-Gefäß mit *Safe-Lock*-Deckel überführt. Das CPG wurde mit 1 mL Kaliumcarbonat-Lösung (0.05 M in Methanol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 6 µL Eisessig hinzugegeben, die Lösung abpipettiert und das CPG drei Mal mit 300 µL RNase-freiem Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuumkonzentrator entfernt (25 °C, 0.1 mbar).

Abspaltung der NPEOC-Schutzgruppe

Im Anschluss an die RNA-Synthese wurden die CPG-Säulchen im Hochvakuum getrocknet, geöffnet und das CPG in ein EPPENDORF-Gefäß mit *Safe-Lock*-Deckel überführt. Das CPG wurde mit 1 mL 0.5 M DBU sowie 40 mM Thymin in Pyridin versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 Min, 13000 rpm), der Überstand abpipettiert, das CPG drei Mal mit trockenem Pyridin gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die anschließende Abspaltung erfolgte nach der *UltraMild*-Methode.

Entfernung der TBDMS-Schutzgruppe

Um die TBDMS-Schutzgruppen zu entfernen, wurde die lyophilisierte RNA in 300 μL DMSO suspendiert, 300 μL $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ zugegeben und für 2.5 h bei 60 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 600 μL Isopropyltrimethylsilylether versetzt und die RNA mithilfe von Diethylether über Nacht bei -32 $^\circ\text{C}$ ausgefällt. Die ausgefallene RNA wurde zentrifugiert, überstehende Lösung abpipettiert, drei Mal mit 80 %igem Ethanol gewaschen und anschließend lyophilisiert.

Reinigung modifizierter RNA mittels semipräparativer HPLC

Um ein RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten, wurde die HPLC vor der Aufreinigung der RNA mit Ethanol gespült. Als Laufmittel wurde ein 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer in, mit DEPC behandeltem, RNase-freiem Wasser verwendet und die Stränge mit steigendem Acetonitril-Gehalt eluiert. Die verwendeten Gradienten und Detektionswellenlängen sind in Kapitel 8.3.3 aufgelistet.

Charakterisierung durch Massenspektrometrie

Wie bereits für die Massenbestimmung von DNA beschrieben, wurde auch die Analyse der RNA durchgeführt. Hierbei wurde allerdings eine RNase-freie Matrix (3-HPA) verwendet.

Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte analog zur DNA. Nachfolgend sind die verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten aufgelistet:

$$\epsilon_{260} = (r_A \cdot \epsilon_{rA} + r_C \cdot \epsilon_{rC} + r_G \cdot \epsilon_{rG} + r_U \cdot \epsilon_{rU}) \cdot 0.9 \quad (5)$$

$$\epsilon_{rA} = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad \epsilon_{rC} = 7.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{rG} = 11.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad \epsilon_{rU} = 9.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Tabelle 14: Molare Extinktionskoeffizienten von **o-4API**, **DMAPI** und **DAPym** bei $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Modifikation	$\epsilon_{260} [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
o-4API	22.7
DMAPI	12.4
DAPym	2.24

8.3.3 HPLC-Methoden

Tabelle 15: HPLC-Methoden zur Aufreinigung der modifizierten DNA-Sequenzen.

DNA	Modifikation	Gradient [% B in A]	Laufzeit [Min]	Temperatur [°C]	λ [nm]
LMB	L-cU + Cy3 + Cy5	0-50	40	40	260, 290, 555, 646
DMB	cU + Cy3 + Cy5	0-50	40	40	260, 290, 555, 646
h-FISH	cU + Cy5	0-40	40	40	260, 290, 646
h-FISH	cU + AF488	0-40	40	40	260, 290, 488
f-FISH	cU + Cy5	0-40	40	40	260, 290, 646
l-FISH	LNA + cU + Cy5	0-40	40	40	260, 290, 646
t-FISH	cU + Cy3	0-40	40	40	260, 290, 555
t-FISH	cU + Cy5	0-40	40	40	260, 290, 646
m-FISH	cU + Cy5	0-40	40	40	260, 290, 646

Tabelle 16: HPLC-Methoden zur Aufreinigung der synthetisierten RNA-Sequenzen.

RNA	Modifikation	Gradient [% B in A]	Laufzeit [Min]	Temperatur [°C]	λ [nm]
RNA1	o-4API	0-15	50	60	260, 290, 385
RNA2	DMAPI	0-15	50	60	260, 290, 400
RNA3	DAPym	0-15	50	60	260, 290, 310

8.3.4 Charakterisierung der Oligonukleotide

Molecular Beacons

Tabelle 17: Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der *Molecular Beacons*.

DNA	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	berechnete Masse [gmol ⁻¹]	gefundene Masse [gmol ⁻¹]
LMB1	336.2	11241.2	11242.2
LMB2	362.7	11857.3	11859.4
LMB3	353.3	11859.3	11862.4
LMB4	379.8	12475.4	12477.4
DMB1	336.2	11241.2	11243.5
DMB4	379.8	12475.4	12477.6

h-FISH-Sonden

Tabelle 18: Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der **h-FISH**-Sonden zur Detektion von miRNA in humanem Darmgewebe.

DNA	$\text{Ø}\epsilon_{260}$ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	berechnete Masse [gmol ⁻¹]	gefundene Masse [gmol ⁻¹]
h-FISH-21 Cy	243.1	7305.0	7303.6
h-FISH-31 Cy	211.3	6960.0	6959.2
h-FISH-135b Cy	272.8	7676.1	7681.9
h-FISH-210 Cy	225.1	7268.0	7272.7
h-FISH-218 Cy	245.1	7049.9	7053.0
Pos. Kontr. Cy	220.6	7278.9	7279.9
Neg. Kontr. Cy	231.1	7282.0	7284.1
h-FISH-21 AF	254.4	7397.9	7397.8
h-FISH-31 AF	222.6	7052.8	7054.8
h-FISH-135b AF	284.1	7769.0	7765.2
h-FISH-210 AF	236.4	7360.9	7367.6
h-FISH-218 AF	256.4	7142.8	7151.9
Pos. Kontr. AF	231.9	7371.8	7377.6
Neg. Kontr. AF	242.4	7374.9	7384.0

f-FISH-Sonden

Tabelle 19: Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der **f-FISH**-Sonden zur Detektion von miRNA in Zebrafisch-Gehirnschnitten.

DNA	$\text{Ø}\epsilon_{260}$ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	berechnete Masse [gmol ⁻¹]	gefundene Masse [gmol ⁻¹]
f-FISH-9	268.8	7636.0	7635.6
f-FISH-31	227.2	7241.9	7248.3
f-FISH-96	272.8	7692.0	7696.9
f-FISH-146a	237.8	7576.0	7577.6
f-FISH-182	233.8	7311.9	7313.9
f-FISH-183	246.3	7610.0	7612.9
f-FISH-726	226.5	7063.9	7063.2

l-FISH-Sonden

Tabelle 20: Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der LNA-modifizierten l-FISH-Sonden zur Detektion von miRNA in Zebrafisch-Gehirnschnitten.

DNA	$\emptyset\epsilon_{260}$ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	berechnete Masse [gmol ⁻¹]	gefundene Masse [gmol ⁻¹]
l-FISH-9	264.8	8028.3	8033.3
l-FISH-31	223.2	7634.2	7637.2
l-FISH-96	268.8	8084.3	8082.4
l-FISH-146a	233.8	7968.2	7970.5
l-FISH-182	229.8	7704.2	7704.7
l-FISH-183	242.3	8002.2	8006.3
l-FISH-726	222.5	7456.1	7458.8

t-FISH-Sonden

Tabelle 21: Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der t-FISH-Sonden zur Detektion von miR-9 in Zebrafisch-Gehirnschnitten.

DNA	$\emptyset\epsilon_{260}$ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	berechnete Masse [gmol ⁻¹]	gefundene Masse [gmol ⁻¹]
t-FISH1 Cy3	193.2	6034.7	6035.0
t-FISH1 Cy5	198.3	6060.8	6061.0
t-FISH2 Cy3	193.2	6034.7	6034.3
t-FISH2 Cy5	198.3	6060.8	6063.7
t-FISH3 Cy3	215.0	6101.8	6104.0
t-FISH3 Cy5	220.1	6127.9	6125.8

m-FISH-Sonden

Tabelle 22: Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der cU-modifizierten sowie der ersten drei Cy5-geclickten m-FISH-Sonden zur Detektion der mRNA von *prdm12b* in Zebrafisch-Gehirnschnitten.

DNA	$\emptyset\epsilon_{260}$ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	berechnete Masse [gmol ⁻¹]	gefundene Masse [gmol ⁻¹]
m-FISH1	211.2	6117.1	6116.3
m-FISH2	207.4	6082.1	6082.1
m-FISH3	217.2	6228.1	6228.1
m-FISH4	221.9	6227.1	6227.3
m-FISH5	182.2	6026.0	6026.5
m-FISH6	188.4	6137.0	6137.8

Experimenteller Teil

m-FISH7	206.6	6220.1	6221.5
m-FISH8	200.7	6114.1	6115.3
m-FISH9	211.3	6122.1	6124.1
m-FISH10	190.7	6162.0	6161.3
m-FISH11	219.2	6202.1	6203.7
m-FISH12	208.6	6194.1	6196.5
m-FISH13	204.7	6154.1	6157.5
m-FISH14	197.5	6135.0	6138.2
m-FISH15	193.4	6090.0	6092.6
m-FISH16	191.4	6121.0	6123.8
m-FISH17	202.7	6185.1	6188.3
m-FISH18	190.8	6065.0	6067.6
m-FISH19	204.8	6159.1	6161.8
m-FISH20	205.4	6215.1	6218.1
m-FISH21	204.0	6200.1	6202.6
m-FISH22	200.6	6211.1	6211.7
m-FISH23	173.7	6099.0	6097.9
m-FISH24	207.9	6235.1	6233.0
m-FISH25	204.6	6251.1	6249.6
m-FISH26	207.9	6235.1	6238.4
m-FISH27	204.6	6251.1	6254.0
m-FISH28	210.6	6163.1	6162.9
m-FISH29	204.6	6251.1	6254.7
m-FISH30	203.9	6195.1	6198.3
m-FISH31	209.3	6250.1	6253.1
m-FISH32	206.6	6123.1	6125.4
m-FISH33	178.8	6144.0	6147.5
m-FISH34	182.2	6026.0	6027.6
m-FISH35	222.4	6380.1	6381.9
m-FISH36	218.4	6340.1	6341.8
m-FISH1 Cy5	221.2	6682.9	6688.9
m-FISH2 Cy5	217.4	6647.9	6651.4
m-FISH3 Cy5	227.2	6793.9	6802.3
m-FISH1-36 Cy5	Ø 202.7	-	-

RNA

Tabelle 23: Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der synthetisierten RNA-Stränge RNA1 – RNA3.

RNA	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	berechnete Masse [gmol ⁻¹]	gefundene Masse [gmol ⁻¹]
RNA1	135.5	4148.8	4145.2
RNA2	125.2	4176.8	4172.5
RNA3	115.1	4096.8	4097.9

8.4 FISH-Experimente in humanen Darmgewebeschnitten

Mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeblöcke wurden von DR. ALEXANDER MARX (Universitätsmedizin Mannheim, Pathologisches Institut) zur Verfügung gestellt. Normales und Tumorgewebe stammten jeweils von demselben Patienten.

Probenvorbereitungen, FISH Experimente und die Mikroskopie wurden von DR. MARÍA CONTRERAS aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. CHRISTOPH CREMER (Institut für Molekulare Biologie, Mainz) durchgeführt. Dazu wurden die FFPE-Blöcke mit einem LEICA *RM2255-Rotationsmikrotom* in 10 µm dicke Schnitte sektioniert und auf Deckgläser aufgebracht. Die Gewebeschnitte wurden auf den Deckgläsern bei 65 ° C getrocknet und anschließend bei 4 °C maximal einen Monat gelagert. Für die FISH-Experimente wurden die getrockneten Gewebeschnitte mit einer Ethanolserie (100 %, 95 %, 70 %, 50 %, 25 %) rehydriert und mit entionisiertem Wasser sowie phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Für die Antigendemaskierung wurden die Gewebeschnitte für 15 Min mit einer Lösung aus 1 µg/mL Proteinase K in 50 mM Tris-Puffer versetzt. Anschließend wurde mit PTW (1x PBS + 0.1 % Tween-20) und PBS gewaschen. Die Proben wurden mit 0.5 % Triton-X in PBS permeabilisiert, zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in einer Ethanolreihe (25 %, 50 %, 70 %, 95 %, 100 %) dehydriert und für 5 Min an Luft getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden mit einer Hybridisierungslösung versetzt (50 % Formamid, 0.75 M NaCl, 75 mM Natriumcitrat, 50 mg/mL Heparin, 0.5 % Tween-20). Die FISH-Sonden wurden für 5 Min bei 80 °C denaturiert und als 200 mM Lösung in Hybridisierungspuffer zu den Proben gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37 °C. Abschließend wurde zweimal mit SSC-Puffer (NaCl, Natriumcitrat) gewaschen. Für die konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen wurde ein LEICA *TCS SP5 STED* Mikroskop mit 40x/1.10 bzw. 63x/1.20 Wasser-Immersionsobjektiv verwendet. Die Quantifizierung der positiven miRNA-Signale wurde mit der Software PERKINELMER *Columbus* durchgeführt. Einzelmolekül-

mikroskopie-Aufnahmen wurden mit einem LEICA SR GSD System basierend auf einem *inverted widefield DMI AF6000* Mikroskop mit 160x/1.43 Öl-Immersionsobjektiv sowie einem ANDOR TECHNOLOGIES *iXon3 Ultra 897* Sensor mit einer Pixelgröße von 100 nm aufgenommen. Die Rekonstruktion erfolgte mit der Software *ThunderSTORM*.

8.5 FISH-Experimente an Zebrafisch-Gehirnschnitten

Die Sektionierung der Zebrafisch-Gehirnschnitte, die Hybridisierung mit den FISH-Sonden sowie die mikroskopischen Aufnahmen wurden von LUISA LÜBKE aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. UWE STRÄHLE / DR. SEPAND RASTEGAR (KIT, Institut für Biologische und Chemische Systeme) durchgeführt.

Zunächst wurden Zebrafischgehirne seziiert und in 100 % Methanol bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Gehirne mit einer Methanolkette (75 %, 50 % bzw. 25 %) in PBS rehydriert und viermal mit PTW gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Gehirne in einem ProtK-PTW-Puffer (Proteinase K + PTW) für 30 Min inkubiert und danach in einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die Gehirne wurden fünfmal mit PTW und im Anschluss mit einer Waschlösung (10 % Formamid, 2x SSC, 0.1 % Tween-20 in Wasser) gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Gehirne in 2 %-ige Agarose eingebettet, mit einem LEICA *Vibratom* in 50 µM dicke Schnitte sektioniert und Hirnschnitte aus dem Telencephalon gesammelt.

Es wurde jeweils ein Hirnschnitt in einem 1.5 mL EPPENDORF-Gefäß mit einer Hybridisierungslösung (10 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 0.02 % RNase-freie BSA, 50 µg tRNA, 2x SSC in Wasser) für 3 – 4 h individuell vorhybridisiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, daraufhin 500 µL frische Hybridisierungslösung hinzugegeben, welche mit 5 – 50 ng FISH-Sonde versetzt wurde, und abschließend über Nacht individuell hybridisiert (Tab. 24). Die Lösung wurde vorsichtig entfernt und der Hirnschnitt fünfmal gewaschen (10 % Formamid, 2x SSC, 0.1 % Tween-20 in Wasser). Für die DAPI-Anfärbung wurde der Hirnschnitt mit 300 µL Waschlösung mit 5 µg/mL DAPI für 20 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die konfokalen Laser-Scan-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen wurden an einem LEICA *TCS SP5 DM6000B* Mikroskop mit 10x-, 40x- sowie 63x-Objektiv aufgezeichnet.

Tabelle 24: Hybridisierungstemperaturen für die verschiedenen FISH-Sonden.

Sonden	T _{Hyb} [°C]
f-FISH	40 – 43
l-FISH	34 – 54
t-FISH	37
m-FISH	72

8.6 Zellexperimente der *Molecular Beacons*

Die Probenvorbereitung wurde unter Anleitung von DR. FRANZISKA RÖNICKE eigenständig durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten durch DR. FRANZISKA RÖNICKE.

Humane Cervix-Karzinomzellen (HeLa wt) wurden unter sterilen Bedingungen in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-Medium) mit 60 µg/mL Penicilin, 100 µg/mL Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FKS, GIBCO) bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur 80 %-igen Konfluenz adhärent kultiviert. Die Zellen wurden zum Passagieren mit PBS gewaschen, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (10 mL 0.25 %-ige Trypsin-Lösung, 10 mL 5 mM EDTA-Lösung, 30 mL PBS) abgelöst und in DMEM-Medium wieder aufgenommen. Die Anzahl der Zellen wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Es wurden 24 h vor der Transfektion 4 x 10⁴ HeLa Zellen pro Kammer in einem 8-well-Zellkultur-Objektträger (IBIDI® *µ-Slide 8-well*) in 200 µL *Opti-MEM*TM-Medium ausgesät. 5 µL *Opti-MEM*TM-Medium wurde mit 0.30 µL *Lipofectamin*TM versetzt sowie 0.2 µg DNA in 10 µL *Opti-MEM*TM-Medium gegeben. Anschließend wurden je 5 µL der beiden Mischungen vereint und für 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde mit 200 µL *Opti-MEM*TM-Medium verdünnt und die Lösung zu den Zellen gegeben. Für die konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen wurde ein LEICA *DMi8 TCS SPE* Mikroskop mit *HC PL APO CS2 63x/1.30 Öl-* Immersionsobjektiv verwendet. Hierbei wurde der Donorfarbstoff Cy3 bei einer Wellenlänge von $\lambda_{exc} = 488$ nm mit einem Argon-Ionen-Laser angeregt und die Fluoreszenz der *Molecular Beacons* bei $\lambda_{em} = 545 - 585$ nm für Cy3 sowie $\lambda_{em} = 650 - 690$ nm für Cy5 mit einer Bildauflösung von 1024 x 1024 Pixel aufgenommen. Die erste Aufnahme erfolgte direkt nach Zugabe der DNA-*Lipofectamin*TM-Lösung zu den Zellen. Anschließend wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und stündlich eine neue Aufnahme mit der Software *Leica LAS X* durchgeführt. Die Software *Leica LAS AF Lite* wurde zur Auswertung und Bearbeitung der Zellbilder verwendet.

8.7 Zusätzliche Spektren und Daten

8.7.1 Molecular Beacons

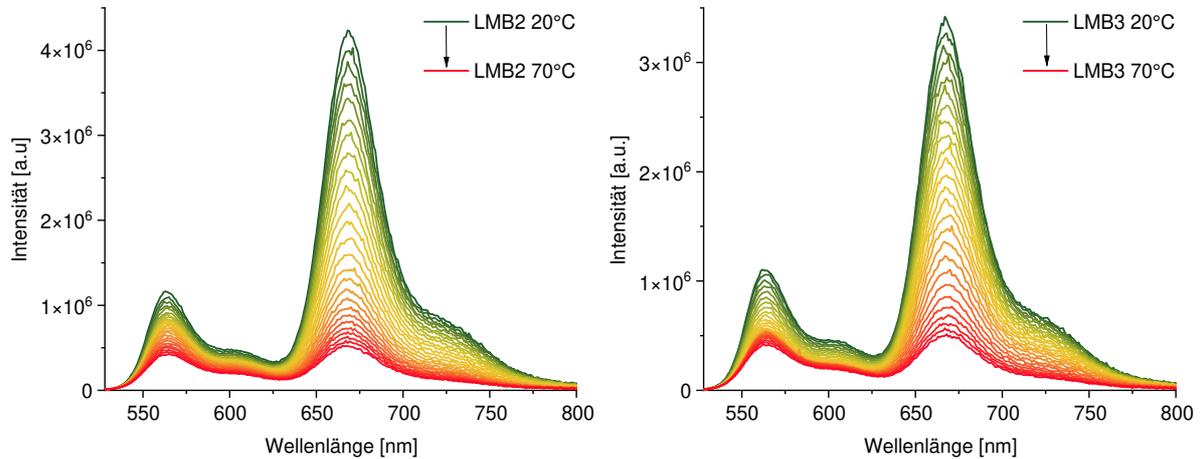


Abbildung 73: Temperaturabhängige Emission von **LMB2** und **LMB3** im Bereich von 20 – 70 °C; 2.5 μ M DNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, λ_{exc} = 518 nm, Spaltbreite 3/3 nm.

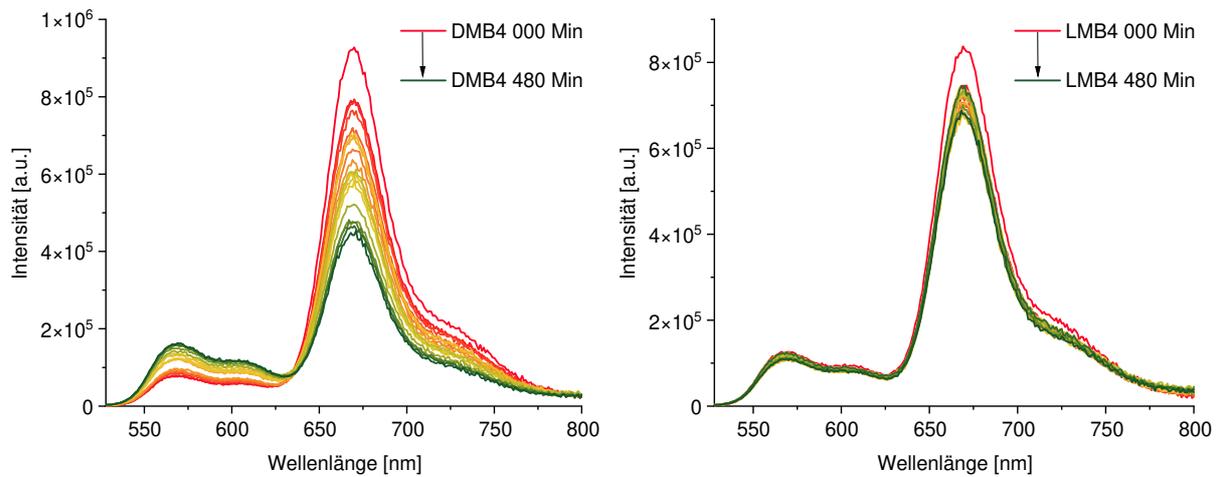


Abbildung 74: Zeitabhängige Emission von **DMB4** und **LMB4** in Zelllysate; 2.5 μ M DNA, 37 °C, λ_{exc} = 518 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

8.7.2 t-FISH-Sonden

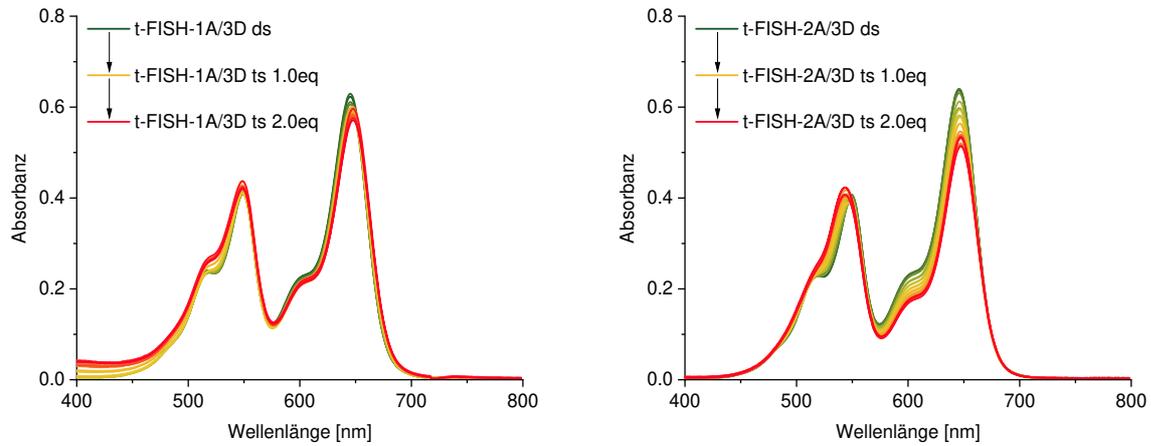


Abbildung 75: Absorption von **t-FISH-1A/3D** (links) und **t-FISH-2A/3D** (rechts) in Abhängigkeit der Äquivalente miR-9; 2.5 μM Sonden, 0 – 5 μM RNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

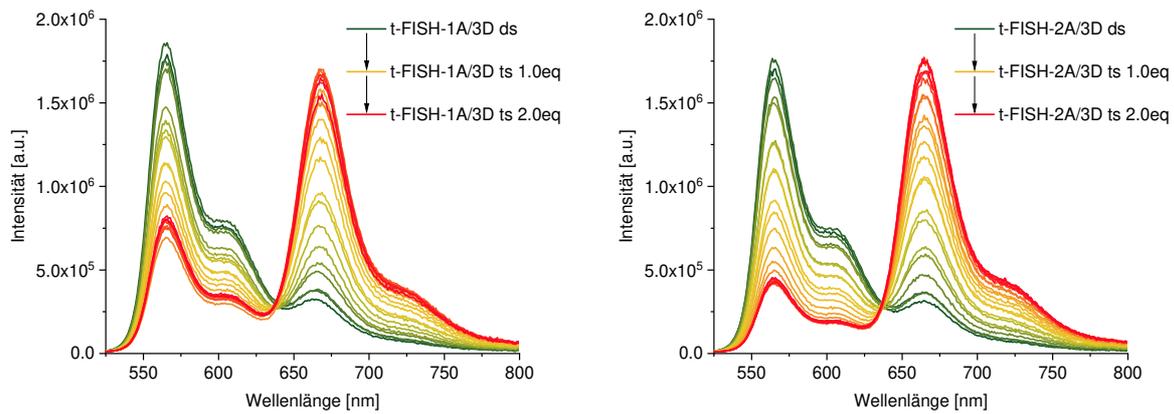


Abbildung 76: Emission von **t-FISH-1A/3D** (links) und **t-FISH-2A/3D** (rechts) in Abhängigkeit der Äquivalente miR-9; 2.5 μM Sonden, 0 – 5 μM RNA, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm, Spaltbreite 2/2 nm.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. Hell, www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/hell/speech (06.06.2021).
- [2] E. Abbe, *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **1873**, 9, 413-468.
- [3] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 62, 2535-2538.
- [4] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780-782.
- [5] T. A. Klar, S. W. Hell, *Opt. Lett.* **1999**, 24, 954-956.
- [6] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, 313, 1642-1645.
- [7] D. Baddeley, C. Batram, Y. Weiland, C. Cremer, U. J. Birk, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2640-2646.
- [8] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *PNAS* **2006**, 103, 18911.
- [9] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2579-2619.
- [10] K. Wang, J. Huang, X. Yang, X. He, J. Liu, *Analyst* **2013**, 138, 62-71.
- [11] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Physiol.* **1962**, 59, 223-239.
- [12] O. Shimomura, *J. Microsc.* **2005**, 217, 3-15.
- [13] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1589-1600.
- [14] G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, 3, 042001.
- [15] M. F. Debets, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6439-6455.
- [16] Craig S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 1075-1101.
- [17] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 16-20.
- [18] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 8968-8989.
- [19] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.
- [20] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [21] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046-15047.
- [22] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895-4950.
- [23] C. P. Ramil, Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 89-95.
- [24] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2494-2507.
- [25] R. Huisgen, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 403-419.
- [26] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [27] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.
- [28] R. Berg, B. F. Straub, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2715-2750.

- [29] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457-460.
- [30] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1152.
- [31] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993-18001.
- [32] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [33] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570-14576.
- [34] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893-16899.
- [35] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [36] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [37] J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486-9494.
- [38] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodivers.* **2006**, *3*, 509-514.
- [39] F. Seela, H. Xiong, P. Leonard, S. Budow, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1374-1387.
- [40] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [41] A. M. Jawalekar, N. Meeuwenoord, J. G. O. Cremers, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 287-290.
- [42] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2230-2231.
- [43] M. Aigner, M. Hartl, K. Fauster, J. Steger, K. Bister, R. Micura, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 47-51.
- [44] K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 581-589.
- [45] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.
- [46] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55-75.
- [47] B. Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [48] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 187-191.
- [49] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 103-110.
- [50] M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641-2684.

- [51] L. Stryer, R. P. Haugland, *PNAS* **1967**, 58, 719-726.
- [52] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem* **1978**, 47, 819-846.
- [53] J. W. Borst, A. J. W. G. Visser, *Meas. Sci. Technol.* **2010**, 21.
- [54] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303-308.
- [55] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1191-1196.
- [56] V. V. Didenko, *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, **2006**.
- [57] Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1044-1056.
- [58] C. E. Rowland, C. W. Brown, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, *Methods Appl Fluoresc* **2015**, 3, 042006.
- [59] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4562-4589.
- [60] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142-155.
- [61] S. Preus, L. M. Wilhelmsson, *ChemBioChem* **2012**, 13, 1990-2001.
- [62] X. Fang, J. J. Li, J. Perlette, W. Tan, K. Wang, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 747 A-753 A.
- [63] D. M. Kolpashchikov, *Scientifica* **2012**, 2012, 17.
- [64] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 402-405.
- [65] P. R. Bohländer, M. L. Abba, F. Bestvater, H. Allgayer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 5001-5006.
- [66] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, 13, 1136-1138.
- [67] K. Okabe, R. Sakaguchi, B. Shi, S. Kiyonaka, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2018**, 470, 717-731.
- [68] M. M. Ogle, A. D. Smith McWilliams, B. Jiang, A. A. Martí, *ChemPhotoChem* **2020**, 4, 255-270.
- [69] M. Karnebogen, D. Singer, M. Kallerhoff, R. H. Ringert, *Thermochim. Acta* **1993**, 229, 147-155.
- [70] N. G. Waterman, L. Goldberg, T. Appel, *Am. J. Surg.* **1969**, 118, 31-35.
- [71] I. S. Singh, J. D. Hasday, *Int. J. Hyperthermia* **2013**, 29, 423-435.
- [72] H. Rosenberg, N. Pollock, A. Schiemann, T. Bulger, K. Stowell, *Orphanet J. Rare Dis.* **2015**, 10, 93.
- [73] S. Lal, S. E. Clare, N. J. Halas, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1842-1851.
- [74] G. Ke, C. Wang, Y. Ge, N. Zheng, Z. Zhu, C. J. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 18908-18911.

- [75] C. F. Chapman, Y. Liu, G. J. Sonek, B. J. Tromberg, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 416-425.
- [76] S. Uchiyama, Y. Matsumura, A. P. de Silva, K. Iwai, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5926-5935.
- [77] V. Tseeb, M. Suzuki, K. Oyama, K. Iwai, S. i. Ishiwata, *HFSP Journal* **2009**, *3*, 117-123.
- [78] K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 705.
- [79] T. Barilero, T. Le Saux, C. Gosse, L. Jullien, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7988-8000.
- [80] H. Urata, K. Shinohara, E. Ogura, Y. Ueda, M. Akagi, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8174-8175.
- [81] K. P. Williams, X.-H. Liu, T. N. M. Schumacher, H. Y. Lin, D. A. Ausiello, P. S. Kim, D. P. Bartel, *PNAS* **1997**, *94*, 11285-11290.
- [82] Y. Kim, C. J. Yang, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7279-7287.
- [83] A. T. Jonstrup, J. Fredsøe, A. H. Andersen, *Sensors* **2013**, *13*.
- [84] S. Ebrahimi, Y. Akhlaghi, M. Kompany-Zareh, Å. Rinnan, *ACS Nano* **2014**, *8*, 10372-10382.
- [85] D. Gareau, A. Desrosiers, A. Vallée-Bélisle, *Nano Lett.* **2016**, *16*, 3976-3981.
- [86] C. D. S. Brites, P. P. Lima, N. J. O. Silva, A. Millán, V. S. Amaral, F. Palacio, L. D. Carlos, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4799-4829.
- [87] T. Qin, B. Liu, K. Zhu, Z. Luo, Y. Huang, C. Pan, L. Wang, *Trends Anal. Chem.* **2018**, *102*, 259-271.
- [88] M. Nakano, T. Nagai, *J. Photochem. Photobiol. C* **2017**, *30*, 2-9.
- [89] J. G. Gall, M. L. Pardue, *PNAS* **1969**, *63*, 378-383.
- [90] M. L. Pardue, J. G. Gall, *PNAS* **1969**, *64*, 600-604.
- [91] P. R. Langer-Safer, M. Levine, D. C. Ward, *PNAS* **1982**, *79*, 4381-4385.
- [92] P. Komminoth, F. B. Merk, I. Leav, H. J. Wolfe, J. Roth, *Histochemistry* **1992**, *98*, 217-228.
- [93] J. M. Levisky, R. H. Singer, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2833-2838.
- [94] G. T. Rudkin, B. D. Stollar, *Nature* **1977**, *265*, 472-473.
- [95] J. G. J. Bauman, J. Wiegant, P. Borst, P. van Duijn, *Exp. Cell Res.* **1980**, *128*, 485-490.
- [96] P. Lichter, T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, D. C. Ward, *Human Genetics* **1988**, *80*, 224-234.
- [97] J. Bayani, J. A. Squire, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2004**, *23*, 22.24.21-22.24.52.
- [98] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281-297.

- [99] A. N. Silaharoglu, D. Nolting, L. Dyrskjøt, E. Berezikov, M. Møller, N. Tommerup, S. Kauppinen, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2520.
- [100] M. Leijon, A. Graeslund, P. E. Nielsen, O. Buchardt, B. Norden, S. M. Kristensen, M. Eriksson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9820-9825.
- [101] A. Silaharoglu, H. Pfundheller, A. Koshkin, N. Tommerup, S. Kauppinen, *Cytogenetic and Genome Research* **2004**, *107*, 32-37.
- [102] P. M. Nederlof, D. Robinson, R. Abuknesha, J. Wiegant, A. H. N. Hopman, H. J. Tanke, A. K. Raap, *Cytometry* **1989**, *10*, 20-27.
- [103] P. M. Nederlof, S. van der Flier, J. Wiegant, A. K. Raap, H. J. Tanke, J. S. Ploem, M. van der Ploeg, *Cytometry* **1990**, *11*, 126-131.
- [104] E. V. Volpi, J. M. Bridger, *Biotechniques* **2008**, *45*, 385-409.
- [105] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585-590.
- [106] A. M. Femino, K. Fogarty, L. M. Lifshitz, W. Carrington, R. H. Singer, in *Methods Enzymol.*, Vol. 361, Academic Press, **2003**, pp. 245-304.
- [107] A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 877.
- [108] A. Orjalo, H. E. Johansson, J. L. Ruth, *Nat. Methods* **2011**, *8*, i-ii.
- [109] N. Raddaoui, S. Croce, F. Geiger, A. Borodavka, L. Möckl, S. Stazzoni, B. Viverge, C. Bräuchle, T. Frischmuth, H. Engelke, T. Carell, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1-6.
- [110] N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.
- [111] F. Hövelmann, L. Bethge, O. Seitz, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2072-2081.
- [112] F. Hövelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19025-19032.
- [113] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [114] L. M. Wilhelmsson, *Q. Rev. Biophys.* **2010**, *43*, 159-183.
- [115] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- [116] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228-1237.
- [117] K. Evans, D. Xu, Y. Kim, T. M. Nordlund, *J. Fluoresc.* **1992**, *2*, 209-216.
- [118] E. L. Rachofsky, E. Seibert, J. T. Stivers, R. Osman, J. B. A. Ross, *Biochemistry* **2001**, *40*, 957-967.
- [119] M. E. Hawkins, *Cell Biochem. Biophys.* **2001**, *34*, 257-280.
- [120] M. E. Hawkins, in *Methods Enzymol.*, Vol. 450, Academic Press, **2008**, pp. 201-231.
- [121] S. L. Driscoll, M. E. Hawkins, F. M. Balis, W. Pfliederer, W. R. Laws, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 3277-3286.

- [122] M. E. Hawkins, F. M. Balis, *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32*, e62.
- [123] J. A. S. III, J. R. Barrio, N. J. Leonard, G. Weber, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3499-3506.
- [124] D. I. Scopes, Barrio, N. J. Leonard, *Science* **1977**, *195*, 296.
- [125] J. A. S. III, J. R. Barrio, N. J. Leonard, *Science* **1972**, *175*, 646-647.
- [126] K.-Y. Lin, R. J. Jones, M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873-3874.
- [127] L. M. Wilhelmsson, A. Holmén, P. Lincoln, P. E. Nielsen, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2434-2435.
- [128] P. Sandin, L. M. Wilhelmsson, P. Lincoln, V. E. C. Powers, T. Brown, B. Albinsson, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 5019-5025.
- [129] R. S. Butler, A. K. Myers, P. Bellarmine, K. A. Abboud, R. K. Castellano, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1863-1865.
- [130] R. S. Butler, P. Cohn, P. Tenzel, K. A. Abboud, R. K. Castellano, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 623-633.
- [131] D. C. Khara, S. Banerjee, A. Samanta, *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 1793-1798.
- [132] C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-2358.
- [133] G. Saroja, T. Soujanya, B. Ramachandram, A. Samanta, *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 405-410.
- [134] E. Krystkowiak, K. Dobek, A. Maciejewski, *J. Photochem. Photobiol A: Chem.* **2006**, *184*, 250-264.
- [135] A. Maciejewski, E. Krystkowiak, J. Koput, K. Dobek, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 322-332.
- [136] M. Sajadi, T. Oberhuber, S. A. Kovalenko, M. Mosquera, B. Dick, N. P. Ernsting, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 44-45.
- [137] M. E. Vazquez, D. M. Rothman, B. Imperiali, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1965-1966.
- [138] D. Mandal, S. Sen, D. Sukul, K. Bhattacharyya, A. K. Mandal, R. Banerjee, S. Roy, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10741-10747.
- [139] G. Saroja, B. Ramachandram, S. Saha, A. Samanta, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2906-2911.
- [140] S. Wörner, F. Röncke, A. S. Ulrich, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 618-622.
- [141] J. Riedl, R. Pohl, N. P. Ernsting, P. Orság, M. Fojta, M. Hocek, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2797-2806.
- [142] M. Weinberger, F. Berndt, R. Mahrwald, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2589-2599.

- [143] L. Dehmel, F. Berndt, M. Weinberger, M. Sajadi, I. Ioffe, H.-A. Wagenknecht, N. P. Ernsting, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 6813-6820.
- [144] M. Merkel, L. Dehmel, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 384-388.
- [145] E. Moyroud, P. Strazewski, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1277-1284.
- [146] H. Vorbrüggen, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 509-520.
- [147] H.-K. Walter, B. Olshausen, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 127-137.
- [148] F. Lang, *Masterarbeit: Synthese und Charakterisierung doppelt-modifizierter Molecular Beacons mit L-DNA Konfiguration*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2017**.
- [149] M. Grøtli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899-5914.
- [150] P. R. Bohländer, *Dissertation: Detektion von Nukleinsäuren durch postsynthetisch modifizierte Fluoreszenzsonden auf Basis photostabiler Cyaninfarbstoffe*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2015**.
- [151] M. Bixon, J. Jortner, *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 715-726.
- [152] P. Mehlen, A. Puisieux, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 449-458.
- [153] P. C. Nowell, *Science* **1976**, *194*, 23-28.
- [154] S. Dutta, G. Chowdhury, K. S. Gates, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1852-1853.
- [155] O. Oleksiuk, M. Abba, K. C. Tezcan, W. Schaufler, F. Bestvater, N. Patil, U. Birk, M. Hafner, P. Altevogt, C. Cremer, H. Allgayer, *Oncotarget* **2015**, *6*, 44745-44757.
- [156] D. P. Bartel, *Cell* **2009**, *136*, 215-233.
- [157] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1027-1036.
- [158] F. Lang, M. F. Contreras-Gerenas, M. Gelléri, J. Neumann, O. Kröger, F. Sadlo, K. Berniak, A. Marx, C. Cremer, H.-A. Wagenknecht, H. Allgayer, *Cancers* **2021**, *13*, 3692.
- [159] I. Singh, A. Contreras, J. Cordero, K. Rubio, S. Dobersch, S. Günther, S. Jeratsch, A. Mehta, M. Krüger, J. Graumann, W. Seeger, G. Dobreva, T. Braun, G. Barreto, *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 990-1001.
- [160] N. Diotel, R. Rodriguez Viales, O. Armant, M. März, M. Ferg, S. Rastegar, U. Strähle, *J. Comp. Neurol.* **2015**, *523*, 1202-1221.
- [161] H. Grandel, J. Kaslin, J. Ganz, I. Wenzel, M. Brand, *Dev. Biol.* **2006**, *295*, 263-277.
- [162] R. Schmidt, T. Beil, U. Strähle, S. Rastegar, *JoVE* **2014**, 51753.

- [163] N. Diotel, L. Lübke, U. Strähle, S. Rastegar, *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 568930.
- [164] L. Lübke, U. Strähle, S. Rastegar, *persönliches Gespräch*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2018**.
- [165] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.
- [166] QIAGEN, GeneGlobe, <https://geneglobe.qiagen.com/de/explore/tools/tm-prediction/form> (06.06.2021).
- [167] ATTO-TEC, https://www.atto-tec.com/?language=de&cPath=37_59&cat=c59_Farbstoffauswahl-farbstoffauswahl-59.html (06.06.2021).
- [168] Q. Luo, L. Liu, C. Yang, J. Yuan, H. Feng, Y. Chen, P. Zhao, Z. Yu, Z. Jin, *Nanotechnology* **2018**, *29*, 114001.
- [169] L. Doll, *Dissertation: Synthese und Entwicklung fluoreszenter Architekturen zur Visualisierung von DNA und RNA*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2020**.
- [170] T. Hohenauer, A. W. Moore, *Development* **2012**, *139*, 2267-2282.
- [171] T. Soujanya, R. W. Fessenden, A. Samanta, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3507-3512.
- [172] G. Saroja, B. Ramachandram, S. Saha, A. Samanta, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2906-2911.
- [173] X. Wang, E. J. Salaski, D. M. Berger, D. Powell, Y. Hu, D. Wojciechowicz, K. Collins, E. Frommer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6941-6944.
- [174] M. A. Cameron, S. B. Cush, R. P. Hammer, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065-9069.
- [175] H. Lang, M. Gottlieb, M. Schwarz, S. Farkas, B. S. Schulz, F. Himmelsbach, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 2172-2185.
- [176] W. H. A. Kuijpers, J. Huskens, C. A. A. van Boeckel, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6729-6732.
- [177] A. M. Avino, R. Eritja, *Nucleosides and Nucleotides* **1994**, *13*, 2059-2069.

10 APPENDIX

10.1 Publikationen

F. Lang, M. F. Contreras-Gerenas, M. Gelléri, J. Neumann, O. Kröger, F. Sadlo, K. Berniak, A. Marx, C. Cremer, H.-A. Wagenknecht, H. Allgayer, *Cancers* **2021**, *13*, 3692.

10.2 Konferenzen und Posterbeiträge

07/2019 Summer School 2019 – Nucleic Acid Chemistry & Synthetic Biology, Würzburg, **2019**

Fluorescent probes for the detection of endogenous miRNA in human tissue
(Vortrag + Poster)

09/2019 IX. Nukleinsäurechemie-Treffen, Saarbrücken, **2019**

Fluorescent probes for the detection of endogenous miRNA in human tissue
(Poster)

10.3 Lehre

WS2017/18 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT

SS2018 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT

WS2018/19 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, chemischen Biologie und Lebensmittelchemie am KIT

SS2019 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT

SS2019 Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie am KIT

Appendix

04/2019 – 07/2019	Betreuung des Vertiefungspraktikums von Rita Michenfelder <i>Aminophthalimid als isosterer und fluoreszenter Basenersatz in RNA</i>
WS2019/20	Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie am KIT
SS2020	Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie am KIT
08/2020 – 11/2020	Betreuung der Bachelorarbeit von Katharina Funk <i>Synthese und mikroskopische Untersuchung fluoreszenter Sonden zur Detektion der mRNA <i>prdm12b</i> sowie der miRNA-9-5p in Zebrafisch-Gehirnschnitten</i>
WS2020/21	Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie am KIT

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Karlsruhe, den 09. Juni 2021

Fabian Lang