

Entwicklung hybridisierungssensitiver Nukleinsäuresonden mit modularem Aufbau

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. Julian Gebhard

Karlsruhe, 2022

1. Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

2. Referent: Prof. Dr. Joachim Podlech

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2022

„Das Zitat am Anfang einer Doktorarbeit ist ja auch
komplett nutzlos.“

Frei nach Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2018 bis April 2022 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Institut für Technologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Rahmen dieser Arbeit und darüber hinaus unterstützt haben.

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die interessante Themenstellung sowie die stets offene Tür. Außerdem möchte ich mich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und den großen Freiraum für eigene Ideen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Doktorgeschwistern und auch allen anderen für die großartige Arbeitsatmosphäre, gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft, welche die Promotionszeit für mich unvergesslich gemacht haben: Dr. Christoph Bickmann, Felix Bösch, Anke Culetto, Dr. Larissa Doll, Dorothee Ganz, Benjamin Felker, Elena Foitzik, Dr. Yannic Fritz, Philipp Geng, Madeleine Giraud, Lisa Gramespacher, Sebastian Häcker, Dr. Dennis Harijan, Lara Hirsch, Annette Hochgesand, Dr. Robert Hofsäß, Sina Jaschik, Sven Klehenz, Joana Krämer, Dr. Katja Krell, Arthur Kuhlmann, Dr. Fabian Lang, Dr. Benjamin Lehmann, Eileen List, 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, Dr. Daniel Sack, Maren Schrödter, Manuel Schupp, Dr. Christian Schwechheimer, Maximilian Seifermann, Nicola Seul, Dr. Fabienne Seyfert, Desirée Steuernagel, Claudia Sommer, Dr. Hülya Ucar, Fabienne Urbanek, Fabian Weick, Judith Winsauer, Dr. Samantha Wörner.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- Claudia für die Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten und deine stets freundliche und offene Art.
- Annette für die MALDI-Messungen etlicher HPLC-Läufe, die vielen Bestellungen und deine Hilfsbereitschaft bei jeder Angelegenheit.
- Lara für die ESI-Messungen und die Bereitstellung deiner synthetisierten Fluorophore.

- Luisa für die Experimente und Einblicke in Zebrafische und deren Gehirne sowie deine große Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen.
- Meinen Vertiefenden Henrik, Maren und Nicolas für die Ausdauer bei schwierigen Synthesen und die gemeinsame Arbeit.
- Joana für die nur leicht glorifizierte Erinnerung an dich als Beste Nebensitzerin, die ich jemals hatte. Ich hätte wirklich gerne meine gesamte Promotionszeit mit dir an meiner Seite verbracht.
- Fabian (Premium) für die kurze Zeit als Nebensitzer in der du nie mit Joana gleichziehen konntest und wie du mir gezeigt hast, wie man mit einem Fahrrad seitlich umkippen kann. Danke auch für deine Hilfsbereitschaft und viele interessante Gespräche.
- Yannic, Arthur, Fabienne und Lisa für die Aufnahme in den Geist des Kinderlabors und das leckere Zewa. Danke für alle dummen Dinge und Gespräche, die wir zusammen haben durften.
- Eileen und Madeleine dafür, dass ihr Premium jetzt in 203 unterstützt und unseren Arbeitskreis bereichert. Es hat mich gefreut euch noch kennengelernt zu haben.
- Fabian (Lang 2) für das Korrekturlesen meiner Arbeit, deine große Hilfsbereitschaft in allen Dingen und das aufrechterhalten der Mottotage sowie die gemeinsame Arbeit in 204.
- Sara für das Kümmern und im Blick haben Aller. Danke für deine verständnis- und liebevolle Art und die gemeinsame Zeit in 204. Ich freue mich auch auf unseren Fallschirmsprung ;)
- Samantha für Prinzenmusik und andere Hörerlebnisse in Labor 204 sowie für viele lustige Momente und Kraulereien.
- Maren dafür, dass ich erleben durfte, wie du von meiner OCF-Studentin über Vertiefer- und Masterarbeit zur Promovierenden wurdest und dabei stets bei mir in 204 geblieben bist.
- Nicola für viele gemeinsame Heimwege bis sich unsere Wege getrennt haben und ein vereinigt sein in allen HPLC-Leiden-schaften. Danke, dass wir uns ein fast leeres Großraumlabor teilen durften.
- Sven für die kurze Zeit, die wir uns das Labor teilen durften und in der ich eigentlich nie da war ;)

- Hülya für das Korrekturlesen meiner Arbeit und mehr als drei Jahre zusammen in einem Labor. Danke, dass du es mit mir als Laborpartner ausgehalten hast und wir mittlerweile so gute Freunde geworden sind, dass ich dein Trauzeuge werden darf :P
- Dem alten Labor 205 aus Lari und Katja für die Unterstützung bei Fragen und Problemen, gute Gespräche und viele schöne Momente im AKW.
- Dem neuen Labor 205 aus Lisa, Rita und Basti für viel Stimmung, mehr oder weniger gute Musik und auf jeden Fall immer viel Spaß.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, dafür dass ich mich immer auf euch verlassen kann und ihr mich zu dem erzogen haben, der ich heute bin. Ein besonderer Dank geht auch an Annika für deine Unterstützung, dein Verständnis und den Rückhalt, den du mir gibst.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung	1
2	Theorie	5
2.1	Phosphonatmethode	5
2.2	Postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren	7
2.3	Optische Spektroskopie	10
2.4	Fluoreszenzlöschung durch Energie- und Elektronentransfer	14
2.5	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	17
2.6	Umgebungssensitive Fluorophore	20
2.7	Hybridisierungssensitive Sonden	25
3	Synthese	33
3.1	Alkinlinkersynthesen (DNA-Bausteine)	35
3.2	Fluorophorsynthesen (<i>Click</i> -Bausteine)	37
3.3	Zusammenfassung und Ausblick	43
4	Spektroskopische Charakterisierung	44
4.1	Einfluss der gegenüberliegenden Nukleotide	44
4.2	Einfluss der benachbarten Nukleotide	47
4.3	Einfluss der Fluorophoranbindung	53
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	62
5	Mögliche Anwendungen	64

5.1	<i>Binary-Probes</i>	64
5.2	<i>Light-Up</i> Nitroindolsonden	70
5.3	Test an mRNA <i>mdka</i>	74
5.4	Cy5 <i>mdka</i> -Sonden.....	81
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	84
6	Zusammenfassung	86
7	Experimenteller Teil.....	88
7.1	Materialien, Methoden und Geräte	88
7.2	Oligonukleotide	90
7.3	Charakterisierung der Oligonukleotide	100
7.4	Synthesevorschriften.....	103
8	Ergänzende Spektren	140
9	Literaturverzeichnis	146
10	Appendix.....	154
10.1	Publikationen	154
10.2	Konferenzen und Posterbeiträge.....	154
10.3	Ehrenwörtliche Erklärung	155

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	DC	Dünnschicht- chromatographie
°C	Grad Celsius	DCM	Dichlormethan
µL	Mikroliter	DFK	Diethylaminofluoren- ketotriazolylfluoroph
µM	mikromolar	DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
µm	Mikrometer	DMF	Dimethylformamid
Å	Ångström	DMSO	Dimethylsulfoxid
A	Akzeptor, Adenosin, Absorption	DMTr	Dimethoxytrityl
a.u.	willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AP	basenfreie DNA-Stelle (<i>apurinic/ apyrimidinc site</i>)	ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
Äq	Äquivalente	E	Energietransfereffizienz
ATP	Adenosintriphosphat	ECHO	<i>exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotides</i>
bzw.	beziehungsweise	EDANS	5-(2'-Aminoethyl)amino- naphthalen-1-sulfonsäure
C	Cytidin	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ca.	cira	5-EdU	5-Ethynyl-Uridin
cm	Zentimeter	EE	Essigsäureethylester
CPG	<i>controlled pore glas</i>	ER	Ethynylribose
cU	2'- <i>O</i> -Propargyluridin	ESI	Elektronensprayionisation
CuAAC	kupfer(I)katalysierte Azid- Alkin-Cycloaddition	<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
Cy5	Cyanine 5	F	Fluoreszenz
D	Donor	FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> - Hybridisierung
d	dublett	FIT	<i>forced intercalation</i>
DABCYL	4-(4'-Dimethylamino- phenylazo)benzoesäure		
D-aTNA	<i>acyclic D-threoninol nucleic acid</i>		

FRET	FÖRSTER-Resonanz-energietransfer	mg	Miligramm
		MHz	Megahertz
G	Guanosin	min	Minute
GS	Gegenstrang	miRNA	<i>micro</i> -RNA
h	Stunde	mL	Mililiter
H	Helligkeit	mM	milimolar
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)	mmol	Milimol
		mRNA	<i>messenger</i> -RNA
		MS	Massenspektrometrie
HPA	Hydroxypicolinsäure	NaP _i	Natriumphosphatpuffer
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)	ncRNA	<i>non-coding</i> -RNA
		nm	Nanometer
		nmol	Nanomol
		NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
HR	hochauflösend (<i>high resolution</i>)	ns	Nanosekunde
		p	Pentett
IC	Innere Umwandlung (<i>internal conversion</i>)	2-PC	2-Propynylcarbamat
		PET	<i>photoinduced electron transfer</i>
ISC	Interkombination (<i>intersystem Crossing</i>)	pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
ISH	<i>in-situ</i> -Hybridisierung	PNA	Peptidnukleinsäure
<i>J</i>	Kopplungskonstante	ppm	<i>parts per million</i>
L	Liter	q	quartett
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)	RNA	Ribonukleinsäure
		RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
		rpm	<i>rounds per minute</i>
M	molar	rRNA	<i>ribosomal</i> -RNA
m	Multipllett	R _t	Retentionszeit
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>	RT	Raumtemperatur
		s	Sekunde, Singulett
MB	<i>molecular beacon</i>	shRNA	<i>small hairpin</i> -RNA

siRNA	<i>small interfering-RNA</i>	TMS	Tetramethylsilan
sm	<i>single molecule</i>	tRNA	<i>transfer-RNA</i>
Smp	Schmelzpunkt	ü.N.	über Nacht
S _n	Singulett-Zustand n	UV	Ultraviolett
SNA	Serinolnukleinsäure	Vis	sichtbares Licht
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)	VR	Schwingungsrelaxation (<i>vibrational relaxation</i>)
t	Triplett	z.B.	zum Beispiel
T	Thymidin	δ	chemische Verschiebung
T ₁	erster elektronisch angeregter Triplettzustand	Δλ _{Stokes}	STOKES-Verschiebung
TBTA	Tris(benzyltriazolylmethyl)-amin	ε	Extinktionskoeffizient
TCA	Trichloressigsäure	λ _{em.}	Emissionswellenlänge
TFA	Trifluoressigsäure	λ _{exc.}	Anregungswellenlänge
THF	Tetrahydrofuran	φ	Fluoreszenzquantenausbeute
THPTA	Tris(hydroxypropyltriazolyl)-methylamin		

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den Chemical Abstracts^[a] und den von der IUPAC-IUB-Kommission^[b] empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden kursiv dargestellt. Als Dezimaltrennzeichen werden in dieser Arbeit Punkte statt Kommata verwendet.

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

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

1 Einleitung und Themenstellung

Spätestens seit der COVID-19-Pandemie und der Entwicklung der Impfstoffe gegen das Virus ist RNA (*ribonucleic acid*) kein unbekannter Begriff mehr. Auch wenn den mRNA der Impfstoffe von Verschwörungsmystikern vorgeworfen wird, das Erbgut zu verändern,^[1] so haben diese doch schon zahlreichen Menschen das Leben gerettet.^[2-5] Doch auch ohne Impfung hängt das Leben in bedeutendem Maße von RNA-Molekülen ab.

Von allen biologischen Makromolekülen besitzt RNA die größte Vielfalt an Funktionen und spielt daher eine wichtige Rolle in den verschiedensten zellulären Prozessen.^[6] Bis in die Mitte der 1980er Jahre wurde davon ausgegangen, dass RNA im Wesentlichen dafür vorhanden ist, um die Information der DNA (*deoxyribonucleic acid*) an die Proteine zu übermitteln.^[7] An diesem Prozess sind drei Arten von RNA beteiligt: mRNA (*messenger-RNA*), welche die Information aus dem Zellkern bringt und vervielfältigt, rRNA (*ribosomal-RNA*), die das enzymatische Zentrum der Proteinsynthese bildet und tRNA (*transfer-RNA*), welche den genetischen Code in eine Abfolge von Amino-säuren übersetzt. In den letzten Jahrzehnten hat sich jedoch gezeigt, dass RNA auch in vielen anderen biochemischen Prozessen eine Rolle spielt.^[8] Dazu gehören unter anderem die katalytische Aktivität von Ribozymen^[9] und die vielfältige Regulierung der Genexpression durch *riboswitches*^[10], miRNA (*micro-RNA*)^[11], siRNA (*small interfering-RNA*)^[12] und shRNA (*small hairpin-RNA*)^[13]. Darüber hinaus existieren noch viele weitere Arten von ncRNA (*non-coding-RNA*), deren Wirkungsmechanismen bisher nur teilweise oder gar nicht verstanden wurden.^[14] Ein besseres Verständnis darüber welche Rollen und Funktionen RNA in den verschiedenen biologischen Prozessen einer Zelle einnimmt, könnte bei der Diagnose und Behandlung von Krankheiten hilfreich sein.^[15-16]

Dafür ist es nötig, RNA-Moleküle in Zellen mit guter räumlicher und zeitlicher Auflösung beobachten zu können. Natürliche RNA sendet jedoch keine spezifischen Signale aus, weshalb es Sonden braucht, die es erlauben RNA in Zellen zu markieren.^[17-19] Hierfür haben fluorophormarkierte Nukleinsäuresonden an großer Beliebtheit gewonnen, da sie eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften besitzen: Sie können relativ einfach und kostengünstig mit hoher Spezifität synthetisiert werden, sie können einfach an fast jeder beliebigen Stelle mit

Fluorophoren und anderen spezifischen Funktionalitäten modifiziert werden, Nukleinsäure-einzelstränge sind in der Lage, mit hoher Genauigkeit komplementäre Sequenzen zu erkennen, und sie sind biokompatibel sowie ungiftig.^[20] Über die komplementäre Sequenz können die Sonden an die Zielnukleinsäuren binden und mithilfe der angebondenen Fluorophore kann unter dem Fluoreszenzmikroskop die Position der Sonden und damit auch der Zielnukleinsäuren in der Zelle bestimmt werden. Vor allem bei der Untersuchung von lebenden Zellen ist es wichtig, dass Sonden, welche kein Zielmolekül finden, auch kein positives Fluoreszenzsignal liefern, da diese nicht entfernt werden können.^[21] Dafür gibt es bereits einige Konzepte, bei welchen Sonden mit umgebungssensitiven Fluorophorsystemen durch die Interaktion mit einem Zielmolekül ihr Fluoreszenzsignal ändern und somit eine Hybridisierungssensitivität mit minimierten falsch-positiven Signalen aufweisen (siehe Kapitel 2.7). Es gibt jedoch weiterhin einen Bedarf nach neuen Fluorophoren mit umgebungssensitiven Eigenschaften für solche Sonden, die sich durch hohe Quantenausbeuten, Helligkeit und Photostabilität auszeichnen.^[22] Damit ein umgebungssensitiver Fluorophor auch hybridisierungssensitive Eigenschaften entwickeln kann, muss sich seine Umgebung bei der Hybridisierung maßgeblich ändern. Eine enge Anbindung des Fluorophors über einen kurzen Linker an die Nukleinsäure ist dabei von Vorteil, da der Fluorophor so in starke Wechselwirkungen mit umliegenden Nukleotide treten kann, welche im Nukleinsäureduplex aufgrund der Basenpaarung geordneter und starrer vorliegen als im unhybridisierten Zustand.^[23]

Um den Einfluss von umgebenden Nukleotiden auf Fluorophore zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit ein modulares Sondenkonzept entworfen werden, welches es erlaubt, ausgewählte Fluorophore mit geringem synthetischem Aufwand in Nukleinsäuren einzubringen. Dazu sollte der kurze acyclische Alkinlinker **L** entwickelt werden, welcher an jeder beliebigen Stelle in eine Nukleinsäure eingebracht werden kann und es erlaubt postsynthetisch über eine kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) einen beliebigen azidmodifizierten Fluorophor eng an die Nukleinsäure zu binden (Abbildung 1).

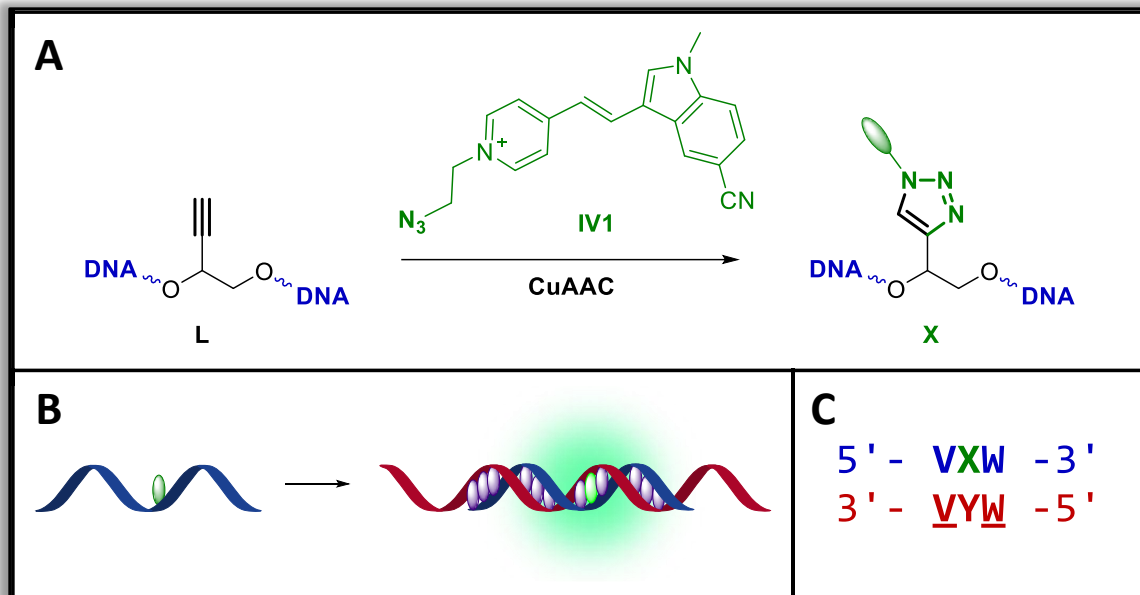


Abbildung 1: Grundlegendes Konzept dieser Arbeit. A: Der in eine Nukleinsäure (blau) integrierte Alkinlinker (schwarz) kann mit einem Fluorophor (grün) über eine CuAAC-Reaktion verknüpft werden. B: Hybridisierung mit dem Zielmolekül (rot) führt zur Wechselwirkung mit dem Basenstapel (violett) des Duplexes und zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. C: Dabei wurde der Einfluss der umliegenden Nukleotide (V, W, Y = A, T, C, G; Unterstrich markiert komplementäres Nukleotid) auf die photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors X untersucht.

Die postsynthetische Verknüpfung mit dem Fluorophor soll für eine Modularität sorgen, die es erlaubt, verschiedene vielversprechende Fluorophore in Nukleinsäuren einzubringen, ohne dass diese als Bausteine für die Nukleinsäuresynthese vorliegen müssen. Die enge Anbindung soll den verknüpften Fluorophor in Wechselwirkung mit den umliegenden Nukleotiden zwingen, womit eine Hybridisierungssensitivität ermöglicht wird. Diese soll über einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität zur Detektion von Nukleinsäuren genutzt werden.

Indolvinylfluorophore weisen eine hohe Photostabilität auf und zeigen in Anwesenheit von Nukleinsäuren einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität.^[24-25] Ein methylierter Indolstickstoff sowie eine Cyanogruppe an der 5-Position der Indoleinheit führen dabei zu einer besonders hohen Photostabilität bei geringer Zelltoxizität.^[26] Trotz dieser vorteilhaften Eigenschaften ist eine Verwendung dieser Fluorophore in hybridisierungssensitiven Sonden bisher nicht bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Fluorophor **IV1** mithilfe des Alkinlinkers auf seine Hybridisierungssensitivität untersucht werden. Um den Einfluss der jeweiligen kanonischen Nukleotide auf den Fluorophor bei der Hybridisierung zu analysieren, sollte

dieser in Nucleinsäuren mit verschiedenen umliegenden Nucleotiden eingebracht und spektroskopisch charakterisiert werden.

Aufgrund der weiten Verbreitung von Thiazolorangefluorophoren in hybridisierungssensitiven Sonden^[21, 27-30] sollten zum Vergleich ebenfalls Fluorophore dieser Klasse auf ihrer Hybridisierungssensitivität untersucht werden. Um den sterischen Einfluss der chiralen Nucleinsäure auf die Fluorophore beurteilen zu können, sollten außerdem unterschiedliche Anbindungsmöglichkeiten der Fluorophore in Kombination mit den beiden möglichen Enantiomeren des Alkinlinkers auf die Eigenschaften bei der Hybridisierung (Abbildung 2) werden.

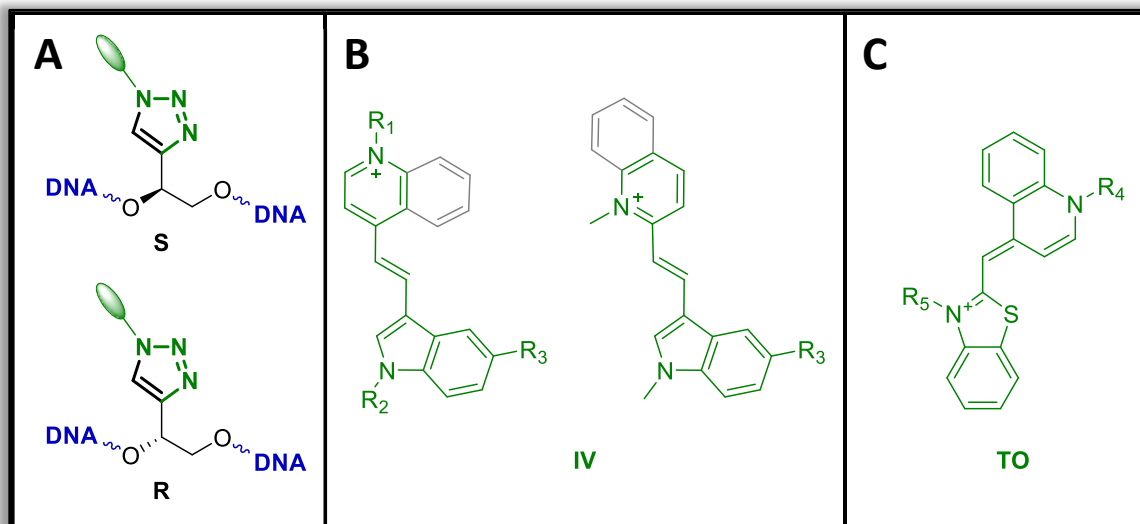


Abbildung 2: A: S- und R-konfigurierte Anknüpfung eines Fluorophors. B: Darstellung der untersuchten Indolvinylfluorophore IV mit unterschiedlichen Anknüpfungspunkten R₁₋₃. C: Darstellung der untersuchten Thiazolorange-fluorophore TO mit unterschiedlichen Anknüpfungspunkten R₄₋₅.

Dabei sollten die Fluorophore entweder an einer der Positionen R₁, R₂ und R₄ über einen Ethyllinker oder an einer der Positionen R₁, R₄ und R₅ über einen Propyllinker verknüpft werden. Die Indolvinylfluorophore sollten dabei auch bei direkter Anknüpfung an Position R₃ unter Variation der Anknüpfung einer Pyridineinheit bzw. Chinolineinheit über die 2- bzw. 4-Position an die Indoleinheit untersucht werden. Nach der Charakterisierung sollte die Anwendung des Systems in verschiedenen hybridisierungssensitiven Sondenkonzepten getestet und so Sonden entwickelt werden, welche in der Lage sind, Nucleinsäuren selektiv und sensitiv zu erkennen und erfolgreich zu detektieren.

2 Theorie

2.1 Phosphonatmethode

Die Synthese und Modifikation von Nucleinsäuren ist von großer Bedeutung für die biomedizinische Forschung.^[31-33] Über die Oligonucleotid-Festphasensynthese können modifizierte Nucleotide und andere Sonderbausteine direkt in eine Nucleinsäure eingebracht werden. Aufgrund hoher Ausbeuten bei relativ kurzen Reaktionszeiten und wenigen Nebenprodukte hat sich vor allem die Phosphoramiditmethode bei der Synthese von Nucleinsäuren etabliert.^[34-35] Es gibt allerdings spezielle Bausteine, die sich nicht über diese Methode in eine Nucleinsäure einbauen lassen. In solchen Fällen kann auf die Phosphonatmethode als Alternative zurückgegriffen werden.^[36-39]

Die Phosphonatmethode (Abbildung 3) wurde in der Oligonucleotid-Festphasensynthese erstmals von FROEHLER *et al.*^[40] und GAREGG *et al.*^[41-42] verwendet. Dabei wird eine Nucleinsäure sukzessive von 3' nach 5' aufgebaut. Als Ausgangsmaterial dient das erste Nucleotid der zu synthetisierenden Sequenz, welches meistens über die 3'-OH-Gruppe an *controlled pore glass* (CPG) als feste Phase gebunden und an der 5'-OH-Gruppe mit einer Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) geschützt ist. Daran werden schrittweise die folgenden Nucleotide angeknüpft, wobei für jedes Nucleotid die gleiche Abfolge verschiedener Reaktionsschritte durchgeführt wird.

Im ersten Schritt wird die DMTr-Gruppe des letzten Nucleotids z.B. mit Hilfe von Dichloressigsäure abgespalten. Danach wird das nächste 5'-DMTr-geschützte Nucleotid, welches an der 3'-Position ein Phosphonat trägt, zusammen mit einem Säurechlorid als Aktivierungsreagenz (meist Pivaloyl- oder Adamantoylchlorid) gekoppelt. Im Unterschied zur Phosphoramiditmethode wird auf einen anschließenden *Capping*-Schritt häufig verzichtet, da das Säurechlorid selbst mit der 5'-OH-Gruppe reagiert und so freigebliebene OH-Gruppen an weiterem Kettenwachstum hindert. Auf einen Oxidations-schritt kann ebenfalls verzichtet werden, da der gebildete H-Phosphonatediester im Unterschied zum Phosphittriester der Phosphoramiditsynthese stabil gegenüber den sauren Bedingungen der Entschützung ist. So

kann nach der Kupplung direkt ein neuer Zyklus beginnen. Am Ende der Oligonukleotidsynthese kann je nach Anwendung die DMTr-Gruppe des letzten Nukleotids in der Sequenz entfernt oder beibehalten werden. Danach wird das gesamte Oligonukleotidrückgrat in einem Schritt mit wässriger Iodlösung oxidiert, unter basischen Bedingungen die Schutzgruppen an den Basen und Phosphaten der natürlichen Nucleotide entfernt und die Nucleinsäure vom CPG abgespalten.^[35]

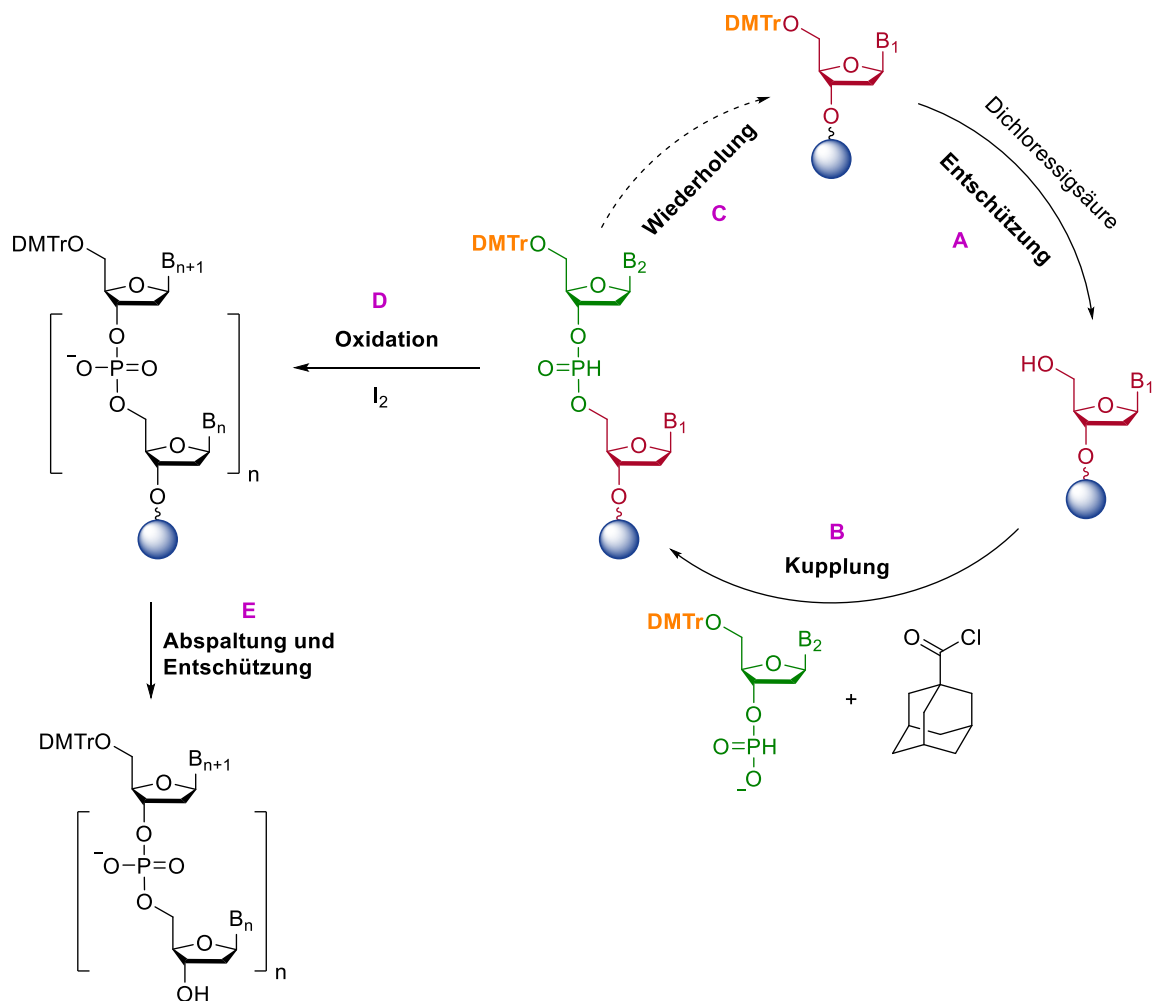


Abbildung 3: Ablauf der Oligonukleotid-Festphasensynthese nach der Phosphonatmethode. Im ersten Schritt (A) wird unter Verwendung von Dichloressigsäure die DMTr-Schutzgruppe (orange) von dem an CPG (blau) gebundenen Nucleotid (rot) abgespalten. Im zweiten Schritt (B) wird das nächste Nucleotid (grün) unter Verwendung eines Säurechlorids (schwarz) als Aktivator an das bereits vorhandene Nucleotid gekuppelt. Diese Schritte werden für jedes Nucleotid in der zu synthetisierenden Sequenz wiederholt (C). Am Ende wird mit wässriger Iodlösung das Oligonukleotidrückgrat zum Phosphat oxidiert (D) und anschließend unter basischen Bedingungen vom CPG abgespalten und alle vorhandenen Schutzgruppen entfernt.^[35]

2.2 Postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren

Nicht immer lassen sich Modifikationen jedoch über die Festphasensynthese in eine Nukleinsäure einbringen, da diese nicht kompatibel mit den sauren, alkalischen und oxidativen Reaktionsbedingungen der Synthese sind, die Synthese zu aufwendig ist oder der Einbau zu drastischen Verlusten in der Ausbeute der nachfolgenden Schritte der Festphasensynthese führt.^[43] Anwendungen, wie die bioorthogonale Markierung, bevorzugen es, Modifikationen erst nach der Nukleinsäuresynthese einzubringen.^[44] Durch postsynthetische Ansätze können diese Probleme überwunden sowie die Anknüpfung verschiedener Modifikationen an das gleiche funktionalisierte Oligonukleotid ermöglicht werden. Dafür wird eine kleine Modifikation während der Festphasensynthese eingeführt, welche danach in einer chemoselektiven Reaktion mit der gewünschten Modifikation, z.B. einem Fluorophor, umgesetzt wird.^[45]

Eine Übersicht wichtiger postsynthetischer Modifikationsmethoden ist in Abbildung 4 dargestellt. Dazu gehören die Amidkupplung, die normale und die inverse DIELS-ALDER-Cycloaddition, die Photoclick-Reaktion, die STAUDINGER-Ligation, sowie die kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC).^[44-47]

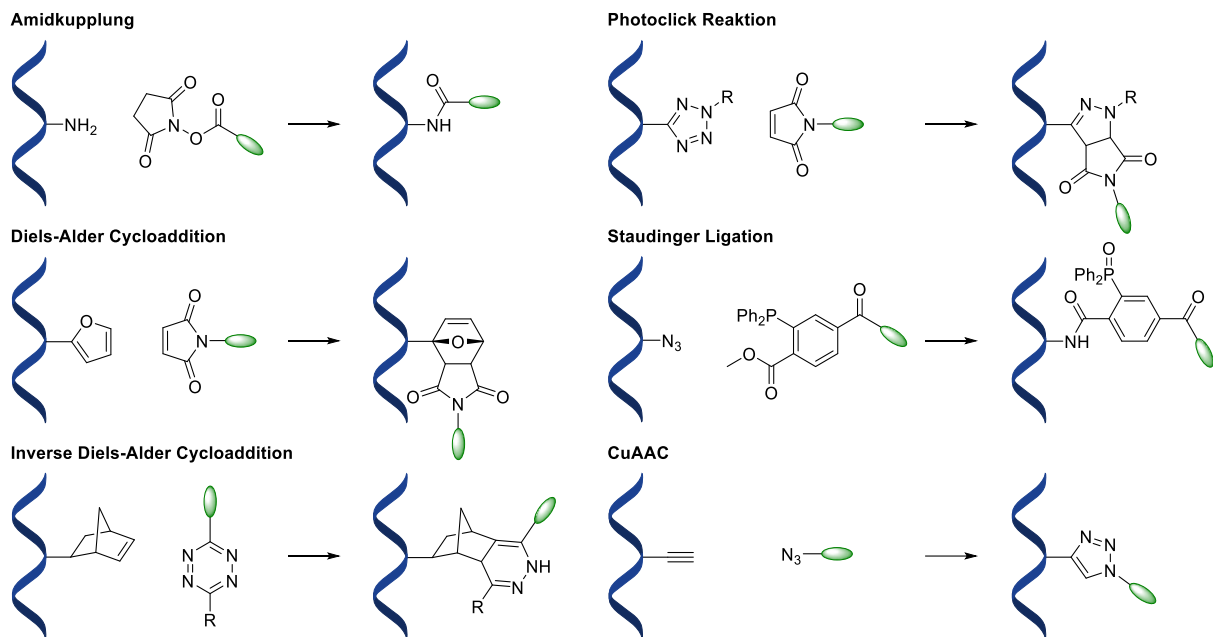


Abbildung 4: Übersicht ausgewählter postsynthetischer Modifikationsmethoden für Nucleinsäuren. Nucleinsäuren sind dabei in blau und mögliche Modifikationen in grün dargestellt.^[44-45]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Konzept der CuAAC verwendet, um mit Fluorophoren modifizierte Oligonucleotide herzustellen. Daher soll diese im Folgenden näher erläutert werden.

Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)

Bei der CuAAC es sich um eine Weiterentwicklung der von HUISGEN entdeckten 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Alkin und einem organischen Azid, welche zu einem 1,2,3-Triazol verknüpft werden.^[48] Für die unkatalysierte Reaktion sind hohe Temperaturen notwendig und sie läuft nicht regiospezifisch ab. MELDAL und SHARPLESS entdeckten unabhängig voneinander, dass diese Probleme umgangen werden können, wenn der Reaktion ein Cu(I)-Katalysator zugegeben wird. Dadurch kann die Reaktion bei Raumtemperatur ablaufen und es entsteht selektiv das 1,4-Isomer,^[49-51] wodurch diese Reaktion zu den von SHARPLESS definierten *Click*-Reaktionen zählt. Diese zeichnen sich durch einen breiten Anwendungsbereich, sehr hohe Ausbeuten, Regiospezifität und wenig bis keine, dafür aber leichtentfernbar Nebenprodukte aus.^[52]

Neben dem von SHARPLESS postulierten Reaktionsmechanismus an dem nur ein Cu-Atom beteiligt ist, wurde von FOKIN ein zweiter Mechanismus postuliert, in welchem zwei Cu-Atome eine Rolle spielen.^[50, 53] Es wird davon ausgegangen, dass beide Mechanismen miteinander konkurrieren, dabei jedoch der auf zwei Cu-Spezies beruhende Mechanismus deutlich schneller abläuft.^[54] Dieser Mechanismus der CuAAC ist in Abbildung 5 dargestellt. Im ersten Schritt bildet der Kupferkatalysator (**A**) zusammen mit dem Alkin einen π -Komplex aus (**B**). Im nächsten Schritt wird das Alkin deprotoniert und es bildet sich zusammen mit einem weiteren Cu(I)-Kation ein Kupferacetylen-Komplex (**C**). Anschließend koordiniert das Azid an ein Kupferion und wird vom Alkin nukleophil angegriffen (**D**), woraufhin sich ein sechsgliedriger Zyklus aus Alkin, Azid und Kupfer bildet (**E**). Im darauffolgenden Schritt wird Kupfer aus dem Ring entfernt und es entsteht ein Triazol-Kupfer-Derivat (**F**). Im letzten Schritt erfolgt eine Reptonierung, das Triazol wird erhalten und der Katalysator (**A**) zurückgebildet.^[51]

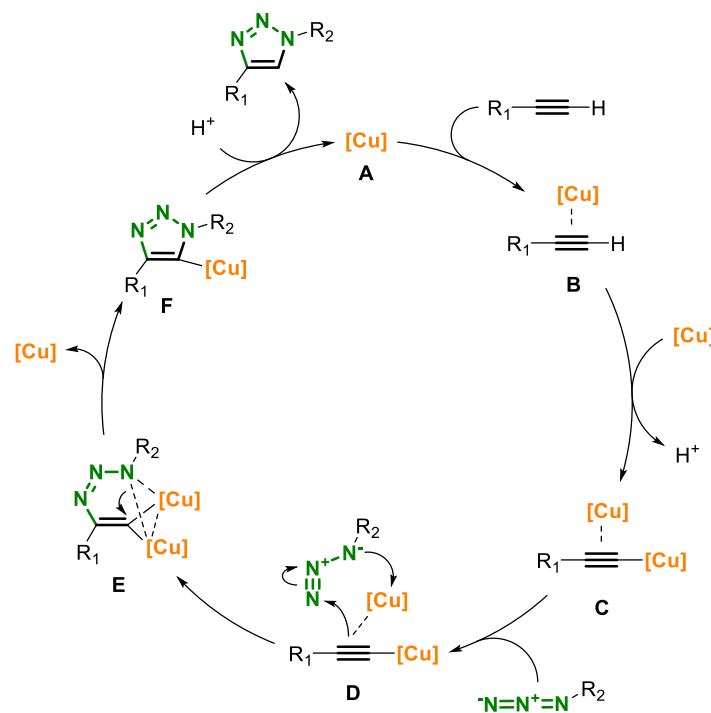


Abbildung 5: Postulierter Mechanismus der CuAAC nach FOKIN. Der Kupferkatalysator (orange) bildet einen π -Komplex (B) mit dem Alkin (schwarz), woraufhin unter Deprotonierung eine weitere Kupferspezies addiert (C). Danach greift ein Azid (grün) den Komplex an (D) und es bildet sich ein sechsgliedriger Übergangszustand (E). Aus diesem wird eine Kupferspezies eliminiert (F), woraufhin unter Reptonierung das Produkt entsteht und der Katalysator (A) zurückerhalten wird.^[53]

Da Kupferionen in der Lage sind, DNA-Strangbrüche herbeizuführen, eignete sich diese Methode jedoch zunächst nicht für die postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren.

Durch die Verwendung von z.B. Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA) als stabilisierendem Liganden für die Cu(I)-Ionen, kann dieses Problem jedoch überwunden und die Methode erfolgreich zur postsynthetischen Modifikation von Nukleinsäuren verwendet werden.^[43, 55]

2.3 Optische Spektroskopie

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide wurden mit Fluorophoren markiert, um diese später über ihre spektroskopischen Eigenschaften detektieren zu können. Daher werden im Folgenden die notwendigen theoretischen Grundlagen der dafür wichtigen photophysikalischen Prozesse erläutert. Durch die Absorption eines Photons kann ein Fluorophor vom elektronischen Grundzustand (S_0) in einen elektronisch angeregten Zustand (S_n) gelangen. Da diese Absorption ein sehr schneller Prozess (10^{-15} s) im Vergleich zur Schwingung von Atomkernen ($10^{-12} - 10^{-10}$ s) ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich der Kernabstand während der elektronischen Anregung nicht ändert. Danach müssen sich die Kerne der neuen elektronischen Struktur anpassen und kommen in Bewegung. Diese Tatsache wird als FRANCK-CONDON-Prinzip^[56-57] bezeichnet und führt dazu, dass bei unterschiedlichen Gleichgewichts-abständen der Kerne des Grundzustands und des angeregten Zustands vorwiegend Übergänge in höhere Schwingungsniveaus stattfinden (Abbildung 6). Das Absorptionsspektrum spiegelt somit die Schwingungsstruktur des angeregten Zustands wider.^[58]

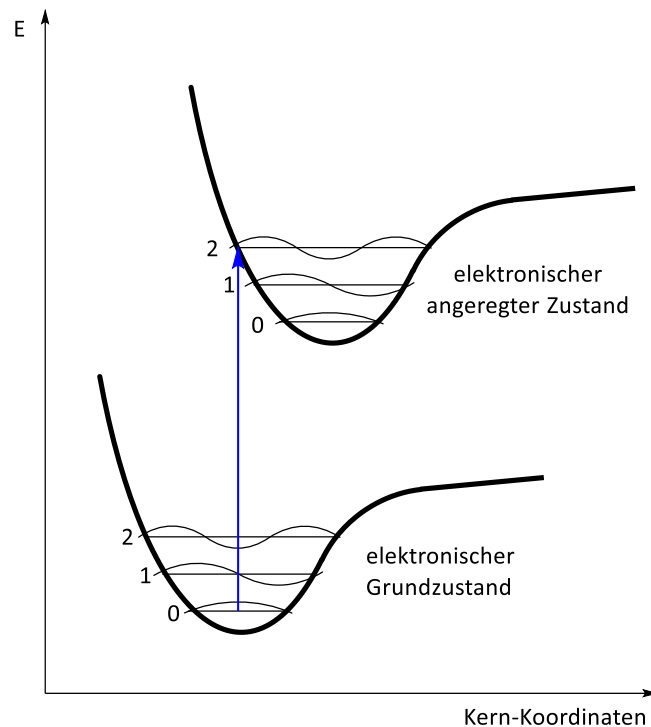


Abbildung 6: Potentialenergiediagramm bei der Absorption zur Verdeutlichung des FRANCK-CONDON-Prinzips. Dargestellt sind jeweils die ersten drei Schwingungszustände des elektronischen Grundzustands und ersten angeregten Zustands. Die Absorption (blau) findet vom Schwingungsgrundniveau des Grundzustands in ein angeregtes Schwingungsniveau des angeregten Zustands statt.^[59]

In Abbildung 7 sind die wichtigsten photophysikalischen Prozesse, die nach der Lichtabsorption eines Moleküls ablaufen, in einem JABLONSKI-Diagramm^[60] dargestellt. Durch Schwingungsrelaxation (*vibrational relaxation* VR) kann ein Molekül auf das Schwingungsgrundniveau des jeweiligen elektronischen Zustands gelangen. Dabei wird die Energie meist durch Stöße an das Lösungsmittel in Form von Wärme abgegeben. Als Innere Umwandlung (*internal conversion* IC) wird ein strahlungsloser Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen gleicher Multiplizität bezeichnet, welcher isoenergetisch auf einer Zeitskala von $10^{-11} - 10^{-9}$ s verläuft. Dabei findet ein Übergang von einem höheren elektronischen Zustand in einen niedrigeren elektronischen Zustand mit hohem Schwingungsniveau statt. Dieser Übergang funktioniert schlechter, je größer der Energieunterschied zwischen den elektronischen Zuständen ist.

Zwischen den elektronischen Zuständen S_1 und S_0 ist der Energieunterschied relativ groß, was dazu führt, dass die interne Umwandlung mit den Prozessen der Fluoreszenz ($10^{-10} - 10^{-7}$ s)

und der Interkombination (*intersystem crossing* ISC; $10^{-10} - 10^{-8}$ s) konkurriert. Dadurch und aufgrund der schnellen Schwingungsrelaxation finden strahlende Übergänge nur aus dem Schwingungsgrundniveau der tiefsten elektronischen Anregungszustände statt (KASHA-Regel).^[61] Daraus folgt ebenfalls, dass die Wellenlänge des emittierten Lichts unabhängig von der Wellenlänge des absorbierten Photons ist. Die Fluoreszenz bezeichnet also die Emission eines Photons während der Relaxation vom Schwingungsgrundniveau des S_1 - in den S_0 -Zustand. Dabei kann die Relaxation nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip auch in höhere Schwingungsniveaus des Grundzustands erfolgen. Da die Unterschiede der Schwingungsniveaus im Grundzustand und im angeregten Zustand oft gleich verteilt sind, ergibt sich das Fluoreszenzspektrum spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum (*mirror image* Regel). Aufgrund des Energieverlustes durch Schwingungsrelaxation im angeregten Zustand liegt dabei das Fluoreszenzspektrum immer bei höheren Wellenlängen (niedrigere Energie) als das Absorptionsspektrum.

Der Unterschied zwischen dem Maximum im Absorptionsspektrum und dem Maximum im Fluoreszenzspektrum wird STOKES-Verschiebung^[62] genannt. Der Schnittpunkt beider Spektren gibt die Energiedifferenz zwischen dem Schwingungsgrundniveau des Grundzustandes und dem Schwingungsgrundniveau des ersten angeregten Zustandes an, da hier aufgrund der fehlenden Schwingungsrelaxation die Energien des absorbierten und des emittierten Photons gleich sind. Die Überlappung von Absorptions- und Fluoreszenzspektren kommt dadurch zustande, dass sich bei Raumtemperatur aufgrund der BOLTZMANN-Verteilung ein kleiner Teil der Moleküle auf angeregten Schwingungsniveaus befindet und daher weniger Energie für die Anregung in den S_1 -Zustand benötigt.

Interkombination bezeichnet den strahlungslosen Übergang zwischen zwei isoenergetischen Schwingungsniveaus, die zu elektronischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität gehören. Der Übergang zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Multiplizität ist grundsätzlich verboten, durch eine große Spin-Bahn-Kopplung (z.B. durch die Anwesenheit schwerer Atome) kann dieser verbotene Übergang allerdings ermöglicht werden. Anschließend kann es beim Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ zur Emission kommen. Da es sich hierbei aber wieder um einen verbotenen Übergang handelt, ist die Geschwindigkeit dieses Prozesses, der

Phosphoreszenz, eher langsam (ca. $10^{-6} - 10$ s). Das führt dazu, dass es in Lösung meist schneller zu Stößen mit Lösungsmittelmolekülen kommt, welche eine weitere Interkombination in den elektronischen Grundzustand und Schwingungsrelaxation begünstigen. Bei tiefen Temperaturen und/oder in einem starren Medium, kann Phosphoreszenz beobachtet werden. Dabei kann der Zeitraum der Emission nach der Anregung im Bereich von Minuten oder mehr liegen. Da das niedrigste Schwingungsniveau des T_1 -Zustands niedriger liegt als das des S_1 -Zustands, liegt das Phosphoreszenzspektrum bei höheren Wellenlängen als das Fluoreszenzspektrum.^[59]

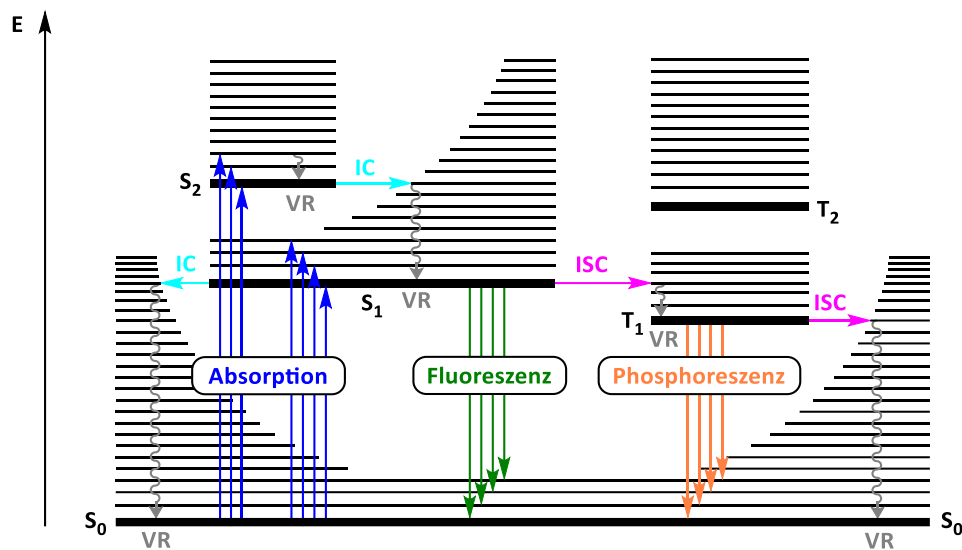


Abbildung 7: JABLONSKI-Diagramm. VR: Schwingungsrelaxation (*vibrational relaxation*), IC: Innere Umwandlung (*internal Conversion*), ISC: Interkombination (*intersystem Crossing*), S: Singulett-Zustand, T: Triplett-Zustand.^[59]

Über die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_{fl}) kann der prozentuale Anteil der absorbierten Photonen (n_{abs}), welche unter Ausstrahlung von Fluoreszenz wieder emittiert werden (n_{fl}), nach folgender Formel bestimmt werden:^[58]

$$\Phi_{fl} = \frac{n_{fl}}{n_{abs}} \quad (1)$$

Experimentell kann die Fluoreszenzquantenausbeute mit Hilfe einer ULBRICHT-Kugel bestimmt werden, welche es erlaubt die gesamte von einer Probe emittierte Strahlung zu messen. Alternativ ist die Bestimmung auch über den Vergleich mit dem Emissionsspektrum eines Standards mit bekannter Quantenausbeute möglich.^[63]

2.4 Fluoreszenzlöschung durch Energie- und Elektronentransfer

Es gibt auch Prozesse, welche die Emission eines Fluorophors verringern können. Diese werden unter dem Begriff der Fluoreszenzlöschung (*engl. quenching*) zusammengefasst. Dabei ist Fluoreszenzlöschung ein rein phänomenologischer Begriff, welcher nichts über den Vorgang der vorliegenden photophysikalischen Prozesse aussagt. Es gibt verschiedene Mechanismen, wie z.B. die Interkombination, den FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET), den Elektronenaustausch und den photoinduzierten Elektronentransfer (PET), die eine Fluoreszenzlöschung verursachen können. Die Mechanismen schließen sich dabei nicht gegenseitig aus und oft kommt es zu Kombinationen der verschiedenen Prozesse.^[59, 64]

Die Fluoreszenzlöschung durch Interkombination (Schweratomeffekt) kann durch einen Stoß zwischen einem schweren Atom (z.B. Br, I) oder einem paramagnetischen Molekül (z.B. Triplett-Sauerstoff) mit dem angeregten Fluorophor im Singulettzustand verursacht werden, wodurch eine Interkombination des Fluorophors in den angeregten Triplettzustand stattfindet. Durch die Langlebigkeit des Triplettzustands kann es zu einem erneuten Stoß mit dem Fluoreszenzlöcher (*Quencher*) kommen, wodurch der Fluorophor in den elektronischen Grundzustand gelangt und durch Schwingungsrelaxation seine Energie strahlungslos in Form von Wärme an die Umgebung abgibt (Abbildung 8). Alternativ ist es auch möglich, dass der Fluorophor durch strahlungslosen Zerfall wieder in den Grundzustand gelangt.^[59, 64-65]

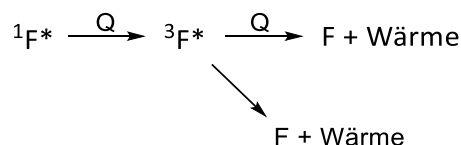


Abbildung 8: Fluoreszenzlöschung durch Interkombination. F steht dabei für den Fluorophor, Q für den Fluoreszenzlöcher, das * gibt den angeregten Zustand wider und die hochgestellte Zahl gibt an, ob sich das Molekül im ¹Singulett- oder ³Triplettzustand befindet.^[59, 64]

Fluoreszenzlöschung kann auch durch einen FRET^[66] ausgelöst werden. Dabei wird die Energie des Fluorophors (Donor) mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkung strahlungslos auf den nicht-fluoreszenten *Quencher* (Akzeptor) übertragen, ein Beispiel ist in Abbildung 9 dargestellt. Dabei besitzt der angeregte Fluorophor ein Elektron im HOMO (*highest occupied molecular orbital*) und ein Elektron im LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*). Der *Quencher* hat

beide Elektronen im HOMO, da er sich im Grundzustand befindet. Findet nun ein FRET statt, kehrt das Elektron des Fluorophors aus dem LUMO in das HOMO zurück und gleichzeitig wird ein Elektron des *Quenchers* in das LUMO angeregt. Bei der Relaxation des *Quenchers* in den Grundzustand wird die Energie strahlungslos als Wärme frei. [59, 64, 67]

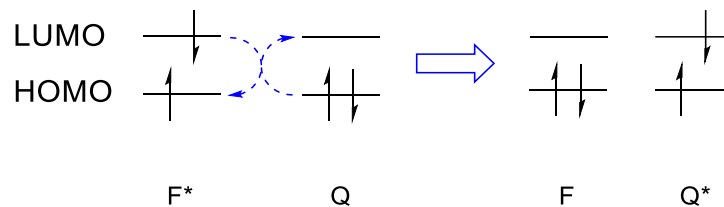


Abbildung 9: Resonanzenergietransfer zwischen Fluorophor und *Quencher*. Ein Elektron des angeregten Fluorophors (F*) fällt vom LUMO zurück ins HOMO, wodurch ein Elektron des *Quenchers* (Q) ins LUMO gelangen kann. [59, 64, 67]

Als Akzeptor kann statt eines *Quenchers* auch ein weiterer Fluorophor verwendet werden, in diesem Fall kommt es nach Anregung des Donors zur Fluoreszenz des Akzeptors. Für einen effektiven FRET müssen das Fluoreszenzspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, wodurch ein Energieübertrag über eine Distanz von über 100 Å stattfinden kann. Die Effizienz des Energietransfers kann über den Abstand von Donor und Akzeptor oder über die Löschung der Donorfluoreszenz bestimmt werden. Dabei wird das Verhältnis zwischen der Donoremission bei anwesendem und abwesendem Akzeptor gebildet: [68]

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2)$$

E: FRET-Effizienz

r: Abstand zwischen Donor und Akzeptor

R_0 : Förster-Radius (Abstand bei 50 % FRET-Effizienz)

F_{DA} : Fluoreszenzintensität des Donors mit Akzeptor

F_D : Fluoreszenzintensität des Donors ohne Akzeptor

Fluoreszenzlöschung kann ebenso durch Elektronenaustausch (DEXTER-Transfer [69]) auftreten. Hierbei hat der angeregte Fluorophor (Donor) ein Elektron im LUMO und überträgt dieses strahlungslos an den *Quencher* (Akzeptor). Der *Quencher* überträgt im Austausch ein Elektron

aus dem HOMO an den Fluorophor zurück. Daraufhin befindet sich der *Quencher* im angeregten Zustand und der Fluorophor im Grundzustand (Abbildung 10). Für einen effizienten Elektronenaustausch müssen Donor und Akzeptor in einen Abstand von weniger als 10 Å vorliegen, um eine Überlappung der Molekülorbitale zu ermöglichen. Wie beim FRET müssen auch hier Fluoreszenzspektrum des Donors und Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Im Gegensatz zum FRET sind hier jedoch auch spinverbotene Übergänge zwischen Triplettzuständen möglich.^[59, 64, 67]

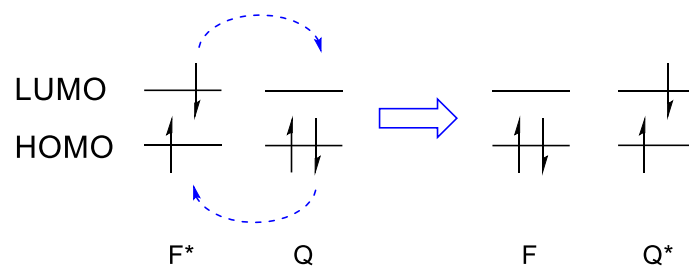


Abbildung 10: Elektronenaustausch zwischen Fluorophor und *Quencher*. Ein Elektron geht vom LUMO des angeregten Fluorophors (F*) in das LUMO des *Quenchers* über, dafür wandert ein Elektron aus dem HOMO des *Quenchers* (Q) in das HOMO des Fluorophors.^[59, 64, 67]

Beim PET kann zwischen reduktivem und oxidativem *Quenching* unterschieden werden (Abbildung 11). Beim reduktiven *Quenching* fungiert der *Quencher* als Donor und überträgt ein Elektron an den angeregten Fluorophor (Akzeptor). Daraufhin bildet sich ein Komplex zwischen reduziertem Fluorophor und oxidiertem *Quencher*. Beim oxidativen *Quenching* agiert der angeregte Fluorophor als Donor und überträgt sein angeregtes Elektron an den *Quencher* (Akzeptor). Hierbei bildet sich ein Komplex zwischen oxidiertem Fluorophor und reduziertem *Quencher*. Dieser Komplex kann in beiden Fällen strahlungsfrei zerfallen.

Bildet sich der Komplex ohne dass ein Elektron vollständig übertragen wird und es stattdessen zwischen Donor und Akzeptor delokalisiert vorliegt, so wird dieser Komplex auch Exciplex (*excited complex*) genannt. Dieser ist nur im angeregten Zustand stabil und bei der Rückkehr in den Grundzustand zerfällt der Exciplex unter Emission eines Photons wieder in Donor und Akzeptor. Sind Donor- und Akzeptormolekül identisch wird der angeregte Komplex Excimer (*excited dimer*) genannt.^[59, 64, 67, 70-71]

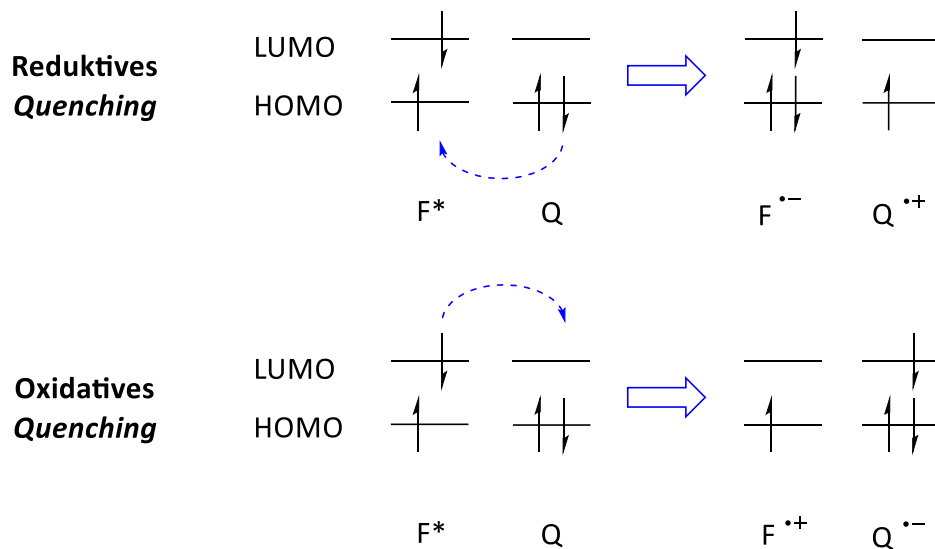


Abbildung 11: Reduktives und oxidatives *Quenching* durch PET. Beim reductiven *Quenching* geht unter Komplexbildung ein Elektron vom HOMO des *Quenchers* (Q) auf das HOMO des angeregten Fluorophors (F^*) über. Beim oxidativen *Quenching* geht ein Elektron vom LUMO des F^* in das LUMO des Q über.^[59, 64, 67, 70]

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

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten fluorophormarkierte Oligonukleotide wurden als Sonden für die Detektion von Nukleinsäuren eingesetzt. Das folgende Kapitel gibt einen Einblick in Methoden, die zur Detektion von Nukleinsäuren in Zellen verwendet werden.

Im Jahr 1969 entwickelten GALL und PARDUE^[72-73] eine Technik, bei der radiomarkierte Nukleinsäuresonden mit komplementären Zielsequenzen in Zellen hybridisieren, um diese anschließend mittels Autoradiographie zu analysieren. Die Methode, auch *in-situ*-Hybridisierung (ISH) genannt, entwickelte sich zu einem wichtigen Werkzeug in der klinischen Diagnostik und Forschung. Die Methode ist allerdings zeitaufwändig, birgt gesundheitliche Gefahren und der rasche Zerfall der radioaktiven Isotope führt zu einer schlechten Auflösung. BAUMAN *et al.*^[74] verwendete daher 1980 anstatt radioaktiver Isotope Fluorophore zur Markierung der Nukleinsäuren, wodurch die Auflösung besser und die Methode schneller sowie sicherer wurde. Aufgrund des Einsatzes von Fluorophoren wird diese verbesserte Methode auch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) genannt. Eine schematische Darstellung eines FISH-Experiments ist in Abbildung 12 dargestellt. Bei dieser Methode wird

eine Zelle oder Gewebe, welches eine gesuchte Nukleinsäure enthält, fixiert und anschließend mit fluorophormarkierten Nukleinsäuresonden versetzt. Die Sonden werden mit der komplementären Zielsequenz hybridisiert und überschüssige unhybridisierte Sonden ausgewaschen. Anschließend kann die Zelle oder das Gewebe unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und das Fluoreszenzsignal der Sonden detektiert werden.^[75-76]

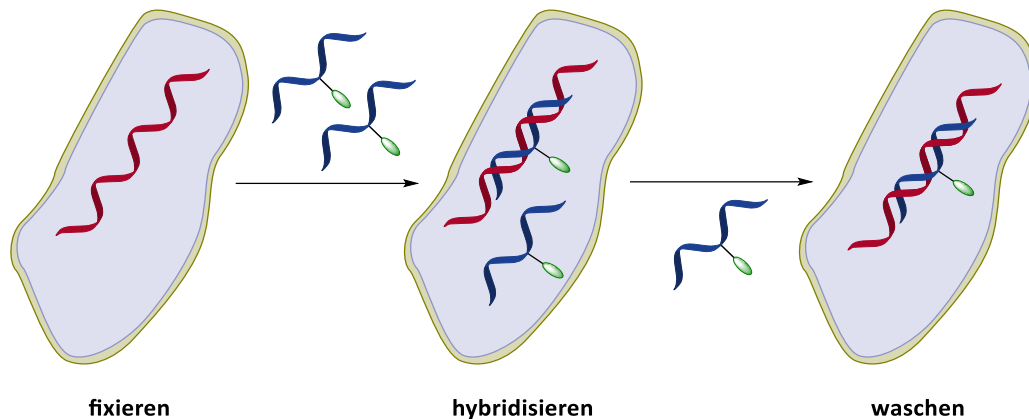


Abbildung 12: Schematischer Ablauf bei der Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung. Zellen, welche eine gesuchte Nukleinsäure (rot) enthalten werden fixiert, mit Sonden (blau), welche einen Fluorophor (grün) enthalten, hybridisiert und überschüssige Sonden ausgewaschen.^[76]

Ein großes Problem bei dieser Methode ist die hohe Hintergrundfluoreszenz, die durch unspezifische Bindungen der Sonden auftreten. Um diese zu senken, versetzten LANDEGENT *et al.* die Zellen zuerst mit unmarkierten unspezifischen Nukleinsäuren, damit unspezifische Bindungsstellen in der Zelle besetzt werden, bevor die eigentlichen fluorophor-markierten Sonden zugegeben wurden.^[77] Weiter kann die Verwendung mehrerer kürzerer Sondensequenzen die Spezifität erhöhen und so ebenfalls das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis verbessern.^[78]

Durch Verbesserungen in der Hardware von Mikroskopen und Detektoren sowie durch Verbesserungen der Algorithmen zur Signalauswertung konnten immer kleinere Ziele und schwächere Signale erkannt werden. So gelang es schließlich sogar mit Hilfe von Sonden, welche mit je fünf Fluorophoren markiert waren, den genauen Aufenthaltsort einzelner mRNA-Moleküle in Zellen sichtbar zu machen (*single molecule FISH*; sm-FISH).^[79-80] Jedoch sind Synthese und Aufreinigung solcher mehrfach fluorophormarkierter Sonden aufwendig und durch Wechselwirkung zwischen den Fluorophoren kann es außerdem zur

Fluoreszenzlöschung kommen. Weiterhin sorgten unspezifische Bindungen der Sonden immer noch für falsch-positive Signale. TYAGI *et al.* entwickelten daher eine Methode, bei der 48 oder mehr kurze Sonden, die jeweils mit einem Fluorophor markiert wurden, komplementär an ein einzelnes mRNA Molekül binden (Abbildung 13).^[81-82] Da das Signal erst detektierbar wird, wenn ungefähr zehn oder mehr Sonden an die mRNA gebunden sind, nimmt die Anzahl falsch-positiver Signale durch unspezifische Bindungen bei dieser Methode deutlich ab.^[83]



Abbildung 13: Funktionsweise der *sm*-FISH. Mehrere mit je einem Fluorophor (grün) markierte Sonden (blau) hybridisieren an eine Zielsequenz (rot).^[82]

Die Verwendung einer großen Anzahl an Sonden kann jedoch auch zu unspezifischen Bindungen und einem schlechteren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis führen. Daher verwendeten CARELL *et al.* eine Methode, die einen Kompromiss zwischen der Anzahl an Sonden und der Anzahl an Fluorophormarkierungen pro Sonde darstellt. Dabei wurden zehn Sonden über die CuAAC mit je drei Fluorophoren markiert, welche durch je zwei Sulfonatgruppen zweifach negativ geladen waren. Dadurch konnte die Wechselwirkung zwischen den Fluorophoren bzw. der Fluorophore mit der negativ geladenen Nukleinsäure minimiert werden. Falsch positive Signalen konnten so weiter vermindert und Zielsequenzen, die aufgrund ihrer Sekundärstruktur nur wenige Bindungsstellen bieten, auch in geringer Konzentration erfolgreich markiert werden.^[84]

Darüber hinaus wurden noch viele weitere FISH-Varianten mit unterschiedlichem Anwendungsgebiet und spezieller Optimierung entwickelt.^[85] Unspezifische Hintergrundsignale, welche durch nicht vollständig ausgewaschene Sonden verursacht werden, bleiben jedoch weiterhin ein Problem. Vor allem bei der Markierung von Nukleinsäuren in lebenden Zellen, die nicht einfach gewaschen werden können, sollten ungebundene Sonden kein positives Fluoreszenzsignal aussenden. Daher ist die Verwendung von Fluorophoren, welche sensitiv auf Veränderungen in ihrer Umgebung, wie die Hybridisierung an komplementäre

Nukleinsäuren, mit einem Wechsel in ihrem Fluoreszenzsignal reagieren können, von großer Bedeutung für die Markierung von Nukleinsäuren in lebenden Zellen.^[28]

2.6 Umgebungssensitive Fluorophore

Um beurteilen zu können, ob sich ein Fluorophor für die Markierung von Biomolekülen, wie Nukleinsäuren, die in dieser Arbeit detektiert werden sollen, eignet, müssen folgende Eigenschaften untersucht werden. Die wichtigsten Parameter sind hohe Photostabilität, Fluoreszenzquantenausbeuten, Helligkeit (Produkt aus Extinktion und Quantenausbeute), große STOKES-Verschiebung und eine Anregung bei mehr als 400 nm.^[24, 86] Darüber hinaus sollten Fluorophore auch in der Lage sein, auf Veränderungen in ihrer Umgebung mit einer Änderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften zu reagieren, um damit Interaktionen zwischen Biomolekülen, wie z.B. die Hybridisierung von Nukleinsäuren, die in dieser Arbeit eine besondere Rolle spielt, anzeigen zu können. Dabei kann es sich um eine Änderung in der Fluoreszenzintensität, der Emissionsfarbe, dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Wellenlängen, der Fluoreszenzlebenszeit oder der Anisotropie handeln (Abbildung 14). Oft kann auch eine Veränderung mehrere Eigenschaften auftreten.^[87]

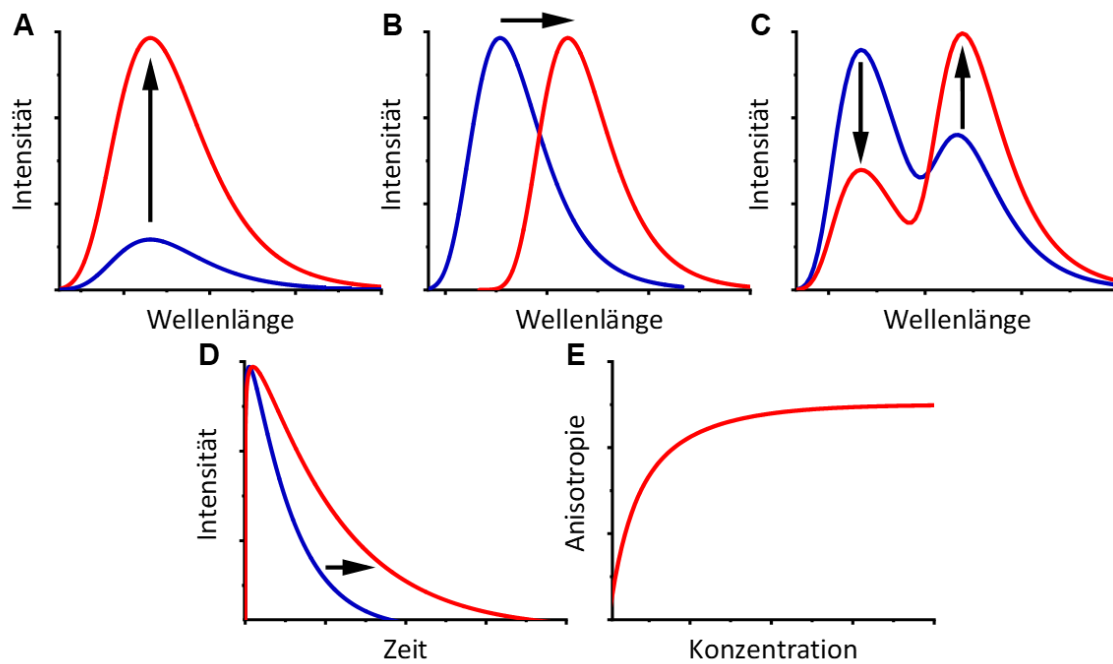


Abbildung 14: Übersicht über verschiedene durch Fluoreszenzspektroskopie messbare Größen, mit denen sich Änderungen in der molekularen Struktur, Dynamik und Interaktion verfolgen lassen. Dargestellt sind Änderungen in (A) der Fluoreszenzintensität, (B) der Emissionsfarbe, (C) dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Wellenlängen, (D) der Fluoreszenzlebenszeit und (E) der Anisotropie.^[87]

Die Fluoreszenzintensität ist bei weitem die am häufigsten verwendete Messgröße, um den Einfluss der Umgebung auf Fluorophore zu untersuchen. Wichtige Beispiele sind die Fluoreszenzlöschung von 2-Aminopurin in DNA^[88], die Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen^[89], die Beobachtung von Protein-DNA-Interaktionen^[90], die Aufklärung von DNA-Reparaturmechanismen^[91] und die Anwendung in Aptameren^[92]. Der Vorteil bei der Beobachtung der Fluoreszenzintensität liegt in der Einfachheit und der hohen Sensitivität der Messmethode. Da die Fluoreszenzintensität jedoch abhängig von den instrumentellen Bedingungen, wie Helligkeit der Lichtquelle und Sensitivität des Detektors ist, sind Ergebnisse an unterschiedlichen Geräten nicht reproduzierbar. Die Fluoreszenzintensität ist auch abhängig von der Konzentration des Fluorophors, welche nicht immer genau bekannt ist. Daher wird häufig die Fluoreszenzquantenausbeute gemessen, da diese unabhängig von diesen Bedingungen ist und sich somit besser zum Vergleich von Ergebnissen eignet.

Möglich ist auch die Beobachtung der Fluoreszenzlebenszeit. Dabei wird der Zerfall des angeregten fluoreszierenden Zustands in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Diese Methode

wurde unter anderem dazu verwendet, DNA-Protein-Interaktionen zu beobachten^[93], Viskosität in Zellen zu bestimmen^[94] und neurodegenerative Krankheiten zu untersuchen.^[95]

Eine weitere Möglichkeit wie Fluorophore auf ihre Umgebung reagieren können, ist über eine Änderung der Emissionsfarbe. Beispiele sind die Farbänderung von 4-Aminophthalimid in verschiedenen Lösungsmitteln^[96], die Beobachtung von Protein-wechselwirkungen^[97] und die Unterscheidung von kleiner und großer Furche in Nukleinsäuren verschiedener Formen.^[98]

Liegt ein System vor, bei dem zwei Wellenlängen gleichzeitig emittiert werden, welche sich in ihrer Intensität je nach Umgebung verändern, können über das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten zueinander Rückschlüsse auf die molekulare Umgebung, wie die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen^[99], Glucose^[100] oder den pH-Wert^[101] gezogen werden.

Die Anisotropie beschreibt die Größe der polarisierten Emission. Werden bestimmte Fluorophore mit polarisiertem Licht bestrahlt, so werden bevorzugt Fluorophore mit einer bestimmten Ausrichtung angeregt. Sind diese in ihrer Bewegung eingeschränkt, kommt es zu einer polarisierten Emission in nur eine Richtung, es liegt eine hohe Anisotropie vor. Können die angeregten Fluorophore frei rotieren, emittieren sie Licht in jede Richtung und es kommt zur Depolarisation, die Anisotropie ist niedrig. Änderungen in der Anisotropie konnten beispielsweise helfen die Prozesse der ATP-Hydrolyse^[102], Proteinentfaltung^[103] und Helikase-katalysierten Entwindung von DNA^[104] besser zu verstehen. Aufgrund der Verwendung von Polarisationsfiltern bei Anisotropiemessungen fällt jedoch die Sensitivität dieser Methode geringer aus.^[87]

Welche Methode zu Detektion gewählt wird, hängt vom Ziel des Forschungsprojekts oder von der neuen Technologie, die entwickelt werden soll, ab. Für die Untersuchung der Hybridisierung von Nukleinsäuren sollten klar unterscheidbare Signale für den gebundenen und den ungebundenen Zustand erhalten werden.^[87]

Funktionsweisen umgebungssensitiver Fluorophore

Ein Übersicht über verschiedener Mechanismen, die eine Änderung der fluoreszenten Eigenschaften eines Fluorophors bewirken können ist in Abbildung 15 dargestellt. Dazu gehören Ladungstransfer, Protonentransfer, Konformationsänderungen, durch Aggregation verursachtes *Quenching* und durch Aggregation verursachte Emission. Dabei kann es auch zu einer Kombination mehrerer Mechanismen kommen.^[105]

Fluorophore, welche einen Ladungstransfer durchführen können, besitzen Donor- und Akzeptorgruppen, wodurch nach der Absorption eines Photons die Ladung von der Donor- auf die Akzeptorgruppe übertragen werden kann. Dies führt zu einem dipolaren angeregten Zustand, welcher mit der Umgebung wechselwirken und von dieser stabilisiert werden kann. Je polarer die Umgebung des angeregten dipolaren Fluorophors, desto besser wird dieser Zustand stabilisiert und desto größer wird die Wellenlänge des emittierten Lichts. Dieser Effekt konnte unter anderem bereits dazu ausgenutzt werden, um die Eigenschaften von Biomembranen^[106] und Ligand-Protein-Wechselwirkungen^[107] zu untersuchen.

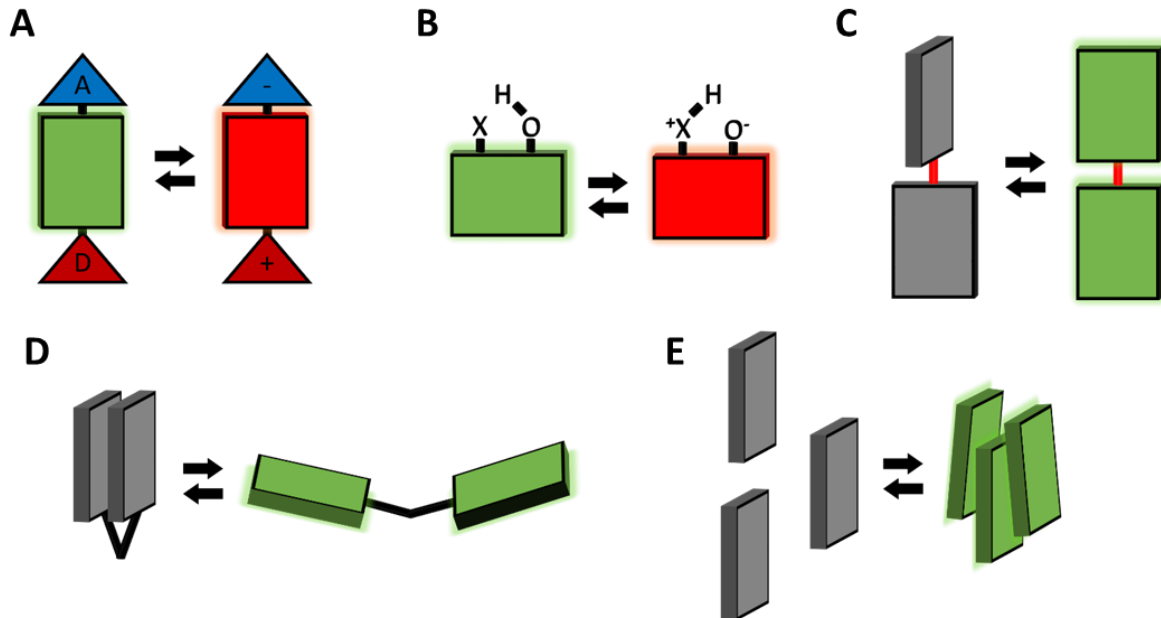


Abbildung 15: Übersicht verschiedener Mechanismen, die bei umgebungssensitiven Farbstoffen eine Rolle spielen. Dazu gehören (A) Ladungstransfer, (B) Protonentransfer, (C) Konformationsänderungen, (D) durch Aggregation verursachtes *Quenching* und (E) durch Aggregation verursachte Emission.^[105]

Ist ein angeregter Fluorophor in der Lage, einen intramolekularen Protonentransfer durchzuführen, kann ein angeregter Tautomer entstehen, der bei Relaxation ein Photon höherer Wellenlänge emittiert. Je polarer und protischer eine Umgebung, desto mehr wird der Protonentransfer gehemmt und desto weniger wird die Emission vom Tautomer bestimmt. In unpolaren Umgebungen dominiert dagegen der Tautomer die Emission. Über das Verhältnis der Emission des normalen und des tautomeren Fluorophors lassen sich so Rückschlüsse auf die Polarität der Umgebung schließen. Dadurch war es möglich, Vorgänge bei der Apoptose^[108], bei Proteininteraktionen^[109] und bei der Parkinson-erkrankung^[110] zu detektieren.

Manche angeregten Fluorophore können durch Änderung in ihrer Konformation strahlungslos in den Grundzustand relaxieren. Dabei handelt es sich meist um eine interne Rotation, welche die Planarität des Fluorophors stört. Wird diese Konformationsänderung durch die vorliegende Umgebung erschwert, kann das Emissionsvermögen und die Fluoreszenzlebenszeit des Fluorophors ansteigen. Damit lassen sich z.B. Rezeptoren auf Zelloberflächen visualisieren^[111], die Viskosität von Plasmamembranen in Zellen bestimmen^[112] und Fehlstellen in Nukleinsäuren detektieren.^[113]

Aggregationsinduziertes *Quenching* bezeichnet den Prozess, wenn es bei Fluorophoren in polarer Umgebung zu hydrophoben Wechselwirkungen untereinander kommt, wodurch sich nichtfluoreszierende H-Aggregate bilden. In unpolarer Umgebung lösen sich die Aggregate auf und es kommt zur Emission. Dabei kann es sich sowohl um intra- als auch um intermolekulare Aggregation handeln. Beispiele, bei denen dieses Verhalten von Fluorophoren ausgenutzt wurde, sind die Detektion von Rezeptoren^[114] und Membranen.^[115] Es gibt auch Fluorophore, welche einen umgekehrten Effekt zeigen. Bei diesen führt Aggregation zu einem Anstieg in der Fluoreszenz, was beispielsweise für DNA-templierten Energietransport genutzt werden kann.^[116]

Manche Fluorophore sind in der Lage, auf Einflüsse aus der Umgebung, wie Polarität, Viskosität und molekulare Ordnung, zu reagieren und in ihrem Fluoreszenzsignal widerzuspiegeln. Damit können sie helfen die Eigenschaften von Lipidmembranen zu

verstehen, die Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen zu beobachten und Zielmoleküle in lebenden Zellen sichtbar zu machen.^[105]

2.7 Hybridisierungssensitive Sonden

Um Nukleinsäuren, die in lebenden Zellen und Gewebe vorliegen, für die Fluoreszenzmikroskopie zugänglich zu machen, braucht es Sonden, welche in der Lage sind ihr Fluoreszenzverhalten zu ändern, wenn sie mit der Zielnukleinsäure hybridisieren. Dafür gibt es verschiedene Konzepte, welche umgebungssensitive Fluorophore verwenden, um eine Hybridisierungssensitivität zu erreichen. Weit verbreitet sind Konzepte, die auf einem *Quenching*-Mechanismus oder manchmal auch einer Wellenlängenverschiebung beruhen, wie *Molecular Beacons* (MB). Dabei basiert die Sonde auf einer einzelsträngigen Nukleinsäure, welche aus einer Schleife und einem Stamm besteht (Abbildung 16). Die Schleife wird aus einer Erkennungssequenz gebildet, welche komplementär zur Zielnukleinsäure ist. Der Stamm setzt sich aus zwei aneinandergelagerten komplementären Sequenzen zusammen, welche auf jeder Seite der Erkennungssequenz liegen. An einer der beiden Stammsequenzen ist ein Fluorophor gebunden und an der anderen Stammsequenz ein *Quencher*. Die komplementären Stammsequenzen bringen Fluorophor und *Quencher* zusammen, wodurch die Fluoreszenz meist über einen FRET-Mechanismus gelöscht wird. Wenn die Erkennungssequenz der Sonde mit einem Zielmolekül hybridisiert, werden dabei Fluorophor und *Quencher* getrennt, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht.^[117-119]

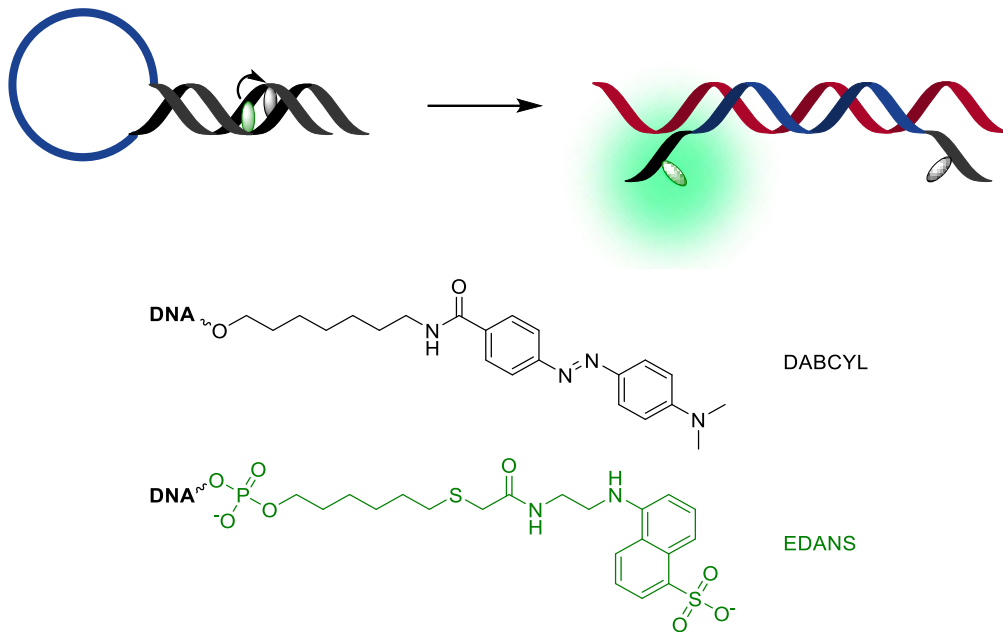


Abbildung 16: Oben: Hybridisierungsvorgang von *Molecular Beacons* (MB) mit einem Zielmolekül (rot). Der MB besteht aus einer Stammregion (schwarz), einer Schleifenregion (blau), einem Fluorophor (grün) und einem *Quencher* (grau). Unten: Von TYAGI *et al.* verwendetes Fluorophor-*Quencher*-Paar bestehend aus 5-(2'-Aminoethyl)aminonaphthalen-1-sulfonsäure (EDANS) am 5'-Ende und 4-(4'-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL) am 3'-Ende der Nukleinsäure.^[117]

ASANUMA *et al.* konnten dieses Konzept unter Verwendung von *acyclic D-threoniol nucleic acid* (D-aTNA) so weiterentwickeln, dass kein *Quencher* und keine Stammsequenz mehr benötigt werden. Diese sogenannten linearen Sonden bestehen aus einer Erkennungssequenz, welche mehrere, durch die natürlichen Nukleotide voneinander getrennte, an D-aTNA gebundene Perylen-fluorophore enthält (Abbildung 17). Liegt keine Zielsequenz vor, können die Fluorophore aufgrund der hohen Flexibilität der D-aTNA miteinander wechselwirken und es kommt zur Fluoreszenzlöschung. Hybridisiert die Sonde mit dem Zielmolekül, interkalieren die Fluorophore zwischen die Basenpaare und es kommt zu einem starken Fluoreszenzsignal. Unter Verwendung von *serinol nucleic acid* (SNA) konnte diese Methode noch weiter ausgebaut werden.^[120-123]

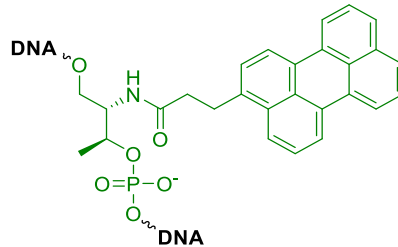
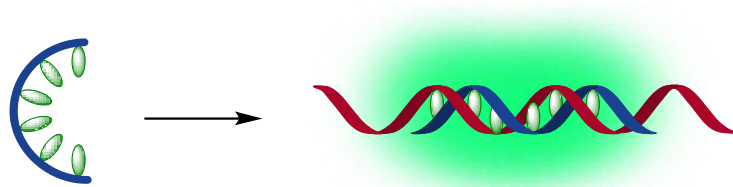


Abbildung 17: Oben: Hybridisierungsvorgang von linearen Sonden bestehend aus Erkennungssequenz (blau) und Fluorophoren (grün) mit einem Zielmolekül (rot). Unten: An D-aTNA gebundener Perylenfluorophor.^[120-121]

Ein weiteres Konzept, bei welchem Fluoreszenzlöschung im Sondenstrang eine Rolle spielt, verwendet einen PET zwischen Fluorophor und Nitroindol. Hier enthält die Sonde in der Erkennungssequenz ein Fluorophor und mit einem Nukleotid Abstand ein Nitroindol als Basensurrogat (Abbildung 18). Im Einzelstrang sind Fluorophor und Nitroindol benachbart, wodurch ein PET ablaufen und die Fluoreszenz gelöscht werden kann. Hybridisiert die Sonde mit einem Zielmolekül wird der Abstand zu groß, der stark distanzabhängige PET kann nicht mehr stattfinden und die Fluoreszenz steigt an.^[124]

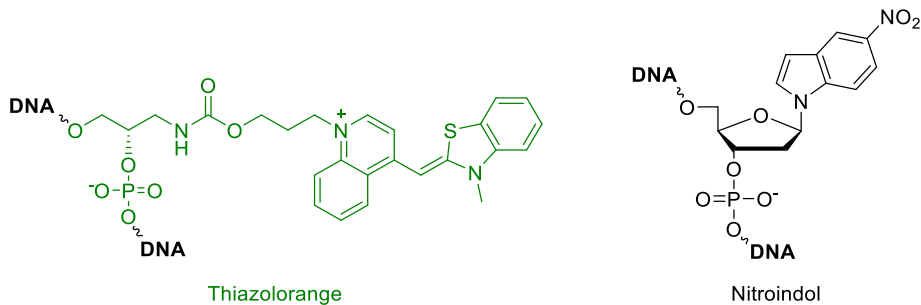


Abbildung 18: Oben: Hybridisierungsvorgang einer Sonde bestehend aus Erkennungssequenz (blau), Fluorophor (grün) und Nitroindol (grau) mit einem Zielmolekül (rot). Unten: Thiazolorangebasensurrogat als möglicher Fluorophor und Nitroindol als PET-Quencher.^[124]

Andere Konzepte favorisieren einen Ansatz, bei dem die Hybridisierung der Sonde mit dem Zielmolekül über einen FRET-Mechanismus einen Farbwechsel in der Fluoreszenz verursacht. Dazu gehören beispielsweise Nukleinsäure *traffic lights* (Abbildung 19). Diese bestehen aus einer Erkennungssequenz, welche einen Donor enthält und einer komplementären Sequenz, welche einen Akzeptor enthält. Wird der Donor angeregt, kommt es zum FRET und einer Emission des Akzeptors. Hybridisiert die Erkennungssequenz mit einem Zielmolekül, wird der Akzeptorstrang verdrängt und der FRET unterbunden, was zu einer Emission des Donors führt.^[125-126]

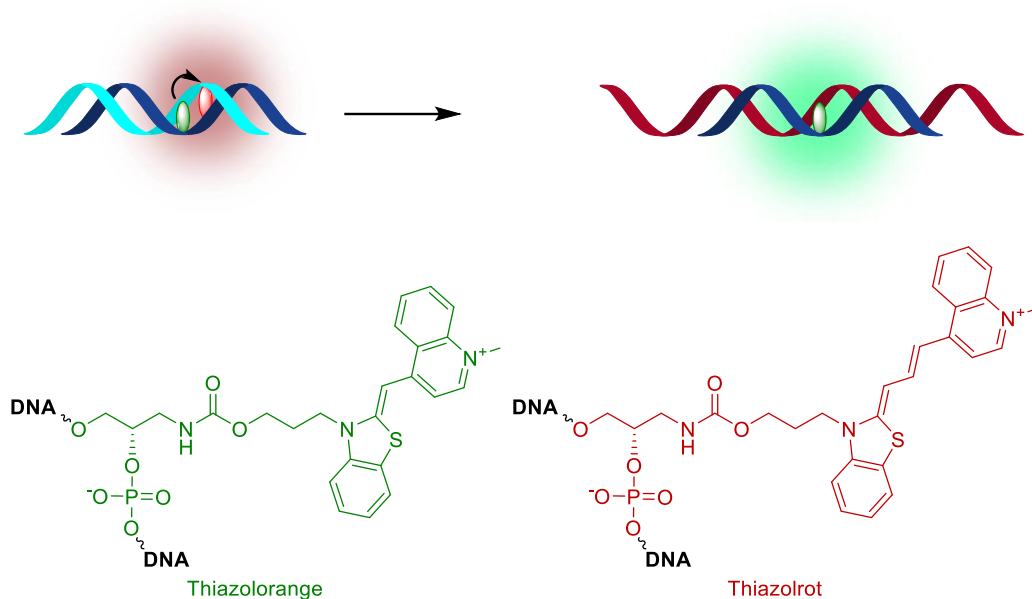


Abbildung 19: Oben: Hybridisierungsvorgang von Nukleinsäure *traffic lights* bestehend aus Erkennungssequenz (blau), komplementären Sequenz (cyan), Donorfluorophor (grün) und Akzeptorfluorophor (rot) mit einem Zielmolekül (rot). Unten: Donor-Akzeptor-Paar bestehend aus Thiazolorange- und Thiazolrotbasensurrogaten.^[125]

Ein weiteres Konzept, bei dem der Wechsel zwischen zwei Farben eine Rolle spielt, sind sogenannte *Binary-Probes* (Abbildung 20). Hierbei werden zwei Arten von fluorophor-markierten Nukleinsäuresonden eingesetzt, wobei eine Sonde einen Donorfluorophor und die andere einen Akzeptorfluorophor besitzt. Wird der Donor in ungebundenem Zustand angeregt, so ist die Distanz zum Akzeptor zu groß für einen FRET und es kommt zur Donoremission. Hybridisieren aber beide Sonden an ein komplementäres Zielmolekül, so kommen sich Donor und Akzeptor so nahe, dass ein FRET stattfinden und es zur Akzeptoremission kommen kann.^[127]

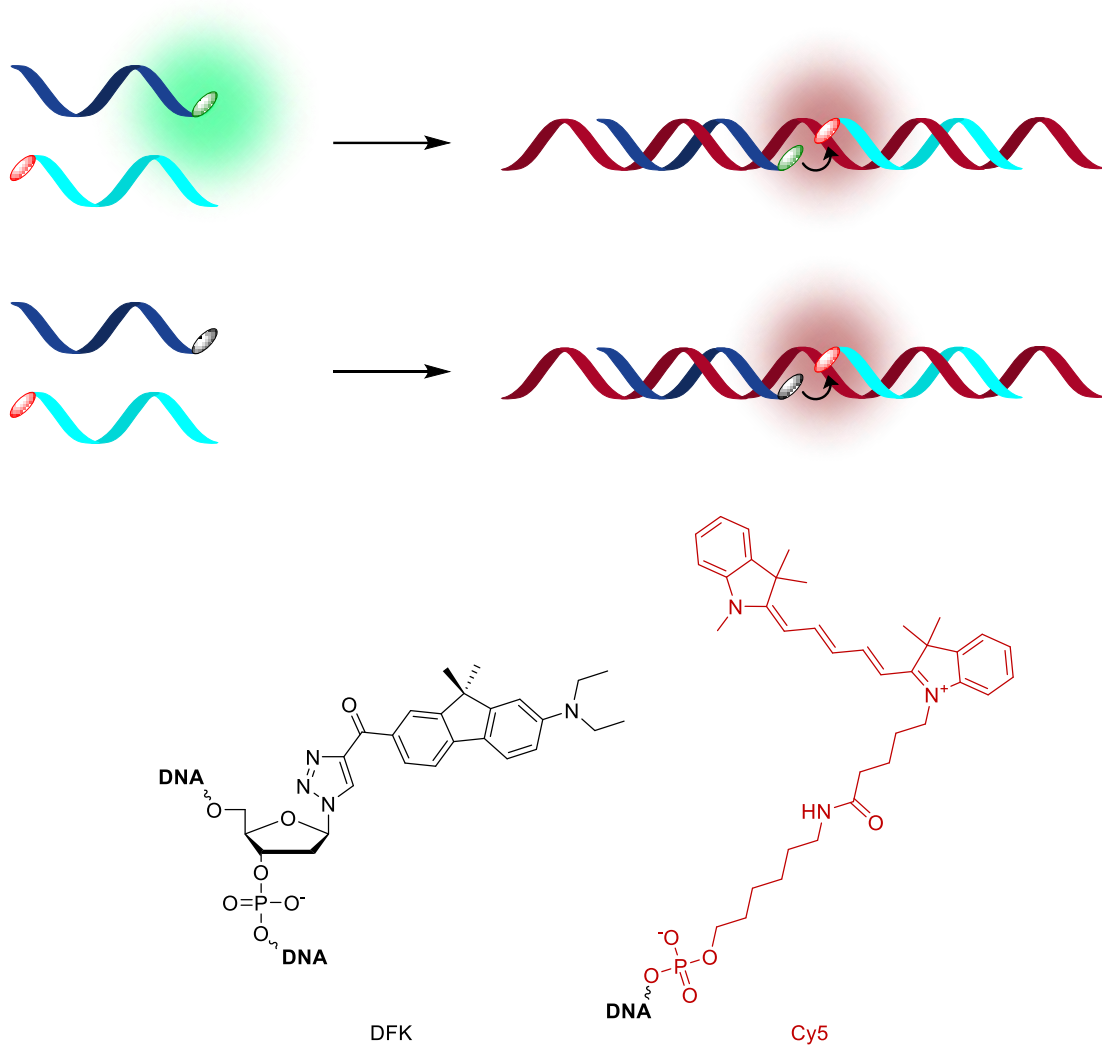


Abbildung 20: Oben: Hybridisierungsvorgang von *Binary-Probes* bestehend aus zwei Erkennungssequenzen (blau und cyan), Donorfluorophor (grün) bzw. gelöschter Donor (grau) und Akzeptorfluorophor (rot) mit einem Zielmolekül (rot) nach FRET- (oben) und DRET-Mechanismus (unten). Unten: Donor-Akzeptor-Paar bestehend aus dem Diethylaminofluorenketotriazolyl-fluorophor (DFK) und Cyanin 5 (Cy5) nach DRET-Mechanismus.^[128]

Dieses Konzept konnte kürzlich unter Verwendung eines *dark resonance energy transfers* (DRET), bei dem die Energie von einem gelöschten Donor auf einen Akzeptor übertragen wird, weiterentwickelt werden. Dabei wird der Donor in gewöhnlichen *Binary-Probes* durch einen gelöschten Donor mit großer STOKES-Verschiebung ersetzt. Dadurch ist die Donorfluoreszenz der ungebunden Sonden zusätzlich gelöscht und es kommt bei der Hybridisierung nicht nur zu einem Farbwechsel, sondern auch zu einem großen Anstieg in der Fluoreszenzintensität und damit zu einem besseren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis.^[128]

Es gibt auch Konzepte, die anstatt zwei verschiedener Fluorophoren, zwei gleiche Fluorophore verwenden, wie z.B. das Konzept der *exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotide* (ECHO) Sonden (Abbildung 21). Dabei sind zwei Thiazolorangefluorophore über einen verzweigten Linker an ein Nukleotid in einer Erkennungssequenz gebunden. In ungebundenem Zustand kommt es zur Aggregation der beiden Fluorophore, wodurch ihre Fluoreszenz gelöscht wird. Hybridisiert die Sonde mit dem Zielmolekül, so interkalieren die Fluorophore in den Basenstapel der Doppelhelix und es kommt zu einem Anstieg der Emission.^[129-131]

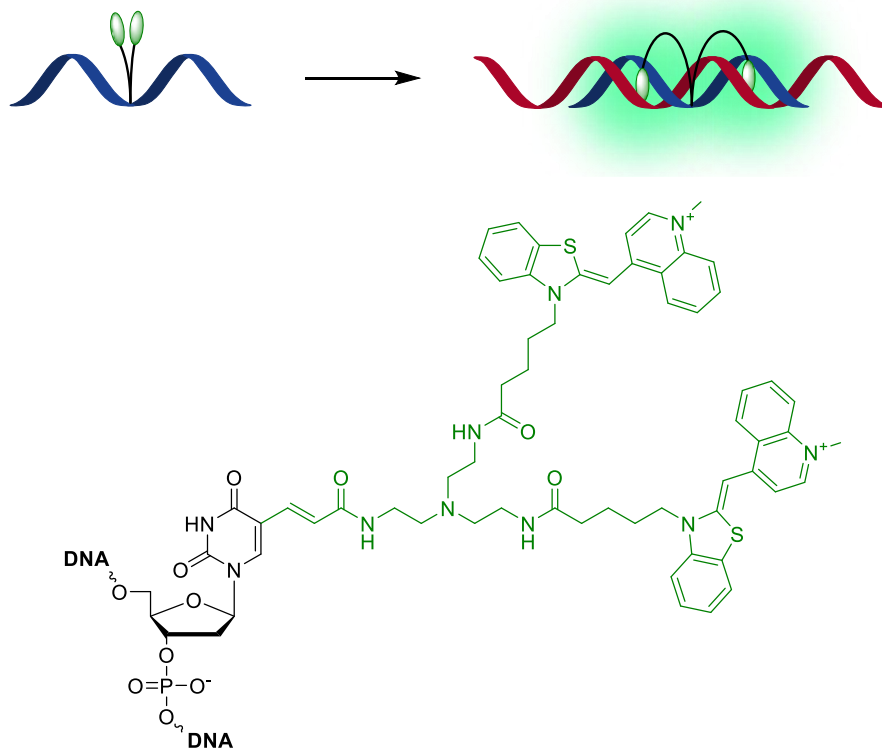


Abbildung 21: Oben: Hybridisierungsvorgang von ECHO Sonden bestehend aus einer Erkennungssequenz (blau) und Fluorophoren (grün) mit einem Zielmolekül (rot). Unten: Zweifach thiazolorangemodifiziertes Nukleotid.^[129-131]

Ebenfalls zwei Thiazolorangefluorophore werden in Sonden verwendet, welche ähnlich wie *traffic lights* oder *molecular beacons* funktionieren können. Die Fluorophore befinden sich als Basensurrogate in zueinander komplementären Sequenzen, wodurch sich ein excimer-ähnlicher Komplex mit wellenlängenverschobener Emission bildet (Abbildung 22). Hybridisiert die Erkennungssequenz mit dem Zielmolekül, liegt der Fluorophor nur noch als Monomer vor und es kommt zu einer Verschiebung in der Emissionswellenlänge.^[29, 132]

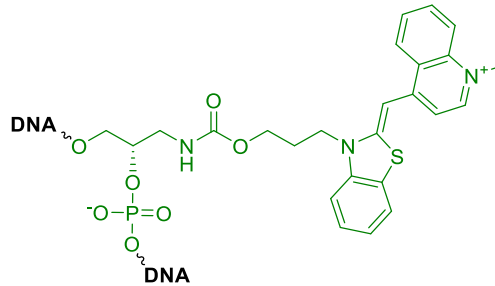
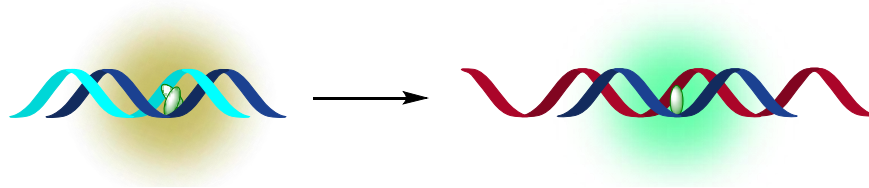


Abbildung 22: Oben: Hybridisierungsvorgang einer Sonde bestehend aus Erkennungssequenz (blau), komplementären Sequenz (cyan) und Fluorophoren (grün) mit einem Zielmolekül (rot). Unten: Thiazolorangebasensurrogat.^[29, 132]

Ein weiteres Konzept umfasst Sonden, welche nur ein Fluorophor benötigen, wie beispielweise *Light-Up* Sonden. Diese besitzen eine Erkennungssequenz aus Peptidnukleinsäuren (PNA) und enthalten außerdem an einem Ende einen Thiazolorangefluorophor, welcher sensitiv auf die Viskosität seiner Umgebung reagieren kann. Im unhybridisierten Zustand ist der Fluorophor frei beweglich und zeigt nur eine geringe Emission. Kommt es zur Hybridisierung mit dem Zielmolekül, kann der Fluorophor in den Basenstapel der Doppelhelix interkalieren und die Fluoreszenzintensität steigt stark an.^[30]

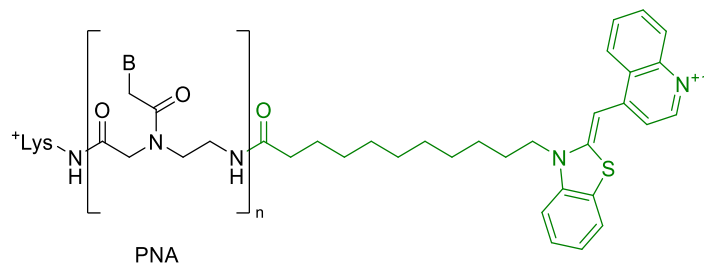
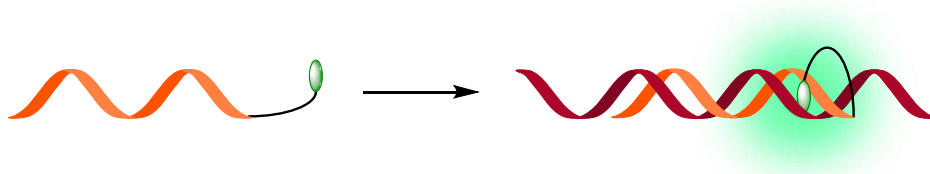


Abbildung 23: Oben: Hybridisierungsvorgang einer *Light-Up* Sonde bestehend aus eine PNA-Erkennungssequenz (orange) und eines Fluorophors (grün) mit einem Zielmolekül (rot). Unten: Thiazolorangemodifikation am N-Terminus einer PNA. B bezeichnet die Nukleotide und Lys⁺ bezeichnet Lysinamid.^[30]

Hierbei konnte jedoch keine DNA als Erkennungssequenz genutzt werden, da aufgrund des langen flexiblen Linkers der Fluorophor auch mit den Nukleotiden der einzelsträngigen DNA

stapeln und so die Fluoreszenz der ungebundenen Sonden erhöhen konnte. SEITZ *et al.* entwickelten das Konzept weiter, indem sie den Fluorophor als Basensurrogat mit einem kurzen Linker in der Mitte der Sequenz integrierten (Abbildung 24). Der kurze Linker soll verhindern, dass es im Einzelstrang zur π - π -Stapelung zwischen dem Fluorophor und den Nucleotiden kommt und gleichzeitig den Fluorophor im Doppelstrang in die Position einer natürlichen Nucleobase und somit zur π - π -Stapelung zwingen. Dadurch zeigen diese *forced intercalation* (FIT) genannten Sonden ebenfalls einen starken Anstieg der Fluoreszenzintensität, wenn sie mit dem Zielmolekül hybridisieren.^[23, 133-135]

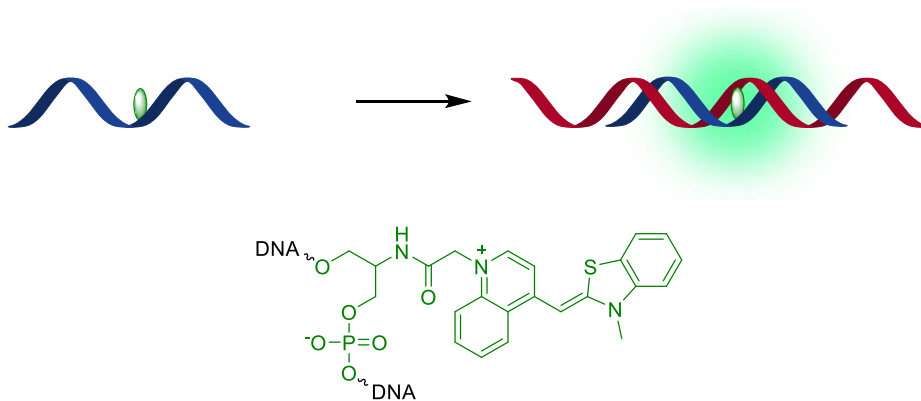


Abbildung 24: Hybridisierungsvorgang einer FIT-Sonde bestehend aus einer Erkennungssequenz (blau) und einem Fluorophor (grün) mit einem Zielmolekül (rot).^[23, 133-135]

3 Synthese

Die Synthese von hybridisierungssensitiven Sonden gestaltet sich oft aufwendig, da meist für jeden untersuchten Fluorophor ein separates Phosphoramidit mit unterschiedlicher Syntheseroute hergestellt werden muss. Daher ist ein postsynthetischer Ansatz, bei dem lediglich eine kleine funktionelle Gruppe während der Festphasensynthese eingebracht wird, von großem Vorteil.^[45, 136] Diese kann nach der Oligonukleotidsynthese mit einem Fluorophor gekuppelt werden. So werden nicht nur die harschen Reaktionsbedingungen und schlechten Ausbeuten während der Festphasensynthese umgangen, sondern es besteht außerdem eine höhere Modularität, da verschiedene Fluorophore an diese Modifikation geknüpft werden können, ohne dass ein neues Phosphoramidit synthetisiert werden muss. Eine weit verbreitete Methode zur postsynthetischen Markierung verwendet Aminogruppen, die in Nukleinsäuren eingebracht und anschließend mit dem Aktivester eines Fluorophors gekuppelt werden.^[43] Allerdings weist diese Methode nur geringe Ausbeuten bei der Kupplung auf und es kann zu Nebenreaktionen mit den Aminogruppen der Nukleotide kommen.^[43, 45] Dagegen bringt eine postsynthetische Modifikation mittels CuAAC hohe Ausbeuten bei milden Reaktionsbedingungen. Hierfür werden meist Alkinfunktionen in eine Nukleinsäure eingebracht, welche anschließend mit azidfunktionalisierten Fluorophoren gekuppelt werden.^[43, 45] Einige wichtige Beispiele für Möglichkeiten, eine Alkinfunktion in ein Oligonukleotid einzubringen, sind in Abbildung 25 dargestellt. Dabei kann ein Alkin an verschiedenen Positionen, wie z.B. an die 5- oder 2'-O-Position eines Uridins^[51], die 1'-Position eines Ribofuranosids^[137] oder an ein acyclisches Carbamat^[138] geknüpft werden.

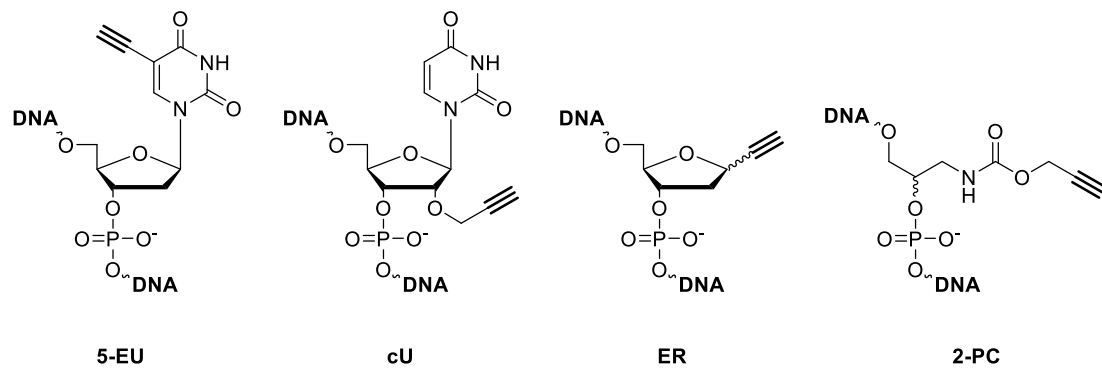


Abbildung 25: Kommerziell erhältlichen Nukleinsäuremodifikationen 5-Ethynyl-Uridin (**5-EdU**), 2'-O-Propargyl-uridin (**cU**) und Ethynylribose (**ER**) sowie dem acyclischen 2-Propynylcarbamat (**2-PC**).

Die bisher verfügbaren Möglichkeiten zeichnen sich jedoch meist durch eine große Distanz zwischen Nukleinsäurerückgrat und Alkinfunktion aus. Für die Anwendung in hybridisierungssensitiven Sonden sollte die Anbindung aber dafür sorgen, dass sich die unmittelbare Umgebung eines verknüpften Fluorophors in Abhängigkeit des Hybridisierungszustandes ändert. Dadurch kann ein umgebungssensitiver Fluorophor in die Lage versetzt werden, zwischen dem unhybridisierten und hybridisierten Zustand der Nukleinsäure zu unterscheiden. Es benötigt also eine Anknüpfung, welche die Stapelung des Fluorophors im unhybridisierten Zustand verhindert und eine Interkalation oder Bindung in der kleinen Furche im hybridisierten Zustand ermöglicht. Ein kurzer Linker, welcher den Fluorophor in der Doppelhelix in die Position einer kanonischen Nukleobase bringt, sollte die gewünschten Eigenschaften mit sich bringen.^[23]

Deshalb wurde ein kurzer Alkinlinker synthetisiert, welcher sich über die Oligonukleotid-Festphasensynthese an die Position eines beliebigen Nukleotids in einer Nukleinsäure einbringen lässt und eine anschließende Verknüpfung mit azidmodifizierten Fluorophoren erlaubt. Um zusätzlich den Einfluss der Konfiguration des Alkinlinkers zu untersuchen, wurden beide möglichen Enantiomere synthetisiert. Außerdem wurden azidmodifizierte umgebungssensitive Indolvinylfluorophore als Kupplungspartner für den Alkinlinker synthetisiert. Dabei wurde die Azidfunktion an verschiedenen Stellen des Fluorophors angebracht, um den Einfluss der Position der Azidfunktion zu untersuchen. Abschließend wurden verschieden azidfunktionalisierte Thiazolorangefluorophore zur Verknüpfung mit

dem Alkinlinker synthetisiert, da diese oft in hybridisierungssensitiven Sonden verwendet werden.

3.1 Alkinlinkersynthesen (DNA-Bausteine)

Die Syntheseroute des für die Oligonukleotid-Festphasensynthese DMTr-geschützten S-konfigurierten Alkinlinkers **6** ist in Abbildung 26 dargestellt. Dabei wurde zu Beginn der kommerziell erhältliche, zweifach acetalgeschützte Zuckeralkohol **1** oxidativ unter Bildung des flüchtigen Aldehyds **2** gespalten, welches anschließend direkt in einer COREY-FUCHS-Reaktion zuerst in das Dibromid **3** mit einer Ausbeute von 43 % und danach in das Alkin **4** überführt wurde. Dieses wurde ohne Aufreinigung einer Acetalspaltung unterworfen, um den ungeschützten Alkinlinker **5** in einer Ausbeute von 52 % zu erhalten. Die bis zu diesem Schritt literaturbekannte Synthese wurde von einer DMTr-Schätzung mit einer Ausbeute von 68 % gefolgt, um den Alkinlinker für die DNA-Festphasensynthese vorzubereiten. Damit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 15 % über fünf Stufen für den DMTr-geschützten Alkinlinker **6**.^[139-141]

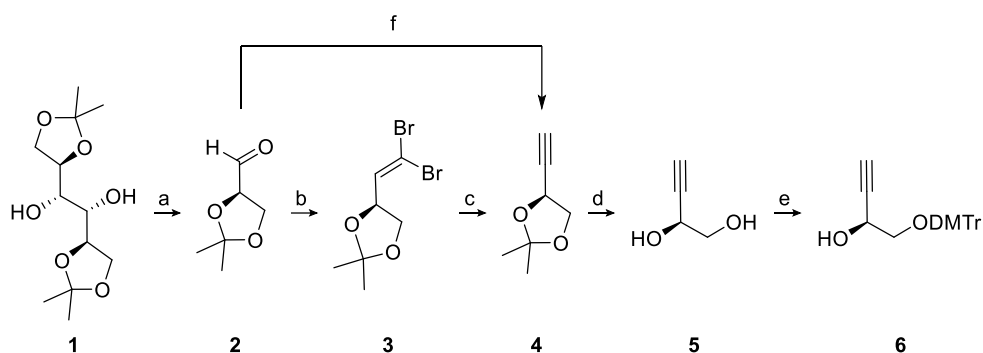


Abbildung 26: Syntheseroute des DMTr-geschützten Alkinlinkers **51**. a) NaIO₄, NaHCO₃, DCM/H₂O, 0 °C -> RT, 2 h; b) CBr₄, PPh₃, Et₃N, DCM, 0 °C, 30 min, 43 % (zwei Stufen); c) n-BuLi, THF, -78 °C -> 10 °C, 2 h; d) Dowex® 50WX8, MeOH, 35 °C, ü.N., 52 % (zwei Stufen); e) DMTr-Cl, Pyridin, RT, ü.N., 68 %; f) OHIRA-BESTMANN-Reagenz, K₂CO₃, MeOH, 0 °C -> RT, ü.N..

Es wurde ebenfalls eine alternative Syntheseroute verwendet, bei welcher auf die COREY-FUCHS-Reaktion verzichtet und stattdessen Aldehyd **2** unter Verwendung des OHIRA-BESTMANN-Reagenzes in einer modifizierten SEYFERTH-GILBERT-Reaktion direkt in das Alkin **4** überführt wird. Anschließend wurde **5** direkt mit nur einmaliger Aufreinigung in einer Ausbeute von 41 %

erhalten. Damit liegt die Gesamtausbeute dieser Syntheseroute für den DMTr-geschützten Alkinlinker **6** bei 28 % über vier Stufen.^[142]

Die Syntheseroute des R-konfigurierten Alkinlinkers ist in Abbildung 27 gezeigt. Dabei wurde von dem kommerziell erhältlichen Diol **7** ausgegangen, welches im Gegensatz zu der in der Literatur bekannten Synthese nicht mit einer Benzyl-, sondern mit einer DMTr-Schutzgruppe an einer der beiden Hydroxyfunktion geschützt wurde. Dabei wurde das DMTr-geschützte Dioxolan **8** in einer Ausbeute von 70 % erhalten. Die zweite Hydroxyfunktion wurde in einer APPEL-Reaktion durch eine Chloridfunktion substituiert, wodurch **9** in einer Ausbeute von 77 % gewonnen wurde. Im letzten Schritt wurde durch Eliminierung mit Hilfe von LDA der DMTr-geschützte Alkinlinker **10** in einer Ausbeute von 73 % erhalten. Damit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 39 % über drei Stufen für die Synthese von **10**.^[143-146]

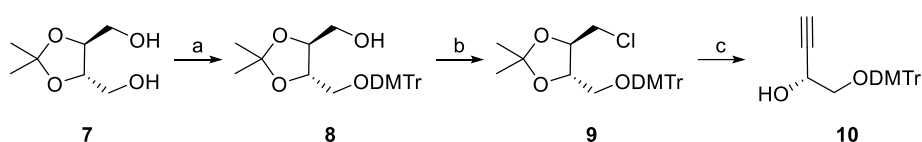


Abbildung 27: Syntheseroute des DMTr-geschützten Alkinlinkers **R1**. a) DMTr-Cl, Pyridin, RT, ü.N., 70 %; b) CCl₄, PPh₃, Pyridin, 60 °C, 12 h, 77 %; c) LDA, THF, -78 °C → 0 °C, 3 h, 73 %.

Die DMTr-geschützten Alkinlinker **6** und **10** sollten anschließend zu Phosphoramiditen für die Oligonukleotid-Festphasensynthese umgesetzt werden (Abbildung 28). Allerdings konnte dabei trotz vollem Umsatz kein Produkt isoliert werden. Dies könnte möglicherweise auf eine Reaktion des nichtbindenden Elektronenpaares der Phosphor(III)-Spezies mit der Alkinfunktion zurückzuführen sein, wodurch die Entstehung eines stabilen Phosphoramidits verhindert werden würde.^[147-148] Daher wurden **6** und **10** alternativ, analog zu etablierten Synthesen, zu den Phosphonaten **S** und **R** umgesetzt, welche erfolgreich in einer Ausbeute von je 69 % erhalten wurden.^[40]

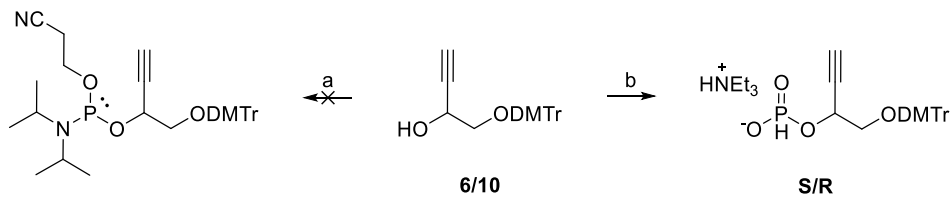


Abbildung 28: Syntheseroute der Phosphoramidite bzw. Phosphonate **S** und **R**. a) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, DCM, RT, 3 h; b) PCl_3 , *N*-Methylmorpholin, 1,2,4-Triazol, DCM, 0 °C, 10 min, 69 %.

3.2 Fluorophorsynthesen (*Click*-Bausteine)

Als Kupplungspartner für die Alkinlinker wurden azidmodifizierte Indolvinylfluorophore synthetisiert. Diese umgebungssensitiven Fluorophore weisen eine hohe Photostabilität auf und zeigen in Anwesenheit von Nukleinsäuren einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität.^[24-25] Durch interne Rotation können diese Fluorophore ihre Planarität verlieren und nach einer Anregung strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren (Abbildung 29).^[28] Durch Wechselwirkung mit dem Basenstapel einer Nukleinsäure kann diese interne Rotation gehindert werden, wodurch nur der Weg der Fluoreszenz für die Rückkehr in den Grundzustand bleibt.

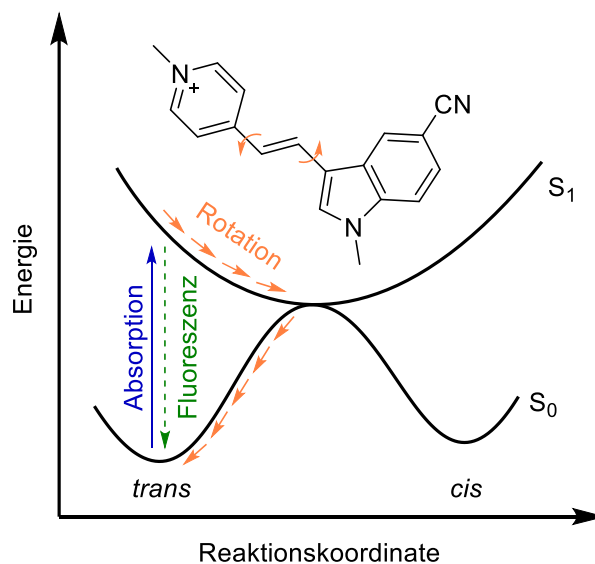


Abbildung 29: Fluorophor in einem Energiediagramm, welcher nach Absorption (blau) eines Photons in den ersten angeregten Zustand (S_1) gelangt. Anschließend kann es zur Fluoreszenz (grün) kommen oder der Fluorophor kehrt strahlungslos mittels interner Rotation (orange) in den Grundzustand (S_0) zurück.^[28]

In Abbildung 30 ist die Syntheseroute des Indolvinylfluorophors **IV1** gezeigt. Die Synthese begann mit dem kommerziell erhältlichen 4-Methylpyridin **11**, welches mit 2-Iodethanol gekuppelt wurde.^[149] Dabei wurde das positiv geladene Pyridiniumion **12** in einer Ausbeute von 79 % erhalten. Ebenfalls kommerziell erhältlich ist das Indolderivat **13**, welches am Stickstoff methyliert wurde, sodass das methylierte Indolderivat **14** in einer Ausbeute von 60 % erhalten wurde. Die beiden Bausteine **12** und **14** wurden anschließend unter basischen Bedingungen miteinander gekuppelt, woraufhin der Indolvinylfluorophor **15** in einer Ausbeute von 91 % synthetisiert wurde. In einer APPEL-Reaktion wurde die Hydroxyfunktion durch eine Bromidfunktion substituiert, um **16** in einer Ausbeute von 62 % zu erhalten. Im letzten Schritt wurde der Azid-Indolvinylfluorophor **IV1** in einer Ausbeute von 40 % erhalten. Damit ergibt sich eine Gesamtausbeute für diesen Fluorophor von 14 % über vier Stufen bezogen auf **13**.^[150]

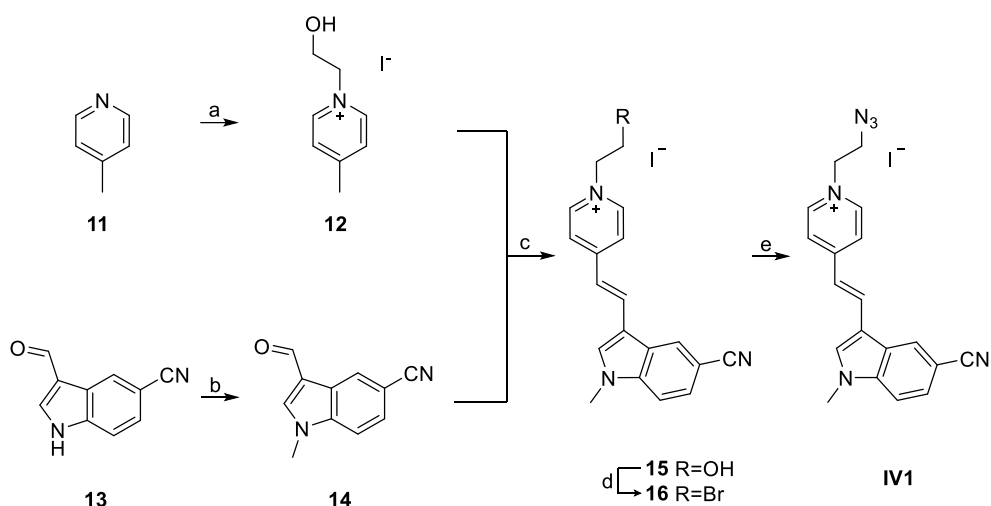


Abbildung 30: Synthese des Indolvinylfluorophors **IV1**. a) 2-Iodethanol, Toluol, RT -> Rückfluss, 4.5 h, 79 %; b) K_2CO_3 , Dimethylcarbonat, DMF, 130 °C, ü.N, 60 %; c) Piperidin, EtOH, Rückfluss, ü.N., 91 %; d) PPh_3 , CBr_4 , DMF, RT, ü.N., 62 %; e) NaN_3 , NaI, DMF, RT, ü.N., 40 %.

In Abbildung 31 sind der Indolvinylfluorophor **IV2**, welcher einen Propyllinker zum Azid besitzt und der Indolvinylfluorophor **IV3**, welcher einen Azidlinker am Indolstickstoff besitzt, dargestellt. Diese wurden analog zu der Syntheseroute von **IV1** hergestellt. Für **IV2** wurde dabei 3-Iodethanol statt 2-Iodethanol verwendet und es wurde in einer Gesamtausbeute von 34 % erhalten.^[150] Bei **IV3** wurde das Indolderivat **13** mit 2-Iodethanol gekoppelt und dafür das 4-Methylpyridin **11** methyliert. **IV3** konnte dabei in einer Gesamtausbeute von 6 % erhalten werden.

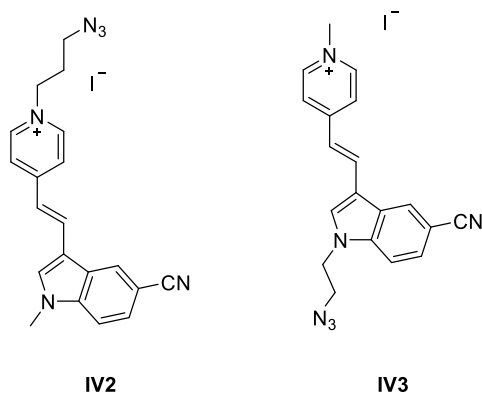


Abbildung 31: Indolvinylfluorophore **IV2** und **IV3**.

In Abbildung 32 ist die Syntheseroute des Indolvinylfluorophors **IV4** gezeigt. Dieses besitzt im Gegensatz zu **IV1-3** keinen Azidlinker, stattdessen ist die Azidfunktion direkt an der 5-Position der Indoleinheit angebracht. Bei der Synthese wurde von dem kommerziell erhältlichen Indolderivat **17** ausgegangen, welches zunächst mit einer Azidfunktion modifiziert wurde. Dabei wurde **18** erhalten, welches ohne Aufreinigung direkt mit 1,4-Dimethyl-pyridiniumiodid gekuppelt wurde. Das Indolvinylfluorophor **IV4** wurde in einer Ausbeute von 66 % über zwei Stufen erhalten.^[150]

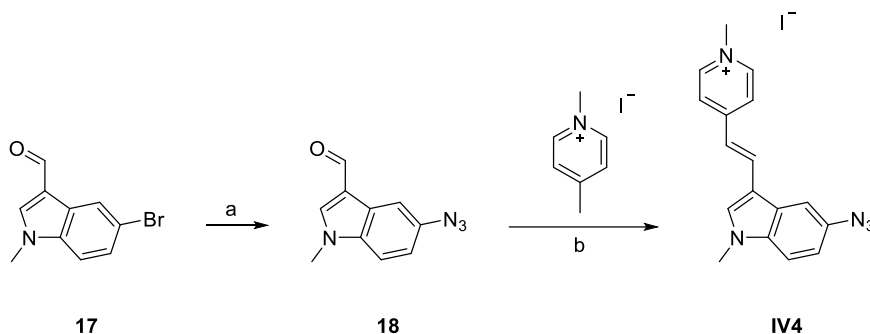


Abbildung 32: Synthese des Indolvinylfluorophors **IV4**. a) NaN_3 , Natriumascorbat, Kupfer(II)sulfatpentahydrat, L-Prolin, K_2CO_3 , DMF/ H_2O (1:1), 85 °C, ü.N.; b) Piperidin, EtOH, Rückfluss, 4 h, 66 % über zwei Stufen.

Die in Abbildung 33 dargestellten Indolvinylfarbstoffe **IV5**, **IV6** und **IV7** wurden von LARA HIRSCH aus der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT synthetisiert und bereitgestellt. Die Synthese erfolgte dabei analog zu der gezeigten Syntheseroute von **IV4**. Bei **IV5** ist die Indolvinyleinheit im Unterschied zu **IV4** nicht über die 4-Position, sondern über die 2-Position der Pyridineinheit verknüpft. **IV6** und **IV7** sind statt mit einer Pyridin- mit einer Chinolineinheit verknüpft. Dabei ist **IV6** über die 2- und **IV7** über die 4-Position des Chinolins verknüpft. Bei den Synthesen der

Indolvinylfluorophore **IV1**, **IV2** und **IV4** wurde nach leicht modifizierten Vorschriften von DR. CHRISTIAN SCHWECHHEIMER aus der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT vorgegangen.^[150]

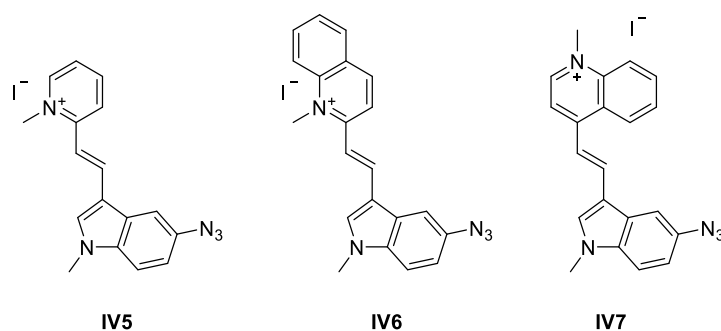


Abbildung 33: Indolvinylfluorophore **IV5**, **IV6** und **IV7**.

Aufgrund der häufigen Verwendung von Thiazolorange in hybridisierungssensitiven Sonden, wurden auch von diesem Fluorophor verschiedene Azidderivate hergestellt.^[21, 27-30] In Abbildung 34 ist die Syntheseroute von **TO1** dargestellt, welches eine über einen Ethyllinker am Chinolinstickstoff des Thiazolorange verknüpfte Azidfunktion besitzt. Die Synthese erfolgte dabei ähnlich einer bereits bekannten Route.^[151-153] Es wurde mit dem kommerziell erhältlichen 4-Methylchinolin **19** begonnen, welches mit 2-Iodethanol verknüpft wurde.^[154] Dabei wurde das Chinoliniumion **20** in einer Ausbeute von 74 % erhalten. Das ebenfalls kommerziell erhältliche Benzothiazolderivat **21** wurde am Stickstoff methyliert, wodurch **22** in einer Ausbeute von 76 % erhalten wurde.^[155] Das Chinolin- **20** und das Benzothiazolderivat **22** wurden anschließend unter basischen Bedingungen gekuppelt und der Thiazolorangefluorophor **23** in einer Ausbeute von 31 % erhalten.^[152] Anschließend wurde dieser zunächst in einer APPEL-Reaktion mit einer Ausbeute von 41 % zum Bromid **24** und danach zum Azid **TO1** in einer Ausbeute von 71 % umgesetzt. Damit wurde eine Gesamtausbeute von 7 % über vier Stufen bezogen auf das 4-Methylchinolin **19** erreicht.

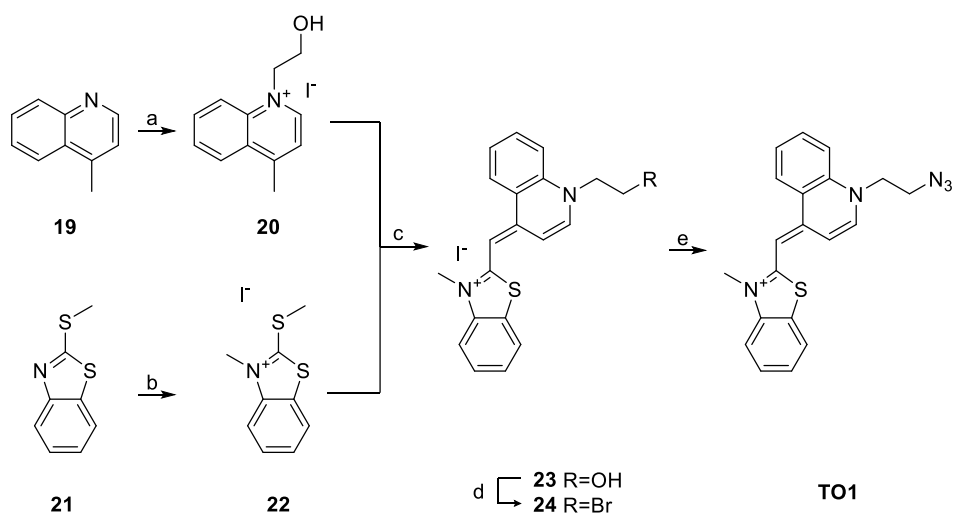


Abbildung 34: Syntheseroute des Thiazolorangefluorophors **TO1**. a) 2-Iodethanol, Dioxan, Rückfluss, 24 h, 74 %; b) MeI, DMF, 60 °C, 24 h, 76 %; c) Et₃N, MeOH/DCM (1:1), RT, ü.N., 31 %; d) CBr₄, PPh₃, DMF, RT, ü.N., 41 %; e) NaN₃, NaI, DMF, 85 °C, ü.N., 71 %.

In Abbildung 35 ist die Syntheseroute für **TO2** dargestellt, welches einen Propyl- statt eines Ethyllinkers an der Azidfunktion besitzt. Die Synthese erfolgte bis **27** nach literaturbekannter Vorschrift^[156], bei der zunächst das 4-Methylchinolin mit einem Iodlinker gekuppelt wurde, um das Chinoliniumion **26** in einer Ausbeute von 90 % zu erhalten. Danach wurde Iod durch eine Azidfunktion substituiert, wodurch **27** in einer Ausbeute von 81 % erhalten wurde. Anschließend wurden die Bausteine **27** und **22** nach Standardprozedur unter basischen Bedingungen gekoppelt, um den Thiazolorangefluorophor **TO2** in einer Ausbeute von 39 % zu erhalten. Die Gesamtausbeute über drei Stufen betrug 28 %.

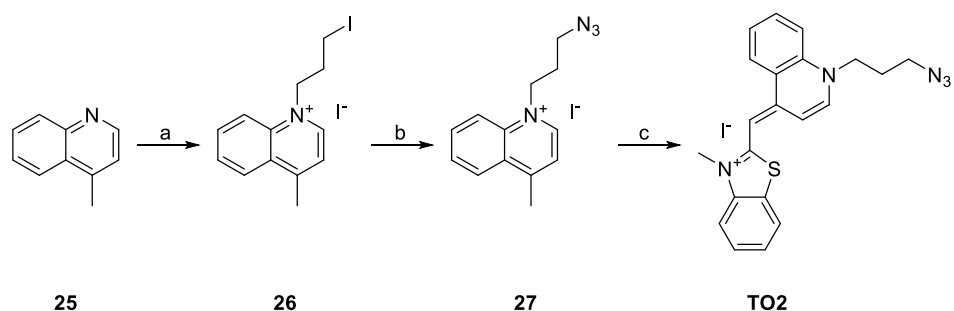


Abbildung 35: Syntheseroute des Thiazolorangefluorophors **TO2**. a) 1,3-Diiodpropan, MeCN, Rückfluss, ü.N., 90 %; b) NaN₃, MeCN, Rückfluss, ü.N., 81 %; c) **22**, Et₃N, MeOH/DCM (1:1), RT, ü.N., 39 %.

Da es in hybridisierungssensitiven Sonden oft einen Unterschied macht, ob Thiazolorange über die Benzothiazol- oder über die Chinolineinheit an die Sonde geknüpft ist, wurde

ebenfalls ein Thiazolorangederivat synthetisiert, welches die Azidfunktion an der Benzothiazoleinheit trägt.^[27, 157-159] In Abbildung 36 ist die Syntheseroute für **TO3** gezeigt, welches einen Propyllinker zur Azidfunktion am Benzothiazolstickstoff besitzt. Dabei wurde eine bereits in der Literatur bekannte Syntheseroute leicht modifiziert.^[160] Ausgegangen wurde von dem kommerziell erhältlichen 4-Chlorchinolin **28**, welches am Stickstoff methyliert wurde, um das Chinoliniumion **29** in einer Ausbeute von 95 % zu erhalten.^[155] Das ebenfalls kommerziell erhältliche 2-Methylbenzothiazol **30** wurde mit 1,3-Dibrompropan in einer Ausbeute von 8 % zu **31** umgesetzt.^[161] Die Bausteine **29** und **31** wurden anschließend unter basischen Bedingungen in einer Ausbeute von 75 % zum Thiazolorangfluorophor **32** gekuppelt.^[162] Die Bromidfunktion konnte anschließend in einer Ausbeute von 63 % mit einer Azidfunktion substituiert werden, um das Thiazolorangfluorophorazid **TO3** zu erhalten. Die Gesamtausbeute über drei Stufen bezogen auf 2-Methylbenzothiazol **30** betrug 4 %.

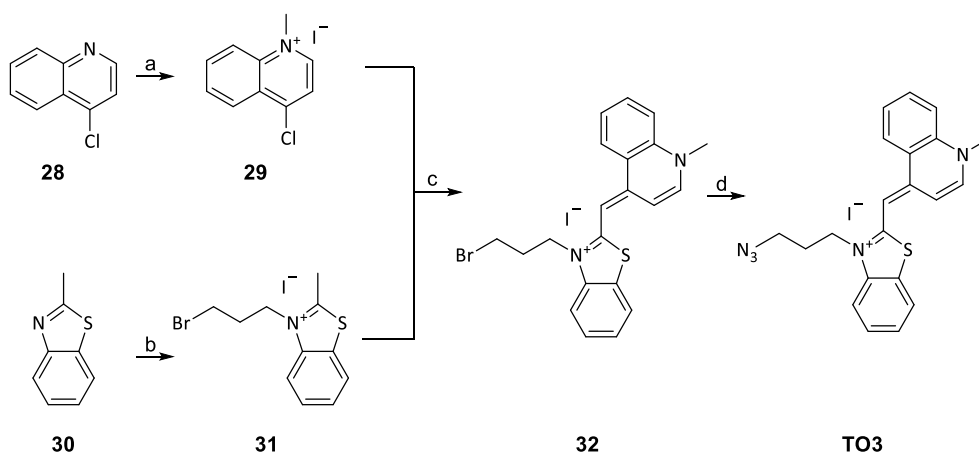


Abbildung 36: Syntheseroute des Thiazolorangefluorophors **TO3**. a) MeI, Dioxan, Rückfluss, 24 h, 95 %; b) 1,3-Dibrompropan, Toluol, Rückfluss, 72 h, 8 %; c) Et₃N, MeOH/DCM (1:1), RT, ü.N., 75 %; d) NaN₃, NaI, DMF, 85 °C, ü.N., 63 %.

Die Synthese eines Thiazolorangederivats, welches die Azidfunktion an einem Ethyllinker am Benzothiazolstickstoff trägt, blieb erfolglos.

3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich die kurzen Alkinlinker **S** und **R** für die nachfolgende postsynthetische Markierung von Nucleinsäuren mittels der CuAAC synthetisiert werden. Es war zwar nicht möglich, die stabilen Phosphoramidite der Alkinlinker herzustellen, dafür konnten jedoch erfolgreich die Phosphonate für die anschließende Verwendung in der Oligonucleotid-Festphasensynthese hergestellt werden. Dabei verlief die Synthese für beide Alkinlinker in wenigen Stufen bei einer hohen Gesamtausbeute von etwa 19-27 %.

Des Weiteren konnten die Fluorophore **IV1-7** als Kupplungspartner für die Alkinlinker in der CuAAC an verschiedenen Stellen mit einer Azidfunktion modifiziert werden. Die Synthese erfolgte dabei über analoge Routen bei wenigen einfachen Syntheseschritten mit guten Gesamtausbeuten von ca. 6-66 %. Ebenso konnten das in hybridisierungssensitiven Sonden oft verwendete Thiazolorange als Fluorophore **TO1-3** mit Azidfunktionen an verschiedenen Stellen hergestellt werden. Auch hierbei verlief die Synthese in wenigen Stufen und mit guten Gesamtausbeuten von etwa 4-28 %.

Genauso ist es möglich, in Zukunft noch weitere in hybridisierungssensitiven Sonden etablierte oder neu entwickelte umgebungssensitive Fluorophore mit einer Azidfunktion zu versehen, um diese als Kupplungspartner für die entwickelten Alkinlinker bereit zu stellen. Dabei muss sich nicht auf viskositätssensible Fluorophore beschränkt werden, sondern auch polaritätsabhängige oder andere umgebungssensitive Fluorophore könnten in der Lage sein, die Hybridisierung von Nucleinsäuren anzuzeigen.^[87, 105] Außerdem erweitert der Alkinlinker das Repertoire an Alkinfunktionen in Oligonucleotiden, um eine sehr enge Anbindung an das Oligonucleotidrückgrat.^[51, 137]

Um den sterischen Einfluss des Linkers weiter zu untersuchen, wäre es möglich, zusätzlich zu den synthetisierten Konfigurationsisomeren auch die jeweiligen Konstitutionsisomere, bei denen die Phosphonatfunktion und die DMTr-Schutzgruppe vertauscht vorliegen, herzustellen und in der Oligonucleotid-Festphasensynthese zu verwenden.

4 Spektroskopische Charakterisierung

4.1 Einfluss der gegenüberliegenden Nukleotide

Zunächst wurde untersucht, wie der Fluorophor **IV1** auf die im DNA-Duplex gegenüberliegenden kanonischen Nukleotide oder das Fehlen einer solchen reagiert. Dazu wurde der Alkinlinker **S** in die Nukleinsäure eingebracht und mit dem Fluorophor **IV1** über eine CuAAC gekuppelt (Abbildung 37). Anschließend wurde die Nukleinsäure **DNA-X** (**X = S-IV1**) mit einem Äquivalent des komplementären Gegenstrangs **DNA-Y-GS** hybridisiert, welcher je eine der vier kanonischen Nukleotide (**Y = Adenosin (A), Thymin (T), Cytidin (C), Guanosin (G)**) oder kein Nukleotid (**Y = AP-Stelle (apurinic-/apyrimidinic-site)**), an der dem Fluorophor im Duplex gegenüberliegenden Position besitzt.

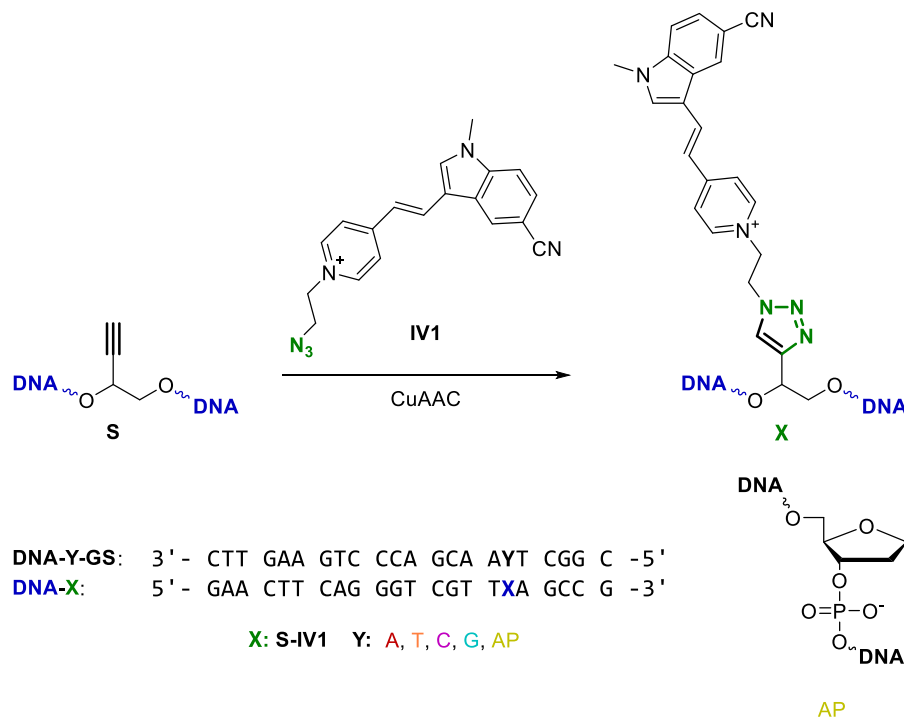


Abbildung 37: CuAAC zwischen dem in eine DNA integrierten Alkinlinker **S** mit dem Fluorophor **IV1** (oben). Die erhaltene Nukleinsäure **DNA-X** wurde mit den komplementären Gegensträngen **DNA-Y-GS** hybridisiert (unten).

Die Extinktionen der unhybridisierten (*ss; single stranded*) Nukleinsäure **DNA-X** und der verschiedenen DNA-Duplexe (*ds; double stranded*) wurden in Puffer-Salz-Lösungen gemessen und sind in Abbildung 38 dargestellt. Bei etwa 450 nm liegt das Extinktionsmaximum des

Fluorophors **IV1**. Hier besitzt der Fluorophor in der unhybridisierten Nukleinsäure und in den DNA-Duplexen mit Guanosen und Adenosin in komplementärer Position die höchste Extinktion. Mit Thymin und Cytidin oder mit fehlendem Nukleotid in komplementärer Position sinkt die Extinktion etwas ab. Eine hohe Extinktion im hybridisierten Zustand führt dabei zu einer hohen Helligkeit und ist daher für die Verwendung in hybridisierungssensitiven Sonden von Vorteil.

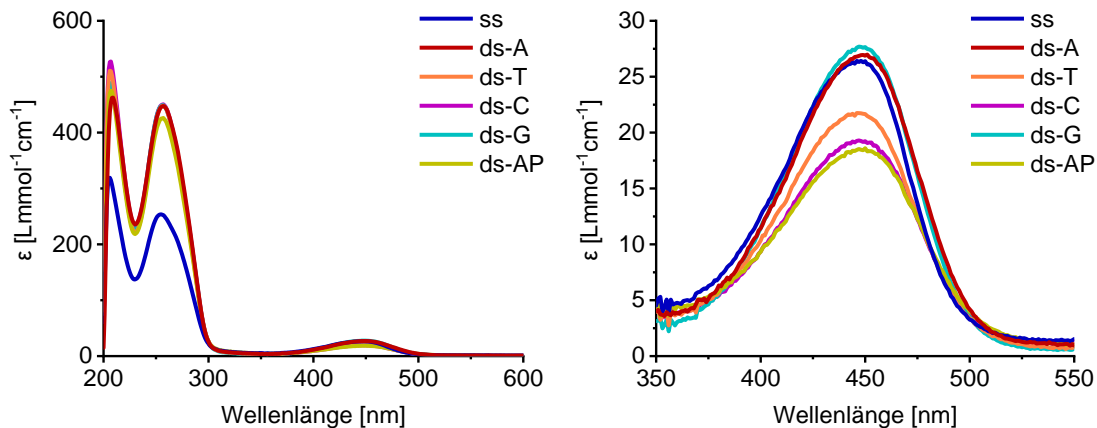


Abbildung 38: Extinktion der Nukleinsäure **DNA-X** im unhybridisierten (ss) und mit den komplementären Gegensträngen **DNA-Y-GS** hybridisierten (ds) Zustand. Links ist das komplette Spektrum gezeigt, rechts eine Vergrößerung der Fluorophorextinktion; 2.5 μ M **DNA**, 1 Äq **GS**, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

Die zugehörigen Fluoreszenzspektren sind in Abbildung 39 dargestellt, wobei der Fluorophor bei 435 nm angeregt wurde. Sowohl die unhybridisierte als auch die hybridisierten Nukleinsäuren zeigen nur ein Fluoreszenzsignal, wobei das Fluoreszenzmaximum der unhybridisierten Nukleinsäure bei etwa 515 nm und die Fluoreszenzmaxima der Duplexe bei etwa 525 nm liegen. Damit besitzt der Fluorophor eine STOKES-Verschiebung von ungefähr 65 nm im unhybridisierten Zustand und 75 nm in den verschiedenen Duplexen. Die Fluoreszenzintensitäten sind für alle Duplexe, außer für den Adenosinduplex, niedriger als die Fluoreszenzintensitäten der unhybridisierten Nukleinsäure. Der Adenosinduplex dagegen erreicht fast eine doppelt so hohe Fluoreszenzintensität im Maximum als die unhybridisierte Nukleinsäure.

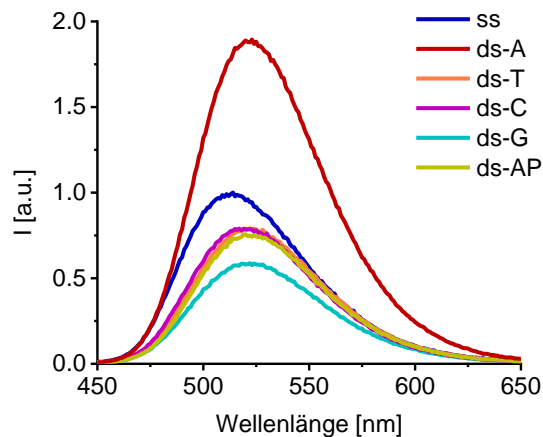


Abbildung 39: Fluoreszenz der Nukleinsäuren **DNA-X** im unhybridisierten (ss) und mit den komplementären Gegensträngen **DNA-Y-GS** hybridisierten (ds) Zustand; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm; normiert auf ss = 1.

Obwohl beide Purinduplexe eine ähnlich hohe Extinktion wie die unhybridisierte Nukleinsäure aufweisen, so zeigt der Guanosinduplex doch die geringste Fluoreszenzintensität, während der Adenosinduplex die höchste Fluoreszenzintensität zeigt. Dies ist wahrscheinlich auf die bekannte fluoreszenzlöschende Eigenschaft von Guanosin zurückzuführen, welche durch einen PET ausgelöst wird.^[163-165] Die beiden Pyrimidinkomplexe und der AP-Komplex zeigen deutlich niedrigere Extinktionen und Fluoreszenzintensitäten als die unhybridisierte Nukleinsäure. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Fluorophor durch die gegenüberliegenden kleineren Pyrimidine bzw. mit fehlendem Nukleotid viel Platz im Duplex erhält, wodurch eine interne Rotation und damit ein strahlungsloser Übergang in den Grundzustand wahrscheinlicher wird.

Der entwickelte Alkinlinker konnte dazu verwendet werden, einen Fluorophor in eine Nukleinsäure postsynthetisch einzubringen und auf seine photophysikalischen Eigenschaften bei der Hybridisierung zu untersuchen. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Fluorophor **IV1** mit einem gegenüberliegenden Adenosin einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung zeigt. Des Weiteren weist der Fluorophor eine hohe STOKES-Verschiebung auf, was für die Anwendung in Nukleinsäuresonden von großem Vorteil ist.

4.2 Einfluss der benachbarten Nukleotide

In der ursprünglichen Nukleinsäure **DNA-X** liegen Thymin in 5'- und Adenosin in 3'-Richtung zum Fluorophor vor. Um den Einfluss, der in 5'- und 3'-Richtung zum Fluorophor liegenden Nukleotide zu untersuchen, wurden die Nukleinsäuren **DNA-VXA** und **DNA-TXW** (**V, W** = A, T, C, G) synthetisiert. Adenosin wurde als „komplementäres“ Nukleotid des Fluorophors ausgewählt (Abbildung 40).

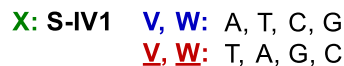


Abbildung 40: **DNA-VXA** und **DNA-TXW** und ihre komplementären Gegenstränge.

Für das in 5'-Richtung benachbarte Nukleotid ergibt sich im unhybridisierten Zustand eine Extinktion des Fluorophors in der Reihenfolge $A > G > C > T$, während sich im hybridisierten Zustand kaum noch ein Unterschied in der Extinktion des Fluorophors für die unterschiedlichen Nukleotide ergibt (Abbildung 41). Für das benachbarte Nukleotid in 3'-Richtung besitzt der Fluorophor mit Cytidin im unhybridisierten Zustand die höchste Extinktion, wodurch sich die Reihenfolge $C > T > G > A$ ergibt. Im hybridisierten Zustand besitzt der Fluorophor für jedes in 3'-Richtung benachbarte Thymin und Cytidin eine ähnliche Extinktion. Mit einem in 3'-Richtung benachbarten Adenosin und Guanosen besitzt der Fluorophor eine etwas niedrigere Extinktion.

Die Fluoreszenzintensitäten des Fluorophors zeigen in den unhybridisierten Nukleinsäuren für die benachbarten Nukleotide in 5'- und 3'-Richtung nur geringe Unterschiede. Die Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten Nukleinsäuren liegen in den meisten Fällen deutlich über denen der unhybridisierten. Mit benachbartem Cytidin in 3'-Richtung und Guanosen in 5'-Richtung steigt die Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung nur sehr wenig an oder fällt sogar etwas ab. Während der Fluorophor im hybridisierten Zustand für die in

5'-Richtung benachbarten Nucleotide eine ähnliche Abhängigkeit wie im unhybridisierten Zustand zeigt, so ergibt sich für das in 3'-Richtung benachbarte Nucleotid eine völlig andere Abhängigkeit. Hier zeigt der Fluorophor mit einem benachbarten Thymidin mit sehr großem Abstand die höchste Fluoreszenzintensität, wodurch sich die Reihenfolge $T \gg A > G > C$ ergibt.

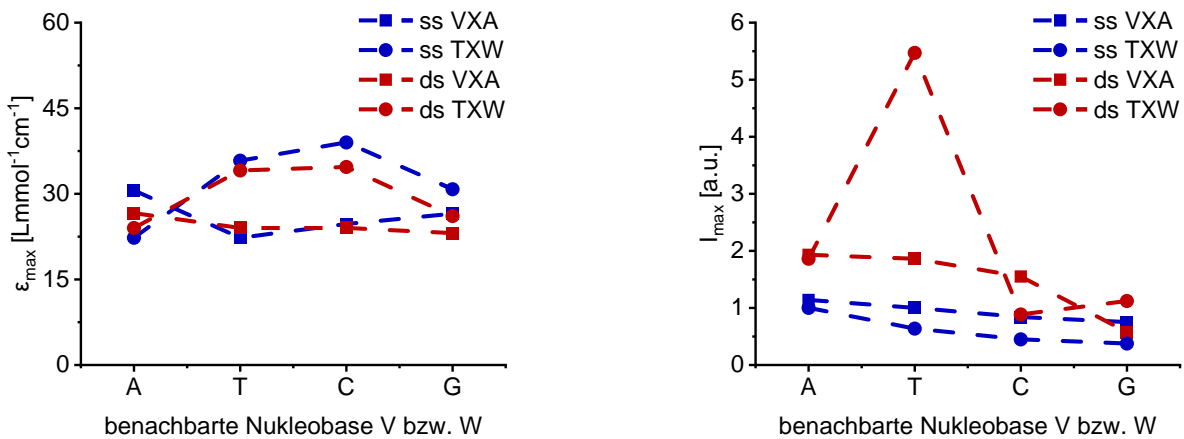


Abbildung 41: Extinktionen (ϵ_{\max}) bzw. Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum des Fluorophors in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-VXA** und **DNA-TXW** in Abhängigkeit der jeweiligen benachbarten Nucleotide; 2.5 μM DNA, 1 \AA GS, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm; I_{\max} normiert auf **DNA-TXA-ss** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

Die geringen Fluoreszenzintensitäten in den Nucleinsäuren, welche ein benachbartes Guanosen aufweisen kann auch hier vermutlich auf die fluoreszenzlöschende Eigenschaft des Guanosen zurückgeführt werden. Wie gut Guanosen in der Lage ist, die Fluoreszenz des Fluorophors zu löschen, hängt aber ebenfalls davon ab, in welchem Nachbarschaftsverhältnis es sich zum Fluorophor befindet. Generell zeigt der Fluorophor in den unhybridisierten Nucleinsäuren mit benachbartem Adenosin oder Thymidin eine etwas höhere Fluoreszenzintensität als mit einem benachbarten Cytidin oder Guanosen. Auch in hybridisiertem Zustand führt ein benachbartes AT-Paar zu einer höheren Fluoreszenzintensität als ein benachbartes GC-Paar. Die höchste Fluoreszenzintensität zeigt der Fluorophor in der hybridisierten Nucleinsäure mit einem benachbarten Thymidin sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung, wobei auch die Extinktion in dieser Nucleinsäure einen hohen Wert zeigt.

Als nächstes wurden weitere Nucleinsäuren **DNA-ZXZ** (**Z** = A, T, C, G) untersucht, welche sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung neben dem Fluorophor das gleiche Nucleotid aufweisen (Abbildung 42).



X: S-IV1 **Z:** A, T, C, G
Z: T, A, G, C

Abbildung 42: Nucleinsäuren **DNA-ZXZ** und deren komplementärer Gegenstrang.

Die Extinktion des Fluorophors erreicht für zwei benachbarte Cytidine den höchsten Wert und es ergibt sich sowohl in den unhybridisierten als auch in den hybridisierten Nucleinsäuren die Reihenfolge C > G > T > A für die Extinktion des Fluorophors in Abhängigkeit der benachbarten Nucleotide (Abbildung 43). Die Fluoreszenzintensität zeigt für die unhybridisierten und hybridisierten Nucleinsäuren eine ähnliche Abhängigkeit wie schon zuvor beobachtet.

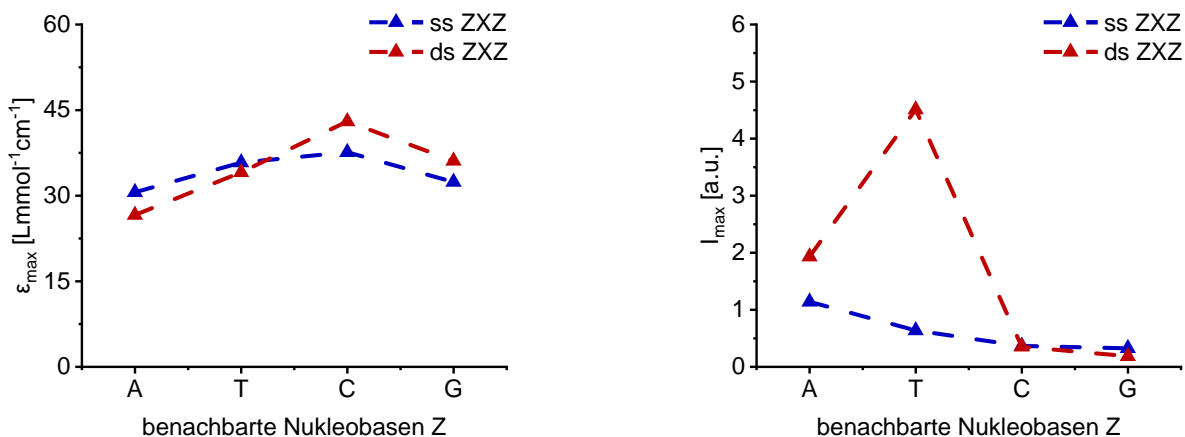


Abbildung 43: Extinktionen (ϵ_{\max}) bzw. Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum des Fluorophors in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-ZXZ** in Abhängigkeit der jeweiligen benachbarten Nucleotide; 2.5 μ M **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm; I_{\max} normiert auf **DNA-AXA-ss** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

Dieser Vergleich zeigt, dass benachbarte Cytidine die Extinktion des Fluorophors im unhybridisierten und hybridisierten Zustand erhöhen können, während benachbarte Adenosine die Fluoreszenzintensität etwas erhöhen und benachbarte Guanosine die Fluoreszenz löschen. Zwei benachbarte Thymidine weisen dabei den interessantesten Einfluss auf den Fluorophor auf. Im unhybridisierten Zustand zeigt der Fluorophor damit eine etwa

halb so hohe Fluoreszenzintensität als mit zwei benachbarten Adenosinen. Im hybridisierten Zustand steigt die Fluoreszenzintensität in dieser Nukleinsäure jedoch auf mehr als das Doppelte der hybridisierten **DNA-AXA** an.

Nachdem der Einfluss der einzelnen Nukleotide auf den Fluorophor erörtert wurde, soll nun noch ein genaueres Augenmerk daraufgelegt werden, welchen Einfluss die Position der jeweiligen Nukleotide auf die photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors hat. Dazu wurden die Nukleinsäuren **DNA-MXA** und **DNA-AXM** (**M** = T, G) miteinander verglichen, bei denen Thymin und Guanin je einmal in 5'- und einmal in 3'-Richtung benachbart zum Fluorophor vorliegen (Abbildung 44).

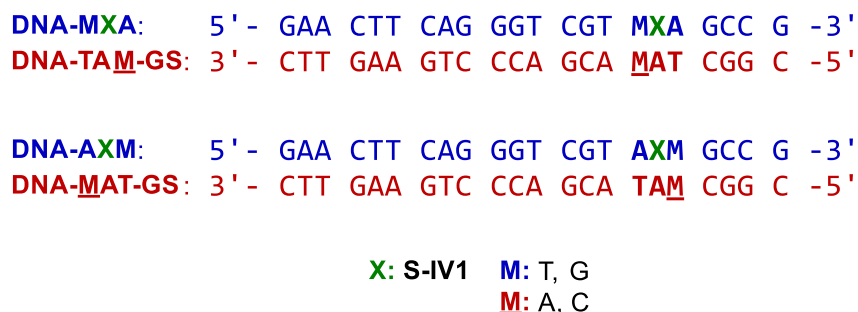


Abbildung 44: **DNA-VXA** und **DNA-AXV** und ihre komplementären Gegenstränge.

Die Extinktion des Fluorophors ist in der unhybridisierten Nukleinsäure höher, wenn Thymin in 3'-Richtung statt in 5'-Richtung zum Fluorophor benachbart vorliegt (Abbildung 45). Die Fluoreszenzintensität ist mit einem in 5'-Richtung benachbarten Thymin sowohl im unhybridisierten als auch im hybridisierten Zustand höher. Mit einem benachbarten Guanin in 5'-Richtung ist die Fluoreszenzintensität des Fluorophors im unhybridisierten Zustand höher als im hybridisierten Zustand. Liegt das Guanin in 3'-Richtung, so ist die Fluoreszenzintensität im unhybridisierten Zustand etwa siebenmal geringer als im hybridisierten Zustand.

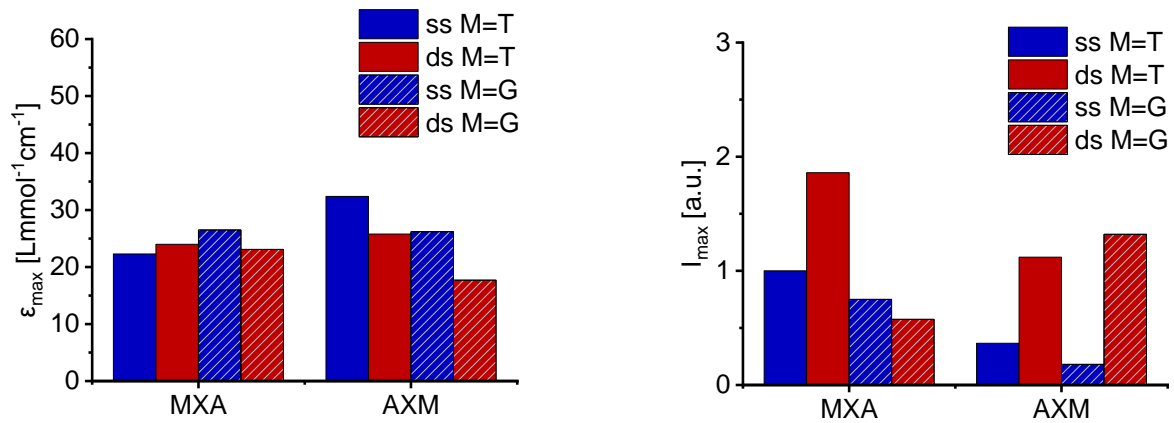


Abbildung 45: Extinktionen (ϵ_{\max}) bzw. Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum des Fluorophors in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-MXA** und **DNA-AXM** mit **M = T, G**; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl , pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm; I_{\max} normiert auf **DNA-TXA-ss = 1**.

Es kann folglich nicht nur einen großen Unterschied machen, welche Nucleotide in direkter Nachbarschaft zum Fluorophor liegen, sondern auch ob diese in 5'- oder in 3'-Richtung benachbart sind. Guanosen löscht die Fluoreszenz des Fluorophors als 5'-Nachbar im hybridisierten Zustand besser als im unhybridisierten Zustand. Als 3'-Nachbar wird die Fluoreszenz im unhybridisierten Zustand sehr stark gelöscht, während durch die Hybridisierung sich eine Anordnung ergibt, in der die Löschung weniger effektiv verlaufen kann.

Da die Fluoreszenzintensität stark von der Konzentration der Probe und den Parametern des jeweiligen Messgeräts abhängt, sind diese Werte mit einem höheren Fehler belastet und können nur in Relation mit anderen Proben verglichen werden, welche unter den gleichen Messparametern und zeitgleich bestimmt wurden. Um absolute und besser vergleichbare Messgrößen zu erhalten, wurden zusätzlich die Fluoreszenzquantenausbeuten der hergestellten Nucleinsäuren gemessen. Dabei zeigt der Fluorophor in der Nucleinsäure **DNA-TXT** im hybridisierten Zustand mit etwas mehr als 30 % die höchste Fluoreszenzquantenausbeute (Abbildung 46). Als wichtige Kenngröße für hybridisierungssensitive Sonden wurde außerdem der Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute durch die Hybridisierung mit einer komplementären Nucleinsäure berechnet. Dieser *Light-Up* ergibt sich als Quotient aus der Fluoreszenzquantenausbeute des hybridisierten Zustands und der Fluoreszenzquantenausbeute des unhybridisierten Zustands. Wie auch bei der Fluoreszenzintensität zeigt

die Nukleinsäure **DNA-TXT** den größten Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung und besitzt damit einen *Light-Up* von etwa 9. Den zweithöchsten *Light-Up* von etwa 8 zeigt die Nukleinsäure **DNA-AXG**. Nur bei den Nukleinsäuren **DNA-CXC** und **DNA-GXG** nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung leicht ab.

Eine weitere wichtige Kenngröße von hybridisierungssensitiven Sonden ist die Helligkeit der Sonde, welche sich aus dem Produkt der Extinktion und der Quantenausbeute in hybridisiertem Zustand ergibt. Hier zeigt erwartungsgemäß die Nukleinsäure **DNA-TXT** ebenfalls mit Abstand den höchsten Wert. Die Nukleinsäuren **DNA-CXC** und **DNA-GXG** zeigen auch hier die niedrigsten Werte. Obwohl die Nukleinsäure **DNA-AXG** einen großen Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung zeigt, weist sie doch nur eine geringe Helligkeit im hybridisierten Zustand auf und eignet sich daher weniger gut für die Anwendung in hybridisierungssensitiven Sonden.

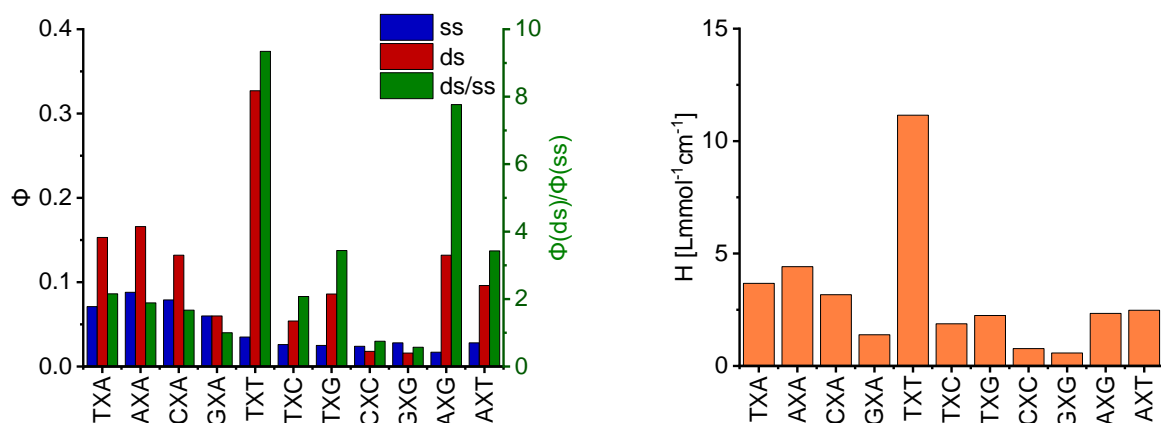


Abbildung 46: Links: Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ) von **DNA-VXW** (V, W= A, T, C, G) im unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Zustand und der daraus resultierende Quotient (ds/ss); Rechts: Helligkeit (H) des Fluorophors in den hybridisierten Nukleinsäuren ($\phi_{ds} \cdot \epsilon_{ds}$); 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{exc.} = 450 \text{ nm}$.

Mit Hilfe des entwickelten Alkinlinkers konnte der Fluorophor **IV1** in mehrere verschiedene Nukleinsäuren eingebracht werden, um dessen photophysikalischen Eigenschaften in Abhängigkeit verschiedener benachbarter Nukleotide zu untersuchen. Dabei konnte festgestellt werden, dass benachbarte Nukleotide, wie erwartet, einen großen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten des Fluorophors haben und dass nicht nur die die Art der benachbarten Nukleotide einen entscheidenden Einfluss ausübt, sondern auch, ob sie in 5'- oder in 3'-Richtung zum Fluorophor benachbart sind.

Um die Eignung in hybridisierungssensitiven Sonden zu bestimmen, wurden ebenfalls die Fluoreszenzquantenausbeute und die Helligkeit des Fluorophors in den verschiedenen Nucleinsäuren miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass zwei benachbarte Thymidine sowohl zu dem höchsten Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung als auch zu der mit Abstand höchsten Helligkeit der hybridisierten Nucleinsäure von allen untersuchten Nucleinsäuren führte.

4.3 Einfluss der Fluorophoranbindung

Enantiomere unterscheiden sich normalerweise nicht in ihrer Extinktion und Emission, jedoch können diese optischen Eigenschaften durch die Wechselwirkung mit der chiralen Nucleinsäure unterschiedlich stark beeinflusst werden. Deswegen wurde zusätzlich zu dem **S**-konfigurierten Alkinlinker auch ein **R**-konfigurierter Alkinlinker hergestellt und als **X** in die Nucleinsäure **DNA-TXT** eingebracht. Anschließend wurden die Alkinlinker mit verschiedenen azidmodifizierten Fluorophoren gekuppelt. (Abbildung 47).

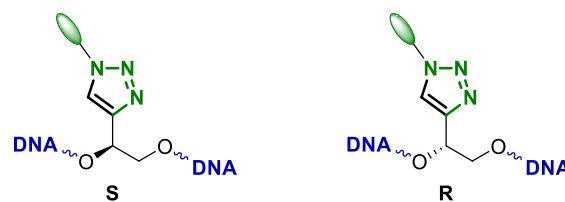


Abbildung 47: S- und R-konfigurierte Linker, welche in der Nucleinsäure **DNA-TXT** an einen Fluorophor gekuppelt wurden.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Fluorophoranbindung untersucht. Dazu wurde der Fluorophor **IV2** hergestellt, welcher einen Propyllinker am Azid statt einem Ethyllinker wie in **IV1** besitzt. Außerdem wurde der Fluorophor **IV3** hergestellt, welcher mit einem Ethyllinker über den Indolstickstoff verknüpft wird, statt wie bei **IV1** und **IV2**, über den Pyridinstickstoff (Abbildung 48). Die drei Fluorophore wurden sowohl an den **S**- als auch an den **R**-konfigurierten Alkinlinker in der Nucleinsäure **DNA-TXT** (X: **S-IV1**, **R-IV1**, **S-IV2**, **R-IV2**, **S-IV3**,

R-IV3) gekuppelt und auf die photophysikalischen Eigenschaften vor und nach der Hybridisierung untersucht.

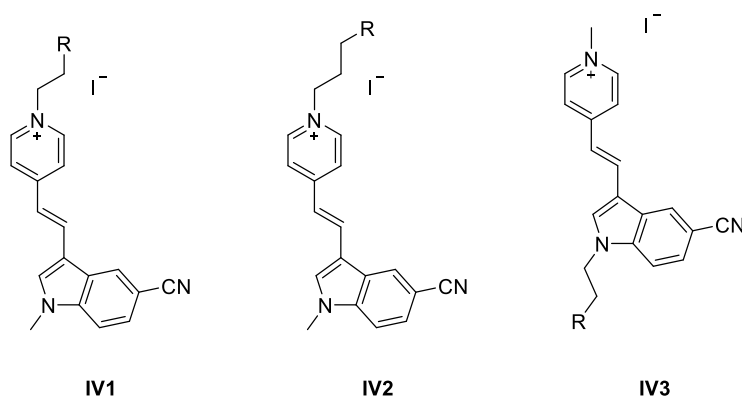


Abbildung 48: An Position R mit den Alkinlinkern verknüpften Indolvinylfluorophore **IV1-3**.

Das Extinktionsmaximum der Fluorophore **IV1+2** liegt bei etwa 450 nm, während das Extinktionsmaximum des Fluorophors **IV3** hypsochrom nach 420 nm verschoben ist. Durch die Hybridisierung sinkt die Extinktion der drei Fluorophore unterschiedlich stark ab, eine konstant hohe Extinktion wie bei **IV1** ist allerdings für eine möglichst hohe Helligkeit in Sonden von Vorteil (Abbildung 49). Die Konfiguration der Anknüpfung macht nur bei **IV2** einen wesentlichen Unterschied, wobei im hybridisierten Zustand die **S**-konfigurierte Anknüpfung die höhere Extinktion besitzt. Insgesamt ist die Extinktion des Fluorophors **IV1** am höchsten, gefolgt von **IV2** und **IV3**.

Das Maximum in der Fluoreszenzintensität liegt bei den Fluorophoren **IV1** und **IV2** bei etwa 520 nm, während es bei dem Fluorophor **IV3** auf etwa 505 nm hypsochrom verschoben ist. Bei allen drei Fluorophoren kommt es durch die Hybridisierung zu einem Anstieg in der Fluoreszenzintensität, wobei dieser für die Fluorophore mit **S**-konfigurierte Anknüpfung immer höher ausfällt als für dieselben Fluorophore mit **R**-konfigurierte Anknüpfung. Am höchsten ist die Fluoreszenzintensität für den Fluorophor **IV1**, gefolgt von **IV2** und **IV3**.

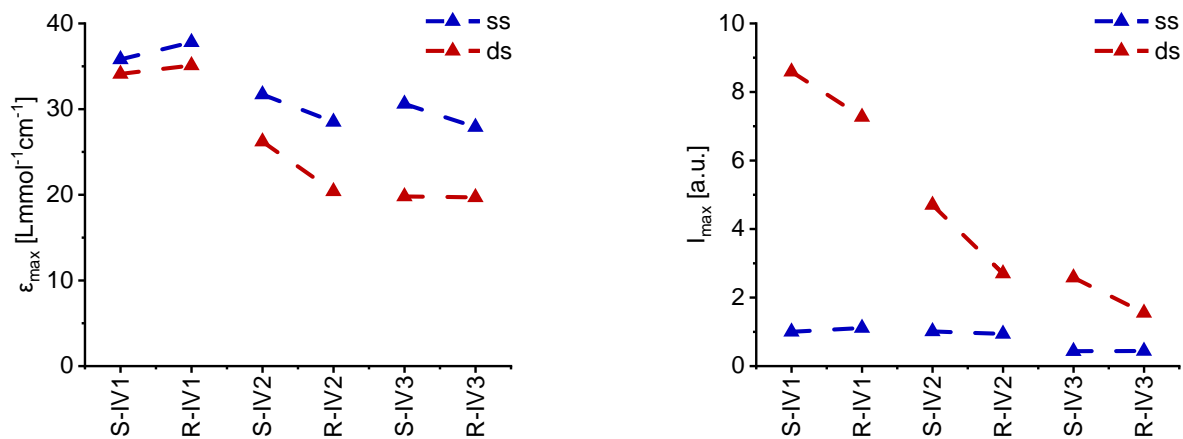


Abbildung 49: Extinktionen (ϵ_{\max}) bzw. Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum der Fluorophore **IV1-3** in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-TXT** in Abhängigkeit der Konfiguration des verknüpften Alkinlinkers **S** bzw. **R**; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl , pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 450$ nm für **IV1+2** und $\lambda_{\text{exc.}} = 420$ nm für **IV3**; I_{\max} normiert auf **S-IV1-ss** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

Eine Anknüpfung über den Indolstickstoff statt über den Pyridinstickstoff führt zu einer hypsochromen Verschiebung sowohl in der Extinktion als auch in der Emission. Diese Verschiebung könnten auf eine unterschiedlich polare Wechselwirkung mit der Nucleinsäure zurückzuführen sein, da der Fluorophor nun gedreht in der Nucleinsäure vorliegt. Dadurch wird die STOKES-Verschiebung etwas vergrößert und Extinktion und Fluoreszenzintensität des Fluorophors sinken ab. Vor allem im hybridisierten Zustand fällt die Fluoreszenzintensität dabei deutlich niedriger aus. Die Anknüpfung an den Pyridinstickstoff über einen Propyl- statt einem Ethyllinker führt ebenfalls zu einer verringerten Extinktion und Fluoreszenzintensität, sowohl im unhybridisierten als auch im hybridisierten Zustand. Jedoch liegen Extinktion und Fluoreszenzintensität dabei immer noch über den Werten des indolverknüpften Fluorophors. Insgesamt führt eine kurze Anbindung über den Pyridinstickstoff des Fluorophors zu der höchsten Extinktion und der höchsten Fluoreszenzintensität im hybridisierten Zustand. Im unhybridisierten Zustand liefern die drei Fluorophore alle eine ähnliche Fluoreszenzintensität, was darauf hindeutet, dass die Fluorophore in der Nucleinsäure **DNA-TXT** im unhybridisierten Zustand nur wenig mit der Nucleinsäure in Wechselwirkung treten. Erst bei der Ausbildung der Doppelhelix bildet sich eine geordnete Struktur, mit der die Fluorophore wechselwirken. Dabei wird der über den Pyridinstickstoff ethylverknüpfte Fluorophor **IV1** am stärksten von dem Nucleinsäureduplex beeinflusst.

Der Vergleich der **S**- und **R**-konfigurierten Anknüpfung zeigt im unhybridisierten Zustand ebenfalls nur wenig Einfluss, während im hybridisierten Zustand die **S**-konfigurierte Anknüpfung zu einer deutlich erhöhten Fluoreszenzintensität im Vergleich zur **R**-konfigurierten Anknüpfung führt. Auch das deutet darauf hin, dass die Nukleinsäure im unhybridisierten Zustand nur eine geringe Ordnung besitzt und nur wenig chiralen Einfluss auf die Fluorophore ausübt. Durch die Bildung der rechtsgängigen Doppelhelix führen die unterschiedlich konfigurierten Anknüpfungen zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem geordneten Duplex. Die Fluorophore werden durch eine **S**-konfigurierte Anknüpfung zu einer stärkeren Wechselwirkung mit dem Nukleinsäureduplex gezwungen als durch eine **R**-konfigurierte Anknüpfung.

In Abbildung 50 sind vier weitere Fluorophore **IV4-7** dargestellt, welche ebenfalls sowohl an den **S**- als auch an den **R**-konfigurierten Alkinlinker in der Nukleinsäure **DNA-TXT** (**X**: **S-IV4**, **R-IV4**, **S-IV5**, **R-IV5**, **S-IV6**, **R-IV6**, **S-IV7**, **R-IV7**) geknüpft wurden.

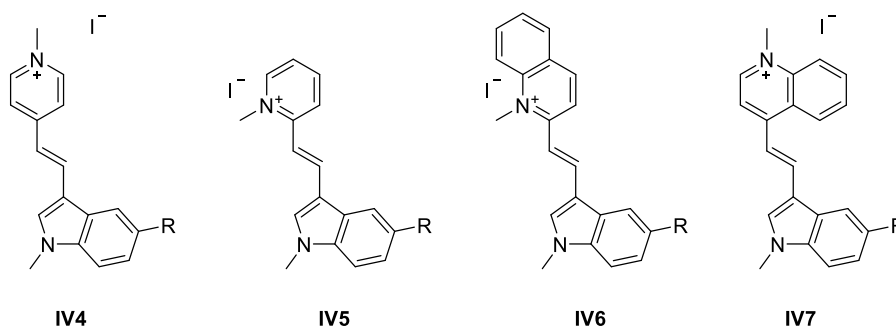


Abbildung 50: An Position R mit den Alkinlinkern verknüpfte Indolvinylfluorophore **IV4-7**.

Das Extinktionsmaximum von **IV4** liegt etwa bei 440 nm, das von **IV5** bei etwa 420 nm, das von **IV6** bei etwa 480 nm und das von **IV7** bei etwa 500 nm. Die Extinktion in der unhybridisierten Nukleinsäure liegt auch bei diesen Fluorophoren meist über der Extinktion der hybridisierten Nukleinsäure, nur der Fluorophor **IV5** weist im unhybridisierten und hybridisierten Zustand eine nahezu identische Extinktion auf (Abbildung 51). Die Konfiguration der Anknüpfung führt nur im unhybridisierten Zustand zu einer meist etwas erhöhten Extinktion im Fall der **R**-konfigurierten Anknüpfung. Die höchste Extinktion zeigt der Fluorophor **IV6** gefolgt von **IV7** und **IV8**. Die geringste Extinktion weist der Fluorophor **IV5** auf.

Der Fluorophor **IV4** besitzt bei etwa 515 nm sein Maximum in der Fluoreszenzintensität, der Fluorophor **IV5** bei etwa 500 nm, **IV6** bei etwa 545 nm und **IV7** bei etwa 580 nm. Die Fluoreszenzintensität ist auch hier bei allen Fluorophoren im hybridisierten Zustand höher als im unhybridisierten Zustand, wobei der Anstieg bei Fluorophor **IV5** nur sehr gering ausfällt.

Die Fluoreszenzintensität fällt für **IV5** deutlich geringer aus als für die anderen Fluorophore. Die höchste Fluoreszenzintensität im hybridisierten Zustand besitzt der Fluorophor **IV6** gefolgt von **IV7**. Die Konfiguration der Anknüpfung hat vor allem auf den Fluorophor **IV6** im hybridisierten Zustand einen großen Einfluss, welcher mit **S**-konfigurierte Anknüpfung eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität zeigt.

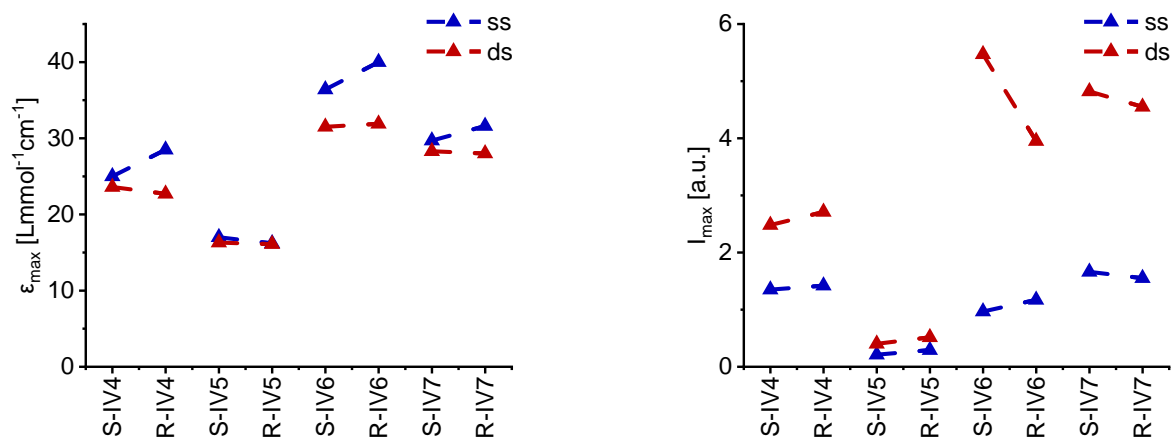


Abbildung 51: Extinktionen (ϵ_{\max}) bzw. Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum der Fluorophore **IV4-7** in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-TXT** in Abhängigkeit der Konfiguration des verknüpften Linkers **S** bzw. **R**; 2.5 μ M **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaPi -Puffer, 250 mM NaCl , pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc.}} = 440$ nm für **IV4**, $\lambda_{\text{exc.}} = 420$ nm für **IV5**, $\lambda_{\text{exc.}} = 480$ nm für **IV6**, $\lambda_{\text{exc.}} = 500$ nm für **IV7**; I_{\max} normiert auf **S-IV1-ss** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

Die Fluorophore, welche eine Chinolineinheit anstelle einer Pyridineinheit besitzen, haben ihre Extinktion und Fluoreszenzintensität aufgrund des größeren konjugierten Systems bathochrom verschoben. Außerdem zeigen sie generell eine höhere Extinktion und Fluoreszenzintensität sowie einen höheren Anstieg in der Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung. Die Anknüpfung über die 2-Position, statt über die 4-Position führt bei den Fluorophoren mit Pyridineinheit zu einer niedrigeren Extinktion und Fluoreszenzintensität. Bei den Fluorophoren mit Chinolineinheit führt eine Anknüpfung über die 2-Position zu einer höheren Extinktion und Fluoreszenzintensität sowie einem größeren Anstieg der

Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung. Die veränderte Polarität des Fluorophors **IV5** im Vergleich zu **IV4** scheint zu einer schlechteren Wechselwirkung mit der Nukleinsäure zu führen, während der zusätzliche aromatische Ring im Fluorophor **IV6** dem entgegenwirkt und durch eine bessere Ladungsverteilung sowie einem generell größeren π -System stärker mit der Nukleinsäure und vor allem dem Nukleinsäureduplex wechselwirkt. Auch **IV7** besitzt ein größeres π -System, was der Grund sein könnte, weswegen dieser Fluorophor eine größere Wechselwirkung mit dem Nukleinsäureduplex zeigt als der Fluorophor **IV4**.

Die Fluorophore **IV4** und **IV5**, welche eine Pyridineinheit besitzen, zeigen mit dem **R**-konfigurierten Linker eine leicht höhere Fluoreszenzintensität, während die Fluorophore **IV7** und vor allem **IV6** eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität im hybridisierten Zustand zeigen, wenn sie über den **S**-konfigurierten Linker verknüpft sind.

In hybridisierungssensitiven Sonden sind Thiazolorangefluorophore weit verbreitet, daher wurden auch die in Abbildung 52 gezeigten Fluorophore **TO1-3** an die **S**- und **R**-konfigurierten Alkinlinker in der Nukleinsäure **DNA-TXT** geknüpft.

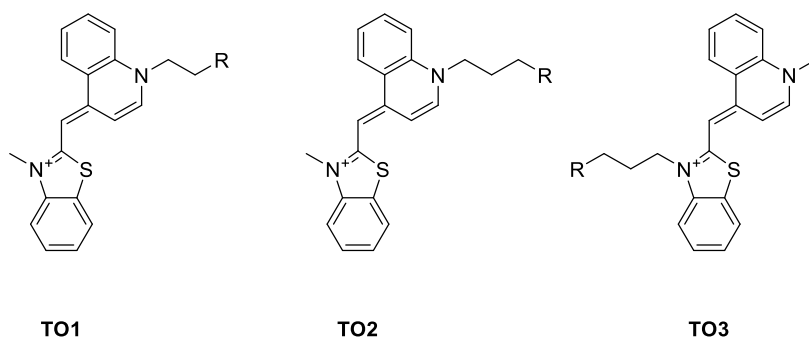


Abbildung 52: An Position R mit den Alkinlinkern verknüpften Thiazolorangefluorophore **TO1-3**.

Die Extinktionsmaxima von **TO1** und **TO2** liegen bei etwa 515 nm, das Extinktionsmaximum von **TO3** ist leicht hypsochrom verschoben und liegt bei etwa 510 nm. Insgesamt weisen die Thiazolorangefluorophore eine mehr als doppelt so hohe Extinktion als die Indolvinylfluorophore auf (Abbildung 53). Der Unterschied zwischen hybridisiertem und unhybridisiertem Zustand fällt hier in den meisten Fällen gering aus. Nur bei der **S**-konfigurierten Anknüpfung des Fluorophors **TO2** liegt die Extinktion im unhybridisierten Zustand deutlich unter der des hybridisierten Zustands und unter der Extinktion bei

R-konfigurierter Anknüpfung. **TO2** ist auch der einzige untersuchte Fluorophor, bei dem die Extinktion durch die Hybridisierung ansteigt. Während der Fluorophor **TO1** keinen großen Unterschied in der Extinktion bei **S**- und **R**-konfigurierter Anknüpfung aufweist, zeigen die Fluorophore **TO2** und **TO3** eine leicht erhöhte Extinktion bei **R**-konfigurierter Anknüpfung.

Die Fluoreszenzintensitäten liegen bei allen Thiazolorangefluorophoren bei etwa 530 nm. Im Unterschied zu den Indolvinylfluorophoren liegen die Fluoreszenzintensitäten der Thiazolorangefluorophore alle im hybridisierten Zustand unter denen im unhybridisierten Zustand. Außerdem liegen die Fluoreszenzintensitäten hier bei einer **R**-konfigurierter Anknüpfung generell höher als bei einer **S**-konfigurierter Anknüpfung, vor allem beim Fluorophor **TO2** im hybridisierten Zustand ist dieser Unterschied deutlich zu sehen. Generell zeigt der Fluorophor **TO2** die höchste Fluoreszenzintensität, gefolgt von **TO3** und **TO1**.

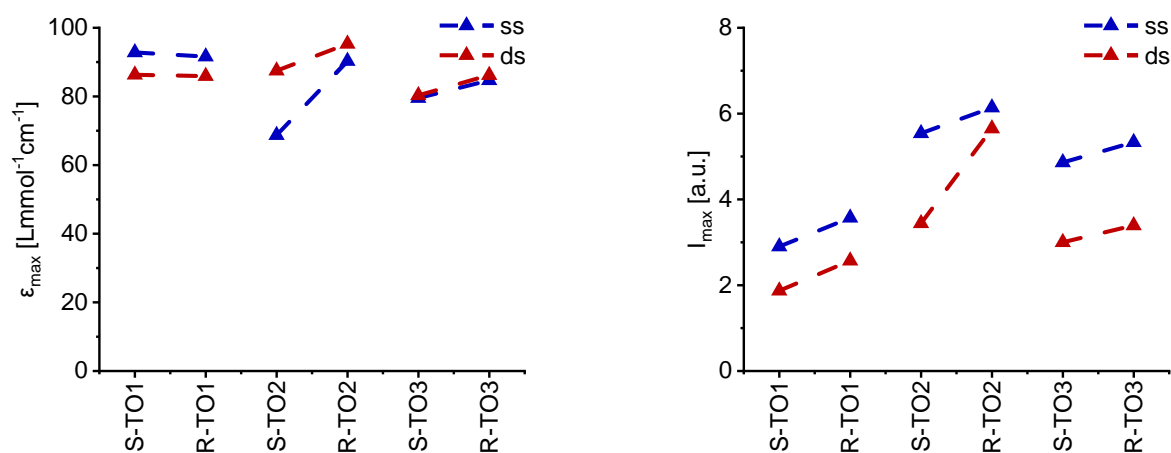


Abbildung 53: Extinktionen (ϵ_{\max}) bzw. Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum der Fluorophore **TO1-3** in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-TXT** in Abhängigkeit der Konfiguration des verknüpften Linkers **S** bzw. **R**; 2.5 μ M **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaPi -Puffer, 250 mM NaCl , pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc.}} = 485$ nm; I_{\max} normiert auf **S-IV1-ss** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

Bei den Thiazolorangefluorophoren scheint die Verknüpfung über einen Propyllinker zu einer höheren Fluoreszenzintensität zu führen als die Verknüpfung über einen Ethyllinker. Außerdem führt die Verknüpfung über den Chinolinstickstoff ebenfalls zu einer leicht erhöhten Fluoreszenzintensität gegenüber einer Verknüpfung über den Benzothiazolstickstoff. Die Thiazolorangefluorophore besitzen eine andere Geometrie als die Indolvinylfluorophore, wodurch hier der **R**-konfigurierte Alkinlinker zu einer erhöhten

Fluoreszenzintensität vor allem im Nukleinsäureduplex führt. Allerdings sorgt diese veränderte Geometrie auch dafür, dass die Fluoreszenzintensität dieser Fluorophore bei der Hybridisierung abnimmt.

In Abbildung 54 sind die Fluoreszenzquantenausbeuten der an die Nukleinsäure **DNA-TXT** geknüpften Fluorophore **IV1-7** und **TO1-3** in Abhängigkeit der Konfiguration des verknüpften Alkinlinkers dargestellt. Außerdem wurde auch hier als wichtige Kenngröße *Light-Up* bei der Hybridisierung bestimmt. Wie bereits bei den Fluoreszenzintensitäten beobachtet, zeigen alle Indolvinylfluorophore einen *Light-Up* bei der Hybridisierung, während es bei allen untersuchten Thiazolorangefluorophoren zu einer Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung kommt. Die höchsten Fluoreszenzquantenausbeuten von etwa 40 % zeigt der Fluorophor **IV7** im hybridisierten Zustand, gefolgt von den Fluorophoren **IV1** und **IV6** mit etwas mehr als 30 %. Den größten *Light-Up* von etwa 9 zeigt weiterhin der Fluorophor **IV1**, gefolgt von den Fluorophoren **IV3** mit einem *Light-Up* von 8 und **IV6** mit einem *Light-Up* von etwa 7.

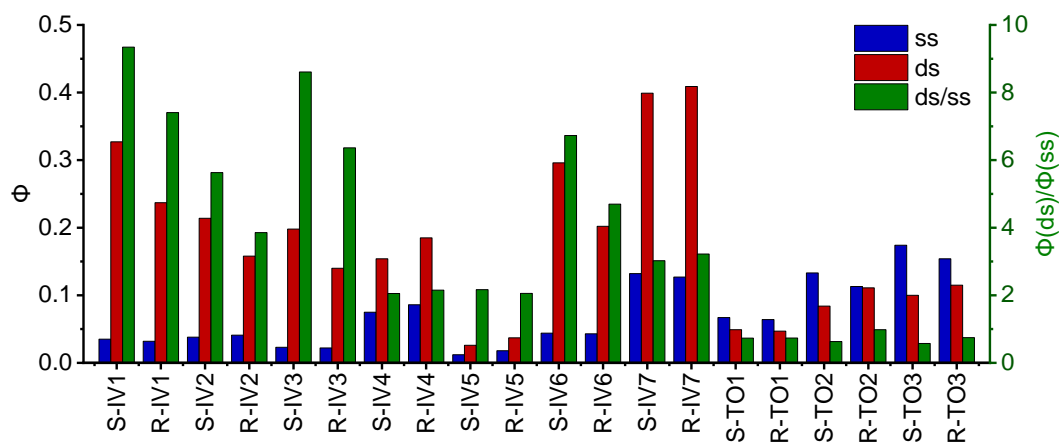


Abbildung 54: Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ) der Fluorophore **IV1-7** und **TO1-3** in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nukleinsäuren **DNA-TXT** in Abhängigkeit der Konfiguration des verknüpften Linkers **S** bzw. **R** und der daraus resultierende Quotient ($\phi(ds)/\phi(ss)$); 2.5 μ M **DNA**, 1 \AA **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, Anregung im jeweiligen Extinktionsmaximum.

Die Helligkeit der Fluorophore und ihre STOKES-Verschiebungen in der Nukleinsäure **DNA-TXT** sind in Abbildung 55 dargestellt. Dabei zeigt sich für die Indolvinylfluorophore eine konstant große STOKES-Verschiebung von 65-85 nm, während die Thiazolorangefluorophore lediglich eine STOKES-Verschiebung von etwa 15-20 nm zeigen. Die Helligkeit ist weiterhin für den

Fluorophor **IV1** am höchsten, gefolgt von **IV7**. Der Fluorophor **IV5** zeigt mit Abstand die geringste Helligkeit aller untersuchten Fluorophore.

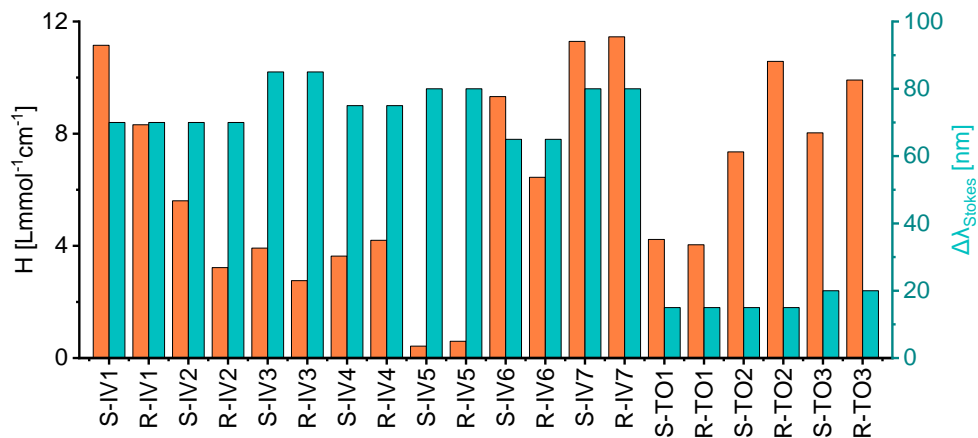


Abbildung 55: Helligkeit (H) und STOKES-Verschiebung ($\Delta\lambda$) der Fluorophore **IV1-7** und **TO1-3** der hybridisierten Nukleinsäuren **DNA-TXT** in Abhängigkeit der Konfiguration des verknüpften Linkers **S** bzw. **R**; 2.5 μ M **DNA**, 1 Äq **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl , pH 7, 20 °C, Anregung im jeweiligen Extinktionsmaximum.

Für die Verwendung in hybridisierungssensitiven Sonden wird eine hohe Photostabilität und eine große STOKES-Verschiebung benötigt. Diese Kriterien werden von allen untersuchten Indolvinylfluorophoren erfüllt. Desweiteren ist eine hohe Quantenausbeute im hybridisierten Zustand, wie sie bei den Fluorophoren **IV1-3** und **IV6-7** zu finden ist, nötig. Außerdem ist es von Vorteil, wenn Fluorophore einen möglichst hohen Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung zeigen. **IV7** zeigt zwar eine hohe Quantenausbeute im hybridisierten Zustand, allerdings ist die Quantenausbeute im unhybridisierten Zustand ebenfalls hoch, wodurch es zu einem vergrößerten Hintergrundsignal kommt. Um die Autofluoreszenz in Zellen zu überstrahlen, ist ebenfalls eine hohe Helligkeit im hybridisierten Zustand notwendig. Von den untersuchten Fluorophoren, welche auch alle anderen Bedingungen erfüllen, besitzen nur **IV1** und **IV6** eine relativ hohe Helligkeit. Insgesamt erfüllt **IV1** die Kriterien als Fluorophor für hybridisierungssensitive Sonde am besten.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Der synthetisierte Alkinlinker konnte erfolgreich dazu verwendet werden, um verschiedene Fluorophore postsynthetisch in Nucleinsäuren einzubringen. Durch die enge Anbindung der Fluorophore an die Nucleinsäure konnten Wechselwirkungen der Fluorophore mit den umliegenden Nucleotiden im unhybridisierten und hybridisierten Zustand der Nucleinsäuren provoziert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Fluorophor **IV1** mit einem gegenüberliegenden Adenosin einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung zeigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Fluorophor **IV1** mit fast allen untersuchten Kombinationen aus benachbarten Nucleotiden einen *Light-Up* bei der Hybridisierung verursacht. Weiter wurde deutlich, dass ein in der Nähe liegendes Guanosin die Emission des Fluorophors löschen kann, während zwei dem Fluorophor in der Nucleinsäure benachbart liegende Thyminide zu einem großem *Light-Up* sowie zu einer großen Helligkeit im hybridisierten Zustand führen. Dabei hat es nicht nur einen Einfluss auf den Fluorophor welche Nucleotide in der Nachbarschaft liegen, sondern auch ob diese in 5'- oder 3'-Richtung zum Fluorophor vorliegen.

Außer den umliegenden Nucleotiden hat auch die Art und Weise der Anbindung des Fluorophors einen großen Einfluss auf seine photophysikalischen Eigenschaften. So führt der **S**-konfigurierte Alkinlinker bei den meisten Indolvinylfluorophoren zu einer höheren Fluoreszenz im hybridisierten Zustand, während bei den Thiazolorangefluorophoren der **R**-konfigurierte Linker zu höheren Fluoreszenzen führt. Ebenso hat es einen Einfluss, an welcher Position der Fluorophor mit dem Alkinlinker verknüpft wird. Die Anbindung über einen Ethyllinker am Pyridinstickstoff wie bei Fluorophor **IV1** führte dabei zu dem größten *Light-Up* bei der Hybridisierung und zu der größten Helligkeit im hybridisierten Zustand, während die Verwendung einer Chinolin- statt einer Pyridineinheit und die Anküpfung direkt an der Indoleinheit wie bei Fluorophor **IV7** zu den höchsten Fluoreszenzquantenausbeuten und einer ebenso großen Helligkeit führt.

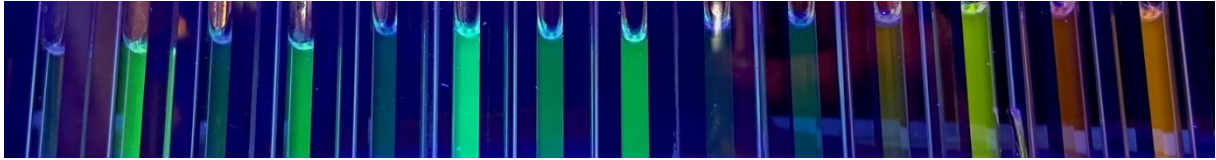


Abbildung 56: Foto der jeweils unhybridisierten und hybridisierten Nukleinsäuren **DNA-TXT** mit den Fluorophoren **IV1-7** mit **S**-konfigurierter Anknüpfung von links nach rechts.

Der Vergleich mit den Thiazolorangefluorophoren zeigte, dass diese zwar eine höhere Extinktion als die Indolvinylfluorophore besitzen, dafür aber keinen *Light-Up* bei der Hybridisierung zeigen. Außerdem weisen die Indolvinylfluorophore eine deutlich höhere **STOKES**-Verschiebung und Photostabilität auf, was für die Anwendung in hybridisierungssensitiven Sonden von Vorteil ist.

Wie für die untersuchten Fluorophore gezeigt, kann der Alkinlinker noch mit weiteren Fluorophoren gekuppelt und auf die photophysikalischen Eigenschaften bei der Hybridisierung sowie auf den Einfluss verschiedener benachbarter Nukleotide untersucht werden. Oder es könnten weitere Anbindungsarten der Indolvinylfluorophore auf ihre Eigenschaften getestet werden. Dabei könnte die Verwendung von Fluorophoren, die eine Chinolineinheit wie **IV6** und **IV7** enthalten, aber über einen Ethyllinker am Chinolinstickstoff angebunden sind, interessante Ergebnisse liefern. Diese können bei höheren Wellenlängen angeregt werden und zeigten im Vergleich vielversprechende Eigenschaften für die Verwendung in hybridisierungssensitiven Sonden.

Um den Einfluss der Chiralität der Nukleinsäure auf die Fluorophore weiter zu untersuchen, könnten die **S**- und **R**-konfigurierten Alkinlinker in eine linksgängige L-DNA-Nukleinsäure eingebracht werden. Damit könnte gezeigt werden, ob die Konfiguration der Alkinlinker dann genau die entgegengesetzten photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore bei der Hybridisierung bewirkt.

5 Mögliche Anwendungen

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurden im Folgenden verschiedene Sondensysteme entwickelt, welche in der Lage sind, bestimmte Nukleinsäuren zu erkennen und erfolgreich zu detektieren. Um die Verwendungsmöglichkeiten des entwickelten Alkinlinkersystems zu zeigen, wurde Fluorophor **IV1** als *Binary-Probes* und *Light-Up-Sonden* verwendet.

5.1 *Binary-Probes*

Als *Binary-Probes* werden Sondenpaare bezeichnet, welche zusammen an eine Zielsequenz hybridisieren und dadurch einen Donor- und einen Akzeptorfluorophor in räumliche Nähe zueinander bringen.^[127] Im hybridisierten Zustand kann so ein FRET zwischen Donor und Akzeptor stattfinden, wodurch die Emission des Donors verringert und die Emission des Akzeptors erhöht wird. Im unhybridisierten Zustand sind Donor und Akzeptor für einen Energietransfer zu weit voneinander entfernt und es kommt nur zur Donoremission. Ein verbreitetes Problem dieser Sonden ist die ungewollte direkte Anregung des Akzeptors bei der Anregungswellenlänge des Donors, wodurch es zu einer ungewollten Akzeptoremission und einem möglichen falsch-positiven Signal kommt.^[128] Diese Kreuzanregung kann durch die Verwendung eines Donorfluorophors mit großer STOKES-Verschiebung minimiert werden. Ein weiteres Problem liegt in der Überschneidung der Emission des Donorfluorophors mit der Emission des Akzeptorfluorophors. Wenn Donorfluorophore mit einer großen STOKES-Verschiebung verwendet werden, liegt die Donoremission oft im Bereich der Akzeptoremission, wodurch eine klare Unterscheidung schwierig wird. Dieses Problem kann durch die Verwendung eines Donorfluorophors gelöst werden, welcher in seiner Emission gelöscht ist. So kann zwar ein Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor stattfinden, jedoch führt die gelöschte Emission des Donors im unhybridisierten Zustand nicht zu einem falsch-positiven Signal. Dieser in der Literatur manchmal auch DRET genannte

Energietransfer ermöglicht die Minimierung der Hintergrundstrahlung und Erhöhung der Sensitivität von *Binary-Probes*.^[128]

In den bisherigen DRET-basierten *Binary-Probes* wird der Donorfluorophor als Phosphoramidit in der Oligonukleotid-Festphasensynthese eingebracht. Im Gegensatz dazu erlaubt der modulare Alkinlinker eine postsynthetische Kupplung, wodurch der Zugang auch für andere Fluorophore, welche nicht mit den Bedingungen während der Festphasensynthese kompatibel sind, ermöglicht wird. Die Verwendung des bereits untersuchten Fluorophors **IV1** in Kombination mit dem **S**-konfigurierten Alkinlinker bringt einerseits den für einen DRET benötigten Vorteil einer gelöschten Fluoreszenz im unhybridisierten Zustand. Zusätzlich wird die Donoremission im hybridisierten Zustand im Unterschied zu den bereits bekannten DRET-basierten *Binary-Probes* nicht mehr gelöscht, wodurch es bei der Hybridisierung sowohl zu einem Anstieg in der Akzeptoremission als auch in der Donoremission kommt.

Um die mögliche Anwendung in *Binary-Probes* zu untersuchen, wurde der Fluorophor **IV1** über den **S**-konfigurierten Alkinlinker mit der Nukleinsäure **DNA-TXT** gekuppelt und als Donorsonde verwendet. Als Akzeptorsonde wurde **ATTO590** gewählt, welches sich am 5'-Ende der kommerziell erhältlichen Nukleinsäure **DNA-O** befindet. Nach der Hybridisierung der Donor- und Akzeptorsonden an die komplementäre Nukleinsäure **DNA-FRET-GS** kann so ein Energietransfer von **IV1** auf **ATTO590** stattfinden (Abbildung 57).

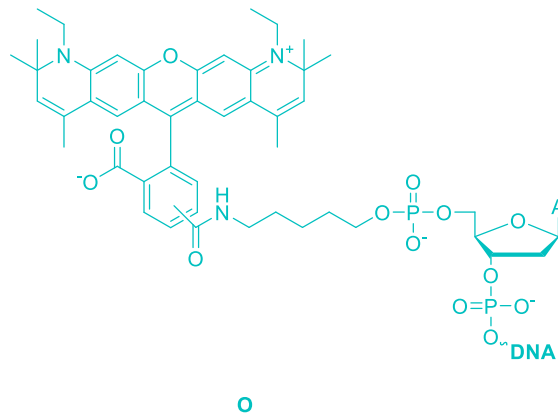
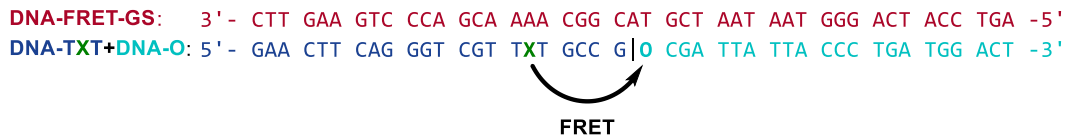


Abbildung 57: Die Sonden **DNA-TXT** und **DNA-O** hybridisieren an den komplementären Gegenstrang **DNA-FRET-GS**, dabei kommen sich die Fluorophore **IV1** und **ATTO590** so nahe, dass ein effizienter FRET stattfinden kann.

In Abbildung 58 (links) sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden dargestellt. Der Donor (**IV1**) besitzt sein Absorptionsmaximum bei 450 nm, bei dieser Wellenlänge zeigt der Akzeptor (**ATTO590**) nur noch eine Extinktion von $0.82 \text{ Lmmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Emission des Donors erstreckt sich in einem Bereich von etwa 465-650 nm und überlappt mit der Absorption des Akzeptors, welche sich von etwa 500-650 nm erstreckt. Durch die Überlappung wird ein Energietransfer möglich und nach einer Anregung des Donorfluorophors bei 450 nm kann es zur Emission des Akzeptors bei 630 nm kommen.

In Abbildung 58 (rechts) sind die Fluoreszenzspektren der unhybridisierten und hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden dargestellt. Wie schon zuvor gezeigt, besitzt die Donorsonde im unhybridisierten Zustand eine viel geringere Fluoreszenzintensität als im hybridisierten Zustand. So ist die Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum des Akzeptors der gleichzeitig hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden etwa um den Faktor 200 höher als bei der unhybridisierten Donorsonde. Dabei verläuft der Energietransfer mit einer Effizienz von 81 % (Berechnung siehe Kapitel 2.4).

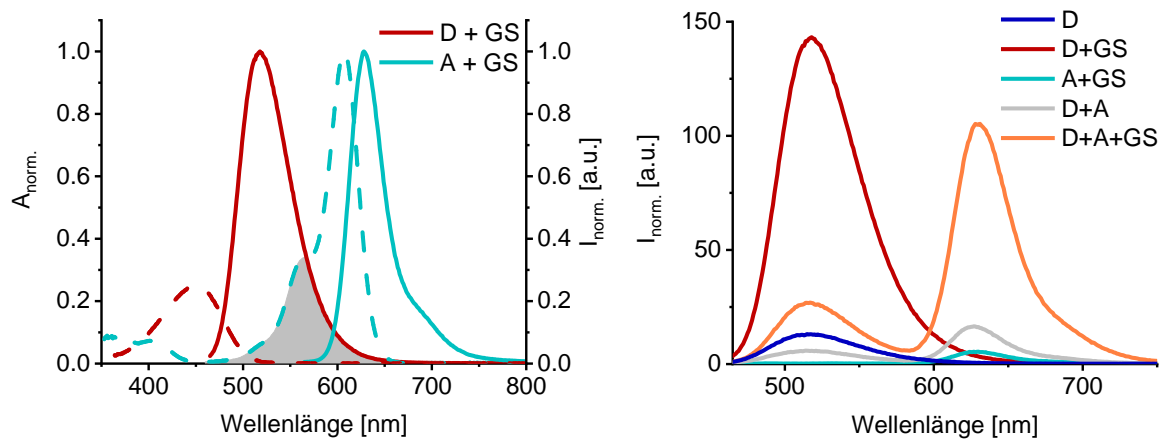


Abbildung 58: Links: Absorptions- (gestrichelt) und Fluoreszenzspektren (durchgezogen) des Donors (D+GS) und Akzeptors (A+GS) in hybridisiertem Zustand. Rechts: Fluoreszenzspektren der unhybridisierten (D) und hybridisierten (D+GS) Donorsonde, der hybridisierten Akzeptorsonde (A+GS), der vereinigten unhybridisierten Donor- und Akzeptorsonden (D+A) und der gleichzeitig hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden (D+A+GS); 2.5 µM **Donor/Akzeptor**, 1 Åq **GS**, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{ext}} = 450$ nm.

Allerdings kommt es mit dem verwendeten Akzeptorfluorophor trotz niedriger Extinktion im Bereich der Anregungswellenlänge auch zu einer ungewollten Kreuzanregung dessen bei 450 nm, was zu einer leichten Akzeptoremission bei 630 nm führt. Daher ist die Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum des Akzeptors der gleichzeitig hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden nur etwa 20-mal so hoch wie bei der ohne Donor vorliegenden Akzeptorsonde. Dieser Faktor könnte durch die Verwendung eines Akzeptors mit noch niedrigerer oder komplett fehlender Absorption im Bereich der Donorabsorption weiter verbessert werden.

Liegen Donor- und Akzeptorsonden zusammen im unhybridisierten Zustand vor, so kann bei der verwendeten Konzentration ebenfalls ein FRET stattfinden. Dieser verläuft mit einer Effizienz von 56 % und ist auf die offensichtlich bereits vorhandene räumliche Nähe von Donor und Akzeptor in der Lösung zurückzuführen. Somit kommt es hierbei in der Fluoreszenzintensität nur zu einem Anstieg um etwa den Faktor 7 bei der Hybridisierung. Dieser Faktor könnte durch die Verwendung geringerer Konzentrationen erhöht werden.

Um das Verhalten des entwickelten SONDENSYSTEMS weiter zu untersuchen, wurde der Fluorophor **IV1** in derselben Nukleinsäure auch als Akzeptor verwendet. Liegen dann Donor- und Akzeptorsonde im unhybridisierten Zustand zusammen vor und es kommt aufgrund der

Konzentration zu einem Energietransfer, so sollte der hybridisierungssensitive Fluorophor **IV1** dennoch kein Fluoreszenzsignal liefern. Dies ist vor allem von Vorteil, wenn überschüssige Sonden in Zellen nicht ausgewaschen werden können. Als Donor wurde **DY-350** gewählt, welches sich am 5'-Ende der kommerziell erhältlichen Nukleinsäure **DNA-D** befindet. Dieser Fluorophor lässt sich bei niedrigerer Wellenlänge anregen und ermöglicht so einen Energietransfer auf **IV1**, wenn Donor- und Akzeptorsonden an die komplementäre Zielnukleinsäure hybridisieren (Abbildung 59).

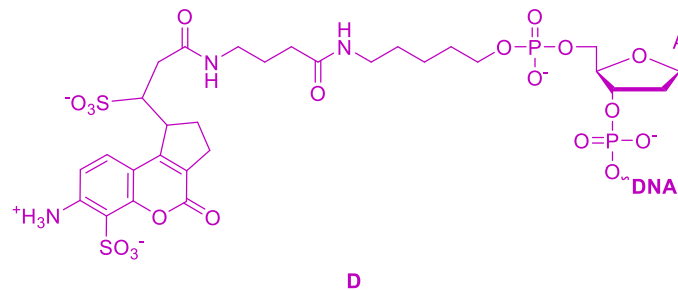


Abbildung 59: Die Sonden **DNA-TXT** und **DNA-D** hybridisieren an den komplementären Gegenstrang **DNA-FRET**, dabei kommen sich die Fluorophore **IV1** und **DY-350** so nahe, dass ein effizienter FRET stattfinden kann.

In Abbildung 60 (links) sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden dargestellt. Der Donor **DY-350** besitzt sein Absorptionsmaximum bei etwa 360 nm, bei welchem der Akzeptor **IV1** fast keine Absorption mehr zeigt. Die Emission des Donors liegt im Bereich von etwa 470-550 nm und überlappt sehr stark mit der Absorption des Akzeptors, welche im selben Bereich liegt. Auch hier wird nach einer Anregung des Donors bei 360 nm ein Energietransfer und eine daraus resultierende Emission des Akzeptors bei 515 nm möglich.

In Abbildung 60 (rechts) sind die Fluoreszenzspektren der unhybridisierten und hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden dargestellt. Die Verwendung von **IV1** als Akzeptor bringt den Vorteil, dass es nur im hybridisierten Zustand zu einem Fluoreszenzsignal der Akzeptorsonde kommt. So ist die Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum des Akzeptors der gleichzeitig

hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden etwa 35-mal höher als in der unhybridisierten Akzeptorsonde.

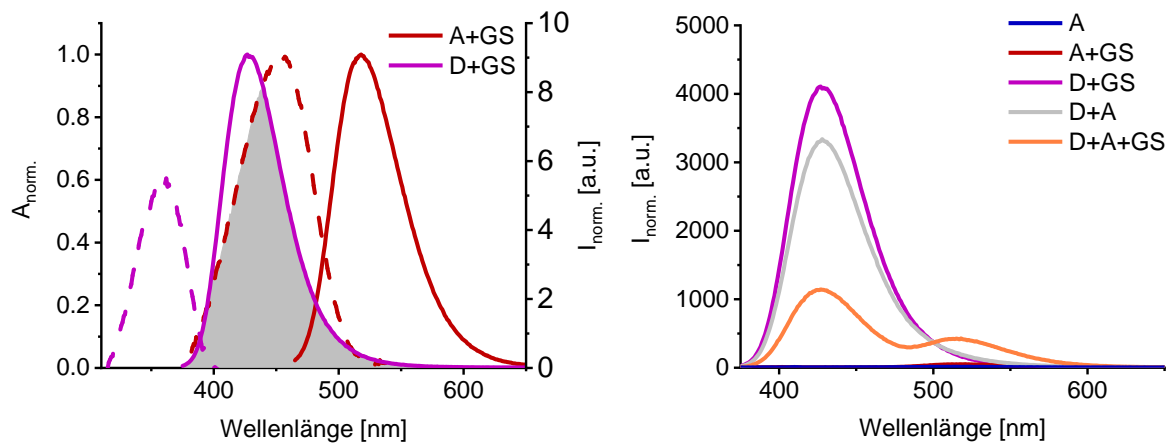


Abbildung 60: Links: Absorptions- (gestrichelt) und Fluoreszenzspektren (durchgezogen) des Donors (D+GS) und Akzeptors (A+GS) in hybridisiertem Zustand. Rechts: Fluoreszenzspektren der hybridisierten Donorsonde (D+GS), unhybridisierten (A) und hybridisierten (A+GS) Akzeptorsonde, der vereinigten unhybridisierten Donor- und Akzeptorsonden (D+A) und der gleichzeitig hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden (D+A+GS); 2.5 µM Donor/Akzeptor, 1 Äq GS, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{ext}} = 360$ nm.

Allerdings kommt es mit dem verwendeten Donor zur Überlappung der Donor- und Akzeptoremission, wodurch die Fluoreszenzintensität, der gemeinsam hybridisierten Donor- und Akzeptorsonden bei einer FRET-Effizienz von 72 % nur etwa doppelt so hoch liegt als bei der ohne Akzeptor vorliegenden Donorsonde. Durch die Wahl eines Donor-Akzeptorpaars, welches keine Überlappung in der Emission zeigt, könnte dieser Faktor vermutlich deutlich verbessert werden.

Liegen die Donor- und Akzeptorsonden im unhybridisierten Zustand zusammen vor, so findet ein Energietransfer mit einer Effizienz von 19 % statt. Aufgrund der geringen Fluoreszenz des unhybridisierten Akzeptors **IV1** ist die Fluoreszenzintensität bei 515 nm hier im Vergleich zur Donorsonde aber fast nicht erhöht.

Die entwickelte Sonde konnte erfolgreich in *Binary-Probes* verwendet werden, um Zielnukleinsäuren mit einem Wechsel im Fluoreszenzsignal zu detektieren. Der Vorteil dieser Sonden besteht darin, dass sie durch eine geringe Fluoreszenzintensität im Einzelstrang die Hintergrundstrahlung im Vergleich zu herkömmlichen *Binary-Probes* deutlich reduzieren können. Ein kleiner Nachteil besteht in der ungewollten Kreuzanregung des **ATTO590** bei

450 nm, sowie in der benötigten niedrigen Anregungswellenlänge des **DY-350** und der Überlappung der **DY-350** und **IV1** Emission. In dieser Arbeit wurde sich auf die kommerziell erhältliche Fluorophore beschränkt, durch die Verwendung alternativer synthetischer Fluorophore könnten sich diese Probleme beheben lassen. In Zukunft könnte bei diesen Sonden auch die Sequenzabhängigkeit von den benachbarten Nukleotiden weiter untersucht werde, da es in diesem System mehr auf eine geringe Fluoreszenzintensität im unhybridisierten Zustand als auf eine möglichst großen *Light-Up* bei der Hybridisierung ankommen könnte. Genauso könnten anstelle des Fluorophors **IV1** auch andere der bereits untersuchten Fluorophore zur Anwendung kommen. Wenn es gelingt sowohl in der Donor- als auch als Akzeptorsonde einen hybridisierungssensitiven Fluorophor zu verwenden, so könnte das mehrere der zuvor gezeigten Vorteile vereinen.

5.2 *Light-Up* Nitroindolsonden

Light-Up Sonden beruhen auf dem Anstieg der Fluoreszenzintensität eines umgebungs-sensitiven Fluorophors bei der Hybridisierung. Meistens wird dabei durch die Wechselwirkung mit dem Nukleinsäureduplex die interne Rotation des Fluorophors gehemmt, wodurch ein Anstieg in der Emission ausgelöst wird.^[23, 30] Ein anderes Sondenkonzept basiert auf der fluoreszenzlöschenden Eigenschaft von Nitroindol. Dabei wird Nitroindol in der Nähe eines Fluorophors in der Sonde eingebracht. Durch die ungeordnete Struktur der Nukleinsäure im unhybridisierten Zustand kann es zu einem stark distanzabhängigen PET kommen, welcher die Emission des Fluorophors löscht. Hybridisiert die Sonde mit der Zielnukleinsäure, so wird der Abstand zwischen Fluorophor und Nitroindol in der geordneten Struktur des Nukleinsäureduplexes definiert und größer, wodurch die Effizienz des PET abnimmt und die Fluoreszenzintensität des Fluorophors ansteigt.^[124] Diese beiden Sondenkonzepte wurden im Folgenden vereint, um ein noch größeres Aufleuchten des Fluorophors **IV1** bei der Hybridisierung zu erreichen.

Um herauszufinden, wie sich das Einbringen und der Abstand der Nitroindolmodifikation auf die photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors auswirkt, wurden die Sonden **DNA-N1**

und **DNA-N2** synthetisiert, bei denen Nitroindol als Basensurrogat mit einem bzw. zwei Nukleotiden Abstand, zu dem an den **S**-konfigurierten Alkinlinker gekoppelten Fluorophor **IV1**, vorliegt (Abbildung 61). Um die Eigenschaften des Fluorophors im DNA-DNA-Duplex mit denen im DNA-RNA-Duplex zu vergleichen, wurden diese Sonden zusätzlich auch mit einer komplementären RNA hybridisiert und mit der bereits untersuchten Sonde **DNA-TXT** verglichen.

DNA-N1: 5' - GAA CTT CAG GGT CGN **TXT** GCC G -3'
DNA-GS: 3' - CTT GAA GTC CCA GCA AAA CGG C -5'

DNA-N2: 5' - GAA CTT CAG GGT CNT **TXT** GCC G -3'
DNA-GS: 3' - CTT GAA GTC CCA GCA AAA CGG C -5'

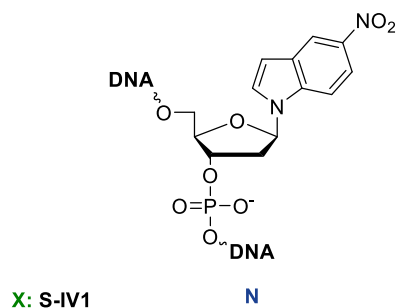


Abbildung 61: Sonden **DNA-N1** und **DNA-N2**, welche Nitroindol als Basensurrogat in einem Abstand von einer bzw. zwei Nukleotide zum Fluorophor **IV1** besitzten.

In Abbildung 62 sind die Extinktion- und Fluoreszenzintensitätsmaxima der Sonden bei der Hybridisierung mit komplementärer DNA bzw. RNA in Abhängigkeit des Abstands zum Nitroindol dargestellt. Der Unterschied zwischen unhybridisierter Sonde und mit DNA hybridisiert führt zu keinem großen Unterschied in der Extinktion. Die Hybridisierung mit RNA verringert die Extinktion des Fluorophors **IV1** etwas.

Das höchste Maximum in der Fluoreszenzintensität besitzen die Sonden im DNA-DNA-Duplex. Im Vergleich dazu ist die Fluoreszenzintensität in den DNA-RNA-Duplexen etwas niedriger. Die Fluoreszenzintensitäten der unhybridisierten Sonden liegen aber in allen Fällen um ein Vielfaches unter denen der verschiedenen Duplexe. Die höchste Fluoreszenzintensität tritt bei den Sonden ohne Nitroindol auf. In den Sonden, welche ein Nitroindol mit einem Nukleotid Abstand zum Fluorophor enthalten, liegt die Fluoreszenzintensität im DNA-DNA-Duplex

deutlich niedriger als in den Sonden ohne Nitroindol. Im DNA-RNA-Duplex dagegen weisen die **N1**-Sonden eine fast gleich hohe Fluoreszenzintensität wie die Sonden ohne Nitroindol auf. Die Fluoreszenzintensität im unhybridisierten Zustand ist bei den **N1**-Sonden nur noch weniger als halb so hoch wie bei den Sonden ohne Nitroindol. Die **N2**-Sonden zeigen im unhybridisierten Zustand eine Fluoreszenzintensität, welche zwischen der Intensität der **N1**-Sonden und der Sonden ohne Nitroindol liegt. Im DNA-DNA-Duplex liegt die Fluoreszenzintensität der **N2**-Sonden etwas über der Intensität der **N1**-Sonden, aber weiter unter der Intensität der Sonden ohne Nitroindol. Im DNA-RNA-Duplex weisen die die **N2**-Sonden die niedrigste Fluoreszenzintensität im Vergleich mit den DNA-RNA-Duplexen der anderen beiden Sonden auf.

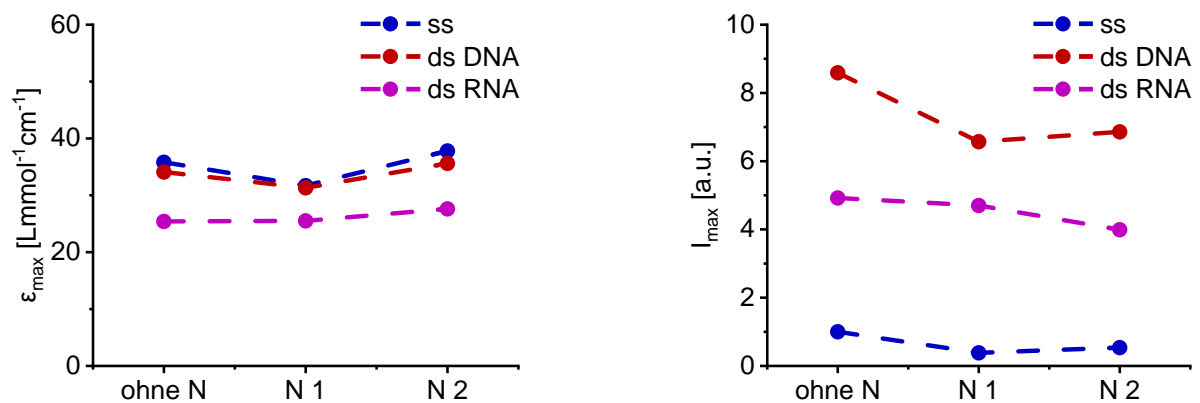


Abbildung 62: Extinktionen (ϵ_{\max}) bzw. Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit DNA (ds DNA) und RNA (ds RNA) hybridisierten Sonden **DNA-TXT** (ohne N), **DNA-N1** und **DNA-N2**; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm; I_{\max} normiert auf **ohne N ss** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

Wie beabsichtigt, löscht Nitroindol die Fluoreszenz des naheliegenden Fluorophors im unhybridisierten Zustand um mehr als die Hälfte, wobei die Löschung bei steigendem Abstand weniger effektiv wird. Im hybridisierten Zustand wird die Fluoreszenzintensität ebenfalls etwas gelöscht, jedoch nicht so stark wie im unhybridisierten Zustand. Die Hybridisierung mit RNA führt zu einer verminderten Extinktion und Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Hybridisierung mit DNA, was die Effizienz der Sonden für RNA-Zielmoleküle etwas vermindert. Jedoch weisen auch die DNA-RNA-Duplexe noch eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zum unhybridisierten Zustand auf.

Weiter wurden auch die Quantenausbeuten sowie die daraus resultierenden Anstiege bei der Hybridisierung und die Helligkeit der untersuchten Sonden bestimmt, welche in Abbildung 63 dargestellt sind. Dabei zeigen die Sonden ohne Nitroindol einen *Light-Up* von 9 bei der Hybridisierung mit DNA und einen *Light-Up* von 7 bei der Hybridisierung mit RNA. Durch das eingebrachte Nitroindol konnte der *Light-Up* in den **N1**-Sonden auf ca. 21 für den DNA-DNA-Duplex und ca. 16 für den DNA-RNA-Duplex erhöht werden. In den **N2**-Sonden beträgt der *Light-Up* im DNA-DNA-Duplex noch etwa 11 und im DNA-RNA-Duplex etwa 9.

Die Helligkeit nimmt dabei durch das eingebrachte Nitroindol in den DNA-DNA-Duplexen der Nitroindolsonden im Vergleich zu der Sonde ohne Nitroindol um bis zu 15 % ab. Die Hybridisierung mit RNA statt DNA führt bei der Sonde ohne Nitroindol zu einer Verringerung der Helligkeit um etwa 45 %. Bei den Nitroindolsonden sinkt die Helligkeit bei der Hybridisierung mit RNA im Vergleich zur Hybridisierung mit DNA noch um ca. 35 % ab.

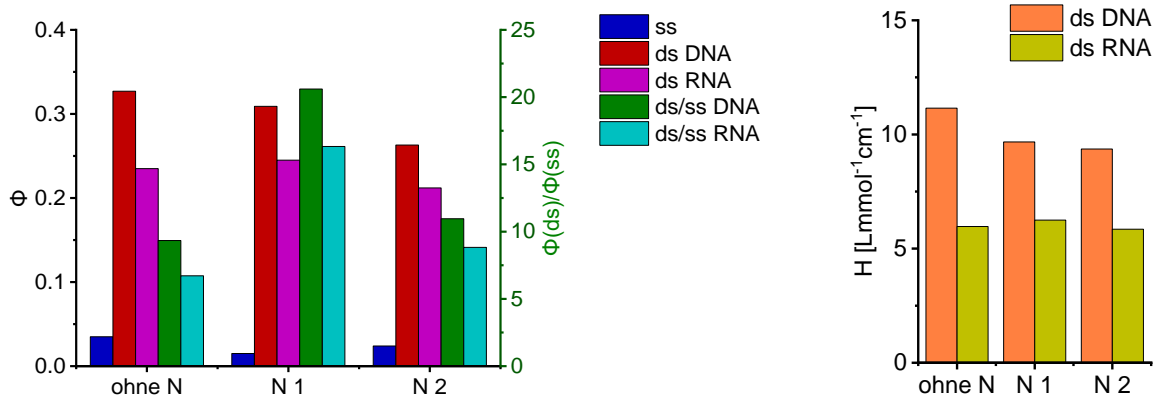


Abbildung 63: Links: Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ) des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit DNA (ds DNA) und RNA (ds RNA) hybridisierten Sonden **DNA-TXT** (ohne N), **DNA-N1** und **DNA-N2** und der daraus resultierende Quotient (ds/ss DNA und ds/ss RNA); Rechts: Zugehörige Helligkeiten (H) der Sonden im DNA-DNA-Duplex (ds DNA) und im DNA-RNA-Duplex (ds RNA); $2.5 \mu\text{M DNA}$, $1 \text{ \AA} \text{ GS}$, $10 \text{ mM NaPi-Puffer}$, 250 mM NaCl , $\text{pH } 7$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 450 \text{ nm}$.

Die Hybridisierung mit RNA statt mit DNA führt insgesamt zu einem etwa 20-30 % geringeren Aufleuchten des Fluorophors bei der Hybridisierung. Dieser nachteilige Effekt konnte jedoch durch das Einbringen eines Nitroindolbasensurrogats in einem Abstand von einem Nukleotid zum Fluorophor, welches zu einem etwa 220-240 % größeren Aufleuchten bei der Hybridisierung führt, mehr als ausgeglichen werden.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierung mit einer RNA-Zielsequenz zu etwas niedrigeren Extinktionen, Fluoreszenzintensitäten und Quantenausbeuten führt, als eine Hybridisierung mit einer DNA-Zielsequenz. Die Verwendung einer Nitroindolmodifikation in einem Abstand von einem Nukleotid zum Fluorophor führt bei der Hybridisierung zu einer deutlichen Erhöhung des *Light-Up* in der Fluoreszenzquantenausbeute. Das entwickelte Sondensystem in Kombination mit einer Nitroindolmodifikation eignet sich zur Detektion von sowohl DNA als auch RNA-Zielsequenzen. Eine Bindung an diese Zielsequenzen kann über einen großen Anstieg in der Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute beobachtet werden.

5.3 Test an mRNA *mdka*

Aufgrund des hohen *Light-Ups* der Nitroindolsonden bei der Hybridisierung wurde dieses System für die Detektion an einer realen mRNA-Sequenz getestet. Dabei handelt es sich um die Sequenz *mdka*-mRNA, welche bei der Regenerierung von Verletzungen des zentralen Nervensystems von Zebrafischen eine Rolle spielt.^[166-167] Zunächst wurden 15 Sonden von etwa 40 möglichen Sonden ausgewählt, welche in der Zielsequenz in zentraler Position ein Motiv aus drei benachbarten Adenosinen aufweisen (Abbildung 64). Dadurch kann der Fluorophor **IV1** mit einem Adenosin als komplementärem Nukleotid hybridisieren und wird außerdem von zwei Thymidinen in der Sonde flankiert, was in vorherigen Experimenten zu dem größten Anstieg in der Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung führte. Außerdem enthält jede der Sonden ein Nitroindol als Basensurrogat, so dass sich für alle Sonden ein **NTXT** Motiv ergibt. Diese 15 möglichen Sonden wurden synthetisiert und zunächst auf ihre photophysikalischen Eigenschaften bei der Hybridisierung mit den komplementären DNA-Strängen untersucht.

mdka: 3'- aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa...gattgattaaattagacaaa - 5' (ca. 2000 Basen)

```
M1: 5'- TGG CTG AAN TXT GCT GTG TT -3'  
M2: 5'- ACG NTX TGC TGA CAT TCG AC -3'  
M3: 5'- GGT GCA GGN TXT GGT CAC AG -3'  
M4: 5'- TGG GTT TGT NTX TGA CCT TG -3'  
M5: 5'- ACG GGG TNT XTA CTG CTC CT -3'  
M6: 5'- GCT ATG TNT XTG TGG CTG TA -3'  
M7: 5'- ACA ACG GCN TXT TAT TCT CC -3'  
M8: 5'- TGT TGT CNT XTA GCA AAT GA -3'  
M9: 5'- ATT GCT ACN TXT ATA CCC CG -3'  
M10: 5'- CAC TAC ACN TXT TAT AGA AA -3'  
M11: 5'- CTC CAT GCN TXT CAA CAA CC -3'  
M12: 5'- TCA CTC ATG TAC NTX TTG TT -3'  
M13: 5'- TGG TTC NTX TTC TAT TGC AT -3'  
M14: 5'- CAC ACA NTX TAT AAA TAG GC -3'  
M15: 5'- AAA CTT TNT XTG CTA ACC AA -3'
```

N: Nitroindol
X: S-IV1

Abbildung 64: Zielsequenz *mdka*-mRNA (violett) und die komplementären Nukleinsäuren **DNA-M1-15**.

Die Extinktion liegt in allen Sonden in einem ähnlichen Bereich (Abbildung 65). Die Fluoreszenzintensität des Fluorophors liegt in allen Sonden im hybridisierten Zustand höher als im unhybridisierten Zustand. Im unhybridisierten Zustand tritt dabei in der Sonde **M2** die höchste Fluoreszenzintensität aller unhybridisierten Sonden auf und liegt nur knapp unter der Fluoreszenzintensität im hybridisierten Zustand. Die niedrigsten Fluoreszenzintensitäten im unhybridisierten Zustand weisen die Sonden **M1** und **M3** auf. Die höchsten Fluoreszenzintensitäten im hybridisierten Zustand zeigt der Fluorophor in den Sonden **M5** und **M7**, während er in den Sonden **M6** und **M15** die niedrigsten Fluoreszenzintensitäten aller hybridisierten Sonden aufweist.

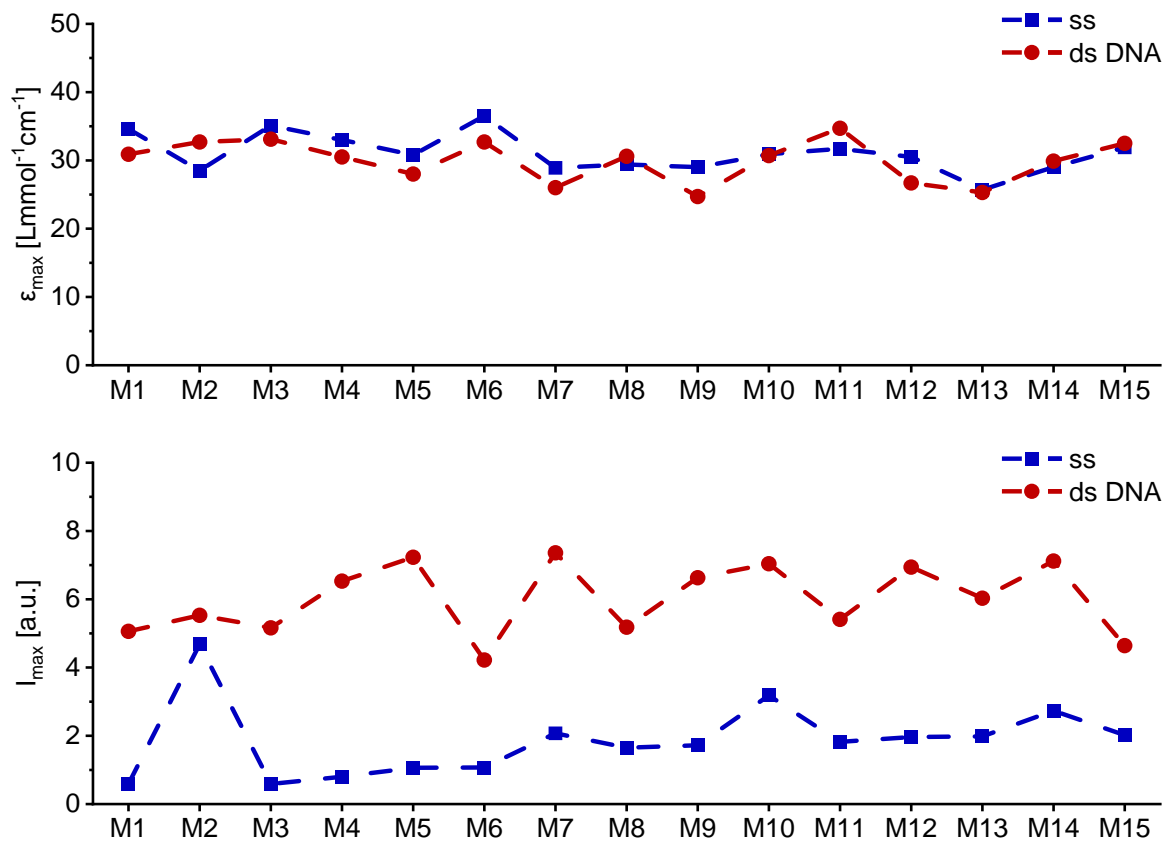


Abbildung 65: Extinktionen (ϵ_{\max}) und der Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit DNA (ds DNA) hybridisierten Sonden **DNA-M1-15**; 2.5 μM DNA, 1 \AA q GS, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm. I_{\max} normiert auf **M1** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der untersuchten Sonden und der ermittelte *Light-Up* bei der Hybridisierung sind in Abbildung 66 gezeigt. Den größten *Light-Up* der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung zeigt der Fluorophor in den Sonden **M1** und **M3-5** um mehr als 8. Den geringsten *Light-Up* zeigt der Fluorophor in der Sonde **M2**, welcher fast ganz ausbleibt. Ansonsten beträgt der *Light-Up* in allen Sonden mindestens 2 oder höher. Die Helligkeit des Fluorophors im hybridisierten Zustand ist in den Sonden **M5** und **M4** am höchsten und in der Sonde **M6** am niedrigsten.

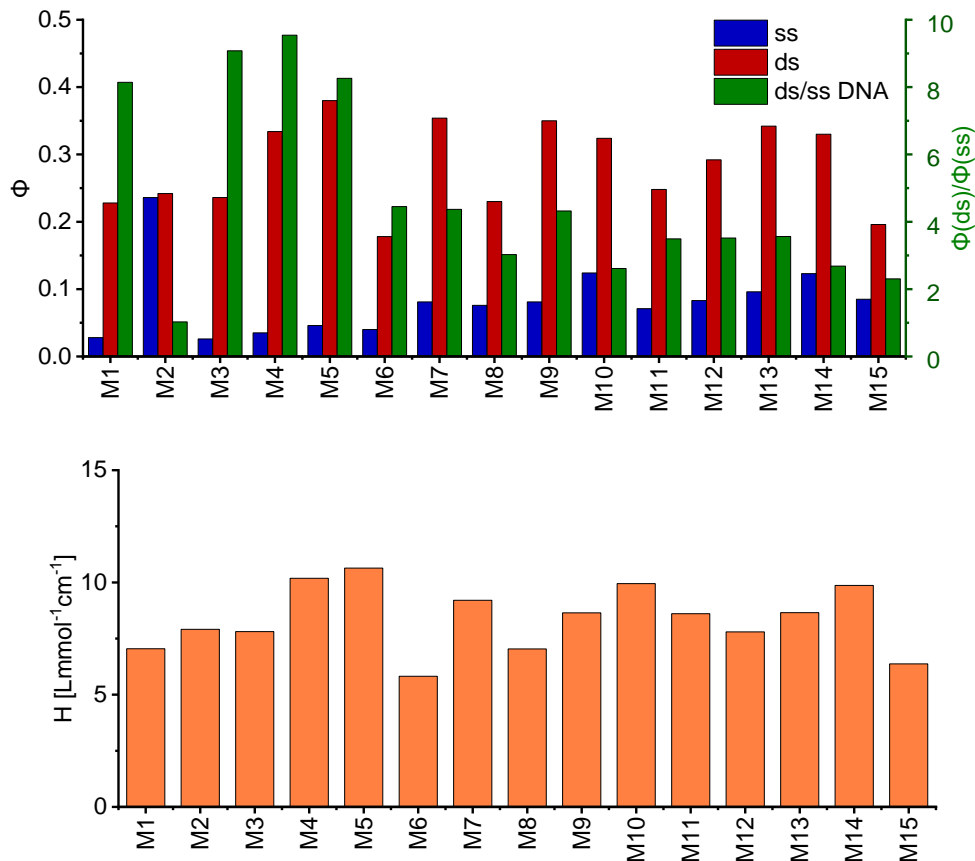


Abbildung 66: Oben: Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ) des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit DNA (ds DNA) hybridisierten Sonden **DNA-M1-15** und der daraus resultierende Quotient (ds/ss DNA); Unten: Helligkeiten (H) der Sonden im DNA-DNA-Duplex $2.5 \mu\text{M DNA}$, $1 \text{ \AA}q \text{ GS}$, $10 \text{ mM NaP}_i\text{-Puffer}$, 250 mM NaCl , $\text{pH } 7$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 435 \text{ nm}$.

Das *Light-Up*-Nitroindolsondenkonzept wurde erfolgreich auf verschiedene Sonden übertragen, welche für die Markierung einer ausgewählten mRNA in Frage kommen. Dabei zeigen fast alle untersuchten Sonden ein Aufleuchten bei der Hybridisierung. Das größte Aufleuchten zeigte der Fluorophor dabei in den Sonden **M1** und **M3-5**. Diese Sonden sollten sich damit am besten für die Markierung der mRNA eignen und werden im Folgenden weiter analysiert.

Zunächst wurden die ausgewählten Sonden mit RNA hybridisiert, um den Einfluss dieser auf die Eigenschaften bei der Hybridisierung zu untersuchen. In Abbildung 67 sind die Maxima der Extinktions- und Fluoreszenzintensitäten des Fluorophors in den Sonden **M1** und **M3-5** im unhybridisierten und mit RNA hybridisierten Zustand dargestellt. Die Extinktion fällt, wie bereits schon vorher beobachtet, im DNA-RNA-Duplex etwas geringer aus als im DNA-DNA-Duplex, während die Extinktion in den unhybridisierten Sonden stets darüber liegt. Die

Fluoreszenzintensitäten liegen auch im DNA-RNA-Duplex deutlich über den Fluoreszenzintensitäten im unhybridisierten Zustand und erreichen in der Sonde **M4** den höchsten Wert. In der Sonde **M1** besitzt der Fluorophor sowohl im unhybridisierten Zustand als auch im hybridisierten Zustand die niedrigste Fluoreszenzintensität der vier untersuchten Sonden.

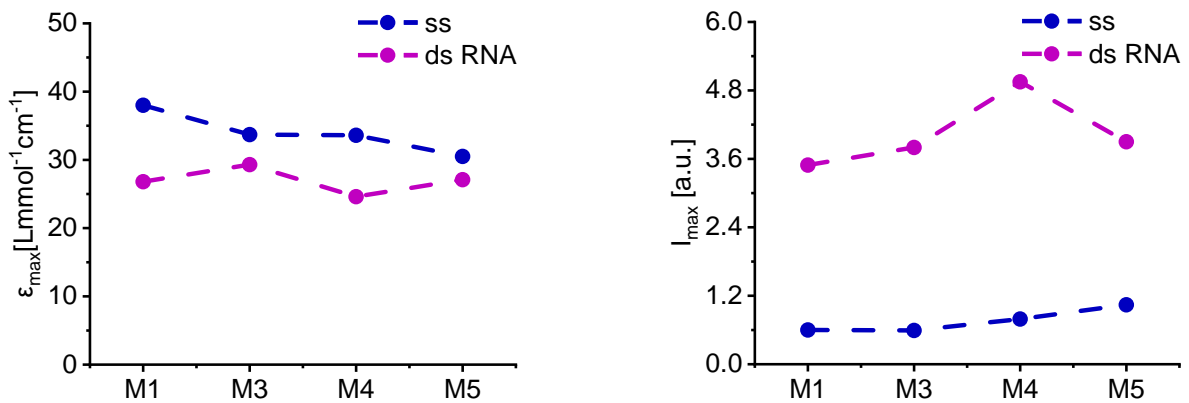


Abbildung 67: Extinktionen (ϵ_{\max}) und Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit RNA (ds RNA) hybridisierten Sonden **DNA-M1+3-5**; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM **NaPi**-Puffer, 250 mM **NaCl**, pH 7, 20 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm; I_{\max} normiert auf **M1** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

In Abbildung 68 sind die Fluoreszenzquantenausbeuten, deren Anstieg bei der Hybridisierung und die Helligkeit des Fluorophors in den untersuchten Sonden dargestellt. Einen fast 8-fachen Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Hybridisierung zeigt der Fluorophor in den Sonden **M3** und **M4**. In der Sonde **M1** liegt der *Light-Up* bei etwa 7, während er in der Sonde **M5** noch bei etwa 5 liegt. Die größte Helligkeit weist der Fluorophor in der Sonde **M4** auf, gefolgt von den Sonden **M5** und **M3**. Eine etwas niedrigere Helligkeit zeigt der Fluorophor in der Sonde **M1**.

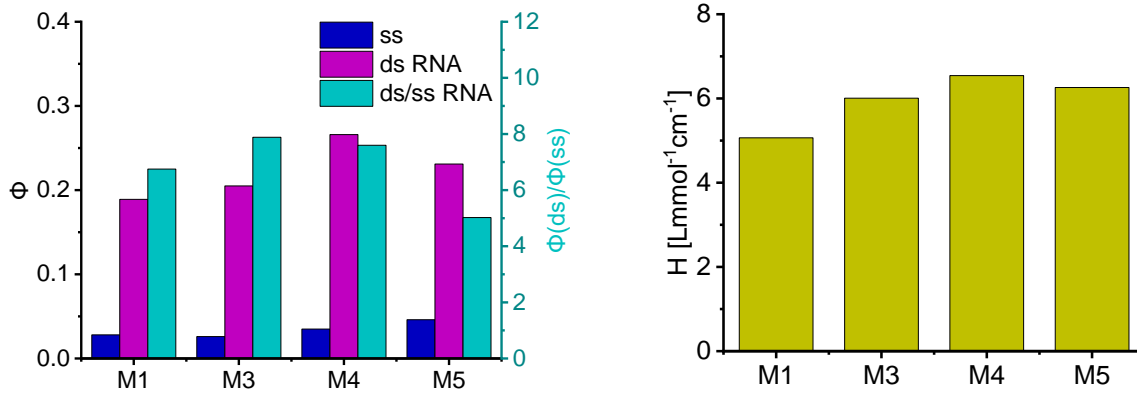


Abbildung 68: Rechts: Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ) des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit RNA (ds RNA) hybridisierten Sonden **DNA-M1+3-5** und der daraus resultierende Quotient (ds/ss RNA); Rechts: Helligkeit (H) der Sonden im DNA-RNA-Duplex; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 435 \text{ nm}$.

Auch bei der Hybridisierung mit RNA zeigen die vier untersuchten Sonden noch einen deutlichen *Light-Up* bei der Hybridisierung. Um zu untersuchen, wie sich die Sonden bei einer gleichzeitigen Hybridisierung an die mRNA verhalten, wurde aufgrund der fehlenden Zugänglichkeit der gesamten mRNA-Sequenz für *in vitro* Experimente ein RNA-Mix erstellt. Dieser besteht aus den vier Sequenzabschnitten der mRNA, die komplementär zu den Sonden sind (Abbildung 69). Die Sonden wurden in verschiedenen Kombinationen miteinander gemischt und als Mischung mit dem RNA-Mix hybridisiert. Im ersten Schritt wurde nur die Sonde **M1** mit dem RNA-Mix hybridisiert, danach wurde eine Mischung aus den Sonden **M1** und **M3** (**M1/3**) und schließlich auch die Mischungen **M1/3/4** und **M1/3/4/5** mit dem RNA-Mix hybridisiert und auf die photophysikalischen Eigenschaften untersucht. Die Konzentration des RNA-Mix wurde dabei konstant gehalten und die Sonden jeweils äquivalent zugegeben.

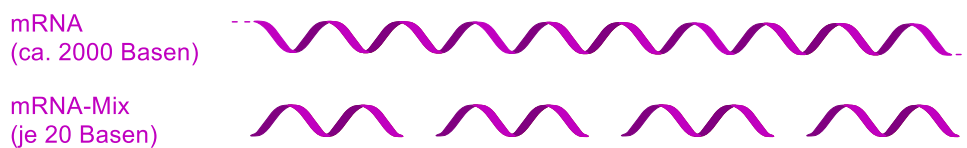


Abbildung 69: mRNA (oben) und die daraus resultierenden kurzen RNA-Sequenzen für den RNA-Mix.

In Abbildung 70 sind die Fluoreszenzquantenausbeuten, deren Anstieg bei der Hybridisierung und die Helligkeit des Fluorophors in den untersuchten Sondenmischungen dargestellt. Da die Fluoreszenzquantenausbeuten weitgehend unabhängig von der Konzentration des Fluorophors sind, steigen diese nicht mit der Anzahl verwendeter Sonden an. Stattdessen

ergibt sich eine gemittelte Quantenausbeute der gemischten Einzelsonden. Der *Light-Up* in der Fluoreszenzquantenausbeute liegt für die einzelne Sonde **M1**, welche mit dem RNA-Mix hybridisiert wurde, bei etwa 6. In Kombination mit der Sonde **M3** steigt der *Light-Up* auf 8 an. Die Kombination aus den Sonden **M1**, **M3** und **M4** zeigt denselben *Light-Up*, während die Kombination aus allen vier untersuchten Sonden noch einen *Light-Up* von etwa 7 zeigt. Die Helligkeit wiederum nimmt mit jeder zusätzlich an den RNA-Mix hybridisierten Sonde weiter zu.

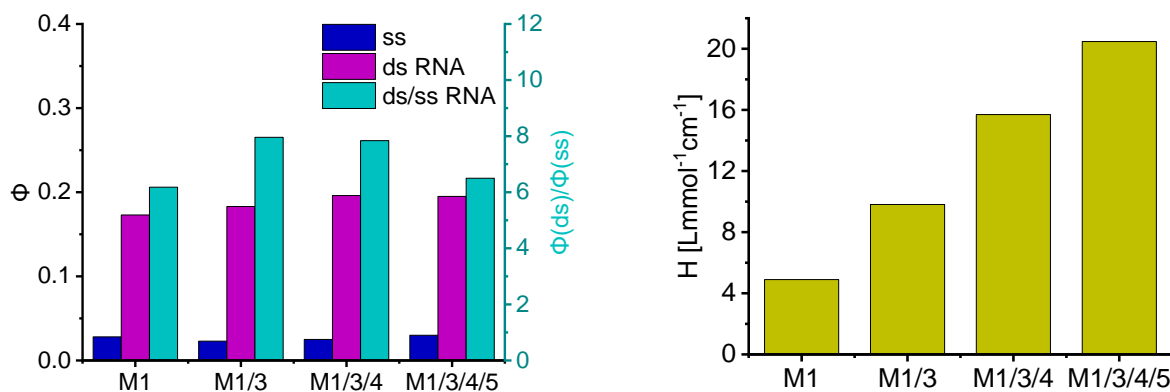


Abbildung 70: Rechts: Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ) des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten Sondenmischungen **M1**, **M1/3**, **M1/3/4**, **M1/3/4/5** (ss) und mit RNA-Mix (ds RNA) hybridisierten Sonden und der daraus resultierende Quotient (ds/ss RNA); Rechts: Helligkeit (H) der Sonden im DNA-RNA-Duplex; 2.5 μ M je **DNA-Sonde**, 1 \AA q **GS-Mix**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^{\circ}$ C, $\lambda_{exc.} = 435$ nm.

Durch die Kombination mehrerer Sonden konnte bei etwa gleichbleibendem *Light-Up* eine Erhöhung der Gesamthelligkeit des Signals erreicht werden. Somit war es möglich, mit Hilfe des entwickelten Sondenkonzeptes, einen Mix aus mehreren RNA-Sequenzen durch ein Aufleuchten der Sonden bei der Hybridisierung mit guter Helligkeit zu detektieren. Um die Helligkeit weiter zu steigern, könnten noch weitere Sonden für die Ziel-mRNA hergestellt und auf geeignete photophysikalische Eigenschaften hin untersucht werden. Dabei könnten auch Sonden untersucht werden, welche nicht unbedingt ein **TXT**-Motiv aufweisen. Außerdem könnten bei Bedarf auch weitere der untersuchten Sonden verwendet werden, um die Helligkeit auf Kosten des *Light-Up* weiter zu erhöhen.

5.4 Cy5 *mdka*-Sonden

In Rahmen eines Kooperationsprojektes mit LUISA LÜBKE aus der Arbeitsgruppe von DR. SEPAND RASTEGAR konnten DR. LARISSA DOLL und DR. FABIAN LANG aus der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT bereits FISH-Sonden für die mRNA von *sox9a* und *prdm12b* synthetisieren.^[168-169] Nun wurden ebenfalls analoge Sonden für die Detektion der mRNA von *mdka* synthetisiert. Bei dem verwendeten Sondenkonzept hybridisieren 36 einfach markierter Sonden an ein mRNA-Molekül (Abbildung 71). Die Sonden wurden so gewählt, dass die erste Sonde beginnend am Startcodon (ATG) hybridisiert, dass der GC-Gehalt möglichst unter 50 % liegt und mindestens zehn Nukleotide in der Sequenz der mRNA zwischen den einzelnen Sonden liegen. Außerdem wurden Abschnitte auf der mRNA, welche große Ähnlichkeit zu verwandten mRNAs aufweisen, ausgespart. Jede Sonde besteht aus 20 Nukleotiden, wobei jeweils ein mittig liegendes Thymidin durch ein 2'-*O*-Propargyluridin **cU** ausgetauscht wurde. Die 36 Stränge wurden unter Verwendung der kommerziell erhältlichen 2'-*O*-Propargyluridin-Phosphoramidits mittels Phosphoramidit-Festphasensynthese synthetisiert. Zur Vereinfachung der postsynthetischen Modifikation wurden je 20 nmol jeder Sonde zu einem Sonden-Mix vereinigt und gleichzeitig über eine CuAAC mit dem rotfluoreszierenden Fluorophorazid **Cy5** gekuppelt.

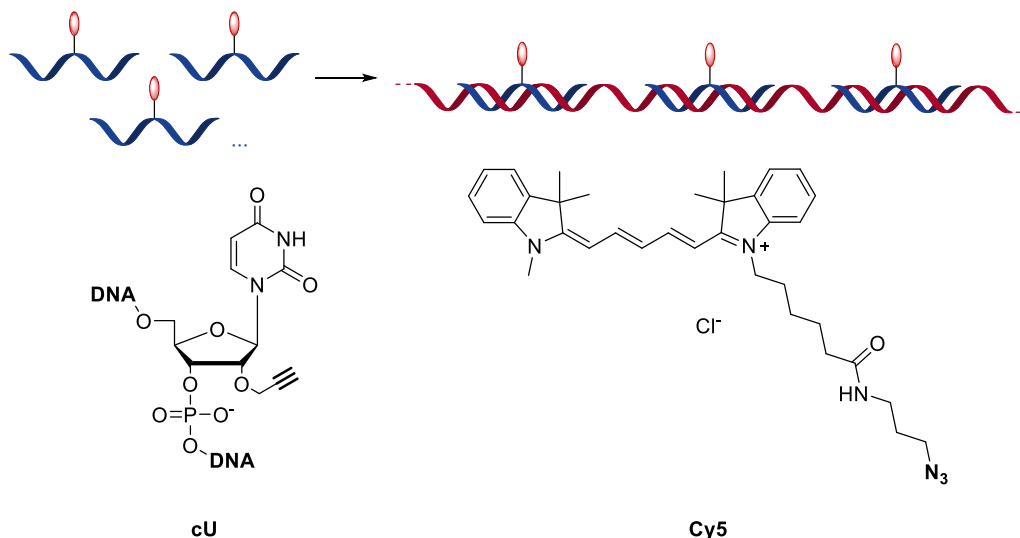


Abbildung 71: Hybridisierung der 36 Sonden an das mRNA Molekül *mdka* unter Verwendung von **cU** anstelle eines mittig liegenden Thymidins, welches über eine CuAAC mit dem Fluorophor **Cy5** gekuppelt wurde.

Der Sondenmix wurde über RP-HPLC aufgereinigt, wobei alle Fraktionen mit einer Absorption im DNA und Fluorophorbereich gesammelt und vereinigt wurden. Die so erhaltenen Sonden wurden anschließend von LUISA LÜBKE in FISH Experimenten zur Detektion der *mdka* mRNA in Schnitten des Telencephalons von 8-12 Monate alten Wildtyp-Zebrafischen als Fluoreszenzmarker verwendet. Zum Vergleich wurde die mRNA ebenfalls in ISH-Experimenten^[170] angefärbt, wobei eine Blaufärbung die Expression der mRNA anzeigt. Die FISH-Sonden wurden bei 633 nm angeregt und die Emission wurde mit Hilfe eines Konfokalmikroskops im Emissionsbereich des Fluorophors bei 650-740 nm gemessen. In Abbildung 72 sind Aufnahmen der ISH- und FISH-Experimente an einem unverletzten Gehirn gezeigt. Dabei zeigt das ISH-Experiment eine leichte Anfärbung der Randbereiche sowie in der ventrikulären Zone zwischen den beiden Hemisphären, wo die mRNA exprimiert wird. Im FISH-Experiment ist in der ventrikulären Zone ebenfalls eine leichte Anfärbung zu erkennen sowie im unteren Randbereich.

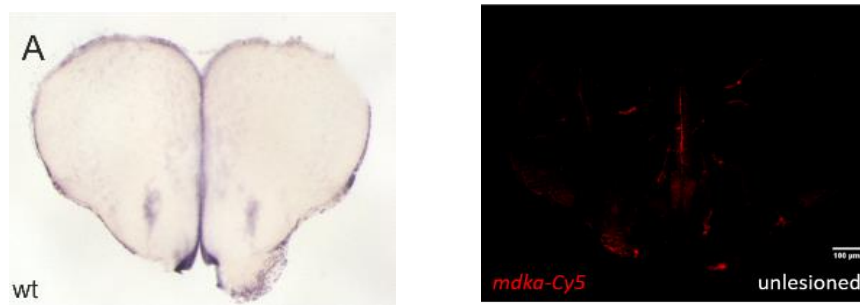


Abbildung 72: Stereomikroskop- und Konfokalmikroskopaufnahmen der ISH- (links) und FISH- (rechts) Experimente am unverletzten Gehirn eines Zebrafisches zur Detektion der mRNA *mdka*; $\lambda_{exc.} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 650-740 \text{ nm}$.

Im unverletzten Zustand wird die mRNA im Gehirn nur schwach exprimiert, daher sind in den ISH- und FISH-Experimenten auch nur leichte Signale zu beobachten. Im Folgenden wurde dem Gehirn des Zebrafisches in einer Hemisphäre eine Stichwunde zugefügt, während die andere Hemisphäre als Kontrolle dient. Nach 1, 3 und 5 Tagen wurde das Hirngewebe je eines verletzten Zebrafisches in einem FISH-Experiment untersucht (Abbildung 73). Im ISH-Experiment ist einen Tag nach der Verletzung kein erhöhtes Signal festzustellen, nach 3 Tagen kommt es in der verletzten Hemisphäre zu einer starken Anfärbung, welche nach 5 Tagen wieder etwas zurückgeht und nur noch im Randbereich etwas verstärkt auftritt. Im FISH-Experiment ist einen Tag nach der Verletzung im oberen Randbereich der verletzten

Hemisphäre ein leichtes Signal zu erkennen. 3 Tage nach der Verletzung kommt es zu einem deutlichen Signal im Randbereich der verletzten Hemisphäre sowie im unteren Bereich zwischen den beiden Hemisphären. 5 Tage nach der Verletzung ist kaum noch ein Signal zu erkennen.

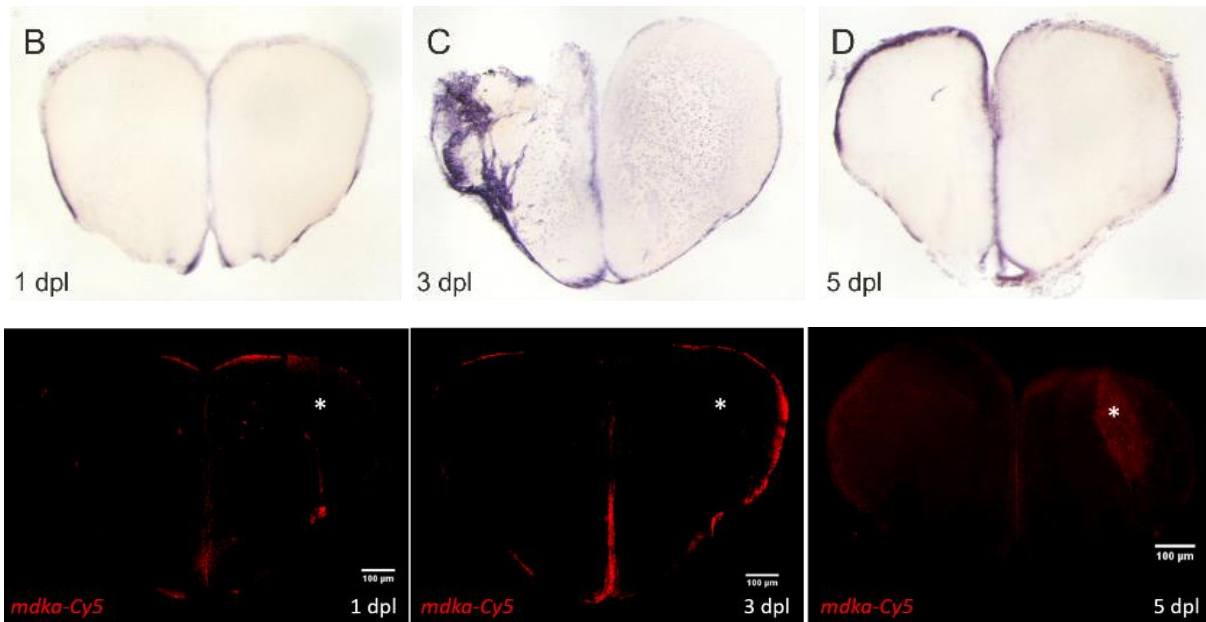


Abbildung 73: Stereomikroskop- und Konfokalmikroskopaufnahmen der ISH- (oben) und FISH- (unten) Experimente am verletzten Gehirn eines Zebrafisches nach 1 (links), 3 (mitte) und 5 (rechts) Tagen zur Detektion der mRNA *mdka*. Die Position der Stichwunde wurde in den FISH-Experimenten mit einem weißen Stern markiert; $\lambda_{exc.} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 650-740 \text{ nm}$.

Durch die Verletzung wird die Expression der mRNA vorübergehend erhöht und es kommt zu einem verstärkten Sondensignal, welches nach 3 Tagen seinen Höhepunkt erreicht. Nach 5 Tagen wird die Expression wieder zurückgefahren und das Signal wird wieder schwächer. Die mRNA des *mdka* konnte somit erfolgreich markiert und über einen Zeitraum von 5 Tagen nach einer Stichverletzung des Gehirns eines Zebrafisches beobachtet werden. Dabei konnten eine Erhöhung der Genexpression und anschließend wieder eine Verminderung dieser festgestellt werden. Die Verwendung von hybridisierungssensitiven Sonden könnte in Zukunft eine Markierung der mRNA *in vivo* ermöglichen, wodurch eine kontinuierliche Beobachtung der Genexpression über den gesamten Zeitraum mit guter räumlicher Auflösung möglich wäre.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Der entwickelte kurze Alkinlinker konnte in Kombination mit dem Fluorophor **IV1** in *Binary-Probes* dazu verwendet werden, Nukleinsäuren durch einen Wechsel in der Emissionswellenlänge anzuzeigen. Dabei konnte die Hintergrundstrahlung durch die hybridisierungssensitiven Eigenschaften im Vergleich zu herkömmlichen *Binary-Probes* deutlich verringert werden. So konnte im vollständig hybridisierten Zustand eine bis zu 200-fach höhere Fluoreszenzintensität im Bereich der Akzeptoremission beobachtet werden als bei der unhybridisierten Donorsonde und eine 20-fach höhere Fluoreszenzintensität als bei der Akzeptorsonde. Auch in diesem System ist durch den verwendeten Alkinlinker eine modulare postsynthetische Markierung der Sonden möglich, wodurch der Zugang und die Untersuchung für weitere Fluorophore deutlich vereinfacht wird.

Außerdem konnte der Alkinlinker in Kombination mit dem Fluorophor **IV1** und Nitroindol für die Markierung von Nukleinsäuren in *Light-Up* Sonden verwendet werden. Dabei konnte ein bis zu 21-facher *Light-Up* bei der Hybridisierung erreicht werden. Basierend auf diesem System konnten auch mehrere mögliche Sonden für die Detektion der mRNA *mdka* entwickelt und getestet werden. Wobei die Hybridisierung mehrerer Sonden zu einer erhöhten Helligkeit und einem *Light-Up* von bis zu 8 führte. In einem anderen System konnte unter Verwendung von **Cy5**-Sonden ebenfalls die mRNA des Gens *mdka* detektiert werden. Dabei konnte in FISH-Experimenten die Genexpression der mRNA im Gehirn von Zebrafischen nach einer Stichverletzung verfolgt werden.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass der entwickelte Alkinlinker nicht nur eine hohe Modularität besitzt und eine Hybridisierungssensitivität von Fluorophoren erlaubt, sondern dass er auch vielseitig in unterschiedlichen Konzepten für hybridisierungssensitive Sonden einsetzbar ist. Es könnten auch noch weitere Anwendungen gefunden werden, in denen der Alkinlinker durch seine geringe Größe und Modularität viele Vorteile mit sich bringen kann. So könnte der Linker für genug Flexibilität im Nukleinsäurerückgrat sorgen, um durch eine enge Anbindung von Perylen Sonden nach dem Prinzip der *linear probes* zu ermöglichen.^[120] Außerdem könnten dank der Modularität bei jeder Anwendung noch weitere Fluorophore auf ihre

Eignung untersucht werden. Die Verwendung von optimierten hybridisierungssensitiven Sonden bei der Markierung der *mdka* mRNA könnte dazu führen, dass die FISH-Experimente ohne Waschschrift auskommen oder sogar *in vivo* durchgeführt werden können.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung der kurzen modularen Alkinlinker **S** und **R** für die postsynthetische Modifikation von Nucleinsäuren. Dadurch kann bei umgebungssensitiven Fluorophoren die Wechselwirkung mit den umliegenden Nucleotiden im hybridisierten und unhybridisierten Zustand kontrolliert werden. Der Alkinlinker wurde sowohl in **S**- als auch in **R**-Konfiguration erfolgreich als Phosphonat für die Oligonucleotid-Festphasensynthese hergestellt, genau wie mehrere azidmodifizierte Fluorophore als Kupplungspartner in der postsynthetischen Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition. Dabei konnten sowohl der Alkinlinker als auch die Fluorophore in wenigen Stufen und mit guten Ausbeuten erhalten werden.

Mit in der Nucleinsäure benachbarten Thyminen und einem im Nucleinsäureduplex gegenüberliegenden Adenosin führte die Hybridisierung zu einem 9-fachen *Light-Up* des Fluorophors. Die Anbindung des Fluorophors über einen Ethyllinker am Pyridinstickstoff des Indolvinylfluorophors und über die **S**-Konfiguration des Alkinlinkers führte zur höchsten Hybridisierungssensitivität und Helligkeit. Der in hybridisierungssensitiven Sonden oft verwendeten Fluorophor Thiazolorange zeigte im Vergleich dazu keine Hybridisierungssensitivität.

In *Binary-Probes* konnte der an den Alkinlinker geknüpfte Indolvinylfluorophor durch seine Hybridisierungssensitivität die Hintergrundstrahlung deutlich reduzieren. Dadurch konnte bei der Hybridisierung der Sonden an eine Zielsequenz ein bis zu 200-facher Anstieg in der Fluoreszenzintensität im Bereich der Akzeptoremission im Vergleich zur unhybridisierten Donorsonde erreicht werden. In Kombination mit Nitroindol gelang es, die Emission des Indolvinylfluorophors im unhybridisierten Zustand weiter zu verringern, wodurch der *Light-Up* bei der Hybridisierung mit einer komplementären Nucleinsäure auf 21 gesteigert werden konnte.

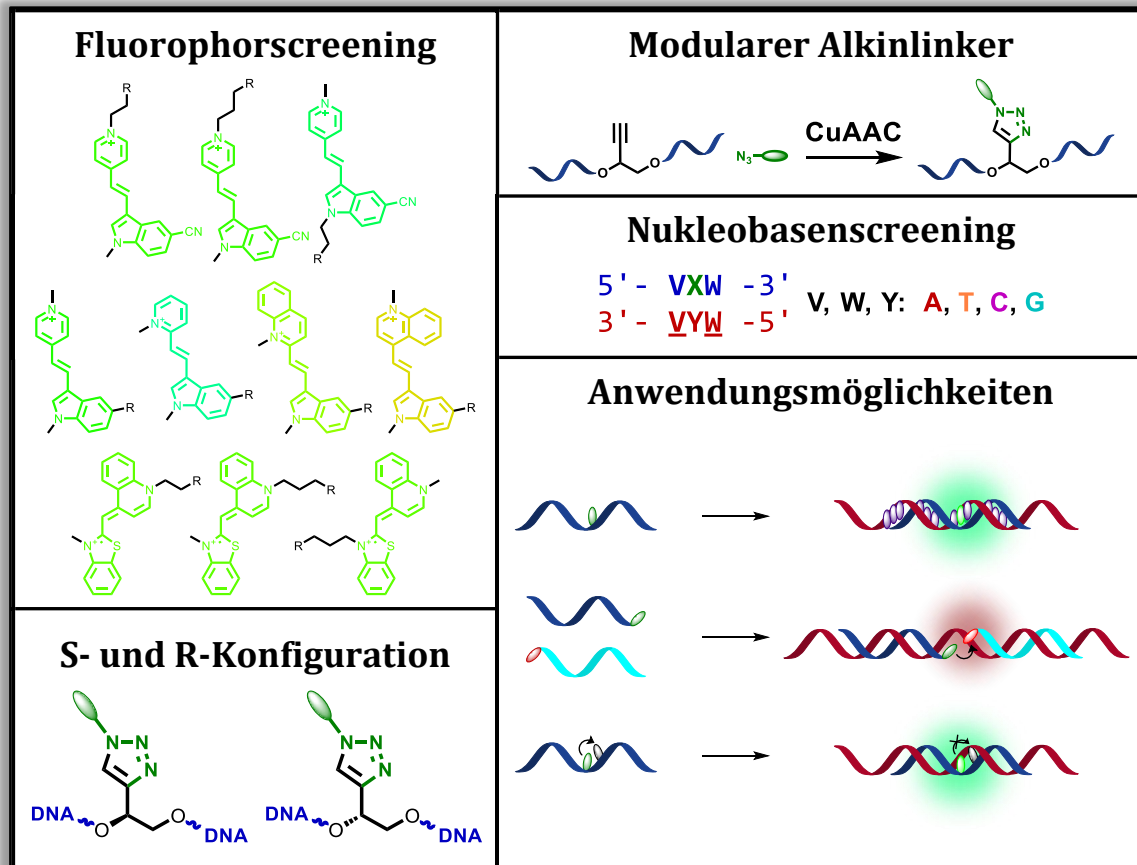


Abbildung 74: Zusammenfassende Darstellung über die Charakterisierung und Anwendung des entwickelten Alkinlinkers.

Basierend auf diesem System konnten auch spezifische Sonden für die mRNA *mdka* entwickelt werden, welche in einem Modellversuch einen 8-fachen *Light-Up* bei der Hybridisierung zeigten. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes wurden auch **Cy5**-basierte Sonden für diese mRNA entwickelt, um damit in FISH-Experimenten die Expression der mRNA während der Heilung einer Stichverletzung im Gehirn von Zebrafischen zu verfolgen.

Durch die Modularität des entwickelten Alkinlinkers konnten verschiedene Fluorophore in Nukleinsäuren eingebracht werden, ohne jeden Fluorophor separat als Phosphoramidit synthetisieren zu müssen. Die enge Anbindung des Fluorophors an die Nukleinsäure durch den Linker ermöglicht es umgebungssensitiven Fluorophoren sensibel auf eine Hybridisierung zu reagieren und diese in einem optischen Signal anzuzeigen. Zukünftig könnten so auch weitere azidmodifizierte Fluorophore auf mögliche Anwendungen in hybridisierungssensitiven Sonden getestet werden.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien, Methoden und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die für die Synthese verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen ABCR, ACROS ORGANICS (THERMOFISCHER SCIENTIFIC), ALFA AESAR, APOLLO SCIENTIFIC, BIOSYNTH CARBOSYNTH, CARL ROTH, LUMIPROBE, MERCK, SIGMA ALDRICH (MERCK), TCI und VWR bezogen. Dabei wurde mindestens die Qualitätsstufe „zur Synthese“ verwendet. Alle Reagenzien wurden bedarfsgerecht gelagert. Wasser wurde aus einer MERCK *Mili-Q Direct 8* Entsalzungsanlage erhalten.

Reaktionsführung

Die luft- und wasserempfindlichen Reaktionen wurden unter Argonatmosphäre (99.999 % Reinheit) der Firma *Alphagaz* durchgeführt. Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurden über folgende Kältemischungen erreicht: Isopropanol/Trockeneis (-78 °C), Wasser/Eis (0 °C), Eis/NaCl (-20 °C).

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die DC wurden mit 60 F₂₅₄ Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten mit einer Schichtdicke von 0.25 mm der Firma MERCK durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über eine Anfärbung mit Kaliumpermanganat- oder schwefelsaurer Methanol-Tauchlösung.

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma SIGMA-ALDRICH mit einer Korngröße von 40-63 µm als stationäre Phase durchgeführt. Die Auftragung erfolgte entweder durch Lösen der zu reinigenden Substanz im Laufmittel oder durch Adsorption an der stationären Phase. Während der Auftrennung wurde mittels einer Handpumpe ein Überdruck erzeugt.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Messungen zur Analyse der hergestellten Substanzen erfolgte an einem *Bruker Advance 400* (400 MHz ¹H-NMR, 101 MHz ¹³C-NMR) oder *Bruker Advance 500* (500 MHz ¹H-

NMR, 126 MHz ^{13}C -NMR). Dabei wurde die Substanz in ca. 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel der Firma EURISOTOP gelöst und in Probenröhrchen mit 5 mm Durchmesser gemessen. Die chemische Verschiebung δ wurde in *parts per million* (ppm) und relativ zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben. Zur Kalibrierung wurden folgende Signale, der unvollständig deuterierten Lösungsmittel verwendet:

CDCl_3 : ^1H -NMR: $\delta = 7.26$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 77.16$ ppm

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

MeOD- d_4 : ^1H -NMR: $\delta = 3.31$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 49.00$ ppm

Die Kopplungskonstante J wurde in Hz angegeben und für die Beschreibung der Multiplizität wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Pentett) und m (Multipllett).

Massenspektrometrie (ESI)

Die hochauflösenden Massenspektren wurden an einem *Q Exactive* der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC mit *electron spray ionisation* (ESI) aufgenommen. Die Signale wurden im Masse/Ladungsverhältnis (m/z) angegeben und das Molekülion als $[\text{M}^+]$ oder in protonierter Form als $[\text{MH}^+]$ dargestellt.

Optische Spektroskopie

Die optische Charakterisierung erfolgte in Quarzglasröhrchen der Firma STARNA (Schichtdicke 1 cm, Probenvolumen 1 mL) bei einer Temperatur von 20 °C. Dabei wurden alle Spektren mithilfe des jeweiligen Lösungsmittels basislinienkorrigiert.

UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren wurden an einem *Cary 100 Bio* Spektrometer der Firma VARIAN mit Temperaturregler (*Cary 100 Temperature Controller*) unter Verwendung der Software *Cary WinUV Scan Application* aufgenommen (Durchschnittszeit 0.1 s, Datenintervall 1.0 nm, Scangeschwindigkeit 600 nm/min, Lampenwechsel bei 350 nm). Bei Schmelzpunktmessungen von Oligonukleotiden wurde die Absorption bei 260 nm in einem Temperaturbereich von

10 – 90 °C (Heiz- bzw. Kühlrate 0.7 °C/min, Datenintervall 0.5 °C) unter Verwendung der Software *Thermal* gemessen.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-3* oder *Fluoromax-4* Spektrofluorometer der Firma HORIBA-SCIENTIFIC mit *LFI-3751* Peltier-Element von *Wavelength Electronics* bzw. mit *AC 2000* Thermostat von THERMOFISHER SCIENTIFIC unter Verwendung der Software *Fluorescence V3.5* aufgenommen (Integrationszeit 0.1 s, Schrittweite 1.0 nm, Inkrementzeit 0.2 s). Die Belichtungsspaltbreiten wurden der jeweiligen Probe angepasst. Die in dieser Arbeit direkt miteinander verglichenen Spektren wurden immer am selben Gerät und unter Verwendung derselben Parameter gemessen.

Fluoreszenzquantenausbeuten

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

7.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid Festphasensynthese

Die Synthese der Oligonukleotide wurde unter Argonatmosphäre an einem *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE durchgeführt. Dabei wurde *Controlled Pore Glass* (CPG) als feste Phase mit einer Belegung von 1 μmol (500 Å) verwendet. Die dafür benötigten Reagenzien, Phosphoramidite und CPG-Säulchen wurden von den Firmen CHEMGENES, GLENRESEARCH (EUROGENTEC) und SIGMA ALDRICH bezogen. Die kommerziell erworbenen Phosphoramidite wurden für die Synthese in MeCN gelöst (Phosphoramidite der natürlichen Nukleotide 0.067 M, Phosphoramidite von **cU** und Nitroindol 0.1 M). Die Phosphonate wurden in MeCN/Pyr 1:1 (0.13 M) gelöst. Die Synthese erfolgte für eine vereinfachte spätere Aufreinigung im Modus DMTr-on.

Die Phosphonate wurden innerhalb des Standardkupplungsprotokolls mit angepassten Teilschritten verwendet. Die dafür benötigten Reagenzien wurden unter Argonatmosphäre in

den benötigten Konzentrationen hergestellt. Als Aktivator wurde Adamantoylcarbonylchlorid in MeCN/Pyr 1:1 (0.17 M; 102 mg in 3 mL) gelöst. Als Oxidationslösung wurden 4 % I₂ in THF/Pyr/H₂O 8:1:1 (734 mg, 16 mL THF, 2 mL Pyr, 2 mL H₂O) gelöst. Als Co-Oxidationslösung wurde Et₃N/THF/H₂O 8:1:1 verwendet.

Alle unmodifizierten Oligonukleotide, sowie die **ATTO590** und **DY-350** modifizierten Oligonukleotide wurden über HPLC gereinigt von den Firmen METABION und BIOMERS bezogen.

Kupplungsprotokolle

Die Syntheseyklen erfolgten nach dem in Tabelle 1 dargestellten Standardkupplungsprotokoll, welches je nach Bedarf über die verwendete *Branch* angepasst wurde. Dabei wurden folgende Abkürzungen verwendet:

TCA (Trichloressigsäure), **COL** (CPG-Säule), **TRM** (Tritylmonitor), **GAS** (Argon), **ACN** (Acetonitril), **M_W** (Lösungsmittelabfall), **OXI** (Standardoxidationslösung für Phosphoramidite), **WTH** (Wartezeit), **TET** (Tetrazolaktivator für Phosphoramidite), **AMD** (jeweiliges Phosphoramidit bzw. Phosphonat), **CP_A** und **CP_B** (*Capping* Reagenzien), **_L_** (Adamantoylcarbonylchloridaktivator für Phosphonate), **_U_** (Oxidationslösung für Phosphonate), **_I_** (Co-Oxidationslösung für Phosphonate).

Tabelle 1: Standardkupplungsprotokoll.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S. Col. Ptr.	Totzeit [s]	Branch
Entschützung							
1	4	TCA		COL			
2	30	TCA		TRM	ON		
3					ON		
4						15	
5	20	TCA		TRM	ON		
6					ON		
7						15	
8	20	TCA		TRM	ON		
9					ON		
10						15	
11	20	TCA		TRM	ON		
12					ON		
13						15	

14	20	TCA	TRM	ON		
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		
Kupplung						
1	15	GAS	COL			
2					1	1
3	10	ACN	M_W		50	
4	10	ACN	COL	ON		
5				ON		
6	35	GAS	COL			
7	20	GAS	M_W			
Capping						
1	2	GAS	COL			
2					1	2
3	2	GAS	COL		1	
Oxidation						
1	20	OXI	COL	ON		
2				ON		
3	10	ACN	M_W		9	
4					9	
5		WTH			150	
6		WTH			150	
7	30	GAS	COL			
8	2	ACN	M_W			
9	16	ACN	COL	ON		
10				ON		
11	20					
12	30	GAS	COL			
13	2	ACN	M_W			
14	15	ACN	COL	ON		
15				ON		
16	40					

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

Für die Phosphoramidite der natürlichen Nukleotide wurde bei der Kupplung die in Tabelle 2 gezeigte *Branch* verwendet.

Tabelle 2: *Branch* für die Kupplung der Phosphoramidite der natürlichen Nukleotide.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S. Col. Ptr.	Totzeit [s]	Branch
Branch-Kupplung							
1	4	TET		COL	ON		
2	8	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						24	
5	8	AMD	TET	COL	ON		
6					ON		
7						24	
8	10	ACN		M_W			
9	10	GAS		M_W			

Beim *Capping* wurde für alle Phosphoramidite die in Tabelle 3 gezeigte *Branch* verwendet.

Tabelle 3: *Branch* für das *Capping* aller Phosphoramidite.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S. Col. Ptr.	Totzeit [s]	Branch
Branch-Capping							
1	20	CP_A	CP_B	COL	ON		
2					ON		
3						15	
4	3	CP_A	CP_B	COL	ON		
5					ON		
6						15	
7	20	GAS		COL			
8	2	ACN		M_W			
9	12	ACN		COL	ON		
10					ON		
11	10	GAS		M_W		2	
12	30	GAS		COL			

Für die Phosphoramidite von **cU** und Nitroindol wurde bei der Kupplung die in Tabelle 4 gezeigte *Branch* verwendet.

Tabelle 4: *Branch* für die Kupplung der Phosphoramidite con **cU** und Nitroindol.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S. Col. Ptr.	Totzeit [s]	Branch
Branch-Kupplung							
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	4	TET		COL	ON		
11					ON		
12	20	ACN		M_W			
13	20	GAS		M_W			

Für die Phosphonate wurden die in Tabelle 5 dargestellten *Branches* bei Kupplung und *Capping* verwendet, wobei die *Branch* für das *Capping* einen alternativen Oxidationsschritt für das Phosphonat vor dem eigentlichen *Capping* enthält.

Tabelle 5: *Branches* für die Kupplung und das *Capping* der Phosphonate.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S. Col. Ptr.	Totzeit [s]	Branch
Branch-Kupplung							
1	4	_L_		COL	ON		
2	8	AMD	_L_	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6						99	
7						99	
8						99	
9						99	
10						99	
11	8	AMD	_L_	COL	ON		
12					ON		

13						99
14						99
15						99
16						99
17						99
18						99
19						99
20	5	_L_		COL	ON	
21					ON	
22	20	ACN		COL	ON	
23					ON	
24	20	ACN		M_W		
25	20	GAS		M_W		
Branch-Capping						
1	20	GAS		COL		
2	20	_U_		COL		99
3						99
4						99
5	10	ACN		M_W		
6	10	GAS		M_W		
7	20	ACN		COL		
8	20	GAS		COL		
9	40	_U_	_I_	COL		99
10						99
11	10	ACN		M_W		
12	10	GAS		M_W		
13	20	ACN		COL		
14	20	CP_A	CP_B	COL	ON	
15					ON	
16						15
17	3	CP_A	CP_B	COL	ON	
18					ON	
19						15
20	20	GAS		COL		
21	2	ACN		M_W		
22	12	ACN		COL	ON	
23					ON	
24	10	GAS		M_W		2
25	30	GAS		COL		

Abspaltung

Im Anschluss zur Oligonuklotidsynthese wurden zunächst die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet. Um das Oligonukleotid von den Schutzgruppen und der festen Phase abzuspalten, wurde diese in ein EPPENDORF-Gefäß mit *Safe-Lock-Deckel* überführt und mit 700 µL Ammoniumhydroxidlösung (>25%, *trace select, Fluka*) versetzt und über Nacht bei 55 °C erhitzt. Anschließend wurde auf RT abgekühlt und in einem Vakuumkonzentrator *Alpha RVC* der Firma CHRIST vom Ammoniak (30 min, 34 °C, 100 mbar) befreit. Daraufhin wurde die überstehende Lösung in ein weiteres EPPENDORF-Gefäß abpipettiert und das CPG noch dreimal mit je 200 µL Wasser gewaschen.

Voraufreinigung

Nach der Abspaltung wurden die DMTr-on synthetisierten Oligonukleotide über DMTr-Affinitätssäulen *Glen-Pak™ DNA Purification Cartridges* der Firma GLEN RESEARCH aufgereinigt. Dafür wurde die Säule über 1 mL Spritzen der Firma BRAUN mit einer Tropfrate von etwa 1-2 Tropfen/s zunächst mit 0.5 mL MeCN und anschließend mit 1.0 mL 2 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 7) äquilibriert. Das zuvor erhaltene Oligonukleotid, welches nach der Abspaltung in etwa 1 mL Wasser gelöst vorliegt, wurde noch mit 1.0 mL NaCl-Lösung (100 mg/mL) versetzt und danach auf die Säule gegeben. Anschließend wurde das Oligonukleotid auf der Säule zweimal mit 1.0 mL einer Salzwashlösung (100 mg/mL NaCl-Lösung mit 5% MeCN) gewaschen, um vorhandene Abbruchstränge zu entfernen. Durch Zugabe von zweimal 1.0 mL TFA-Lösung (2 % in Wasser) wurde die DMTr-Gruppe abgespalten und mit zweimal 1.0 mL Wasser wurden die Säure- und Salzreste entfernt. Das aufgereinigte Oligonukleotid wurde mit 1.5 mL Elutionslösung (0.5 % Ammoniumhydroxid in MeCN/Wasser 1:1) von der Säule gespült und anschließend im Vakuumkonzentrator zur Trockene eingedampft (über Nacht, 25 °C, 0.1 mbar).

Postsynthetische CuAAC-Reaktion

Um die azidmodifizierten Fluorophore mit dem Alkinlinker oder **cU** in einer Nukleinsäure zu verknüpfen, wurde das vorgereinigte Oligonukleotid in 50 µL Wasser gelöst und mit 114 µL Fluorophorazid-Lösung (10 mM in DMSO/^tBuOH 3:1), 25 µL Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser) und einem Gemisch aus 34 µL TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/^tBuOH 3:1) und 17

μL Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/ $t\text{BuOH}$ 3:1) versetzt. Die Mischungen mit Indolvinylfluorophoren und **Cy5** wurden anschließend für 2 h auf 60 °C erhitzt und in Abständen von etwa 30 min durchmischt. Die Mischungen mit den Thiazolorangefluorophoren wurden über Nacht auf einem Schüttler bei RT durchmischt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in ein Falcon überführt und 150 μL Na_2EDTA -Lösung (40 mM in Wasser) und 450 μL Natriumacetat-Lösung (300 mM in Wasser) zugegeben. Zur Fällung der Oligonukleotide wurde die Lösung anschließen mit EtOH (100 %) auf 10 mL aufgestockt und über Nacht bei -32 °C gelagert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min), zweimal mit Ethanol (80 %) gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um die modifizierten von den unmodifizierten Oligonukleotiden zu trennen und restliche Abbruchstränge sowie Fluorophorreste zu entfernen wurde eine Trennung über semipräparative RP-HPLC durchgeführt. Die Trennung erfolgte an einer *Dionex Ultimate3000* mit Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, RS Fluoreszenzdetektor und Fraktionssammler der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC unter Verwendung der Software *Chromeleon 7*. Zur semi-präparativen Trennung wurde eine *VDSphere OptiBio PUR 300 C18-SE*-Säule (250 x 10 mm, 5 μm) der Firma VDS OPTILAB mit einer Flussrate von 2.5-3.5 mL/min bei einer Temperatur von 40 °C verwendet. Dabei diente ein Gradient aus 0-10 % Acetonitril über 40 min mit anschließendem Plateau bei 10 % für 15 min in 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH = 6.5) als mobile Phase. Das modifizierte Oligonukleotid wurde in 300 μL Wasser aufgenommen und über den Autosampler injiziert. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und der charakteristischen Absorptionswellenlänge des jeweiligen Fluorophors konnte das Oligonukleotid detektiert und fraktionsweise gesammelt werden.

Für eine analytische Trennung wurde eine *VDSphere OptiBio PUR 300 C18-SE*-Säule (250 x 4.6 mm, 5 μm) mit einer Flussrate von 1.0 mL/min verwendet.

Massenspektrometrie (MALDI)

Um die Reinheit der gesammelten Fraktionen zu überprüfen, wurden diese zur Trockene eingedampft und anschließend in 50 µL Wasser aufgenommen. Danach wurden sie mittels Matrix assistierter Laser Desorption Ionisierung mit Flugzeitbestimmung (MALDI-TOF) Massenspektrometrie analysiert und alle reinen Fraktionen vereinigt. Die Messungen erfolgten dabei an einem *Axima Confidence* Spektrometer der Firma SHIMADZU mit 3-Hydroxypicolinsäure (gesättigte Lösung in MeCN/Wasser 1:1)/ Diammoniumhydrogencitrat (0.44 M in Wasser) 9:1 als Matrix.

Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide

Die Konzentration der vereinigten Fraktionen des modifizierten Oligonukleotids wurden über die Absorption an einem *NS-1000 Spektrophotometer* der Firma NANODROP im Nucleinsäuremodus bestimmt. Dabei ergibt sich die Konzentration aus dem LAMBERT-BEER-Gesetz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten des Oligonukleotids ϵ bei 260 nm. Dieser ergibt sich unter Berücksichtigung der Wechselwirkung der benachbarten Nucleotide im Oligonukleotid nach folgender Formel:

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

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient bei 260 nm (siehe Tabelle 6)

X: Anzahl der Nucleotide (A, T, C, G) bzw. der Fluorophormodifikationen (F) im Oligonukleotid

Tabelle 6: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Nucleotide bzw. Fluorophore bei 260 nm.

Nucleotid bzw. Fluorophor	ϵ_{260} [Lmol ⁻¹ cm ⁻¹]
A	15 400
T	8 800
C	7 300
G	11 700
IV1-3	18 900
IV4-7	23 800
TO1-3	9 400
NI	16 000
cU	10 100
Cy5	10 000

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde das modifizierte Oligonukleotid (2.5 μM) zusammen mit 1.00 $\text{\AA}q$ der entsprechenden komplementären Nukleinsäuren in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP_i , pH 7) und 250 mM NaCl-Lösung für 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

ISH- und FISH-Experimente

Die Experimente und die dafür nötige Präparation der Zebrafisch-Gehirnschnitte wurden von LUISA LÜBCKE durchgeführt. Dabei wurden 8-12 Monate alte AB Wildtyp Zebrafische verwendet. Um die Stichwunden zu verursachen, wurde kurz nach der Betäubung der Fische mit Tricain eine Spritzennadel in die linke Hemisphäre eingeführt, während die rechte Hemisphäre als Kontrolle unverletzt blieb.

Für die ISH-Experimente wurden DIG-Sonden über Nacht mit dem Gehirngewebe bei 68 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 μm dicke Querschnitte durch Schneiden des in Agarose eingebetteten Gehirns mit einem *Vibratom VT1000s* der Firma LEICA erhalten und für 1 h in Blockierungspuffer (1x PBS, 0.1 % Tween-20, 0.2 % BSA, 1% DMSO) inkubiert. Danach wurden sekundäre DIG-Antikörper *Anti-DIG-AP* der Firma ROCHE in Blockierungspuffer zugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung mit NBT/BCIP (3.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Färbepuffer) in Färbepuffer (100 mM Tris, 50 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, pH 9.5) der Firma ROCHE bevor die Gehirnschnitte auf Glasobjektträgern *Aqua-Poly/Mount* (Kat.-Nr. 18606-20) der Firma POLYSCIENCE mit Deckgläsern einer Dicke von 0.13-0.16 mm montiert wurden. Die Bilder wurden mit einem Stereomikroskop *MZ16 F* der Firma LEICA aufgenommen.

Für die FISH-Experimente wurden die Querschnitte wie oben beschrieben erhalten und sofort mit Hybridisierungslösung (10 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 0.02 % BSA, 50 μg tRNA, 2x SSC) gewaschen. Nach 3-4 h Vorhybridisierung wurden die Sonden in einer 1:6 Verdünnung in Hybridisierungslösung zugegeben und über Nacht bei 72 °C inkubiert. Danach wurden die Gehirnschnitte mit Waschlösung (10 % Formamid, 2x SSC, 0.1 % Tween-20) bei 72 °C gewaschen. Die Gehirnschnitte wurden auf Glasobjektträgern *Aqua-Poly/Mount* (Kat.-Nr. 18606-20) der Firma POLYSCIENCE mit Deckgläsern einer Dicke von 0.17 mm montiert und unter

einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP5 der Firma LEICA untersucht. Fluoreszenzbilder für rote Kanäle wurden sequentiell mit 16-Bit Farbtiefe und einer Anregungswellenlänge von 633 nm, sowie einer Emissionswellenlänge von 650-740 nm aufgenommen. Die Pixelauflösung für die XY- und Z-Ebene beträgt dabei 0.24 bzw. 0.50 μm .

7.3 Charakterisierung der Oligonukleotide

Tabelle 7: Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide. Werte in Klammern geben den Schmelzpunkt im DNA-RNA-Duplex an. Die Retentionszeiten beziehen sich auf die Auftrennung mit der analytischen HPLC-Säule mit einem Gradienten von 0-20 % MeCN bei 40 °C und einer Flussrate von 1 mL/min.

Oligonukleotid	Modifikation X	ϵ_{260} [Lmol ⁻¹ cm ⁻¹]	Smp [°C]	Berechnete Masse [gmol ⁻¹]	Gefundene Masse [gmol ⁻¹]	R _t [min]
DNA-TXA	S-IV1	220 474	70	6936.2	6938.0	12.8
DNA-AXA	S-IV1	226 414	70	6945.3	6945.0	12.9
DNA-CXA	S-IV1	219 124	68	6921.2	6923.3	12.9
DNA-GXA	S-IV1	223 084	66	6961.3	6963.5	12.9
DNA-TXT	S-IV1	214 560	72 (70)	6927.2	6928.2	13.6
DNA-TXC	S-IV1	213 184	65	6912.2	6912.1	13.7
DNA-TXG	S-IV1	217 144	65	6952.2	6956.2	13.5
DNA-CXC	S-IV1	211 834	74	6897.2	6902.3	13.6
DNA-GXG	S-IV1	219 754	75	6977.2	6979.6	13.3
DNA-AXG	S-IV1	223 084	67	6961.3	6957.2	12.7
DNA-AXT	S-IV1	220 474	66	6936.2	6940.3	13.4
DNA-TXT	R-IV1	214 560	72	6927.2	6928.2	13.6
DNA-TXT	S-IV2	214 560	72	6941.1	6948.4	13.9
DNA-TXT	R-IV2	214 560	71	6941.1	6949.1	13.9
DNA-TXT	S-IV3	214 560	73	6927.2	6933.7	13.5
DNA-TXT	R-IV3	214 560	73	6927.2	6930.9	13.5
DNA-TXT	S-IV4	219 460	74	6888.1	6894.2	13.4
DNA-TXT	R-IV4	219 460	73	6888.1	6895.5	13.3
DNA-TXT	S-IV5	219 460	73	6888.1	6888.6	13.1
DNA-TXT	R-IV5	219 460	73	6888.1	6891.8	13.1
DNA-TXT	S-IV6	219 460	75	6938.5	6937.1	13.8
DNA-TXT	R-IV6	219 460	74	6938.5	6939.7	13.8
DNA-TXT	S-IV7	219 460	75	6938.5	6937.0	13.9
DNA-TXT	R-IV7	219 460	74	6938.5	6941.9	13.7
DNA-TXT	S-TO1	205 060	72	6958.4	6958.6	13.9
DNA-TXT	R-TO1	205 060	72	6958.4	6962.3	13.8
DNA-TXT	S-TO2	205 060	73	6972.1	6973.3	14.1
DNA-TXT	R-TO2	205 060	74	6972.1	6974.7	14.1

DNA-TXT	S-TO3	205 060	72	6972.1	6980.7	14.7
DNA-TXT	R-TO3	205 060	71	6972.1	6980.2	14.7
DNA-NTXT	S-IV1	222 640	69 (66)	6963.4	6958.2	14.5
DNA-NTTXXT	S-IV1	222 030	66 (64)	6938.4	6935.4	15.5
DNA-M1	S-IV1	202 300	62 (59)	6366.3	6365.2	15.1
DNA-M2	S-IV1	204 910	67	6289.3	6289.5	16.0
DNA-M3	S-IV1	212 110	66 (62)	6410.3	6410.2	14.8
DNA-M4	S-IV1	196 360	60 (60)	6357.3	6357.7	16.1
DNA-M5	S-IV1	195 640	64 (61)	6296.3	6296.7	15.1
DNA-M6	S-IV1	202 300	60	6366.3	6367.3	15.7
DNA-M7	S-IV1	198 340	57	6224.3	6225.8	16.1
DNA-M8	S-IV1	214 900	55	6343.3	6344.3	15.8
DNA-M9	S-IV1	198 340	58	6224.3	6225.9	16.1
DNA-M10	S-IV1	222 190	48	6265.3	6267.9	15.6
DNA-M11	S-IV1	198 970	61	6178.3	6180.0	15.4
DNA-M12	S-IV1	195 100	53	6245.3	6246.3	16.4
DNA-M13	S-IV1	193 120	54	6276.3	6279.38	16.2
DNA-M14	S-IV1	224 800	53	6290.4	6294.8	15.4
DNA-M15	S-IV1	216 250	51	6256.3	6257.0	16.4

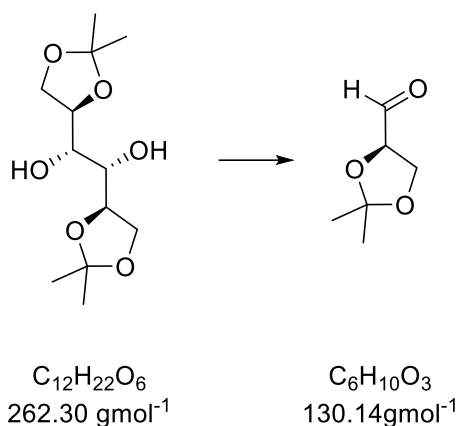
Tabelle 8: Charakterisierung der synthetisierten *mdka*-Cy5 Sonden. Gefundene Massen wurden aus den HPLC-Fractionen der Mischung aller Sonden bestimmt und weisen aufgrund der Vielzahl an überlagerten Signalen einige Fehlstellen auf.

	Sonden (5' → 3')	GC-Gehalt [%]	ϵ_{260} [Lmol ⁻¹ cm ⁻¹]	Berechnete Masse [gmol ⁻¹]	Gefundene Masse [gmol ⁻¹]
1	TGT TCA CTC XTC TCC AGC AT	35	184 170	6596.6	-
2	TCG AAA GTX CCC TCA CTG AA	45	205 950	6663.6	-
3	TTT ACT GCX CCT CTG GAT CT	45	182 190	6627.6	6628.3
4	CGT GTT TAG AXG GCG GAT GA	50	212 520	6830.6	-
5	CGT GCX GAA CAA CAC AGA GT	50	218 460	6737.6	6738.3
6	ATG TGT TTG XGG CTG TAG AG	45	207 930	6836.6	-
7	GCT GTT ACX CTG TCA TAG TC	45	192 090	6676.6	6679.2
8	GTG CAT GAA AGA GXC ATG TA	40	225 120	6807.6	6807.7
9	ACA ACG GCA TXT TAT TCT CC	40	197 400	6629.6	6633.4
10	AAA CAG CAG AGG AGX GGC TG	55	228 990	6842.7	6845.2
11	CAG CTG ATA GAX GGT AGA GA	45	227 730	6832.6	-
12	CTT TAG CAA AXG AGA GGC CT	45	213 870	6743.6	6744.8
13	GTG TTT GAT XGA GTT CTA CT	35	198 750	6746.6	6747.2
14	CCC GCT AGX AAT ATA ATC CT	40	203 340	6638.6	-
15	TGG GTG ACT XAT CCA ATT GC	45	201 990	6725.6	-
16	ACA CTC CTX AGT TTT ATA GT	30	200 100	6659.6	-
17	GGG GGT ATT XTC ACT TTT AC	40	197 400	6731.6	6735.2

18	AGA TCT GTX AGT AAC AGT CA	35	218 550	6742.6	6742.2
19	CAT GCA TTX CAA CAA CCC TC	45	198 030	6583.6	6584.8
20	ATA TGT TXG CGC AAG AGG GG	50	218 460	6839.6	6839.0
21	TCA CTC ATG XAC CTT TTG TT	35	186 870	6626.6	6626.2
22	GAG GGC TCA AGX GTC TTT AA	45	211 890	6774.6	6779.7
23	AGA AAC ATA XGC GGT CTG CA	45	219 810	6752.6	6757.1
24	TGA CCC GGA AXA CAG AGG AA	50	228 360	6786.7	6787.4
25	GGT TCT TTT XCT ATT GCA TA	30	192 180	6681.6	6683.8
26	GAG CCA GTG XAC ATA AGT GT	45	217 830	6783.6	-
27	TTA ATG GAC XTG TCT ACC AC	40	201 360	6669.6	6673.3
28	ACG ATT ATX ACC CTG ATG GA	40	211 260	6718.6	6719.2
29	CTC ATA TAA CXG TAC CAG CT	40	203 340	6638.6	-
30	GTC ATT TGT XAA GGG TTA GA	35	214 590	6804.6	-
31	CCC AGT CTC XTA AAT TTC TA	35	194 790	6604.6	6605.6
32	TCT CTG TGX ACA CAC ATT TT	35	192 810	6635.6	6635.0
33	GAA GGA TTX CGC TGC ATG TA	45	211 890	6774.6	6781.1
34	ACT TTC TTX GCT AAC CAA CA	35	200 730	6613.6	-
35	TTC CTA ACC XAG AGG GAA CA	45	215 850	6712.6	6711.9
36	TGC AGA ATG XTA CAG GGC AG	50	220 440	6808.6	6814.2

7.4 Synthesevorschriften

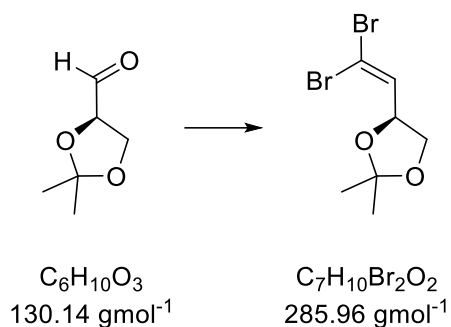
(R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (2)



527 mg der kommerziell erhältlichen Verbindung **1** (2.01 mmol, 1.00 Äq) wurden in 6 mL DCM bei 0 °C gelöst und mit 4 mL halbgesättigter aq. NaHCO_3 -Lösung vermischt. Dann wurden 864 mg NaIO_4 (4.04 mmol, 2.01 Äq) zugegeben und 20 min gerührt. Danach wurde die Reaktion auf RT erwärmt und weitere 2 h gerührt. Als die Reaktion beendet war, wurde so viel NaSO_4 zugegeben, bis keine Wasserphase mehr übrig war. Anschließend wurde die Suspension filtriert und der Rückstand mit DCM gewaschen. Das Filtrat wurde vorsichtig im Vakuum (>700 mbar) vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene gelbe Öl wurde ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet.

R_f (Hex/EE 1:1) = 0.5

(S)-4-(2,2-Dibromovinyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (3)



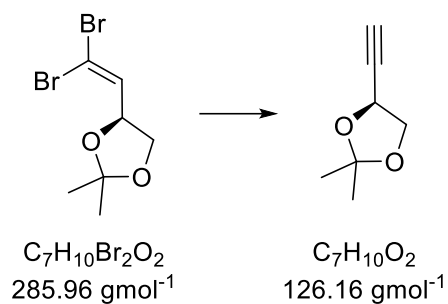
2.67 g CBr_4 (8.04 mmol, 2.00 Äq) wurden in 10 mL DCM bei 0 °C gelöst und mit einer Lösung von 4.22 g PPh_3 (16.1 mmol, 4.00 Äq) in 10 mL DCM versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei 0 °C gerührt, wobei eine Rotfärbung auftrat. Danach wurden 5 ml Et_3N zugegeben und das zuvor erhaltene **2** (in 2 ml DCM gelöst) zugegeben. Die Reaktion wurde weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/Hex 1:3 + 0.1 % Et_3N) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 43 % (495 mg, 1.73 mmol) über zwei Schritte erhalten.

R_f (DCM) = 0.8

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 6.53 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.73 (dt, J = 6.4, 7.7 Hz, 1H), 4.19 (dd, J = 6.3, 8.4 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 6.5, 8.4 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.38 (s, 3H).

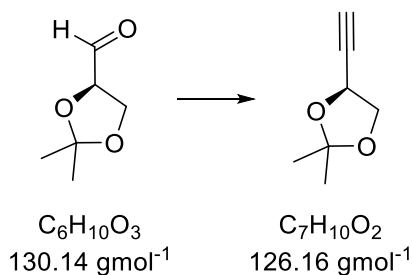
1H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[139]

(S)-4-Ethynyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (4): Route A



Zu einer Lösung von 495 mg **3** (1.73 mmol, 1.00 Äq) in 5 mL absolutem THF wurden 1.53 mL *n*BuLi (3.82 mmol, 2.21 Äq, $c = 2.5 \text{ mol/L}$ in Hexan) bei -78°C gegeben und 1 h gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf 10°C erwärmt und 1 h gerührt. Dann wurden 4 mL Et_2O und 4 mL H_2O bei Raumtemperatur zugegeben und 15 min gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Et_2O extrahiert, die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das resultierende Öl wurde ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet.

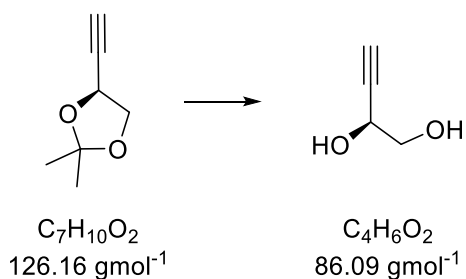
Route B



772 mg Dimethyl(1-diazo-2-oxypypropyl)phosphonat (4.02 mmol, 1.00 Äq) wurden in 3 ml MeOH gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 567 mg K_2CO_3 (4.10 mmol, 1.02 Äq) zugegeben und die resultierende gelbe Suspension 15 min bei 0 °C gerührt. Danach wurde das zuvor erhaltene **2** (in 2 ml MeOH gelöst) zugegeben. Nach 2 h wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Dann wurde die Mischung mit Et_2O verdünnt und mit gesättigter aq. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O extrahiert und die organischen Phasen wurden vereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Dabei wurde ein Öl erhalten, das ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet wurde.

R_f (Hex/EE 9:1) = 0.5

(S)-But-3-yn-1,2-diol (5)



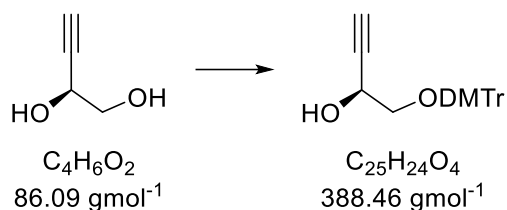
Das zuvor erhaltene **4** wurde in 7 ml MeOH gelöst und 1.0 g Dowex 50W wurden zugegeben. Danach wurde auf 35 °C erhitzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Dowex 50W abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hex/EE 2:1) gereinigt. Das Produkt wurde aus Benzol/Aceton lyophilisiert, um einen weißen hygroskopischen Feststoff in einer Ausbeute von 52 % (77.5 mg, 0.900 mmol) über zwei Schritte für Route A bzw. 41 % (142 mg, 1.65 mmol) über drei Schritte für Route B zu erhalten.

R_f (Hex/EE 1:3) = 0.4

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.52 – 4.42 (m, 1H), 3.77 (dd, $J = 11.4, 3.7$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 11.3, 6.2$ Hz, 1H), 2.51 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H), 2.39 (br s, 1H), 2.09 (br s, 1 H).

$^1\text{H NMR}$ stimmt mit der Literatur überein.^[139]

(S)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)but-3-yn-2-ol (6)



140 mg **5** (1.63 mmol, 1.00 Äq) wurden in 18 mL absolutem Pyridin gelöst und mit 578 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.63 mmol, 1.00 Äq) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hex/EE 10:1 + 0.1 % Et₃N) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 68 % (431 mg, 1.11 mmol) isoliert.

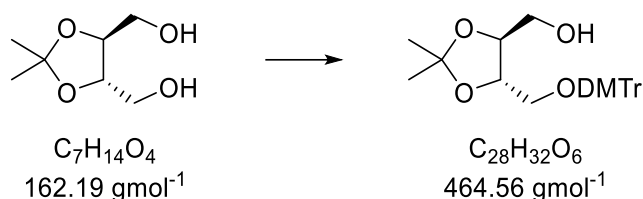
R_f (Hex/EE 1:1) = 0.6

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.47 – 7.44 (m, 2H), 7.35 – 7.32 (m, 4H), 7.32 – 7.27 (m, 2H), 7.24 – 7.20 (m, 1H), 6.86 – 6.81 (m, 4H), 4.49 – 4.44 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.36 – 3.28 (m, 2H), 2.49 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 2.45 (d, J = 2.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 158.72, 149.97, 144.66, 136.11, 135.82, 135.75, 130.18, 129.27, 128.48, 128.21, 128.05, 127.07, 123.89, 113.35, 86.54, 82.22, 77.41, 77.16, 76.91, 73.73, 67.00, 62.06, 55.38.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für C₂₅H₂₄O₄⁺ [M⁺]: 388.1670; gefunden [M⁺]: 388.1649.

((4S,5S)-5-((Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (8)



1.00 g der kommerziell erhältlichen Verbindung **7** (6.17 mmol, 1.00 Äq) wurde aus Benzol lyophilisiert und anschließend in 50 mL absolutem Pyridin gelöst und mit 2.19 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (6.17 mmol, 1.00 Äq) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hex/EE 5:1 + 0.1 % Et_3N) aufgereinigt und das Produkt wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 70 % (2.01 g, 4.32 mmol) erhalten.

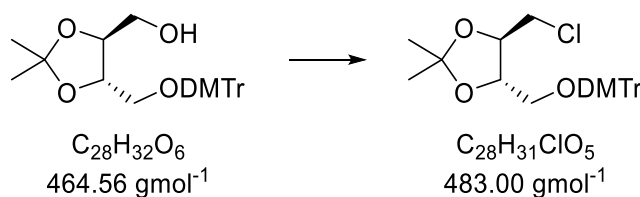
R_f (Hex/EE 1:1) = 0.6

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.36 – 7.29 (m, 2H), 7.28 – 7.05 (m, 7H), 6.77 – 6.67 (m, 4H), 3.96 – 3.80 (m, 2H), 3.69 (s, 6H), 3.76 – 3.47 (m, 2H), 3.34 – 3.24 (m, 1H), 3.15 – 3.02 (m, 1H), 1.99 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 1.32 (s, 3H), 1.28 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 158.48, 149.72, 144.68, 136.28, 130.20, 129.26, 128.34, 128.24, 127.99, 127.87, 127.19, 126.98, 126.76, 123.96, 113.28, 113.15, 109.34, 86.56, 81.54, 79.92, 78.11, 77.41, 77.16, 76.91, 62.61, 62.10, 55.33, 27.17.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{28}H_{32}O_6^+$ [M⁺]: 464.2194; gefunden [M⁺]: 464.2196.

(4S,5R)-4-((Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(chloromethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (9)



2.18 g der Verbindung **8** (4.69 mmol, 1.00 Äq) wurden in 42 mL Pyridin gelöst und bei RT mit 2.6 mL CCl_4 (26.9 mmol, 5.74 Äq) und 4.22 g PPh_3 (16.1 mmol, 3.44 Äq) versetzt. Die Lösung wurde auf 60 °C erhitzt und 12 h gerührt. Nach dem Abkühlen auf 0°C wurde mit Hexan auf die Hälfte verdünnt und 30 min gerührt. Der Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulen-chromatographisch (Hex/EE 20:1 + 0.1 % Et_3N) aufgereinigt und das Produkt wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 77 % (1.74 g, 3.61 mmol) erhalten.

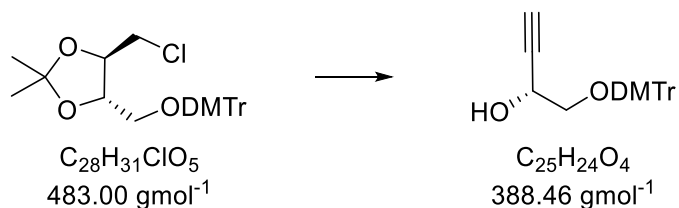
R_f (Hex/EE 10:1) = 0.3

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.48 – 7.41 (m, 2H), 7.35 – 7.15 (m, 7H), 6.87 – 6.80 (m, 4H), 4.22 – 3.95 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.77 – 3.54 (m, 2H), 3.42 – 3.32 (m, 1H), 3.29 – 3.20 (m, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.42 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 144.76, 135.91, 130.17, 129.26, 127.98, 127.90, 126.98, 113.29, 86.56, 64.18, 62.41, 55.38, 27.05.

HR-MS (ESI) m/z: berechnet für $C_{28}H_{31}ClO_5^+$ [M⁺]: 482.1855; gefunden [M⁺]: 482.1856

(R)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)but-3-yn-2-ol (10)

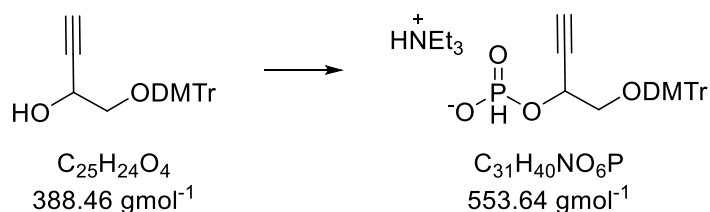


1.3 ml DIPA (9.24 mmol, 6.00 Äq) wurden in 10 ml THF gelöst und bei 0 °C wurden 3.1 ml 2.5 M *n*BuLi in Hexan (7.70 mmol, 5.00 Äq) zugegeben. Nach 15 min wurde die resultierende LDA-Lösung auf -78 °C abgekühlt und mit 744 mg **9** (1.54 mmol, 1.00 Äq) in 2 ml THF versetzt. Nach 30 min wurde die Lösung über 2 h auf 0 °C erwärmt und weitere 30 min gerührt. Dann wurden 10 mL gesätt. aq. NH₄Cl-Lösung zugegeben und die Mischung mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingedampft, der Rückstand in wenig MeOH gelöst und säulenchromatographisch (Hex/EE 10:1 + 0.1% Et₃N) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 73 % (435 mg, 1.12 mmol) erhalten.

R_f (Hex/EE 1:1) = 0.6

¹H NMR stimmt mit **6** überein.

(S/R)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)but-3-yn-2-ylphosphonat (S/R)



Zu einer Lösung aus 713 μL PCl_3 (1.12 g, 8.15 mmol, 5.00 Äq) und 9.06 mL N Methylmorpholin (1.88 g, 81.5 mmol, 50.0 Äq) in 86 mL DCM wurden 1.88 g 1,2,4 Triazol (27.2 mmol, 16.7 Äq) bei RT zugegeben. Nach 30 min wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt und 632 mg **6/10** (1.63 mmol, 1.00 Äq) in 26 mL DCM vorsichtig zugegeben und 10 min gerührt. Dann wurde die Lösung mit 1.0 M wässriger Triethylammoniumbicarbonatlösung (pH = 8.5) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH 10:1 + 0.1 % Et_3N) aufgereinigt. Danach wurde das Produkt erneut mit 1.0 M wässriger Triethylammoniumbicarbonat-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde aus Benzol lyophilisiert, um einen weißen Schaum in einer Ausbeute von 69 % (626 mg, 1.13 mmol) zu erhalten.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +9.3 \text{ (S)}, -9.1 \text{ (R)}$$

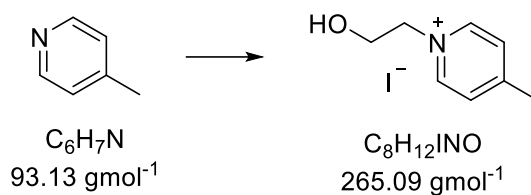
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.39 – 7.36 (m, 2H), 7.30 – 7.22 (m, 4H), 7.18 – 7.13 (m, 2H), 7.12 – 7.04 (m, 1H), 6.97 (d, $J = 631.3$ Hz, 1H), 6.76 – 6.67 (m, 4H), 5.05 – 4.96 (m, 1H), 3.68 (s, 6H), 3.27 – 3.11 (m, 2H), 2.85 (q, $J = 7.1$ Hz, 6H), 2.30 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 1.15 (t, $J = 7.3$ Hz, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 158.52, 144.91, 136.11, 130.30, 130.29, 128.46, 128.42, 127.86, 126.80, 113.17, 86.20, 81.79, 81.76, 73.46, 66.74, 63.96, 63.92, 55.34, 45.62, 9.12.

$^{31}\text{P NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.76 (dd, $J = 631.1, 9.3$ Hz).

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{NO}_6\text{P}^+$ [MH^+]: 554.2666; gefunden [MH^+]: 554.2664.

1-(2-Hydroxyethyl)-4-methylpyridin-1-iumiodid (**12**)

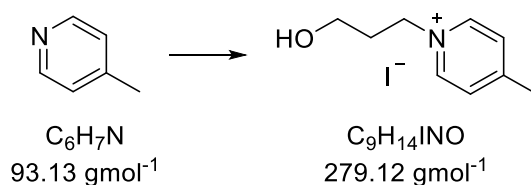


0.19 mL 4-Methylpyridin (186 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq) und 0.17 mL 2-Iodethanol (378 mg, 2.20 mmol, 1.10 Äq) wurden in 2.5 mL Toluol gelöst und 4 h zunächst bei RT und anschließend 30 min unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung abdekantiert und der Rückstand mit Et₂O gewaschen. Das Produkt wurde als oranges Öl in einer Ausbeute von 79 % (418 mg, 1.58 mmol) erhalten.

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.85 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 7.99 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 5.18 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.59 (t, 2H), 3.88 – 3.73 (m, 2H), 2.61 (s, 3H).

¹H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[149]

1-(2-Hydroxypropyl)-4-methylpyridin-1-iumiodid (**33**)

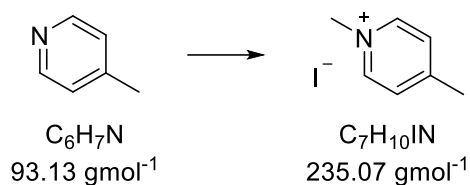


Verbindung **33** wurde analog zu **12** synthetisiert. Ausbeute: 78%.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.97 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 7.99 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 4.63 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.43 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.05 (p, J = 7.0 Hz, 2H).

¹H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[171]

1,4-Dimethylpyridin-1-iumiodid (34)

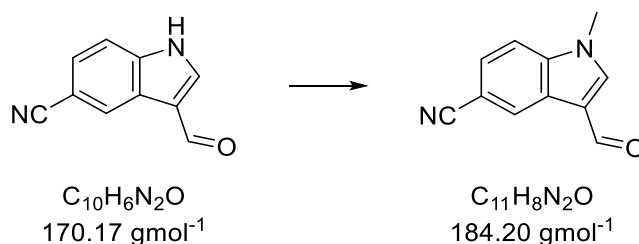


0.29 mL 4-Methylpyridin (279 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq) wurden in 1.2 ml MeCN gelöst. Bei 0°C wurden langsam 0.22 mL Mel (511 mg, 3.60 mmol, 1.20 Äq) zugegeben und die Reaktion wurde bei RT über Nacht gerührt. Dann wurde Et₂O zugegeben, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und mit Et₂O gewaschen. Das Produkt wurde als weißes Pulver in quantitativer Ausbeute (705 mg, 3.00 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.27 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

¹H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[172]

3-Formyl-1-methyl-1H-indole-5-carbonitril (14)

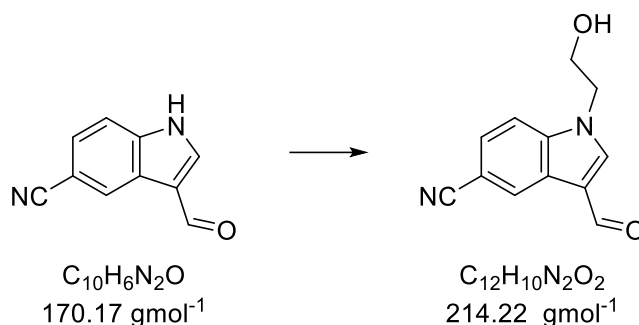


400 mg 3-Formyl-1H-indol-5-carbonitril (2.35 mmol, 1.00 Äq), 358 mg K_2CO_3 (2.59 mmol, 1.10 Äq) und 0.79 ml Dimethylcarbonat (847 mg, 9.40 mmol, 4.00 Äq) wurden in 2.5 mL DMF gelöst und über Nacht bei 130 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurden 50 ml Eis zugegeben und mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als grünes Pulver in einer Ausbeute von 60 % (259 mg, 1.41 mmol) erhalten.

1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 9.97 (s, 1H), 8.49 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.73 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H).

1H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[173]

3-Formyl-1-(2-hydroxyethyl)-1H-indole-5-carbonitril (35)



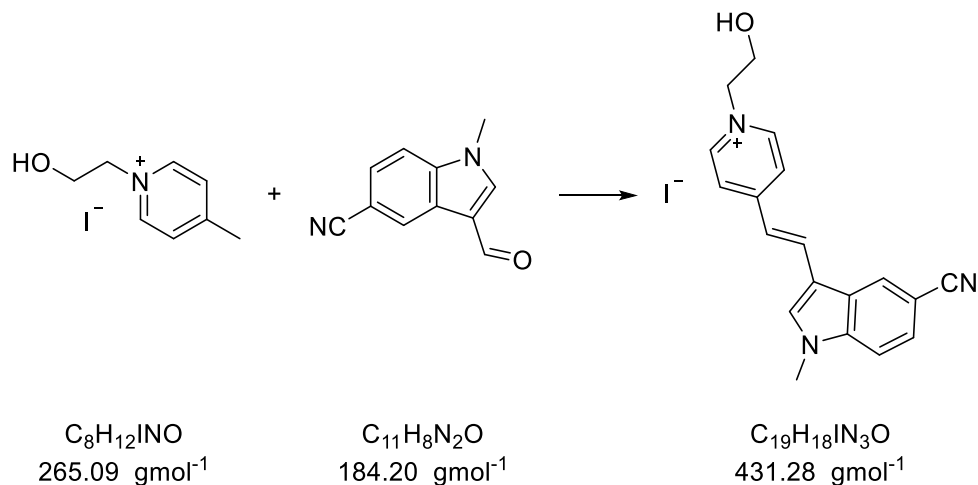
500 mg 3-Formyl-1H-indol-5-carbonitril (2.94 mmol, 1.00 Äq) und 330 mg KOH (5.88 mmol, 2.00 Äq) wurden in 12 mL DMF gelöst und 0.300 mL 2-Iodethanol (758 mg, 4.41 mmol, 1.50 Äq) wurden bei RT zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 35 °C erwärmt und über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, Wasser wurde zugegeben und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hex/EE 1:3) aufgereinigt und das Produkt als weißes Pulver in einer Ausbeute von 57 % (365 mg, 1.70 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 9.98 (s, 1H), 8.50 – 8.42 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 5.03 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.38 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 184.81, 142.90, 126.00, 125.46, 116.68, 112.66, 59.49, 49.12.

HR-MS (ESI) *m/z*: berechnet für C₁₂H₁₁N₂O₂⁺ [MH⁺]: 215.0815; gefunden [MH⁺]: 215.0815.

(E)-4-(2-(5-Cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(2-hydroxyethyl)pyridin-1-iumiodid (15)



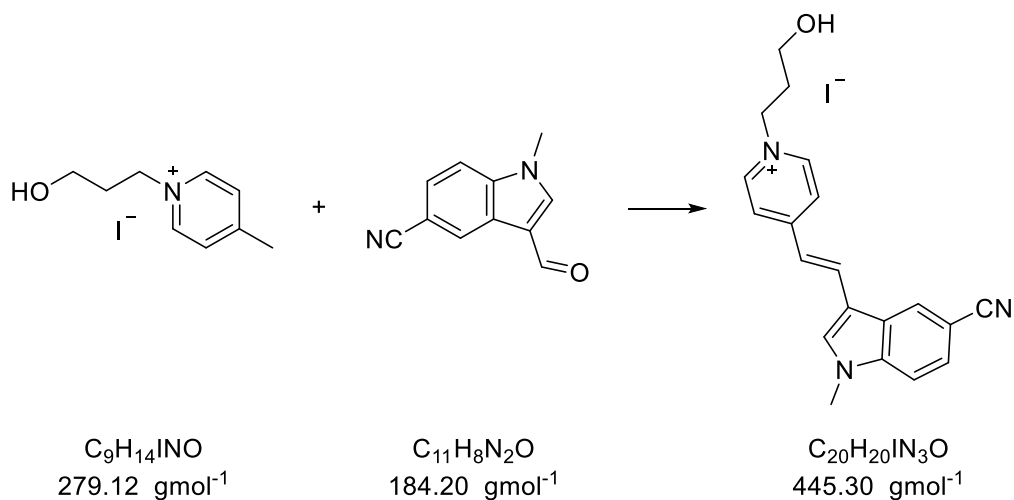
772 mg (2.91 mmol, 1.10 Äq) **12** und 488 mg **14** (2.65 mmol, 1.00 Äq) wurden in 30 mL EtOH gelöst, 0.58 mL Piperidin (496 mg, 5.83 mmol, 2.20 Äq) zugegeben und die Reaktion über Nacht unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen der Mischung wurde der resultierende Feststoff abfiltriert und mit EE gewaschen. Anschließend wurde aus MeOH/Et₂O (1:1) umkristallisiert und das Produkt als oranges Pulver in einer Ausbeute von 91 % (1.04 g, 2.41 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.77 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 8.75 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.28 – 8.17 (m, 3H), 8.14 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.23 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.50 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (q, J = 5.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 154.65, 144.57, 139.91, 137.29, 134.45, 126.18, 126.09, 125.64, 122.57, 120.76, 119.28, 113.54, 112.86, 103.86, 62.17, 60.53, 33.87.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{19}H_{18}N_3O^+$ [M^+]: 304.1445; gefunden [M^+]: 304.1438.

(E)-4-(2-(5-Cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-iumiodid (36)



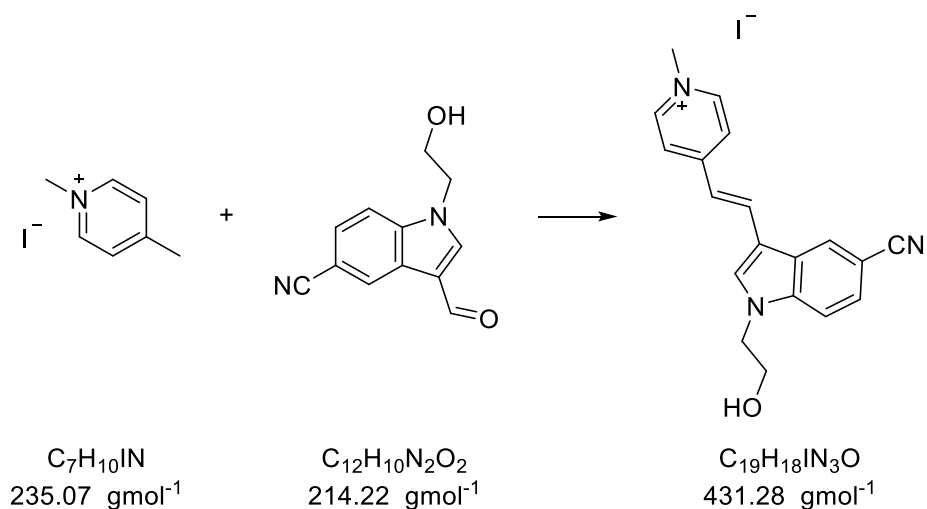
Verbindung **36** wurde analog zu **15** synthetisiert. Ausbeute: 61%.

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.86 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 8.73 (s, 1H), 8.29 – 8.13 (m, 4H), 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 4.78 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.54 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.47 (q, J = 5.5 Hz, 2H), 2.07 (p, J = 6.5 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 154.02, 143.85, 139.39, 136.75, 134.02, 125.69, 125.56, 125.16, 122.31, 120.27, 118.76, 113.07, 112.34, 103.33, 57.16, 57.03, 33.37, 33.17.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{20}H_{20}N_3O^+$ [M^+]: 318.1601; gefunden [M^+]: 318.1597.

(E)-4-(2-(5-Cyano-1-(2-hydroxyethyl)-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-methylpyridin-1-iumiodid (37)



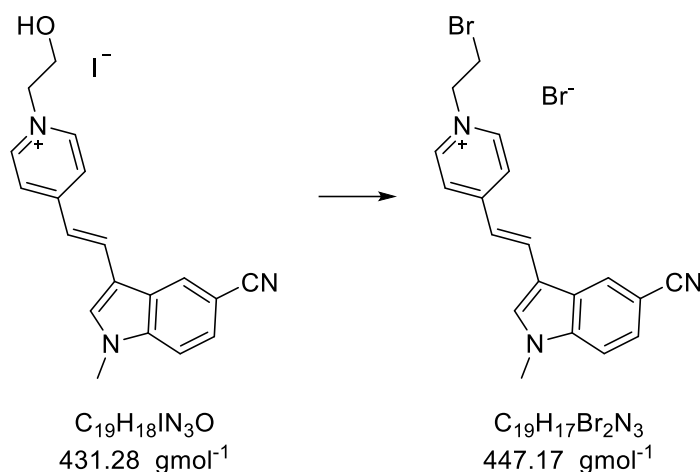
Verbindung **37** wurde analog zu **15** synthetisiert. Ausbeute: 71%.

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.78 – 8.71 (m, 3H), 8.25 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 8.20 – 8.13 (m, 3H), 7.84 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.00 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.38 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 4.20 (s, 3H), 3.76 (q, J = 5.2 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 153.71, 144.43, 139.11, 136.39, 133.87, 125.61, 125.38, 125.31, 122.07, 120.28, 118.68, 112.99, 112.62, 103.18, 59.89, 49.03, 46.46.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{19}H_{18}N_3O^+$ [M^+]: 304.1444; gefunden [M^+]: 304.1442.

(E)-1-(2-Bromoethyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid (16)



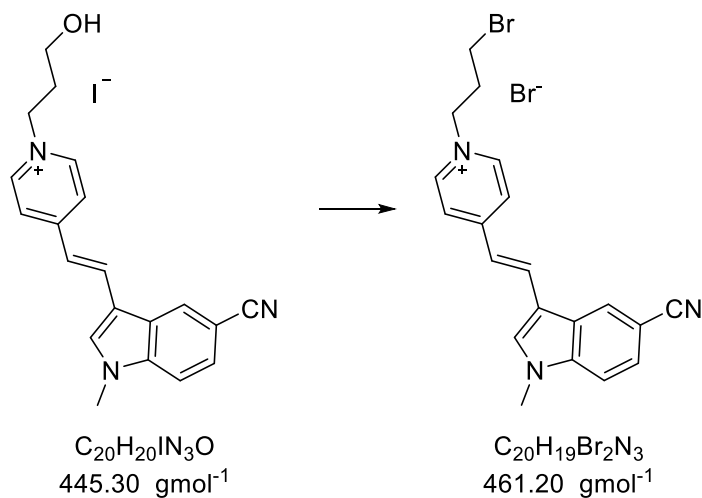
600 mg **15** (1.39 mmol, 1.00 Äq), 1.09 g PPh_3 (4.17 mmol, 3.00 Äq) und 1.52 g CBr_4 (4.59 mmol, 3.30 Äq) wurden in 12 mL DMF gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, 2 g NaBr zugegeben und in einer Mischung aus DCM/ H_2O (3:1) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst und unter Rühren wurde Et_2O langsam zugegeben, bis zur vollständigen Fällung. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als gelbes Pulver in einer Ausbeute von 62 % (386 mg, 0.863 mmol) erhalten.

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.85 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 8.74 (s, 1H), 8.28 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 4.88 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.09 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 154.86, 143.86, 139.46, 137.11, 134.79, 125.66, 125.15, 122.15, 120.22, 118.63, 113.07, 112.41, 103.47, 59.54, 33.40, 31.78.

HR-MS: (ESI) m/z: berechnet für $C_{19}H_{17}BrN_3^+$ [M^+]: 366.0601; gefunden [M^+]: 366.0595.

(E)-1-(3-Bromopropyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid (38)



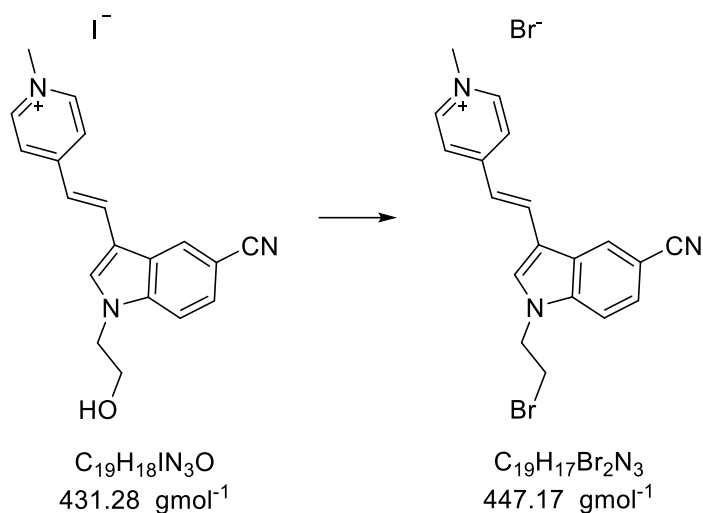
Verbindung **38** wurde analog zu **16** synthetisiert. Ausbeute: quantitativ

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 8.74 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 8.16 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.59 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.60 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.54 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 154.31, 143.83, 139.40, 136.86, 134.27, 125.70, 125.59, 125.16, 122.46, 120.25, 118.73, 113.08, 112.36, 103.36, 57.93, 34.23, 33.39, 32.96, 30.32.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{20}H_{19}BrN_3^+$ [M⁺]: 380.0757; gefunden [M⁺]: 380.0752.

(E)-4-(2-(1-(2-Bromoethyl)-5-cyano-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-methylpyridin-1-iumiodid (39)



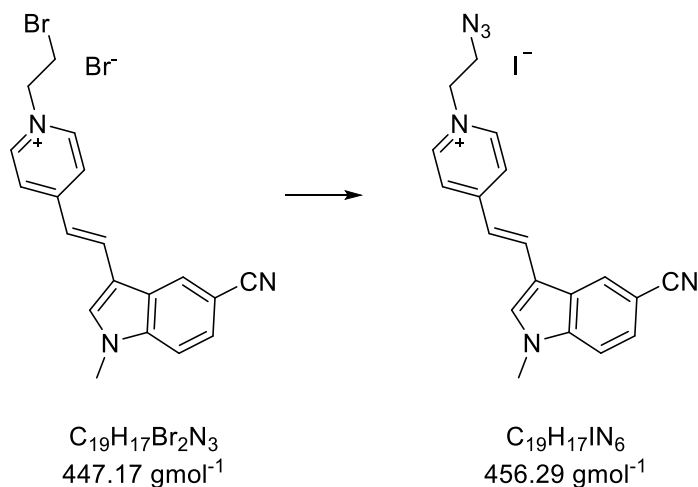
Verbindung **39** wurde analog zu **16** synthetisiert. Ausbeute: 41 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.80 – 8.73 (m, 3H), 8.27 – 8.17 (m, 4H), 7.91 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.6, 1.5 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 4.79 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.21 (s, 3H), 3.95 (t, J = 5.9 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 153.58, 144.56, 138.81, 135.72, 133.55, 125.71, 125.35, 122.29, 120.15, 119.36, 113.37, 112.57, 103.59, 47.56, 46.50, 32.32.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BrN}_3^+$ [M⁺]: 366.0601; gefunden [M⁺]: 366.0597.

(E)-1-(2-Azidoethyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid (IV1)



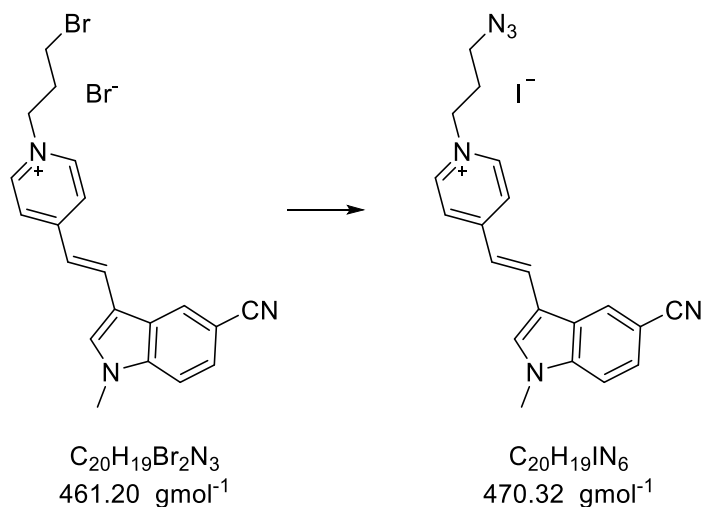
50.0 mg **16** (0.112 mmol, 1.00 Äq), 55.9 mg NaI (0.373 mmol, 3.33 Äq) und 72.8 mg NaN₃ (1.12 mmol, 10.0 Äq) wurden in 2.8 mL DMF gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 150 mL Et₂O/Hex (2:1) gegeben und die überstehende Lösung wurde abdekantiert. Zum Rückstand wurden 200 mg NaI gegeben und in einer Mischung aus DCM/H₂O (3:1) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst und unter Rühren wurde bis zur vollständigen Fällung Et₂O langsam zugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als gelbes Pulver in einer Ausbeute von 40 % (20.4 mg, 0.0448 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.83 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 8.75 (s, 1H), 8.27 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 4.63 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.04 – 3.97 (m, 2H), 3.94 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 154.66, 144.00, 139.46, 137.08, 134.59, 125.68, 125.14, 122.27, 120.23, 118.67, 113.06, 112.42, 103.45, 58.03, 50.28, 33.39.

HR-MS: (ESI) m/z : berechnet für $C_{19}H_{17}N_6^+$ [M^+]: 329.1510; gefunden [M^+]: 329.1502.

(E)-1-(2-Azidopropyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid (IV2)



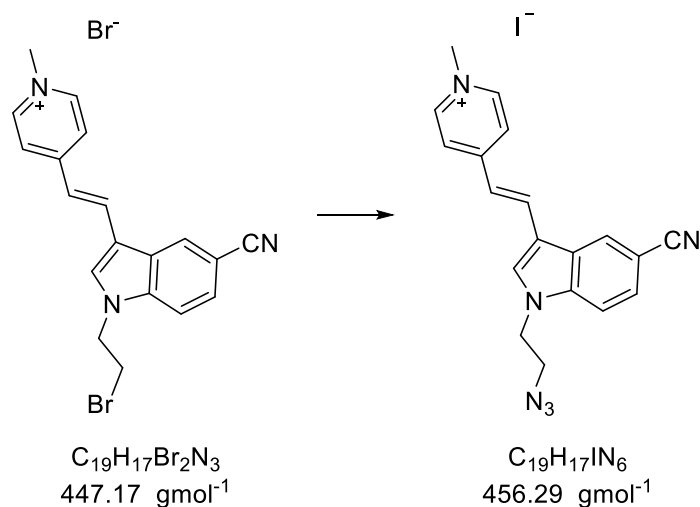
Verbindung **IV2** wurde analog zu **IV1** synthetisiert. Ausbeute: 93 %.

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.84 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 8.75 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 8.14 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.6, 1.5 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 4.51 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.49 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.19 (p, J = 6.8 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 154.21, 143.76, 139.40, 136.83, 134.19, 125.67, 125.59, 125.14, 122.41, 120.25, 118.71, 113.06, 112.36, 103.36, 56.95, 47.63, 33.40, 29.50.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{20}H_{19}N_6^+$ [M⁺]: 343.1666; gefunden [M⁺]: 343.1661.

(E)-4-(2-(1-(2-Azidoethyl)-5-cyano-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-methylpyridin-1-iumiodid (IV3)



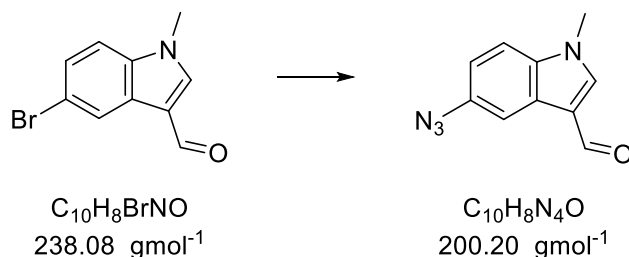
Verbindung **IV3** wurde analog zu **IV1** synthetisiert. Ausbeute: 35 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.80 – 8.73 (m, 3H), 8.27 – 8.17 (m, 4H), 7.90 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 4.55 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.21 (s, 3H), 3.82 (t, J = 5.5 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 153.60, 144.55, 138.90, 135.68, 133.55, 125.76, 125.36, 122.26, 120.16, 119.30, 113.61, 112.48, 103.56, 50.32, 46.52, 45.54.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_6$ $[\text{M}^+]$: 329.1509; gefunden $[\text{M}^+]$: 329.1504.

5-Azido-1-methyl-1H-indole-3-carbaldehyd (18)



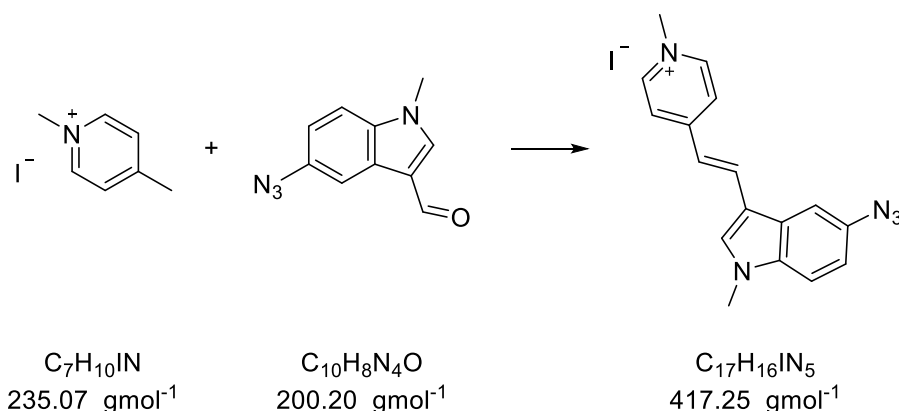
293 mg (4.50 mmol, 1.50 Äq) NaN_3 , 714 mg 5-Brom-1-methyl-1H-indol-3-carbaldehyd (3.00 mmol, 1.00 Äq), 297 mg Natriumascorbat (1.50 mmol, 0.50 Äq), 150 mg Kupfer(II)-sulfat-pentahydrat (0.600 mmol, 0.20 Äq), 69,1 mg L-Prolin (0.600 mmol, 0.20 Äq) und 63.6 mg Kaliumcarbonat (0.600 mmol, 0.20 Äq) wurden in 10 mL DMF/ H_2O gelöst (2:1). Die Reaktion wurde auf 85 °C erhitzt und über Nacht gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Mischung mit 40 ml H_2O und 10 ml konz. aq. NH_3 -Lösung versetzt. Anschließend wurde mit Et_2O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 41 % (245 mg, 1.22 mmol) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.95 (s, 1 H), 8.01 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H), 7.68 (s, 1 H), 7.31 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.99 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1 H), 3.87 (s, 3 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 50.8, 106.2, 111.2, 111.9, 116.3, 118.7, 135.9, 140.0, 155.7, 184.3.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{10}H_9N_4O^+$ [MH^+]: 201.0771; gefunden [MH^+]: 201.0766.

(E)-4-(2-(5-Azido-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-methylpyridin-1-iumiodid (IV4)



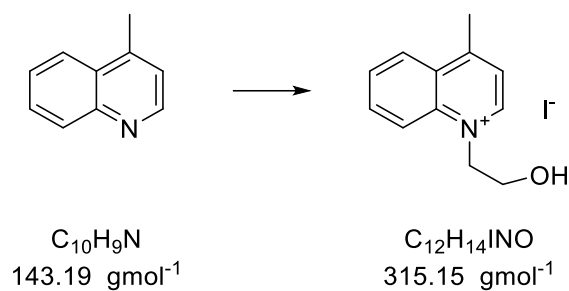
229 mg (0.975 mmol, 1.30 Äq) **34** und 150 mg **18** (0.75 mmol, 1.00 Äq) wurden in 7.5 mL EtOH gelöst, 0.16 mL Piperidin (140 mg, 1.65 mmol, 2.20 Äq) wurden zugegeben und die Reaktion für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Mischung mit Et₂O verdünnt und der Niederschlag wurde abfiltriert. Das Rohprodukt wurde aus MeOH/Et₂O (1:1) umkristallisiert. Nach Trocknen im Vakuum wurde das Produkt als rotes Pulver in einer Ausbeute von 66 % (207 mg, 0.495 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.69 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 8.22 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.85 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 4.18 (s, 3H), 3.89 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 153.86, 144.20, 135.61, 135.55, 134.76, 133.19, 126.53, 121.80, 117.18, 114.54, 112.51, 112.18, 110.16, 46.27, 33.35.

HR-MS (ESI) m/z: berechnet für C₁₇H₁₆N₅⁺ [M⁺]: 290.1401; gefunden [M⁺]: 290.1394.

1-(2-Hydroxyethyl)-4-methylquinolin-1-iumiodid (20)

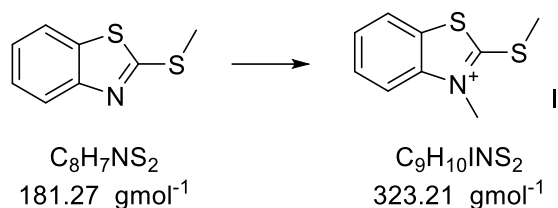


1.85 mL 4-Methylchinolin (2.00 g, 14.0 mmol, 1.00 Äq) und 1.09 mL 2-Iodethanol (2.41 g, 14.0 mmol, 1.00 Äq) wurden in 10 mL Dioxan gelöst und 24 h unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Niederschlag abfiltriert und mit Et₂O gewaschen. Das Produkt wurde als gelbes Pulver in einer Ausbeute von 74 % (3.25 g, 10.3 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 9.25 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 8.61 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.55 (dd, J = 8.5, 1.4 Hz, 1H), 8.24 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 8.10 – 8.01 (m, 2H), 5.09 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.91 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.02 (s, 3H).

¹H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[154]

3-Methyl-2-(methylthio)benzo[d]thiazol-3-iumiodid (22)

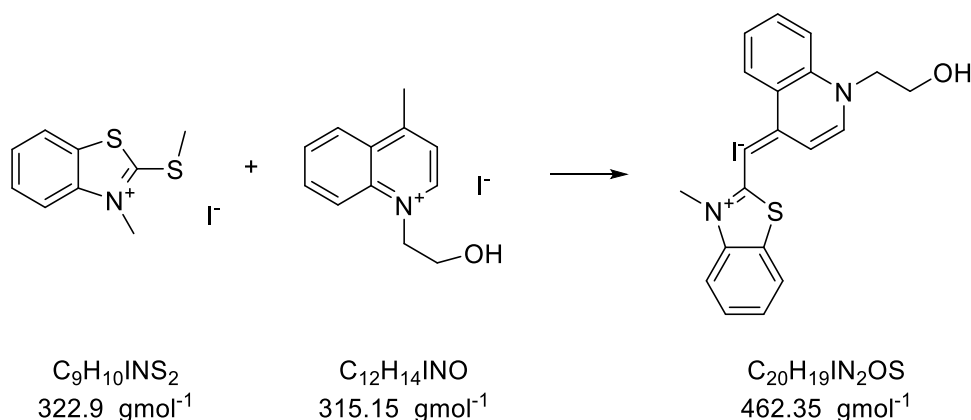


6.00 g Methylthiobenzothiazol (33.1 mmol, 1.00 Äq) wurden in 20 mL DMF gelöst und mit 8.20 mL MeI (18.7 g, 132 mmol, 4.00 Äq) versetzt. Die Reaktion wurde auf 60 °C erwärmt und 24 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit EE verdünnt und der Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Das Produkt wurde als weißes Pulver in einer Ausbeute von 76 % (8.10 g, 25.1 mmol) erhalten.

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (ddd, J = 8.5, 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.73 (ddd, J = 8.3, 7.3, 1.0 Hz, 1H), 4.11 (s, 3H), 3.13 (s, 3H).

1H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[155]

(E)-2-((1-(2-Hydroxyethyl)quinolin-4(1H)-ylidene)methyl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-iumiodid (23)



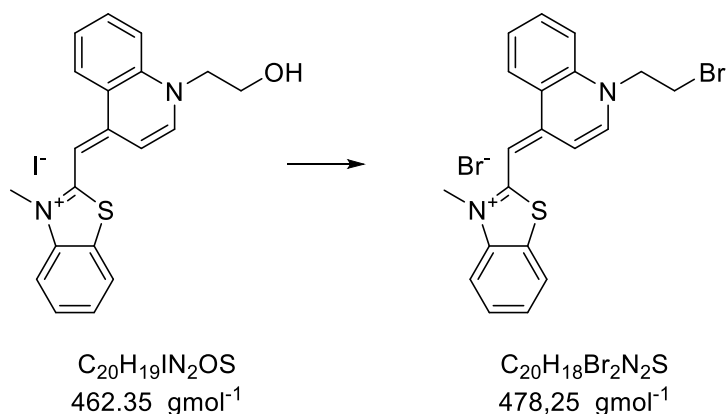
1.90 g **20** (6.03 mmol, 1.00 Äq) und 2.14 g **22** (6.63 mmol, 1.10 Äq) wurden in 50 mL MeOH/DCM (1:1) gelöst. Anschließend wurden 2.51 mL Et₃N (1.83 g, 18.1 mmol, 3.00 Äq) zugegeben, woraufhin eine Rotfärbung auftrat. Die Reaktion wurde unter Verwendung von Waschflaschen über Nacht bei RT gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit Et₂O verdünnt, der Niederschlag abfiltriert, mit Et₂O und Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als rotes Pulver in einer Ausbeute von 31 % (858 mg, 1.86 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.45 – 7.35 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 5.12 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.68 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.84 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 159.87, 148.72, 145.38, 140.48, 137.27, 133.01, 128.13, 126.68, 125.75, 124.42, 124.31, 123.80, 122.85, 118.22, 112.92, 107.60, 87.93, 58.74, 56.51, 33.82.

HR-MS (ESI) *m/z*: berechnet für C₂₀H₁₉N₂OS⁺ [M⁺]: 335.1213; gefunden [M⁺]: 335.1205.

(E)-2-((1-(2-Bromoethyl)quinolin-4(1H)-yliden)methyl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-iumbromid (24)



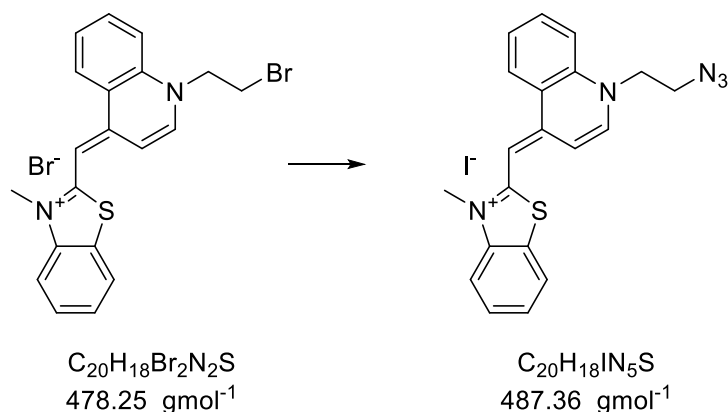
850 mg **23** (1.84 mmol, 1.00 Äq), 1.45 g PPh_3 (5.52 mmol, 3.00 Äq) und 2.01 g CBr_4 (6.07 mmol, 3.30 Äq) wurden in 20 mL DMF gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit Et_2O verdünnt, der Niederschlag abfiltriert und mit Et_2O gewaschen. Anschließend wurde der Rückstand mit 2 g NaBr versetzt und in einer Mischung aus DCM/ H_2O (3:1) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst und unter Rühren wurde bis zur vollständigen Fällung langsam Et_2O zugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als rotes Pulver in einer Ausbeute von 41 % (359 mg, 0.751 mmol) erhalten.

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.81 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.58 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.98 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 5.03 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.02 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 160.82, 148.67, 144.92, 140.46, 136.73, 133.33, 128.26, 126.81, 125.91, 124.76, 124.08, 124.05, 122.97, 117.84, 113.27, 107.06, 88.74, 54.36, 34.01, 31.02.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{20}H_{18}BrN_2S^+$ $[M^+]$: 397.0369; gefunden $[M^+]$: 397.0360.

**(E)-2-((1-(2-Azidoethyl)quinolin-4(1H)-yliden)methyl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-iumiodid
(TO1)**



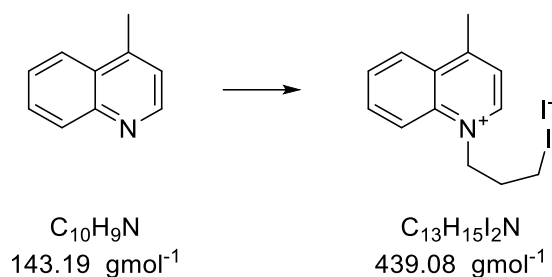
359 mg **24** (0.751 mmol, 1.00 Äq), 488 mg NaN_3 (7.51 mmol, 10.0 Äq) und 375 mg NaI (2.50 mmol, 3.33 Äq) wurden in 7 mL DMF gelöst und über Nacht bei 85 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde bis zur vollständigen Fällung mit Et_2O verdünnt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, der Rückstand mit 1 g NaI versetzt und in einer Mischung aus DCM/ H_2O (3:1) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst und unter Rühren wurde bis zur vollständigen Fällung langsam Et_2O zugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als rotes Pulver in einer Ausbeute von 71 % (260 mg, 0.533 mmol) erhalten.

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.81 (dd, J = 8.8, 1.4 Hz, 1H), 8.56 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.08 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.99 (ddd, J = 8.6, 7.0, 1.3 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.79 – 7.72 (m, 1H), 7.64 (ddd, J = 8.5, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.48 – 7.43 (m, 1H), 7.40 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.80 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.93 (t, J = 5.5 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 161.02, 149.02, 145.12, 140.86, 137.44, 133.71, 128.68, 127.24, 126.33, 125.14, 124.50, 123.39, 118.40, 113.64, 107.98, 89.06, 53.29, 49.69, 34.50.

HR-MS (ESI) m/z : berechnet für $C_{20}H_{18}N_5S^+$ $[M^+]$: 360.1278; gefunden $[M^+]$: 360.1271.

1-(3-Iodopropyl)-4-methylquinolin-1-iumiodid (26)

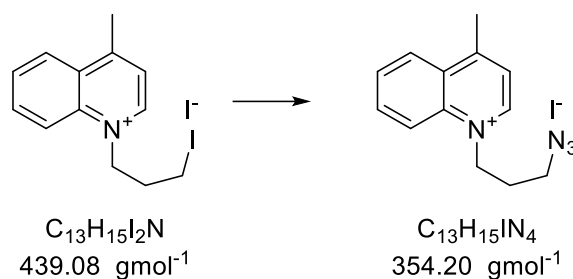


1.85 mL 4-Methylchinolin (2.00 g, 14.0 mmol, 1.00 Äq) und 4.80 mL 1,3-Diodopropan (12.4 g, 42.0 mmol, 3.00 Äq) wurden in 20 mL MeCN gelöst und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt in EE resuspendiert, abfiltriert und aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 90 % (5.53 g, 12.6 mmol) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 10.32 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H), 8.57 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 1H), 8.38 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1H), 8.24 (ddd, $J = 8.7, 7.0, 1.4 \text{ Hz}$, 1H), 8.05 – 7.96 (m, 2H), 5.52 – 5.44 (m, 2H), 3.48 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.75 – 2.63 (m, 2H).

$^1\text{H NMR}$ stimmt mit der Literatur überein.^[156]

1-(3-Azidopropyl)-4-methylquinolin-1-iumiodid (**27**)

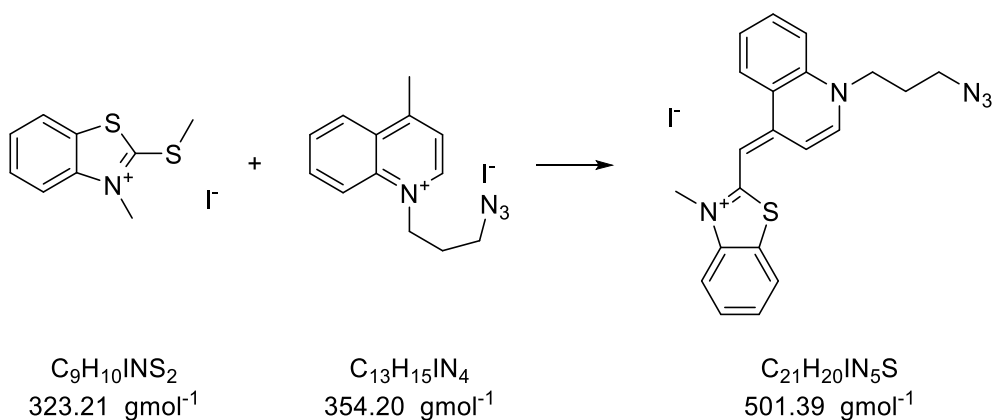


2.00 g **26** (4.55 mmol, 1.00 Äq) und 891 mg NaN_3 (13.7 mmol, 3.00 Äq) wurden in 45 mL MeCN gelöst und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurden die Salze abfiltriert und das Filtrat vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in DCM resuspendiert, filtriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als grünes Pulver in einer Ausbeute von 81 % (1.31 g, 3.69 mmol) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 9.41 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.60 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.56 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 1H), 8.28 (ddd, $J = 8.7, 7.0, 1.4$ Hz, 1H), 8.13 – 8.03 (m, 2H), 5.07 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.29 – 2.17 (m, 2H).

$^1\text{H NMR}$ stimmt mit der Literatur überein.^[156]

(E)-2-((1-(3-Azidopropyl)quinolin-4(1H)-yliden)methyl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-iumiodid (TO2)



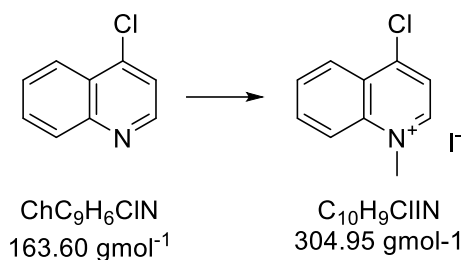
502 mg **22** (1.55 mmol, 1.10 Äq) und 500 mg **27** (1.41 mmol, 1.00 Äq) wurden in 12 mL MeOH/DCM 1:1 gelöst. Danach wurden 0.600 mL Et₃N (429 mg, 4.23 mmol, 3.00 Äq) zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde bis zur vollständigen Fällung Et₂O zugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Et₂O und Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als rotes Pulver in einer Ausbeute von 39 % (275 mg, 0.550 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.00 – 7.93 (m, 1H), 7.78 – 7.67 (m, 2H), 7.58 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 4.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.11 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 160.58, 148.95, 144.82, 140.86, 137.45, 133.74, 128.62, 127.21, 126.35, 124.99, 124.65, 124.37, 123.35, 118.38, 113.49, 108.29, 88.71, 52.14, 48.40, 34.41, 28.41.

HR-MS (ESI) *m/z*: berechnet für C₂₁H₂₀N₅S⁺ [M⁺]: 374.1434; gefunden [M⁺]: 374.1427.

4-Chlor-1-methylquinolin-1-iumiodid (29)

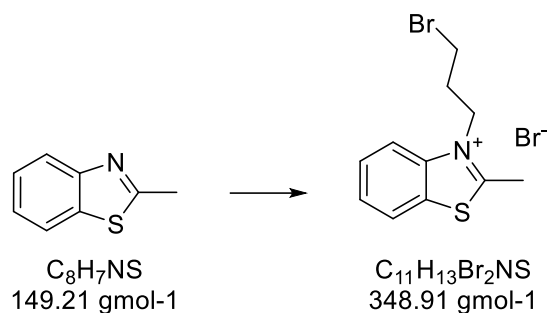


Es wurden 250 mg 4-Chlorchinolin (1.53 mmol, 1.00 Äq) in 6 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurden 0.29 mL Methyljodid (653 mg, 4.60 mmol, 3.00 Äq) zugegeben und 24 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde der Feststoff abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 95 % (442 mg, 1.45 mmol) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 9.11 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 8.87 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 8.54 – 8.45 (m, 1H), 8.44 – 8.38 (m, 1H), 8.33 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 8.23 – 8.08 (m, 1H), 4.54 (s, 3H).

$^1\text{H NMR}$ stimmt mit der Literatur überein.^[155]

3-(3-Bromopropyl)-2-methylbenzo[d]thiazol-3-iumbromid (31)

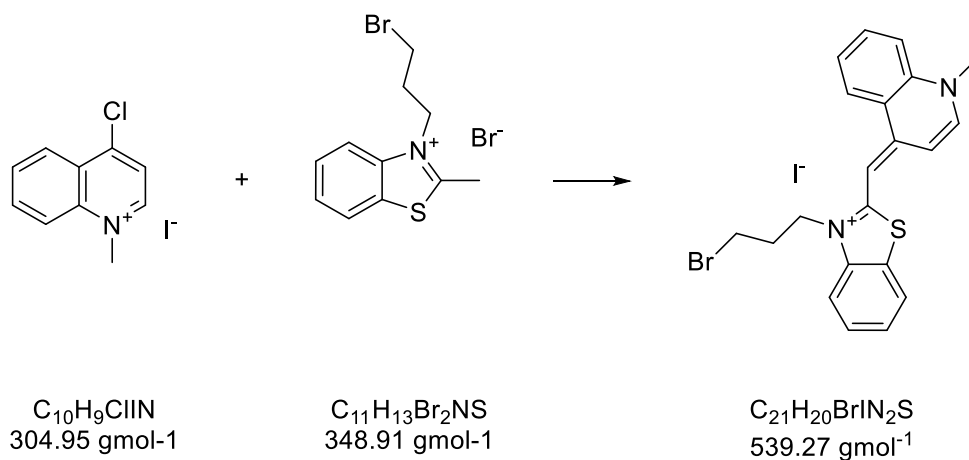


Es wurden 1.29 mL 2-Methylbenzothiazol (1.50 g, 10.1 mmol, 1.00 Äq) und 5.12 mL 1,3-Dibrompropan (10.2 g, 50.3 mmol, 5.00 Äq) in 10 mL Toluol gelöst und für 72 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Diethylether gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als hellroter Feststoff in einer Ausbeute von 8 % (282 mg, 0.808 mmol) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.48 (dd, $J = 8.3, 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 8.39 – 8.32 (m, 1H), 7.91 (ddd, $J = 8.5, 7.3, 1.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.81 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.0 \text{ Hz}$, 1H), 4.86 – 4.78 (m, 2H), 3.74 (t, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.50 – 2.38 (m, 2H).

$^1\text{H NMR}$ stimmt mit der Literatur überein.^[161]

(E)-3-(3-Bromopropyl)-2-((1-methylquinolin-4(1H)-yliden)methyl)benzo[d]thiazol-3-iumiodid (32**)**

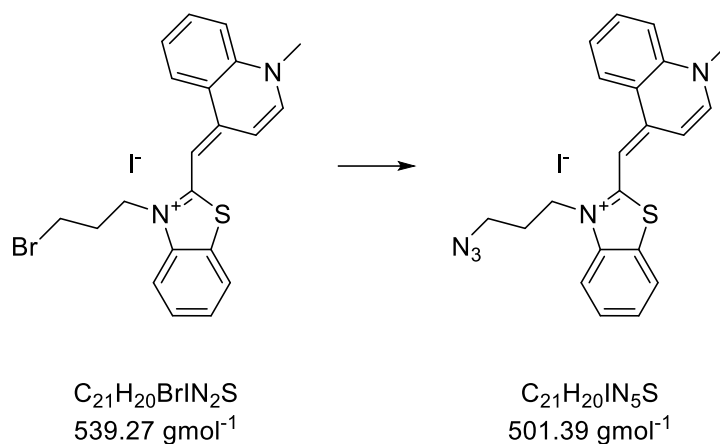


Es wurden 100 mg **29** (0.328 mmol, 1.00 Äq) und 115 mg **31** (0.328 mmol, 1.00 Äq) in 2.5 mL MeOH/DCM 1:1 gelöst. Anschließend wurden 0.14 mL Triethylamin (99.3 mg, 0.984 mmol, 3.00 Äq) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Danach wurden 506 mg Kaliumiodid zugegeben und mit Diethylether ausgefällt. Die Suspension wurde 10 min gerührt, danach wurde der Niederschlag abfiltriert und mit Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen. Das erhaltene Produkt wurde im Vakuum getrocknet und als roter Feststoff in einer Ausbeute von 75 % (133 mg, 0.246 mmol) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.66 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 2H), 7.81 (dt, *J* = 13.3, 6.3 Hz, 2H), 7.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 4.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 4.21 (s, 3H), 3.48 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.39 – 2.31 (m, 2H).

¹H NMR stimmt mit der Literatur überein.^[174]

(E)-3-(3-Azidopropyl)-2-((1-methylquinolin-4(1H)-ylidene)methyl)benzo[d]thiazol-3-iumiodide (TO3)



Es wurden 50.0 mg **32** (0.093 mmol, 1.00 Äq) mit 46.5 mg Natriumiodid (0.310 mmol, 3.33 Äq) und 60.5 mg Natriumazid (0.93 mmol, 10.0 Äq) in 1 mL Dimethylformamid gelöst und über Nacht bei 85 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Diethylether ausgefällt. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert, der Rückstand in DCM/Wasser aufgenommen und bis zum Entfärben der Wasserphase extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingeeengt und der Fluorophor mit Diethylether ausgefällt. Das erhaltene Produkt wurde im Vakuum getrocknet und als dunkelroter Feststoff in einer Ausbeute von 63 % (28.1 mg, 0.056 mmol) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 8.75 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.64 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.10 – 7.97 (m, 3H), 7.77 (dd, J = 17.0, 8.2 Hz, 2H), 7.60 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.45 – 7.31 (m, 2H), 6.92 (s, 1H), 4.65 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.18 (s, 3H), 3.60 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.06 (t, J = 6.9 Hz, 2H).

$^1\text{H NMR}$ stimmt mit der Literatur überein.^[160]

8 Ergänzende Spektren

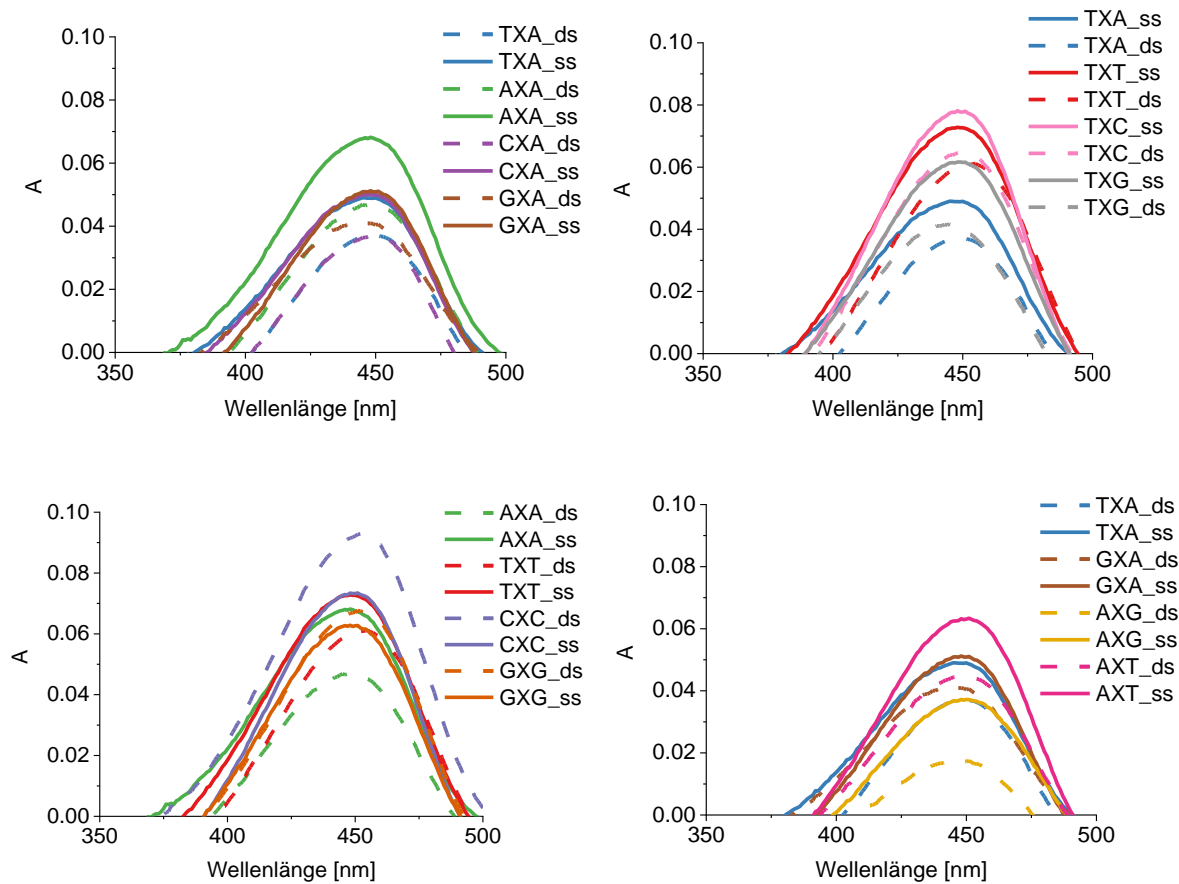
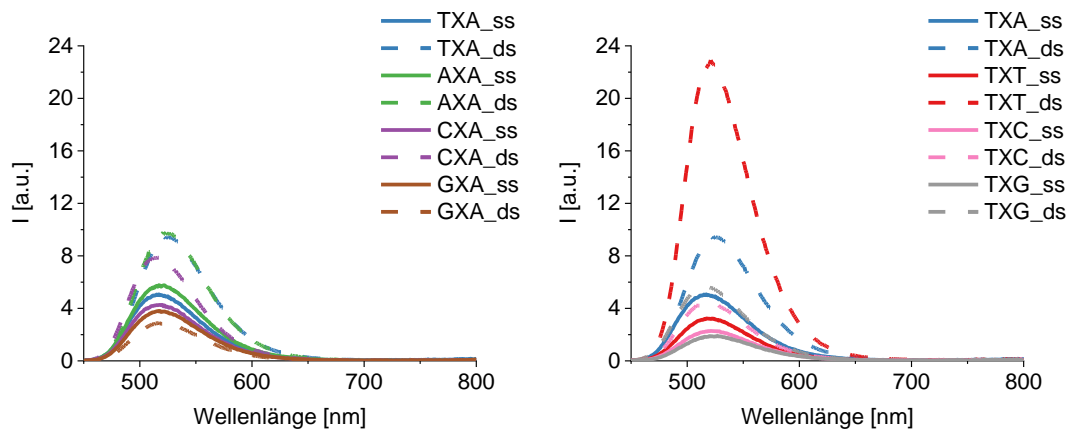


Abbildung 75: Absorptionsspektren des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-VXW** in Abhängigkeit der jeweiligen benachbarten Nucleotide; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$.



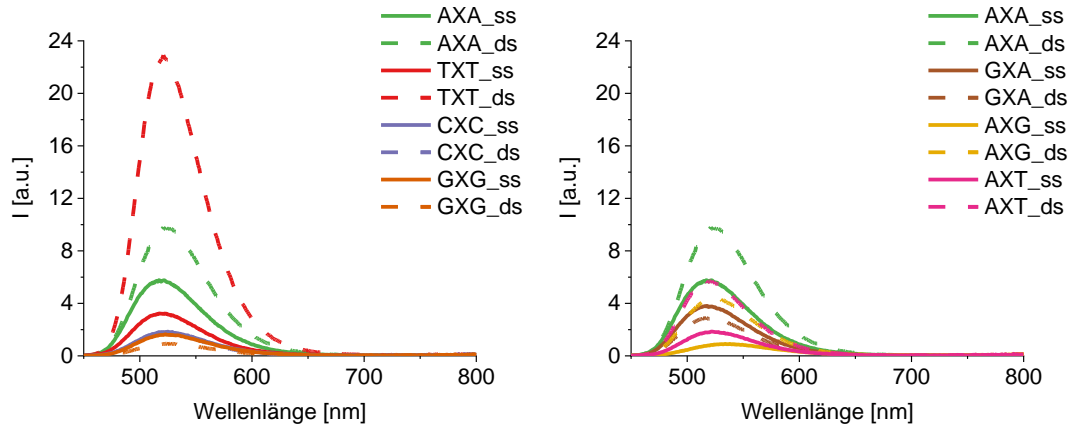
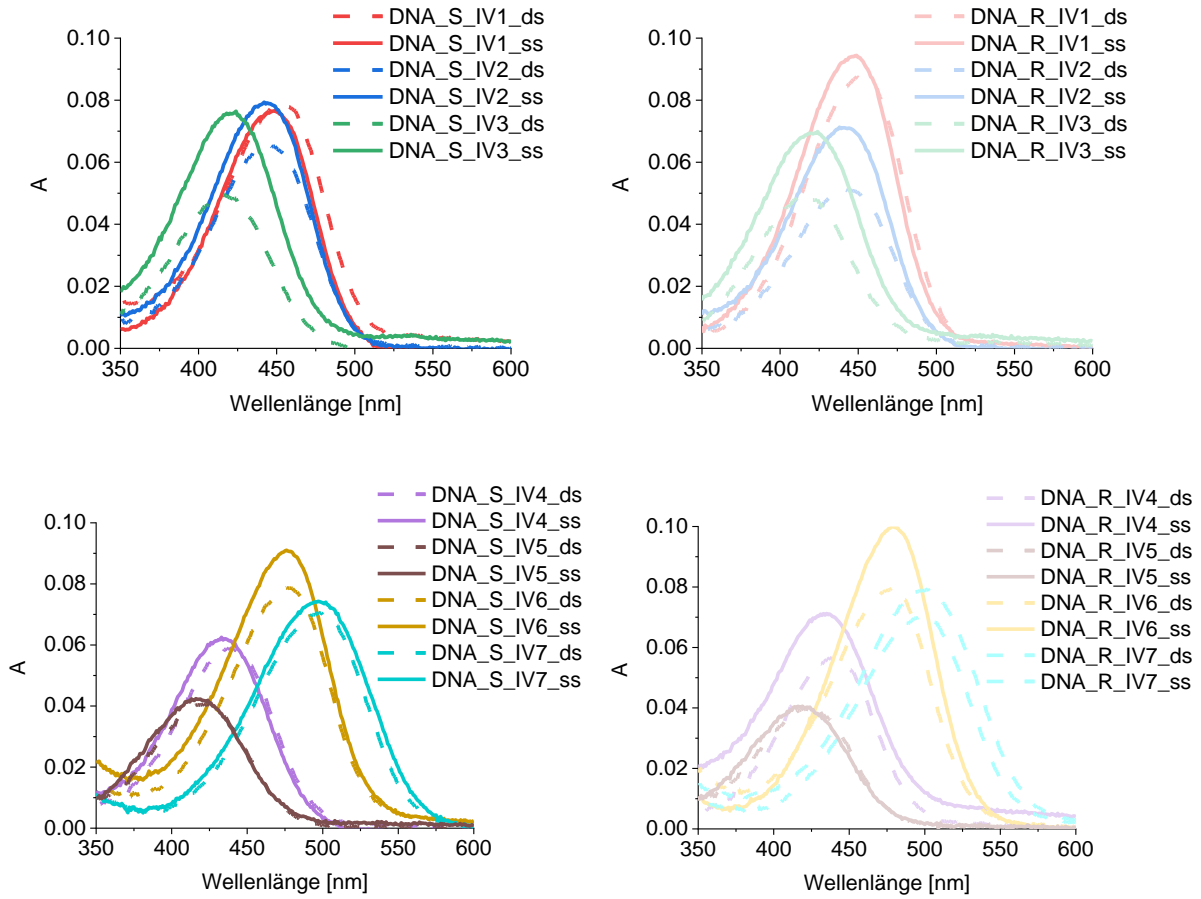


Abbildung 76: Fluoreszenzspektren des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nucleinsäuren **DNA-VXW** in Abhängigkeit der jeweiligen benachbarten Nucleotide; 2.5 μ M **DNA**, 1 μ q **GS**, 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm.



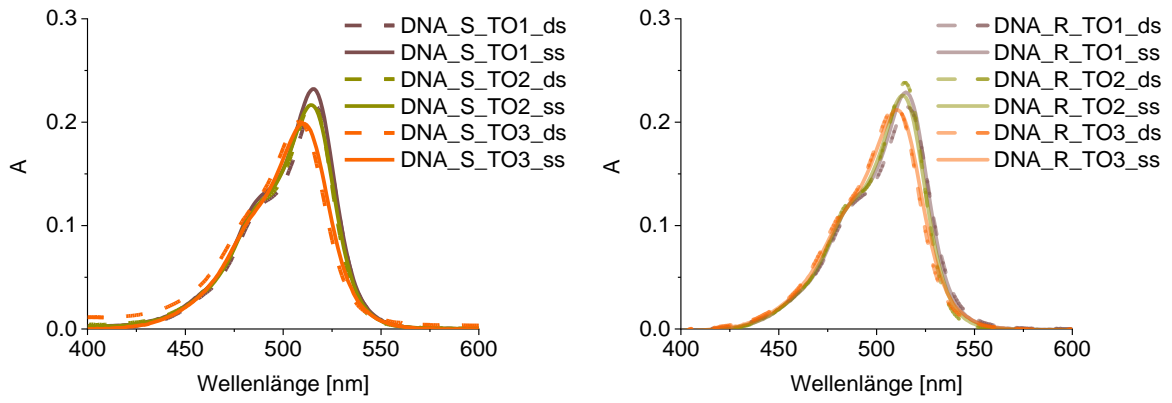
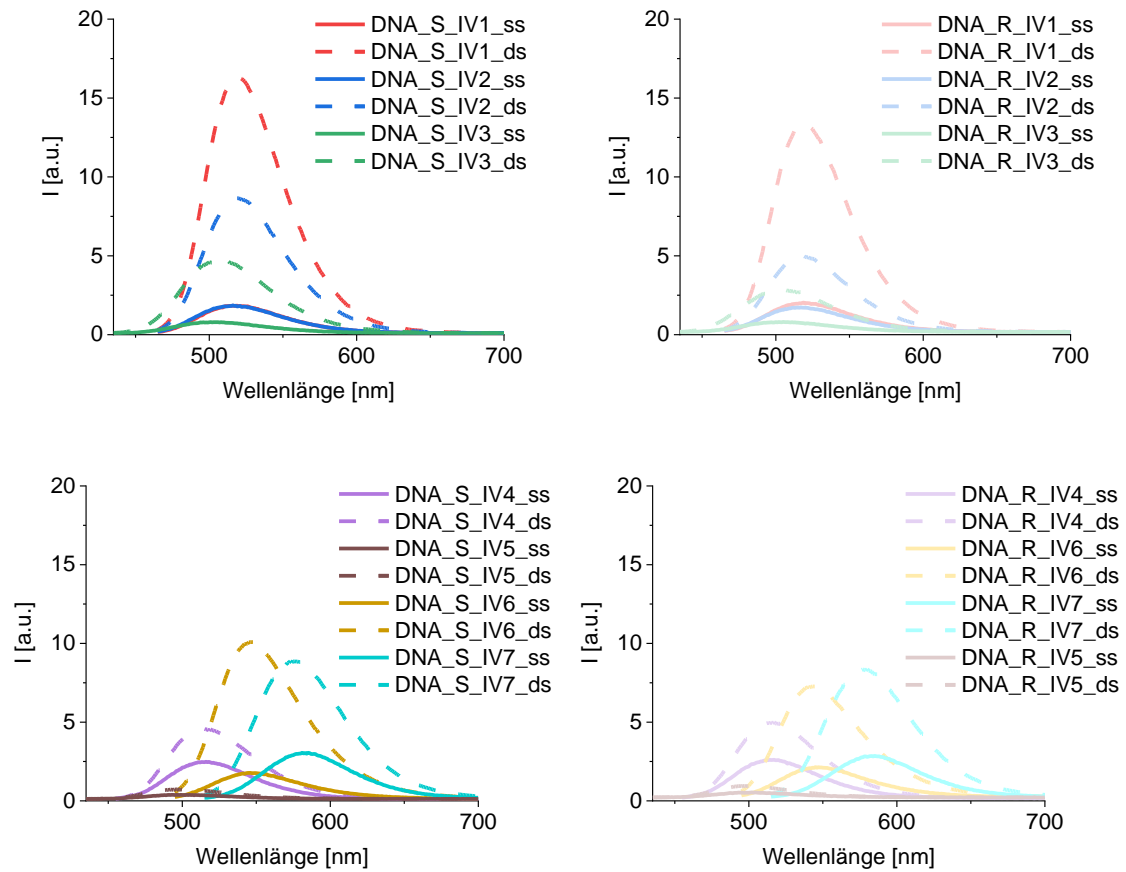


Abbildung 77: Absorptionsspektren der Fluorophore **IV1-7** und **TO1-3** in der unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nukleinsäure **DNA-TXT** in Abhängigkeit der S- bzw. R-konfigurierten Anknüpfung; 2.5 μ M DNA, 1 \AA q GS, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.



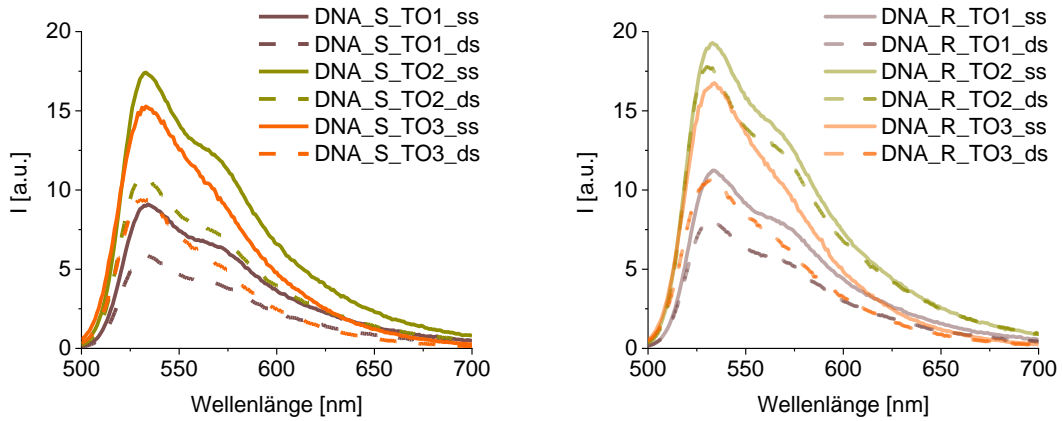


Abbildung 78: Fluoreszenzspektren der Fluorophore **IV1-7** und **TO1-3** in der unhybridisierten (ss) und hybridisierten (ds) Nukleinsäure **DNA-TXT** in Abhängigkeit der S- bzw. R-konfigurierten Anknüpfung; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaPi -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^{\circ}\text{C}$, Anregung im jeweiligen Absorptionsmaximum.

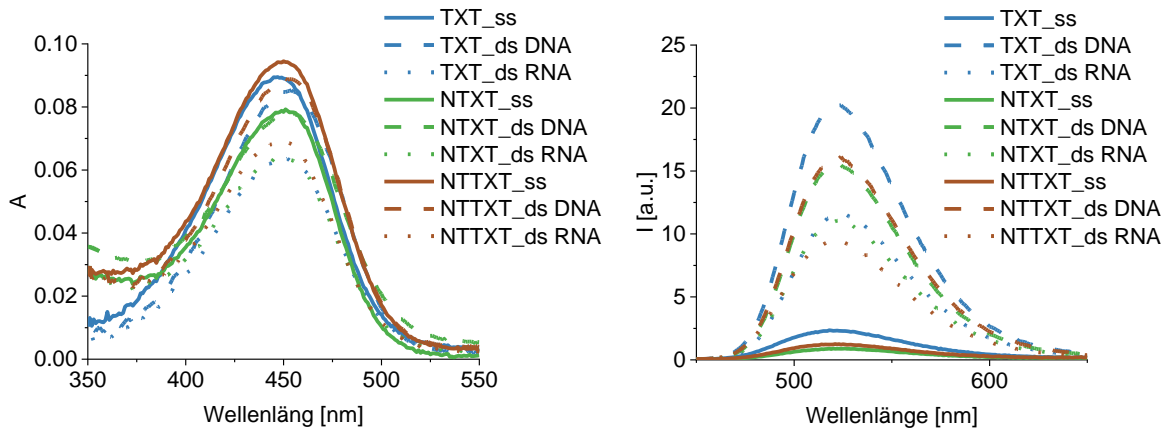
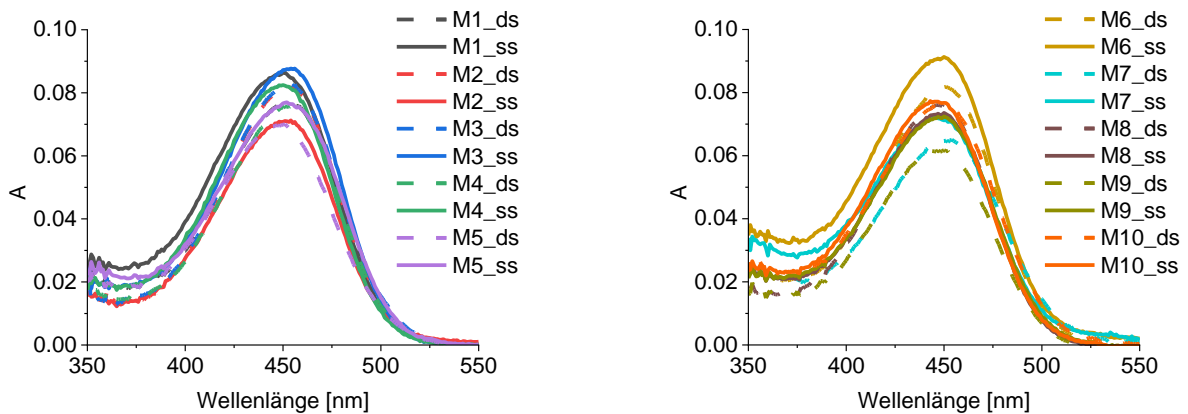


Abbildung 79: Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Fluorophors **IV1** in der unhybridisierten (ss) und mit DNA und RNA hybridisierten (ds) Nukleinsäure **DNA-TXT** in Abhängigkeit der Nitroindolmodifikation; 2.5 μM **DNA**, 1 \AA q **GS**, 10 mM NaPi -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 $^{\circ}\text{C}$, Anregung im jeweiligen Absorptionsmaximum.



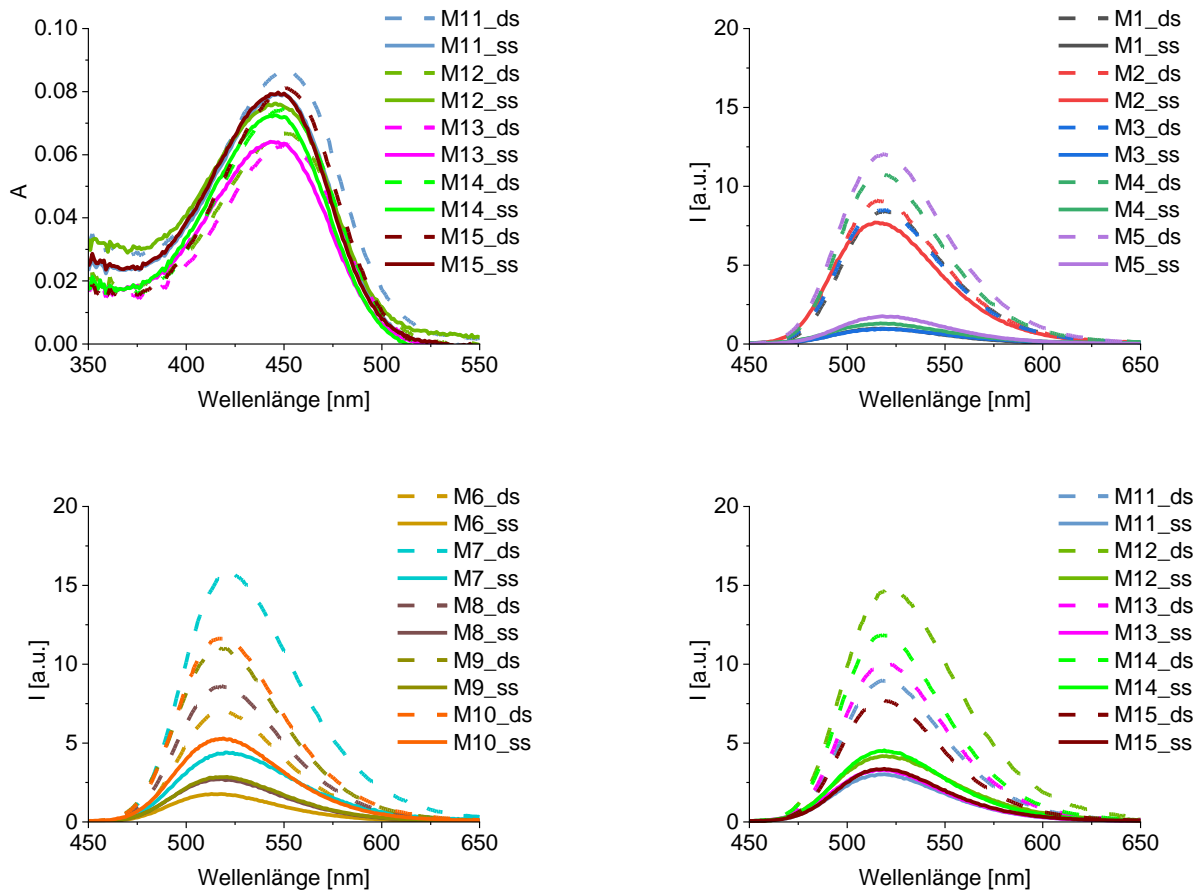


Abbildung 80: Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit DNA hybridisierten (ds) Nucleinsäure **M1-15**; 2.5 μM DNA, 1 \AA q GS, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, Anregung im jeweiligen Absorptionsmaximum.

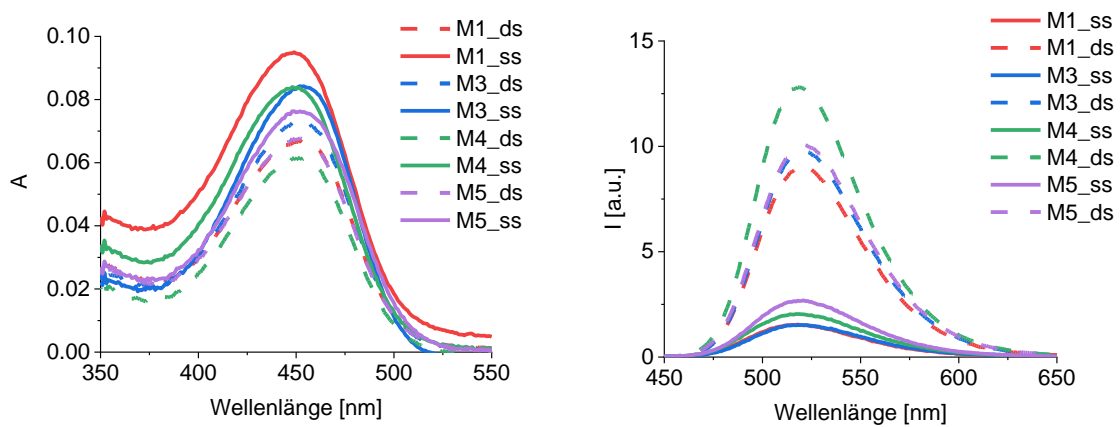


Abbildung 81: Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Fluorophors **IV1** in den unhybridisierten (ss) und mit RNA hybridisierten (ds) Nucleinsäure **M1+3-5**; 2.5 μM DNA, 1 \AA q GS, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, Anregung im jeweiligen Absorptionsmaximum.

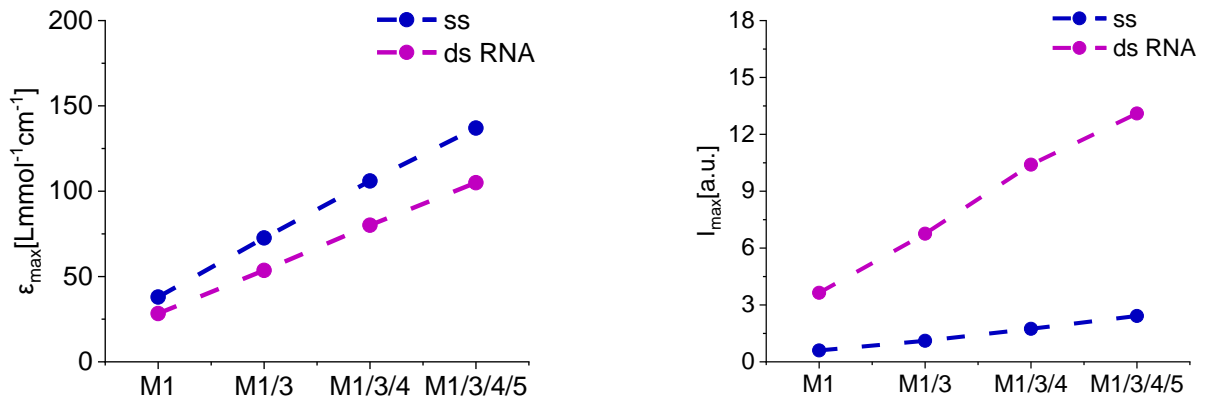


Abbildung 82: Extinktionen (ϵ_{\max}) und Fluoreszenzintensitäten (I_{\max}) im jeweiligen Maximum des Fluorophors IV1 in den unhybridisierten Sondenmischungen **M1**, **M1/3**, **M1/3/4**, **M1/3/4/5** (ss) und mit RNA-Mix (ds RNA) hybridisierten Sonden; 2.5 μ M **DNA**, 1 Äq **GS**, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc.}} = 435$ nm; I_{\max} normiert auf **M1** = 1. Gestrichelte Linien stellen keine Messpunkte dar und dienen nur der besseren Übersichtlichkeit.

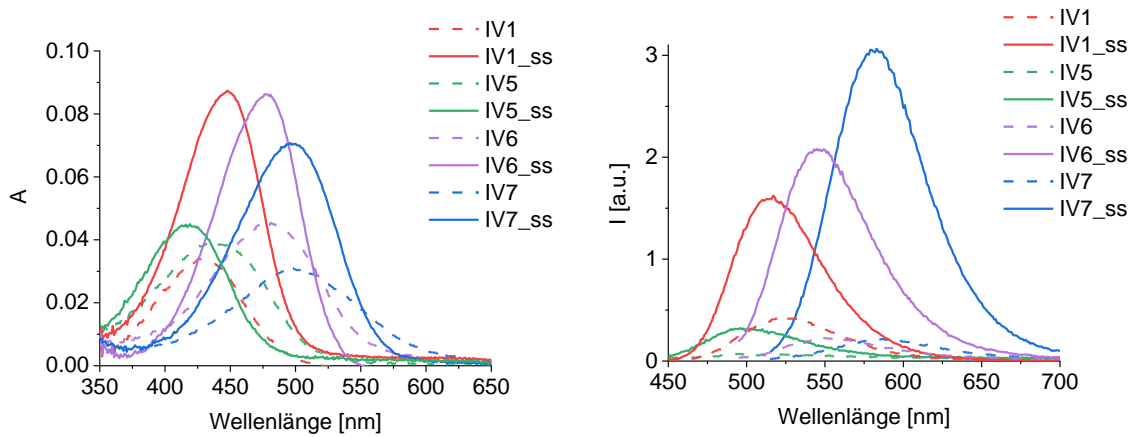


Abbildung 83: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Fluorophore **IV1+5-7** nicht kovalent an DNA gebunden und in den unhybridisierten (ss) Nukleinsäure **DANN-TXT**; 2.5 μ M **DNA**, 1 Äq **GS**, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, Anregung im jeweiligen Absorptionsmaximum.

9 Literaturverzeichnis

- [1] P. Löffler, *Front. Immunol.* **2021**, *12*.
- [2] M. M. Meslé, J. Brown, P. Mook, J. Hagan, R. Pastore, N. Bundle, G. Spiteri, G. Ravasi, N. Nicolay, N. Andrews, T. Dykhanovska, J. Mossong, M. Sadkowska-Todys, R. Nikiforova, F. Riccardo, H. Meijerink, C. Mazagatos, J. Kyncl, J. McMenamain, T. Melillo, S. Kaoustou, D. Lévy-Bruhl, F. Haarhuis, R. Rich, M. Kall, D. Nitzan, C. Smallwood, R. G. Pebody, *Eurosurveillance* **2021**, *26*, 2101021.
- [3] M. J. Mulligan, K. E. Lyke, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, K. Neuzil, V. Raabe, R. Bailey, K. A. Swanson, P. Li, K. Koury, W. Kalina, D. Cooper, C. Fontes-Garfias, P.-Y. Shi, Ö. Türeci, K. R. Tompkins, E. E. Walsh, R. Frenck, A. R. Falsey, P. R. Dormitzer, W. C. Gruber, U. Şahin, K. U. Jansen, *Nature* **2020**, *586*, 589-593.
- [4] U. Sahin, K. Karikó, Ö. Türeci, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 759-780.
- [5] I. Hoerr, R. Obst, H.-G. Rammensee, G. Jung, *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30*, 1-7.
- [6] B. A. Armitage, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 806-812.
- [7] S. Ray, J. R. Widom, N. G. Walter, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4120-4155.
- [8] D. He, K.-W. Wong, Z. Dong, H.-W. Li, *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 7773-7793.
- [9] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147-157.
- [10] P. J. McCown, K. A. Corbino, S. Stav, M. E. Sherlock, R. R. Breaker, *RNA* **2017**, *23*, 995-1011.
- [11] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [12] G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244-251.
- [13] D. D. Rao, J. S. Vorhies, N. Senzer, J. Nemunaitis, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 746-759.
- [14] J. Beermann, M.-T. Piccoli, J. Viereck, T. Thum, *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 1297-1325.
- [15] Z. Qu, D. Adelson, *Front. Gene.* **2012**, *3*, 205.
- [16] M. Széll, Z. Bata-Csörgő, L. Kemény, *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18*, 141-148.
- [17] S. Tyagi, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 331.
- [18] S. Rombouts, M. Nollmann, *FEMS Microbiol. Rev.* **2020**, *45*, 1-13.
- [19] Y. Xia, R. Zhang, Z. Wang, J. Tian, X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2824-2843.

- [20] D. Samanta, S. B. Ebrahimi, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* **2020**, *32*, 1901743.
- [21] A. Okamoto, *Appl. Microsc.* **2019**, *49*, 14.
- [22] W. Xu, K. M. Chan, E. T. Kool, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 1043-1055.
- [23] L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2439-2448.
- [24] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [25] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 044003.
- [26] C. Schwechheimer, F. Rönicke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 6557-6563.
- [27] P. Klimkowski, S. De Ornellas, D. Singleton, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 5943-5950.
- [28] F. Hövelmann, O. Seitz, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 714-723.
- [29] S. Berndl, S. D. Dimitrov, F. Menacher, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 2386-2395.
- [30] N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.
- [31] N. M. Bell, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2691-2703.
- [32] K. H. Shaughnessy, *Molecules* **2015**, *20*, 9419-9454.
- [33] M. J. Gait, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, *2*, 61-68.
- [34] D. Krois, *Organisch-chemische Methoden*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2017**.
- [35] S. Roy, M. Caruthers, *Molecules* **2013**, *18*, 14268.
- [36] A. Schwögler, T. Carell, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1415-1418.
- [37] K. Sato, H. Imai, T. Shuto, R. I. Hara, T. Wada, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 15032-15041.
- [38] M. Mosimann, P. A. Küpfer, C. J. Leumann, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5211-5214.
- [39] A. Vigovskaya, D. Abt, I. Ahmed, C. M. Niemeyer, C. Barner-Kowollik, L. Fruk, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 442-449.
- [40] B. C. Froehler, P. G. Ng, M. D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5399-5407.
- [41] P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4051-4054.
- [42] P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4055-4058.

- [43] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [44] K. Krell, D. Harijan, D. Ganz, L. Doll, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 990-1011.
- [45] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [46] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895-4950.
- [47] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806-8827.
- [48] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
- [49] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [50] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [51] N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7122-7154.
- [52] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [53] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457-460.
- [54] L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500304.
- [55] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [56] J. Franck, E. G. Dymond, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1926**, *21*, 536-542.
- [57] E. Condon, *Phys. Rev.* **1926**, *28*, 1182-1201.
- [58] F. Hinderer, in *UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie: Einführung in die spektroskopische Analyse mit UV- und sichtbarer Strahlung*, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, **2020**.
- [59] B. Valeur, in *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Weinheim, **2012**.
- [60] G. N. Lewis, M. Kasha, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 2100-2116.
- [61] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14-19.
- [62] G. G. Stokes, *Phil. Trans. R. Soc.* **1852**, *142*, 463-562.
- [63] A. K. Gaigalas, L. Wang, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2008**, *113*, 17-28.
- [64] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [65] D. Wöhrle, in *Photochemie*, **1998**, pp. 179-230.

- [66] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.
- [67] G. J. Kavarnos, N. J. Turro, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 401-449.
- [68] J.-L. Mergny, A. S. Boutorine, T. Garestier, F. Belloc, M. Rougée, N. V. Bulychev, A. A. Koshkin, J. Bourson, A. V. Lebedev, B. Valeur, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 920-928.
- [69] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
- [70] A. Arrigo, A. Santoro, M. T. Indelli, M. Natali, F. Scandola, S. Campagna, *PCCP* **2014**, *16*, 818-826.
- [71] H. Lemmetyinen, N. V. Tkachenko, A. Efimov, M. Niemi, *PCCP* **2011**, *13*, 397-412.
- [72] J. G. Gall, M. L. Pardue, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1969**, *63*, 378-383.
- [73] M. L. Pardue, J. G. Gall, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1969**, *64*, 600-604.
- [74] J. G. J. Bauman, J. Wiegant, P. Borst, P. van Duijn, *Exp. Cell Res.* **1980**, *128*, 485-490.
- [75] E. Prudent, D. Raoult, *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *43*, 88-107.
- [76] H. Frickmann, A. E. Zautner, A. Moter, J. Kikhney, R. M. Hagen, H. Stender, S. Poppert, *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43*, 263-293.
- [77] J. E. Landegent, N. Jansen in de Wal, R. W. Dirks, M. van der Ploeg, *Hum. Genet.* **1987**, *77*, 366-370.
- [78] J. B. Lawrence, R. H. Singer, C. A. Villnave, J. L. Stein, G. S. Stein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 463-467.
- [79] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585-590.
- [80] J. M. Levsky, R. H. Singer, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2833-2838.
- [81] A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 877-879.
- [82] F. B. Markey, V. Parashar, M. Batish, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2021**, *12*, e1608.
- [83] A. Orjalo, H. E. Johansson, J. L. Ruth, *Nat. Methods* **2011**, *8*, i-ii.
- [84] 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*, 2214-2218.
- [85] E. V. Volpi, J. M. Bridger, *BioTechniques* **2008**, *45*, 385-409.
- [86] P. R. Böhländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7547-7551.
- [87] B. Y. Michel, D. Dziuba, R. Benhida, A. P. Demchenko, A. Burger, *Front. Chem.* **2020**, *8*.

- [88] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228-1237.
- [89] R. H. E. Hudson, A. Ghorbani-Choghamarani, *Synlett* **2007**, *2007*, 0870-0873.
- [90] J.-W. Jung, S. K. Edwards, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 440-444.
- [91] T. Ono, S. Wang, C.-K. Koo, L. Engstrom, S. S. David, E. T. Kool, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1689-1692.
- [92] S. D. Jhaveri, R. Kirby, R. Conrad, E. J. Maglott, M. Bowser, R. T. Kennedy, G. Glick, A. D. Ellington, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469-2473.
- [93] H.-N. Nguyen, L. Zhao, C. W. Gray, D. M. Gray, T. Xia, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8989-9001.
- [94] M. K. Kuimova, G. Yahioglu, J. A. Levitt, K. Suhling, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6672-6673.
- [95] N. Amdursky, Y. Erez, D. Huppert, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1548-1557.
- [96] M. Weinberger, F. Berndt, R. Mahrwald, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2589-2599.
- [97] G. S. Loving, M. Sainlos, B. Imperiali, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 73-83.
- [98] T. Kimura, K. Kawai, T. Majima, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5829-5832.
- [99] G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440-3450.
- [100] X. Ge, L. Tolosa, G. Rao, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1403-1410.
- [101] S. Yao, K. J. Schafer-Hales, K. D. Belfield, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5645-5648.
- [102] G. Mocz, M. K. Helms, D. M. Jameson, I. R. Gibbons, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9862-9869.
- [103] M. R. Eftink, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 482-501.
- [104] H. Q. Xu, A. H. Zhang, C. Auclair, X. G. Xi, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e70-e70.
- [105] A. S. Klymchenko, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 366-375.
- [106] A. P. Demchenko, Y. Mély, G. Duportail, A. S. Klymchenko, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 3461-3470.
- [107] I. A. Karpenko, R. Kreder, C. Valencia, P. Villa, C. Mendre, B. Mouillac, Y. Mély, M. Hibert, D. Bonnet, A. S. Klymchenko, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 359-363.
- [108] V. V. Shynkar, A. S. Klymchenko, C. Kunzelmann, G. Duportail, C. D. Muller, A. P. Demchenko, J.-M. Freyssinet, Y. Mely, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2187-2193.
- [109] K. Enander, L. Choulier, A. L. Olsson, D. A. Yushchenko, D. Kanmert, A. S. Klymchenko, A. P. Demchenko, Y. Mély, D. Altschuh, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1864-1870.

- [110] D. A. Yushchenko, J. A. Fauerbach, S. Thirunavukkuarasu, E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7860-7861.
- [111] J. Karpenko, Y. Niko, V. P. Yakubovskiy, A. O. Gerasov, D. Bonnet, Y. P. Kovtun, A. S. Klymchenko, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 3002-3009.
- [112] I. López-Duarte, T. T. Vu, M. A. Izquierdo, J. A. Bull, M. K. Kuimova, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5282-5284.
- [113] R. W. Sinkeldam, A. J. Wheat, H. Boyaci, Y. Tor, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 567-570.
- [114] I. A. Karpenko, M. Collot, L. Richert, C. Valencia, P. Villa, Y. Mély, M. Hibert, D. Bonnet, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 405-412.
- [115] M. Collot, R. Kreder, A. L. Tatarets, L. D. Patsenker, Y. Mely, A. S. Klymchenko, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17136-17139.
- [116] H. Ucar, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 10048-10053.
- [117] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [118] Y. Hara, T. Fujii, H. Kashida, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5502-5506.
- [119] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 402-405.
- [120] H. Asanuma, M. Akahane, N. Kondo, T. Osawa, T. Kato, H. Kashida, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3165-3169.
- [121] H. Asanuma, M. Akahane, R. Niwa, H. Kashida, Y. Kamiya, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4315-4319.
- [122] K. Murayama, Y. Kamiya, H. Kashida, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1298-1301.
- [123] K. Murayama, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 120-128.
- [124] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4263-4266.
- [125] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.
- [126] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H.-A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 890-894.
- [127] A. Tsuji, H. Koshimoto, Y. Sato, M. Hirano, Y. Sei-Iida, S. Kondo, K. Ishibashi, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 3260-3274.
- [128] G. Barnoin, J. Shaya, L. Richert, H.-N. Le, S. Vincent, V. Guérineau, Y. Mély, B. Y. Michel, A. Burger, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, e72-e72.
- [129] S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, H. Yanagisawa, S. Tsuruma, A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 546-551.

- [130] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [131] L. Guo, A. Okamoto, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 9406-9409.
- [132] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.
- [133] F. Hövelmann, L. Bethge, O. Seitz, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2072-2081.
- [134] A. Knoll, S. Kankowski, S. Schöllkopf, J. C. Meier, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 14817-14820.
- [135] J. Chamiolo, G.-m. Fang, F. Hövelmann, D. Friedrich, A. Knoll, A. Loewer, O. Seitz, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 595-604.
- [136] W. Schmucker, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2012**, *23*, 2435-2448.
- [137] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388-1405.
- [138] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [139] O. W. Gooding, C. C. Beard, D. Y. Jackson, D. L. Wren, G. F. Cooper, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1083-1088.
- [140] N. Kojima, N. Maezaki, H. Tominaga, M. Asai, M. Yanai, T. Tanaka, *Chemistry* **2003**, *9*, 4980-4990.
- [141] L. J. Patalag, P. G. Jones, D. B. Werz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13340-13344.
- [142] K. J. Ralston, H. C. Ramstadius, R. C. Brewster, H. S. Niblock, A. N. Hulme, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 7192-7196.
- [143] J. S. Yadav, M. C. Chander, B. V. Joshi, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2737-2740.
- [144] M. Lopp, T. Kanger, A. Miiraus, T. Pehka, Ü. Lille, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 943-944.
- [145] M. Barbazanges, C. Meyer, J. Cossy, P. Turner, *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 4480-4495.
- [146] C. Raji Reddy, N. N. Rao, P. Sujitha, C. G. Kumar, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 1819-1824.
- [147] H. Collet, P. Calas, A. Commeyras, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 1152-1153.
- [148] V. C. Christov, J. G. Ivanova, *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2231-2244.
- [149] C. F. Zhao, G. S. He, J. D. Bhawalkar, C. K. Park, P. N. Prasad, *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 1979-1983.
- [150] C. Schwechheimer, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe **2018**.
- [151] T. Šmidlehner, A. Kurutos, J. Slade, R. Belužić, D. L. Ang, A. Rodger, I. Piantanida, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 1682-1692.

- [152] T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, K.-H. Drexhage, R. W. Sabnis, *Dyes Pigm.* **1995**, *29*, 315-322.
- [153] T. G. Deligeorgiev, D. A. Zaneva, S. H. Kim, R. W. Sabnis, *Dyes Pigm.* **1998**, *37*, 205-211.
- [154] Y. Shimizu, T. Temma, I. Hara, R. Yamahara, E.-i. Ozeki, M. Ono, H. Saji, *J. Fluoresc.* **2012**, *22*, 719-727.
- [155] N. I. Shank, H. H. Pham, A. S. Waggoner, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 242-251.
- [156] G. B. Cserép, K. N. Enyedi, A. Demeter, G. Mező, P. Kele, *Chem. - Asian J.* **2013**, *8*, 494-502.
- [157] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.
- [158] S. Ikeda, A. Okamoto, *Chem. - Asian J.* **2008**, *3*, 958-968.
- [159] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 1239-1248.
- [160] J. Qiu, A. Wilson, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, e138-e138.
- [161] Y.-J. Lu, Z.-Y. Wang, D.-P. Hu, Q. Deng, B.-H. Huang, Y.-X. Fang, K. Zhang, W.-L. Wong, C.-F. Chow, *Dyes Pigm.* **2015**, *122*, 94-102.
- [162] Y. Li, N. Sun, H.-L. Ser, W. Long, Y. Li, C. Chen, B. Zheng, X. Huang, Z. Liu, Y.-J. Lu, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 15000-15014.
- [163] S. Doose, H. Neuweiler, M. Sauer, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1389-1398.
- [164] G. Hwang, *Molecules* **2018**, *23*, 124.
- [165] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.
- [166] C. Winkler, M. Schäfer, J. Duschl, M. Scharl, J.-N. Volff, *Genome Res.* **2003**, *13*, 1067-1081.
- [167] E. Gramage, J. Li, P. Hitchcock, *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 913-923.
- [168] L. Doll, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2020**.
- [169] F. Lang, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2021**.
- [170] L. Jin, R. V. Lloyd, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **1997**, *11*, 2-9.
- [171] P. R. Bohländer, T. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9223-9230.
- [172] Y. Zhang, J. Wang, P. Jia, X. Yu, H. Liu, X. Liu, N. Zhao, B. Huang, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4582-4588.
- [173] H. Fei, J. Yu, Y. Jiang, H. Guo, J. Cheng, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7092-7095.
- [174] W. Long, Y.-J. Lu, K. Zhang, X.-H. Huang, J.-Q. Hou, S.-Y. Cai, Y. Li, X. Du, L. G. Luyt, W.-L. Wong, C.-F. Chow, *Dyes Pigm.* **2018**, *159*, 449-456.

10 Appendix

10.1 Publikationen

N. Gaß, J. Gebhard, H.-A. Wagenknecht, *ChemPhotoChem* **2017**, *1*, 48-50.

10.2 Konferenzen und Posterbeiträge

07/2019 Summer School 2019 - Nucleic acid chemistry and synthetic biology,
Würzburg, **2019**

*Synthesis and Characterization of new fluorogenic “clickable” DNA
hybridization probes* (Poster)

09/2019 IX. Nukleinsäurechemietreffen (Saarbrücken, Deutschland)

*Synthesis and Characterization of new fluorogenic “clickable” DNA
hybridization probes* (Poster)

10.3 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 16.03.2022

Julian Gebhard