Synthese neuer fluoreszenter Oligonukleotide als potenzielle Sonden für N^6-Methyladenosin in DNA und RNA

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

M. Sc. Anna-Lena Ruopp

aus Engen

1. Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
2. Referent: Prof. Dr. Michael Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2025

Meiner Familie

"Wit beyond measure is man's greatest treasure."

Luna Lovegood –

Harry Potter and the Order of the Phoenix

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2022 bis Dezember 2025 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht, für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die ausgezeichnete Betreuung während der letzten drei Jahre bedanken. Ihre Tür stand jederzeit für Fragen offen und Sie konnten mir immer den einen oder anderen guten Ratschlag mitgeben. Dennoch ließen Sie mir auch den nötigen Freiraum, um mich als Wissenschaftlerin weiterentwickeln zu können. Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Meier für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und auch ehemaligen Kollegen des AKWs für eine unvergessliche Zeit bedanken. Insbesondere die Mittagspausen mit teilweise sehr „interessanten“ Themen waren mit euch immer ausgesprochen unterhaltsam. Vielen Dank für die großartige Gemeinschaft, die wissenschaftliche Unterstützung und die vielen gemeinsamen Erlebnisse.

Ein großes Dankeschön geht an Claudia Sommer und Ariane Kahl. Eure Tür stand für alle organisatorischen und administrativen Herausforderungen weit offen und ihr konntet egal für jedes Problem eine passende Lösung finden.

Des Weiteren möchte ich mich bei Annette Hochgesand, Lara Hirsch und Silas Leidenheimer für die zahlreichen Bestellungen aller benötigten Materialien bedanken. Danke, Lara und Annette, dass ihr so viele MALDI- und ESI-Messungen für mich durchgeführt habt. Zudem danke ich Dr. Andreas Rapp für die Betreuung und die Problembehebung der NMR-Spektrometer.

Außerdem möchte ich mich bei Jan Kunzmann und Max Flügge für das Korrekturlesen dieser Arbeit ganz besonders bedanken.

Ein riesiges Dankeschön geht an mein Labor 205 mit Sabrina und Max. Ich durfte das letzte Jahr meiner Promotion eine unglaublich tolle und auch lustige Zeit mit euch verbringen. Ihr habt mich stets aufgeheitert, wenn es im Labor mal nicht so lief,

wie ich wollte. Max, deine unglaubliche Begeisterung für Chemie jeglicher Art hat auch mich teilweise angesteckt. Danke für deinen wissenschaftlichen Input.

Auch möchte ich mich bei meiner fleißigen Vertieferstudentin Liana Bauer und meinem HiWi Florian Dicks für eure Unterstützung bei meiner Forschung bedanken.

Cindy Konstantin, dir möchte ich danken, dass du mir das Arbeiten mit Oligonukleotiden und insbesondere das RNAse freie Arbeiten beigebracht hast. Danke, Lukas Frey, dass du neben deiner eigenen Arbeit noch so unzählig viele MALDI-Proben für mich gemessen hast. Und danke auch, Pascal Rauthe, dass du mir bei den TCSPC-Messungen und auch der Auswertung der Daten geholfen hast.

Mathis Mitha, dir gilt mein besonderer Dank, da du mich mit deiner unglaublich großen Expertise sowohl bei spektroskopischen Daten als auch bei der chemischen Synthese weitreichend unterstützt hast.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Jan als meinem Leidensgenossen bedanken. Wir haben die Letzen zwei Jahre sehr eng an ähnlichen Themen zusammengearbeitet. Ohne dich wäre ich vermutlich viel öfter an meinen DNA-Synthesen und Datenauswertungen verzweifelt. Danke dir, dass du mir immer eine große Hilfe und Motivation warst.

Dann möchte ich mich noch bei meinen Studienfreunden aus Konstanz bedanken. Schon im Mathe-Vorkurs hat sich unser Beauty-Block gebildet. Danke an Nina, Julia, Robin, Leni und Carina für all diese schönen, aber auch anstrengenden Jahre Chemiestudium. Danke für so unfassbar viel Unterstützung und Zusammenhalt. Ganz besonders möchte ich mich hier bei Carina bedanken. Du wurdest in dieser Zeit zu meiner besten Freundin. Wir haben zusammen gelacht und geweint und du stehst bis heute immer mit Rat und Tat zur Seite ♡

Auch meinen Freunden außerhalb der Chemie gilt ein großes Dankeschön. Danke, Hannah, Luca, Theresa und Sophia. Bei euch konnte ich in stressigen Zeiten den nötigen Abstand finden und einfach mal Spaß haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an Philipp. Seit ich nach Karlsruhe gezogen bin, bist du immer für mich da gewesen und hast mir vor allem während meiner Schreibphase immer den Rücken gestärkt und mich ganz großartig unterstützt. Danke, mein Schatz.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern Hans-Peter und Beatrice dafür, dass ihr immer hinter meinen Träumen steht und mich mein Leben lang unterstützt habt. Ihr habt mir so unheimlich viel ermöglicht. Auch meinem Bruder Jonathan möchte ich danken. Danke, dass du immer fest daran geglaubt hast, dass ich es bis zum Doktor schaffen kann. Und danke auch an mein Pferd Courly, dass ich mit dir immer den nötigen sportlichen Ausgleich finden kann und dass du mich seit dreizehn Jahren durch dick und dünn begleitet hast.

Inhaltsverzeichnis

1 Motivation und Themenstellung 1

2 Theoretischer Hintergrund 5

2.1 Fluoreszenzsonden in Nukleinsäuren 5

2.2 Fluoreszente Basensurrogate 7

2.2.1 4-Aminophthalimid als fluoreszentes Basensurrogat 10

2.3 Dichromophorsysteme in Oligonukleotiden 17

2.3.1 Molecular Beacons 17

2.3.2 Inter- und Intrastrangwechselwirkungen von fluoreszenten Dimeren 19

2.3.3 Verschiedene nicht ribosebasierte Linker zur Verknüpfung der Chromophore 27

2.4 Methylierung von Nukleinsäuren als wichtige Reporterfunktion in Zellen 29

2.4.1 DNA-Methylierung 29

2.4.2 RNA-Methylierung 31

3 4-Aminophthalimid als Sonde für N^6-Methyladenosin 35

3.1 Synthese des *o*-4API-Phosphoramiditbausteins 36

3.2 Synthese der Oligonukleotide 41

3.2.1 Synthese der *o*-4API-Stränge 42

3.2.2 Synthese der N^6-Methyladenosin-Stränge 43

3.3 Spektroskopische Untersuchungen 44

3.3.1 Optische Charakterisierung der RNA-RNA-Duplexe 45

3.3.2 Optische Charakterisierung der DNA-RNA-Hybridduplexe 52

3.4 Vergleich der verschiedenen Duplexe 55

3.5 Ausblick 57

4 Dichromophorsyteme in DNA und deren mögliche Anwendung zur N^6-Methyladenosin Detektion 59

4.1 Synthese der Chromophorbausteine 66
4.1.1 Synthese der Phosphoramidite der Chromophore DMANI1 und DMANI2 66
4.1.2 Synthese des Phosphoramidits des PANI-Chromophors 68
4.1.3 Synthese der Phosphoramidite der Chromophore ANI1 und ANI2 68
4.1.4 Synthese der Phosphoramidite der Chromophore NDI1 und NDI2 71
4.2 Synthese der DNA-Stränge 73
4.3 Optische Charakterisierung der Monomer-Duplexe und Interstrangdimer-Duplexe 76
4.3.1 Charakterisierung der DMANI1- und DMANI2-modifizierten DNA 76
4.3.2 Charakterisierung der mit ANI1 oder ANI2 modifizierten DNA 80
4.4 Optische Charakterisierung der Intrastrangdimere auf ihre Eignung als Sonde für N^6-Methyladenosin 84
4.4.1 Untersuchung der DNA–DNA-Duplexe 84
4.4.2 Untersuchung der DNA–RNA-Duplexe 92
4.5 Charakterisierung der mit NDI modifizierten Oligonukleotide 98
4.6 Zusammenfassung und Ausblick 102

5 Zusammenfassung 105

6 Experimentalteil 107

6.1 Materialien, Methoden und Geräte 107
6.2 Synthesevorschriften 112
6.3 Oligonukleotide 151
6.3.1 Synthese der modifizierten DNA 151
6.3.2 Arbeiten mit RNA 162
6.3.3 Synthese der modifizierten RNA 162
6.3.4 Charakterisierung der Oligonukleotide 171

7 Bildquellenverzeichnis 173

8 Literaturverzeichnis 175

9 Appendix 187

9.1 Unterstützende spektroskopische Daten 187

9.1.1 NMR- und Massespektren der Verbindungen 187

9.1.2 HPLC- und Massespektren der Oligonukleotide 224

9.1.3 Absorptionsspektren der *o*-4API-modifizierten Stränge 254

9.1.4 Schmelztemperaturspektren 255

9.1.5 Übersicht Fluoreszenzlebensdauern 266

9.2 Publikationsliste 268

9.3 Konferenzen und Posterbeiträge 269

9.4 Lehre 270

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
®	registrierte Warenmarke
°	Grad
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
4API	4-Aminophthalimid
A	2'-Desoxyadenosin
a	Adenosin
a.u.	*arbitrary unit*
Abs.	Absorption
AcOH	Essigsäure
ANI	Aminonaphthalimid
Äq.	Äquivalent
arom.	aromatisch
BSA	*N,O*-Bis(trimethylsilyl)-acetamid
C	2'-Desoxycytosin
CDI	Carbonyldiimidazol
CPG	*controlled pore glass*
d	Duplett
Da	Dalton
DAPym	Diaminopyrimidin
DBU	Diazabicycloundecen
DCM	Dichlormethan
ddH_2O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMANI	Dimethylamino-naphthalimid
DMAPI	4-*N,N*-Dimethylamino-phthalimid
DMF	Dimethylformamid
DMF-DMA	Dimethylformamid-dimethylacetal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DMTrCl	Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	de-novo-Methyltransferase
EE	Essigsäureethylester
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
FFT	*fast Fourier transformation*
Fl.	Fluoreszenz
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
G	2'-Desoxyguanosin
g	Guanosin
g	Gramm
h	Stunde
HMDS	Hexamethyldisilazan

HPLC	*high pressure liquid chromatography*
Hz	Hertz
I	Intensität
ICT	intramolekularer Ladungstransfer
LED	*ligth emitting diode*
m	*meta*
M	Molar
m^1a	N^1-Methyladenosin
m^5C	5-Methyl-2‘-Desoxycytosin
m^5c	5-Methylcytosin
m^6A	N^6-Methyl-2‘-Desoxyadenosin
m^6a	N^6-Methyladenosin
m^7g	7-Methylguanosin
MALDI	*Matrix assisted laser desorption ionization*
MeCN	Acetonitril
MEOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mRNA	Boten-RNA (*messenger* RNA)
MS	Massenspektroskopie
NaP_i	Natriumphosphatpuffer
NDI	Naphthaldiimid
NEt_3	Triethylamin
NH_4OAc	Ammoniumacetat
NIS	*N*-Iodsuccinimid
nm	Nanometer
NMR	*Nuclear magnetic resonance*
NPEOC	4-(2-Nitrophenyl)-ethoxycarbonyl
NPE-OH	2-(4-Nitrophenyl)-ethanol
o	*ortho*
p.a.	*pro analysis*
Pac	Phenoxyacetyl
PA-Cl	2-Cyanoethyl-N,N-Diisopropylchlor-phosphoramidit
PBI	Perylenbisimid
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
ppm	*parts per million*
q	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Singlulett
S_n	Singulett-Zustand n
snRNA	*small nuclear* RNA
T	2‘-Desoxythymidin
t	Triplett
t	Zeit

TBAF	Tetrabutylammonium-fluorid
TBDMS	*tert*-Butyldimethylsilyl
TBDMSCl	*tert*-Butyldimethylsilyl-chlorid
TCSPC	*time correlated single photon counting*
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TICT	*twisted intramolecular charge transfer*
$TIPDSiCl_2$	1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan
T_m	Schmelztemperatur
TO	Thiazol Orange
tRNA	Transport-RNA
™	nicht registrierte Warenmarke
u	Uridin
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vgl.	Vergleich
VIS	sichtbares Licht
α	Rotationswinkel der Übergansdipolmomente
Δ	Delta
ε_{260}	Extinktionskoeffizient bei 260 nm
Θ	Versatzwinkel der Übergansdipolmomente
λ	Wellenlänge
$\lambda_{Abs.}$	Absorptionsmaximum
$\lambda_{Exc.}$	Anregungswellenlänge
$\lambda_{Fl.}$	Fluoreszenzmaximum
σ	Hammett-Konstante
τ	Fluoreszenzlebenszeit
$\tau_{ø}$	Mittlere Fluoreszenzlebenszeit
Φ	Fluoreszenz-quantenausbeute

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

„An understanding of the molecular Structure of the nucleic acids should be of value in the effort to understand the fundamental phenomena of life."[1]

Seit diesem Zitat von Linus Pauling im Jahr 1953 hat sich gezeigt, dass Nukleinsäuren weit mehr sind als nur passive Informationsträger. Sie sind dynamische, regulierbare Systeme, deren chemische Modifikation tiefgehend in zelluläre Prozesse eingreift. Besonders in der RNA spielen posttranskriptionelle Modifikationen eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Genexpression. Durch gezielte chemische Veränderungen lassen sich Struktur, Stabilität, Faltung und Wechselwirkungen von RNA-Molekülen gezielt beeinflussen. Unter den bisher bekannten über 170 RNA-Modifikationen zählt N^6-Methyladenosin (m^6a) zu einer der häufigsten und biologisch relevantesten.[2] Diese Modifikation wirkt sich auf RNA-Stabilität, Translationseffizienz alternatives Spleißen aus und steht im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wie Krebs, neurodegenerativen Störungen oder Virusinfektionen.[3-4] Trotz ihrer biologischen Relevanz bleibt eine selektive und empfindliche Detektion einzelner RNA-Modifikationen auf molekularer Ebene eine Herausforderung. Konventionelle Methoden beruhen meist auf enzymatischen oder immunchemischen Ansätzen, die nur eine begrenzte räumliche Auflösung bieten und kaum Echtzeituntersuchungen zulassen.[5-6]

Fluoreszenzbasierte Detektionsstrategien stellen daher eine attraktive Alternative dar, da sie eine nicht-invasive, hochsensitive und ortsaufgelöste Beobachtung molekularer Prozesse ermöglichen. Insbesondere ermöglicht der Einsatz fluoreszenter Basensurrogate die direkte Untersuchung von Hybridisierungsprozessen oder Basenmodifikationen. Die Herausforderung besteht allerdings darin, Chromophore zu entwickeln, die strukturell mit den Nukleobasen kompatibel sind, eine ausreichende Fluoreszenzquantenausbeute besitzen und gleichzeitig empfindlich und selektiv auf Veränderungen in ihrer Mikroumgebung reagieren.[7]

Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Charakterisierung verschiedener Fluoreszenzsonden, die eine selektive Detektion der N^6-Methyladenosin-Modifikation in Nukleinsäuren ermöglichen sollten. Dabei sollten verschiedene Detektionsmechanismen untersucht werden.

Im ersten Ansatz wurde das *o*-4-Aminophthalimid (***o*-4API**) als komplementäres Basensurrogat für Adenosin eingeführt. Aufgrund seiner ausgeprägten solvatofluorochromen Eigenschaften reagiert der Chromophor äußerst sensibel auf Veränderungen der lokalen Umgebung.[8] Der Austausch eines unmodifizierten Adenosins durch m^6a sollte demnach zu einer deutlichen Veränderung der Fluoreszenz führen (Abbildung 1).

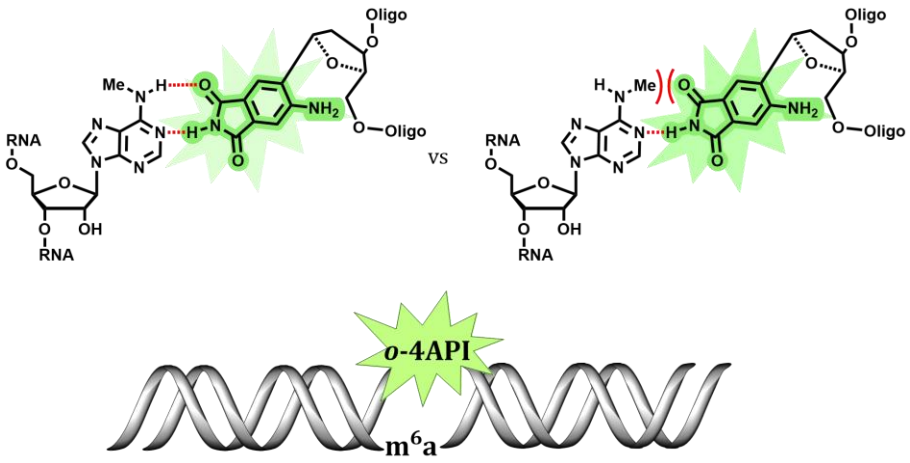


Abbildung 1: Funktionsprinzip des ***o*-4API**-Basensurrogats zur Verwendung als potenzielle m^6a-Sonde.

Im zweiten Ansatz sollten verschiedene Aminonaphthalimid- und Naphthaldiimid-basierte Chromophore synthetisiert werden. Im Anschluss sollen diese über unterschiedlich lange Linkersysteme als Monomere und Dimere in DNA eingebaut werden. Ziel war es, die optischen Eigenschaften von Inter- und Intrastrang-Dimeren zu untersuchen und mit denen der entsprechenden Monomere zu vergleichen. Zudem sollte das Intrastrangdimer als potenzielle Sonde für die m^6a-Modifikation konzipiert werden. Dabei sind die zwei Chromophore, wie eine molekulare Klammer, um ein Thymin angeordnet. Durch Anwesenheit von m^6a anstelle von Adenosin im komplementären Strang nimmt die Anzahl an

ausgebildeten Wasserstoffbrücken zu Thymin ab. Dadurch soll es zu einer verstärkten Wechselwirkung zwischen den Chromophoren kommen, die sich in einer charakteristischen Änderung der Emission äußert (Abbildung 2).

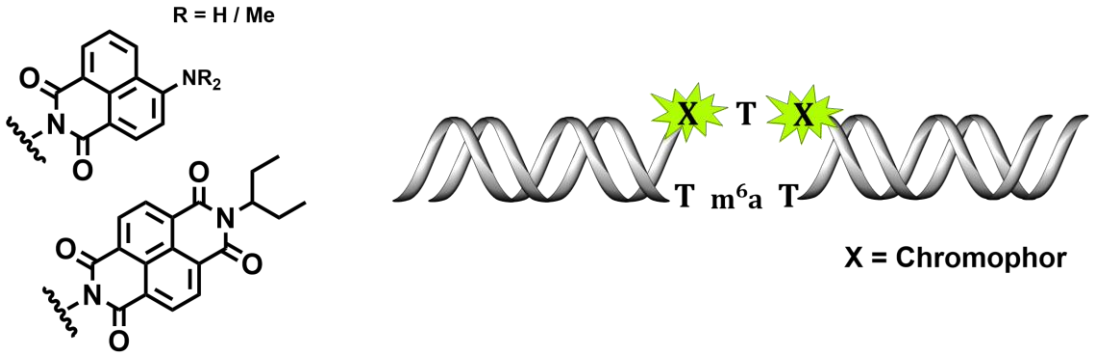


Abbildung 2: Struktur der untersuchten Chromophore sowie die Anwendung der Chromophorklammer als potenzielle m^6a-Sonde.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Fluoreszenzsonden in Nukleinsäuren

Natürliche Nukleinsäuren besitzen keine Emission. Um strukturelle Änderungen, Hybridisierungsvorgänge oder Wechselwirkungen mit Proteinen in Echtzeit und auf molekularer Ebene verfolgen zu können, ist eine Markierung von DNA und RNA mit Radioaktiv- oder Fluoreszenzmarkern unabdingbar. Die Markierung mit Fluoreszenzmarkern kann auf drei verschiedenen Arten erfolgen. Zum einen können nicht-kovalent gebundene Anfärbereagenzien verwendet werden. Diese können entweder in die Nukleinsäuresequenz interkalieren, wie es bei Ethidiumbromid oder *Oxazole Yellow* (YO) der Fall ist.[9-10] Alternativ können sie sich, wie 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) und *Hoechst*-Farbstoffe, in der kleinen Furche der DNA-Helix anlagern.[11-12] Solche Farbstoffe werden häufig zum Anfärben von Gelen oder in der Zellmikroskopie eingesetzt. Dabei können sie selektiv bestimmte Zellen oder deren Zellorganellen sichtbar machen. So färbt zum Beispiel YO ausschließlich apoptotische Zellen, während *Hoechst* spezifisch an die DNA des Zellkerns anlagert und diesen somit sichtbar macht.[13-14]

Als zweite Möglichkeit zur Markierung können fluoreszente Farbstoffe kovalent und extern an die Nukleinsäuresequenz gebunden werden. Extern bedeutet in diesem Zusammenhang, dass sich der Chromophor außerhalb der Basenstapelung befindet, zum Beispiel am Ende einer Sequenz oder über eine Seitenkette am Phosphatrückgrat an die Nukleinsäuren verknüpft ist. Zu solchen extern gebundenen Fluoreszenzmarkern gehören zum Beispiel Fluorescein, Rhodamin sowie Cy3 und Cy5.[15-17] Diese zeichnen sich durch hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und starker Emission aus und werden ebenfalls in der Gelelektrophorese und der Zellmikroskopie eingesetzt. Dabei besitzen die kovalent gebundenen Farbstoffe gegenüber ihren nicht kovalent gebundenen Pendants mehrere Vorteile. Zum einen sind durch die feste Bindung an die Nukleinsäuren sowohl die Position als auch die Stöchiometrie des Farbstoffs bekannt. Dies ermöglicht reproduzierbare Spektroskopie-Experimente, welche für

eine quantitative Auswertung oder die Nachverfolgung dynamischer Prozesse einzelner Moleküle unabdingbar sind.[18-19]

Die dritte Kategorie zur fluoreszenten Markierung umfasst interne, kovalent gebundene Chromophore, welche direkt in die Basenstapelung integriert sind. Diese internen Modifikationen ersetzten eine der natürlich vorkommenden Basen an der jeweiligen Position. Es gibt Modifikationen, die analog zu den natürlichen Nukleobasen Wasserstoffbrücken ausbilden und sich an der Basenpaarung beteiligen können.[20-21] Andere Modifikationen bilden dagegen keine Wasserstoffbrücken und sind ausschließlich über π-π-Wechselwirkungen in die Helix integriert.[22-24] Solche internen Modifikationen können im Vergleich zu den externen Modifikationen direkt an der relevanten Position innerhalb der Nukleinsäure eingebracht werden und ermöglichen dadurch eine präzise Detektion struktureller Veränderungen oder molekularer Prozesse unter physiologischen Bedingungen. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf den fluoreszenten Basensurrogaten, welche eine strukturell isomorphe Integration in DNA- oder RNA-Duplexe ermöglichen (vgl. Kapitel 2.2).[7]

Unabhängig von der Art der Markierung müssen die eingesetzten Fluorophore bestimmte photophysikalische Eigenschaften erfüllen, um eine aussagekräftige Detektion in Nukleinsäuren zu ermöglichen. Somit sollten sich die Fluoreszenzsonden selektiv außerhalb des Absorptionsspektrums von natürlichen Nukleinsäuren anregen lassen, welche Licht bis zu einer Wellenlänge von etwa λ = 300 nm absorbieren.[25] Um aussagekräftige Absorptionsspektren zu erhalten und eine störungsfreie Fluoreszenzanregung zu ermöglichen, sollte die Anregungswellenlänge eines geeigneten Chromophors oberhalb dieses Bereichs liegen. Zudem sollte diese, um Photoschäden an den zu untersuchenden Nukleinsäuren zu vermeiden, möglichst weit in den sichtbaren Bereich verschoben sein. Für die spektroskopische Detektion ist neben einer hohen Quantenausbeute des Fluorophors auch eine große *Stokes*-Verschiebung von Vorteil, da sich dadurch die Anregungs- und Emissionsbanden nur minimal überlappen, was den Anteil an

Streulicht aus der Anregungsquelle reduziert und somit das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis verbessert.[26]

2.2 Fluoreszente Basensurrogate

Unter fluoreszenten Basensurrogaten versteht man synthetische Chromophore, welche eine natürliche Nukleobase innerhalb einer Nukleinsäure ersetzen und dabei strukturell in die Basenstapelung der Doppelhelix integriert sind. Sie sind isoster oder isomorph zu den natürlichen Basen und so an die (2′-Desoxy-)Ribose gebunden, dass sie keine wesentlichen Veränderungen der Nukleinsäuregeometrie verursachen. Gleichzeitig sind diese Basenanaloga imstande Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und sind somit aktiv an der Basenpaarung beteiligt. Aufgrund ihrer strukturellen Kompatibilität eignen sie sich besonders gut, um lokale Strukturen, Dynamiken oder Wechselwirkungen in Nukleinsäuren zu untersuchen.[7,27-28]

Eines der ältesten bekannten Basensurrogate ist das 2-Aminopurin (**2-AP**), welches erstmals 1969 von WARD *et al.* photophysikalisch in Nukleinsäuren untersucht wurde. **2-AP** kann analog zu Adenosin (A) mit Thymin (T) oder Uracil (U) Watson-Crick-Basenpaare bilden. Zudem ist auch eine etwas schwächere Basenpaarung mit Cytosin (C) möglich.[20]

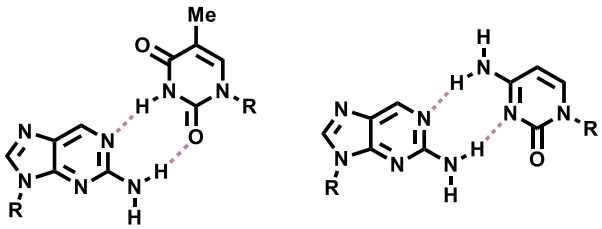


Abbildung 3: Wasserstoffbrückenbindung zwischen **2-AP** und T (links) sowie **2-AP** und C (rechts) mit R = (2′-Desoxy)Ribose.

Es kann selektiv neben der Absorption der natürlichen Basen bei $\lambda_{Exc.}$ = 305 nm angeregt werden und emittiert bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Fl.}$ = 370 nm. Dabei sind diese Eigenschaften sehr stark von der Umgebung des Chromophors abhängig. So

kommt es in einer polaren Umgebung zu einer bathochromen Verschiebung dieser Maxima. Die hohe Quantenausbeute von **2-AP**, welches es frei in Lösung aufzeigt, wird durch die Einbettung in Nukleinsäuren stark gelöscht, wobei diese Löschung sequenzabhängig erfolgt.[29-30] Trotz der aufgelisteten Nachteile ist **2-AP** eines der am meisten verwendeten Basensurrogate und kann aufgrund der ausgeprägten Sensitivität bezüglich seiner Mikroumgebung für Studien zur Kinetik und Konformationsänderung von Nukleinsäuren eingesetzt werden.[7]

Um die sequenzabhängige Fluoreszenzlöschung des **2-AP**s zu überwinden, wurden von HAWKINS und PFLEIDERER 2001 die Pteridine entwickelt, zu denen die Guanin(G)-Analoga **3-MI** und **6-MI** sowie die A-Analoga **6-MAP** und **DMAP** gehören (Abbildung 4).[21,31]

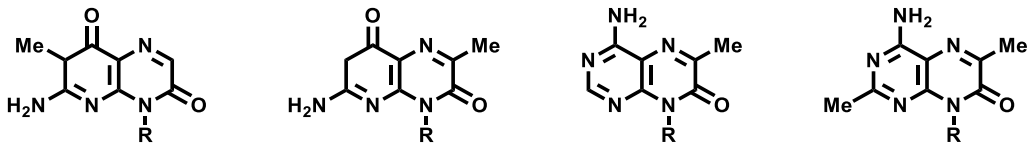


Abbildung 4: Strukturen der Pteridine **3-MI**, **6-MI**, **6-MAP** und **DMAP** mit R = 2'-Desoxyribose**.**

Die Pteridine sind ebenfalls, wie das **2-AP**, sehr empfindlich gegenüber Veränderungen in ihrer lokalen Mikroumgebung, allerdings wird die Fluoreszenz im Duplex weniger stark gelöscht. Sie reagieren empfindlich auf Änderungen in der Basenstapelung und Konformation, was sich in der Fluoreszenzintensität widerspiegelt und wodurch sie sich besonders gut zur Untersuchung von Hybridisierungs- und Faltungsprozessen in Nukleinsäuren eignen. Die Chromophore besitzen eine deutlich zu der von Nukleinsäuren abgegrenzte Absorptionsbande bei $\lambda_{Abs.}$ = 310-350 nm und emittieren bei etwa $\lambda_{Fl.}$ = 430 nm.[21,31-32] Ein Nachteil der Pteridine besteht darin, dass es aufgrund der Methylgruppen zu einer Verringerung der Schmelztemperaturen (T_m) der Oligonukleotid-Duplexe kommt, welche eine ähnliche Destabilisierung, wie eine punktuelle Basenfehlpaarung mit sich bringt.[32] Dennoch wurden die Pteridine in einer Vielzahl von Anwendungen erfolgreich eingesetzt, zum Beispiel in der

Echtzeitanalyse von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen oder als Reporter für die Hybridisierung. [33-35]

Obwohl **2-AP,** wie auch die Pteridine, wertvolle Informationen über Struktur und Dynamik von Nukleinsäuren liefern, ist ihre Anwendung durch die umgebungssensitive Fluoreszenz limitiert. Deshalb wurden weitere fluoreszente Basensurrogate entwickelt, die teilweise eine deutlich unabhängigere Quantenausbeuten und eine weniger umgebungsabhängige Fluoreszenz zeigen. Besonders hervorzuheben sind hierbei die trizyklischen Cytosinanaloga **tC** und **tC^O** welche mit G Wasserstoffbrücken ausbilden können und sich durch eine besonders helle Fluoreszenz auszeichnen.[36-39] Durch ihre strukturelle Isomorphie zur natürlichen Base verursachen sie zudem nur minimale Veränderungen der B-DNA-Geometrie (Abbildung 5).[40]

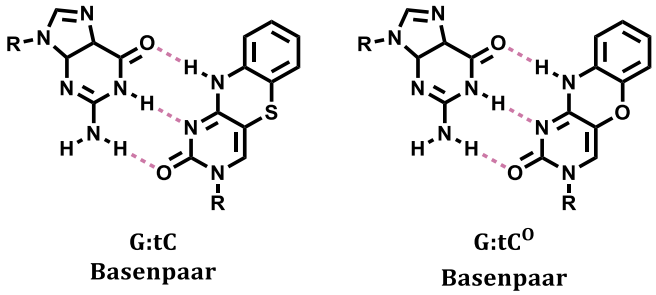
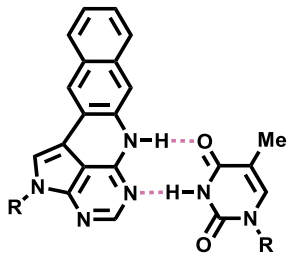


Abbildung 5: Wasserstoffbrückenbindung zwischen **tC** und G (links) und **tC^O** und G (rechts) mit R = 2'-Desoxyribose.

Die beiden Cytosinanaloga können in DNA bei über $\lambda_{Exc.}$ = 395 nm angeregt werden und fluoreszieren deutlich im sichtbaren Bereich bei $\lambda_{Fl.}$ = 505 nm (**tC**) beziehungsweise $\lambda_{Fl.}$ = 560 nm (**tC^O**), wobei die Quantenausbeute des **tC^O** nochmal etwas höher ausfällt.[37,39] Aufgrund ihrer Photostabilität eignen sie sich hervorragend für Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Experimente (weitere Informationen zu FRET in Kapitel 2.3.1), zur Analyse von Polymerase-Wechselwirkungen sowie für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie von Nukleinsäuren.[41-43]

Ein weiteres ebenfalls nur wenig umgebungssensitives Basensurrogat ist das von WILHELMSSON und BROWN entwickelte pentazyklische Adenin (**pA**). Dieses ist ebenfalls, wie **tC** und **tC^O**, strukturell um ein aromatisches Ringsystem erweitert und

zeichnet sich durch eine hohe Quantenausbeute und außergewöhnliche Photostabilität aus. Es bildet selektiv Wasserstoffbrücken mit T und fügt sich Aufgrund seiner Isomorphie zu den natürlichen Basen nahezu störungsfrei in die DNA-Doppelhelix ein (Abbildung 6).[27,44]



pA:T
Basenpaar

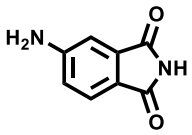
Abbildung 6: Wasserstoffbrückenbindung zwischen **pA** und T mit R = 2′-Desoxyribose.

Das **pA** kann bei einem Maximum von $\lambda_{Exc.}$ = 410 nm im sichtbaren Bereich angeregt werden und emittiert bei $\lambda_{Fl.}$ = 490 nm.[27,45] Aufgrund seiner hohen Helligkeit und der geringen Umgebungssensitivität gilt **pA** heute als eines der leistungsfähigsten Adeninanaloga für Anwendungen in der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie, in FRET-Analysen oder zur mikroskopischen Visualisierung von Nukleinsäuren.[44-46]

Neben den beschriebenen, strukturell etablierten Basensurrogaten wurden in den letzten Jahren weitere Chromophore entwickelt, um ein noch breiteres Spektrum an photophysikalischen Eigenschaften abzudecken. Einer dieser Chromophore ist das 4-Aminophthalimid (**4API**) welches aufgrund seiner isosteren Struktur zu Purinbasen und seiner ausgeprägten Empfindlichkeit gegenüber seiner Mikroumgebung ebenfalls als fluoreszentes Basensurrogat geeignet ist.[47]

2.2.1 4-Aminophthalimid als fluoreszentes Basensurrogat

Das **4API** ist ein kleiner, planarer Chromophor aus der Familie der Phthalimide (Abbildung 7).



4API

Abbildung 7: Struktur des 4-Aminophthalimids (4API) mit einer elektronenschiebenden Aminogruppe und einer elektronenziehenden Imidfunktion.

Der Chromophor kann selektiv neben der Eigenabsorption von Nukleinsäuren in Wasser bei einer Wellenlänge von bis zu $\lambda_{Exc.}$ = 370 nm angeregt werden und emittiert bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Fl.}$ = 540nm.[48] Seine fluoreszenten Eigenschaften beruhen auf einem stark ausgeprägten intramolekularen Ladungstransfer (ICT, *intramolecular charge transfer*) im angeregten Zustand. Dabei wird ein Elektron von der als Donor fungierenden Aminogruppe in das π*-Orbital der Imidfunktion verschoben, welche den Akzeptor bildet. Zudem bewirkt der ausgeprägte Elektronentransfercharakter des Moleküls eine starke Solvatochromie in polaren Lösungsmitteln, wodurch der ICT-Zustand stärker stabilisiert wird, was sich in einer bathochromen Verschiebung der Absorption und Emission widerspiegelt.[8] So ist **4API** einer der stärksten solvatofluorochromen Farbstoffe und besitzt eine lösungsmittelabhängige Stokes-Verschiebung von bis zu 115 nm.[8,20,49] Auch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen kann die fluoreszenten Eigenschaften des Moleküls beeinflussen, da sich dadurch die Elektronendichteverteilung im Molekül verändert und sich daraus folgend das Energieniveau des angeregten Zustands verschiebt. Dies führt dazu, dass die Relaxation vom angeregten Zustand (S_1) in den Grundzustand (S_0) strahlungslos erfolgt und die Fluoreszenz gelöscht wird.[50]

Die aufgeführten photophysikalischen Eigenschaften führten dazu, dass **4API** sowie das davon abgeleitete 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimid (**DMAPI**) schon seit den frühen 2010er Jahren in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT auf ihre Eignung als fluoreszente Basensurrogate untersucht wurden. Dabei synthetisierte MICHAEL WEINBERGER erstmals das in *meta*-Position verknüpfte C-Nukleosid ***m*-4API,** baute dieses erfolgreich in DNA ein und untersuchte es photophysikalisch sowohl als Nukleosid als auch im DNA-Duplex.[47] In den folgenden Jahren gelang es MARKUS

MERKEL, das in *ortho*-Position verknüpfte ***o*-4API**-Nukleosid herzustellen. Auch dieses konnte erfolgreich in DNA eingebaut und spektroskopisch charakterisiert werden.[51] Zudem gelang es MERKEL, das daraus abgeleitete, *ortho*-verknüpfte **DMAPI**-Nukleosid ebenfalls in DNA einzubauen und optisch zu charakterisieren.[52] Um das Feld der möglichen Anwendungen zu erweitern, wurden zuletzt von FABIAN LANG die ***o*-4API**- und **DMAPI**-Bausteine erneut synthetisiert und danach in RNA eingebaut und charakterisiert.[53-54] In allen drei Arbeiten wurden das Basenpaarungsverhalten und die damit einhergehenden optischen Eigenschaften der **4API**- und **DMAPI**-Bausteine mit unterschiedlichen Gegenbasen untersucht. Dabei wurde der Einfluss der natürlichen Basen A, T, G, C für DNA beziehungsweise a, u, g, c für RNA sowie das Verhalten gegenüber einer abasischen Stelle charakterisiert. Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde zudem das Verhalten gegenüber einer artifiziellen Gegenbase, dem Diaminopyrimidin (**DAPym**), untersucht. Dieses wurde als komplementäre Gegenbase zu **4API** von der Arbeitsgruppe ERNSTING vorgeschlagen (Abbildung 8).[47,49,55]

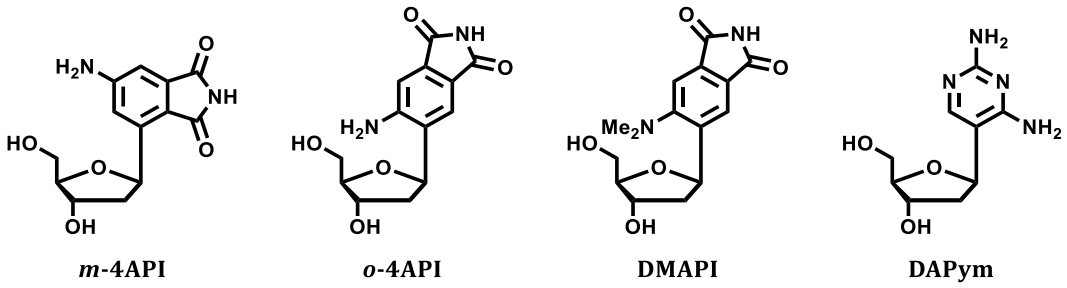


Abbildung 8: Strukturen der mit den artifiziellen Basen modifizierten Nukleoside ***m*-4API**, ***o*-4API** und **DMAPI** sowie der komplementären Gegenbase **DAPym**.

Durch NMR-Strukturanalysen der Arbeitsgruppe ERNSTING konnten die Konformationen der von WEINBERGER und MERKEL synthetisierten artifiziellen Basenpaare ***m*-4API:DAPym, *o*-4API:DAPym** sowie **DMAPI:DAPym** innerhalb der DNA-Doppelstränge charakterisiert werden.[51,55] Dabei zeigte sich, dass das ***m*-4API** im Duplex in einem Gleichgewicht zwischen zwei verschiedenen Konformationen vorliegt. Eine 1H-Konfiguration, bei der nur eine von insgesamt drei möglichen Wasserstoffbrücken zu **DAPym** ausgebildet ist und eine 2H-Konfiguration mit zwei ausgebildeten Wasserstoffbrücken (Abbildung 9). Das

Gleichgewicht liegt bei Raumtemperatur etwas auf der Seite der 1H-Konfiguration verschoben. Die verschiedenen Ausrichtungen des Chromophors kommen durch die Konformation des 2′-Desoxyribofuranosids zustande, welche für 1H in einer 2′-endo-Konformation und für 2H in einer 3′-endo-Konformation vorliegt. Die 3'-endo-Konformation ist typisch für eine A-Helix, wie sie in RNA vorkommt, und erklärt die beobachtete Ausweitung der Helix in der 2H-Form. Aufgrund dieser geometrischen Eigenschaften kann eine ideale Basenpaarung mit dem **DAPym** nicht erfolgen.

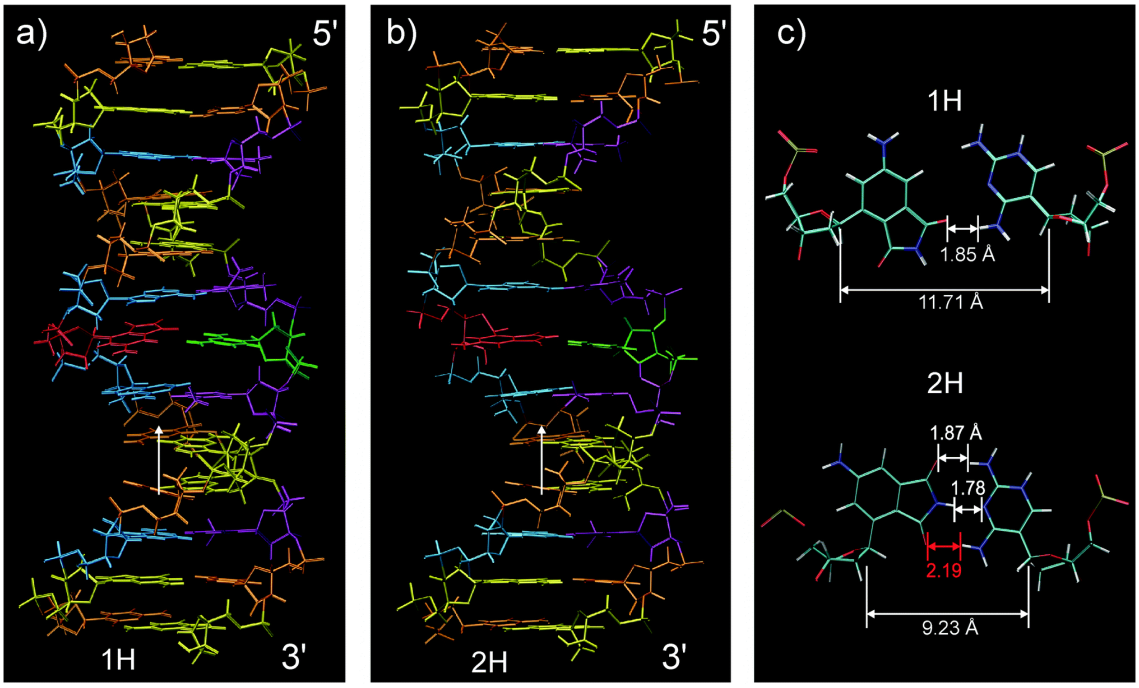


Abbildung 9: Die von der Gruppe ERNSTING analysierte NMR-Struktur des Basenpaars m-4APIs (rot) und DAPym (grün) in der untersuchten DNA-Doppelhelix, wobei in a) nur eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann, während in b) zwei Wasserstoffbrücken möglich sind; c) zeigt dabei die durchschnittlichen Abstände zwischen den relevanten Wasserstoffatomen.[55]

Diese nicht ideale strukturelle Anordnung des **m-4API** spiegelt sich auch in den optischen Eigenschaften des DNA-Duplexes wider. So zeigt der Chromophor im Duplex einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz auf etwa das Doppelte im Vergleich zum Einzelstrang. Allerdings ist der Anstieg dabei für die Basenpaarungen des **m-4API**s mit natürlichen Basen höher als für die Paarung mit **DAPym**. Eine Ausnahme bildet hier die Hybridisierung gegen G, welche die Fluoreszenz nicht erhöht. Die Einbettung in die Doppelhelix resultiert zudem in einer hypsochromen Verschiebung der Maxima.[47]

Die NMR-Strukturanalyse des ***o*-4API:DAPym**-Basenpaares ergab, dass sich durch die Verknüpfung der Base in *ortho*-Position der glykosidische Bindungswinkel des Nukleotids veränderte. Die Konformation der 2′-Desoxyribose ähnelte mehr einer C2′-endo-Geometrie und passt damit besser zu der Struktur der DNA-B-Helix. Dadurch kann ***o*-4API** besser in die Basenstapelung der DNA integriert werden als ***m*-4API** und optimal mit dem **DAPym**, welches in einer idealen C2′-endo-Konformation vorliegt, wechselwirken (Abbildung 10).[51]

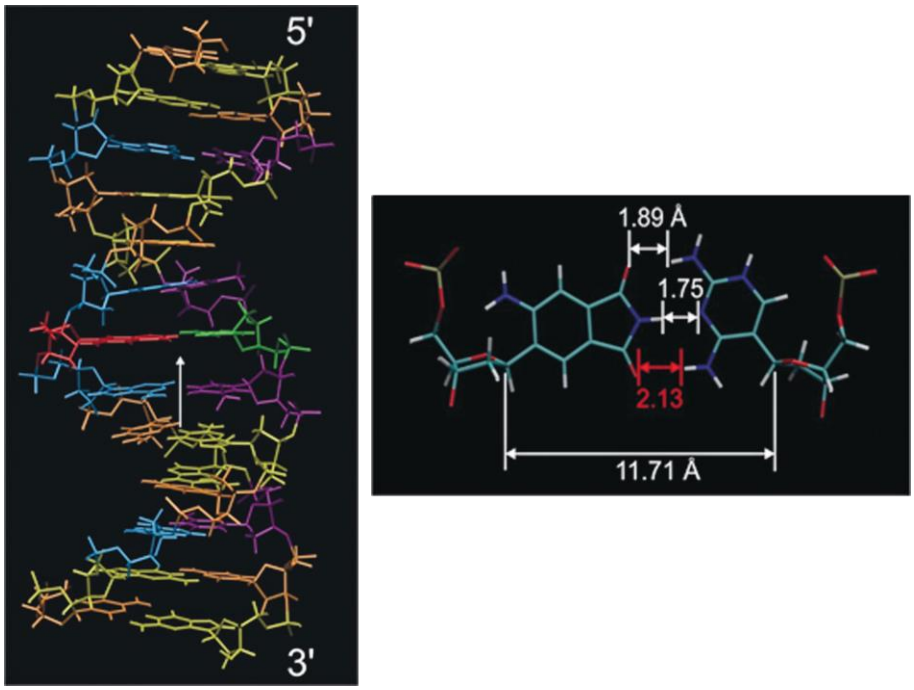


Abbildung 10: Die von der Gruppe ERNSTING analysierte NMR-Struktur des Basenpaars ***o*-4APIs** (rot) und **DAPym** (grün) in der untersuchten DNA-Doppelhelix (links) sowie die dabei möglichen alternierend ausgebildeten Wasserstoffbrücken (rechts).[51]

Aufgrund des kleineren Winkels des Fünfrings der Imidfunktion können allerdings auch hier nur zwei von drei möglichen Wasserstoffbrücken zwischen den beiden artifiziellen Basen ausgebildet werden. Dabei bleibt die Wasserstoffbrücke zwischen der N-H-N-Bindung dauerhaft bestehen, während die der Carbonylgruppen alternierend ausgebildet wird. Die strukturellen Unterschiede zwischen dem *meta*- und *ortho*-verknüpften Nukleosid spiegeln sich zudem in den Schmelztemperaturen und den Emissionsspektren wider. Die DNA-Duplexe ***o*-4API** zeigen leicht höhere Schmelztemperaturen und eine stärkere, hypsochrom verschobene Fluoreszenz im Vergleich zu den ***m*-4API**-haltigen Duplexen. Zudem

variieren die Fluoreszenzintensitäten zwischen den verschiedenen Hybridisierungspartnern mehr, wobei die Fluoreszenzen für die Paarung gegen **DAPym** und C am stärksten ausfallen. Die spektroskopischen Ergebnisse korrelieren mit einer besseren Integration des Chromophors in den Basenstapel der Doppelhelix und der damit verbundenen stärkeren π-Stapelung.[51-52]

Für die mit **DMAPI** modifizierten DNA-Sequenzen ergibt sich ein ganz anderes Bild als für die Basensurrogate mit einer primären Aminofunktion. Die zusätzlichen Methylgruppen führen dazu, dass die Fluoreszenz stark gelöscht wird. Als Erklärung hierfür wird von einem *twisted intramolecular charge transfer* (TICT)-Zustand ausgegangen, welcher durch die verschiedenen Anordnungen der Methylgruppen zustande kommt. Diese können zum einen planar in der Ebene zu dem restlichen Chromophor liegen oder bis um 90° verdreht aus der Ebene herausragen.[48,52] Durch die Rotation bleibt zwar der Ladungstransfer vom Donor auf den Akzeptor bestehen, allerdings wird die π-Konjugation des Systems unterbrochen. Das S_1-Niveau des TICT-Zustands wird energetisch abgesenkt, und die Relaxation aus diesem Zustand erfolgt weitestgehend strahlungslos (Abbildung 11).[56]

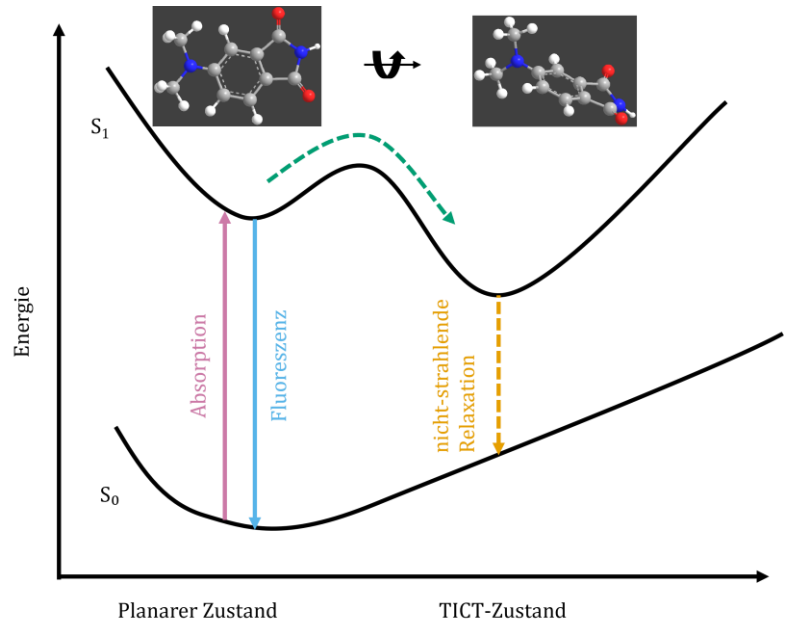


Abbildung 11: Vereinfachtes Jablonski-Schema zur Darstellung des TICT-Zustands des **4API**; S_0 = Singulett-Grundzustand, S_1 = erster angeregter Singulett-Zustand, D = Donor, A = Akzeptor.

NMR-Strukturanalysen ergaben, dass sich die Methylgruppen im Duplex aufgrund sterischer Hinderung bevorzugt aus der Ebene herausdrehen. Gleichzeitig wird die Ausrichtung des **DMAPI** so verdreht, dass die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zu dem **DAPym** nicht mehr stattfindet (Abbildung 12).[52]

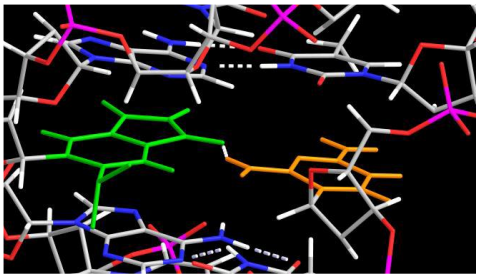


Abbildung 12: Die von der Gruppe ERNSTING analysierte NMR-Struktur des Basenpaars DMAPI (grün) und DAPym (orange) in der untersuchten DNA-Doppelhelix.[52]

Für den Einbau der ***o*-4API**- und **DMAPI**-Bausteine in RNA liegen bisher keine Strukturanalysen vor. Die spektroskopischen Analysen der **DMAPI**-Duplexe zeigen, dass analog zu den Ergebnissen der Untersuchungen in DNA, die Fluoreszenz auch in RNA stark gelöscht wird.[54] Für den ***o*-4API**-Chromophor ergeben sich allerdings deutliche Unterschiede zwischen den DNA- und RNA-Duplexen. So weist zum Beispiel die Basenpaarung gegen Adenosin in RNA eine deutlich schwächere Fluoreszenz auf. Auffällig ist zudem, dass im Fall der DNA-Duplexe das ***o*-4API:DAPym**-Basenpaar die stärkste Fluoreszenz aufweist; für die RNA-Duplexe ist die Emission für das Basenpaar zwischen ***o*-4API** und Cytosin am größten. Wie zuvor beschrieben, liegt das **DAPym** in einer C2′-endo-Konformation vor und auch die Konformation des ***o*-4APIs** ähnelt dieser. Dadurch wird eine ideale Ausrichtung der Bausteine zueinander in der A-RNA-Helix verhindert. Zudem beeinflusst die Geometrie der artifiziellen Nukleotide das π-Stacking des Chromophors mit in die Basenstapelung, wodurch die optischen Eigenschaften ebenfalls beeinflusst werden.[53-54] Aus den vorangegangenen Ergebnissen geht also hervor, dass der Chromophor sehr sensitiv auf Änderungen der Basenpaarung, der Polarität und der Integration in die Basenstapelung reagiert. Unterschiede in der Helixgeometrie und der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beeinflussen direkt die elektronischen Eigenschaften der **4API**-Chromophore und führen zu messbaren Änderungen in der Intensität und Verschiebung der Emission.

2.3 Dichromophorsysteme in Oligonukleotiden

Während die Anwendung von fluoreszenten Basensurrogaten hauptsächlich auf der Wechselwirkung eines Chromophors mit der entsprechenden Nukleinsäure beruht, eröffnet die Kombination zweier Farbstoffe innerhalb eines Oligonukleotids zusätzliche Möglichkeiten. Dabei können durch gezielte Variation von Position, Abstand und Orientierung der Chromophore spezifische Wechselwirkungen zwischen diesen induziert werden, welche zu charakteristischen Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften führen.

2.3.1 Molecular Beacons

Eines der bekanntesten Dichromophorsysteme in Nukleinsäuren sind die *Molecular Beacons*, die erstmals 1996 von TYAGI und KRAMER beschrieben wurden.[57] Diese Systeme basieren auf einem einzelsträngigen Oligonukleotid, welches in Teilen seiner Sequenz selbstkomplementär ist und dadurch in Lösung eine Haarnadelstruktur ausbildet. Die 3′- und 5′-Enden des Oligonukleotids sind dabei kovalent mit einem Fluorophor und einem Quencher verbunden. Aufgrund der räumlichen Nähe in der geschlossenen Haarnadelstruktur wird die Fluoreszenz des Chromophors durch den Quencher unterdrückt. Kommt es zur Hybridisierung mit einer vollständig komplementären Zielsequenz, wird die Haarnadelstruktur geöffnet. Dadurch befinden sich Fluorophor und Quencher nicht mehr in räumlicher Nähe zueinander, wodurch es zu einem Anstieg der Donorfluoreszenz kommt (Abbildung 13).[57-58]

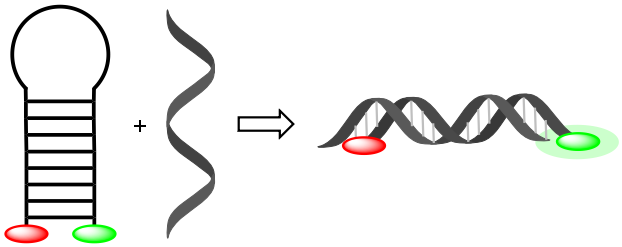


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines *Molecular Beacons* mit dem Quencher in Rot und dem Fluorophor in Grün.

Anstelle eines Quenchers kann auch ein zweiter Chromophor in den *Molecular Beacon* eingebracht werden, welcher mit dem anderen Fluorophor einen *Förster-*

Resonanzenergietransfer (FRET) eingehen kann. Dieser physikalische Prozess wurde 1946 von THEODOR FÖRSTER entdeckt und beschreibt einen nicht-strahlenden Energietransfer von einem angeregten Donormolekül auf ein zweites Akzeptormolekül über eine Dipol-Dipol-Kopplung.[59] Voraussetzungen für diesen Übergang sind die räumliche Nähe der beiden Moleküle in einem Abstand von 1.5 – 10 nm (Förster-Radius), die spektrale Überlappung zwischen der Donor-Emission und der Akzeptor-Absorption sowie eine geeignete Orientierung der Übergangsdipole (Abbildung 14).[60-62]

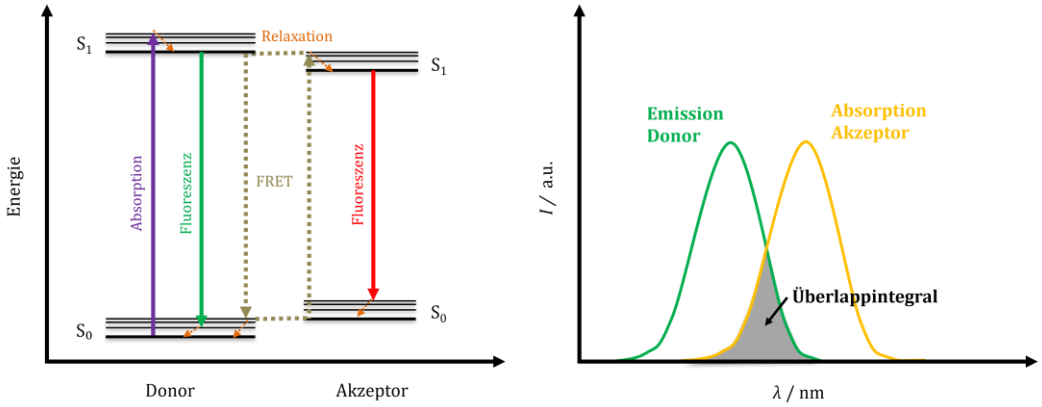


Abbildung 14: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur schematischen Darstellung eines FRET (links) sowie Skizzierung eines überlappenden Donor-Emissionsspektrums (grün) mit einem Akzeptor-Absorptionsspektrum (gelb) und dem dadurch entstehenden Überlappintegral (grau).

Aus der Effizienz des Energietransfers lassen sich dann Rückschlüsse auf den Abstand und die räumliche Anordnung der Chromophore innerhalb der Nukleinsäuren ziehen. Um einen breiten Anwendungsbereich abzudecken, wurden verschiedene Donor-Akzeptor-Kombinationen in *Molecular Beacons* eingeführt. Einige bekannte Vertreter sind dabei das *TET–TAMRA*-Paar, *Cy3–Cy5* oder das *Alexa Fluor 488–RedX*-Paar[63], wobei hier immer der Donor als erstes und der Akzeptor als zweites genannt wird.[64-65] Die Wahl der unterschiedlichen Farbstoffpaare ermöglicht eine gezielte Anpassung an den spektralen Bereich und die Empfindlichkeit der Messung, was die *Molecular Beacons* zu einer vielseitigen Analysemethode in der Nukleinsäurechemie macht.

2.3.2 Inter- und Intrastrangwechselwirkungen von fluoreszenten Dimeren

Neben den FRET-basierten Systemen wurden weitere Dichromophorsysteme entwickelt, in denen anstelle von zwei unterschiedlichen Chromophoren zwei identische Chromophore miteinander wechselwirken. In solchen Systemen können durch die gezielte räumliche Anordnung zweier Chromophore im Duplex verschiedene photophysikalische Effekte wie die Bildung von H- oder J-Aggregaten sowie Excimere, erzeugt werden.

2.3.2.1 Photophysikalische Grundlagen von H- und J-Aggregaten, sowie Excimeren

Um die Wechselwirkungen zwischen zwei identischen Chromophoren zu verstehen, sind Kenntnisse der theoretischen Grundlagen des Excitonmodells, wie es von KASHA beschrieben wurde, von zentraler Bedeutung. Der Begriff Exciton wurde ursprünglich 1931 von FRENKEL geprägt, der diesen zur Beschreibung eines delokalisierten elektronischen Anregungszustands in molekularen Kristallen einführte.[66] Aufbauend darauf übertrug KASHA das Modell auf molekulare Aggregate, um die photophysikalischen Eigenschaften von Chromophoraggregaten zu erklären.[67]

Bei der Anregung eines Elektrons vom Grundzustand in einen energetisch höher liegenden Zustand entsteht ein elektronisches Übergangsdipolmoment, welches zu einer kurzzeitigen Polarisation des Moleküls führt.[68] Die Richtung und Intensität des Übergansdipolmoments sind dabei abhängig von der elektronischen Struktur des Chromophors. Befinden sich nun zwei Chromophore in räumlicher Nähe, können ihre Übergangsdipolmomente über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen miteinander koppeln. Dies wird als Exciton-Kopplung bezeichnet und führt zu einer Delokalisierung des angeregten Zustands über die beiden Chromophore.[66-67] Dabei kommt es zu der sogenannten *Davydov*-Aufspaltung des angeregten Zustands in zwei Exciton-Energieniveaus.[69] Diese Aufspaltung führt zu einer charakteristischen Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima im

Vergleich zum Monomer.[70-71] Abhängig von der Orientierung der Übergangsdipolmomente resultiert daraus entweder ein H- oder ein J-Aggregat.

In einem H-Aggregat (H für hypsochrom) sind die Übergangsdipolmomente der Chromophore parallel übereinander (*face-to-face)* angeordnet, kommt es zu einer positiven Exzitonenkopplungsenergie. Dabei ist die Population des energetisch höheren Exciton-Niveaus optisch erlaubt, während der niedrigere Zustand verboten ist. Infolgedessen kommt es zu einer hypsochromen Verschiebung der Absorptionsbande gegenüber dem Monomer, während die Fluoreszenz meist stark gelöscht oder vollkommen unterdrückt ist. J-Aggregate (J für den Entdecker JELLY) beschreiben dagegen eine versetzte (*head-to-tail*) Anordnung der Übergangsdipolmomente der Chromophore mit negativer Kopplungsenergie der angeregten Zustände. In diesem Fall ist das tieferliegende Excitoneniveau optisch erlaubt, woraus eine bathochrome Verschiebung der Absorption und Fluoreszenz mit schmaler, intensiver Emissionsbande resultiert. Ob ein H- oder J-Aggregat entsteht, hängt von dem Winkel zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten ab. Bei einem Winkel $\Theta < 54.7°$ überwiegt die negative Kopplung des J-Aggregats, für $\Theta > 54.7°$ kommt es zu einer positiven Kopplung des H-Aggregats (Abbildung 15).[67,72]

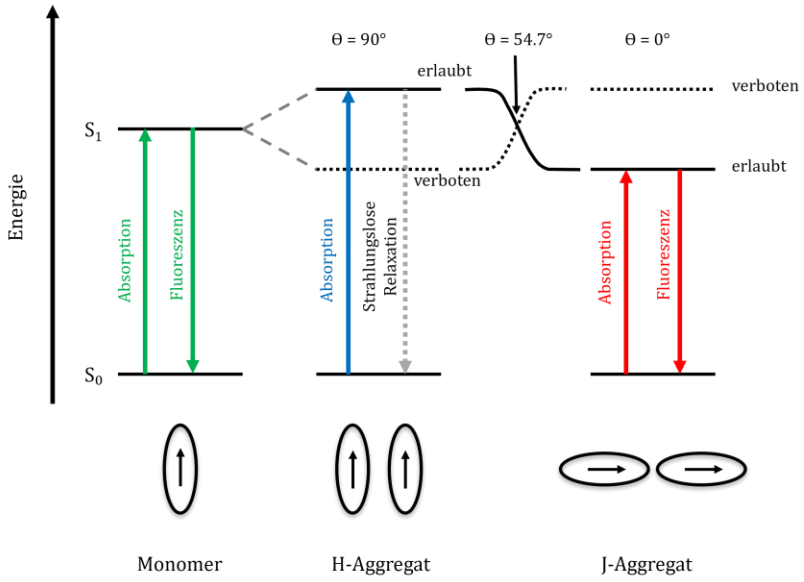


Abbildung 15: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur schematischen Darstellung der Excitonaufspaltung und den durch die verschiedenen Anordnungen der Dipole resultierenden H- oder J-Aggregate.

Neben diesen durch Grundzustandsassoziation entstehenden Aggregaten existieren auch kurzlebige, ausschließlich im angeregten Zustand gebildete Komplexe, sogenannte Excimere (engl. *excited dimers*).[73-76] Diese entstehen durch die Wechselwirkungen eines angeregten Chromophors mit einem identischen, nicht angeregten Nachbarn.[77] Dabei wird die elektronische Anregung über beide Moleküle delokalisiert, wodurch ein neuer angeregter Zustand mit eigener elektronischer und geometrischer Struktur entsteht. Aufgrund von repulsiven Wechselwirkungen bei zu kleinem Abstand der Monomere im Grundzustand existiert das Excimer nur im angeregten Zustand.[78] Da das Excimer erst nach der Anregung gebildet wird, zeigen sich im Gegensatz zu H- und J-Aggregaten keine Änderungen im Absorptionsspektrum. Die Emission ist charakteristisch bathochrom verschoben und weist eine breite, Fluoreszenz ohne Feinstruktur auf.[73,79] Die Rotverschiebung resultiert daraus, dass der energetisch niedrigste Zustand des Excimers auf einem tieferen Potentialminimum liegt als der angeregte Zustand des Monomers (Abbildung 16).[77,80] Nach der Relaxation überwiegen erneut die repulsiven Wechselwirkungen, und es kommt zu eine Dissoziation in die beiden Monomere. Die Fluoreszenzlebensdauern von Excimeren sind häufig verlängert, da emittierte Photonen von benachbarten Chromophoren reabsorbiert und erneut emittiert werden können.[77,81]

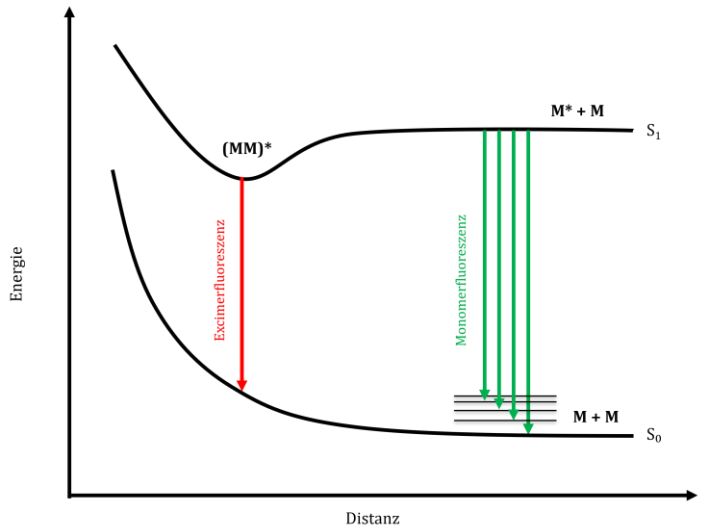


Abbildung 16: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur schematischen Darstellung der Unterschiede zwischen Monomer- und Excimerfluoreszenz.

Die Art der Aggregatbildung hängt stark von der strukturellen Umgebung und der Beweglichkeit der Chromophore ab. In stark geordneten Duplexen treten durch die Fixierung der Chromophore eher H- beziehungsweise J-Aggregate auf, während in flexibleren Einzelsträngen die Bildung von Excimeren begünstigt wird. Auf Basis dieser theoretischen Konzepte lassen sich die experimentell beobachteten Eigenschaften verschiedener Dichromophorsysteme erklären.[82] Im Arbeitskreis WAGENKNECHT wurden solche Systeme bereits umfassend untersucht. So charakterisierte SINA BERNDL die optischen Eigenschaften von Thiazol-Orange (TO)-Dimeren, während DANIELA BAUMSTARK und CLEMENS WAGNER die Dimerisierung von Perylenbisimiden (PBI) analysiert haben.[83-87] Auch außerhalb dieses Arbeitskreises wurden vergleichbare Chromophore erforscht. So haben NICOLI *et al.* die Bildung von H-Aggregaten von Cyanin-3-(Cy3)-Farbstoffen in DNA untersucht, während sich gleich mehrere Gruppen mit der Excimerbildung von Pyrenen in Oligonukleotiden beschäftigen.[88-93]

2.3.2.2 Thiazol-Orange Dimere in DNA

Thiazol-Orange (TO) ist ein kationischer, asymmetrischer Cyaninfarbstoff und zeichnet sich besonders durch seine hohen Fluoreszenzquantenausbeuten aus. Aufgrund seiner Planarität und einer ausgedehnten π-Konjugation zeigt das TO starke π-π-Wechselwirkungen und kann sowohl in DNA als auch in RNA interkalieren. Aufgrund seiner Eigenschaften wird er in zahlreichen Anwendungen der Nukleinsäureanalytik eingesetzt, beispielsweise in FRET-Sonden mit einem weiteren Cyaninfarbstoff.[94] Zur Erweiterung des Anwendungsspektrums untersuchte SINA BERNDL aus der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT das Verhalten von Thiazol-Orange-Monomeren und -Dimeren in DNA-Duplexen. Der Chromophor wurde über eine Carbamatfunktion an einen Aminopropandiol-Linker gekoppelt in die DNA eingebracht (Abbildung 17).[83-84]

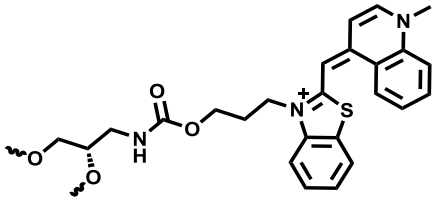


Abbildung 17: Struktur des Linker-verknüpften TO-Chromophors.

Aufgrund eines gezielten Einbaus von einem oder zwei Chromophoren konnten dabei selektiv die Monomer- und die Dimer-Eigenschaften des Thiazol-Orange-Chromophors charakterisiert werden. Dafür wurden verschiedene Duplexsysteme entworfen. Ein Duplex mit lediglich einem Chromophor für die Untersuchung des Monomer, eine Interstrang-Dimer-Duplex mit je einem Chromophor in beiden Strängen sowie ein Intrastrang-Dimer-Duplex mit zwei nebeneinander angeordneten Chromophoren im selben Strang (Abbildung 18).

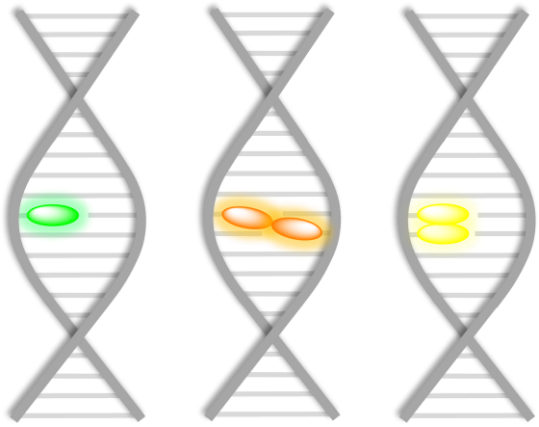


Abbildung 18: Schematische Darstellung der verschiedenen von Sina Berndl untersuchten Anordnungen der Chromophore im Duplex mit dem Monomer-Duplex (links), dem Interstrangdimer-Duplex (Mitte) und dem Intrastrangdimer-Duplex (rechts).

Die spektroskopischen Ergebnisse der Untersuchungen von BERNDL zeigten sehr spezifische photophysikalische Eigenschaften für die jeweiligen Duplexe. Der TO-Monomer-Duplex zeigt eine vibronisch strukturierte Absorptionsbande mit zwei Maxima bei $\lambda_{Abs.}$ = 486 nm und $\lambda_{Abs.}$ = 507 nm und zeigt eine grüne Emission bei $\lambda_{Fl.}$ = 530 nm. Zudem wurde die Fluoreszenzlebenszeit des Monomers ermittelt welche im Bereich von τ = 1.2-1.6 ns liegt. Die Schmelztemperatur des modifizierten Duplexes ist nur geringfügig erniedrigt ΔT_m = -2 °C, was eine weitgehend erhaltene Duplexstabilität belegt. Der beschriebene Intrastranddimer-Duplex führte zu einer

im Vergleich zum Monomer hypsochrom verschobenen Absorption bei $\lambda_{Abs.}$ = 486-490 nm und einer stark bathochrom verschobenen orangefarbenen Emission bei ungefähr $\lambda_{Fl.}$ = 580nm, welche mit einer verlängerten Fluoreszenzlebensdauer von τ = 2.8 ns einhergeht. Die Schmelztemperatur des Intrastrangdimer-Duplexes ist höher als die der unmodifizierten DNA, was durch eine Stabilisierung des Duplex über π-π-Wechselwirkung zwischen den Chromophoren erklärt wird. Das Verhalten des Duplexes wird durch eine excitonische Aufspaltung erklärt, wobei zwar die Anregung analog zu einem H-Aggregat in das höher liegende Exciton erfolgt und eine Verdrehung der Anordnung der Chromophore einen Übergang aus dem niedrigeren Excition teilweise erlaubt, wodurch es zur Emission kommt.[84] Solch ein Ergebnis konnte auch schon für andere Cyaninfarbstoffe beschrieben werden und wurde als fluoreszierendes H-Aggregat bezeichnet.[95-96] Für die Intrastrangdimere zeigt sich dagegen ein anderes Verhalten. Die Absorption ist stärker hypsochrom verschoben ($\lambda_{Abs.}$ = 475 nm), während die leicht bathochrom verschobene gelbe Fluoreszenz überwiegend gelöscht wird. Dies entspricht dem Verhalten eines klassischen H-Aggregats, welches durch eine planare Stapelung der Chromophore ohne Verdrehung im Duplex zustande kommt. Der Duplex wird in diesem Fall thermodynamisch destabilisiert, da es zu keinen zusätzlichen chromophorbasierten Wechselwirkungen zwischen den beiden DNA-Strängen kommt.[83-84]

BERNDL beschreibt eine Anwendung des TO-Dimers für ein direktes, farbbasiertes *Readout* von einer erfolgreichen Hybridisierung. In *Molecular Beacons* führt die geschlossene Haarnadelstruktur zu einer orangefarbenen Dimer-Emission, während im geöffneten Hybridisierungszustand die grüne Monomer-Fluoreszenz zu beobachten ist. Damit lässt sich der Hybridisierungszustand ohne einen weiteren Farbstoff direkt erkennen.[84]

2.3.2.3 Perylenbisimid Dimere in DNA

Neben dem TO wurden auch Perylenbisimid (PBI)-Chromophore als dimerbildende Farbstoffe in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT untersucht (Abbildung 19). Die PBIs gehören zu den am meisten untersuchten π-konjugierten Farbstoffen und zeichnen sich durch eine große photochemische und thermische Stabilität aus. Zudem weisen

sie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und eine planare aromatische Struktur auf, wodurch sie ein idealer Chromophor für die DNA-Modifikation sind. Aufgrund des ausgedehnten π-Systems des Perylenkerns, welches über die Imidfunktionen elektronisch erweitert ist, absorbieren PBIs weit im sichtbaren Bereich bei bis zu $\lambda_{Abs.}$ = 550 nm. Es kommt zu einer Feinstruktur der Absorptionsbande aufgrund von vibronischen Zuständen. Die PBIs zeigen zudem eine spiegelsymmetrische Emission mit einer kleinen *Stokes*-Verschiebung von ungefähr $\Delta\lambda$ = 20 nm. Aufgrund der starken intermolekularen π-π-Wechselwirkungen neigen die PBIs, in Lösung oder auch in supramolekularen Architekturen wie DNA, zu einer starken Aggregatsbildung, die je nach Orientierung der Chromophore zu H- und J-Aggregaten oder auch zu Excimeren führt.[97-99]

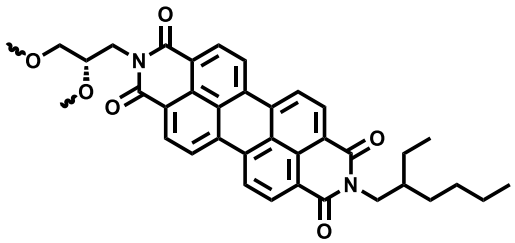


Abbildung 19: Struktur des Linker-verknüpften PBI-Chromophors.

CLEMENS WAGNER und DANIELA BAUMSTARK untersuchten die photophysikalischen Eigenschaften von **PBI** in DNA. Es wurden ebenfalls die Modelle von Monomer Duplex und eines Interstrangdimer-Duplex untersucht (vgl. Abbildung 18). Die **PBI**-Chromophore wurden ebenfalls mit dem Aminopropandiol-Linker mit der DNA verknüpft, allerdings wurde dieser direkt, ohne Verlängerung über eine Carbamatgruppe, mit dem **PBI** verbunden und ist somit kürzer als der von SINA BERNDL verwendete Linker für das **TO** (vgl. Kapitel 2.3.2.2).[85-87]

Der von WAGNER untersuchte Monomer-Duplex zeigte, dass das **PBI** zwar effizient in die Basenstapelung integriert wird, die Emission aber aufgrund von starken stapelnden Wechselwirkungen mit den benachbarten Basen gelöscht wird.[87] Im Interstrangdimer-Duplex kommt es zu intensiven π-π-Wechselwirkungen zwischen den beiden Chromophoren. Das Absorptionsspektrum zeigt zwei im Vergleich zum Monomer deutlich verschobene Banden bei $\lambda_{Abs.}$ = 506 nm und $\lambda_{Abs.}$ = 645 nm. Es

wird daher von einer starken excitonischen Kopplung ausgegangen. Das Fluoreszenzspektrum zeigt eine breite, um etwa $\Delta\lambda_{.}$ = 100 nm bathochrom verschobene Emission bei $\lambda_{Fl.}$ = 660 nm welche einer Excimerbildung zugesprochen wird.[85-86] BAUMSTARK untersuchte zudem auch die Wechselwirkungen der **PBI**-Chromophore als Intrastrangdimer. Diese waren, anders als bei BERNDL, nicht in direkter Nachbarschaft zueinander angeordnet, sondern lagen durch ein Adenosin voneinander getrennt vor. Der entsprechende Gegenstrang wurde dann so modifiziert, dass entweder eine komplementäre Basenpaarung von A mit T möglich war oder eine aktive Basenfehlpaarung mit A, G, oder C induziert wurde (Abbildung 20).

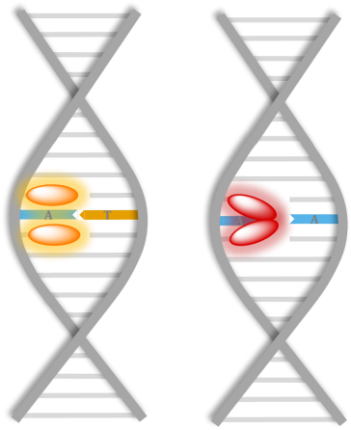


Abbildung 20: Schematische Darstellung der von DANIELA BAUMSTARK verwendeten **PBI**-Dimer-Sonde zur Erkennung von Punktmutationen am Beispiel einer AT-Basenpaarung und einer AA-Basenfehlpaarung.

Dabei wurde folgendes Verhalten der **PBI**-Chromophore festgestellt. Kam es zu einer Basenpaarung, wurden die Chromophorwechselwirkungen zwischen den beiden **PBI** unterdrückt, und es wurde ausschließlich eine Monomerfluoreszenz bei $\lambda_{Fl.}$ = 558 nm beobachtet. Eine Basenfehlpaarung führte dazu, dass die Chromophore miteinander interagieren konnten und es kam zu einer charakteristischen Excimeremmission bei $\lambda_{Fl.}$ = 660 nm während die Monomerfluoreszenz weitestgehend unterdrückt wurde. Dieses System ist so sensitiv, dass eine Quantifizierung zwischen einer erfolgreichen Basenpaarung und einer Basenfehlpaarung möglich war. Die sogenannte **PBI**-Klammer ermöglicht somit eine direkte Detektion von Punktmutationen oder Basendeletionen.[86]

2.3.3 Verschiedene nicht ribosebasierte Linker zur Verknüpfung der Chromophore

Zur Modifikation von Nukleinsäuren mit Chromophoren können verschiedene nicht-ribosebasierte Linkersysteme verwendet werden. Die Art des verwendeten Linkers kann dabei unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Doppelhelixgeometrie des zu untersuchenden Systems haben.[100-101] Daher ist es wichtig, abhängig von dem geplanten Experiment einen dafür geeigneten Linker auszuwählen. Bekannte Linker sind dabei der (S)-Aminopropandiol-Linker, der Glycerol-Linker sowie der D-Threoninol-Linker (Abbildung 21).

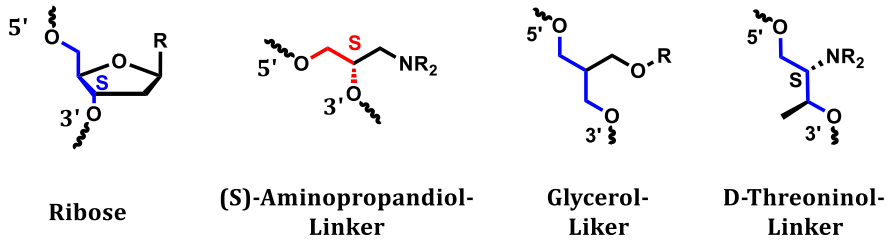


Abbildung 21: Strukturen der verschiedenen Linker mit C_2-Kettenlänge (rot) und C_3-Kettenlänge (blau) im Vergleich zu Ribose.

Der von der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT zur DNA-Modifizierung verwendete Aminopropandiol-Linker enthält ein chirales Zentrum, welches die Stereochemie einer 2′-Desoxyribose nachahmt und dadurch eine definierte räumliche Orientierung des Chromophors ermöglicht. Allerdings unterscheidet sich die Kettenlänge der rückgratäquivalenten C-C-Verknüpfung zwischen der 3′- und 5′-Hydroxygruppe des Aminopropandiol-Linkers von derjenigen der 2′-Desoxyribose durch die Verkürzung um eine Methylengruppe (Abbildung 21). Inwieweit sich dieser strukturelle Unterschied auf die Geometrie der DNA-Helix auswirkt, wurde bisher nicht ausreichend untersucht, allerdings deuten verringerte Schmelztemperaturen im Vergleich zu unmodifizierten Duplexen auf eine Destabilisierung hin.[83,86,102] Allgemein ist der Linker chemisch stabil, erhöht aber im Vergleich zu einer Verknüpfung über 2'-Desoxyribose die konformationelle Flexibilität der Modifikation. Die Hydrophilie des Linkers führt zu einer guten Löslichkeit von modifizierten Oligonukleotiden in Wasser. Wie aus den Arbeiten von WAGNER, BAUMSTARK und BERNDL hervorgeht, eignet er sich für den Einbau

verschiedener Chromophore und ermöglicht die Ausbildung von Dimer-Wechselwirkungen innerhalb der Duplexstruktur.[83-87]

Der Glycerol-Linker wurde von PEDERSEN für die Verknüpfung von Pyren-Modifikationen in Oligonukleotiden beschrieben. Durch die drei Hydroxygruppen des Glycerol-Grundgerüsts ist der Linker stark hydrophil und trägt ebenfalls zu einer sehr guten Löslichkeit der modifizierter Oligonukleotide bei.[103-104] Im Vergleich zu dem Aminopropandiol-Linker, ist der Glycerol-Linker achiral und bringt eine stärkere Flexibilität mit sich. Dadurch eignet er sich besonders gut zur Verknüpfung sterisch gehinderter Chromophore, ohne die Geometrie der Doppelhelix wesentlich zu beeinflussen.[103] Zudem entspricht die Kettenlänge zwischen den 3'- und 5'-Hydroxygruppen des Glycerol-Linkers, anders als beim Aminopropandiol-Linker, der natürlichen Distanz der (Desoxy)ribose-Verknüpfung im DNA-Rückgrat. Während dieser Linker in DNA-Duplexen zur Ausbildung stabiler Helices beiträgt, wurden für Hybridisierungen mit RNA deutlich erniedrigte Schmelztemperaturen und somit geringerer Duplexstabilitäten beobachtet.[100,103] Über die Anwendung als Linker für artifizielle Oligonukleotid-Modifikationen hinaus kann aus der Glycerol-Einheit sogar ein vollständig künstliches Rückgrat aufgebaut werden, wie es im Konzept der Glycol Nucleic Acids (GNA) demonstriert wurde.[105-106]

Ein weiterer häufig genutzter Linkertyp ist der D-Threoninol-Linker, welcher von ASANUMA und KOMIYAMA entwickelt und für den Einbau verschiedener Chromophore eingesetzt wurde.[107-108] Die Schmelztemperaturen der modifizierten Duplexe blieben weitgehend unverändert, was auf eine hohe strukturelle Kompatibilität dieses Linkers mit der Geometrie der DNA-Doppelhelix hinweist.[107,109] Wie der Aminopropandiol-Linker besitzt auch der Threoninol-Linker ein chirales Zentrum, welches die Stereochemie der (Desoxy)ribose nachahmt. Zudem stimmt auch die Kettenlänge zwischen 3'- und 5'-Hydroxyfunktion mit der Distanz im natürlichen Rückgrat überein. Durch seine Flexibilität kann der Linker zur Stabilisierung geordneter Aggregatstrukturen beitragen, wie etwa die Bildung von H-Aggregaten, welche beim Einbau von Methylrot beobachtet wurde.[110]

Neben den beschriebenen Linkern, welche möglichst gut die Eigenschaften eines natürlichen Riboserückgrats imitieren, wurden noch weitere Alternativen entwickelt. Dazu zählen unter anderem die Carboxamid-Linker, Alkynyl-Linker oder Triazoyl-Linker.[111-113] Zur Einführung dieser Linker wird der Chromophor zweifach funktionalisiert und liegt dadurch in die Mitte des Linkersystems eingebettet vor.

2.4 Methylierung von Nukleinsäuren als wichtige Reporterfunktion in Zellen

2.4.1 DNA-Methylierung

DNA-Methylierung kommt sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Organismen vor.[114] Die erste methylierte DNA-Base, 5-Methyl-2′-Desoxycytosin (m^5C), wurde 1948 von HOTCHKISS in der DNA des Thymus von Kälbern entdeckt.[115] Sieben Jahre später wurde eine weitere Methylmodifikation, N^6-Methyldesoxyadenosin (m^6A), von DUNN und SMITH an der DNA von *Escherichia Coli 15T*$^-$ Bakterien entdeckt.[116] Dieser Bakterienstamm reagiert besonders empfindlich auf Thyminmangel, was sich unter anderem in einer gesteigerten Aktivität der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und damit einer Zunahme an m^6A wiederspiegelt.[117] Die unterschiedlichen Lokalisierungen der Methylgruppe an den beiden Basen führt zu einem Unterschied in der Stabilität der DNA-Doppelhelix im Vergleich zu einer komplett modifizierten DNA. So führt die Methylgruppe des m^5C, welche direkt am Pyrimidinring lokalisiert ist, zu einer höheren Stabilität der DNA - Doppelhelix. Dagegen ist die Methylgruppe des m^6A direkt am freien Amin lokalisiert, welches direkt an der Basenpaarung teilnimmt, was zu einer verringerten Stabilität führt (Abbildung 22).[118]

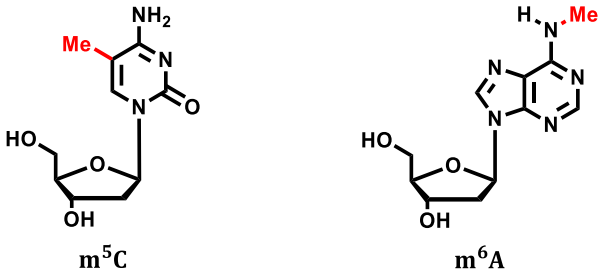


Abbildung 22: Strukturformeln von m^5C und m^6A.

In Säugetieren kommt größtenteils m^5C als Modifikation vor. Dabei sind auf die gesamte DNA bezogen ca. 1-5 % der C-Basen methyliert.[119-120] Der Grad der Methylierung ist hierbei zellspezifisch, wobei am meisten m^5C in Gehirn und Thymus nachgewiesen wurde.[121] Die m^6A-Modifikation dagegen war lange nur in prokaryotischen Organismen bekannt und wurde erst vor 10 Jahren in eukaryotischer DNA entdeckt.[122-125] Eine sicher nachgewiesene epigenetische Funktion hat sie dabei nur in Einzellern; für mehrzellige Organismen, wie zum Beispiel Säugetiere, haben zwar mehrere Studien ein Vorkommen bestätigt, eine epigenetische Funktion wird allerdings angezweifelt.[118,126-129]

Die m^5C-Modifikation ist eine der am intensivsten erforschten epigenetischen Markierungen, da sie zentral an der Regulation der Genexpression beteiligt ist.[119,130-131] Durch Methylierung bestimmter Regionen in Genen können diese stillgelegt und durch entsprechende Demethylierung aktiviert werden.[131-133] In Wirbeltieren sind überwiegend CpG-Dinukleotide modifiziert, während CpG-Inseln in Promoterregionen unmethyliert bleiben, wodurch eine Genaktivierung ermöglicht wird.[134-135] Die Methylierungsmuster werden durch die de-novo-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B etabliert und durch DNMT1 während der DNA-Replikation erhalten.[120,136-137] Die m^5C-Modifikation ist stark an der Steuerung der Zelldifferenzierung beteiligt und kann zudem eine epigenetische Reprogrammierung ermöglichen, bei der differenzierte Zellen wieder in pluripotente Zustände überführt werden.[138-139] Fehlregulierte m^5C-Muster, wie Hypo- oder Hypermethylierung, sind charakteristisch für verschiedene Tumorarten und Imprinting-Störungen und dienen als diagnostische Marker für Krankheiten wie Darmkrebs oder Glioblastome.[140-146]

Die m^6A-Modifikation kommt weitestgehend in Bakterien vor. Sie wirkt sich hierbei auf die Replikationskontrolle, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Transkriptionsregulation sowie Genomabwehr aus.[118,147] Dabei dient die Adeninmethylierung den Bakterien als vereinfachtes Immunsystem. Die Wirts-DNA ist methyliert und dadurch vor korrespondierenden Restriktionsendonukleasen geschützt, unmethylierte Fremd-DNA wird dagegen enzymatisch gespalten und abgebaut.[118] In Eukaryoten ist das Vorkommen von m^6A vor allem in verschiedenen Einzellern gut belegt. In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beeinflusst diese Modifikation vor allem die Anordnung der Nukleosomen sowie die Transkription. Dabei ist m^6A hauptsächlich an ApT-Dinukleotiden lokalisiert und markiert aktive Gene.[126,148] In Mehrzellern dagegen ist m^6A nur in Spuren vorhanden, was die Detektion erschwert und zu falsch-positiven Befunden führen kann, welche auf Kontaminationen aus bakterieller DNA beruhen.[149-150] Dennoch ist es inzwischen mehreren Wissenschaftlern gelungen, die Präsenz von m^6A in der genomischen DNA von Mäusen nachzuweisen.[149,151-152] Des Weiteren konnten LIU *et al.* in frühen embryonalen Stadien von Zebrafischen und Schweinen bis zu 0.1–0.2 % Methylierung an den gesamten A-Basen nachweisen, allerdings sank dieses Level im fortlaufenden Entwicklungsstadium der Embryonen auf ppm-Niveau ab.[129] Ob m^6A eine epigenetische Funktion in mehrzelligen Organismen besitzt, bleibt offen. So gehen mehrere Studien davon aus, dass m^6A ein Artefakt aus der Verstoffwechselung von ribosomalem m^6a ist, was gegen eine epigenetische Markierung spricht.[127,152] Es kann also festgehalten werden, dass es noch weiterer Forschung auf diesem Gebiet bedarf und dass eine Entwicklung von noch sensibleren Methoden zur Detektion helfen könnte, eindeutigere Ergebnisse zu liefern.

2.4.2 RNA-Methylierung

Spätestens seit der Covid-19-Pandemie ist RNA für die meisten Menschen kein Fremdwort mehr. Neben ihrer essenziellen Rolle in der Proteinbiosynthese übernimmt sie zahlreiche regulatorische Funktionen im zellulären Kontext. Zur Steuerung dieser verschiedenen Prozesse wird RNA durch *Writer*-, *Eraser*- und

Reader-Proteine dynamisch über die Methylierung reguliert. Im Vergleich zur DNA gibt es dabei eine größere Variation an verschiedenen Methylierungen. Dazu gehören die Adeninmethylierungen N^6-Methyladenosin (m^6a) und N^1-Methyladenosin (m^1a), 5-Methylcytidin (m^5c), 7-Methylguanosin (m^7g) sowie die Methylierung am 2'-Sauerstoff der Ribose, welche für alle vier verschiedenen Ribonukleoside vorkommt (Abbildung 23).[153] Dabei kommen diese fünf Modifikationen gleichermaßen in Prokaryoten wie in Eukaryoten vor, allerdings zeigen sie stark unterschiedliche Modifikationslandschaften.[154] Im weiteren Verlauf wird ausschließlich auf die RNA-Methylierung bei Säugetieren eingegangen.

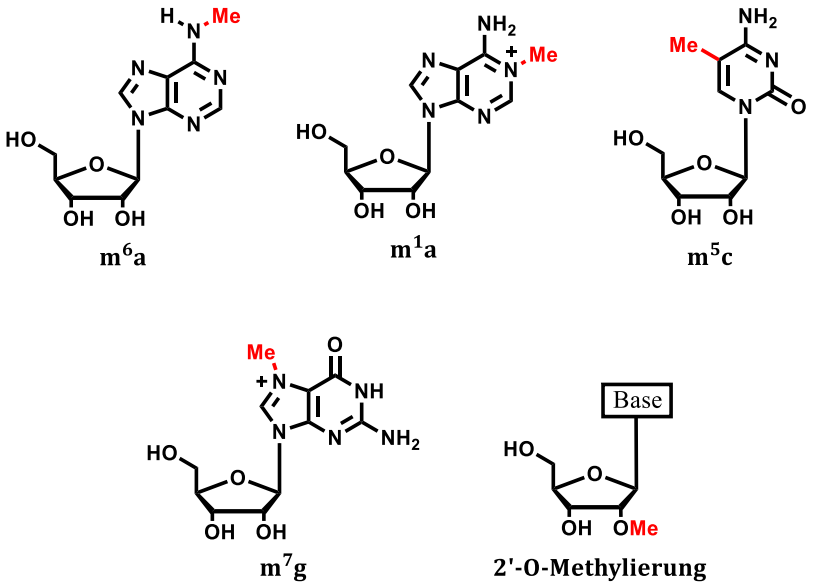


Abbildung 23: Strukturformeln von m^6a, m^1a, m^5c, m^7g und der 2'-O-Methylierung.

Die Methylierung von Cytidin kommt nicht nur in DNA, sondern auch als Modifikation von RNA vor. Hier ist sie vor allem in tRNA und rRNA weit verbreitet, kann aber auch in mRNA auftreten.[155] Die m^5c-Modifikation beeinflusst Export und Stabilität von mRNA, die Translationskontrolle sowie die Reaktion auf zellulären Stress.[156-157] Aufgrund dieses Einflusses auf wichtige zelluläre Prozesse wird davon ausgegangen, dass m^5c auch eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Zudem wurden in verschiedenen Krebsarten abweichende Methylierungsmuster der c-Base gefunden.[158-159]

Die m^7g-Modifikation kommt größtenteils als RNA-*Cap* vor und schützt hier die 5′-Enden. Gleichzeitig erhöhen sie aber auch die Bindungsaffinität für verschiedene Initiationsfaktoren.[160-161] So sind sie zum Beispiel essenziell für die *Cap*-abhängige Translation. Als interne RNA-Modifikation sowie in tRNA spielt m^7g zudem eine Rolle beim Zellwachstum und kann auch hier die Translation beeinflussen.[154,162-163]

Die 2′-O-Methylierung (Nm) kommt am häufigsten in rRNA, tRNA, snRNA sowie am mRNA-*Cap* vor. Besonders wichtig ist diese Modifikation in Bezug auf das Immunsystem, da es diesem bei der Unterscheidung zwischen körpereigener RNA und fremd-RNA hilft. Auch sind die am *Cap* gelegenen Nm wichtige Abwehrpunkte in der Wirt-Virus-Interaktion.[164-165]

Die Methylierung m^1a kommt sehr häufig in tRNA vor. Aufgrund der durch die Methylierung verursachte dauerhaften positiven Ladung an der Nukleobase wird die Basenpaarung gestört.[166] Dadurch wird in der tRNA die T-Schleife stabilisiert und die Initiation wird beeinflusst. In mRNA führt m^1a dagegen zu einer Hemmung der Translation.[167] Veränderungen und Dysregulierungen an den für die m^1a-Methylierung und -Demethylierung zuständigen Enzymen führen zu diversen Erkrankungen wie Tumorbildung oder neurologischen Auffälligkeiten.[168-170]

Die m^6a-Methylierung ist die am häufigsten vorkommende interne mRNA-Modifikation in Säugetieren. Sie führt ebenfalls, wie die m^1a-Modifikation, zu einer Destabilisierung der Doppelhelix, da die Methylgruppe die Watson-Crick-Basenpaarung einschränkt.[171] Die Modifikation findet sich sehr selektiv in einem DRACH-Sequenzmuster (D = a/g/u, R = a/g, A = m^6a, C = c, H = a/c/u) wieder, wobei vor allem der nicht codierte Bereich nahe des Stopcodons am 3′-Ende der RNA durch m^6a modifiziert wird.[172-173] Die N^6-Methylierung ist eine von *Writer*- und *Eraser*-Enzymen dynamisch regulierte Modifikation, welche positions- und strukturabhängig wie ein Schalter funktioniert. *Reader*-Proteine erkennen die Markierung und destabilisieren oder stabilisieren dann je nach Position der Methylierung die mRNA. So bestimmt die m^6a-Modifikation die Lebensdauer der mRNA, was sich zusätzlich auf die Geschwindigkeit des Exports und die Effizienz der Translation auswirkt. Eine Fehlregulierung der m^6a-*Writer*- und *Reader*-Proteine

verschiebt das Gleichgewicht zwischen Stabilisierung und Abbau von mRNAs.[174-175] Solche Veränderungen werden vor allem mit der Tumorprogression assoziiert. Doch auch bei kardiovaskulären Krankheiten wie Herzinsuffizienz, Ischämie oder Arrhythmien kommt es zu einer Dysregulation der m^6a-Modifikation. Gleichzeitig kann die gezielte Manipulation der m^6a-Regulation, als potenzieller therapeutischer Ansatz in der Onkologie genutzt werden.[176-178]

3 4-Aminophthalimid als Sonde für *N*^{6}-Methyladenosin

Aufgrund der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen photophysikalischen Eigenschaften und der damit einhergehenden starken Solvatofluorochromie des **o-4API** als fluoreszentes Basensurrogat wurde die Hypothese entwickelt, dass sich dieses als fluoreszente Sonde zur Detektion der m^{6}a-Modifikation in RNA geeignet sein könnte. Die Methylierung des Adenosins verändert die Anzahl der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen. So kann je nach Orientierung der *N*^{6}-Methylgruppe nur eine der beiden Wasserstoffbrücken zwischen der ***o*-4API** und dem m^{6}a ausgebildet werden (Abbildung 24).

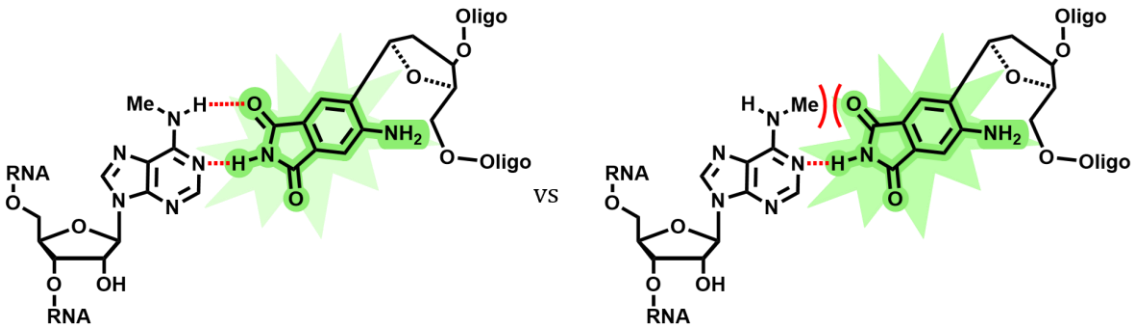


Abbildung 24: Unterschiedliche Zahl der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden m^{6}a-Konformationen und ***o*-4API**.

Parallel dazu führt die zusätzliche Methylgruppe zu einer lokal unpolaren Umgebung des Chromophors. Da ***o*-4API** nachweislich sehr sensitiv auf Änderungen der Polarität und Wasserstoffbrückenbindungen reagiert, ist zu erwarten, dass sich die optischen Eigenschaften zwischen Paarungen mit a und m^{6}a deutlich unterscheiden. Um eine spätere biologische Anwendung sinnvoll gestalten zu können, sollten mögliche Einflüsse der Oligonukleotidsequenz auf den Chromophor analysiert werden. Dafür wurden die direkten Nachbarbasen des ***o*-4API** der schon in den früheren Arbeiten verwendeten Sequenz modifiziert (Abbildung 25). Zunächst sollten die Sequenzen der RNA-Stränge mit allen vier verschiedenen Nachbarbasen analysiert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Untersuchungen auf die entsprechenden DNA-Sequenzen mit A oder T als

Nachbarbase erweitert. Da die vorangegangenen Ergebnisse der RNA-Charakterisierung gezeigt haben, dass die Fluoreszenzen der Duplexe mit g oder c als Nachbarbase zu ***o*-4API** stark gelöscht werden, wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen nicht untersucht.

RNA-Sequenz: 5'—g—c—u—g—c—**x**—***o*-4API**—**x**—c—g—u—c—g—3'

DNA-Sequenz: 5'—G—C—T—G—C—**X**—***o*-4API**—**X**—C—G—T—C—G—3'

Abbildung 25: Allgemeine Sequenzen der Oligonukleotide mit x = a, u, g, c bzw. X = A, T.

Zur Charakterisierung einer möglichen m^6a-Detektion wurden für alle relevanten Sequenzen die jeweiligen RNA-Gegenstränge mit entweder a oder m^6a als komplementäre Base mit den ***o*-4API**-Strängen hybridisiert. Insgesamt entstanden dadurch acht verschiedene RNA-Duplexe sowie vier DNA–RNA-Hybridduplexe, die auf ihre optischen Eigenschaften untersucht wurden. Um die Selektivität der Sonde weiter zu prüfen, wurden zudem Duplexe mit einer m^1a-Modifikation anstelle von m^6a hergestellt und vergleichend analysiert.

cs_RNA_a: 3'—c—g—a—c—g—**y**—**a**—**y**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA_m^6a: 3'—c—g—a—c—g—**y**—**m^6a**—**y**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA_m^1a: 3'—c—g—a—c—g—**u**—**m^1a**—**u**—g—c—a—g—c—5'

Abbildung 26: Allgemeine Sequenzen der RNA-Gegenstränge mit y = u, a, c, g.

3.1 Synthese des *o*-4API-Phosphoramiditbausteins

Die Synthese des ***o*-4API**-Phosphoramidits **12** wurde nach den von MARKUS MERKEL entwickelten Vorschriften durchgeführt.[51] Dabei wurden einzelne Syntheseschritte an neuere Erkenntnisse der Forschung angepasst und dadurch optimiert.

Für die Synthese des Glykals **3** (Abbildung 27) wurde kommerziell erhältliches 2'-Desoxythymidin zunächst an den Hydroxygruppen der Ribose mittels *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS) geschützt. Als nächster Syntheseschritt erfolgte die Eliminierung des Thymins unter Bildung des doppelt geschützten Glykals **2**. Im Unterschied zu dem in früheren Arbeiten des Arbeitskreises WAGENKNECHT vorgeschlagenen Verfahren wurde hier ein alternativer Weg gewählt. MERKEL setzte

in seiner Arbeit Hexamethyldisilazan (HMDS) als Lösungsmittel ein, welches zusammen mit Ammoniumsulfat das starke Silylierungsreagenz Bistrimethylsulfat bildet.[51] Durch Silylierung der Thyminbase *in situ* entsteht so ein positiv gelangender Pyridiniumrest, welcher als gute Abgangsgruppe eliminiert wird. Dieser Weg, welcher 1997 von CAMERON *et al.* vorgeschlagen wurde, besitzt mehrere Nachteile.[179] So erfordert diese Methode hohe Temperaturen von 130 °C und einen großen Überschuss an HMDS. Zudem fallen die Ausbeuten eher gering und stark schwankend aus und es können sich leicht polymere Nebenprodukte bilden. Auch eine Vergrößerung des Reaktionsansatzes wurde als problematisch beschrieben.[180] Deshalb wurde in dieser Arbeit das Glykal nach dem von MAO *et al.* vorgeschlagenen Syntheseweg hergestellt. Dabei erfolgt die Silylierung des Thymidins unter basischen Bedingungen mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) und katalytischen Mengen an $[Ph_2PS]_2NH$, welches nach der Synthesevorschrift von LIANG *et al.* hergestellt wurde.[180-181] Um zu gewährleisten, dass die nachfolgende Heck-Kupplung stereoselektiv in β-Position des Zuckers stattfindet, wurde im nächsten Schritt die TBDMS-Gruppe an der 5'-Position selektiv entfernt.

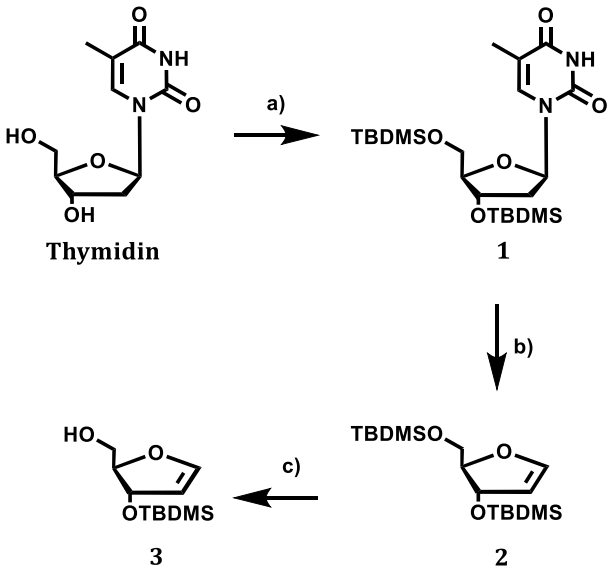


Abbildung 27: Synthese des 3'-geschützten Glykals **3**: a) TBDMSCl, Imidazol, DMF, RT, ü.N., 93 %; b) $[Ph_2PS]_2NH$, 2,6-Lutidin, BSA, Heptan/Toluol, 100 °C, ü.N., 93 %; c) TBAF, THF, 0 °C, 1 h, 85 %.

Zur Herstellung des Basensurrogats wurde kommerziell erhältliches 4-Aminophthalimid in einer elektrophilen aromatischen Substitution mit

N-Iodsuccinimid (NIS) iodiert. Für die Heck-Reaktion zwischen Verbindung **3** und **4** wurden die von MERKEL optimierten Kupplungsbedingungen verwendet. Bei der Kupplungsreaktion wurde festgestellt, dass die 3′-Position teilweise entschützt wurde. Das Verhältnis zwischen der 3'-O-geschützten Verbindung **5** und der ungeschützten Verbindung **6** lag bei etwa 4:1. Dies widerspricht zunächst der Datenlage von MERKEL, der die Verbindung **6** nur in Spuren nachweisen konnte. Da in dieser Arbeit ein größerer Ansatz gewählt wurde und deswegen auch die Reaktionszeit von 2 h auf 18 h erhöht wurde, ist die Entstehung des Nebenprodukts in größeren Mengen durchaus möglich. Eine mögliche Erklärung für diese Nebenreaktion ist die Verwendung des BF_4^--Salzes, welches zur Spaltung von Silylethern in der Lage ist, insbesondere bei kleinen Mengen an Restfeuchtigkeit.[182] Im nächsten Reaktionsschritt wurde Verbindung **5** mit Triethylamintrihydrofluorid vollständig entschützt. Das dabei entstandene Keton **6** wurde anschließend zum Alkohol reduziert und das artifizielle Nukleosid ***o*-4API** wurde erhalten (Abbildung 28).

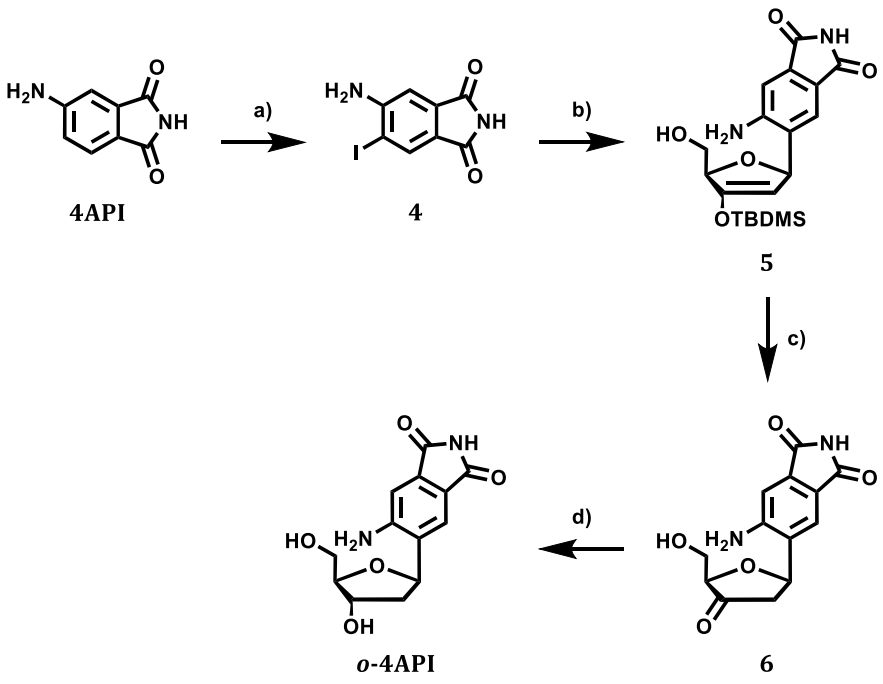


Abbildung 28: Synthese des ***o*-4API**-Nukleosids: a) NIS, DMF, 45 °C, ü.N., 90 %; b) **3**, $Pd_2(dba)_3$, $[(t\text{-Bu})_3PH]BF_4$, Dicyclohexylmethylamin, Dioxan, 75 °C, ü.N., 37 %; c) $NEt_3 \cdot 3HF$, THF, 0 °C → RT, 2 h, 72 %; d) $NaBH(OAc)_3$, AcOH/MeCN 3:1, 0 °C, 2 h, 68 %.

Um das Nukleosid in der Oligonukleotid-Festphasensynthese einsetzen zu können, musste das exozyklische Amin des Aminophthalimids geschützt werden. Dazu wurden zunächst die freien Hydroxygruppen mit der zyklischen *Marciewicz*-Schutzgruppe geschützt. Anschließend wurde das Amin mit Triphosgen zum Isocyanat umgesetzt, welches mit 4-Nitrophenylethanol zur entsprechenden 4-(2-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl (NPEOC)-Schutzgruppe reagierte. Die Gründe für den Einsatz der NPEOC-Schutzgruppe sowie deren Einführung mittels Triphosgen wurden ausführlich von MERKEL diskutiert.[52] Anschließend wurde die *Marciewicz*-Schutzgruppe wieder abgespalten und das nun am Amin geschützte Nukleosid konnte zum Phosphoramidit-Synthesebaustein umgesetzt werden. Dafür wurde zunächst an der 5′-Position eine Dimethoxytrityl (DMTr)-Gruppe eingeführt, gefolgt von der Einführung der Phosphoramiditgruppe an der 3′-Position mittels 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorphosphoramidit (PA-Cl) (Abbildung 29). Der so erhaltene Baustein konnte dann in der Festphasensynthese eingesetzt werden.

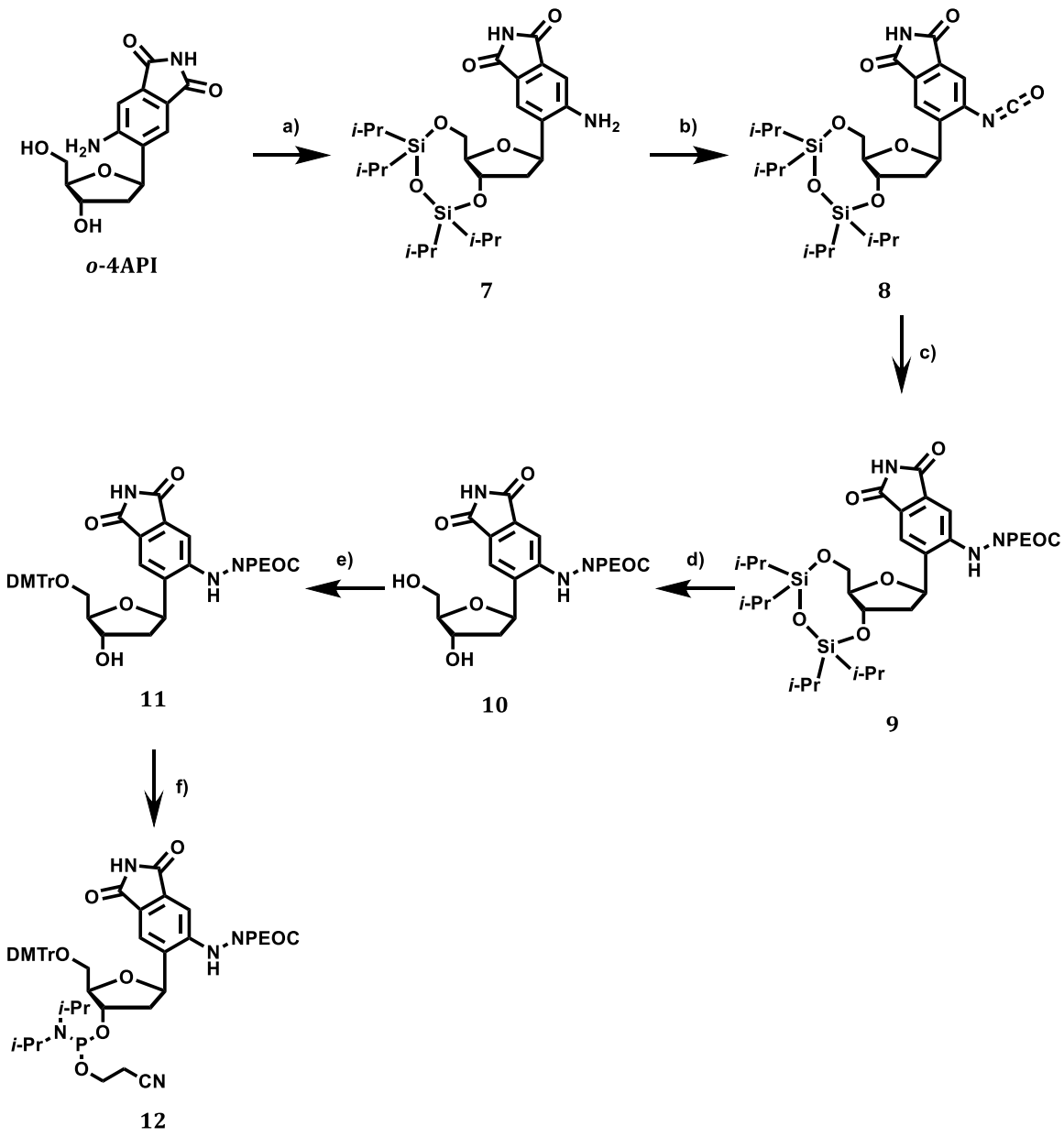


Abbildung 29: Synthese des Phosphoramiditbausteins **12**: a)TIPDSiCl$_2$, Pyridin, 0 °C → RT, ü.N., 76 %; b) Triphosgen, NEt$_3$, THF, 0 °C → RT, 1 h, 83 %; c) NPE-OH, CHCl$_3$, RT, 96 h, 44 %; d) TBAF, THF, 0 °C, 15 min, 57 %; e) DMTrCl, NEt$_3$, Pyridin, RT, ü.N., 47 %; f) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, 4 h, 86 %.

3.2 Synthese der Oligonukleotide

Um den Einfluss der direkten Nachbarbasen des ***o*-4API** auf dessen optische Eigenschaften untersuchen zu können, wurden die vier in Abbildung 30 dargestellten Sequenzen untersucht. Um eine Vergleichbarkeit mit vorherigen Untersuchungen gewährleisten zu können, entsprach die Sequenz von **RNA1_*o*-4API** der von FABIAN LANG untersuchten RNA.[53]

RNA1_*o*-4API: 5'—g—c—u—g—c—**a**—*o*-4API—**a**—c—g—u—c—g—3'

RNA2_*o*-4API: 5'—g—c—u—g—c—**u**—*o*-4API—**u**—c—g—u—c—g—3'

RNA3_*o*-4API: 5'—g—c—u—g—c—**g**—*o*-4API—**g**—c—g—u—c—g—3'

RNA4_*o*-4API: 5'—g—c—u—g—c—**c**—*o*-4API—**c**—c—g—u—c—g—3'

Abbildung 30: Sequenzen der ***o*-4API**-RNA-Stränge für alle vier verschiedenen Nachbarbasen.

Es wurde zudem untersucht, inwieweit sich die optischen Eigenschaften von DNA–RNA-Hybridduplexen von denen reiner RNA-Duplexen unterscheiden. Aus den Messungen der RNA-Duplexe ging hervor, dass die Fluoreszenz von **RNA3_*o*-4API** und **RNA4_*o*-4API** im Doppelstrang stark gelöscht wird (vgl. Kapitel 3.3.1). Für die entsprechenden DNA-Analoga wurde ein vergleichbares Verhalten angenommen. Da eine starke Fluoreszenzlöschung die Detektion m^6a weitgehend verhindert, wurden für die weiteren Untersuchungen ausschließlich die Hybridduplexe der Sequenzen für **DNA1_*o*-4API** und **DNA2_*o*-4API** betrachtet (Abbildung 31). Die synthetisierte Sequenz **DNA1_*o*-4API** entspricht dabei der von MARKUS MERKEL untersuchten DNA.[51]

DNA1_*o*-4API: 5'—G—C—T—G—C—**A**—*o*-4API—**A**—C—G—T—C—G—3'

DNA2_*o*-4API: 5'—G—C—T—G—C—**T**—*o*-4API—**T**—C—G—T—C—G—3'

Abbildung 31: Sequenzen der ***o*-4API**-DNA-Stränge mit den Nukleobasen A und T als Nachbarn des Chromophors.

Zur Beurteilung, ob ***o*-4API** als mögliche Sonde für die m^6a-Detektion verwendet werden kann, wurden zudem die folgenden RNA-Sequenzen als Gegenstränge synthetisiert (Abbildung 32).

cs_RNA1_m^{6}a: 3'—c—g—a—c—g—**u**—**m^{6}a**—**u**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA2_m^{6}a: 3'—c—g—a—c—g—**a**—**m^{6}a**—**a**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA3_m^{6}a: 3'—c—g—a—c—g—**c**—**m^{6}a**—**c**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA4_m^{6}a: 3'—c—g—a—c—g—**g**—**m^{6}a**—**g**—g—c—a—g—c—5'

Abbildung 32: Sequenzen der entsprechenden vier RNA-Gegenstränge mit m^{6}a-Modifikation.

3.2.1 Synthese der *o*-4API-Stränge

Die Synthese der ***o*-4API**-Sequenzen erfolgte analog zu dem von MARKUS MERKEL vorgeschlagenen Syntheseprotokoll für DNA beziehungsweise dem von FABIAN LANG vorgeschlagenen Syntheseprotokoll für RNA. Es galt zu beachten, dass die Imid-Funktionalität des ***o*-4API**-Bausteins unter den Standard-Abspaltungs- und Entschützungsbedingungen mit konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung für die Oligonukleotide zu labil ist. Durch die Entschützung nach der UltraMILD-Methode konnte eine Nebenreaktion des Imids verhindert werden.[52,183] Dies setzte zudem eine Verwendung der für die UltraMILD-Methode kompatiblen Schutzgruppen für die Standardbasen und Phenoxyessigsäureanhydrid als entsprechenden *Capping*-Reagenzes voraus. Im Anschluss an die Festphasensynthese erfolgte die Abspaltung der NPEOC-Schutzgruppe des Aminophthalimids. Dabei wurde Diazabicycloundecen (DBU) in Pyridin als starke nicht-nukleophile Base eingesetzt, welche das Carbamat durch β-Eliminierung abspaltet (Abbildung 33).

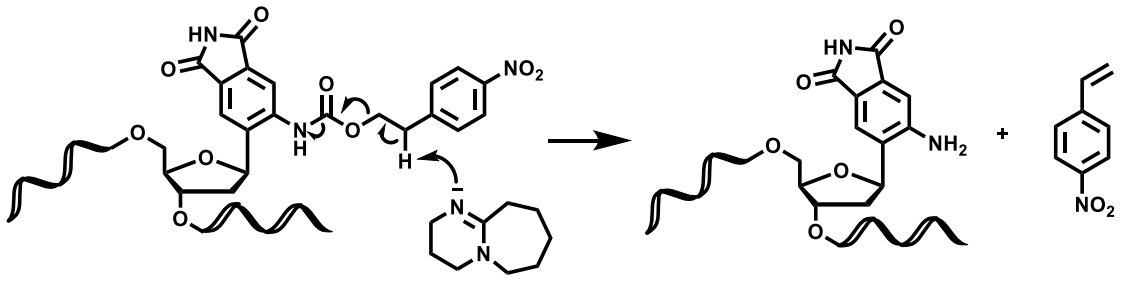


Abbildung 33: Mechanismus der β-Eliminierung des Carbamats zur Abspaltung der NPEOC-Schutzgruppe, katalysiert durch DBU.

Gleichzeitig ist DBU auch in der Lage, die Cyanoethylschutzgruppen des Phosphatrückgrats zu entfernen. Als Nebenprodukte entstehen *para*-Nitrostyrol und Acrylnitril, welche in der Lage sind, die Nukleobasen potenziell zu alkylieren.

Zum Abfangen dieser wurde Thymin als *Scavenger* der Entschützungslösung zugesetzt.[184]

Anschließend wurden durch Anwendung der UltraMILD-Methode die Oligonukleotide von der festen Phase abgespalten und die restlichen Schutzgruppen entfernt. Nach diesem Schritt konnten die DNA-Sequenzen aufgereinigt werden, während für die RNA-Sequenzen noch die 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe der Ribosen mit $NEt_3 \cdot 3HF$ abgespalten werden musste. Durch die Entfernung der 2′-Hydroxy-Schutzgruppe wird die RNA jedoch deutlich labiler, da sie sowohl unter basischen Bedingungen hydrolyseanfällig ist als auch leichter durch RNAsen gespalten werden kann. Dabei kommt es zur Deprotonierung der 2′-Hydroxygruppe, welche dann intramolekular am 3′-Phosphat angreifen kann. Durch Protonentransfer auf den 5′-Sauerstoff des nächsten Nukleotids wird die Phosphoresterbindung an dieser Stelle gespalten. Als Zwischenprodukt entsteht ein zyklischer Phosphordiester, welcher hydrolytisch zum 3'-Phosphat umgesetzt wird. Zur Minimierung der RNA-Degradation wurde unter möglichst RNAse-freien Bedingungen gearbeitet. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte über zwei Schritte. Als Erstes wurden etwaige bei der Synthese entstandene Abbruchstränge mittels DNA- beziehungsweise RNA-GlenPaks™ abgetrennt. Hierbei war es wichtig, dass bei der Synthese die letzte DMTr-Schutzgruppe am 5′-Ende nicht entfernt wurde, da die unpolare DMTr-Gruppe eine erhöhte Affinität zu den GlenPak™-Säulen aufweist als die stärker polaren Abbruchstränge. Aufgrund der niedrigeren Affinität konnten die Abbruchstränge größtenteils weggespült werden. Die zweite Aufreinigung der Stränge erfolgte im Anschluss über semipräparative HPLC.

3.2.2 Synthese der *N*^{6}-Methyladenosin-Stränge

Für die Synthese der Stränge **cs_RNA_m^{6}a** konnten die gängigen Phosphoramiditbausteine mit Standardschutzgruppen verwendet werden. Als *Capping*-Reagenz wurde jedoch erneut Phenoxyessigsäureanhydrid anstelle von Essigsäureanhydrid verwendet, da der m^{6}a-Phosphoramiditbaustein an der exocyclischen Aminogruppe nicht nur methyliert, sondern zusätzlich mit einer Pac-

Schutzgruppe versehen ist (Abbildung 34). Auf diese Weise ließ sich ein unerwünschter Austausch der Pac-Gruppe gegen eine Acetylgruppe vermeiden, der bei der nachfolgenden Entschützung zu einer deutlich längeren Reaktionszeit geführt hätte.

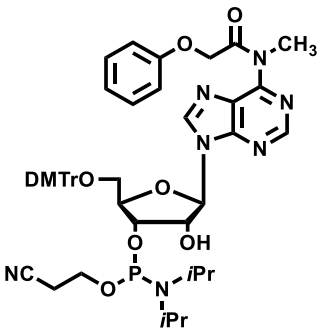


Abbildung 34: Phosphoramiditbaustein des N^6-Methyladenosins.

Die Entschützung und die Abspaltung der Oligonukleotide von der festen Phase erfolgten unter UltraFAST-Bedingungen mit einer 1:1-Lösung aus 33% Methylamin in Ethanol und 25% Ammoniumhydroxid in Wasser.[52,185] Anschließend wurden, wie auch bei den **RNA_*o*-4API** Strängen, die 2′-O-TBDMS-Schutzgruppen mittels $NEt_3 \cdot 3HF$ abgespalten. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte ebenfalls mittels GlenPak™-Säulen und anschließender semipräparativer HPLC. Auch hier wurde darauf geachtet, RNAse-frei zu arbeiten.

3.3 Spektroskopische Untersuchungen

Zur Charakterisierung der synthetisierten ***o*-4API**-Oligomere wurden diese sowohl im Einzelstrang als auch in den unterschiedlichen Duplex-Konstellationen untersucht. Neben den RNA_m^{6}a-Gegensträngen wurden zusätzliche RNA-Sequenzen mit nicht methyliertem Adenosin an der entsprechenden Position kommerziell erworben. Dadurch wurde für jede ***o*-4API**-Sequenz ein Datensatz bestehend aus dem Einzelstrang sowie den zwei Duplexen mit unterschiedlichem Gegenstrang erhalten. (Abbildung 35).

cs_RNA1_a: 3'—c—g—a—c—g—**u**—a—**u**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA2_a: 3'—c—g—a—c—g—**a**—a—**a**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA3_a: 3'—c—g—a—c—g—**c**—a—**c**—g—c—a—g—c—5'

cs_RNA4_a: 3'—c—g—a—c—g—**g**—a—**g**—g—c—a—g—c—5'

Abbildung 35: Übersicht der kommerziell erworbenen cs_RNA_a Gegenstränge.

Ergänzend wurde für die Sequenzen **DNA1_*o*-API** und **RNA1_*o*-API** ein weiterer Duplex mit einem N^1-Methyladenosin-modifizierten RNA-Gegenstrang gebildet (Abbildung 36). Auch diese RNA-Sequenz wurde kommerziell bezogen.

cs_RNA1_m^{1}a: 3'—c—g—a—c—g—**u**—m^{1}a—**u**—g—c—a—g—c—5'

Abbildung 36: Sequenz des kommerziell erworbenen N^1-Methyladenosin-modifizierten RNA-Gegenstrangs.

Ziel des Ansatzes war zu überprüfen, ob die Position der Methylierung am Adenosin einen messbaren Einfluss auf die optischen Eigenschaften der ***o*-4API** -modifizierten Oligomere ausübt und ob sich die Modifikationen m^6a und m^1a anhand der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen unterscheiden.

3.3.1 Optische Charakterisierung der RNA-RNA-Duplexe

Zur Charakterisierung der Emission wurden die Einzelstränge und Duplexe im Absorptionsmaximum des ***o*-4APIs** bei $\lambda_{Abs.}$ = 385 nm angeregt. Zunächst sollte die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Nachbarbasen des ***o*-4APIs** untersucht werden. Betrachtet man die Einzelstränge, zeigen sich für die Sequenzen **RNA1**, **RNA2** und **RNA4** ähnlich starke Fluoreszenzintensitäten. Das Maximum von **RNA1** liegt bei $\lambda_{Fl.}$ = 516 nm, während sich die Maxima für **RNA2** und **RNA4** bei jeweils $\lambda_{Fl.}$ = 523 nm befinden. Die leichte Erhöhung der Intensität und die hypsochrome Verschiebung des Maximums lassen darauf schließen, dass die Umgebung des ***o*-4API**-Bausteins im **RNA1**-Einzelstrang unpolarer ist als für **RNA2** und **RNA4**. Eine Erklärung hierfür wäre, dass das Purin a aufgrund der Größe das ***o*-4API** besser von der polaren, wässrigen Umgebung abschirmen kann als die kleineren Pyrimidine u und c. Zudem können weitere Einflüsse durch Sekundärstrukturen der RNA-Oligomere oder Wechselwirkungen durch die Stapelung zwischen den Nachbarbasen und dem Chromophor nicht ausgeschlossen werden. Für **RNA3** liegt das Maximum bei

$\lambda_{Fl.}$ = 519 nm, allerdings wird die Emission stark gelöscht. Erklärt werden kann dies durch das niedrige Oxidationspotential der Guanosins. Dadurch kann es als Elektronendonor in einem photoinduzierten Elektronentransfer (PET) mit dem angeregten Zustand des Chromophors fungieren (Abbildung 37).[186]

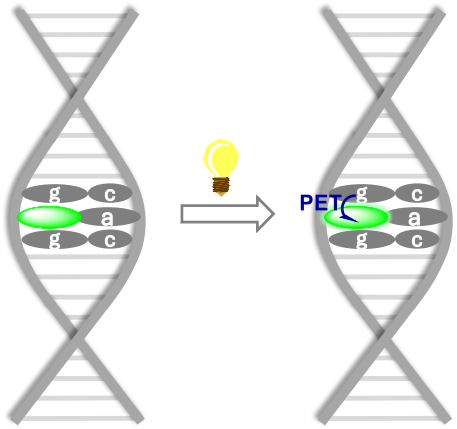


Abbildung 37: Schematische Darstellung eines PET zwischen Guanosin und dem ***o*-4API**-Chromophor, welcher zu einer stark gelöschten Fluoreszenz führt.

Betrachtet man die Duplexe für die Stränge **RNA_*o*-4API** mit den Strängen **cs_RNA_a**, sind die Unterschiede in der Emission um einiges größer. Der Duplex **RNA2+a** zeigt eine wesentlich stärkere Fluoreszenz als der Duplex **RNA1+a**. Auch ist das Maximum umgekehrt zu den Einzelsträngen für **RNA2+a** bei $\lambda_{Fl.}$ = 509 nm bei niedrigerer Wellenlänge als für den Duplex **RNA1+a** bei $\lambda_{Fl.}$ = 514 nm. Dies deutet darauf hin, dass sich infolge der Hybridisierung die Polaritäten der lokalen Umgebung für **RNA1** und **RNA2** geändert haben und sich das ***o*-4API** in **RNA2** nun in einer weniger polaren Nachbarschaft befindet. Durch die Hybridisierung der **RNA4** wurde der Fluorophor über den Gegenstrang in räumliche Nähe zu zwei g-Basen gebracht. Dadurch kann auch hier ein PET stattfinden, welcher zu Folge hat, dass die Fluoreszenz, ebenso wie für den **RNA3-**Duplex, gelöscht wird (Abbildung 38).

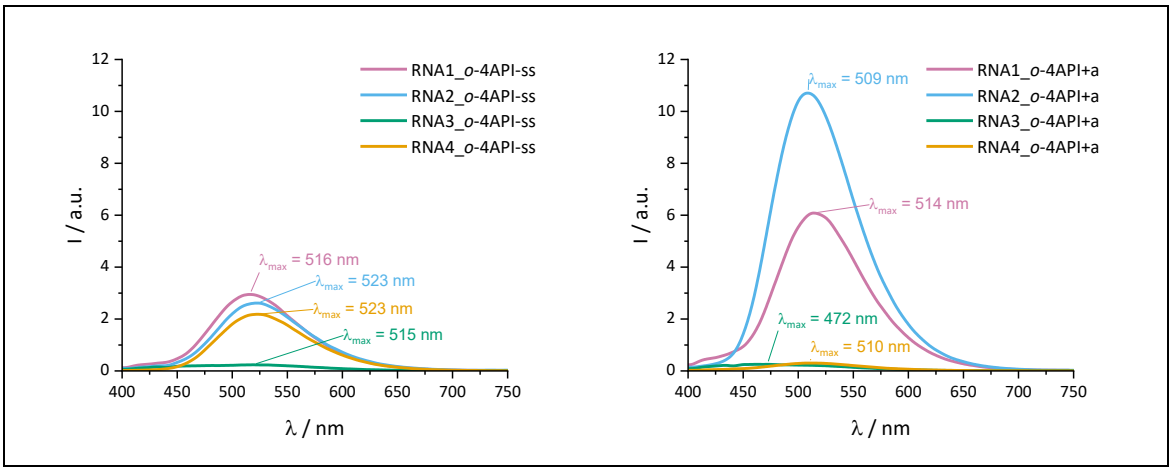


Abbildung 38: Emission der RNA-Einzelstränge (links) sowie der RNA-a-Duplexe (rechts) in Abhängigkeit der Nachbarbasen; 2.5 µM RNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 385 nm, Spaltbreite 3/3 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit lag darauf, zu untersuchen, ob sich ***o*-4API** als Sonde zur Detektion der m^6a-Modifikation in RNA eignet. Hierzu wurden die Emissionsspektren der RNA-Einzelstränge sowie der a- und m^6a--Duplexe für alle vier Nachbarbasen miteinander verglichen (Abbildung 39). Zur besseren Auswertung der Daten wurden für die Sequenz der **RNA3** die gemessenen Fluoreszenzspektren sowohl für den Einzelstrang als auch für die Duplexe polynomiell mit nachfolgender Funktion angepasst:

$$y = \sum_{k=0}^{9} a_k \, x^k \qquad (1)$$

Hierbei beschreibt a_k (mit k = 0,…,9) die Polynomkoeffizienten.

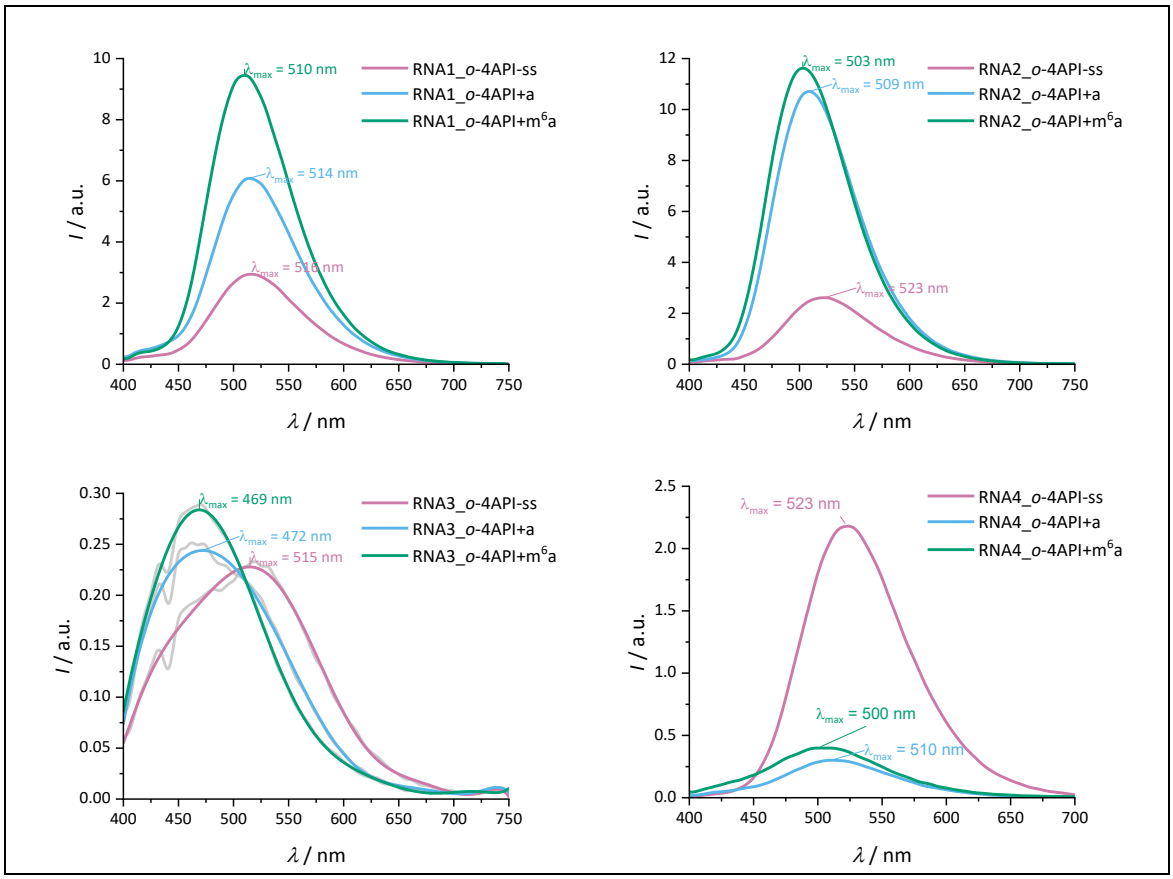


Abbildung 39: Vergleich der Emission zwischen der Einzelstrang-RNA, dem RNA-a-Duplex sowie dem RNA-m^{6}a-Duplex für die vier Nachbarbasenvariationen; 2.5 µM RNA, 10 mM NaP$_i$-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 385 nm, Spaltbreite 3/3 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Für alle Sequenzen außer **RNA4**, führt die Hybridisierung zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dies kann durch die Einbettung des Fluorophors in die RNA-Doppelhelix begründet werden. Dabei sinkt die Polarität der Umgebung des ***o*-4-API**, was in einer steigenden Intensität und einer hypsochromen Verschiebung der Maxima resultiert.[53] In allen vier Fällen lässt sich ein Unterschied zwischen den a-Duplexen und den m^{6}a-Duplexen beobachten. Die zusätzliche Methylgruppe verursacht zum einen zu eine hypsochrome Verschiebung und zum anderen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Der Anstieg der Emission fällt jedoch nach Sequenz unterschiedlich stark aus. Während er für **RNA1** sehr deutlich ist und nahezu zu einer Verdopplung der Intensität der Maxima führt, fallen die Unterschiede für die anderen RNA-Sequenzen deutlich geringer aus. Diese Beobachtungen stimmen mit den Erwartungen überein. Durch die Einführung der Methylgruppe wird die Umgebung des ***o*-4API**s unpolarer, was dann, wie bei den

Einflüssen der Hybridisierung schon beschrieben, zu einem Fluoreszenzanstieg und einer hypsochromen Verschiebung führt. Außerdem geht dabei je nach Ausrichtung der Methylgruppe eine Wasserstoffbrücke verloren. Dadurch ist der Ladungstransfer innerhalb des Chromophors weniger stark ausgeprägt, und die durch den ICT beschriebene Fluoreszenzlöschung wird stärker unterdrückt. Besonders auffällig ist die klare Sequenzabhängigkeit der Emissionsspektren.

Nochmal im Einzelnen betrachtet heißt das, dass für **RNA1** durch die Hybridisierung die deutlichste Intensitätszunahme beobachtet wird. Auch der Anstieg von a-Duplex zum m^6a-Duplex ist hier besonders stark ausgeprägt. Gleichzeitig sind die beschriebenen hypsochromen Verschiebungen hier am schwächsten ausgeprägt und betragen maximal $\Delta\lambda = 6$ nm. **RNA2** zeigt dagegen nur geringe Unterschiede zwischen den a- und m^6a-haltigen Duplexen, weist aber insgesamt die höchste Emission und auch den größten Anstieg durch die Hybridisierung auf. Die hypsochrome Verschiebung mit bis zu $\Delta\lambda = 20$ nm ist hier zudem stärker ausgeprägt. Für **RNA3** wird die Fluoreszenz im Allgemeinen zwar stark gelöscht, jedoch steigen auch hier die Intensitäten durch die Hybridisierung und Methylmodifikation leicht an. Zudem ist die hypsochrome Verschiebung der Maxima in diesem Fall am stärksten ausgeprägt und weist für den m^6a-Duplex $\Delta\lambda = 46$ nm auf. **RNA4** wird zwar durch die Hybridisierung gelöscht, dennoch zeigt der m^6a-Duplex etwas höhere Intensität wie der entsprechende a-Duplex. Auch hier zeigt sich eine ausgeprägte Verschiebung der Emissionsmaxima mit bis zu $\Delta\lambda = 23$ nm. Diese Ergebnisse stehen im Einklang dazu, dass der ***o*-4API** Chromophor äußerst empfindlich auf strukturelle und elektronische Veränderungen in seiner unmittelbaren Umgebung reagiert. Sowohl die Art der Gegenbase als auch die Nachbarbasen innerhalb der RNA-Doppelhelix beeinflussen die Emission signifikant. Zwar hat die Methylierung in allen Fällen einen Einfluss auf die Fluoreszenz, ob dieser aber groß oder eher geringfügig ausfällt, ist stark von der direkten Umgebung des Chromophors abhängig.

Eine Betrachtung der Schmelztemperaturen der verschiedenen Duplexe zeigt, dass die Schmelztemperaturen der m^6a-Duplexe mit $\Delta T_m = 0.2\text{-}1.0$ °C etwas niedriger

sind als die der entsprechenden a-Duplexe. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erwartungen, dass die Methylgruppe die Basenpaarung stört, überein. Zudem zeigt sich eine Erhöhung der Schmelztemperaturen von **RNA3**- und **RNA4**-Duplexe, was durch den erhöhten c/g-Gehalt und dem damit höheren Anteil an Wasserstoffbrückenbindungen korreliert. Zudem ist auffällig, dass die Einbettung des Chromophors zwischen zwei Pyrimidinen, wie es für **RNA2** und **RNA4** der Fall ist, ebenfalls zu einer höheren Schmelztemperatur führt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Schmelztemperaturen der a- und m^6a-Duplexe für RNA1 bis RNA4.

Duplex	**T_m [°C]**
RNA1_*o*-4API+a	63.0
RNA1_*o*-4API+m^6a	62.5
RNA1_*o*-4API+m^1a	61.0
RNA2_*o*-4API+a	65.0
RNA2_*o*-4API+m^6a	64.0
RNA3_*o*-4API+a	71.8
RNA3_*o*-4API+m^6a	71.3
RNA4_*o*-4API+a	74.7
RNA4_*o*-4API+m^6a	74.5

Die erhöhten Schmelztemperaturen für die Pyrimidin-Nachbarbasen können zum Beispiel durch vermehrte Stapelnde Wechselwirkungen entstehen, wie es in Abbildung 40 dargestellt ist. Durch die Einbettung des Chromophors zwischen zwei Purinen wird dieser weitestgehend abgeschirmt; Wechselwirkungen zwischen ***o*-4API** und dem komplementären Strang finden hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen statt. Zwischen zwei Pyrimidinen kann der Chromophor aufgrund seiner Größe nicht vollständig eingebettet werden, es ist möglich, dass es zu weiteren stapelnden Wechselwirkungen mit dem komplementären Strang kommt.

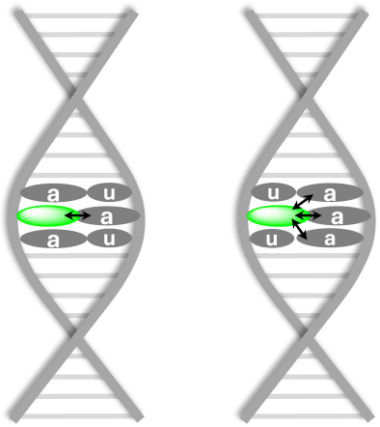


Abbildung 40: Darstellung der Einbettung von ***o*-4API** zwischen zwei Purinen (links) oder zwei Pyrimidinen (rechts) am Beispiel der **RNA1_*o*-4API+a** und der **RNA2_*o*-4API+a** Duplexe. Die Pfeile sollen dabei die möglichen Wechselwirkungen darstellen.

Um feststellen zu können, ob die ***o*-4API**-Sonde in der Lage ist, neben der m^6a-Modifikation auch eine m^1a-Modifikation zu detektieren, wurde der für **RNA1** entsprechende m^1a-Duplex mit dem m^6a-Duplex und dem a-Duplex verglichen. Für den m^1a-Duplex zeigt sich ebenfalls ein ausgeprägter Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dabei sind die Unterschiede zwischen dem m^1a-Duplex und dem m^6a-Duplex wenig signifikant. Somit kann die **RNA1_o-4API** Sonde sowohl für die Detektion von m^6a als auch von m^1a verwendet werden. Allerdings kann die Sonde dabei nicht qualitativ zwischen den beiden Modifikationen differenzieren (Abbildung 41). Die Schmelztemperatur ist mit T_m = 61 °C die niedrigste aller **RNA1**-Duplexe. Dies geht mit den entsprechenden Erwartungen, dass die positive Ladung der m^1a-Modifikation die RNA-Doppelhelix am meisten destabilisiert, einher.

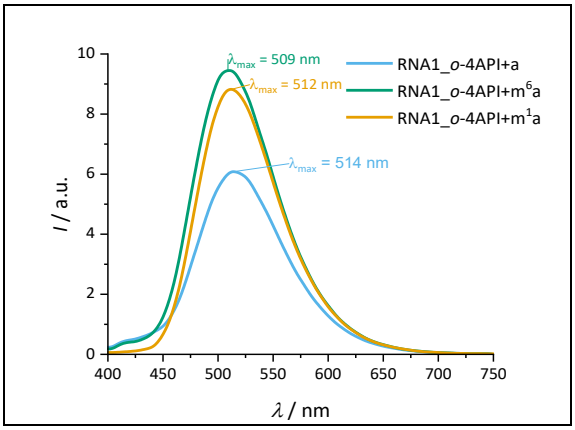


Abbildung 41: Vergleich der Emissionen für den m^6a-Duplex, den m^1a-Duplex und den a-Duplex von RNA1; 2.5 µM RNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 385 nm, Spaltbreite 3/3 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Zusammenfassend zeigen alle untersuchten Systeme einen Anstieg der Fluoreszenz, sollte m^6a anstelle von a im Gegenstrang vorliegen. Diese Änderung ist nur für die Sequenzen der **RNA1** und **RNA4** signifikant; für **RNA4** allerdings aufgrund des starken Quenchings nicht für eine praktische Anwendung geeignet. Dennoch lässt sich festhalten, dass sich die ***o*-4API**-haltigen RNA-Stränge prinzipiell als sensitive Reporter für die Adenosinmethylierung eignen. Allerdings kann die Sonde dabei nicht zwischen der Lokalisation der Methylierung unterschieden.

3.3.2 Optische Charakterisierung der DNA-RNA-Hybridduplexe

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob sich ***o*-4API**, eingebettet in einem DNA-Strang, besser als m^6a-Sonde eignet als in der RNA. Dies brächte mehrere Vorteile mit sich. Zum einen sind DNA-Stränge aufgrund ihrer höheren Stabilität wesentlich stabiler gegenüber enzymatischem Abbau und dadurch besser zu handhaben, was die Sonde, insbesondere im Hinblick auf eine zelluläre Anwendung, geeigneter machen würde. Zum anderen liegt, wie schon in Kapitel 2.2.1 beschrieben das ***o*-4API** Nukleotid in einer 2‘-endo-Konformation vor, was den 2‘-Desoxyribonukleotid Analoga entspricht. Im vorangegangenen Kapitel 3.3.1 wurde festgestellt, dass die räumliche Nähe zu Guanosin in den Sequenzen **RNA3** und **RNA4** zu einer starken Fluoreszenzlöschung führte. Es wurde angenommen, dass dieses Phänomen auf die DNA-Sequenz übertragbar ist. Da hierdurch eine m^6a-Detektion von vornherein ausgeschlossen wird, wurden für die DNA-Sequenzen nur noch die beiden zu **RNA1** und **RNA2** analogen Sequenzen **DNA1** und **DNA2** synthetisiert und untersucht. Zunächst wurden auch hier die Emissionsspektren der Einzelstränge und der a-Hybridduplexe betrachtet (Abbildung 42). Auffällig ist hierbei, dass die Fluoreszenz des Einzelstranges **DNA2**annähernd doppelt so hoch ist wie die des Einzelstrangs **DNA1**. Diese Erhöhung geht dabei nicht mit der Verschiebung des Maximums einher. Für beide Einzelstränge ist dies bei $\lambda_{Fl.} = 523$ nm. In den a-Hybridduplexen nimmt der Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten auf ungefähr zwei Drittel weiter zu. Zudem zeigt sich hier auch eine klare hypsochrome Verschiebung des Maximums des Hybridduplexes **DNA2+a** im Vergleich zum Hybridduplex **DNA1+a**.

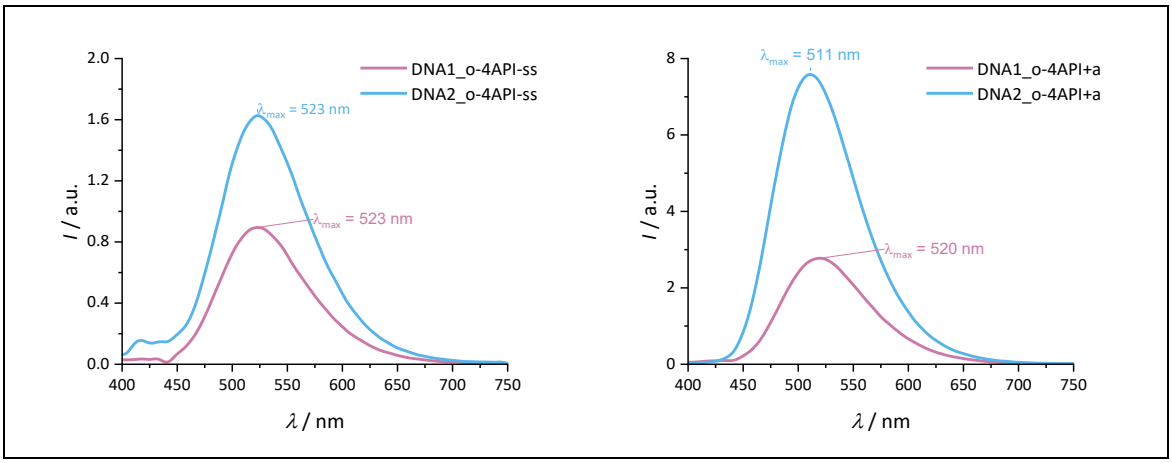


Abbildung 42: Emission der DNA-Einzelstränge (links) sowie der DNA–RNA-a-Hybridduplexe (rechts) in Abhängigkeit der Nachbarbasen A und T; 2.5 µM RNA, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 385 nm, Spaltbreite 3/3 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Der Vergleich der einzelnen Sequenzen und deren Hybridduplexe unter Einbeziehung des m^{6}a-Hybridduplexes zeigt, dass die Emission für alle Duplexe stark zunimmt und die Maxima durch die Hybridisierung hypsochrom verschoben werden (vgl. Kapitel 3.3.1). Dabei sind die Fluoreszenzintensitäten für die Sequenz **DNA1** im Allgemeinen niedriger als für die entsprechenden Einzel- und Doppelstränge **DNA2**. Für beide Systeme ist allerdings der Anstieg der Fluoreszenz über den a-Hybridduplex zum m^{6}a-Hybridduplex im selben Bereich. In beiden Fällen lässt sich zudem ein eindeutiger Unterschied zwischen einem methylierten und einem unmodifizierten Adenosin erkennen. Für die Sequenz **DNA1**verschiebt sich das Emissionsmaximum für den a-Hybridduplex um 3 nm und für den m6a-Hybridduplex um 10 nm. Für **DNA2** fallen die Verschiebungen mit 12 nm und 20 nm deutlich stärker aus. Auffällig ist, dass sich die Unterschiede in den Verschiebungen zwischen den beiden Sequenzen hauptsächlich durch die Hybridisierung ergeben. Die Verschiebung vom a-Hybridduplex zum m^{6}a-Hybridduplex ist für beide Sequenzen mit 7 nm beziehungsweise 8 nm annähernd identisch (Abbildung 43). Die Erklärung für diese Beobachtungen wurde in Kapitel 3.3.1 diskutiert und kann ebenfalls für die Hybridduplexe angenommen werden.

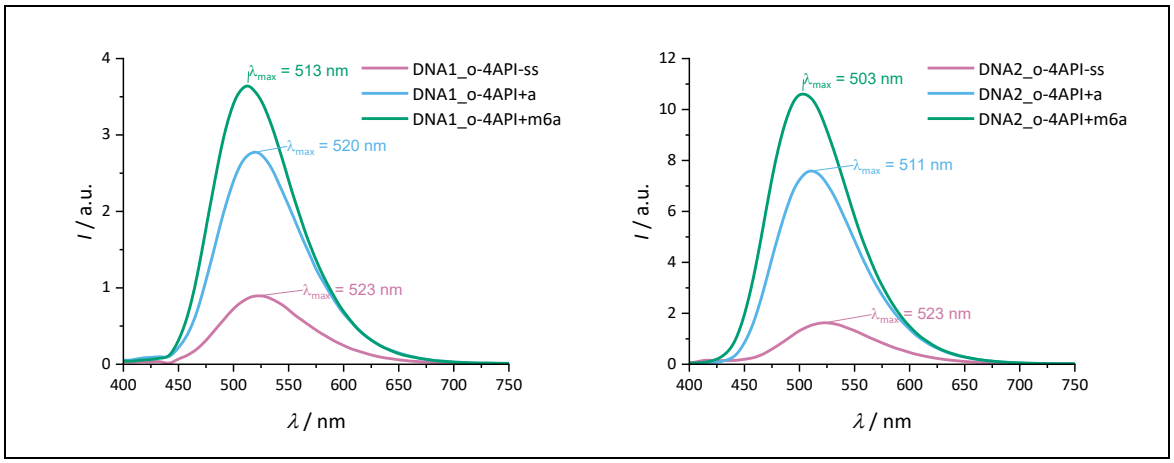


Abbildung 43: Vergleich der Emissionen zwischen der Einzelstrang-DNA, den DNA–RNA-a-Hybridduplexen sowie den DNA–RNA-m^{6}a-Hybridduplexen, für die die Nachbarbasen A und T; 2.5 µM RNA, 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 385 nm, Spaltbreite 3/3 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die Hybridduplexe zeigen durch die Methylierung eine Verringerung ihrer Schmelztemperaturen. Auch lässt sich erneut ein Unterschied zwischen den verschiedenen Sequenzen erkennen, wobei die Hybridduplexe der **DNA2** die höheren Schmelztemperaturen aufweisen (Tabelle 2). Sowohl die Schmelztemperaturen als auch die Fluoreszenzspektren unterstützen die Annahme, dass der Chromophor besser in eine Sequenz mit zwei Pyridinen als Nachbarbasen eingebettet werden kann.

Tabelle 2: Schmelztemperaturen der a- und m^{6}a-Hybridduplexe für **DNA1** und **RNA2**.

Duplex	T_m [°C]
DNA1_*o*-4API+a	51.7
DNA1_*o*-4API+m^{6}a	50.5
DNA1_*o*-4API+m^{1}a	50.3
DNA2_*o*-4API+a	56.0
DNA2_*o*-4API+m^{6}a	55.3

Um die Selektivität bezüglich der ***o*-4API**-Sonde gegenüber der Stelle der Methylierung zu testen, wurde analog zu den RNA-Untersuchungen auch **DNA1** mit dem m^{1}a-haltigen RNA-Gegenstrang hybridisiert. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Fluoresznezintensität für den m^{1}a-Hybridduplex im Vergleich zu dem a-Hybridduplex. Erneut sind die Unterschiede der Emissionsspektren zwischen dem

m^{1}a- und dem m^{6}a gering (Abbildung 44). Die Schmelztemperatur fällt, wie zu erwarten, für m^{1}a-Duplex erneut am niedrigsten aus, allerdings sind die Unterschiede zwischen den Hybridduplexen deutlich geringer als zwischen den reinen RNA-Duplexen (Tabelle 2). Somit kann die DNA-basierte ***o*-4API**-Sonde sowohl eine m^{1}a- als auch eine m^{6}a-Modifikation detektieren, allerdings ist auch für die Hybridduplexe keine aussagekräftige Differenzierung zwischen den beiden Modifikationen möglich.

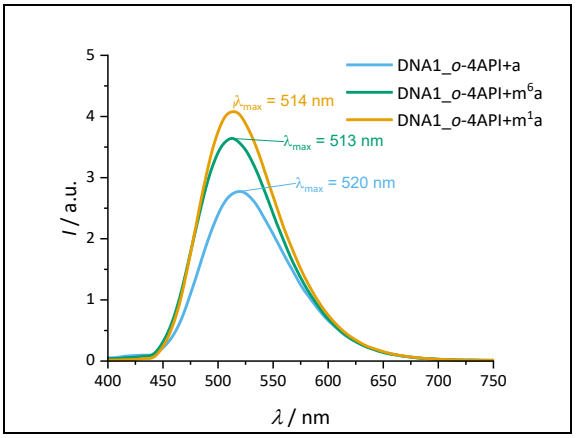


Abbildung 44: Vergleich der Emission für den **DNA1-RNA_m^{6}a** Hybridduplex und den **DNA1-RNA-m^{1}a** Hybridduplex; 2.5 µM RNA, 10 mM NaP$_i$-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 385 nm, Spaltbreite 3/3 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Zusammenfassend zeigen die beiden DNA-Sequenzen einen deutlichen Unterschied in der Emission zwischen nicht methyliertem und methyliertem Adenosin. Dadurch könnte dieses System durchaus als Sonde für die m^{6}a-Detektion eingesetzt werden. Allerdings gilt zu beachten, dass die Unterscheidung der Lokalisation der Methylierung dabei nicht möglich ist.

3.4 Vergleich der verschiedenen Duplexe

Vergleicht man die untersuchten ***o*-4API-RNA**- und ***o*-4API-DNA**-Sonden miteinander, ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz für die DNA-Sequenzen sowohl im Einzel- als auch im Doppelstrang deutlich geringer ist als für die entsprechenden RNA-Sequenzen. Besonders stark ist diese Differenz bei den Strängen der **Sequenz 1** ausgeprägt. Zudem zeigen sich ein ausgeprägter Unterschied in den Verschiebungen zwischen den Fluoreszenzmaxima der äquivalenten RNA- und DNA-Einzel- beziehungsweise Doppelsträngen. Für Sequenz 2 sind die

Unterschiede, mit Ausnahme der Hybridisierung gegen **cs_RNA2-a,** weniger deutlich. Die Maxima liegen hier bei nahezu denselben Wellenlängen. Dabei scheint es keinen wesentlichen Einfluss zu haben, ob in **Sequenz 2** ein Uracil (RNA) oder eine Thymin (DNA) die Nachbarbasen des ***o*-4APIs** bilden. Die beobachteten Unterschiede sind daher vermutlich auf strukturelle Abweichungen der RNA- beziehungsweise DNA-Konformation zurückzuführen und scheinen für **Sequenz 1** stärker ausgeprägt zu sein. Da jedoch keine weiteren Daten zur Struktur der Stränge vorliegen, lässt sich hier keine präzisere Aussage zu treffen.

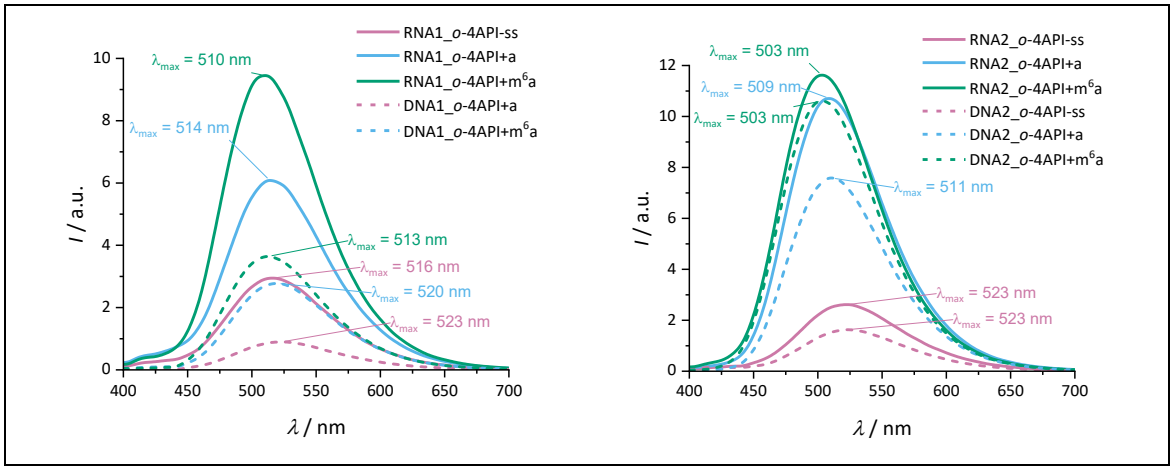


Abbildung 45: Vergleich der Emissionen der Sequenzen **RNA1** und **DNA1** (rechts) sowie **RNA2** und **DNA2** (links).

Die Schmelztemperaturen sind für die Hybridduplexe deutlich niedriger als die der reinen RNA-Duplexe. Dies lässt sich durch die verschiedenen Konformationen, in denen DNA und RNA vorliegen, erklären. Dadurch kann die Watson-Crick-Basenpaarung nicht mehr ideal ausgebildet werden und es kommt zu einer Erniedrigung der Schmelztemperatur. Beide Systeme zeigen für Sequenz 2 eine höhere Schmelztemperatur als für die Sequenz 1. Dies deutet darauf hin, dass die Einbettung des Chromophors sowohl in RNA mit Uridin als Nachbarbase als auch in DNA mit Thymidin als direktem Nachbar besser stattfinden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die **DNA _*o*-4API**-Sonden insgesamt besser zur Detektion der m^{6}a-Modifikation eignen. Zwar zeigen die **RNA1**-Duplexe die größten Unterschiede zwischen a- und m^{6}a-haltigen Strängen, dennoch liefert das DNA-System über beide Sequenzen hinweg die konstanteren

Unterschiede in der Emission, welche eine klare Abgrenzung zwischen a und m^6a treffen lassen. Die fehlende Differenzierbarkeit zwischen der m^6a- und m^1a-Modifikation stellt jedoch in beiden Systemen eine Einschränkung dar.

3.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die erfolgreiche Detektion der m^6a-Modifikation erzielt werden, allerdings bleiben die zugrunde liegenden Mechanismen dafür teilweise ungeklärt. Um die Funktionsweise der Sonde genauer beschreiben zu können, wären Strukturanalysen der untersuchten Duplexe erforderlich. Diese könnten zudem dazu beitragen, die beobachteten Unterschiede zwischen den RNA- und DNA-Sequenzen besser zu verstehen. Insbesondere die deutlichen Unterschiede zwischen **Sequenz 1** und **Sequenz 2** lassen sich nicht eindeutig erklären. Ein möglicher Einfluss des Adenosins als Nachbarbase auf den Chromophor kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Adenosin besitzt nach Guanosin das zweitniedrigste Oxidationspotenzial aller natürlichen Nukleobasen. Es ist daher denkbar, dass auch hier in geringem Maße ein PET vom Adenosin auf den Chromophor stattfinden kann, welcher zu einem partiellen Quenching der Fluoreszenz führt. Die Unterschiede in den Emissionsspektren können zudem davon abhängen, wie gut das ***o*-4API** aufgrund der Einflüsse der Hybridisierung und der Methylgruppe in die Basenstapelung eingebettet werden kann. Je nachdem könnten so die Wechselwirkungen mit Adenosin stärker oder schwächer ausfallen. Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste das Reduktionspotenzial des Chromophors im angeregten Zustand bestimmt werden. Dazu sollte zunächst das Reduktionspotenzial im Grundzustand mittels Cyclovoltammetrie ermittelt werden. Anschließend könnte das Potenzial im angeregten Zustand durch Anwendung der Rehm-Weller-Beziehung berechnet werden.

Für eine potenzielle biologische Anwendung wäre es zudem wichtig, den zeitgleichen Einfluss von zwei verschiedenen Nachbarbasen auf den Chromophor zu untersuchen. Dazu sollten möglichst alle verschiedenen Kombinationen an Nachbarbasen untersucht werden. Von besonderer Relevanz wäre dabei die

Gegensequenz zu der DRACH-Sequenz, in der die m^6a-Modifikation in humaner RNA am häufigsten vorkommt. Im nächsten Schritt könnte die Sonde in zellulärer Umgebung getestet werden. Erste Experimente von FABIAN LANG und FRANZISKA RÖNICKE zeigten bereits, dass der Chromophor im zellulären Kontext mindestens 24 h stabil ist und sich für die Konfokalmikroskopie eignet.[53]

Darüber hinaus wäre es interessant zu prüfen, ob sich ***o*-4API** auch als Sonde für andere Modifikationen eignet. Eine potenzielle Anwendung wäre die Detektion des N^4-Acetylcytidin, welche auch eine direkten Einfluss auf die Basenpaarung besitzt und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit das Verhalten des Chromophors beeinflusst. Die Charakterisierung eines solchen System unteranderem dahingehend interessant, da sowohl in DNA als auch in RNA die ***o*-4API**-Sonde gegenüber einem unmodifizierten Cytosin eine stabile Hybridisierung und starke Fluoreszenz zeigt.

4 Dichromophorsyteme in DNA und deren mögliche Anwendung zur *N*^{6}-Methyladenosin Detektion

Da der zuvor charakterisierte ***o*-4API**-Chromophor als Marker für die Markierung einer m^{6}a-Modifikation nur bedingt geeignet ist (Kapitel 3.4), wurde in dieser Arbeit ein weiterer Ansatz zur Detektion dieser Modifikation verfolgt. Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Arbeiten von SINA BERNDL und DANIELA BAUMSTARK wurde ein Dichromophorsystem entwickelt, das auf der Sequenz der von BAUMSTARK beschriebenen **PBI**-Klammer basiert, an der Zielposition jedoch ein Thymidin anstelle eines Adenins enthält (Kapitel 2.3.2.2 und 2.3.2.3). [83-86]

Die untersuchten Chromophore aus diesen Arbeiten sind relativ groß im Verhältnis zu den natürlichen Nukleotiden. Dadurch wirken sie störend auf die Basenstapelung der Oligonukleotide ein und die Duplexstabilität sinkt. Deshalb wurden für diese Arbeit sterisch weniger gehindertw Chromophore untersucht. Dies hat zwar den Vorteil, dass diese besser in den Basenstapelung interkalieren können, allerdings reduziert eine Verkleinerung des π-Systems das Stacking der Chromophore und führt zu einer hypsochromen Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge. Zunächst wurden, angelehnt an das ***o*-4API**-Molekül, zwei Naphthalimid-Derivate untersucht, welche im Vergleich zum ***o*-4API** um ein aromatisches Ringsystem erweitert sind. Beide Moleküle sind durch eine exocyclische Aminofunktion modifiziert, wobei das *N,N*-Dimethylaminonaphthalimid (**DMANI**) als tertiäres und das Aminonaphthalimid (**ANI**) als primäres Amin vorliegen (Abbildung 46). Es sollte untersucht werden, inwieweit sich die Methylgruppen an der Aminofunktion auf die Ladungstrennung innerhalb des Moleküls auswirkt und welchen Einfluss das auf eine mögliche Dimerisierung hat. Zudem sollte festgestellt werden, ob es durch Methylierung zu einem TICT-Zustand kommen kann, der sich eventuell stark löschend auf die Fluoreszenz auswirken kann.

Die Chromophore wurden über unterschiedlich lange Linkersysteme in die DNA eingebaut. Verwendet wurde dabei der schon von BAUMSTARK genutzte kurze (S)-Aminopropandiol-Linker sowie die von BERNDL eingeführte verlängerte Variante. Dieser lange Linker wurde verknüpft durch eine Carbamatgruppe um eine C_3-Kette verlängert. Durch den Vergleich der beiden Linker sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Länge der Linker auf die Wechselwirkungen zwischen zwei Chromophoren und die Stabilität der Duplexe hat. Insgesamt ergaben sich daraus vier Kombinationen von Chromophor und Linker **DMANI1** und **ANI1** mit den kurzen, sowie **DMANI2** und **ANI2** mit den langen Linkern (Abbildung 46).

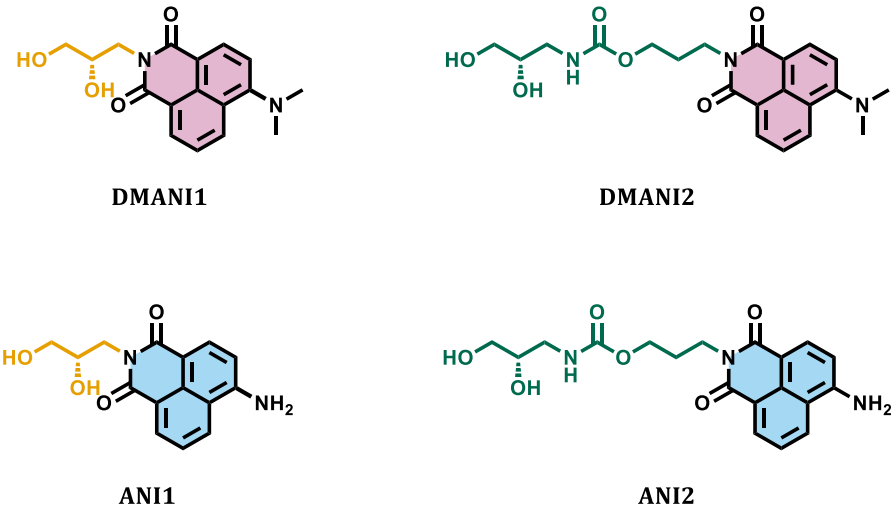


Abbildung 46: Die vier verschiedenen Kombinationen aus Chromophor und Linker DMANI1, DNAMI2, ANI1 und ANI2.

Spektroskopische Untersuchungen der **DMANI**- und **ANI**-Chromophore in Wasser zeigen, dass diese trotz ihrer geringen Größe bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{Abs.}$ = 440 nm (**DMANI**) beziehungsweise $\lambda_{Abs.}$ = 432 nm (**ANI**) und bis zu 500 nm weit in den sichtbaren Bereich angeregt werden können. Die Emissionsspektren zeigen eine leichte bathochrome Verschiebung der **DMANI**-Chromophore mit einem Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{Fl.}$ = 549 nm während die **ANI**-Chromophore ein Maximum bei $\lambda_{Fl.}$ = 545 nm aufweisen. Somit zeigen beide Moleküle eine außergewöhnlich große Stokes-Verschiebung von über 100 nm (Abbildung 47). JING *et al.* beschrieben für kovalent verknüpfte Aminophthalimid-Dimere eine im Vergleich zu der Monomer-Fluoreszenz bathochrom verschobene Excimer-Fluoreszenz mit einem Maximum bei $\lambda_{Fl.}$ = 632 nm in DMSO. Zudem wurde eine

bathochrom verschobene Absorption beobachtet, welche durch eine schwache Exciton-Aufspaltung erklärt wird.[187] Die Bildung der Excimere ist hierbei stark abhängig von dem Abstand und der Geometrie der beiden Chromophore zueinander. Ein entsprechendes Verhalten konnte für die hier untersuchten Chromophore anhand einer Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen c = 3 µM und 100 µM nicht beobachtet werden. Exemplarisch wird hier eine Verdünnung von 50 µM dargestellt.

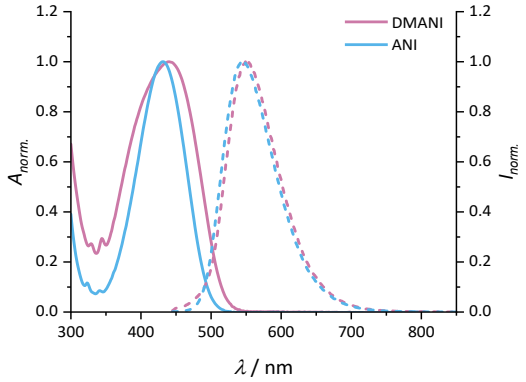


Abbildung 47: Absorptions- und Emissionsspektren der DMANI- und ANI-Verbindungen; 50 µM in ddH_2O + 0.1 % DMSO, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 430 nm.

Zur Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften wurde analog zu den Arbeiten von BERNDL, WAGNER und BAUMSTARK eine DNA-Sequenz mit nur einem Chromophor synthetisiert, die dann entweder mit einem unmodifizierten DNA-Strang hybridisiert oder mit einem zweiten, modifizierten Strang zu einem Interstrangdimer gepaart wurde. Zudem wurde ein weiterer DNA-Strang mit zwei Chromophoren synthetisiert. Die beiden Chromophore wurden dabei durch ein Thymidin separiert. Erfolgt eine Basenpaarung des Thymidins mit einem komplementären Adenosin, sollten die Wechselwirkungen zwischen den beiden Chromophoren unterdrückt werden, während es bei einer Basenfehlpaarung zu stärker ausgeprägten Dimer-Wechselwirkungen kommen sollte. Solche Intrastrang-Dimere wurden bereits von BAUMSTARK zur Detektion von Punktmutationen eingesetzt. In dieser Arbeit soll eine Anwendung der Intrastrangdimere als Sonde für N^6-Methyladenosin ausgeweitet werden (Abbildung 48). Für die Detektion der Methylierung wird angenommen, dass die Methylgruppe, je nach geometrischer Anordnung, die Basenpaarung so weit stört (vgl. Kapitel 3), dass auch hier eine

Dimerisierung der Chromophore stattfinden kann. Im Idealfall sollte dabei ein 50:50-Verhältnis zwischen Monomer und Dimer vorliegen.

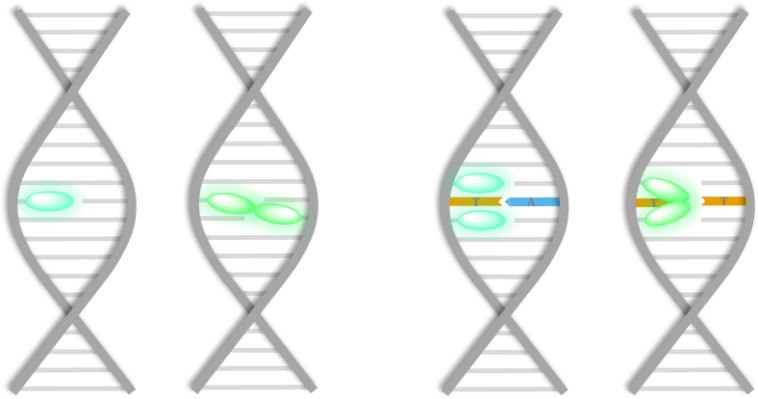
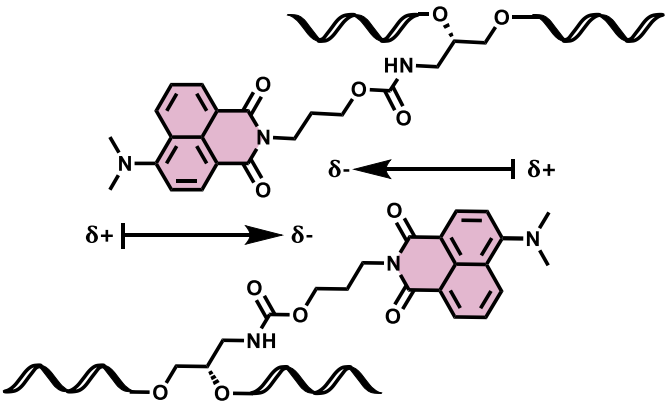
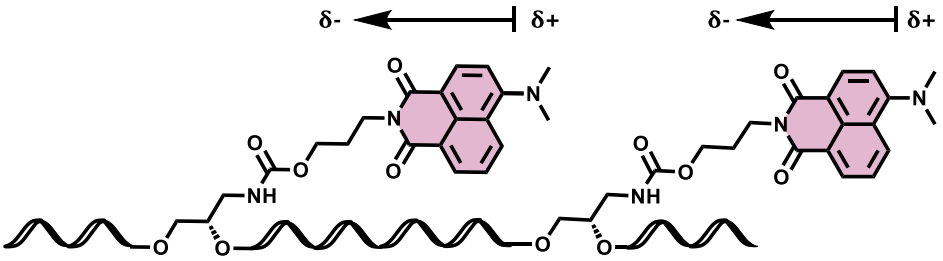


Abbildung 48: Links: Einfacheinbau und Interstrangdimer zur allgemeinen Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften der verschiedenen Chromophore; Rechts: Intrastrangdimere zur Unterscheidung einer erfolgreichen Basenpaarung bzw. einer Fehlpaarung.

Die **DMANI**- und **ANI**-Chromophore besitzen aufgrund ihrer funktionellen Amin- und Imid-Gruppen und deren Anordnung ein starkes Dipolmoment, welches, wie oben erwähnt, zu einem ICT führen kann. In den Interstrangdimer-Duplexen sind die Dipolmomente dabei in entgegengesetzte Richtung orientiert. Hierbei wird das Gesamtdipolmoment aufgehoben, während sich die Dipolmomente in den Intrastrangdimer-Duplexen parallel anordnen und dadurch addieren (Abbildung 49).



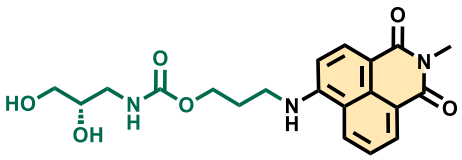
DNA1_DMANI2+cs_DMANI2



DNA3_DMANI2

Abbildung 49: Unterschiedliche Ausrichtung der Dipole in den Dichromophorsystemen **DNA1_DMANI2+cs_DMANI2** und **DNA3_DMANI2**.

Um den Einfluss der verschiedenen Gesamtdipolmomente auf die elektronischen Eigenschaften und die Dimerbildung der Chromophore zu untersuchen, wurde die Verbindung **PANI** entworfen. Diese ist nicht an der Imid-Funktion, sondern am Amin mit dem Linker verknüpft (Abbildung 50). Dabei wurde nur die Verbindung mit dem langen Linker synthetisiert.



PANI

Abbildung 50: Struktur der Verbindung PANI.

Diese wurde dann zusammen mit **DMANI2** als Intrastrangdimer in die DNA3-Sequenz eingebaut und spektroskopisch im Einzelstrang wie auch in den Duplexen untersucht.

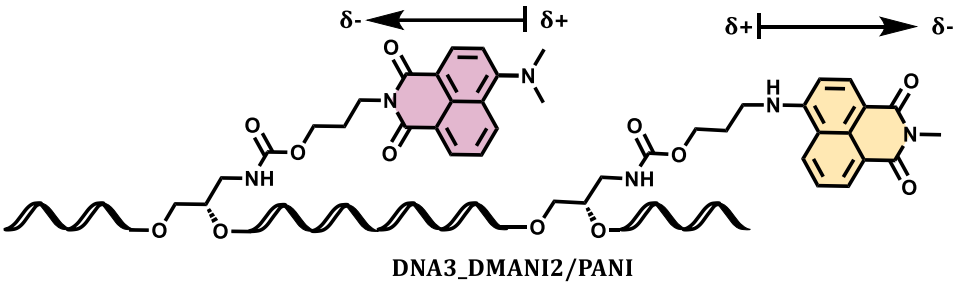


Abbildung 51: Einbau der Chromophore DMANI2 und PANI mit unterschiedlichen Dipolrichtungen in DNA3.

Eine weitere in dieser Arbeit in DNA eingebaute und spektroskopisch untersuchte Molekülklasse sind die Naphthaldiimide (**NDI**), welche im Vergleich zu den Aminonaphthalimiden zwei gegenüberliegende Imid-Funktionalitäten besitzen. Dadurch wirken innerhalb des Moleküls zwei entgegengesetzte partielle Dipolmomente, wodurch das Gesamtdipolmoment annähernd aufgehoben werden sollte. Der Einfluss der unterschiedlichen Substituenten an der Imidfunktion ist dabei gering. Der Chromophor wurde sowohl mit dem kurzen (**NDI1**) als auch mit dem langen Linker (**NDI2**) synthetisiert und in die DNA eingebaut (Abbildung 52).

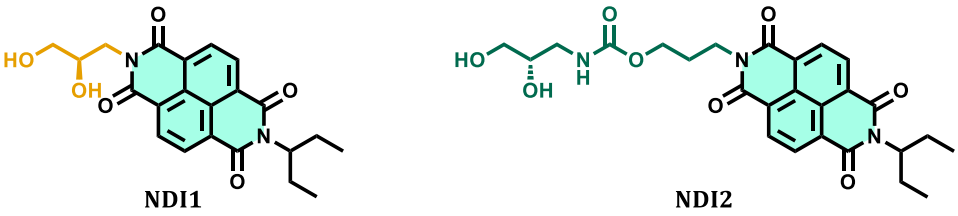


Abbildung 52: Struktur der Naphthaldiimide mit kurzem (NDI1) und langem Linker (NDI2).

Die **NDI**-Chromophore sind die kleineren „Verwandten" der von DANIELA BAUMSTARK untersuchten **PBI**-Chromophore (Kapitel 2.3.2.3). Es werden ähnliche spektroskopische Eigenschaften zwischen **NDI** und **PBI** erwartet, allerdings aufgrund der Verkleinerung des aromatischen Ringsystems mit hypsochromer Verschiebung. So weisen die **NDI**-Chromophore in Acetonitril zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{Abs.}$ = 356 nm und $\lambda_{Abs.}$ = 376 nm auf. Die Stokes-Verschiebung fällt mit gerade einmal $\Delta\lambda$ = 8 nm sehr klein aus, die Fluoreszenzmaxima der Monomere liegen bei $\lambda_{Fl.}$ = 384 nm und $\lambda_{Fl.}$ = 404 nm. Zudem zeigt der Chromophor eine weitere bathochrom verschobene Emissionsbande ohne Feinaufspaltung bei $\lambda_{Fl.}$ = 566 nm. Diese Bande wird in der Literatur einer Excimerfluoreszenz zugeordnet (Abbildung 53).[188-190]

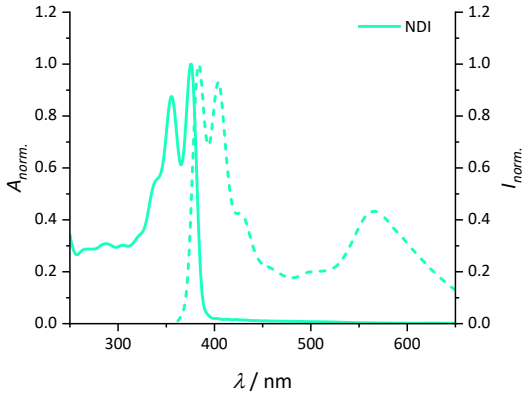
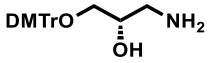


Abbildung 53: Absorptions- und Emissionsspektrum des NDI-Chromophors: 30 µM in MeCN, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 340 nm.

4.1 Synthese der Chromophorbausteine

4.1.1 Synthese der Phosphoramidite der Chromophore DMANI1 und DMANI2

Ausgehend von 4-Brom-1,8-Naphthalinsäureanhydrid wurde über eine nukleophile aromatische Substitution des Bromids mit *N,N*-Dimethylaminverbindung **14** synthetisiert. Die Reaktion kann stattfinden, da das aromatische System aufgrund des Anhydrids elektronenarm ist.[191-192] Anschließend wurde das Anhydrid in einer Kondensationsreaktion entweder mit *S*-3-Amino-1,2-propandiol zu **DMANI1** oder mit 3-Amino-1-propanol zu Verbindung **15** umgesetzt. **DMANI1** wurde im nächsten Syntheseschritt mit DMTrCl geschützt. Um eine selektive Reaktion an der primären Hydroxygruppe zu gewährleisten, wurde das DMTrCl bei 0 °C portionsweise hinzugegeben. Die zuvor mit dem 3-Amino-1-propanol kondensierte Verbindung **15** wurde über eine Carbamatgruppe mit Verbindung **13** verknüpft.



13

Abbildung 54: Struktur des DMTr-geschützten Linkers **13**.

Hierfür wurde die Hydroxygruppe der Verbindung **15** zunächst mit 1,1′-Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert, anschließend erfolgte der nukleophile Angriff der Verbindung **13**. Hierbei war zu beachten, dass die Aktivierung mit CDI stets mit dem Alkohol stattfindet und nicht mit dem Amin. Die Nukleophilie des Alkohols würde nicht ausreichen, um mit dem so entstandenen Carbamid zu reagieren. Die erhaltenen Verbindungen **16** und **17** wurden anschließend mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorphosphoramidit (PA-Cl) zu den gewünschten Phosphoramiditbausteinen **18** und **19** umgesetzt. Die erhaltenen Bausteine wurden direkt in der DNA-Festphasensynthese ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt. Die Reaktion verlief quantitativ. Das komplette Reaktionsschema der Synthesen ist in Abbildung 55 dargestellt.

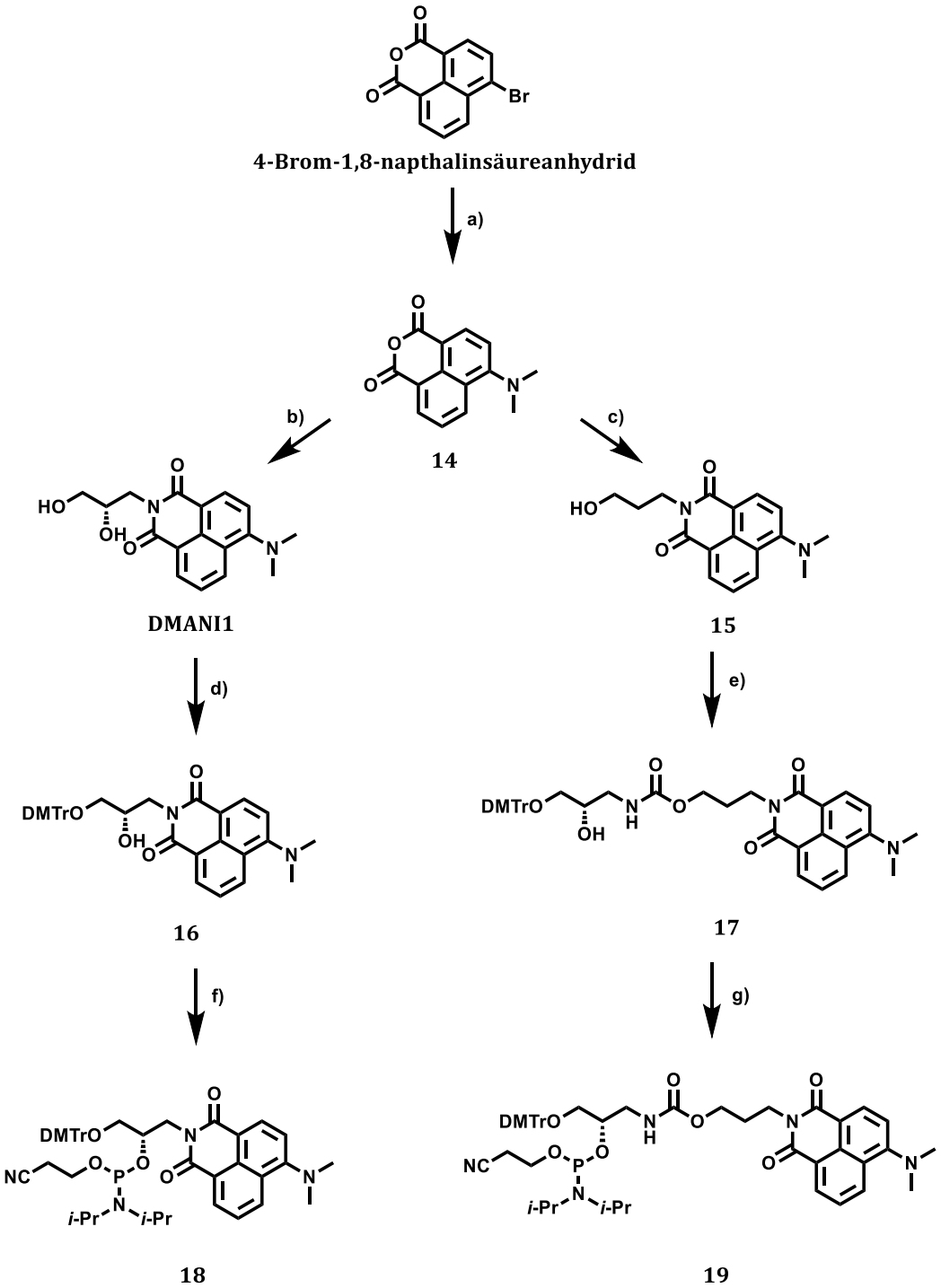


Abbildung 55: Synthese der Phosphoramiditbausteine DMANI1 und DMANI2; a) Me_2NH, $CuSO_4$, DMF, 153 °C, 3 h, 93 %; b) *S*-3-Amino-1,2-Propandiol, EtOH, 80 °C, 4 h, 61 %; c) 3-Amino-1-Propanol, EtOH, 80 °C, 4 h, 65 %; d) DMTrCl, Pyridin, RT, ü.N. 58 %; e) 1. CDI, DMF, RT, 3h, 2. **13**, RT, 72 h, 41 %; f) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, ü.N., quantitativ; g) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, ü.N., quantitativ.

4.1.2 Synthese des Phosphoramidits des PANI-Chromophors

Für die Synthese des PANI-Chromophors diente erneut 4-Brom-1,8-Napthalinsäureanhydrid als Ausgangsstoff. Dies wurde im ersten Syntheseschritt mit Methylamin zu dem entsprechenden Imid **20** kondensiert. Anschließend erfolgte die nukleophile aromatische Substitution des Bromids **20** durch 3-Amino-1-Propanol zu Verbindung **20** unter denselben Bedingungen wie die Reaktion zu Verbindung **14**. Das erhaltene **21** konnte im nächsten Schritt ebenfalls mit dem DMTr-geschützten Propandiol-Linker mittels CDI zum Carbamat **22** verknüpft werden. Das anschließend synthetisierte Phosphoramidit **23** wurde auch hier ohne vorangegangene säulenchromatographische Aufreinigung direkt in der DNA-Festphasensynthese eingesetzt.

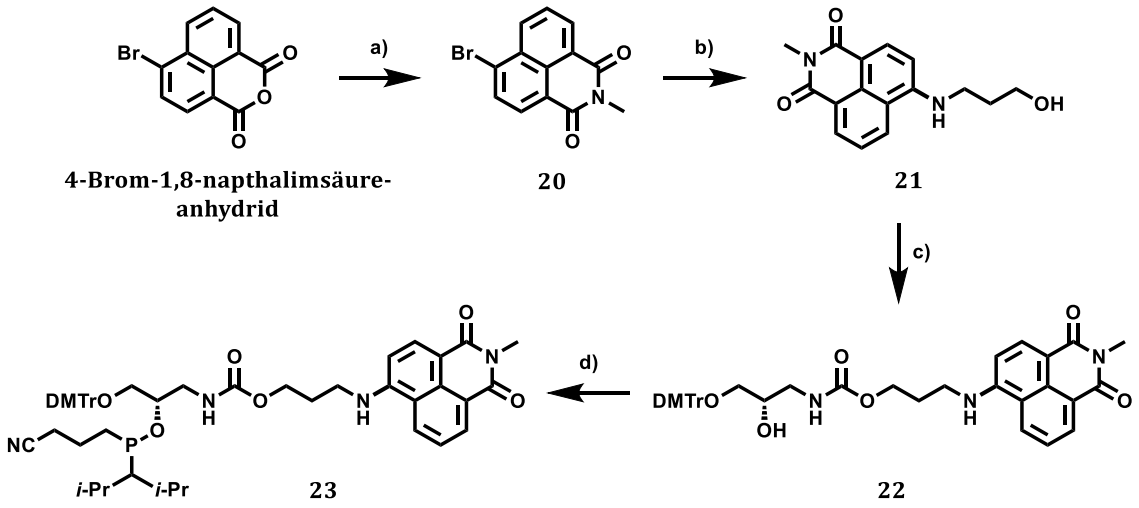


Abbildung 56: a) 33 % Methylamin in EtOH, EtOH, 80 °C, 10 h, 80 %; b) 3-Amino-1-Propanol, $CuSO_4$, DMF, 153 °C, 4 h, 41 %; c) 1. CDI, DMF, RT, 3 h, 2. Linker, RT, 72 h, 17 %; d) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, ü.N., quantitativ.

4.1.3 Synthese der Phosphoramidite der Chromophore ANI1 und ANI2

Die Bausteine der Chromophore **ANI1** und **ANI2** wurden ebenfalls ausgehend von 4-Brom-1,8-Napthalinsäureanhydrid synthetisiert. Im ersten Syntheseschritt, zunächst analog zu der Vorschrift von ZHOU *et al.*, wurde das Bromid durch eine Azidgruppe substituiert.[193] Dieses wurde dann *in situ* mit Natriumhydrogensulfid zum primären Amin reduziert.[194] Die erhaltene Verbindung **24** wurde analog zu

der Synthese der **DMANI**-Bausteine mit den jeweiligen Propanolen zu den Aminonaphthalimiden **ANI1** und **25** kondensiert. Hierfür mussten die Reaktionszeiten im Vergleich zu **DMANI1** und Verbindung **15** von 4 h auf über 18 h erhöht werden. Dennoch fielen die Ausbeuten nur etwa halb so hoch aus. Es wird angenommen, dass die niedrigeren Ausbeuten mit der verminderten Löslichkeit und der stärkeren Aggregatbildung von **24** einhergehen. Eine Erklärung über elektronische Effekte ist unwahrscheinlich, da -NMe_2 ein stärkerer Elektronendonor ist als -NH_2. Als Vergleich wurden hier die Hammett-Konstanten (σ) der *para*-substituierten Benzoesäure herangezogen, welche für eine NMe_2-Gruppe σ_p = -0.63 und für die NH_2-Gruppe σ_p = -0.57 betragen.[195] Somit ist Verbindung **14** das schlechtere Elektrophil welches in einer Substitutionsreaktion ohne weitere Einflüsse langsamer als das **24** reagieren würde. Anders als bei den DMANI-Bausteinen können die ANI-Bausteine nicht in ihrer eigentlichen Form in die DNA eingebaut werden. Um in der Phosphoramidit-Festphasensynthese Nebenreaktionen zu vermeiden und die Chemoselektivität zu gewährleisten, müssen die exocylischen Amingruppen geschützt werden. Hierfür wurden die Verbindungen **ANI1** und **25** mit DMF-DMA zu den jeweiligen Amidinen umgesetzt. Dieses reagiert dabei selektiv mit dem primären Amin, sodass keine vorangehende Schützung der Hydroxygruppen notwendig war. Nach der Oligonukleotidsynthese kann die Schutzgruppe zusammen mit den Schutzgruppen der natürlichen Basen durch Inkubation in konzentrierter Ammoniumhydroxydlösung abgespalten werden. Anschließend wurde analog zu der DMANI-Synthese, die DMTR-Schutzgruppe an **28** eingeführt beziehungsweise die Carbamat-Kupplung der Verbindung **29** mit Propandiol-Linker durchgeführt. Die erhaltenen Verbindungen **28** und **29** wurden ebenfalls zu den Phophoramiditbausteinen **30** und **31** umgesetzt. Auch hier wurde auf eine säulenchromatographische Aufreinigung verzichtet und die Verbindungen konnten quantitativ erhalten werden. Nachfolgende Abbildung 57 stellt das Reaktionsschema der Synthese dar.

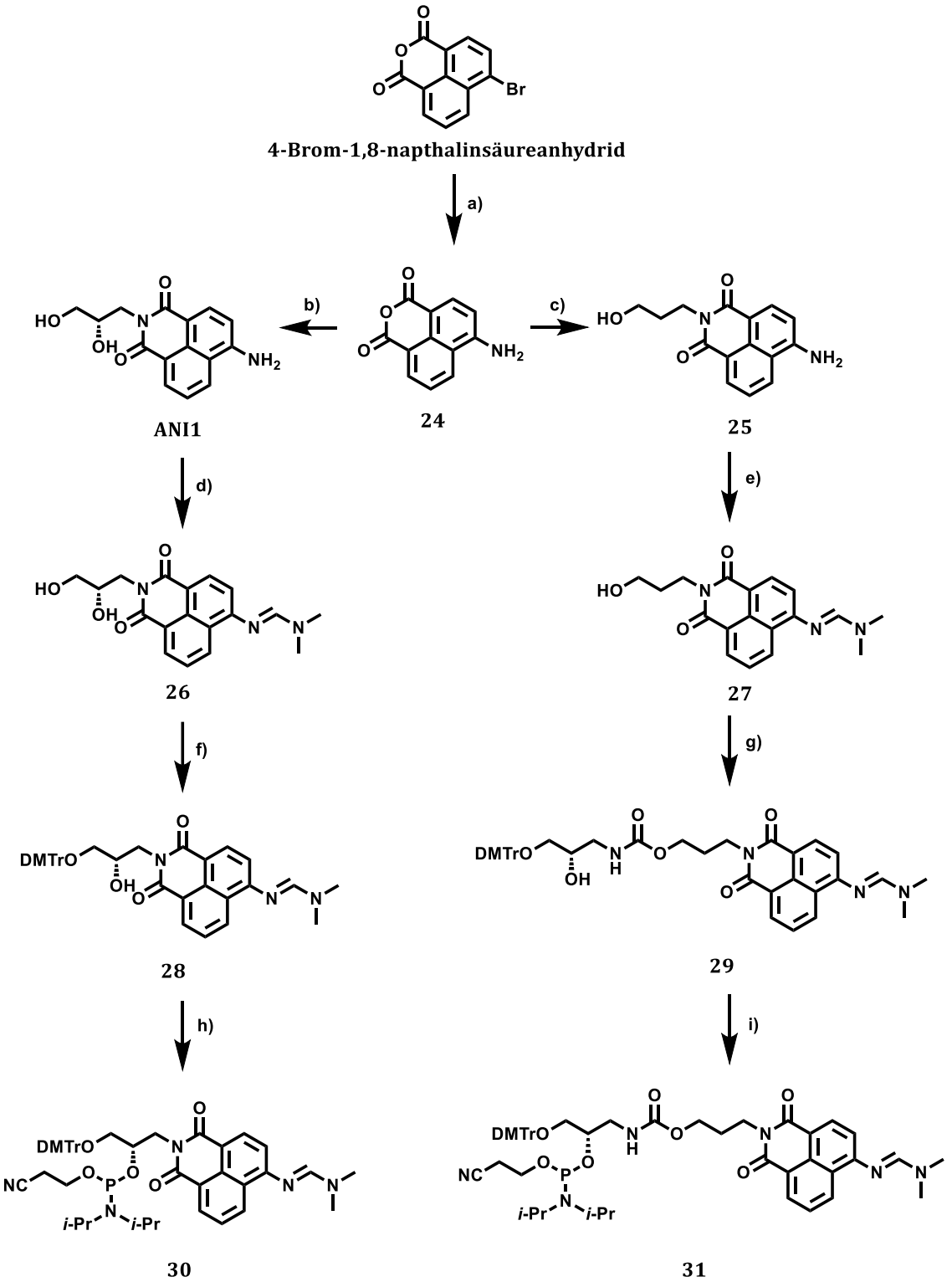


Abbildung 57: Synthese der Phosphoramiditbausteine **30** und **31**; a) 1. NaN_3, H_2O, DMF, 100 °C, 15 min, 2. NaHS, DMF, 90 °C, 2 h., 76 %; b) *S*-3-Amino-1,2-Propandiol, EtOH, 80 °C, 4 h, 36 %; c) 3-Amino-1-Propanol, EtOH, 80 °C, 4 h, 31 %; d) DMF-DMA, MeOH, 50 °C, ü.N., 86 %; e) DMF-DMA, MeOH, 50 °C, ü.N., 60 %; f) DMTrCl, Pyridin, RT, ü.N. 43 %; g) 1. CDI, DMF, RT, 3 h, 2. **13**, RT, 72 h, 25 %; h) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, ü.N., quantitativ; i) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, ü.N., quantitativ.

4.1.4 Synthese der Phosphoramidite der Chromophore NDI1 und NDI2

Die Synthese erfolgte ausgehend von 1,4,5,8-Naphthalintetracarbonsäuredianhydrid, welches in einer Kondensationsreaktion mit 3-Pentylamin zu Verbindung **32** umgesetzt wurde. Durch den Einsatz von 0.95 Äq. 3-Pentylamin konnte die Bildung eines symmetrischen Diimids unterdrückt werden. Davon ausgehend fand die zweite Kondensation an der noch verbleibenden Anhydrid-Funktionalität analog zu der Synthese der (DM)ANI-Chromophore mit entweder *S*-3-Amino-1,2-propandiol oder 3-Amino-1-propanol statt. Die Reaktion wurde aufgrund der geringen Löslichkeit von Verbindung **32** basenkatalysiert in DMF durchgeführt. Durch die Vielzahl an reaktiven Zentren kam es zur Bildung mehrerer Nebenprodukte, was sich in den geringen Ausbeuten von **NDI1** und **33** widerspiegelt. Anschließend wurde, analog zur Synthese der anderen Chromophore, Verbindung **NDI1** DMTr-geschützt und Verbindung **33** über die Carbamatfunktionalität mit Verbindung **13** verknüpft. Im letzten Schritt erfolgte die Synthese der jeweiligen Phosphoramidite **36** und **37**. Durch die labile DMTr-Schutzgruppe und die leicht oxidierbaren und reaktiven Phosphordiester kam es bei der säulenchromatographischen Aufreinigung zu einer Zersetzung der Produkte, was die mittelmäßigen Ausbeuten erklärt.

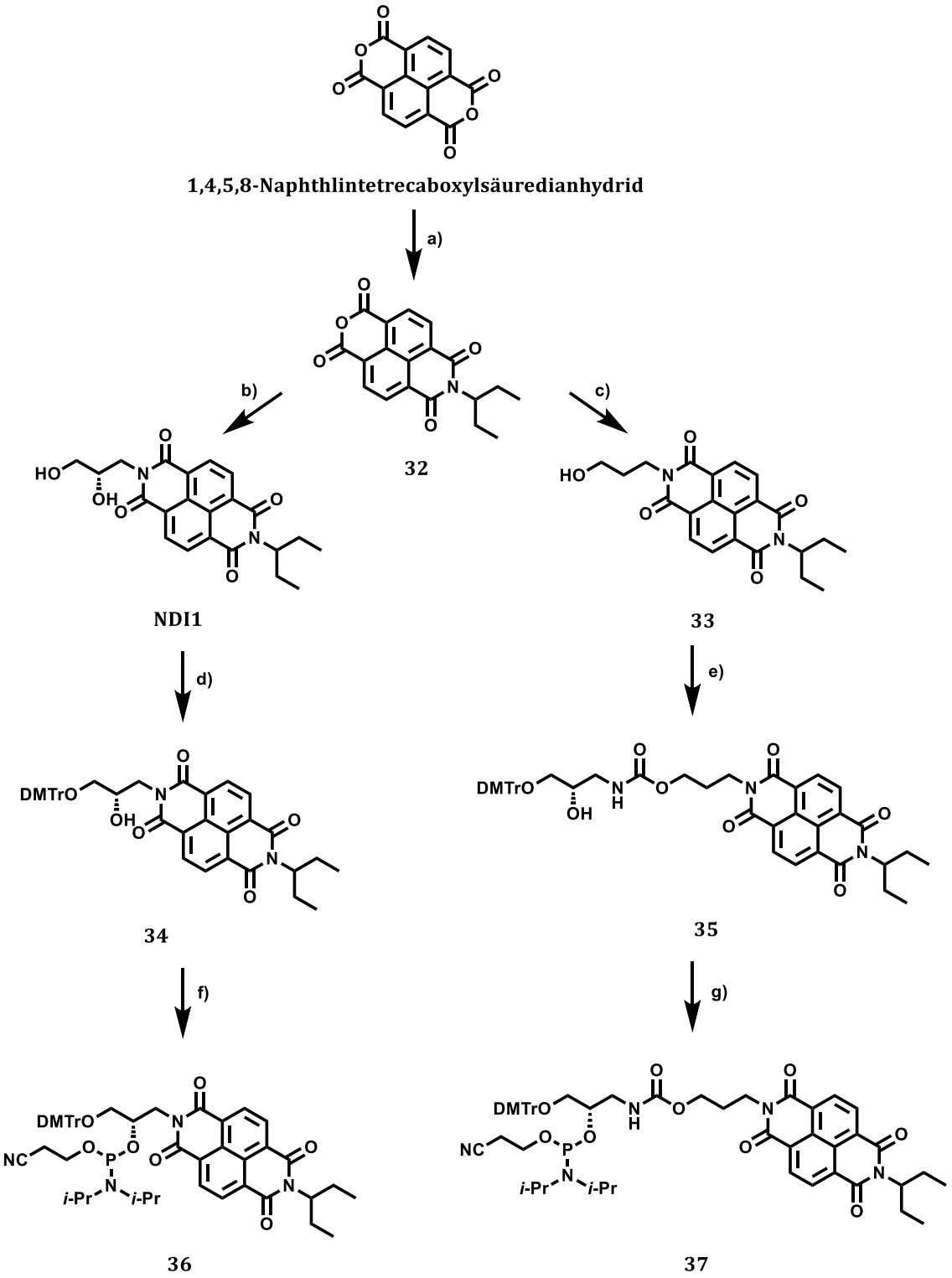


Abbildung 58: Synthese der Phosphoramiditbausteine **36** und **37**; a) 3-Pentylamin, DMF, 140 °C, 3 h, 74%; b) *S*-3-Amino-1,2-Propandiol, NEt_3, DMF, 140 °C, 3 h, 34 %; c) 3-Amino-1-Propanol, NEt_3, DMF, 140 °C, 3 h, 39 %; d) DMTrCl, NEt_3, THF, RT, ü.N., 41 %; e) 1. CDI, DMF, RT, 3 h, 2. **13**, RT, 72 h, 48 %; f) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, ü.N., 62 %; g) PA-Cl, DIPEA, DCM, RT, ü.N., 41 %.

4.2 Synthese der DNA-Stränge

Zur Untersuchung der verschiedenen Chromophorsysteme wurden die Sequenzen **DNA1**, welche jeweils mit einem Farbstoff modifiziert, für die sechs verschiedenen **DMANI-**, **ANI-** und **NDI**-Chromophore synthetisiert (Abbildung 59). Dabei wurde die schon von SINA BERNDL verwendete und etablierte Basenabfolge zur Untersuchung von Thiazol-Orange-Dimeren gewählt.

DNA1_X 5'–G–C–A–T–G–C–A–G–T–T–**X**–A–C–T–G–A–C–3'

mit X = DMANI1; DMANI2;
ANI1; ANI2;
NDI1; NDI2

Abbildung 59: Sequenzen der synthetisierten DNA1-Stränge mit jeweils einem der Chromophore.

Um zu untersuchen, ob und wie sich das Absorptions- und Emissionsverhalten der Modifikationen ändert, wenn zwei Chromophore miteinander interagieren können, wurden die jeweiligen komplementären Gegenstränge zu der **DNA1**-Sequenz synthetisiert, die ebenfalls je einen Chromophor enthalten (Abbildung 60). In den Duplexen liegt dabei je ein Farbstoff gegenüber Thymin.

cs_DNA1_X 3'–C–G–T–A–C–G–T–C–A–**X**–T–T–G–A–C–T–G–5'

mit X = DMANI1; DMANI2;
ANI1; ANI2;
NDI1; NDI2

Abbildung 60: Sequenzen der synthetisierten Gegenstränge zu DNA1 mit jeweils einem der Chromophore.

Um die Eignung des Dichromophorsystems zur Detektion einer m^6A- beziehungsweise m^6a-Modifikation festzustellen, wurden die **DNA3**-Sequenzen mit jeweils zwei derselben **DMANI**-, **ANI**- oder **NDI**-Chromophore, getrennt durch ein Thymidin, synthetisiert (Abbildung 61). Auch die Sequenz DNA3 wurde schon von Sina Berndl zur Untersuchung von Thiazol-Orange-Intrastrang-Dimeren verwendet.

DNA3_X 5'–T–G–C–A–T–G–C–A–**X**–T–**X**–A–C–T–G–A–C–3'

mit X = DMANI1; DMANI2;
ANI1; ANI2;
NDI1; NDI2

Abbildung 61: Sequenzen der synthetisierten DNA3-Stränge mit jeweils zwei identischen Chromophoren.

Zudem wurde die Sequenz der **DNA3** mit den beiden verschiedenen Chromophoren **DNAMI2** und **PANI** synthetisiert, welche zur Untersuchung der Auswirkung der Dipolrichtung auf die spektroskopischen Eigenschaften herangezogen wurde (Abbildung 62).

DNA3_DMANI2/PANI 5'—T—G—C—A—T—G—C—A—DMANI2—T—PANI—A—C—T—G—A—C—3'

Abbildung 62: Sequenzen der synthetisierten DNA3-Stränge mit jeweils zwei gleichen Chromophoren.

Um eine mögliche Anwendung als m^{6}a-Sonde experimentell testen zu können, wurde eine m^{6}a-modifizierte RNA-Sequenz synthetisiert (Abbildung 63).

cs_RNA_m^{6}a 3'—a—c—g—u—a—c—g—u—c-**m^{6}a**—c—u—g—a—c—u—g—5'

Abbildung 63: Sequenz der m^{6}a-modifizierten RNA-

Alle weiteren für die Charakterisierung benötigten Sequenzen wurden kommerziell erworben.

4.2.1.1 Synthese der mit DMANI oder ANI modifizierten Oligonukleotide

Die Phosphoramidit-Festphasensynthese der **DMANI-** und **ANI**-modifizierten Stränge erfolgte für alle Chromophore und Linkerlängen unter denselben Bedingungen. Es konnten die mit Standard-Schutzgruppen versehenen Phosphoramidite der natürlichen Basen verwendet werden. Um einen möglichst hohen Doppeleinbau der Chromophore in Sequenz **DNA3** zu erzielen, wurde die Menge an Phosphoramidit des jeweiligen Kupplungsschritts erhöht. Die Abspaltung von der festen Phase sowie die Entfernung der Schutzgruppen konnten trotz der Imid-Funktionalität mit konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung erfolgen. Alle synthetisierten Stränge wurden zunächst über GlenPak™-Säulen und anschließender semipräperativer HPLC aufgereinigt.

4.2.1.2 Synthese der mit NDI modifizierten Oligonukleotide sowie der mit DMANI2/PANI-modifizierten Sequenz

Die Imid-Funktionalitäten der **NDI**- und **PANI**-Chromophore sind weniger stabil beziehungsweise leichter zugänglich für einen nukleophilen Angriff als die der **DMANI**- und **ANI**-Chromophore. Deswegen wurde bei der Entschützung und

Abspaltung auf die UltraMILD-Methode zurückgegriffen, welche, wie erwähnt (Kapitel 3.2.1), mit einer Lösung aus Kaliumcarbonat in MeOH durchgeführt wird. Dafür musste auch hier die Schutzgruppenstrategie der natürlichen Basen sowie das *Capping*-Reagenz für die Phosphoramidit-Festphasensynthese angepasst werden. Die erhaltenen Stränge wurden anschließend ebenfalls über GlenPak™-Säulen und anschließender semipräparativer HPLC aufgereinigt.

4.2.1.3 Synthese der m^{6}a-modifizierten RNA

Die Synthese der m^{6}a-modifizierten RNA-Sequenz erfolgte analog zu der Synthese der m^{6}a-modifizierten RNA-Gegenstränge, welche zur Charakterisierung der ***o*-4API**-Modifikation synthetisiert wurden (Kapitel 3.2.2). Als *Capping*-Reagenz während der Festphasensynthese wurde ebenfalls Phenoxyessigsäureanhydrid eingesetzt. Die 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe wurde auch hier mit $NEt_3 \cdot 3HF$ entfernt. Die erhaltenen Oligonukleotidstränge konnten über GlenPak™-Säulen mit ausreichender Reinheit aufgereinigt werden, eine weitere Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC war nicht notwendig.

4.3 Optische Charakterisierung der Monomer-Duplexe und Interstrangdimer-Duplexe

Zunächst wurden die optischen Eigenschaften der mit nur einem Chromophor modifizierten DNA-Stränge, sowohl im Einzelstrang als auch im Duplex mit einem Chromophor, sowie im Duplex mit zwei Chromophoren und dem dadurch möglichen Interstrangdimer untersucht (Abbildung 64).

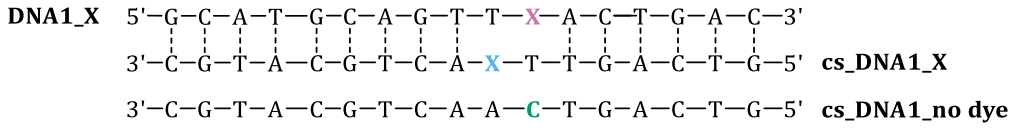


Abbildung 64: DNA1-Duplexe mit einem oder zwei Chromophoren zur untersuchen deren Monomere und Dimere mit X = DMANI1, DMANI2, ANI1 oder ANI2.

4.3.1 Charakterisierung der DMANI1- und DMANI2-modifizierten DNA

Die optische Charakterisierung der mit **DMANI1** oder **DMANI2** modifizierten **DNA1**-Duplexe zeigt in beiden Fällen eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima für die Interstrangdimer-Duplexe im Vergleich zu den Monomer-Duplexen, während die Emission bathochrom verschoben ist. Dabei fällt die Verschiebung der Absorptionsmaxima für die **DMANI1-**Duplexe mit $\Delta\lambda_{Abs.}$ = 6 nm etwas größer aus, als für die **DMANI2**-Duplexe mit $\Delta\lambda_{Abs.}$ = 4 nm (Abbildung 65).

Die Absorptions- sowie Emissionsspektren der Einzelstränge folgen keinem klaren Muster, sind aber zueinander sehr ähnlich. Durch Sekundärstrukturen und Wechselwirkungen der Einzelstränge in Lösung kann es zu einer Aggregation zwischen zwei Chromophoren aus verschiedenen Einzelsträngen kommen. Da diese Prozesse dynamisch ablaufen, können die optischen Eigenschaften der Einzelstränge nur begrenzt interpretiert werden. Nach der Hybridisierung mit dem komplementären Gegenstrang **cs_DNA_no dye** ist ein deutlicher *Turn-on* der Fluoreszenz für die Monomerduplexe im Vergleich zu den Einzelsträngen zu erkennen. Dieser Anstieg lässt sich sowohl durch die Einbettung der solvatochromen Chromophore in die weniger polare Umgebung DNA-Doppelhelix

erklären als auch durch eine Reduzierung der Freiheitsgrade durch die von der Helix vorgegebene Geometrie der Chromophore, wodurch es zu weniger strahlungslosen Übergängen kommt. Für die Interstrangdimer-Duplexe **DNA1_DMANI1+cs_DMANI1** und **DNA1_DMANI2+cs_DMANI2** wird dagegen eine ausgeprägte Fluoreszenzlöschung beobachtet, welche mit einer bathochromen Verschiebung einhergeht ($\Delta\lambda_{Fl.}$ = 5 nm bzw. 14 nm für **DMANI1** bzw. **DMANI2**). Die Kombination aus hypsochrom verschobener Absorption und stark gelöschter Fluoreszenz für die Interstrangdimer-Duplexe spricht für eine Excitonaufspaltung der Dimere, wobei es zur Ausbildung nicht fluoreszierender H-Aggregate kommt (vgl. Kapitel 2.3.2.1). Die über Einzelphotonenzählung (TCSPC) ermittelten mittleren Fluoreszenzlebensdauern stützen die erhaltenen Emissionspektren. Die Lebenszeiten der Monomer-Duplexe sind jeweils höher als die der Einzelstränge und Interstrangdimer-Duplexe (Tabelle 3).

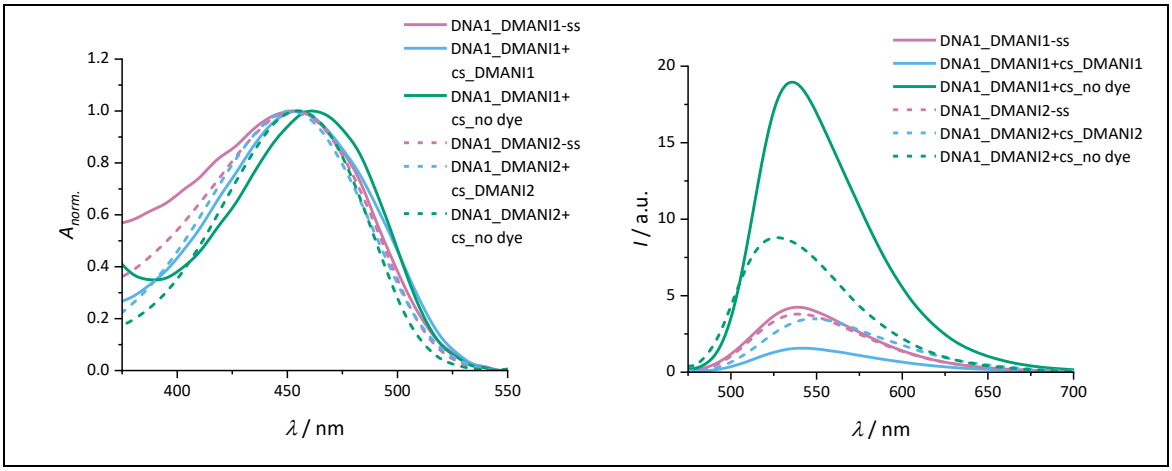


Abbildung 65: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der einfach modifizierten DNA mit **DMANI1** und **DMANI2** im Einzelstrang, Duplex mit nur einem Chromophor und Interstrangdimer; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 460 nm, Spaltbreite 2/2 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die Unterschiede zwischen den **DMANI1**- und **DMNAI2**-modifizierten Duplexen lassen sich durch die jeweilige räumliche Anordnung der Chromophore infolge der unterschiedlichen Linkerlängen erklären. Die hypsochromen Verschiebungen der **DMANI2**-Duplexe im Vergleich zu **DMANI1** in der Absorption, sowie für den **DNA1_DMANI2+no dye-**Duplex in der Emission können durch die solvatofluorchromen Eigenschaften des Chromophors erklärt werden. Durch die längere Alkylkette des langen Linkers kommt es zu einer unpolaren

Mikroumgebung für den solvatofluorochromen **DMANI2**-Chromophor und damit zur Blauverschiebung. Es wird zudem angenommen, dass der kurze Linker bei **DMANI1** zu einer starren Einbettung der Chromophore in die DNA-Basenstapelung führt und die Übergangsdipolmomente der Chromophore annähernd *face-to-face* bei einem Winkel von $\Theta = 90°$ zueinander orientiert sind. Der längere Linker von **DMANI2** erhöht hingegen die Flexibilität der Chromophore, wodurch alternative Anordnungen innerhalb der Doppelhelix begünstigt werden. Für die ebenfalls über einen langen Linker verknüpften TO-Chromophore von SINA BERNDL wurde postuliert, dass sie nicht in die Basenstapelung integriert werden, sondern bevorzugt in der kleinen Furche der DNA lokalisiert sind.[196] Es wird angenommen, dass diese Anordnung auf die hier untersuchten Chromophore übertragbar ist (Abbildung 66).

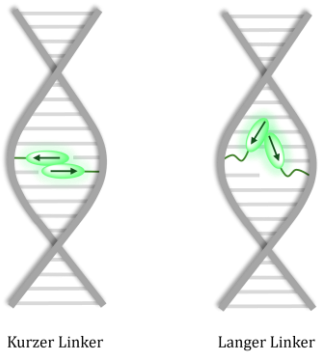


Abbildung 66: Vereinfachte schematische Darstellung des Einflusses der Linkerlänge auf eine mögliche Anordnung der Chromophore in der DNA-Doppelhelix, ohne Berücksichtigung von Auswirkungen auf die Duplexstabilität; die Pfeile stellen die jeweiligen Übergangsdipolmomente dar.

Es wird angenommen, dass sich durch die Lokalisierung der **DMANI2**-Chromophore in der kleinen Furche der Versatzwinkel der Übergangsdipolmomente zu $\Theta < 90°$ verschiebt. Der reine H-Aggregat-Charakter geht verloren und es kommt zu einer bathochrom verschobenen Fluoreszenz. Da diese jedoch weiterhin, wenn auch weniger stark, gelöscht ist, kann nicht von einem reinen J-Aggregat ausgegangen werden. Eine plausible Erklärung ist eine Verdrehung der Chromophore gegeneinander, die durch die sterische Hinderung der Dimethylaminogruppen vorgegeben wird. Eine Verdrehung der Übergangsdipolmomente um den Winkel α beeinflusst die Excitonaufspaltung, sodass bei steigender Verdrehung bis zu einem

Maximum von α = 90°, die Excitonkupplungsenergie *J* abnimmt. Da durch die Verdrehung das resultierende Gesamtübergangsdipolmoment für beide Excitonniveaus ungleich null ist, sind strahlende Übergänge aus beiden Excitonen erlaubt (Abbildung 67).

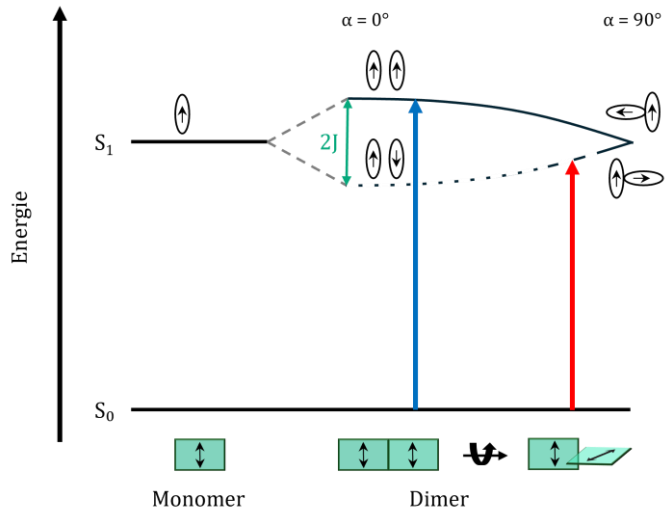


Abbildung 67: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung der Auswirkung einer Verdrehung der Übergangsdipolmomente um einen Winkel α auf die Excitonaufspaltung.

Die beobachteten Schmelztemperaturen unterstützen das postulierte Strukturmodell. Für die **DMANI1**-Duplexe kommt es zu einer Destabilisierung der Doppelhelix, welche für das Interstrangdimer nochmals stärker ausgebildet ist. Dagegen zeigen die **DMANI2**-Duplexe keine signifikanten Unterschiede zwischen Monomer- und Interstrangdimer-Duplexen, zudem ist die Schmelztemperatur um bis zu ΔT_m = +6 °C höher als für die **DMANI1**-Duplexe. Diese Stabilisierung kann auf die flexiblere Chromophorpositionierung und eine geringere Störung der Basenstapelung zurückgeführt werden. Vergleicht man die modifizierten Duplexe mit der unmodifizierten Referenzsequenz aus der Arbeit von SINA BERNDL, lässt sich eine allgemeine Destabilisierung der Duplexe um mindestens ΔT_m = -3 °C beobachten.[83] Dies lässt sich durch das kleine π-System der Chromophore und die dadurch eher schwach stapelnden π-π-Wechselwirkungen erklären, sodass Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen anders als bei den PBI-modifizierten Duplexen von DANIELA BAUMSTARK nicht ausreichen, um eine Stabilisierung der DNA-Doppelhelix zu bewirken.[86]

Tabelle 3: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **DMANI-**modifizierten DNA1-Sequenzen und -Duplexen.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	Φ	$\tau_{ø}$ [ns]	T_m [°C]
DNA1_DMANI1-ss	454	540	0.013	1.56	–
DNA1_DMANI1+cs_DMANI1	455	541	0.008	1.09	59.0
DNA1_DMANI1+cs_no dye	461	536	0.076	2.99	60.0
DNA1_DMANI2-ss	453	540	0.024	1.15	–
DNA1_DMANI2+cs_DMANI2	451	549	0.018	0.73	64.7
DNA1_DMANI2+cs_no dye	455	527	0.045	1.54	64.5

4.3.2 Charakterisierung der mit ANI1 oder ANI2 modifizierten DNA

Die Absorptionsspektren der **DNA1_ANI1**-Duplexe mit dem freien exozyklischen Amin zeigen, wie die **DMANI**-Duplexe, eine hypsochrome Verschiebung des Maximums ($\Delta\lambda_{Abs.}$ = 8 nm) des Interstrangdimers im Vergleich zum Monomer-Duplex. Diese Beobachtung fällt für die **DNA1_ANI2** Duplexe mit nur $\Delta\lambda_{Abs.}$ = 2 nm weitaus weniger signifikant aus. Die Emissionsspektren zeigen einen hybridisierungsbedingten *Turn-on* der Monomer-Duplexe gegenüber den Einzelsträngen. Für den **DNA1_ANI1+cs_ANI1-**Interstrangdimer-Duplex kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung bei einer schwachen bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums um $\Delta\lambda_{Fl.}$ = 3 nm im Vergleich zum Monomer-Duplex. Aufgrund der charakteristischen hypsochromen Verschiebung der Absorption und der gelöschten Fluoreszenz kann angenommen werden, dass es für den **ANI1**-Interstrangdimer-Duplex, analog zu **DMANI1,** ebenfalls zur Bildung nicht fluoreszenter H-Aggregate kommt. Dies korreliert ebenfalls mit einer verkürzten Fluoreszenzlebenszeit des Interstrangdimer-Duplexes im Vergleich zum Monomer-Duplex. Für die **ANI2**-Duplexe ergibt sich ein anderes Bild der Emissionsspektren. Zwar ist auch hier durch die Hybridisierung ein Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen, allerdings fällt dieser für den Interstrangdimer-Duplex stärker aus als für den Monomer-Duplex. Dabei kommt es zu einer nicht signifikanten

hypsochromen Verschiebung des Emissionsmaximums um $\Delta\lambda_{Fl.}$ = 2 nm im Vergleich zum Monomer-Duplex (Abbildung 68).

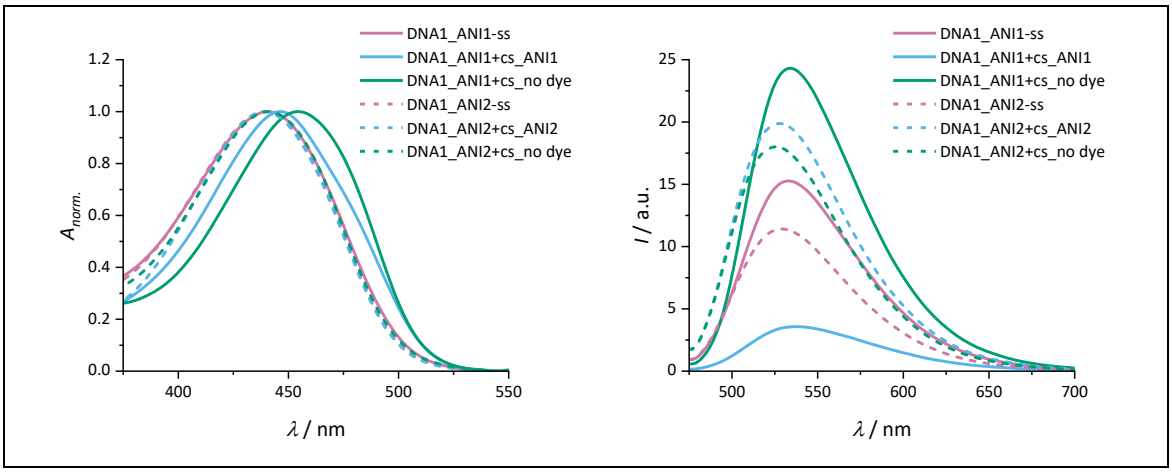


Abbildung 68: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der einfach modifizierten DNA1 mit **ANI1** und **ANI2** im Einzelstrang, im Duplex mit nur einem Chromophor und im Interstrangdimer; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 460 nm, Spaltbreite 2/2 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die nur sehr geringen Verschiebungen der Absorptions- und Emissionsmaxima zwischen den **ANI2**-Duplexen deuten darauf hin, dass der Versatzwinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der beiden Chromophore in der Nähe des „magischen Winkels“ von Θ = 54.7° liegt. Somit wäre die excitonische Kopplung nahezu aufgehoben, wodurch die Aufspaltung des angeregten Zustands minimal ausfällt (vgl. Kapitel 2.3.2.1, Abbildung 15). Damit korreliert auch der Anstieg der Fluoreszenz des Interstrangdimer-Duplexes gegenüber dem Monomer-Duplex. Das Dimer erreicht einen zunehmenden J-Aggregat-Charakter; die Fluoreszenz wird weniger stark gelöscht. Eine verkürzte Fluoreszenzlebenszeit von $\tau_{ø}$ = 9.20 ns und eine niedrigere Fluoreszenzquantenausbeute von Φ = 0.179 des Interstrangdimer-Duplexes im Vergleich zum Monomer-Duplex ($\tau_{ø}$ = 11.85 ns; Φ = 0.258) zeigt aber auch, dass immer noch Quenching-Prozesse stattfinden.

Die Schmelztemperaturen der **ANI1**- und **ANI2**-Duplexe zeigen ein ähnliches Verhalten wie für die **DMANI1**- und **DMANI2**-Duplexe. So sind die T_m für die **ANI2**-Duplexe mit langem Linker generell höher als die der **ANI1**-Duplexe und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Dies stützt die Hypothese, dass sich die Chromophore aufgrund des langen Linkers in der kleinen Furche anlagern.

Die **ANI1**-Duplexe zeigen im Gegensatz zu den **DMANI1**-Duplexen eine Stabilisierung der DNA-Doppelhelix durch die Bildung von Interstrangdimeren. Die Wechselwirkungen zwischen den beiden **ANI1**-Chromophoren führen zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur um ΔT_m = +1 °C (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **ANI-**modifizierten DNA1-Sequenzen und Duplexen.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	Φ	$\tau_{ø}$ [ns]	T_m [°C]
DNA1_ANI1-ss	441	533	0.197	8.83	–
DNA1_ANI1+cs_ANI1	446	537	0.038	3.42	61.0
DNA1_ANI1+cs_no dye	454	534	0.280	10.12	60.0
DNA1_ANI2-ss	439	529	0.173	8.72	–
DNA1_ANI2+cs_ANI2	439	528	0.179	9.20	65.2
DNA1_ANI2+cs_no dye	441	526	0.258	11.85	65.3

Die beobachteten Unterschiede zwischen den **DMANI-** und **ANI**-modifizierten Einzelsträngen und Duplexen lassen sich auf die Methylsubstituenten am Amin der **DMANI**-Chromophore im Vergleich zu dem primären freien Amin der **ANI**-Chromophore erklären. Die Methylierung beeinflusst sowohl die elektronischen Eigenschaften des Chromophors als auch dessen räumliche Einbettung in die DNA-Doppelhelix.

Für die **DMANI-**Stränge werden insgesamt bathochrom verschobene Absorptions- und Emissionsbanden sowie deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten beobachtet als für die **ANI**-Modifikationen. Diese Unterschiede lassen sich durch die Ausbildung eines TICT-Zustands erklären. Ein vergleichbares Verhalten wurde bereits für die **DMAPI**-Basensurrogaten von MARKUS MERKEL beschrieben, die strukturell sehr ähnlich zu den hier untersuchten **DMANI**-Chromophoren sind (vgl. Kapitel 2.2.1) (Abbildung 69).

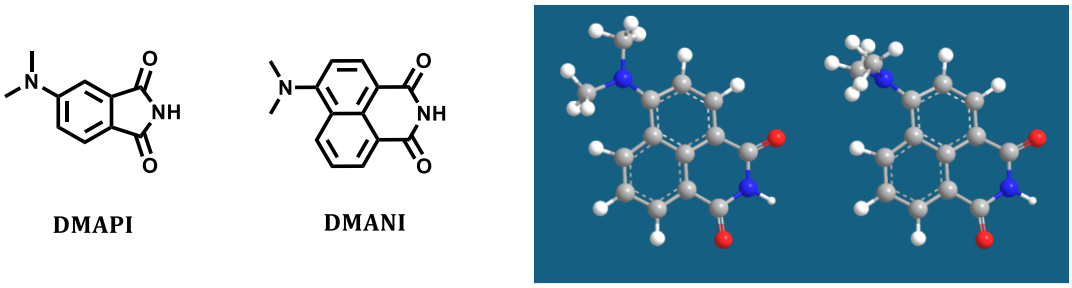


Abbildung 69: Strukturelle Ähnlichkeiten der Moleküle DMANPI und DMANI (links), Verdrehung der Dimethylamingruppe und daraus resultierender TICT-Zustand (rechts).

Aufgrund einer stärker eingeschränkten Rotation der Dimethylamino-Gruppe bei den **DMAPI**-modifizierten DNA-Duplexen, kam es dabei allerdings zu deutlich stärker gelöschten Fluoreszenzen als bei den hier untersuchten **DMANI**-Chromophoren. Auch die Fluoreszenzlebensdauern korrelieren mit einem TICT-Zustand. Die **DMANI**-Stränge weisen deutlich kürzere mittlere Lebenszeiten auf als die **ANI**-Stränge, für die erhaltenen TCSPC-Messdaten ergibt sich eine triexponentielle Anpassung, während die Messdaten der **ANI**-Chromophore einen biexponentiellen Verlauf zeigen (Abbildung 70). Die beiden Lebenszeiten der ANI-Chromophore liegen im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-8} s, während die zusätzliche, kurzlebige Komponente der DMANI-Chromophore im Mittel bei $\tau < 1$ ns liegt. Dies deutet auf einen schnellen, nicht strahlenden Deaktivierungspfad hin, welcher dem TICT-Zustand zugeordnet wurde.

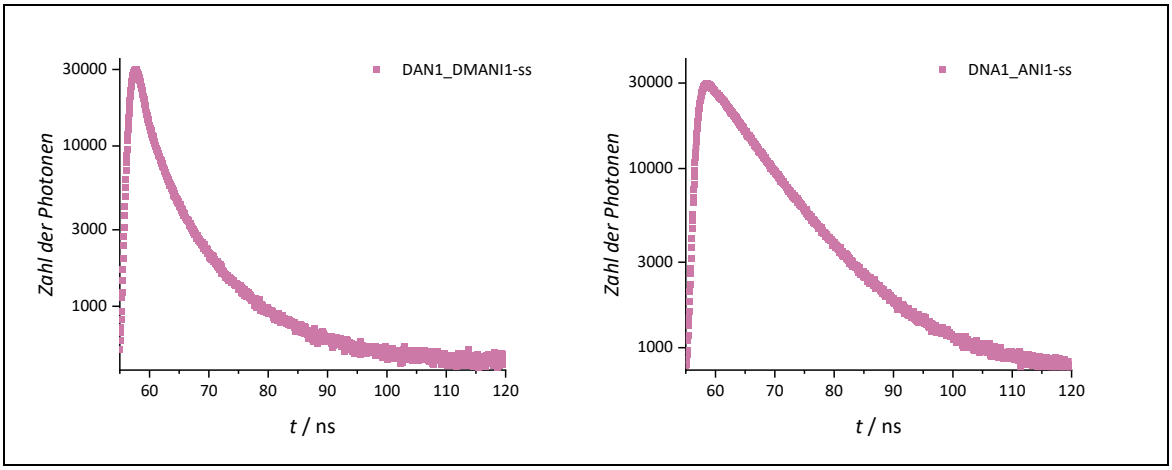


Abbildung 70: TCSPC-Spektren, exemplarisch für die **DMANI**- und **ANI**-Chromophore anhand von **DNA1_DMANI1-ss** und **DNA1_ANI1-ss**.

Darüber hinaus wirkt sich die Methylierung durch ihren sterisch größeren Anspruch nachteilig auf die Einbettung der Chromophore in die DNA-Doppelhelix aus. Dies führt zu einer Destabilisierung der Duplexe und äußert sich in niedrigeren Schmelztemperaturen für die **DMANI**-Duplexe. Zugleich sind die π-π-Wechselwirkungen zwischen zwei Chromophoren weniger stark ausgeprägt, wodurch sich das Interstrangdimer von **DMANI1** im Vergleich zu **ANI1** nicht stabilisierend auf den Duplex auswirkt. Die erhöhte sterische Hinderung begünstigt zudem eine stärkere Verdrehung der Chromophore gegeneinander, was sich auf die excitonische Kopplung und damit auch auf die optischen Eigenschaften auswirkt.

Zusammenfassend führt die Methylierung der **DMANI**-Chromophore zu einer stärkeren nicht-strahlenden Deaktivierung, einer bathochromen Verschiebung der optischen Eigenschaften, kürzeren Fluoreszenzlebensdauern und einer insgesamt geringeren Duplexstabilität. Demgegenüber resultiert das freie Amin der **ANI**-Chromophore in höheren Fluoreszenzquantenausbeuten, längeren Lebensdauern und einer geringeren Destabilisierung der DNA-Doppelhelix.

4.4 Optische Charakterisierung der Intrastrangdimere auf ihre Eignung als Sonde für *N*^{6}-Methyladenosin

Um das Potenzial der Aminonaphthalimid basierten Chromophore zur Detektion der *N*^{6}-Methylierung von Adenosin zu bewerten, wurde eine DNA-Sequenz mit zwei Chromophoren als Klammer um ein Thymidin entworfen. Eine Störung der Watson-Crick-Basenpaarung soll die Ausbildung eines Intrastrangdimers begünstigen. Im Fall einer intakten Basenpaarung wird hingegen eine räumliche Trennung der Chromophore erwartet, sodass diese überwiegend als Monomere vorliegen.

4.4.1 Untersuchung der DNA–DNA-Duplexe

Zur experimentellen Validierung wurden zunächst verschiedene DNA–DNA-Duplexe untersucht. Dabei wurde jeweils ein Duplex charakterisiert, der eine reguläre A:T-Basenpaarung ermöglicht, eine definierte T:T-Basenfehlpaarung

aufweist oder eine m⁶A:T-Paarung enthält, um den Einfluss der Methylgruppe auf die Ausbildung des Intrastrangdimers gezielt beurteilen zu können (Abbildung 71).

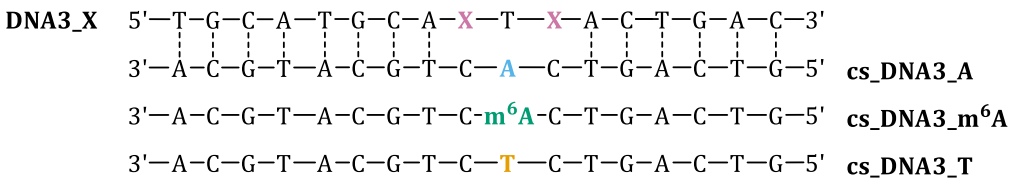


Abbildung 71: Die DNA3-Duplexe zur Untersuchung einer möglichen m⁶A-Sonde.

Die optischen Eigenschaften der mit **DMANI** modifizierten Duplexe zeigen, wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, eine deutliche Abhängigkeit von der Linkerlänge (Abbildung 73). Für die **DMANI1**-Intrastrangdimer-Duplexe mit kurzem Linker wird eine zunehmend hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima beobachtet, je stärker die Ausbildung eines Intrastrangdimers begünstigt ist. Die Emissionsspektren weisen keine eindeutige Korrelation zwischen der Verschiebung der Maxima und dem Dimerisierungsgrad auf, allerdings kommt es mit zunehmenden Chromophor-Wechselwirkungen zu geringeren Fluoreszenzquantenausbeuten. Die erhaltene Quantenausbeute für den **DMANI1+A**-Duplex liegt mit Φ = 0.041 deutlich unter der des entsprechenden Monomer-Duplexes mit Φ = 0.076, während die Quantenausbeute des **DMANI1+T**-Duplexes mit Φ = 0.020 weiter abnimmt. Es ist anzunehmen, dass in allen **DMANI1**-Duplexen die Chromophore sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen, wobei sich das Verhältnis mit zunehmender Basenfehlpaarung zugunsten der Dimerbildung verschiebt. Es wird angenommen, dass sich die Übergangsdipolmomente der **DMANI1**-Chromophore im Intrastrangdimer weitgehend parallel, *face-to-face* orientieren, wodurch es zu einer ausgeprägten Bildung von nicht fluoreszierenden H-Aggregaten kommt (Abbildung 72). Entsprechend stammt die beobachtete Emission ausschließlich von den nicht aggregierten Monomeren.

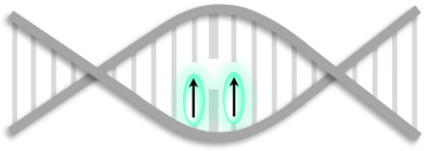


Abbildung 72: Postulierte *face-to-face*-Anordnung der Intrastrangdimere mit kurzem Linker.

Für die **DMANI2**-modifizierten Duplexe mit langem Linker zeigt sich ein anderes Verhalten. Die Absorption ist im Vergleich zu den **DMANI1**-Duplexen hypsochrom verschoben, was mit der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen verringerten Polarität der Mikroumgebung aufgrund des längeren Linkers korreliert. Die Emission ist im Vergleich zu der des Monomer-Duplexes um $\Delta\lambda_{Fl.}$ = 13 nm bathochrom verschoben, wobei sich keine weitere Änderung der Verschiebung zwischen einer Watson-Crick-Basenpaarung oder einer Fehlpaarung zeigt. Es kommt lediglich zu geringfügigen Unterschieden zwischen den Fluoreszenzintensitäten. Aufgrund dieser Beobachtungen und einer hypsochromen Verschiebung der Absorption im Vergleich zu dem **DNA1_DMANI2**-Monomer-Duplex sowie einer verringerten Fluoreszenzquantenausbeute wird davon ausgegangen, dass es aufgrund der Anordnung der Chromophore zur Bildung wenig fluoreszenten H-Aggregaten kommt. Die Fluoreszenzquantenausbeuten der **DMANI2+m^{6}A-** und **DMANI2+T**-Duplexe entsprechen denen des Interstrangdimer-Duplexes mit Φ = 0.020. Unter der Annahme, dass die Chromophore aufgrund des längeren Linkers in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix lokalisiert sind, ist es nachvollziehbar, dass die Ausbildung der Intrastrangdimere durch die Basenpaarung kaum beeinflusst wird. Die zu erkennenden Unterschiede sind eher den solvatofluorochromen Eigenschaften der **DMANI**-Moleküle zuzuordnen.

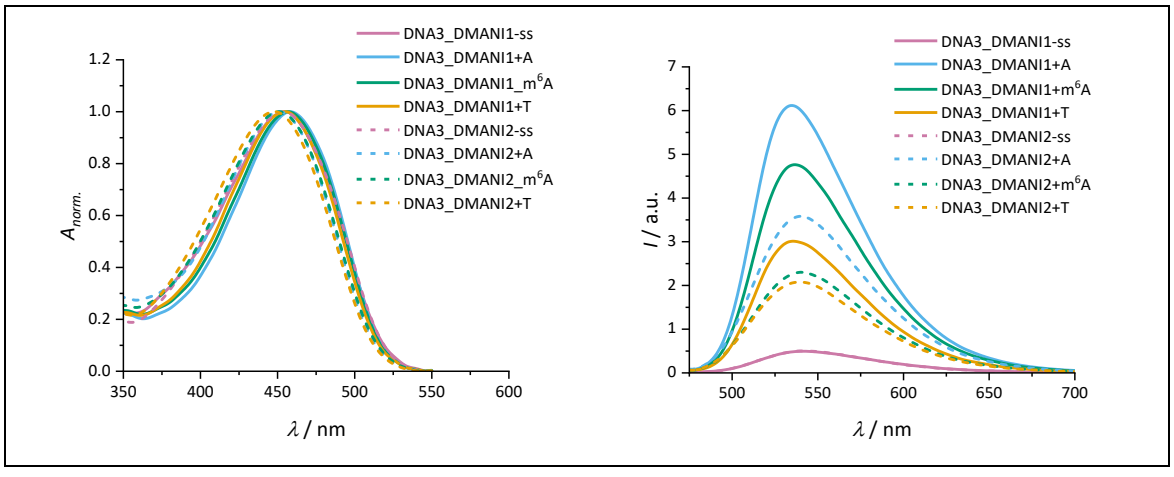


Abbildung 73: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der doppelt modifizierten DNA3 für **DMANI1** und **DMANI2** im Einzelstrang und im Duplex gegen A, m^{6}A und T; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP$_i$-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 460 nm, Spaltbreite 2/2 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die mittels TCSPC-Messung bestimmten mittleren Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von $\tau_{ø}$ = 0.51 – 1.88 ns korrelieren mit den erhaltenen Emissionsspektren. Für die m^{6}A- und T-Duplexe werden kürzere Lebenszeiten als für die A-Duplexe gemessen, was auf eine vermehrte Aggregatsbildung hinweist (Tabelle 5).

Die Schmelztemperaturen der Intrastrangdimer-Duplexe verhalten sich analog zu den DNA1-Duplexen, wobei der kurze Linker der **DMANI1**-Modifikationen zu einer deutlich höheren Destabilisierung der Duplexe führt. Insgesamt sind die Schmelztemperaturen der Intrastrangdimere niedriger als die der Interstrangdimere. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass bei den Interstrangdimeren zusätzliche π-π-Wechselwirkungen zwischen zwei Chromophoren in gegenüberliegenden Strängen zur Stabilisierung der Doppelhelix beitragen. Werden hingegen beide Chromophore im selben Strang positioniert, entfallen diese stabilisierenden Wechselwirkungen, wodurch die thermische Stabilität der Duplexe abnimmt.

Tabelle 5: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **DMANI-**modifizierten DNA3-Sequenzen und Duplexen.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	Φ	$\tau_{ø}$ [ns]	T_m [°C]
DNA3_DMANI1-ss	455	542	0.001	0.51	–
DNA3_DMANI1+A	458	535	0.041	1.88	50.0
DNA3_DMANI1+m^{6}A	457	537	0.037	1.54	50.0
DNA3_DMANI1+T	455	535	0.020	1.17	48.3
DNA3_DMANI2-ss	453	541	0.004	0.52	–
DNA3_DMANI2+A	451	540	0.026	0.92	58.8
DNA3_DMANI2+m^{6}A	451	540	0.018	0.75	57.5
DNA3_DMANI2+T	448	540	0.017	0.77	56.3

Die **DNA3_ANI1**-Duplexe zeigen, analog zu den **DNA3_DMANI1**-Duplexen, Monomerfluoreszenzen (vgl. Kapitel 4.3.2), während die Absorptionsmaxima bei zunehmender Möglichkeit zur Dimerisierung hypsochrom verschoben sind. Dies weist darauf hin, dass es auch hier zu einer Ausbildung nicht fluoreszierender

H-Aggregate kommt und die beobachtete Emission ausschließlich von nicht aggregierten Chromophoren stammt. Im Vergleich zu den **DNA3_DMANI1**-Duplexen fallen die Fluoreszenzquantenausbeuten der **DNA3_ANI1**-Duplexe jedoch deutlich höher aus, da hier keine Ausbildung eines TICT-Zustands erfolgt. Die Quantenausbeute für den **ANI+A**-Duplex ist mit $\Phi = 0.273$ annähernd so hoch wie für den entsprechenden Monomerduplex. Zudem fallen die Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten zwischen den **ANI1**-Intrastrangdimer-Duplexen bei einem A:T-Basernpaar und einer T:T-Basenfehlpaarung deutlich geringer aus. Auch die **DNA3_ANI2**-Duplexe zeigen nur wenig signifikante Änderungen der Absorptions- und Emissionsspektren zwischen den T:A-, T:m^{6}A- und T:T-Paarungen. Auffällig ist jedoch eine Zunahme der Fluoreszenz bei steigendem Basenfehlpaarungsverhalten. Da dabei keine Verschiebung der Fluoreszenzmaxima zwischen den verschiedenen Intrastrangdimer-Duplexen zu beobachten ist, kann dieses Verhalten nicht durch eine Excitonaufspaltung erklärt werden, sondern wird auf Veränderungen in der lokalen Mikroumgebung der Chromophore zurückgeführt. Die Absorptionsspektren der **DAN3_ANI2-**Duplexe entsprechen denen des **DNA1_ANI2-**Monomer-Duplexes, während die Emission im Vergleich zu dem Monomer-Duplex bathochrom verschoben ist. Unter der Annahme, dass auch hier aufgrund des langen Linkers die Chromophore als Dimer in der kleinen Furche vorliegen, deuten die hohen Fluoreszenzquantenausbeuten der Duplexe auf die Bildung von J-Aggregaten hin. Dabei wird angenommen, dass der Versatzwinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der beiden Chromophore vermutlich nur wenig unterhalb des „magischen Winkels“ von $\Theta = 54.7°$ liegt, wodurch so gut wie keine bathochrome Verschiebung der Absorption im Vergleich zum Monomer-Duplex beobachtet werden kann (Abbildung 74).

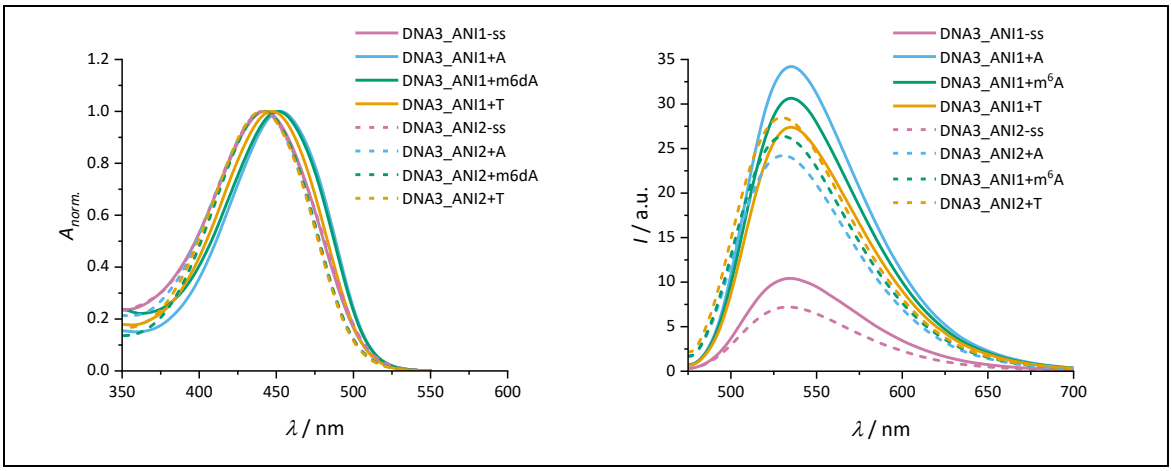


Abbildung 74: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der doppelt modifizierten DNA3 für **ANI1** und **ANI2** im Einzelstrang, und Duplexen gegen A, m^{6}A und T; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP$_i$-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 460 nm, Spaltbreite 2/2 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern der **ANI**-modifizierten Intrastrangdimer-Duplexe sind erwartungsgemäß mit bis zu $\tau_{Ø}$ > 9 ns deutlich höher als die der durch einen TICT-Zustand verkürzten Lebensdauern der **DMANI**-Duplexe. Da sich die Fluoreszenzquantenausbeuten zwischen den Duplexen nur wenig unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass sich hier mögliche Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Nachbarbasen stärker auf die Lebenszeiten auswirken. Die Schmelztemperaturen zeigen einen ähnlichen Trend wie die der **DMANI**-Intrastrangdimer-Duplexe, fallen aber Aufgrund, dass für die **ANI**-Modifikation die sterische Hinderung der Methylgruppe wegfällt, geringfügig höher aus (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **ANI**-modifizierten DNA3-Sequenzen und Duplexen.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	Φ	$\tau_{Ø}$ [ns]	T_m [°C]
DNA3_ANI1-ss	443	535	0.077	6.40	–
DNA3_ANI1+A	452	535	0.273	8.94	51.5
DNA3_ANI1+m⁶A	451	535	0.259	8.98	50.5
DNA3_ANI1+T	447	535	0.230	8.34	49.5
DNA3_ANI2-ss	441	533	0.058	4.13	–
DNA3_ANI2+A	441	530	0.217	8.73	59.5
DNA3_ANI2+m⁶A	442	530	0.227	9.20	59.2
DNA3_ANI2+T	441	530	0.233	9.34	56.8

Neben **DMANI**- und **ANI**-modifizierten Intrastrang-Dimeren wurde ein Intrastrangdimer-Strang mit einem **DMANI2**- und einem **PANI**-Chromophor modifiziert, um den Einfluss der Chromophorausrichtung auf die m^{6}A-Detektion charakterisieren zu können (vgl. Kapitel 4). Die Absorptionsspektren zeigen geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Duplexen, wobei eine hypsochrome Verschiebung der Maxima bei zunehmender Basenfehlpaarung erkennbar ist. Für die Emissionsspektren lässt sich kein solcher Trend beobachten; zudem sind auch die Intensitäten aller drei Duplexe sehr ähnlich zueinander (Abbildung 75).

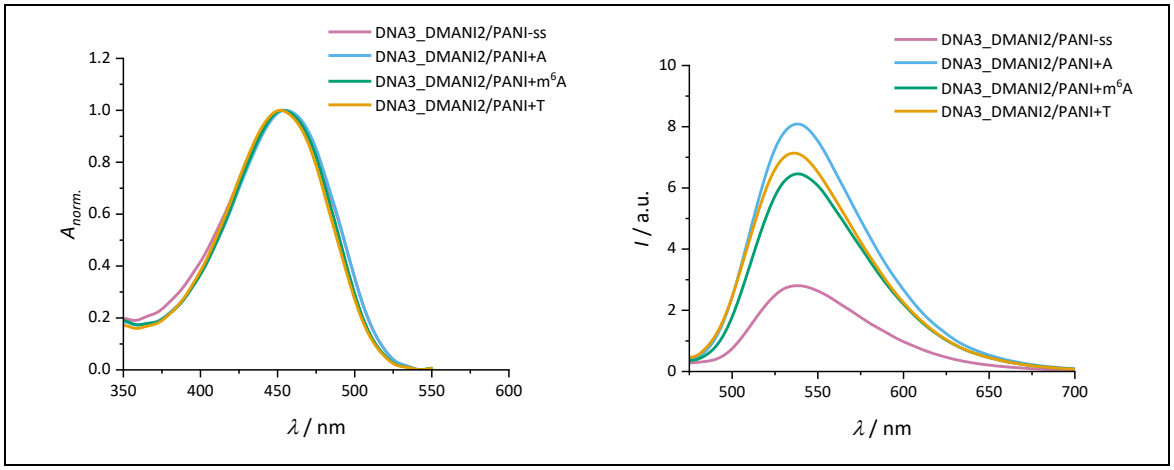


Abbildung 75: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der doppelt modifizierten DNA3_DMANI2/PANI im Einzelstrang und im Duplex gegen A, m^{6}A und T; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP$_i$-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 460 nm, Spaltbreite 2/2 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten und Lebenszeiten fallen für die **DMANI2/PANI**-modifizierten Duplexe deutlich höher aus als für die ausschließlich mit **DMANI2**-modifizierten Intrastrangdimer-Duplexe. Es sind zudem keine signifikanten Unterschiede dieser Werte zwischen dem m^{6}A- und dem T-Duplex erkennbar. Der A-Duplex zeigt eine etwas höhere Quantenausbeute und eine längere Lebensdauer (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **DMANI2/PANI-**modifizierten DNA3-Sequenzen und Duplexen.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	Φ	$\tau_{ø}$ [ns]	T_m [°C]
DNA3_DMANI2/PANI-ss	453	538	0.027	2.79	–
DNA3_ DMANI2/PANI +A	455	538	0.071	3.24	56.3
DNA3_ DMANI2/PANI +m⁶A	453	538	0.064	3.02	55.3
DNA3_ DMANI2/PANI +T	452	536	0.064	3.05	53.0

Die Schmelztemperaturen fallen im Vergleich zu den übrigen mit langem Linker modifizierten Duplexen deutlich niedriger aus. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der **PANI**-Chromophor aufgrund der umgekehrten Orientierung der Imidfunktion dazu in der Lage ist, Wasserstoffbrücken zu dem gegenüberliegenden Cytosin auszubilden (Abbildung 76). Durch den langen Linker kann dies zu einer lokalen Aufweitung der DNA-Doppelhelix führen, was eine Destabilisierung der Duplexe zur Folge hätte. Dies sind allerdings nur Vermutungen und müssten über Strukturanalysen bestätigt werden. Ob der **DMANI2**-Chromophor infolge der Wechselwirkungen zwischen den beiden Chromophoren ebenfalls teilweise in die Basenstapelung interkaliert wird oder weiterhin in der kleinen Furche lokalisiert ist, kann aus den vorliegenden spektroskopischen Daten jedoch nicht abgeleitet werden.

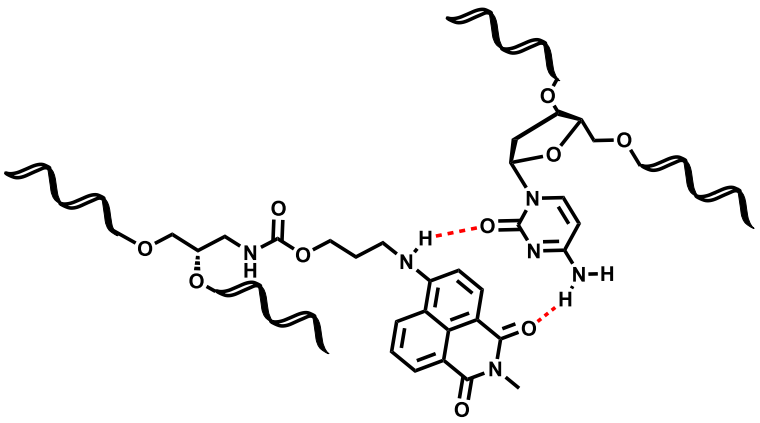


Abbildung 76: Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen **PANI** und Cytosin

.

4.4.2 Untersuchung der DNA–RNA-Duplexe

Da die *N*^{6}-Methyladenosin-Modifikation bei Säugetieren überwiegend in RNA vorkommt, wurden im nächsten Schritt DNA–RNA-Hybridduplexe untersucht, wobei als Sonde dieselbe DNA-Sequenz wie schon für die DNA–DNA-Duplexe eingesetzt wurde (Abbildung 77).

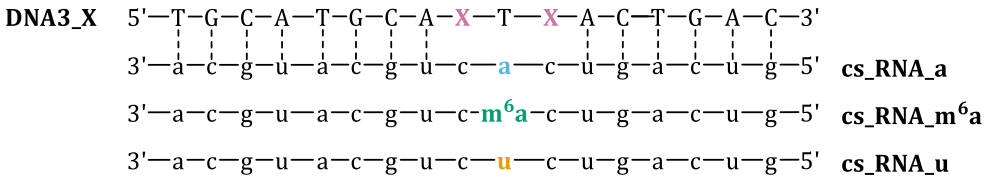


Abbildung 77: Die DNA3-cs_RNA-Hybridduplexe zur Untersuchung einer möglichen m^{6}a-Sonde.

Allgemein fallen die Fluoreszenzquantenausbeuten für die DNA–RNA-Hybridduplexe mit Ausnahme der u-Duplexe, ähnlich aus wie für die reinen DNA-Duplexe. Für die **DMANI1**-RNA-Hybridduplexe fällt auf, dass die Fluoreszenzintensitäten für **DNA3_DMANI1+RNA_a** und **DNA3_DMANI1+RNAU_u** nahezu identisch sind, während der m^{6}a-modifizierten Duplexe eine deutlich stärkere Fluoreszenzlöschung zeigen. Zudem folgen auch die Verschiebungen der Maxima der Emissionsspektren keinem klaren Muster, befinden sich aber bei vergleichbaren Wellenlängen wie für die entsprechenden DNA-Duplexe. Der RNA_u-Duplex weist sowohl in Absorption als auch in Emission eine hypsochrome Verschiebung auf, was auf eine veränderte Mikroumgebung der Chromophore hindeutet und nicht über eine excitonische Kopplung erklärt werden kann. Die Absorptionsmaxima der Hybridduplexe sind im Vergleich zu den DNA-Duplexen sowohl für die **DMANI** als auch **ANI** modifizierten Interstrangdimer-Duplexe leicht bathochrom verschoben, wobei der Unterschied für die mit kurzem Linker modifizierten Chromophore deutlich stärker ausfällt und mit einer erhöhten Polarität der RNA korreliert. Für die **DMANI2**-modifizierten Intrastrangdimer-Hybridduplexe fallen die Unterschiede in den Fluoreszenzquantenausbeuten stärker aus als bei den DNA–DNA-Duplexen. Die Emissionsmaxima entsprechen weitgehend denen der DNA-Duplexe, mit Ausnahme des **DNA3_DMANI+RNA_u** Duplexes, der eine ausgeprägte Fluoreszenzlöschung und eine zusätzliche

bathochrome Verschiebung zeigt. Diese Beobachtung deutet auf eine verstärkte Aggregatbildung und einen erhöhten H-Aggregat-Charakter der Chromophore in diesem Duplex hin.

Die **ANI1**-Hybridduplexe zeigen ein sehr ähnliches Verhalten wie die **DMANI1**-modifizierten DNA–RNA-Duplexe, jedoch sind hier keine signifikanten Unterschiede in den spektroskopischen Daten zwischen den a- und m6a-haltigen Duplexen zu erkennen. Die Fluoreszenzquantenausbeuten für den **DNA3_ANI1+RNA_u** Duplex fallen geringfügig niedriger aus, während die Maxima der Absorptions- und Emissionsspektren hypsochrom verschoben sind. Dies entspricht dem Trend der **DMANI1**-Hybridduplexe und weist darauf hin, dass die veränderte Helixgeometrie der DNA–RNA-Hybridduplexe zu einer stärkeren Wechselwirkung zwischen den Chromophoren führt, wodurch die Unterschiede der optischen Eigenschaften der Dimere zwischen einer Basenpaarung und einer Fehlpaarung deutlich reduziert werden. Die Unterschiede zwischen **DMANI1**- und **ANI1**-Hybridduplexen lassen sich erneut auf die Methylgruppen der **DMANI**-Chromophore zurückführen. Es ist anzunehmen, dass der sterische Anspruch die relative Orientierung der Chromophore zueinander verändert und damit direkt die Aggregatbildung und Excitonaufspaltung beeinflusst. Für die Hybridduplexe liegen allerdings keine Referenzdaten für einen Monomer-Hybridduplex vor. Daher lässt sich nicht eindeutig feststellen, ob die beobachtete Emission ausschließlich auf eine gelöschte Monomerfluoreszenz und die solvatofluorochromen Eigenschaften der Chromophore zurückzuführen ist. Ebenso ist es möglich, dass sie teilweise durch Dimerfluoreszenz verursacht wird.

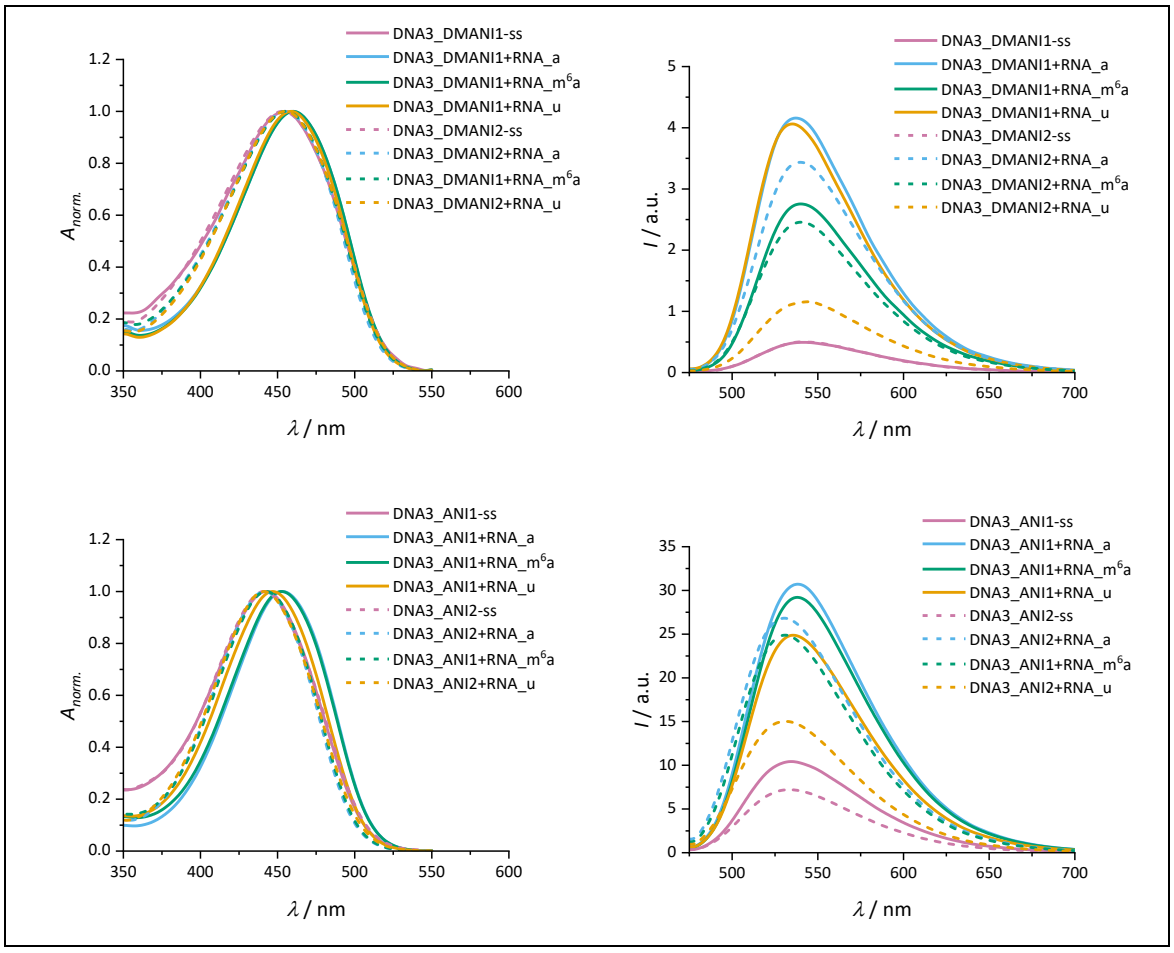


Abbildung 78: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der doppelt modifizierten DNA3 für **DMANI1** und **DMANI2** (oben) sowie **ANI1** und **ANI2** (unten) im Einzelstrang und den Hybridduplexen gegen RNA_a, RNA_m^{6}a und RNA_u; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP$_i$-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 460 nm, Spaltbreite 2/2 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die **ANI2**-Hybridduplexe verhalten sich ähnlich wie die **DMANI2**-Systeme, zeigen jedoch kaum Unterschiede zwischen **DNA3_ANI2+RNA_a** und **DNA3_ANI2+RNA_m^{6}a**. Für **DNA3_ANI2+RNA_u** zeigt sich wie schon bei dem analogen **DMNI2**-Hybridduplex eine deutliche Fluoreszenzlöschung, die aber in diesem Fall nur mit einer hypsochromen Verschiebung der Absorption und nicht mit einer Verschiebung der Emission einhergeht. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen Basenpaarung und Fehlpaarung für die Systeme mit langem Linker deutlich stärker ausgeprägt als für diejenigen mit kurzem Linker. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse signifikant von denen der DNA–DNA-Duplexe wo der kürzere Linker zu größeren unterschieden der optischen Eigenschaften geführt hat (vgl. Kapitel 4.4.1). Die Schmelztemperaturen der mit **DMANI** und **ANI**

modifizierten Hybridduplexe liegen deutlich unter denen der entsprechenden DNA–DNA-Duplexe. Besonders ausgeprägt ist die Destabilisierung bei den Duplexen mit einer T:u-Basenfehlpaarung. Zudem fällt die Abnahme der Schmelztemperaturen für die modifizierten Hybridduplexe mit langem Linker (**DMANI2** und **ANI2**) deutlich stärker aus als für die mit kurzem Linker (**DMANI1** und **ANI1**).

Tabelle 8: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **DMANI1-, DMANI2-, ANI1- und ANI2-**modifizierten DNA3-Hybridduplexe.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	Φ	τø [ns]	T_m [°C]
DNA3_DMANI1-ss	455	542	0.001	0.51	–
DNA3_DMANI1+RNA_a	460	537	0.036	1.47	47.3
DNA3_DMANI1+ RNA_m⁶a	460	540	0.024	1.22	47.2
DNA3_DMANI1+ RNA_u	459	535	0.034	1.50	43.5
DNA3_DMANI2-ss	453	541	0.004	0.52	–
DNA3_DMANI2+ RNA_a	455	540	0.024	0.78	50.5
DNA3_DMANI2+ RNA_m⁶a	456	540	0.017	0.82	49.0
DNA3_DMANI2+ RNA_u	455	544	0.009	0.56	46.5
DNA3_ANI1-ss	443	535	0.077	6.40	–
DNA3_ANI1+RNA_a	453	538	0.285	8.47	50.2
DNA3_ANI1+ RNA_m⁶a	453	538	0.261	8.67	49.0
DNA3_ANI1+ RNA_u	447	536	0.223	8.28	45.6
DNA3_ANI2-ss	441	533	0.058	6.20	–
DNA3_ANI2+ RNA_a	442	530	0.218	8.70	52.5
DNA3_ANI2+ RNA_m⁶a	443	531	0.215	8.33	52.3
DNA3_ANI2+ RNA_u	441	531	0.143	5.14	49.0

Die Unterschiede der optischen Eigenschaften und Duplexstabilitäten zwischen den DNA–DNA-Duplexen und den DNA–RNA-Hybridduplexen sind auf eine veränderte Helixgeometrie aufgrund der 2′-Hydroxygruppe der RNA-Ribose zurückzuführen. Da die konformationsgebenden Einflüsse der RNA überwiegen, kommt es für die Hybridduplexe zur Ausbildung einer A-Helix. In der A-Helix liegen die gestapelten Basen enger beieinander als in der B-Helix, gleichzeitig kommt es zu einer

Aufweitung des Helixdurchmessers. Dadurch wird die große Furche der A-Form enger und tiefer, während die kleine Furche weiter und flacher als in der B-Helix ausgeprägt ist.[197] Diese strukturellen Veränderungen beeinflussen insbesondere die Ausrichtung der Chromophore mit langem Linker, während der kurze Linker weiterhin eine Einbettung der Chromophore in die Basenstapelung begünstigen sollte. Ein mögliches Szenario ist, dass die Aufweitung der A-Helix eine teilweise Einlagerung der mit dem langen Linker verknüpften Chromophore in die Basenstapelung ermöglicht (Abbildung 80). Dies würde die deutlich stärkeren Unterschiede zwischen den Duplexen mit korrekter Basenpaarung und jenen mit Basenfehlpaarung erklären, die ausschließlich für die Hybridduplexe mit langem Linker beobachtet wurden und sich somit deutlich vom Verhalten der entsprechenden DNA-Duplexe unterscheiden.

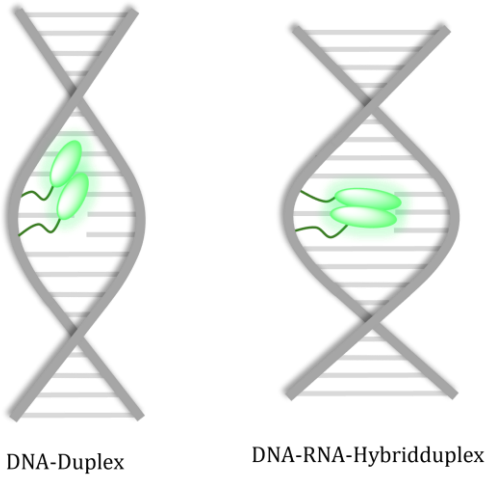


Abbildung 79: Mögliche Unterschiede in der Anordnung der mit langem Linker modifizierten Chromophore in einem reinen DNA-Duplex und einem DNA–RNA-Hybridduplex.

Analog zu den DNA–DNA-Intrastrangdimer-Duplexen wurden für die Hybridduplexe auch die **DMANI2/PANI**-Sequenz untersucht. Es zeigte sich eine geringfügig verringerte Quantenausbeute im Vergleich zu den jeweiligen DNA-Duplexen, während keine großen Veränderungen der optischen Eigenschaften auftraten. **DNA3_DMANI2/PANI+RNA_u** wird, analog zu den **DMANI2-** und **ANI2**-Hybridduplexen, stärker in der Fluoreszenz gelöscht, während die Absorption hypsochrom verschoben ist.

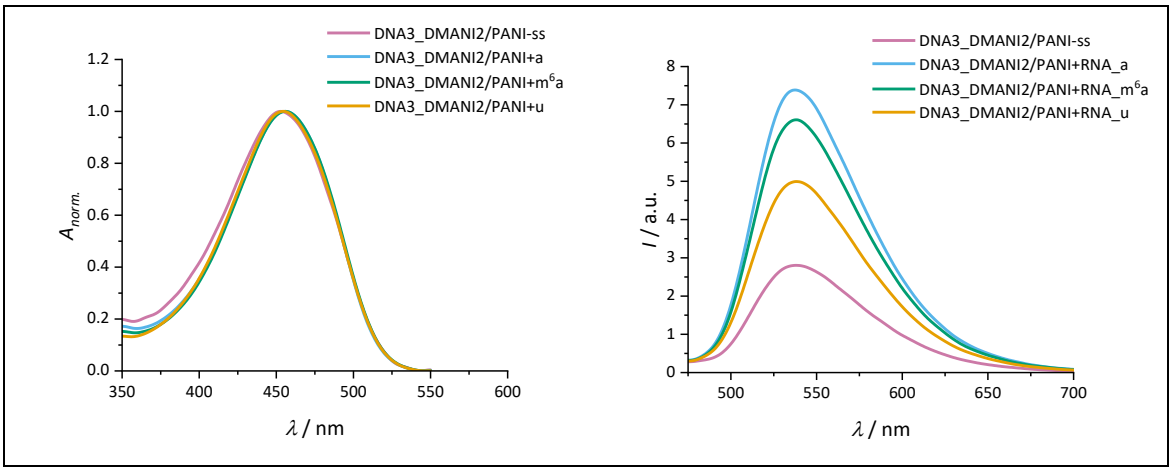


Abbildung 80: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der doppelt modifizierten **DNA3_DMANI2/PANI** im Einzelstrang und in den Hybridduplexen gegen RNA_a, RNA_m^{6}a und RNA_u; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP$_i$-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 460 nm, Spaltbreite 2/2 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Ebenso korrelieren die Schmelztemperaturen mit den beobachteten Ergebnissen der anderen Hybridduplexe, denn auch für dieses mit langem Linker modifizierte System kommt es zu einer deutlichen Erniedrigung der Duplexstabilität im Vergleich zu den DNA–DNA-Duplexen.

Tabelle 9: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **DMANI2/PANI-**modifizierten DNA3-Hybridduplexe.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	Φ	$\tau_{Ø}$ [ns]	T_m [°C]
DNA3_DMANI2/PANI-ss	453	538	0.027	2.79	–
DNA3_DMANI2/PANI +RNA_a	456	537	0.057	2.25	48.5
DNA3_DMANI2/PANI + RNA_m^{6}a	456	538	0.051	2.34	48.3
DNA3_DMANI2/PANI + RNA_u	452	538	0.038	2.29	44.8

4.5 Charakterisierung der mit NDI modifizierten Oligonukleotide

Analog zu den mit Aminonaphthalimid modifizierten DNA-Sequenzen wurden auch für die mit **NDI**-modifizierten DNA-Stränge zunächst die optischen Eigenschaften der Monomer-Duplexe sowie der Interstrangdimer-Duplexe charakterisiert. Zur Vervollständigung der optischen Daten wurden auch die jeweiligen Einzelstränge untersucht. Die Absorptionsspektren zeigen die für **NDI** typische Feinstruktur mit zwei Maxima bei $\lambda_{Abs.}$ = 365 und 385 nm. Für die mit **NDI1** (kurzer Linker) modifizierten Stränge ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Absorption zwischen den beiden Duplexen und dem Einzelstrang. Für **NDI2** (langer Linker) nimmt das relative Verhältnis zwischen den beiden Maxima von Einzelstrang über Monomer-Duplex zu Interstrangdimer-Duplex ab.

Die Emissionsspektren zeigen eine starke Fluoreszenzlöschung. Aufgrund dessen mussten die Spektren bei einer hohen Slitweite von 8 nm aufgenommen werden, wodurch es zu Messartefakten kam. Diese zeigen sich als Minimum bei 415 nm. Eine zuverlässige Interpretation der Daten ist aufgrund der starken Löschung nur wenig aussagekräftig. Festgehalten werden kann, dass sich die Fluoreszenzmaxima im Vergleich zu den vorangegangen Messungen des reinen Chromophors bathochrom um ungefähr 40 nm verschoben haben. Auch ist keine vibronische Feinstruktur mehr zu erkennen. Zudem nimmt die Fluoreszenz für die beiden Interstrangdimer-Duplexe im Vergleich zum Monomer-Duplex deutlich zu, wobei sie für den **NDI2**-Interstrangdimer-Duplex annähernd dreimal so hoch ist. Daher kann angenommen werden, dass sich die Chromophorwechselwirkungen in diesem Fall positiv auf die Fluoreszenzquantenausbeute auswirkt. Ein Sonderfall der hier gezeigten Spektren bildet der **NDI1**-modifizierte Einzelstrang. Dieser zeigt ein Maximum bei $\lambda_{Fl.}$ = 595 nm welches einer Excimerbildung zugeschrieben wird. Dies könnte durch Interaktionen der dynamisch in Lösung vorliegenden Einzelstränge ermöglicht werden (Abbildung 81).

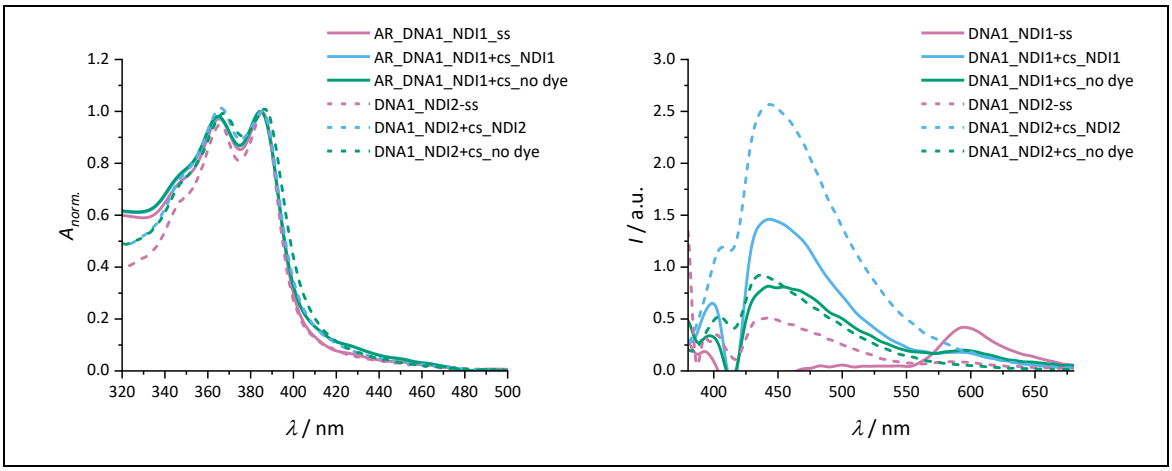


Abbildung 81: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der einfach modifizierten DNA1 mit **NDI1** und **NDI2** im Einzelstrang, im Duplex mit nur einem Chromophor und im Interstrangdimer; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 365 nm, Spaltbreite 8/8 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Die Schmelztemperaturen der **NDI**-modifizierten Duplexe liegen im selben Bereich wie die der DMANI-modifizierten Duplexe. Allerdings nimmt hier die Schmelztemperatur durch die Dimerisierung für den Interstrangdimer-Duplex in beiden Fällen um 0.8 °C im Vergleich zum Monomer-Duplex zu (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der mit **NDI** modifizierten DNA1-Sequenzen und Duplexen.

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	T_m [°C]
DNA1_NDI1-ss	365/385	595	–
DNA1_NDI1+cs_NDI1	365/385	443	59.3
DNA1_NDI1+cs_no dye	365/385	443	58.5
DNA1_NDI2-ss	365/385	443	–
DNA1_NDI2+cs_NDI2	366/385	443	64.8
DNA1_NDI2+cs_no dye	367/387	437	64.0

Die Emissionsspektren der DNA-DNA-Intrastrangdimer-Duplexe zeigen ebenfalls stark gelöschte Fluoreszenzen. Aufgrund dessen war es nicht möglich, die erhaltenen Messdaten zu reproduzieren. Daher fand keine weitere Auswertung dieser Daten statt und es wird auch nicht weiter darauf eingegangen. Im Vergleich zu den DNA-DNA-Duplexen zeigten die DNA-RNA-Hybridduplexe eine weitaus stärkere Fluoreszenz. Es wird angenommen, dass durch die Geometrieänderung der

Doppelhelix von einer B-Helix auf eine A-Helix die Anordnung der Chromophore zu den natürlichen Basen geometrisch so verändert wird, dass die löschenden Prozesse weniger stark stattfinden. Die **DMANI1-**modifizierten Intrastrangdimer-Duplexe weisen zwei für **NDI** charakteristische Maxima bei $\lambda_{Fl.}$ = 393 und 414 nm auf die für den u-Duplex minimal bathochrom verschoben sind. Die Fluoreszenz des Einzelstrangs wird stark gelöscht. Die Emissionsspektren zeigen zwischen dem a-Duplex und dem m^{6}a-Duplex keinen signifikanten Unterschied; für den u-duplex nimmt die Fluoreszenzintensität allerdings stark zu. Dieses Verhalten ist auch für die **NDI2**-modifizierten Duplexe zu erkennen. Allerdings weisen diese, wie auch schon die einfach modifizierten Duplexe, eine bathochrom verschobene und breitere Emissionsbande auf. Dies deutet auf ausgeprägte Dimer-Wechselwirkungen hin, die zum Verlust der vibronischen Feinstruktur führen. Zudem zeigen die Fluoreszenzspektren ein zweites, hypsochrom verschobenes Maximum bei einer Verschiebung, die in dem Bereich der **NDI1**-modifizierten Stränge liegt. Es wird angenommen, dass sowohl ein gewisser Monomer-Anteil als auch ein Dimer-Anteil vorliegen. Die Absorptionsspektren der Duplexe sind erneut sehr ähnlich zueinander und es kommt zu keinen signifikanten Verschiebungen. Das Verhältnis zwischen den beiden Maxima fällt für die **NDI2**-modifizierten Stränge etwas geringer aus als für die **NDI1**-modifizierten Stränge (Abbildung 82).

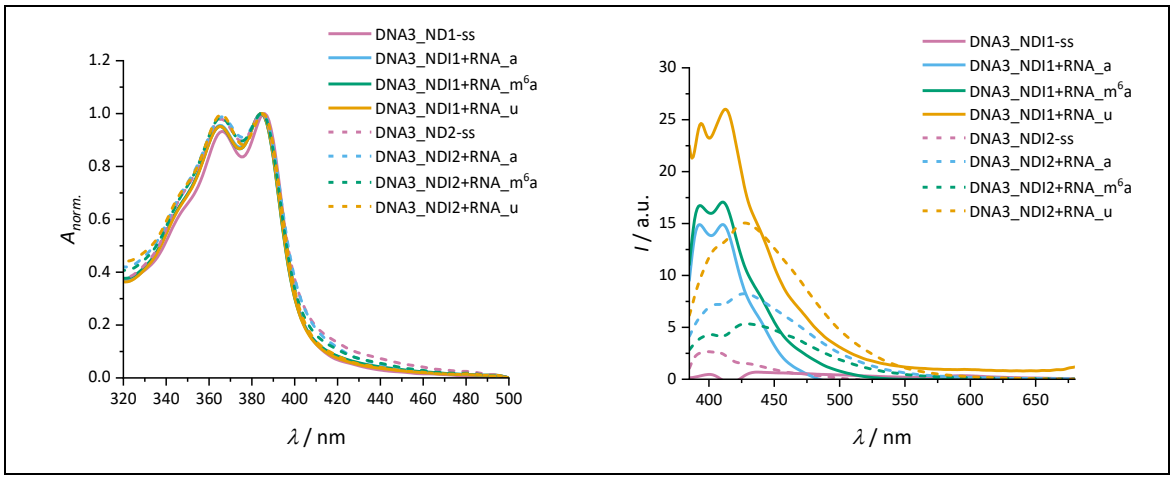


Abbildung 82: Absorptionsspektren (normiert) und Emissionsspektren der doppelt modifizierten DNA3 für **NDI1** und **NDI2** im Einzelstrang und in den Hybridduplexen gegen RNA_a, RNA_m^{6}a und RNA_u; 2.5 µM DNA, 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, $\lambda_{Exc.}$ = 365 nm, Spaltbreite 8/8 nm; Glättung mit FFT-Filter.

Durch die Intrastrangdimere kommt es zu einer ausgeprägten Destabilisierung der Duplexe, was sich in den Schmelztemperaturen widerspiegelt. Diese sind um über 12 °C niedriger als für die Interstrangdimer-Duplexe (Tabelle 11). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Duplexen fallen für die mit **NDI2**-modifizierten Hybridduplexe deutlich stärker aus als für **NDI1**. Dadurch kann, wie schon bei den mit Aminonaphthalimid modifizierten Hybridduplexen, eine Interaktion der **NDI2**-Chromophore in die Basenstapelung angenommen werden.

Tabelle 11: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der **NDI1-** und **NDI2-**modifizierten DNA3-Hybridduplexe

	$\lambda_{Abs.}$ [nm]	$\lambda_{Fl.}$ [nm]	T_m [°C]
DNA3_NDI1-ss	366/386	594	–
DNA3_NDI1+RNA_a	365/384	393/411	47.5
DNA3_NDI1+RNA_m⁶a	365/384	393/411	47.5
DNA3_NDI1+RNA_u	365/384	394/413	46.0
DNA3_NDI2-ss	366/385	399	–
DNA3_NDI2+RNA_a	366/385	407 (sh)/ 427	51.5
DNA3_NDI2+RNA_m⁶a	366/385	401/429	49.3
DNA3_NDI2+RNA_u	366/385	407(sh)/427	41.2

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten vier verschiedene Chromophore synthetisiert werden, wobei diese mit zwei unterschiedlich langen Linkern modifiziert wurden. Insgesamt wurden so sieben verschiedene Bausteine erhalten, welche über die Phosphoramidit-Festphasensynthese in DNA eingebaut wurden. Die charakterisierten Interstrangdimer-Duplexe zeigten im Vergleich zu den Monomer-Duplexen für die **DMANI**- und **ANI**-Modifikationen eine starke Fluoreszenzlöschung, welche excitonischen Wechselwirkungen zugeschrieben wird. Diese sind dabei stark von der Linkerlänge abhängig. Zudem zeigen die **DMANI**-Chromophore eine generell niedrigere Fluoreszenzintensität, was auf einen TICT-Zustand hindeutet. Die mit **NDI** modifizierten Interstrangdimer- und Monomerduplexe zeigen eine stark gelöschte Fluoreszenz und sind dadurch schwer zu charakterisieren. Es zeigt sich aber, dass die Wechselwirkungen zwischen zwei Interstrangdimeren zu einem Fluoreszenzanstieg führen. Die Charakterisierung der Intrastrangdimer-Duplexe zeigt ebenfalls einen deutlichen Einfluss der Länge des Linkers auf die Wechselwirkungen zwischen zwei Chromophoren. Es hat sich gezeigt, dass die Detektion des N^6-Methyladenosins, sowohl in DNA als auch in RNA, nicht zuverlässig über stationäre Fluoreszenzintensitäten erfolgen kann. Durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen ließen sich Unterschiede in den Lebenszeiten erfassen, was eine Differenzierung zwischen methyliertem und unmethyliertem Adenosin ermöglichte. Dies eröffnet die Perspektive für die Anwendung der Dichromophorsysteme in Kombination mit Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie, da sich Unterschiede in den Lebenszeiten auch direkt in der Zelle detektieren lassen. Dadurch könnte die m^6a-Modifikation unter physiologischen Bedingungen visualisiert werden.

Weiterführend sollten zudem Inter- und Intrastrangdimere mit unterschiedlich langen Linkern kombiniert werden. Es wird erwartet, dass diese zu einer anderen Anordnung der Chromophore führt, was dann die Ausbildung von J-Aggregaten ermöglichen könnte. Zudem sollten auch Systeme untersucht werden, in denen zwei verschiedene Chromophore kombiniert werden. Dadurch könnten Exciplex-

Zustände erzeugt werden, die ebenfalls als potenzielle Fluoreszenzsonde eingesetzt werden könnten. Zur weiteren Aufklärung der räumlichen Anordnung und der Wechselwirkung der Chromophore bietet sich der Einsatz von zirkulardichroitischer (CD)-Spektroskopie an. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Orientierung der Übergangsdipolmomente sowie auf das Ausmaß der excitonischen Kopplung ziehen. Anhand dieser Informationen könnten die postulierten Modelle experimentell bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene, größtenteils neuartige Fluoreszenzsonden synthetisiert und umfassend auf eine potenzielle Eignung zur Detektion von N^6-Methyladenosin charakterisiert.

Im ersten Projekt wurde das fluoreszente Basensurrogat ***o*-4API** synthetisiert und als Phosphoramidit mittels automatisierter Festphasensynthese in RNA und DNA eingebaut. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Sonde in der Lage ist, zwischen methyliertem Adenosin und der unmodifizierten Form zu unterscheiden. Die beobachteten Fluoreszenzeigenschaften hängen dabei stark von der molekularen Umgebung des Chromophors ab. Die Sonde konnte sowohl in RNA–RNA-Duplexen als auch in DNA–RNA-Hybridduplexen eingesetzt werden, wobei in den Hybridduplexen eine konstantere Detektion der Methylierung erreicht wurde. Darüber hinaus ermöglicht die Sonde auch die Detektion der m^{1}a-Modifikation; eine klare Differenzierung zwischen m^{1}a- und m^{6}a war jedoch nicht möglich (Abbildung 83).

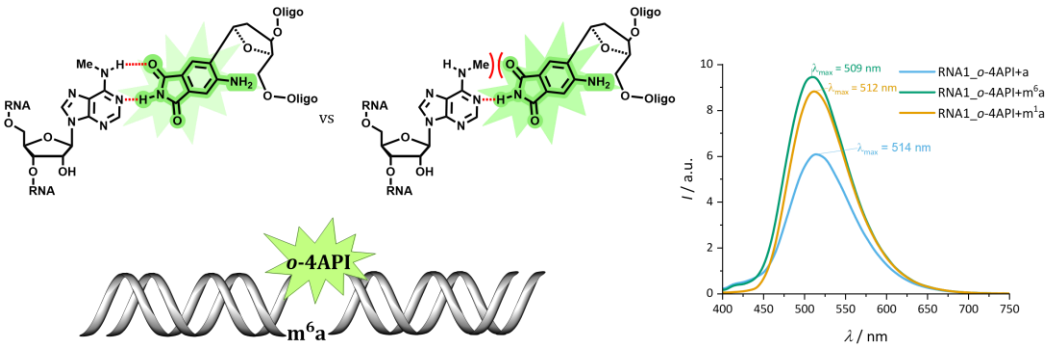


Abbildung 83: Funktionsprinzip der untersuchten **o-4API**-Sonde anhand des Anstiegs der Fluoreszenzintensität.

Im zweiten Projekt wurden die Phosphoramiditbausteine der Chromophore **DMANI**, **ANI**, **PANI** und **NDI** synthetisiert und ebenfalls mittels automatisierter Festphasensynthese in DNA eingebaut. Zunächst wurden die optischen Eigenschaften der Monomer- und Interstrangdimer-Duplexe charakterisiert. Dabei zeigten die mit **ANI**-modifizierten Monomer-Duplexe die höchsten Fluoreszenzquantenausbeuten. Die Quantenausbeuten der mit **DMANI**-

modifizierten Oligonukleotide fielen aufgrund des ausgeprägten TICT-Charakters deutlich niedriger aus und auch die mit **NDI**-modifizierten Oligonukleotide zeigten eine stark gelöschte Fluoreszenz. Die Charakterisierung der Interstrangdimer-Duplexe für die mit **DMANI**- oder **ANI**-modifizierten Systeme deutete auf eine ausgeprägte Bildung von H-Aggregaten hin, wobei die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Chromophoren abhängig von der Länge des Linkers waren. Im Gegensatz dazu zeigten die mit **NDI**-modifizierten Interstrangdimer-Duplexe einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität bis auf das annähernd Dreifache. Die Intrastrangdimer-Duplexe, die als potenzielle m^{6}a-Sonden untersucht wurden, zeigen, dass sowohl die Fluoreszenzintensitäten als auch die Lebensdauern stark von der Kombination aus Chromophor und Linker abhängen. Eine erhöhte Chromophorwechselwirkung führt bei den mit **DMANI**-, **ANI**- oder **PANI**-modifizierten Systemen meist zu einer Fluoreszenzlöschung. Daher erwies sich die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern als deutlich aussagekräftigeres Kriterium zur Detektion der Methylierung als die Fluoreszenzintensität. Die mit **NDI**-modifizierten Intrastrangdimer-Duplexe zeigten hingegen bei stärkeren Chromophorwechselwirkungen einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dieser trat allerdings erst bei einer direkten Basenfehlpaarung auf, die verringerten Wechselwirkungen durch die Methylierung waren nicht ausreichend (Abbildung 84).

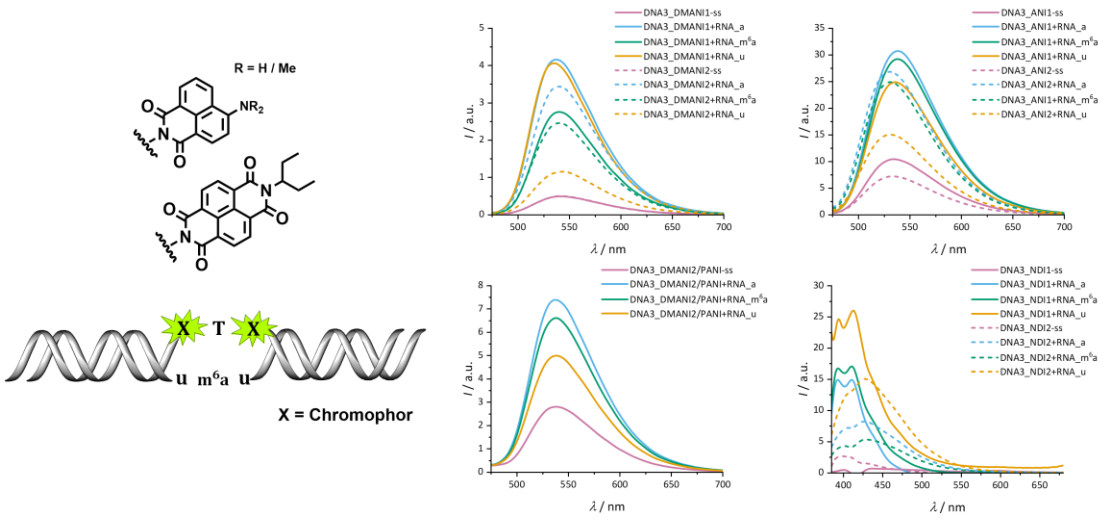


Abbildung 84: Die Dichromophorsysteme führten zu unterschiedlichen spektroskopischen Ergebnissen, die stark von der Chromophor-Linker-Kombination abhängig sind.

6 Experimentalteil

6.1 Materialien, Methoden und Geräte

Reagenzien

Die für die Synthesen eingesetzten Reagenzien wurden von den Firmen ABCR, ALFA AESAR, BIOSYNTH CARBOSYNTH, BLD PHARM, CARBOLUTION, CARL ROTH, MERCK (SIGMA-ALDRICH), TCI, VWR (AVANTOR) bezogen. Die verwendeten Chemikalien wurden bedarfsgerecht gelagert und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Lösungsmittel

Die für die Synthesen verwendeten Lösungsmittel entsprachen mindestens der Reinheitsstufe „p.a." (*pro analysi*). Trockene Lösungsmittel wurden von der Firma FISCHER SCIENTIFIC mit *AcroSeal*® Verschluss bezogen, unter Argonatmosphäre und teilweise über Molekularsieb gelagert. Für die Aufreinigung an der RP-HPLC und für die Analytik wurden „ultrarein" (*HPLC grade*) organische Lösungsmittel der Firma FISCHER SCIENTIFIC verwendet sowie Wasser aus einer MERCK *Milli-Q Direct 8* Entsalzungsanlage verwendet.

Reaktionsführung

Reaktionen, welche sauerstoff- und wasserempfindlich sind, wurden unter Schutzgasatmosphäre mit Argon (*Alphagaz™ 1 Argon*, ≥ 99.999 % Reinheit) der Firma AIR LIQUIDE durchgeführt. Dabei wurden die verwendeten Glasgeräte mittels der Schlenk-Technik mehrfach evakuiert und mit Argon gespült. Zur wasserfreien Reaktionsführung wurden die Glasgeräte davor im Feinvakuum mit einem Heißluftföhn ausgeheizt. Chemikalien wurden im Argongegenstrom zugegeben; Flüssigkeiten dabei über Kunststoffspritzen, Metallkanülen, Mikrolitерspritzen oder Kolbenhubpipetten. Reaktionen, die bei tiefen Temperaturen durchgeführt wurden, wurden folgendermaßen gekühlt:

0 °C	Eis / Wasser
-10 bis -20 °C	NaCl / Eis

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die DC wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten (60 F_{254} Kieselgel, Schichtdicke 0.25 mm) der Firma MERCK benutzt. Die Detektion aromatischer Verbindungen wurde mittels UV-Lampe bei Wellenlängen von $\lambda = 254$ nm und $\lambda = 366$ nm durchgeführt. Zudem wurden oxidierbare Verbindungen durch verschiedene Anfärbereagenzien als Tauchlösungen sichtbar gemacht. Dabei wurden die DC-Platten in die jeweilige Lösung getaucht und durch Erwärmen mittels Heißluftföhn entwickelt. Verwendet wurden dabei folgende Tauchlösungen:

Kaliumpermanganat-Lösung:	450 mg $KMnO_4$, 630 mg K_2CO_3, 45.0 mL H_2O, 750 mL 5 % NaOH-Lösung
Seebach-Lösung:	6.25 g Ammoniummolybdat, 2.05 g Cer(IV)sulfat, 8.2 mL konz. H_2SO_4, 226 mL Wasser

Säulenchromatographie

Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erfolgte mit Kieselgel (Porengröße 60 Å, Korngröße 40-63 µM) der Firma VWR (AVANTOR)als stationäre Phase. Diese wurde im jeweils unpolareren Lösungsmittel(-gemisch) gepackt und zum Verdichten eluiert. Das zu reinigende Rohprodukt wurde entweder im Laufmittel (*wet load*) oder adsorbiert an Kieselgel bzw. Kieselgur (*dry load*) auf die Säule aufgetragen und mit Seesand (reinst, mit HCl gereinigt) der Firma BERND KRAFT überschichtet. Es wurde unter Überdruck, welcher mit einer Handpumpe erzeugt wurde, eluiert.

Automatisierte Flash-Chromatographie

Die automatisierte Flash-Chromatographie wurde auf einem *Isolera One System,* ausgestattet mit einem UV/VIS-Detektor, der Firma BIOTAGE durchgeführt. Für die *normal-phase* Aufreinigung wurden BIOTAGE *Sfär Silica HC D* Säulen in den Größen 5 g, 10 g und 25 g sowie BIOTAGE *Sfär Silica D* Säulen in Größe 5 g verwendet. Für die *reverse-phase* Aufreinigung wurde eine BIOTAGE *Snap Cartridge KP-C18-HS* in der Größe 60 g verwendet. Es wurden jeweils die vom Hersteller angegebenen säulenspezifischen Flussraten eingesetzt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Als HPLC-System wurde ein *Dionex UltiMate3000* der Firma THERMO SCIENTIFIC verwendet. Das System setzt sich aus einem Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, Fluoreszenzdetektor und Fraktionssammler zusammen. Für die Auswertung wurde die Software *Chromeleon 7* verwendet. Die Aufreinigung erfolgte semipräparativ mittels einer VDSpher *OptiBio Pur 300 C18-SE* Säule (250 x 10 mm, 5 µm) der Firma VDS OPTILAB CHROMATOGRAPHIETECHNIK mit einer Flussgeschwindigkeit von 2.5 mL/min. Für analytische Läufe wurde eine VDSpher *OptiBio Pur 300 C18-SE* Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm) ebenfalls von der Firma VDS OPTILAB CHROMATOGRAPHIETECHNIK verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug hier 1.0 mL/min.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die NMR-Spektren wurden an einem BRUKER *Avance 400* Spektrometer (Messfrequenzen: ^{1}H = 400 MHz, ^{13}C = 101 MHz, ^{31}P = 162 MHz) oder an einem BRUKER *Avance DRX 500* Spektrometer (Messfrequenzen: ^{1}H = 500 MHz, ^{13}C = 126 MHz) aufgenommen. Dazu wurden 1-10 mg der zu untersuchenden Substanz in 0.4 mL des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels der Firmen EURISOTOP oder DEUTERO gelöst. Die chemische Verschiebung δ wurde auf Tetramethylsilan referenziert und in ppm angegeben. Zur Korrektur der chemischen Verschiebung δ der Spektren wurden folgende Signale der nicht vollständig deuterierten Lösungsmittel als interne Referenz verwendet:

$CDCl_3$	^{1}H-NMR:	δ = 7.26 ppm	^{13}C-NMR:	δ = 77.16 ppm
DMSO-d_6	^{1}H-NMR:	δ = 2.50 ppm	^{13}C-NMR:	δ = 39.52 ppm
CD_3CN	^{1}H-NMR:	δ = 1.94 ppm	^{13}C-NMR:	δ = 1.32 ppm δ = 118.26 ppm

Die Kopplungskonstanten *J* wurden in Hz angegeben und die Multiplizitäten wurden folgendermaßen beschrieben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Pentett), m (Multiplett). Durch Kombinationen verschiedener Multiplizitäten ergeben sich weitere Aufspaltungsmuster wie beispielsweise dt (Dublett von Tripletts) oder ddd (Dublett von Dubletts von Dubletts).

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie wurde von der Analytikabteilung des Instituts für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt.

ESI-MS

Die Analyse hochauflösender Massenspektren wurde unter Verwendung einer Elektronensprayionisationsquelle (ESI) auf einem *Q Exactive Plus Orbitrap* von der Firma THERMO SCIENTIFIC durchgeführt. In Abhängigkeit der Probe wurde wahlweise mit positiver oder negativer Spannung gemessen. Das Molekülion wurde als $[M^+]$ bzw. $[M^-]$ oder in protonierter Form als $[MH^+]$ bzw. in deprotonierter Form als $[MH^-]$ dargestellt.

MALDI-TOF-MS

Die Matrix-Assistierte-Laser-Desorptions-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) wurde auf einem *AXIMA Confidence* Spektrometer der Firma SHIMADZU gemessen. Dabei wurden folgende Matrizen verwendet:

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

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

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

Optische Spektroskopie

Optische Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Quarzglasküvetten der Firma STARNA mit einer Schichtdicke von 1.00 cm bei 20 °C durchgeführt.

UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

UV/VIS-Absorptionsspektren wurden auf an einem *Cary3500 Multicell UV/VIS*-Spektrometer mit Peltier-Element der Firma AGILENT mithilfe der Steuersoftware *Cary WinUV Scan Application* aufgenommen.

Schmelztemperaturen

Die Bestimmung der Schmelztemperaturen erfolgte am selben Gerät wie die UV/Vis-Absorptionsspektroskopie, über die Absorptionsänderung des Oligonukleotids bei λ = 260 nm. Die Messungen erfolgten über einen Temperaturbereich von 10-90 °C bei einer Heiz- bzw. Kühlrate von 1.0 °C/min und einer Aufzeichnung der Messdaten alle 0.5 °C. Am Start- und am Endpunkt der Messung wurde die Temperatur jeweils für 10 min konstant gehalten.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *FluoroMax Plus* Spektrometer der Firma HORIBA JOBIN YVON aufgenommen. Das Spektrometer wurde anhand der Raman-Streuung von Wasser kalibriert. Die Fluoreszenzspektren wurden durch Subtraktion des jeweiligen Lösungsmittelspektrums korrigiert.

Fluoreszenzlebensdauern

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden über zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (TCSPC) an einem *FluoroMax 4* Spektrometer der Firma HORIBA JOBIN YVON ermittelt. Gemessen wurde bei einer Pulswiederholrate von 1 MHz mit einer gepulsten NanoLED™-455 von HORIBA SCIENTIFIC (Pulsdauer = 1.2 ns), welche über einen *NL-C2 Pulsed Diode Controller* gesteuert wurde. Als Synchronisationseinheit wurde ein *DH-HAT DeltaHub*™ von HORIBA SCIENTIFIC verwendet. Es wurde über eine Messdauer von 200 ns bei einer Detektorspannung von 1100 V gemessen. Für die Prompt-Messung wurde 0.01 % *Ludox® A30 kolloidales Siliciumdioxid* (SIGMA ALDRICH) in Wasser verwendet. Die Auswertung erfolgte über die Software *DataStation v2.7*.

Fluoreszenzquantenausbeute

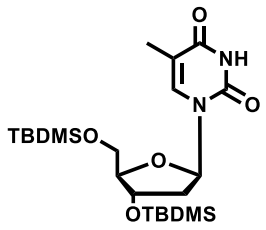
Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden an einem *Quantaurus QY C11347* der Firma HAMAMATSU bei einem Probenvolumen von 2.0 mL gemessen.

Rotations-Vakuum-Konzentrator

Zur Trocknung der Oligonukleotidproben wurde ein *RVC 2-25 CDplus* Midi-Konzentrator, verbunden mit einem *Alpha 2-4 LSCbasic* Eiskondensator der Firma CHRIST verwendet.

6.2 Synthesevorschriften

3',5'-Di-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxythymidin **1**



1

$C_{22}H_{42}N_2O_5Si_2$

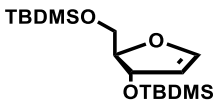
470.76 g/mol

In einem Schlenkkolben wurden unter Argon 3.00 g Thymidin (12.4 mmol, 1.00 Äq.) und 3.54 g Imidazol (52.0 mmol, 4.2 Äq.) in 25 mL trockenem DMF vorgelegt. Das Gemisch wurde 15 min bis zur vollständigen Lösung gerührt. Anschließend wurden 3.92 g TBDMSCl (26.0 mmol, 2.10 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter starkem Rühren in einem Becherglas mit 60 mL Wasser und 60 mL n-Hexan versetzt. Die Phasen wurden zügig voneinander getrennt, bevor das Produkt in großen Mengen auskristallisieren konnte. Die wässrige Phase wurde 2x mit n-Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 5.45 g der Verbindung **1** (11.6 mmol, 93 %) als farbloser Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.03 (s, 1H, NH), 7.47 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-6), 6.33 (dd, *J* = 8.0, 5.8 Hz, 1H, H-1'), 4.40 (dt, *J* = 5.5, 2.5 Hz, 1H, H-3'), 3.94 (q, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-4'), 3.87 (dd, *J* = 11.4, 2.6 Hz, 1H, H-5'), 3.76 (dd, *J* = 11.4, 2.5 Hz, 1H, H-5'), 2.24 (ddd, *J* = 13.1, 5.8, 2.6 Hz, 1H, H-2'), 2.00 (ddd, *J* = 13.5, 8.0, 6.0 Hz, 1H, H-2'), 1.92 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, 5-Me-H), 0.91 (d, *J* = 14.0 Hz, 18H, ^{t}Bu-H), 0.10 (dd, *J* = 14.0, 2.0 Hz, 12H, Si-Me-H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[179]

3',5'-Di-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-Desoxyriboglykal **2**



2
$C_{17}H_{36}O_3Si_2$
344.64 g/mol

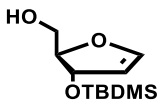
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argon 25.0 g **1** (53.1 mmol, 1.00 Äq.) und 239 mg $[Ph_2PS]_2NH$ (0.53 mmol, 0.01 Äq.) vorgelegt und in einer Mischung aus 60 mL trockenem Heptan und 40 mL trockenem Toluol suspendiert. Zu der Suspension wurden 3.08 mL Lutidin (26.5 mmol, 0.50 Äq.) sowie 32.5 mL Bis(trimethylsilyl)acetamide (133 mmol, 2.50 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 30 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde mit 500 mL DCM verdünnt und 5x mit Wasser und 1x mit Brine gewaschen, bis kein Feststoff mehr zwischen den Phasen entstanden ist. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel mit DCM als Eluent aufgereinigt. Es wurden 17.0 g (49.4 mmol, 93 %) einer schwach gelben, zähen Flüssigkeit als Verbindung **2** erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 6.47 (dd, *J* = 2.7, 1.0 Hz, 1H, H-1'), 5.01 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-3'), 4.86 (td, *J* = 2.7, 1.0 Hz, 1H, H-2'), 4.29 (td, *J* = 6.0, 2.8 Hz, 1H, H-4'), 3.69 (dd, *J* = 10.7, 5.7 Hz, 1H, H-5'), 3.51 (dd, *J* = 10.7, 6.4 Hz, 1H, H-5'), 0.89 (d, *J* = 2.7 Hz, 18H, ^{t}Bu-H), 0.12 – 0.03 (m, 12H, Si-Me-H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[180]

Das eingesetzte $[Ph_2PS]_2NH$ wurde nach der Vorschrift von LIANG *et al.* synthetisiert.[181]

3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-Desoxyriboglykal **3**



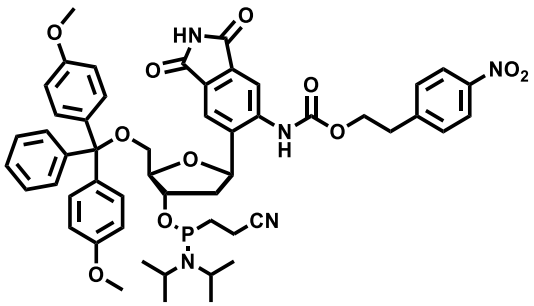
3
$C_{11}H_{22}O_3Si$
230.38 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurden 2.78 g **2** (8.05 mmol, 1.00 Äq.) in 35 mL trockenem THF gelöst und auf -17 °C gekühlt (Eis/NaCl-Bad). Es wurden langsam 7.5 mL einer 1M TBAF in THF-Lösung (7.25 mmol, 0.90 Äq.) hinzugetropft. Die Reaktion wurde für 1 h gerührt, dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur immer unter -15 °C blieb. Anschließend wurde das Gemisch zum Stoppen der Reaktion auf eine Kieselgel-Filtersäule gegeben und mit EE eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cyclohexan/EE 2:1) aufgereinigt. Es wurden 1.75 g (6.81 mmol, 85 %) eines farblosen Öls als Verbindung **3** erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 6.50 (dd, *J* = 2.7, 1.1 Hz, 1H, H-1'), 5.06 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-2'), 4.81 (td, *J* = 3.0, 2.5, 1.1 Hz, 1H, H-3'), 4.35 (dt, *J* = 7.0, 3.6 Hz, 1H, H-4'), 3.71 (ddd, *J* = 11.1, 7.0, 3.8 Hz, 1H, H-5'), 3.60 (ddd, *J* = 12.1, 6.8, 5.8 Hz, 1H, H-5'), 1.73 (dd, *J* = 7.0, 5.8 Hz, 1H, H-OH), 0.89 (s, 9H, ^{t}Bu-H), 0.09 (s, 6H, Si-Me-H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[179]

1‘-(4-*N*-(4-Nitrophenethoxycarbonyl)aminophthalimid-5-yl)-3‘-O-[(2-cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphanyl]-5‘-O-(dimethoxytrityl)-1‘,2‘-didesoxy-β-D-ribofuranose **12**



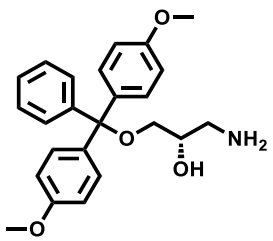
12
$C_{52}H_{56}N_5O_{12}P$
974.02 g/mol

Verbindung **12** wurde nach literaturbekannter Vorschrift ausgehend von **4API** und **3** synthetisiert.

^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 147.22, 146.83.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[51]

(S)-1-Amino-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)propan-2-ol **13**



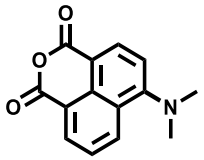
13
$C_{24}H_{27}NO_4$
393.48 g/mol

Der Linker **13** wurde nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.43 – 7.37 (m, 2H, DMTr), 7.34 – 7.16 (m, 7H, DMTr), 6.92 – 6.86 (m, 4H, DMTr), 4.71 (s, 1H, OH), 3.73 (s, 6H, OMe), 3.54 (dt, *J* = 10.1, 5.1 Hz, 1H, CH), 2.94 (dd, *J* = 9.0, 5.4 Hz, 1H, OCH_2), 2.83 (dd, *J* = 9.1, 6.1 Hz, 1H, OCH_2), 2.68 (dd, *J* = 12.8, 4.1 Hz, 1H, NCH_2), 2.47 – 2.43 (m, 1H, NCH_2).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[196]

6-(Dimethylamino)-1*H*,3*H*-benzo[de]isochromen-1,3-dion **14**



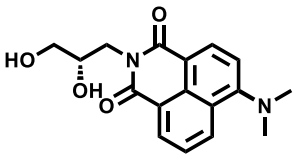
14
$C_{14}H_{11}NO_3$
241.25 g/mol

1.50 g 4-Brom-1,8-naphthalinsäureanhydrid (5.41 mmol, 1.00 Äq.) und 67.6 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (271 µmol, 0.05 Äq.) wurden in einem *Headspace-Crimp-Vial* in 9 mL trockenem DMF suspendiert. Zu dem Gemisch wurden 3.00 mL einer 40 %-Lösung aus Dimethylamin in THF gegeben und das *Vial* wurde verschlossen. Die Reaktion wurde für 3 h auf 150 °C erhitzt und nachdem sie abgekühlt war, in 30 mL Wasser gegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert und im Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt in DCM aufgenommen und unlösliche Rückstände wurden durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde über eine Kieselgel-Filtersäule mit DCM eluiert, um braune Rückstände zu entfernen. Es wurden 1.23 g **14** (5.01 mmol, 93 %) als oranger Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.57 (dd, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H, H-arom.), 8.52 – 8.40 (m, 2H, H-arom.), 7.68 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H, H-arom.), 7.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-arom.), 3.18 (s, 6H, H-NMe_2).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. [192]

(S)-2-(2,3-Dihydroxypropyl)-6-(dimethylamino)-1*H*-benzo[de]isoquinolin-1,3(2*H*)-dion **DMANI1**



DMANI1
$C_{17}H_{18}N_2O_4$
314.34 g/mol

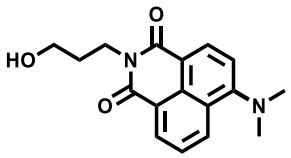
500 mg **14** (2.07 mmol, 1.00 Äq.) und 189 mg S-3-Amiopropan-1,2-diol (2.07 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 30 mL trockenem Ethanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 397 mg **DMANI1** (1.26 mmol, 61 %) als orangener, kristalliner Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.59 (dd, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 1H, arom.), 8.52 – 8.41 (m, 2H, arom.), 7.67 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H, arom.), 7.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, arom.), 4.50 – 4.33 (m, 2H, NCH_2), 4.09 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H, CH), 3.60 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, OCH_2), 3.35 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, sek. OH), 3.15 (s, 6H, NMe_2), 3.10 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, prim. OH).

^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 166.21, 165.65, 157.77, 133.69, 132.18, 131.92, 130.64, 125.11, 125.02, 122.50, 113.83, 113.34, 71.04, 63.59, 44.90, 42.66.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 314.1261 [M^+]; m/z (gefunden) = 315.1338 [MH^+].

6-(Dimethylamino)-2-(3-hydroxypropyl)-1*H*-benzo[de]isoquinolin-1,3(2*H*)-dion **15**



15
$C_{17}H_{18}N_2O_3$
298.34 g/mol

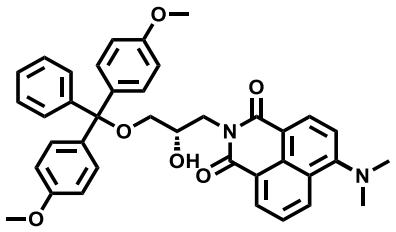
1.03 mg **14** (4.27 mmol, 1.00 Äq.) und 324 µL 3-Amiopropan-1-ol (4.27 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 40 mL trockenem Ethanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und der entstandene Niederschlag wurde filtriert und mit EtOH gewaschen. Es wurden 830 mg **15** (2.79 mmol, 65 %) als gelber, kristalliner Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 8.54 – 8.46 (m, 2H, arom.), 8.39 (dd, *J* = 8.3, 0.8 Hz, 1H, arom.), 7.69 (ddd, *J* = 8.3, 7.4, 0.8 Hz, 1H, arom.), 7.17 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, arom.), 4.17 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, NCH_2), 3.53 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H OCH_2), 3.09 (d, *J* = 0.7 Hz, 6H, NH_2), 2.98 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, OH), 1.85 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H, CCH_2).

^{13}C-NMR (101 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 165.59, 165.02, 158.08, 133.23, 132.43, 131.51, 131.08, 125.93, 125.85, 123.95, 115.25, 114.10, 59.99, 45.03, 37.81, 31.96.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 298.1312 [M^+]; m/z (gefunden) = 298.1310 [M^+].

(S)-2-(3-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-6-(dimethylamino)-1*H*-benzo[de]isoquinolin-1,3(2*H*)-dion **16**



16
$C_{38}H_{36}N_2O_6$
616.71 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 620 mg **DMANI1** (1.97 mmol, 1.00 Äq.) in 23 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurden 735 mg DMTrCl (2.17 mmol, 1.10 Äq.) portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 2 mL MeOH die Reaktion gestoppt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, dabei wurde 2x mit Toluol coevaporiert, um restliches Pyridin zu entfernen. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und 2x mit einer gesättigten $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde 1x mit DCM extrahiert, anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cyclohexan/EE 2:1 +0.1 % NEt_3) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 703 mg **16** (1.14 mmol, 58 %) als gelber Schaum erhalten.

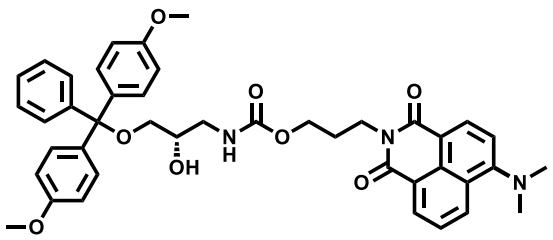
R_f (Cyclohexan/EE 2:1 +0.1 % NEt_3) = 0.28

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.49 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H, arom.), 8.42 (dd, J = 7.2, 1.1 Hz, 1H, arom.), 8.31 (d, J = 8.3 Hz, 1H, arom.), 7.74 (dd, J = 8.5, 7.3 Hz, 1H, arom.), 7.31 – 7.24 (m, 2H, DMTr), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom.), 7.18 – 7.05 (m, 7H, DMTr), 6.78 – 6.65 (m, 4H, DMTr), 5.06 (d, J = 4.7 Hz, 1H, OH), 4.18 – 4.06 (m, 3H, NCH_2, CH), 3.68 (s, 3H, NMe_2), 3.66 (s, 3H, NMe_2), 3.08 (s, 6H, OMe), 3.05 (d, J = 4.2 Hz, 1H, OCH_2), 2.89 (dd, J = 9.3, 4.9 Hz, 1H, OCH_2).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 163.85, 163.21, 157.87, 157.80, 156.43, 144.88, 135.77, 135.53, 132.15, 131.26, 130.44, 129.72, 129.58, 129.46, 128.31, 127.54, 126.37, 124.96, 124.34, 122.57, 113.76, 113.00, 112.92, 112.84, 85.32, 66.93, 66.69, 54.93, 54.90, 44.37, 43.35.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 616.2568 [M^+]; m/z (gefunden) = 616.2562 [M^+].

3-(6-(Dimethylamino)-1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)propyl-(S)-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)carbamat **17**



17
$C_{42}H_{43}N_3O_8$
717.82 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 261 mg **15** (875 mmol, 1.00 Äq.) zusammen mit 170 mg 1,1‘-Carbonyldiimidazol (1.05 mmol, 1.20 Äq.) in 14 mL trockenem DMF gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurden 413 mg **13** (1.05 mmol, 1.20 Äq.) zu der Reaktion gegeben und es wurde für weitere 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/EE 9:1 nach EE) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 257 mg **17** (358 µmol, 41 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (Cyclohexan/EE 1:2) = 0.51

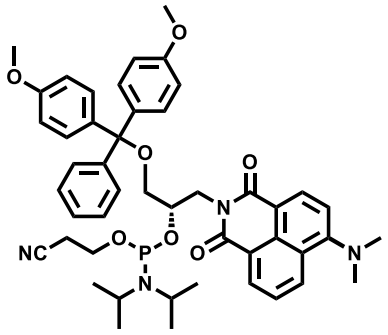
^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 8.44 – 8.38 (m, 2H, arom.), 8.35 – 8.24 (m, 1H, arom.), 7.61 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, arom.), 7.43 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 2H, DMTr), 7.33 – 7.15 (m, 7H, DMTr), 7.14 – 7.04 (m, 1H, arom.), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, DMTr), 5.45 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH), 4.12 (q, *J* = 7.2 Hz, 2Hz, $COOCH_2$), 4.04 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH_2), 3.74 (d, *J* = 11.6 Hz, 7H, OMe, CH), 3.40 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, OH), 3.19 (ddd, *J* = 13.9, 6.4, 4.6 Hz, 1H, $NHCH_2$), 3.05 (d, *J* = 7.3 Hz, 6H, $NHCH_2$, NMe_2), 3.03 – 2.95 (m, 2H, OCH_2), 1.97 – 1.89 (m, 2H, CH_2C).

^{13}C-NMR (101 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 165.23, 164.60, 159.58, 157.94, 146.25, 137.11, 133.13, 132.30, 131.42, 130.98, 130.02, 129.30, 129.03, 128.75, 127.72,

125.90, 125.80, 123.92, 115.31, 114.09, 114.06, 113.97, 113.92, 113.86, 86.80, 70.65, 66.50, 63.69, 60.05, 55.90, 55.86, 45.06, 45.03, 37.95, 37.85, 32.00, 28.59.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 717.3045 [M^+]; m/z (gefunden) = 717.3037 [M^+].

(S)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-3-(6-(dimethylamino)-1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propan-2-yl-(2-cyanoethyl)-diisopropyl-phosphoramidit **18**



18
$C_{48}H_{57}N_4O_7P$
832.98 g/mol

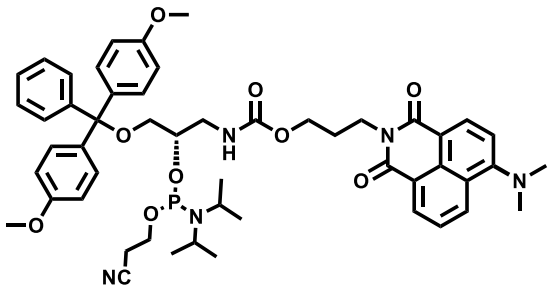
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 92 mg **16** in 9 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 78.0 µL DIPEA (448 µmol, 3.00 Äq.) und 74.8 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (314 µmol, 1.50 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, 2x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. **18** wurde quantitativ (124 µmol, 100 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (DCM/Aceton 9:1) = 0.87

^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 149.13.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 832.3959 [M^-]; m/z (gefunden) = 831.4222 [MH^-].

3-(6-(Dimethylamino)-1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propyl-((2*S*)-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propyl)carbamat **19**



19
$C_{52}H_{64}N_5O_9P$
934.08 g/mol

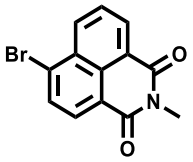
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 144 mg **17** (201 µmol, 1.00 Äq.) in 12 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 105 µL DIPEA (602 µmol, 3.00 Äq.) und 67.0 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (281 µmol, 1.40 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, 2x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Verbindung **19** wurde quantitativ (201 µmol, 100 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (DCM/Aceton 9:1) = 0.80

^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 149.63, 149.30.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 933.4436 [M^+]; m/z (gefunden) = 933.4274 [M^+].

6-Bromo-2-methyl-1-benzo[de]isoquinolin-1,3(2*H*)-dion **20**



20
$C_{13}H_8BrNO_2$
290.12 g/mol

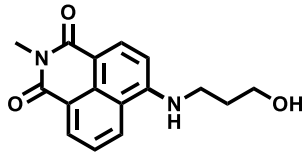
2.00 g 4-Brom-1,8-Naphthalinsäureanhydrid (7.22 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 60 mL EtOH suspendiert und es wurden 1.22 g Methylaminhydrochlorid (18.05 mmol, 2.5 Äq.) sowie 6 mL 33 % Methylamin in EtOH zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nachdem die Reaktion abgekühlt war, wurde der ausgefallene Niederschlag filtriert, mit Ethanol gewaschen und getrocknet. 1.68 g **20** (5.80 mmol, 80 %) wurden als hellgelber Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.45 (ddt, J = 11.1, 8.5, 1.3 Hz, 2H, arom.), 8.21 (dd, J = 7.8, 2.2 Hz, 1H, arom.), 8.12 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H, arom.), 7.92 (ddd, J = 8.9, 7.2, 1.6 Hz, 1H, arom.), 3.35 (s, 3H, CH_3).

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 163.03, 162.98, 132.46, 131.36, 131.25, 130.73, 129.66, 129.01, 128.69, 128.03, 122.64, 121.87, 26.72.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 288.9733 [M^-]; m/z (gefunden) = 288.9738 [M^-].

6-((3-Hydroxypropyl)amino)-2-methyl-1*H*-benzo[de]isoquinolin-1,3(2*H*)-dion **21**



21
$C_{16}H_{16}N_2O_3$
284.31 g/mol

In einem *Headspace-Crimp-Vial* wurden 750 mg **20** (2.59 mmol, 1.00 Äq.) und 32.27 mg $CuSO_4*5H_2O$ in 7.7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 859 µL 3-Amiopropan-1-ol (850 mg, 11.32 mmol, 1.00 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei 155°C gerührt und anschließend auf Eiswasser gegeben. Der ausgefallene Niederschlag wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (DCM/MeOH 24:1 nach 9:1) aufgereinigt. Es wurden 299 mg **21** (1.05 mmol, 41 %) als gelber Feststoff erhalten.

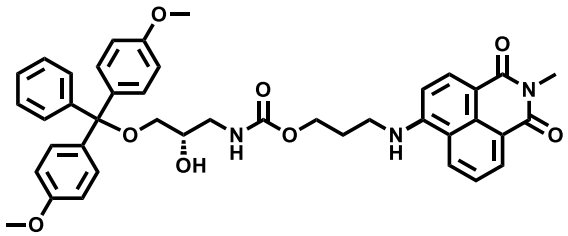
R_f (DCM/MeOH 50:1) = 0.33

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.68 (dd, J = 8.4, 1.1 Hz, 1H, arom.), 8.43 (dd, J = 7.3, 1.1 Hz, 1H, arom), 8.26 (d, J = 8.5 Hz, 1H, arom.), 7.78 (d, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.67 (dd, J = 8.4, 7.3 Hz, 1H, arom.), 6.78 (d, J = 8.7 Hz, 1H, arom.), 4.64 (t, J = 5.0 Hz, 1H, OH), 3.57 (q, J = 5.5 Hz, 2H, OCH_2), 3.49 – 3.41 (m, 2H, $NHCH_2$), 3.34 (s, 3H, NMe), 1.86 (dq, J = 7.6, 6.2 Hz, 2H, CCH_2).

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 164.06, 163.21, 150.73, 134.23, 130.56, 129.33, 128.54, 124.23, 121.84, 120.14, 107.53, 103.71, 58.54, 39.69, 31.10, 26.38.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 284.1155 [M^+]; m/z (gefunden) = 284.1155 [M^+].

3-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)propyl (S)-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)carbamat **22**



22
$C_{41}H_{41}N_3O_8$
703.79 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 340 mg **21** (1.20 mmol, 1.00 Äq.) zusammen mit 308 mg 1,1‘-Carbonyldiimidazol (1.90 mmol, 1.59 Äq.) in 30 mL trockenem DMF gelöst bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurden 747 mg **13** (1.90 mmol, 1.59 Äq.) zu der Reaktion gegeben und es wurde für weitere 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cyclohexan/EE 1:1 nach EE +0.1 % NEt_3) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 232 mg **17** (329 µmol, 28 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (EE/Cyclohexan 2:1) = 0.31

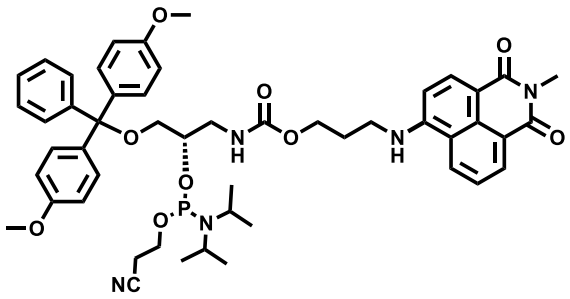
^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 8.41 (dd, J = 7.3, 1.1 Hz, 1H, arom.), 8.28 – 8.23 (m, 2H, arom.), 7.57 (dd, J = 8.4, 7.3 Hz, 1H, arom.), 7.46 – 7.40 (m, 2H, DMTr), 7.36 – 7.21 (m, 6H, DMTr), 7.19 (t, J = 7.3 Hz, 1H, DMTr), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 4H, DMTr), 6.68 (d, J = 8.5 Hz, 1H, arom.), 6.34 – 6.28 (m, 1H, NH), 5.60 (t, J = 6.0 Hz, 1H, COONH), 4.15 (t, J = 6.1 Hz, 2H, $COOCH_2$), 3.76 (d, J = 2.0 Hz, 1H, CH), 3.73 (s, 6H, OMe), 3.44 (q, J = 6.4 Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.37 (s, 3H, NMe), 3.34 – 3.21 (m, 2H, OH, $COONHCH_2$), 3.16 – 3.07 (m, 1H, $COONHCH_2$), 3.04 – 2.96 (m, 2H, OCH_2), 2.01 (p, J = 6.5 Hz, 2H, CCH_2).

^{13}C-NMR (126 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 165.53, 164.82, 159.60, 158.03, 151.05, 146.22, 137.08, 134.83, 131.40, 130.98, 130.55, 129.01, 128.76, 128.11, 127.74,

125.43, 123.68, 121.34, 113.96, 110.27, 104.75, 86.82, 70.62, 66.46, 63.21, 55.86, 44.99, 40.91, 28.87, 26.91.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 703.2888 [M^+]; m/z (gefunden) = 703.2887 [M^+].

3-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)propyl ((2S)-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propyl)carbamat **23**



23
$C_{51}H_{62}N_5O_9P$
920.06 g/mol

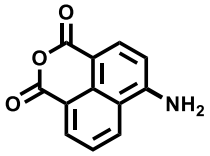
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 70 mg **22** (99.5 µmol, 1.00 Äq.) in 10 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 52.0 µL DIPEA (238.5 mg, 98 µmol, 3.26 Äq.) sowie 31.0 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-chlorophosphoramidit (33 mg, 139 µmol, 1.79 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, 2x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. **23** wurde quantitativ (99.5 µmol, 100 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (DCM/Aceton 9:1) = 0.73

^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 149.37, 149.24.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 919.4280 [M^+]; m/z (gefunden) = 920.5022 [MH^+].

6-Amino-1*H*,3*H*-benzo[de]isochromene-1,3-dion **24**



24
$C_{12}H_7NO_3$
213.19 g/mol

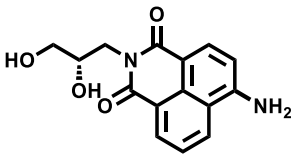
In einem Rundkolben wurden 2.00 g 4-Brom-1,8-naphthalinsäureanhydrid (7.22 mmol, 1.00 Äq.) in 7.70 mL DMF suspendiert und für 30 min gerührt, bis die Suspension flüssig wurde. In einem EPPENDORF-Mikroreaktionsgefäß wurden 703 mg Natriumazid (10.8 mmol, 1.50 Äq.) mit 150 mL Wasser versetzt und anschließend zur Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktion wurde für 45 min bei 100 °C gerührt. Die erhaltene klare Lösung wurde auf Eis gegeben, der entstandene grüne Feststoff wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. Das erhaltene Azid wurde ohne weitere Aufreinigung erneut in 20 mL DMF gelöst und mit einer Lösung von 1.62 g Natriumhydrogensulfid (28.9 mmol, 4.00 Äq.) in 2.00 mL Wasser versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei 100 °C gerührt, anschließend auf Eis gegeben und mit 1M HCl auf pH 3-4 angesäuert. Der erhaltene Feststoff wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. Es wurden 1.16 g **24** (5.49 mmol, 76 %) als senffarbener Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.69 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H, arom.), 8.43 (dd, J = 7.3, 1.1 Hz, 1H, arom.), 8.19 (d, J = 8.5 Hz, 1H, arom.), 7.78 (s, 2H, NH_2), 7.69 (dd, J = 8.4, 7.3 Hz, 1H, arom.), 6.88 (d, J = 8.5 Hz, 1H, arom.).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. [198]

(S)-6-Amino-2-(2,3-dihydroxypropyl)-1*H*-benzo[de]isoquinolin-1,3(2H)-dion

ANI1



ANI1
$C_{15}H_{14}N_2O_4$
286.29 g/mol

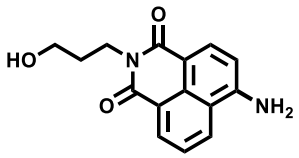
993 mg **24** (4.66 mmol, 1.00 Äq.) und 624 mg S-3-Amiopropan-1,2-diol (6.86 mmol, 1.47 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 90 mL trockenem Ethanol suspendiert und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde heiß filtriert, um ungelöste Rückstände zu entfernen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeengt und der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 483 mg **ANI1** (1.69 mmol, 36 %) als orangener, kristalliner Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.61 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom.), 8.42 (d, J = 7.2 Hz, 1H, arom.), 8.19 (d, J = 8.3 Hz, 1H, arom.), 7.65 (t, J = 7.8 Hz, 1H, arom.), 7.41 (s, 2H, NH_2), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom.), 4.68 (d, J = 5.5 Hz, 1H, sek. OH), 4.51 (t, J = 5.7 Hz, 1H, prim. OH), 4.15 (dd, J = 12.8, 7.7 Hz, 1H, NCH_2), 3.97 (dd, J = 12.8, 5.6 Hz, 1H, NCH_2), 3.87 (dt, J = 7.6, 5.2 Hz, 1H, CH), 3.36 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH_2).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 164.17, 163.34, 152.60, 133.93, 130.98, 129.76, 129.18, 123.97, 121.99, 119.36, 108.12, 107.77, 68.95, 64.60, 42.64, 40.43.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 286.0948 [M^+]; m/z (gefunden) = 287.1025 [MH^+].

6-Amino-2-(3-hydroxypropyl)-1*H*-benzo[de]isoquinolin-1,3(2*H*)-dion **25**



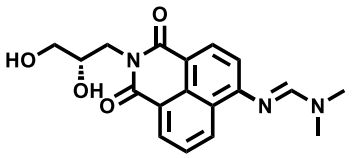
25
$C_{15}H_{14}N_2O_3$
270.29 g/mol

1.16 g **24** (5.46 mmol, 1.00 Äq.) und 621 µL 3-Amiopropan-1-ol (8.19 mmol, 1.50 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 55 mL trockenem Ethanol gelöst und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde heiß filtriert, um ungelöste Rückstände zu entfernen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeengt und der Rückstand wurde 2x aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 488 mg **25** (1.81 mmol, 33 %) als senfgelber, kristalliner Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.61 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, arom.), 8.42 (dd, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H, arom.), 8.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, arom.), 7.65 (dd, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H, arom.), 7.43 (s, 2H, NH_2), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, arom.), 4.46 (s, 1H, OH), 4.09 – 4.03 (m, 2H, NCH_2), 3.47 (dq, *J* = 6.0, 3.6, 3.1 Hz, 2H, OCH_2), 1.81 – 1.71 (m, 2H, CH_2).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. [198]

(S,E)-*N*'-(2-(2,3-Dihydroxypropyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[de]isoquinolin-6-yl)-*N*,*N*-dimethylformimidamid **26**



26
$C_{18}H_{19}N_3O_4$
341.37 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 383 mg **ANI1** (1.34 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Methanol suspendiert. Es wurden 3.03 mL *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal (22.7 mmol, 17.0 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei 45 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/EE 8:2 nach EE) aufgereinigt. Es wurden 397 mg **26** (1.17 mmol, 87 %) erhalten.

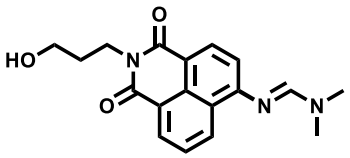
R_f (DCM/MeOH 99:1) = 0.66

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.84 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, arom.), 8.46 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, arom.), 8.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, arom.), 8.19 (s, 1H, NCHN), 7.74 (dd, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H, arom.), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1Harom.), 4.73 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, sek. OH), 4.55 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, prim. OH), 4.20 (dd, *J* = 12.8, 8.0 Hz, 1H, OCH_2), 3.99 (dd, *J* = 12.8, 5.3 Hz, 1H, OCH_2), 3.90 (dt, *J* = 7.9, 5.3 Hz, 1H, CH), 3.45 – 3.36 (m, 2H, NCH_2), 3.18 (s, 3H, NMe_2), 3.17 (s, 3H, NMe_2).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 164.67, 164.11, 155.85, 155.53, 133.18, 131.41, 131.22, 129.46, 127.75, 125.73, 122.32, 114.61, 113.43, 69.24, 65.08, 43.35, 34.93, 19.02.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 341.1370 [M^+]; m/z (gefunden) = 341.1369[M^+].

(E)-*N*'-(2-(3-Hydroxypropyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[de]isoquinolin-6-yl)-*N*,*N*-dimethylformimidamid **27**



27
$C_{18}H_{19}N_3O_3$
325.37 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 93 mg **25** (344 µmol, 1.00 Äq.) in 6 mL trockenem Methanol suspendiert. Es wurden 781 µL *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal (5.85 mmol, 17.0 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei 45 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/EE 8:2 nach EE) aufgereinigt. Es wurden 67.0 mg **27** (206 µmol, 60 %) als gelber Feststoff erhalten.

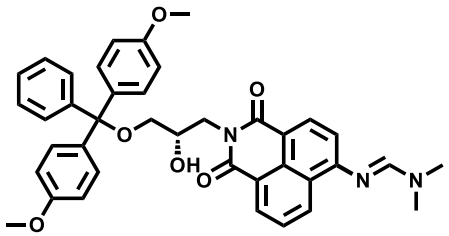
R_f (DCM/MeOH 99:1) = 0.64

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.82 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 1H, arom.), 8.45 (dd, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H, arom.), 8.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H, arom.), 8.18 (s, 1H, NCH), 7.72 (dd, J = 8.3, 7.3 Hz, 1H, arom.), 7.25 (d, J = 8.1 Hz, 1H, arom.), 4.48 (t, J = 5.2 Hz, 1H, OH), 4.13 – 3.99 (m, 2H, NCH_2), 3.49 (td, J = 6.4, 5.1 Hz, 2H, OCH_2), 3.18 (s, 3H, NMe_2), 3.16 (s, 3H, NMe_2), 1.77 (dq, J = 8.8, 6.5 Hz, 2H, CCH_2).

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 163.85, 163.29, 155.49, 155.07, 132.73, 131.04, 130.77, 128.89, 127.29, 125.25, 121.64, 113.91, 112.97, 59.02, 37.23, 36.99, 34.46, 31.17.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 325.1421 [M^+]; m/z (gefunden) = 326.1497 [MH^+].

(S,E)-*N*'-(2-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[de]isoquinolin-6-yl)-*N*,*N*-dimethylformimidamid **28**



28
$C_{39}H_{37}N_3O_6$
643.74 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 447 mg der Verbindung **26** (1.31 mmol, 1.00 Äq.) in 15 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, und es wurden 1.07 g DMTrCl (3.16 mmol, 2.41 Äq.) portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 2 mL MeOH die Reaktion gestoppt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, dabei wurde 2x mit Toluol coevaporiert, um restliches Pyridin zu entfernen. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und 2x mit einer gesättigten $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde 1x mit DCM extrahiert, anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/EE 8:2 nach EE) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 365 mg **28** (567 µmol, 43 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (Cyclohexan/EE 1:4 +0.1 % NEt_3) = 0.71

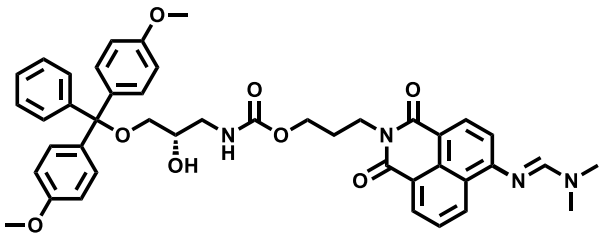
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.81 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 1H, arom.), 8.58 (dd, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H, arom.), 8.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H, arom.), 7.78 (s, 1H, NCHN), 7.65 (dd, J = 8.4, 7.3 Hz, 1H, arom.), 7.54 – 7.45 (m, 2H, DMTr), 7.41 – 7.32 (m, 4H, DMTr),

7.31 – 7.22 (m, 2H, DMTr), 7.23 – 7.14 (m, 1H, DMTr), 7.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, arom.), 6.87 – 6.76 (m, 4H, DMTr), 4.55 (dd, *J* = 13.7, 9.1 Hz, 1H, NCH_2), 4.38 (dd, *J* = 13.7, 3.1 Hz, 1H, NCH_2), 4.12 – 4.22 (m, 1H, CH), 3.78 (s, 6H, OMe), 3.35 – 3.22 (m, 2H, OCH_2), 3.23 (s, 3H, NMe), 3.20 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OH), 3.18 (s, 3H, NMe).

^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 165.92, 165.54, 158.52, 155.93, 153.59, 145.00, 136.31, 136.27, 133.61, 131.81, 131.62, 130.25, 129.73, 129.27, 128.48, 127.98, 127.93, 126.81, 125.43, 122.14, 115.71, 113.54, 113.31, 113.22, 86.13, 70.71, 66.02, 55.33, 44.15, 40.76, 35.05.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 643.2677 [M^+]; m/z (gefunden) = 644.2756 [MH^+].

(E)-3-(6-(((Dimethylamino)methylene)amino)-1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propyl-(S)-(3-(bis(4-methoxyphenyl)-(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)carbamat **29**



29
$C_{43}H_{44}N_4O_8$
744.84 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 181 mg **27** (556 µmol, 1.00 Äq.) zusammen mit 108 mg 1,1‘-Carbonyldiimidazol (667 µmol, 1.20 Äq.) in 9 mL trockenem DMF gelöst bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurden 263 mg **13** (667 µmol, 1.20 Äq.) zu der Reaktion gegeben und es wurde für weitere 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/EE 9:1 nach EE) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 105 mg **29** (141 µmol, 25 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (DCM/MeOH 99:1+ 0.1 % NEt_3) = 0.70

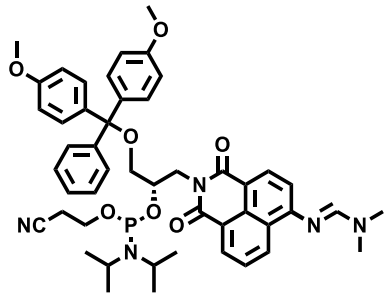
^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 8.85 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, arom.), 8.49 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, arom.), 8.42 – 8.34 (m, 1H, arom.), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NCH), 7.67 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H, arom.), 7.44 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, DMTr), 7.37 – 7.16 (m, 6H, DMTr), 7.12 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, arom.), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, DMTr), 5.38 (s, 1H, NH), 4.20 – 4.11 (m, 2H, NCH_2), 4.06 (p, *J* = 6.1, 5.4 Hz, 2H, $COOCH_2$), 3.74 (s, 7H, OMe, OCH), 3.34 (s, 1H, OH), 3.16 (dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, 8H, NCH_3, $NHCH_2$), 2.99 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH_2), 2.08 – 1.90 (m, 2H, CCH_2).

^{13}C-NMR (101 MHz, CD_3CN): δ (ppm) = 164.97, 159.61, 156.92, 155.54, 146.27, 137.14, 133.91, 133.78, 132.14, 132.05, 131.82, 131.72, 131.00, 129.05, 128.77,

127.74, 126.16, 118.31, 113.98, 86.81, 70.65, 66.50, 63.75, 60.03, 55.87, 40.86, 37.96, 37.81, 35.04, 32.05, 28.64.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 744.3154 [M^+]; m/z (gefunden) = 744.3115 [M^+].

(S)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-3-(6-(((E)-(dimethylamino)methylene)amino)-1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propan-2-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidit **30**



30
$C_{49}H_{58}N_5O_7P$
860.00 g/mol

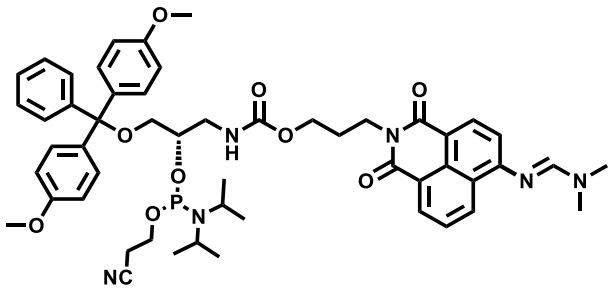
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 96.6 mg **28** (150 µmol, 1.00 Äq.) in 9 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 78.4 µL DIPEA (450 µmol, 3.00 Äq.) und 50.1 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (210 µmol, 1.40 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, 2x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 113 mg **30** wurde quantitativ (124 µmol, 100 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (DCM/Aceton 9:1) = 0.87

^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 149.11, 149.06.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 858.4068 [M^+]; m/z (gefunden) = 859.3882 [M^+].

3-(6-(((E)-(Dimethylamino)methylene)amino)-1,3-dioxo-1H-benzo[de]-isoquinolin-2(3H)-yl)propyl-((2S)-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propyl)carbamat **31**



31
$C_{53}H_{65}N_6O_9P$
961.11 g/mol

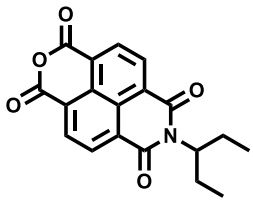
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 105 mg **29** (141 µmol, 1.00 Äq.) in 10 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 80.0 µL DIPEA (159 µmol, 3.26 Äq.) und 60.0 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (252 µmol, 1.79 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, 2x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Verbindung **18** wurde quantitativ (141 µmol, 100 %) als gelber Schaum erhalten.

R_f (DCM/Aceton 9:1) = 0.80

^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 148.49, 147.94.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 960.4545 [M^+]; m/z (gefunden) = 960.4429 [M^+].

7-(Pentan-3-yl)-1*H*-isochromeno[6,5,4]isoquinolin-1,3,6,8(7*H*)-tetraon **32**



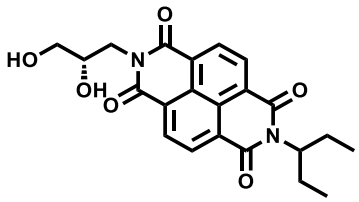
32
$C_{19}H_{15}NO_5$
337.33 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden aufgeteilt auf 6 *Headspace-Crimp-Vials* 2.40 g 1,4,5,8-Naphthalintetracarbonsäuredianhydrid (8.95 mmol, 1.00 Äq.) in insgesamt 48 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von insgesamt 988 µL 3-Pentylamin (741 mg, 8.50 mmol, 0.95 Äq.) wurde für 3 h bei 140 °C gerührt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze vereinigt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 60 mL Aceton gelöst und mit 1M wässriger HCl zu Fällung gebracht. Der erhaltene Niederschlag wurde filtriert, mit Wasser säurefrei gewaschen und getrocknet. Es wurden 2.23 g **32** (6.61 mmol, 74 %) als beiger Feststoff erhalten.

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.56 (d, J = 7.6 Hz, 2H, arom.), 8.19 (d, J = 7.6 Hz, 2H, arom.), 4.88 (tt, J = 9.6, 5.7 Hz, 1H, CH), 2.13 (ddt, J = 13.8, 9.7, 7.4 Hz, 2H, CH_2), 1.89 – 1.79 (m, 2H, CH_2), 0.81 (t, J = 7.5 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 168.53, 136.58, 130.46, 129.40, 128.77, 125.43, 57.03, 24.47, 11.17.

(*S*)-2-(2,3-Dihydroxypropyl)-7-(pentan-3-yl)benzo[3,8]phenanthrolin-1,3,6,8(2*H*,7*H*)-tetraon **NDI1**



NDI1
$C_{22}H_{22}N_2O_6$
410.43 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden aufgeteilt auf 3 *Headspace-Crimp-Vials* 1.00 g **32** (2.96 mmol, 1.00 Äq.) und 283 mg S-3-Amiopropan-1,2-diol (3.11 mmol, 1.05 Äq.) in insgesamt 21 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von insgesamt 434 µL NEt_3 (315 mg, 3.11 mmol, 1.05 Äq.) wurde über Nacht bei 140 °C gerührt. Die Reaktionsansätze wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL einer 2:1 Lösung aus Wasser/MeOH suspendiert und es wurde mit konz. HCl bis pH = 4 angesäuert. Der Niederschlag wurde filtriert und mit Wasser säurefrei gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (DCM nach DCM/MeOH 47:3) aufgereinigt. Es wurden 410 mg **NDI1** (95 µmol, 34 %) als beiger Feststoff erhalten.

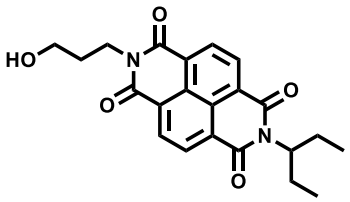
R_f (DCM/MeOH 20:1) = 0.50

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.67 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, arom.), 4.90 (tt, *J* = 9.4, 5.8 Hz, 1H, NCH), 4.83 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, sek. OH), 4.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, prim. OH), 4.24 (dd, *J* = 12.9, 8.5 Hz, 1H, NCH_2), 4.02 (dd, *J* = 12.9, 4.8 Hz, 1H, NCH_2), 3.92 (dp, *J* = 8.3, 5.4 Hz, 1H, OCH), 3.42 (pt, *J* = 9.4, 4.6 Hz, 2H, OCH_2), 2.14 (ddq, *J* = 14.8, 9.4, 7.5 Hz, 2H, CCH_2), 1.99 – 1.80 (m, 2H, CCH_2), 0.84 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 162.86, 130.72, 130.41, 126.41, 126.30, 126.13, 68.27, 64.49, 57.20, 43.72, 24.40, 11.16.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 410.1472 [M^+]; m/z (gefunden) = 411.1551 [MH^+].

2-(3-Hydroxypropyl)-7-(pentan-3-yl)benzo[3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2*H*,7*H*)-tetraone **33**



33
$C_{22}H_{22}N_2O_5$
394.43 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 1.00 g der Verbindung **32** (2.96 mmol, 1.00 Äq.) auf 3 *Headspace-Crimp-Vials* aufgeteilt und in insgesamt 21 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von insgesamt 236 µL 3-Amiopropan-1-ol (3.11 mmol, 1.05 Äq.) und 434 µL NEt_3 (315 mg, 3.11 mmol, 1.05 Äq.) wurde über Nacht bei 140 °C gerührt. Die Reaktionsansätze wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL einer 2:1 Lösung aus Wasser/MeOH suspendiert und es wurde mit konz. HCl bis pH = 4 angesäuert. Der Niederschlag wurde filtriert und mit Wasser säurefrei gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (DCM nach DCM/MeOH 47:3) aufgereinigt. Es wurden 456 mg **33** (1.15 mmol, 39 %) als beiger Feststoff erhalten.

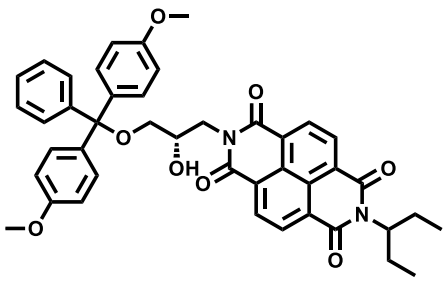
R_f (DCM/MeOH 20:1) = 0.59

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (p pm) = 8.66 (t, J = 3.9 Hz, 4H, arom.), 4.90 (tt, J = 9.5, 5.9 Hz, 1H, NCH), 4.51 (t, J = 5.1 Hz, 1H, OH), 4.16 – 4.08 (m, 2H, OCH_2), 3.51 (td, J = 6.3, 5.0 Hz, 2H, NCH_2), 2.14 (ddq, J = 14.8, 9.3, 7.5 Hz, 2H, $CHCH_2$), 1.94 – 1.75 (m, 4H, $CHCH_2$, CH_2CH_2), 0.83 (td, J = 7.4, 3.7 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 162.60, 130.70, 130.42, 126.29, 126.11, 58.96, 57.19, 38.06, 30.80, 24.39, 11.15, 11.09.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 394.1523 [M^+]; m/z (gefunden) = 395.1598 [MH^+].

(*S*)-2-(3-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-7-(pentan-3-yl)benzo[3,8]phenanthrolin-1,3,6,8(2*H*,7*H*)-tetraon **34**



34
$C_{43}H_{40}N_2O_8$
712.80 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 410 mg **NDI1** (999 µmol, 1.00 Äq.) in 5 mL trockenem THF gelöst. Nach Zugabe von 265 µL NEt_3 (192 mg, 1.90 mmol, 1.90 Äq.) wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und es wurden 355 mg DMTrCl (1.05 mmol, 1.05 Äq.) portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 mL MeOH die Reaktion gestoppt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen und 3x mit einer gesättigten $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM nach DCM/MeOH 19:1 +0.1 % NEt_3) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 289 mg **34** (406 µmol, 41 %) als blassgelber Schaum erhalten.

R_f (DCM/MeOH 20:1 +0.1 % NEt_3) = 0.93

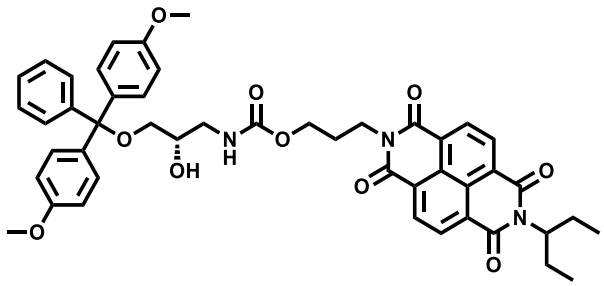
^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.74 (d, *J* = 3.3 Hz, 4H, arom.), 7.48 – 7.42 (m, 2H, DMTr), 7.34 – 7.30 (m, 4H, DMTr), 7.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, DMTr), 7.23 – 7.14 (m, 1H, DMTr), 6.81 – 6.76 (m, 4H, DMTr), 5.04 (tt, *J* = 9.6, 5.8 Hz, 1H, NCH), 4.66 (dd, *J* = 13.6, 9.1 Hz, 1H, NCH_2), 4.26 (dd, *J* = 13.6, 3.5 Hz, 1H, NCH_2), 4.19 (ddt, *J* = 13.4, 8.0, 4.1 Hz, 1H, CCH), 3.77 (d, *J* = 0.8 Hz, 6H, OMe), 3.37 (dd, *J* = 9.5, 4.5 Hz, 1H, OCH_2),

3.27 (dd, *J* = 9.5, 4.1 Hz, 1H, OCH_2), 2.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, OH), 2.23 (ddq, *J* = 14.8, 9.5, 7.5 Hz, 2H, $NCCH_2$), 1.99 – 1.89 (m, 2H, $NCCH_2$), 0.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C-NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 163.80, 158.61, 144.70, 135.95, 135.90, 131.28, 130.20, 130.19, 128.48, 128.27, 128.00, 127.01, 126.96, 126.87, 126.37, 113.25, 86.35, 69.76, 65.66, 58.36, 55.34, 44.27, 25.09, 11.44.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 712.2779 [M^-]; m/z (gefunden) = 712.2742 [M^-].

3-(1,3,6,8-Tetraoxo-7-(pentan-3-yl)-3,6,7,8-tetrahydrobenzo[3,8]phenanthrolin-2(1*H*)-yl)propyl-(S)-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)carbamate **35**



35
$C_{47}H_{47}N_3O_{10}$
813.90 g/mol

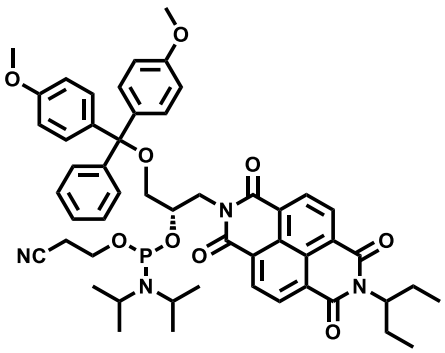
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 200 mg **33** (507 µmol, 1.00 Äq.) zusammen mit 123 mg 1,1'-Carbonyldiimidazol (760 µmol, 1.50 Äq.) in 10 mL trockenem DMF gelöst bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurden 399 mg **13** (1.01 mmol, 2.00 Äq.) zu der Reaktion gegeben und es wurde für weitere 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan nach EE) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 198 mg **35** (243 µmol, 48 %) als blassgelber Schaum erhalten.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.74 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H, arom.), 7.34 – 7.25 (m, 5H, DMTr), 7.21 – 7.14 (m, 4H, DMTr), 6.86 – 6.80 (m, 4H, DMTr), 5.18 (s, 1H, NH), 5.03 (tt, *J* = 9.6, 5.9 Hz, 1H, NCH), 4.33 (td, *J* = 7.0, 1.8 Hz, 2H, $COOCH_2$), 4.20 (p, *J* = 5.0 Hz, 2H, NCH_2), 3.80 (s, 6H, OMe), 3.78 (s, 1H, OCH), 3.70 – 3.56 (m, 2H, OCH_2), 3.41 – 3.33 (m, 1H, $NHCH_2$), 3.29 (dt, *J* = 14.4, 6.1 Hz, 1H, $NHCH_2$), 2.32 – 2.16 (m, 2H, $NCHCH_2$), 2.13 – 2.06 (m, 2H, CCH_2), 1.99 – 1.88 (m, 2H, $NCHCH_2$), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C-NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 163.15, 158.77, 158.69, 157.92, 147.46, 139.59, 131.30, 130.16, 129.27, 128.00, 127.91, 127.23, 127.04, 126.78, 126.26, 113.31, 81.58, 71.22, 63.83, 62.91, 58.38, 55.40, 43.43, 37.96, 27.77, 25.08, 11.4

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 813.3256 [M^-]; m/z (gefunden) = 813.3256 [M^-].

(*S*)-1-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-3-(1,3,6,8-tetraoxo-7-(pentan-3-yl)-3,6,7,8-tetrahydrobenzo[3,8]phenanthrolin-2(1*H*)-yl)propan-2-yl-(2-cyanoethyl)diisopropylphosphoramidite **36**



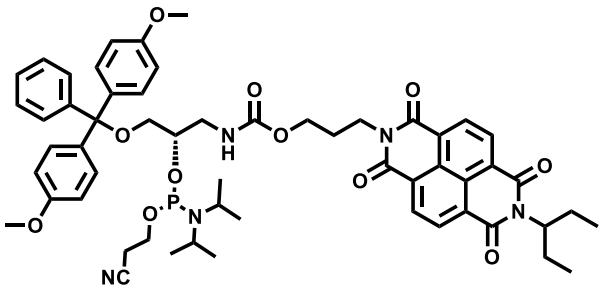
36
$C_{53}H_{61}N_4O_9P$
929.06 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 143 mg **34** (200 µmol, 1.00 Äq.) in 15 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 105 µL DIPEA (77.6 mg, 600 µmol, 3.00 Äq.) und 66.8 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (70.8 mg, 252 µmol, 1.79 Äq.) zugegeben und es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, 2x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/EE 9:1 nach EE) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 128 mg **36** (138 µmol, 62 %) als blassgelber Schaum erhalten.

^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 149.42, 149.10.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 928.4171 [M^-]; m/z (gefunden) = 928.3829 [M^-].

3-(1,3,6,8-Tetraoxo-7-(pentan-3-yl)-3,6,7,8-tetrahydrobenzo-[3,8]-phenanthrolin-2(1*H*)-yl)propyl-((2*S*)-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)-methoxy)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)-phosphaneyl)oxy)propyl)carbamat **37**



37
$C_{57}H_{68}N_5O_{11}P$
1030.17 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 166 mg **35** (205 µmol, 1.00 Äq.) in 15 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 107 µL DIPEA (79.4 mg, 614 µmol, 3.00 Äq.) und 73.2 µL 2-Cyanoethyl-*N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidit (77.6 mg, 307 µmol, 1.5 Äq.) zugegeben und es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, 2x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels automatisierter Flash-Chromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/EE 9:1 nach EE) aufgereinigt. Anschließend wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 86.0 mg **37** (83.5 µmol, 41 %) als blassgelber Schaum erhalten.

^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 149.62, 149.35.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 1029.4648 [M^-]; m/z (gefunden) = 1029.4249 [M^-].

6.3 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder kommerziell von den Firmen BIOMERS.NET oder METABION erworben oder mittels Phosphoramidit-Festphasensynthese an einem *H-6 DNA/RNA-Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE hergestellt. Alle Oligonukleotide wurden entweder trocken oder in ddH_2O bei -32 °C aufbewahrt.

Die für die Oligonukleotid-Festphasensynthese benötigten Phosphoramidit-Bausteine und Reagenzien wurden von den Firmen SIGMA ALDRICH, GLENRESEARCH (EUROGENTEC) oder BLDPHARM bezogen. Als feste Phase wurden *Controlled-Pore-Glass* (CPG)-Säulchen mit einer Belegungsdichte von 1 µmol und einer Porengröße von 500 Å verwendet. Die CPG-Säulchen wurden von den Firmen GLENRESEARCH, CHEMGENES oder BIOSEARCH erworben. Für die Synthese wurden die Phosphoramidite in Acetonitril gelöst; die Konzentrationen betrugen dabei 0.067 M für die unmodifizierten, natürlichen Basen und 0.1 M für die artifiziellen Bausteine und den N^6-methylierten Adenosin-Baustein.

6.3.1 Synthese der modifizierten DNA

Die Synthese der DNA-Stränge erfolgte nach Standardkupplungsbedingungen. Für die artifiziellen Bausteine wurden die Kupplungszeiten und die Menge an Reagenzien erhöht. Es wurde stets im *DMT-on* Modus gebaut. Dabei wird nach dem letzten Kupplungsschritt am Ende der Synthese die 5′-DMTr-Gruppe nicht abgespalten. Um einen besseren Einbau der Chromophore zu erzielen, wurde für die Synthese der sehr reaktive Aktivator 42® verwendet. Für die **DMANI-** und **ANI2-**modifizierten DNA-Stränge wurden jeweils Phosphoramidite mit den Schutzgruppen Benzoyl für A und C und Acetyl für G sowie Essigsäureanhydrid in THF als *Capping*-Reagenz eingesetzt. Für die ***o*-4API-** und **NDI-**modifizierten Stränge wurden die Phosphoramidite geschützt mit Phenoxyacetyl für A, Isopropylphenoxyacetyl für G und Acetyl für C verwendet. Zudem wurde Phenoxyessigsäureanhydrid in THF als *Capping*-Reagenz verwendet, um einen Austausch der Schutzgruppen für A und G durch Acetyl zu vermeiden.

Tabelle 12: Standardkupplungsprotokoll für DNA.

	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	25	TCA		TRM	ON		
6					ON		
7						15	
8	25	TCA		TRM	ON		
9					ON		
10						15	
11	25	TCA		TRM	ON		
12					ON		
13						15	
14	25	TCA		TRM	ON		
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	

2	2	TET		COL	ON		
3					ON		
4						2	1
***Branch*-Kupplung**							
1	4	TET		COL	ON		
2	8	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						10	
5	6	AMD	TET	COL	ON		
6					ON		
7						5	
8	10	ACN		M_W			
9	10	GAS		M_W			
Kupplung							
1	10	ACN		M_W		50	
2	10	ACN		COL	ON		
3					ON		
4	35	GAS		COL			
5	20	GAS		M_W			
Capping							
1	20	CP_A	CP_B	COL	ON		
2					ON		
3						15	
4	10	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			
12	30	GAS		COL			
Oxidation							
1	35	OXI		COL	ON		
2					ON		
3	10	ACN		M_W		9	
4						9	
5		WTH				150	
6		WTH				150	
7	30	GAS		COL			
8	2	ACN		M_W			
9	16	ACN		COL	ON		
10					ON		
11	20						
12	30	GAS		COL			
13	2	ACN		M_W			
14	15	ACN		COL	ON		
15					ON		
16	40						
17	15	ACN		COL	ON		
18					ON		
19	50						
20	10	GAS		M_W			
21	30	GAS		COL			

Für den ***o*-4API** Baustein wurde das DNA-Kupplungsprotokoll folgendermaßen angepasst.

Tabelle 13: Kupplungsprotokoll für den Einbau des ***o*-4API** Phosphoramidits in DNA.

***Branch*-Kupplung**							
	Zeit [0.1 s]	**Reagenz 1**	**Reagenz 2**	**Zielort**	***S. Col. Ptr.***	**Totzeit [s]**	***Branch***
1	4	TET		COL	ON		
2	4	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6						99	
7						99	
8						99	
9	4	AMD	TET	COL	ON		
10					ON		
11						99	
12						99	
13						99	
14						99	
15						99	
16	4	AMD	TET	COL	ON		
17					ON		
18						99	
19						99	
20						99	
21						99	
22	5	TET		COL	ON		
23					ON		
24	20	ACN		M_W			
25	20	GAS		M_W			

Für den Einfacheinbau der Bausteine **DMANI1**, **DMANI2**, **ANI1**, **ANI2**, **NDI1** und **NDI2** wurde das Kupplungsprotokoll weiter angepasst.

Tabelle 14: Kupplungsprotokoll für den Einfacheinbau der Moleküle **DMANI1, DMANI2, ANI1, ANI2, NDI1** und **NDI2.**

***Branch*-Kupplung**							
	Zeit [0.1 s]	**Reagenz 1**	**Reagenz 2**	**Zielort**	***S. Col. Ptr.***	**Totzeit [s]**	***Branch***
1	4	TET		COL	ON		
2	6	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6						99	
7						99	
8						99	
9	4	AMD	TET	COL	ON		
10					ON		
11						99	
12						99	
13						99	
14						99	
15						99	
16	6	AMD	TET	COL	ON		
17					ON		
18						99	
19						99	
20						99	
21						99	
22						99	
23						99	
24	20	ACN		M_W			
25	20	GAS		M_W			

Für einen Doppeleinbau der Bausteine **DMANI1**, **DMANI2**, **ANI1**, **ANI2**, **NDI1** und **NDI2** wurden die Kupplungszeiten und Mengen an Reagenzien weiter erhöht.

Dieses Protokoll wurde sowohl für den Einbau von zwei Farbstoffen direkt nebeneinander als auch getrennt durch ein Thymidin verwendet.

Tabelle 15: Kupplungsprotokoll für den Doppeleinbau der Moleküle **DMANI1, DMANI2, ANI1, ANI2, NDI1** und **NDI2.**

	***Branch*-Kupplung**						
	Zeit [0.1 s]	**Reagenz 1**	**Reagenz 2**	**Zielort**	***S. Col. Ptr.***	**Totzeit [s]**	***Branch***
1	6	TET		COL	ON		
2	8	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6						99	
7						99	
8						99	
9	6	AMD	TET	COL	ON		
10					ON		
11						99	
12						99	
13						99	
14						99	
15						99	
16	6	AMD	TET	COL	ON		
17					ON		
18						99	
19						99	
20						99	
21						99	
22						99	
23						99	
24	20	ACN		M_W			
25	20	GAS		M_W			

Aufarbeitung der o-4API-modifizierten DNA

Nach Abschluss der Synthese wurden die CPG-Säulchen im Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde das CPG in ein EPPENDORF-Gefäß überführt und zur Abspaltung der NPEOC-Schutzgruppe mit 1 mL einer Lösung aus 0.5 M DBU und 40 mM Thymin in Pyridin versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und die überstehende Lösung wurde abpipettiert. Das CPG wurde drei Mal mit je 500 µL trockenem Pyridin gewaschen und anschließend im Feinvakuum getrocknet. Die Abspaltung von der festen Phase und die Entfernung der Schutzgruppen der restlichen Nukleobasen erfolgten nach der UltraMILD-Methode. Hierfür wurden 1 mL 0.05 M K_2CO_3 in MeOH zu dem CPG gegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und der Überstand abpipettiert. Es wurde vier Mal mit je 1 mL wässriger NaCl-Lösung (100 mg/mL in ddH_2O) gewaschen. Die so erhaltene Lösung im Verhältnis von 1:4 (v/v) aus K_2CO_3 in MeOH und NaCl in ddH_2O konnte direkt zur Aufreinigung auf die *GlenPak*™-Säule gegeben werden.

Aufarbeitung der DMANI1-, DMANI2-, ANI1- und ANI2-modifizierten DNA

Nach Abschluss der Synthese wurden die CPG-Säulchen im Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde das CPG in ein EPPENDORF-Gefäß mit *Save-Lock*-Deckel überführt und zur Abspaltung von der festen Phase und Entfernung der Schutzgruppen mit 1 mL Ammoniumhydroxidlösung (25-27 %, *trace select*, FLUKA) versetzt, und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und der Überstand abpipettiert. Es wurde vier Mal mit je 250 µL wässriger NaCl-Lösung (100 mg/mL in ddH_2O) gewaschen, sodass das finale Volumen der vereinigten wässrigen Phase 2 mL betrug. Die so erhaltene Lösung konnte direkt zur Aufreinigung auf die *GlenPak*™-Säule gegeben werden.

Aufarbeitung der NDI1- und NDI2-modifizierten DNA

Nach Abschluss der Synthese wurden die CPG-Säulchen im Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde das CPG in ein EPPENDORF-Gefäß überführt und zur Abspaltung

von der festen Phase und Entfernung der Schutzgruppen nach UltraMILD-Methode mit 1 mL 0.05 M K_2CO_3 in MeOH versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und der Überstand abpipettiert. Es wurde vier Mal mit je 1 mL wässriger NaCl-Lösung (100 mg/mL in ddH_2O) gewaschen. Die so erhaltene Lösung im Verhältnis von 1 :4 (v/v) aus K_2CO_3 in MeOH und NaCl in ddH_2O konnte direkt zur Aufreinigung auf die *GlenPak*™-Säule gegeben werden.

Erste Aufreinigung mittels *Glen-Pak*™

Die synthetisierten DMTr-on DNA-Stränge wurden zunächst über *GlenPak*™ DNA *Purification Cartridges* der Firma GLENRESEARCH aufgereinigt. Dafür wurde die Säule mit 0.5 mL Acetonitril gefolgt von 1 mL 2 M TEAA-Lösung konditioniert. Anschließend wurden die zuvor erhaltenen Oligonukleotidlösungen auf die Säule gegeben. Zur Entfernung der Abbruchstränge wurde mit 2 mL einer Salzwaschlösung (100 mg/mL NaCl in ddH_2O, 5 % MeCN) eluiert. Anschließend wurde mit 2 mL 2 %-iger TFA-Lösung die DMTr-Schutzgruppe abgespalten, danach wurde mit 2 mL ddH_2O gewaschen. Die aufgereinigte DNA wurde mit einer 1:1-Lösung aus MeCN/ddH_2O +0.5% Ammoniumhydroxid von der Säule eluiert. Das Lösungsmittel wurde am Vakuumkonzentrator entfernt.

Zweite Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC

Um restliche Verunreinigungen wie unmodifizierte DNA, noch vorhandene Abbruchstränge oder überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde mittels semipräparativer HPLC eine zweite Aufreinigung durchgeführt. Dazu wurde die jeweilige Probe in 300 µL ddH_2O gelöst. Die Detektion der gewünschten Fraktion erfolgte über die charakteristische Absorptionswellenlänge der Oligonukleotide sowie des jeweiligen Chromophors. Es wurde mit einem Gradienten aus 0.05 M NH_4OAc-Puffer und MeCN eluiert.

Tabelle 16: HPLC-Protokoll zur Aufreinigung der modifizierten DNA-Stränge mit A = 0.05 M NH_4OAc-Puffer und B = MeCN.

DNA-Sequenz	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Flussrate [mL/min]	$\lambda_{Abs.}$ [nm]
DNA1-2_*o*-4API	0-20	30	40	2.5	260, 290, 385
DMANI, ANI und PANI modifizierte Sequenzen	0-20	30	40	2.5	260, 290, 460
NDI modifizierte Sequenzen	0-40	30	40	2.5	260, 290, 365, 385

Charakterisierung mittels Massenspektroskopie und analytischer HPLC

Die einzelnen Fraktionen nach der HPLC-Aufreinigung wurden im Vakuumkonzentrator eingeengt und mittels MALDI-TOF-MS oder ESI-MS charakterisiert. Saubere Fraktionen, welche die gesuchte Masse aufwiesen, wurden vereinigt. Die Reinheit der Vereinigten Stränge wurde durch analytische HPLC bestätigt. Es wurde mit einem Gradienten aus 0.05 M NH_4OAc-Puffer und MeCN eluiert.

Tabelle 17: HPLC-Protokoll zur Analyse der modifizierten DNA-Stränge mit A = 0.05 M NH_4OAc-Puffer und B = MeCN.

DNA-Sequenz	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Flussrate [mL/min]	$\lambda_{Abs.}$ [nm]
DNA1-2_*o*-4API	0-20	20	60	1.0	260, 290, 385
DMANI, ANI und PANI modifizierte Sequenzen	0-20	20	60	1.0	260, 290, 460
NDI modifizierte Sequenzen	0-40	20	60	1.0	260, 290, 365, 385

Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der einzelnen DNA-Proben erfolgte über die Absorption bei 260 nm, welche an einem Spektrophotometer *NS-1000* der Firma NANODROP ermittelt wurde. Die Konzentration wurde anschließend über das LAMBERT-BEER-Gesetz berechnet. Hierfür werden die molaren Extinktionskoeffizienten ε_{260} der Oligonukleotide bei 260 nm in Wasser benötigt, welche sich anhand folgender Formel ergeben:

$$\varepsilon_{260} = nX \cdot \varepsilon_X + (nA \cdot \varepsilon_A + nC \cdot \varepsilon_c + nG \cdot \varepsilon_G + nT \cdot \varepsilon_T) \cdot 0.9$$

ε molarer Extinktionskoeffizient bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm

X die verschiedenen Chromophore in der DNA

n Anzahl der vorhandenen Basen/Chromophore

Der Faktor von 0.9 berücksichtig hierbei die Hypochromizität der DNA.

Tabelle 18: Molare Extinktionskoeffizienten bei 260 nm der Chromophore bzw. Nukleotide in DNA, a = aus der Literatur entnommen, b = näherungsweise aus der Literatur entnommen, c = über die Steigung einer Verdünnungsreihe bestimmt.

Chromophor bzw. Nukleotid	**ε_{260} [L·mol^{-1}·cm^{-1}]**
o-4API [a]	22700 [52]
DMANI1 / DMANI2 [b]	16800 [199]
ANI1 / ANI2 [b]	16800 [199]
PANI [b]	16800 [199]
NDI1 / NDI2 [c]	2600
dA [a]	15400 [200]
dC [a]	7300 [200]
dG [a]	11700 [200]
dT [a]	8800 [200]

Die molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel 6.3.4 aufgeführt.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden 1.00 Äq. der modifizierten Einzelstränge mit 1.5 Äq. der komplementären Gegenstränge (1.00 Äq. für chromophorhaltige Gegenstränge) in 100 µL 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP_i; pH = 7.0) und 62.5 µL 250 mM NaCl-Lösung für 10 min bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde mit ddH_2O auf 1 mL aufgefüllt, sodass die Endkonzentration des Doppelstrangs 2.5 µM betrug. Die so erhaltenen Lösungen wurden für die Absorptions- und Emissionsmessungen verwendet.

6.3.2 Arbeiten mit RNA

Um eine Kontamination der RNA-haltigen Proben zu vermeiden, wurden bei der Arbeit mit RNA grundsätzlich Nitrilhandschuhe getragen, welche entweder mit EtOH p.a. oder RNAse Away® (MOLECULAR BIOPRODUCTS) behandelt wurden. Oberflächen, Verpackungen und Pipetten wurden vor Beginn der Arbeit ebenfalls mit EtOH p.a. oder RNAse Away® behandelt und nach Bedarf mit einem RNAse-freien Tuch trockengewischt. Es wurden nur vom Hersteller als RNAse-frei deklarierte Verbrauchsmaterialien verwendet; diese wurden stets aus Packungen entnommen, die nur für das RNAse-freie Arbeiten zur Verfügung standen. Benötigte Glasgeräte wurden mit RNAse Away® behandelt und anschließend mit RNAse-freiem Wasser nachgespült. Es wurden nur Chemikalien und Lösungsmittel verwendet, die ausschließlich für das RNAse-freie Arbeiten zur Verfügung standen. Zur Herstellung von RNAse freiem Wasser wurde ddH_2O über Nacht mit 0.1 Vol.-% Diethylpyrocarbonat (DPEC) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für mindestens 15 min zum Sieden erhitzt.

6.3.3 Synthese der modifizierten RNA

Für die Synthese der RNA-Stränge wurden aufgrund der sterisch anspruchsvollen 2′-O-TBDMS-Schutzgruppe im Vergleich zu der DNA-Synthese die Kupplungszeiten erhöht. Auch hier wurde stets im *DMT-on* Modus gebaut. Um einen besseren Einbau der Chromophore zu erzielen, wurde für die Synthese der sehr reaktive Aktivator 42® verwendet. Für die ***o*-4API**-modifizierten Stränge wurden die Phosphoramidite

geschützt mit Phenoxyacetyl für a, Isopropylphenoxyacetyl für g und Acetyl für c verwendet. Für die m^6a-modifizierten Stränge wurden jeweils Phosphoramidite mit den Schutzgruppen Benzoyl für a und Acetyl für g und c eingesetzt. In beiden Fällen wurde Phenoxyessigsäureanhydrid in THF als *Capping*-Reagenz verwendet. Um mögliche Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden, wurden vor der Synthese alle Schläuche des *Synthesizers,* welche an die Phosphoramidite angeschlossen werden, mit Ethanol und Acetonitril gespült.

Tabelle 19: Standardkupplungsprotokoll für RNA.

	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	25	TCA		TRM	ON		
6					ON		
7						15	
8	25	TCA		TRM	ON		
9					ON		
10						15	
11	25	TCA		TRM	ON		
12					ON		
13						15	
14	25	TCA		TRM	ON		
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	
2	4	TET		COL	ON		
3					ON		
4						2	1
	***Branch*-Kupplung**						
1	4	TET		COL	ON		
2	6	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						99	
5						99	
6	6	AMD	TET	COL	ON		
7					ON		
8						99	
9						99	
10	6	AMD	TET	COL	ON		
11					ON		
12						99	
13						99	
14	5	TET		COL	ON		
15					ON		
16	20	ACN		M_W			
17	20	GAS		M_W			
	Kupplung						
1						90	

2	10	ACN		M_W		90	
3	10	ACN		COL	ON		
4					ON		
5	35	GAS		COL			
6	20	GAS		M_W			
	Capping						
1	20	CP_A	CP_B	COL	ON		
2					ON		
3						15	
4	10	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			
12	30	GAS		COL			
	Oxidation						
1	35	OXI		COL	ON		
2					ON		
3	10	ACN		M_W		9	
4						9	
5		WTH				150	
6		WTH				150	
7	30	GAS		COL			
8	2	ACN		M_W			
9	16	ACN		COL	ON		
10					ON		
11	20						

12	30	GAS		COL			
13	2	ACN		M_W			
14	15	ACN		COL	ON		
15					ON		
16	40						
17	15	ACN		COL	ON		
18					ON		
19	50						
20	10	GAS		M_W			
21	30	GAS		COL			

Um einen möglichst kompletten Einbau der m^{6}a-Phosphoramidite in die RNA zu erzielen, wurden die Kupplungszeiten leicht erhöht und die Menge der Reagenzien angepasst.

Tabelle 20: Kupplungsprotokoll für m^{6}a-modifizierte RNA-Stränge**.**

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

14						99	
15						99	
16						99	
17	5	TET		COL	ON		
18					ON		
19	20	ACN		M_W			
20	20	GAS		M_W			

Für den Einbau des ***o*-4API-**Phosphoramidits in RNA wurde das gleiche Kupplungsprotokoll wie für den Einbau in DNA verwendet.

Tabelle 21: Kupplungsprotokoll für die o-4API-modifizierten RNA-Stränge**.**

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

19						99	
20						99	
21						99	
22	5	TET		COL	ON		
23					ON		
24	20	ACN		M_W			
25	20	GAS		M_W			

Aufarbeitung der m^{6}a-modifizierten RNA

Nach Abschluss der Synthese wurden die CPG-Säulchen im Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde das CPG in ein EPPENDORF-Gefäß mit *Save-Lock*-Deckel überführt und zur Abspaltung von der festen Phase und zur Entfernung der Schutzgruppen nach dem UltraFAST-Verfahren mit 1 mL einer 1:1-Lösung aus 33 % Methylamin in EtOH und konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung (>25 %, *trace select*, FLUKA) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur und 15 min bei 60°C inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und der der Überstand abpipettiert. Es wurde drei Mal mit je 300 µL RNAse freiem ddH_2O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuumkonzentrator entfernt.

Aufarbeitung der *o*-4API-modifizierten RNA

Nach Abschluss der Synthese wurden die CPG-Säulchen im Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde das CPG in ein EPPENDORF-Gefäß mit überführt und zur Abspaltung der NPEOC-Schutzgruppe mit 1 mL einer Lösung aus 0.5 M DBU und 40 mM Thymin in Pyridin versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und die überstehende Lösung wurde abpipettiert. Das CPG wurde drei Mal mit je 500 µL trockenem Pyridin gewaschen und anschließend im Feinvakuum getrocknet. Die Abspaltung von der festen Phase und die Entfernung der Schutzgruppen der restlichen Nukleobasen erfolgte nach der UltraMILD-Methode. Hierfür wurden 1 mL 0.05 m K_2CO_3 in MeOH zu dem CPG gegeben und es wurde über Nacht bei

Raumtemperatur inkubiert. Die abgekühlte Suspension wurde mit 6 µL Eisessig neutralisiert, anschließend wurde zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und die überstehende Lösung abpipettiert. Es wurde drei Mal mit je 300 µL RNAse freiem ddH_2O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuumkonzentrator entfernt.

Entfernung der 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe

Zur Entfernung der TBDMS-Schutzgruppe wurde die trockene RNA in 115 µL DMSO vollständig gelöst und anschließend mit 60 µL NEt_3 und 75 µL $NEt_3 \cdot 3HF$ versetzt. Es wurde 2.5 h bei 60 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde diese direkt für die Aufreinigung mittels *GlenPak*™-Säule weiterverwendet.

Erste Aufreinigung mittels *Glen-Pak*™

Die synthetisierten DMTr-on RNA-Stränge wurden zunächst über *GlenPak*™ RNA *Purification Cartridges* der Firma GLENRESEARCH aufgereinigt. Dafür wurde die Säule mit 0.5 mL Acetonitril gefolgt von 1 mL 2 M TEAA-Lösung konditioniert. Anschließend wurden die zuvor erhaltenen Oligonukleotidlösungen mit 1.75 mL *GlenPak*™-RNA-*Quenching*-Puffer (GLENRESEARCH) versetzt und auf die Säule gegeben. Zur Entfernung der Abbruchstränge wurde mit 1 mL einer Lösung aus 10 % MeCN und 90% 2 M TEAA (pH = 7.0) eluiert. Anschließend wurde mit 1 mL RNAse freiem ddH2O gewaschen. Zur Entfernung der DMTr-Schutzgruppe wurden 2 mL 2 %-iger TFA-Lösung auf die Säule gegeben, danach wurde mit 2 mL RNAse-freiem ddH_2O gewaschen. Die aufgereinigte DNA wurde mit 1 mL einer Lösung aus 1 M NH_4HCO_3 und 30% MeCN von der Säule eluiert. Das Lösungsmittel wurde am Vakuumkonzentrator entfernt.

Zweite Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC

Um restliche Verunreinigungen wie unmodifizierte RNA, noch vorhandene Abbruchstränge oder überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde mittels semipräparativer HPLC eine zweite Aufreinigung durchgeführt. Dazu wurde die jeweilige Probe in 300 µL RNAse freiem ddH_2O gelöst. Die Detektion der erwünschten Fraktion erfolgte über die charakteristische Absorptionswellenlänge der Oligonukleotide sowie des jeweiligen Chromophors. Es wurde mit einem Gradienten aus RNAse freiem 0.1 M NH_4HCO_3-Puffer und MeCN eluiert.

Tabelle 22: HPLC-Protokoll zur Aufreinigung der modifizierten RNA-Stränge mit A = 0.1 M NH_4HCO_3-Puffer und B = MeCN.

RNA-Sequenz	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Flussrate [mL/min]	$\lambda_{Abs.}$ [nm]
RNA1-4_*o*-4API	0-15	50	60	2.5	260, 290, 385
cs_RNA1-5_m⁶a	0-15	50	60	2.5	260, 290

Charakterisierung mittels Massenspektroskopie und analytischer HPLC

Die einzelnen Fraktionen nach der HPLC-Aufreinigung wurden im Vakuumkonzentrator eingeengt und mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert. Hierbei wurde RNAse-freie 3-HPA Matrix verwendet. Saubere Fraktionen, welche die gesuchte Masse aufwiesen, wurden vereinigt. Die Reinheit der Vereinigten Stränge wurde durch analytische HPLC bestätigt. Es wurde mit einem Gradienten aus RNAse freiem 0.1 M NH_4HCO_3-Puffer und MeCN eluiert.

Tabelle 23: HPLC-Protokoll zur Analyse der modifizierten RNA-Stränge mit A = 0.1 M NH_4HCO_3-Puffer und B = MeCN.

RNA-Sequenz	Gradient [% B in A]	Laufzeit [min]	Temperatur [°C]	Flussrate [mL/min]	$\lambda_{Abs.}$ [nm]
RNA1-4_*o*-4API	0-15	20	60	1.0	260, 290, 385
cs_RNA1-4_m⁶a	0-15	20	60	1.0	260, 290
cs_RNA5_m⁶a	0-20	20	60	1.0	260, 290

Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der einzelnen RNA-Proben erfolgte analog zur DNA.

$$\varepsilon_{260} = nX \cdot \varepsilon_X + (nA \cdot \varepsilon_A + nC \cdot \varepsilon_c + nG \cdot \varepsilon_G + nT \cdot \varepsilon_T) \cdot 0.9$$

ε molarer Extinktionskoeffizient bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm

X die verschiedenen Chromophore in der DNA

n Anzahl der vorhandenen Basen/Chromophore

Die einzelnen Extinktionskoeffizienten sind in nachfolgend aufgelistet und variieren leicht. Für m6a wurde der Einfluss der Methylierung auf den

Extinktionskoeffizienten als nicht signifikant angenommen, deshalb wurde näherungsweise derselbe Wert wie für a verwendet.

Tabelle 24: Literaturbekannte Molare Extinktionskoeffizienten bei 260 nm der Chromophore bzw. Nukleotide in RNA.

Chromophor bzw. Nukleotid	ε_{260} [L·mol^{-1}·cm^{-1}]
o-4API	22700 [52]
a /m^{6}a	15400 [54]
c	7200 [54]
g	11500 [54]
u	9900 [54]

Die molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel 6.3.4 aufgeführt.

Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte analog zu den DN-Duplexen und es wurden 1.00 Äq. der modifizierten Einzelstränge mit 1.5 Äq. der komplementären Gegenstränge (1.00 Äq. für chromophorhaltige Gegenstränge) in 100 µL 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP_i; pH = 7.0, RNAse frei) und 62.5 µL 250 mM NaCl-Lösung (RNAse frei) für 10 min bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde mit RNAse-freiem ddH_2O auf 1 mL aufgefüllt, sodass die Endkonzentration des Doppelstrangs 2.5 µM betrug. Die so erhaltenen Lösungen wurden für die Absorptions- und Emissionsmessungen verwendet.

6.3.4 Charakterisierung der Oligonukleotide

Oligonukleotid	ε_{260} [L·mol^{-1}·cm^{-1}]	Masse berechnet [Da]	Masse gefunden [Da]
DNA1_*o*-4API	134660	3985	3987
DNA2_*o*-4API	122780	3967	3968

DNA1_DMANI1	172320	5255	5257
cs_DNA_DMANI1	166380	5246	5245
DNA3_DMANI1	178590	5302	5309
DNA1_DMANI2	172320	5356	5354
cs_DNA_DMANI2	166380	5347	5350
DNA3_DMANI2	178590	5504	5506
DNA1_ANI1	166420	5227	5230
cs_DNA_ANI1	160480	5218	5219
DNA3_ANI1	166790	5246	5249
DNA1_ANI2	166420	5328	5325
cs_DNA_ANI2	160480	5319	5323
DNA3_ANI2	166790	5448	5471 ($+Na^+$)
DNA3_DMANI2/PANI	178590	5490 (2746, 1831, 1373,1098)	1830, 1372, 1098
DNA1_NDI1	160720	5351	5350
cs_DNA_NDI1	154780	5342	5343
DNA3_NDI1	150190	5494	5496
DNA1_NDI2	160720	5452	5475 ($+Na^+$)
cs_DNA_NDI2	154780	5443	5443
DNA3_NDI2	150190	5696	5696
RNA1_*o*-4API	135560	4149	4151
RNA2_*o*-4API	125660	4103	4107
RNA3_*o*-4API	128540	4181	4184
RNA4_*o*-4API	120800	4101	4102
cs_RNA1_m⁶a	126720	4152	4156
cs_RNA2_m⁶a	136620	4198	4198
cs_RNA3_m⁶a	121860	4150	4154
cs_RNA4_m⁶a	129600	4230	4231
cs_RNA5_m⁶a	164880	5398	5400

7 Bildquellenverzeichnis

Abbildung 9

"Averaged NMR structures. The 4AP moiety is marked red and DAP green; nucleotides A, G, C and T are rendered blue, yellow, orange and violet. The artificial base pair exists in the "1H" (a) and the "2H" configuration (b). White arrows indicate the direction of view on the central base pair in (c). RMSD among all hydrogen atoms (except methyl) is 0.43 Å and 0.55 Å, respectively."

Autor: L. Dehmel, F.Berndt, M. Weinberger, M. Sajadi, I. Ioffe, H.-A. Wagenknecht, N. P. Ernsting

Lizenziert unter Creative Commons-Lizenz CC BY 3.0 (public domain, öffentliche Domäne)

https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/cp/c5cp06972f

Abbildung 10

"NMR structure of DNA2-4. Residue 2 is shown red; 4 in green; and A, G, C, and T in blue, yellow, orange, and violet, respectively. White arrows indicate the direction of view of the central base pair in Figure 2 and Figure S2. The RMSD for all H atoms (except methyl) is 0.54 Å." und "*View of the central base pair of DNA**2**-**4** as indicated in Figure 1. The 4AP nucleoside **2** is on the left and the DAP nucleoside **4** on the right."*

Autor: M. Merkel, L. Dehmel, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201608712

Die Verwendung dieser Abbildung in vorliegender Arbeit wurde unter der Lizenznummer 6336510517226 genehmigt.

Abbildung 12

„NMR-Struktur des Doppelstrangs DNA1-5 mit verschiedenen Ansichten a und b."

Autor: M. Merkel

Lizenziert unter KITopen-Lizenz

https://publikationen.bibliothek.kit.edu/1000064241

Die Verwendung dieser Abbildung in vorliegender Arbeit wurde durch den Autor M. Merkel genehmigt.

8 Literaturverzeichnis

[1] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1953**, *39*, 84-97.

[2] A. Cappannini, A. Ray, E. Purta, S. Mukherjee, P. Boccaletto, S. N. Moafinejad, A. Lechner, C. Barchet, Bruno P. Klaholz, F. Stefaniak, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **2023**, *52*, D239-D244.

[3] P. C. He, C. He, *EMBO J.* **2021**, *40*, e105977.

[4] X. Jiang, B. Liu, Z. Nie, L. Duan, Q. Xiong, Z. Jin, C. Yang, Y. Chen, *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 74.

[5] D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, M. Salmon-Divon, N. Amariglio, G. Rechavi, *Nature Protocols* **2013**, *8*, 176-189.

[6] Q. Zhang, Y. Dai, X. Teng, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, *64*, e202420977.

[7] L. M. Wilhelmsson, *Q. Rev. Biophys.* **2010**, *43*, 159-183.

[8] G. Saroja, T. Soujanya, B. Ramachandram, A. Samanta, *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 405-410.

[9] A. Severini, A. Richard Morgan, *Anal. Biochem.* **1991**, *193*, 83-89.

[10] A. S. Biebricher, I. Heller, R. F. Roijmans, T. P. Hoekstra, E. J. Peterman, G. J. Wuite, *Nat Commun* **2015**, *6*, 7304.

[11] J. Kapuscinski, *Biotech. Histochem.* **1995**, *70*, 220-233.

[12] K. J. Embrey, M. S. Searle, D. J. Craik, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *211*, 437-447.

[13] T. Idziorek, J. Estaquier, F. De Bels, J.-C. Ameisen, *J. Immunol. Methods* **1995**, *185*, 249-258.

[14] S. A. Latt, G. Stetten, *J. Histochem. Cytochem.* **1976**, *24*, 24-33.

[15] J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, *Science* **1987**, *238*, 336-341.

[16] B. B. Rosenblum, L. G. Lee, S. L. Spurgeon, S. H. Khan, S. M. Menchen, C. R. Heiner, S. M. Chen, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4500-4504.

[17] T. Kekić, J. Lietard, *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 14803.

[18] T. Ha, X. Zhuang, H. D. Kim, J. W. Orr, J. R. Williamson, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9077-9082.

[19] R. Roy, S. Hohng, T. Ha, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 507-516.

[20] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228-1237.

[21] M. E. Hawkins, *Cell Biochem. Biophys.* **2001**, *34*, 257-281.

[22] R. X. F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, Rumney, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678.

[23] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590-11591.

[24] C. Strässler, N. E. Davis, E. T. Kool, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 2160-2171.

[25] J. C. Sutherland, K. P. Griffin, *Radiat. Res.* **1981**, *86*, 399-410.

[26] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**, S. 63-95.

[27] M. Bood, A. F. Füchtbauer, M. S. Wranne, J. J. Ro, S. Sarangamath, A. H. El-Sagheer, D. L. M. Rupert, R. S. Fisher, S. W. Magennis, A. C. Jones, F. Höök, T. Brown, B. H. Kim, A. Dahlén, L. M. Wilhelmsson, M. Grøtli, *Chem. Sci. Int. J.* **2018**, *9*, 3494-3502.

[28] J. N. Wilson, E. T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4265-4274.

[29] K. Evans, D. Xu, Y. Kim, T. M. Nordlund, *J. Fluoresc.* **1992**, *2*, 209-216.

[30] E. L. Rachofsky, E. Seibert, J. T. Stivers, R. Osman, J. B. A. Ross, *Biochem.* **2001**, *40*, 957-967.

[31] M. E. Hawkins, in *Methods Enzymol., Band 450*, Academic Press, **2008**, S. 201-231.

[32] S. L. Driscoll, M. E. Hawkins, F. M. Balis, W. Pfleiderer, W. R. Laws, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 3277-3286.

[33] A. M. Moser, M. Patel, H. Yoo, F. M. Balis, M. E. Hawkins, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 216-222.

[34] K. Wojtuszewski, M. E. Hawkins, J. L. Cole, I. Mukerji, *Biochem.* **2001**, *40*, 2588-2598.

[35] M. E. Hawkins, F. M. Balis, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e62-e62.

[36] K.-Y. Lin, R. J. Jones, M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873-3874.

[37] P. Sandin, L. M. Wilhelmsson, P. Lincoln, V. E. Powers, T. Brown, B. Albinsson, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5019-5025.

[38] L. M. Wilhelmsson, P. Sandin, A. Holmén, B. Albinsson, P. Lincoln, B. Nordén, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9094-9101.

[39] P. Sandin, G. Stengel, T. Ljungdahl, K. Börjesson, B. Macao, L. M. Wilhelmsson, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3924-3933.

[40] K. C. Engman, P. Sandin, S. Osborne, T. Brown, M. Billeter, P. Lincoln, B. Nordén, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5087-5095.

[41] L. M. Wilhelmsson, A. Holmén, P. Lincoln, P. E. Nielsen, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2434-2435.

[42] G. Stengel, B. W. Purse, R. D. Kuchta, *Anal. Biochem.* **2011**, *416*, 53-60.

[43] P. Sandin, K. Börjesson, H. Li, J. Mårtensson, T. Brown, L. M. Wilhelmsson, B. Albinsson, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 157-167.

[44] J. R. Nilsson, T. Baladi, A. Gallud, D. Baždarević, M. Lemurell, E. K. Esbjörner, L. M. Wilhelmsson, A. Dahlén, *Sci Rep* **2021**, *11*, 11365.

[45] A. Wypijewska del Nogal, A. F. Füchtbauer, M. Bood, Jesper R. Nilsson, M. S. Wranne, S. Sarangamath, P. Pfeiffer, V. S. Rajan, A. H. El-Sagheer, A. Dahlén, T. Brown, M. Grøtli, L. M. Wilhelmsson, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 7640-7652.

[46] M. S. Wranne, A. F. Füchtbauer, B. Dumat, M. Bood, A. H. El-Sagheer, T. Brown, H. Gradén, M. Grøtli, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 9271-9280.

[47] M. Weinberger, F. Berndt, R. Mahrwald, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2589-2599.

[48] T. Soujanya, R. W. Fessenden, A. Samanta, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3507-3512.

[49] M. Sajadi, T. Obernhuber, S. A. Kovalenko, M. Mosquera, B. Dick, N. P. Ernsting, *J. Phys. Chem. A.* **2009**, *113*, 44-55.

[50] D. Noukakis, P. Suppan, *J. Lumin.* **1991**, *47*, 285-295.

[51] M. Merkel, L. Dehmel, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 384-388.

[52] M. Merkel, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) 2016.

[53] F. Lang, F. Rönicke, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2023**, *21*, 3079-3082.

[54] F. Lang, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) 2021.

[55] L. Dehmel, F. Berndt, M. Weinberger, M. Sajadi, I. Ioffe, H. A. Wagenknecht, N. P. Ernsting, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*, 6813-6820.

[56] W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 971-988.

[57] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.

[58] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49-53.

[59] T. Forster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.

[60] T. Förster, *Ann. Phys. (Leipzig)* **1948**, *437*, 55-75.

[61] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 187-191.

[62] D. M. J. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 507-517.

[63] S. Jockusch, A. A. Martí, N. J. Turro, Z. Li, X. Li, J. Ju, N. Stevens, D. L. Akins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 493-498.

[64] P. J. Santangelo, B. Nix, A. Tsourkas, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e57.

[65] J. Jung, L. Chen, S. Lee, S. Kim, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee, C.-H. Oh, S. Lee, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2609-2615.

[66] J. Frenkel, *Phys. Rev.* **1931**, *37*, 17-44.

[67] M. Kasha, *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55-70.

[68] S. E. Braslavsky, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 293-465.

[69] A. S. Davydov, *Sov. Phys. Usp.* **1964**, *7*, 145.

[70] M. Kasha, in *Spectroscopy of the Excited State* (Hrsg.: B. Di Bartolo, D. Pacheco, V. Goldberg), Springer US, Boston, MA, **1976**, S. 337-363.

[71] S. C. J. Meskers, *ChemPhysChem* **2023**, *24*, e202300666.

[72] M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.

[73] T. Förster, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 333-343.

[74] H. Braun, T. Förster, *Z. Phys. Chem.* **1972**, *78*, 40-49.

[75] H. Braun, T. Förster, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 1091-1095.

[76] T. Förster, H.-P. Seidel, *Z. Phys. Chem.* **1965**, *45*, 58-71.

[77] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **1983**, S. 1-18.

[78] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **1983**, S. 217-255.

[79] T. Förster, K. Kasper, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1955**, *59*, 976-980.

[80] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **1983**, S. 187-215.

[81] R. Katoh, S. Sinha, S. Murata, M. Tachiya, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2001**, *145*, 23-34.

[82] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**, S. 705-740.

[83] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.

[84] S. Berndl, S. D. Dimitrov, F. Menacher, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2386-2395.

[85] D. Baumstark, H. A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6640-6645.

[86] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2612-2614.

[87] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.

[88] F. Nicoli, M. K. Roos, E. A. Hemmig, M. Di Antonio, R. de Vivie-Riedle, T. Liedl, *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 9941-9947.

[89] Y. J. Seo, H. Rhee, T. Joo, B. H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5244-5247.

[90] K. Ebata, M. Masuko, H. Ohtani, M. Kashiwasake-Jibu, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 836-839.

[91] A. A. Martí, X. Li, S. Jockusch, Z. Li, B. Raveendra, S. Kalachikov, J. J. Russo, I. Morozova, S. V. Puthanveettil, J. Ju, N. J. Turro, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3161-3168.

[92] N. N. Dioubankova, A. D. Malakhov, D. A. Stetsenko, V. A. Korshun, *Russ. Chem. Bull.* **2004**, *53*, 463-470.

[93] K. Ishii, S. Tsuchitani, M. Toyama, H. Shigeto, S. Yamamura, T. Ohtsuki, Y. Imai, M. Kitamatsu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2022**, *71*, 128838.

[94] W. R. Algar, M. Massey, U. J. Krull, *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 555-567.

[95] C. Peyratout, L. Daehne, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 3032-3039.

[96] A. Fürstenberg, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8600-8609.

[97] F. Würthner, *Chem. Commun.* **2004**, 1564-1579.

[98] L. Feiler, H. Langhals, K. Polborn, *Liebigs Ann.* **1995**, *1995*, 1229-1244.

[99] C. Kohl, T. Weil, J. Qu, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5297-5310.

[100] J. Brzezińska, K. Adrych-Rożek, Z. Jahnz-Wechmann, J. Boryski, W. T. Markiewicz, *BioTechnologia* **2012**, *93*, 391-399.

[101] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Chem Rev* **2012**, *112*, 4221-4245.

[102] D. Lachmann, S. Berndl, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 13.

[103] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4918-4925.

[104] C. B. Nielsen, M. Petersen, E. B. Pedersen, P. E. Hansen, U. B. Christensen, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 260-269.

[105] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4174-4175.

[106] S. Zhang, J. C. Chaput, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2010**, *42*, 4.40.41-44.40.18.

[107] H. Asanuma, K. Murayama, Y. Kamiya, H. Kashida, *Polym. J.* **2017**, *49*, 279-289.

[108] H. Asanuma, T. Takarada, T. Yoshida, D. Tamaru, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2671-2673.

[109] H. Kashida, M. Tanaka, S. Baba, T. Sakamoto, G. Kawai, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 777-784.

[110] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2217-2223.

[111] S. Werder, V. L. Malinovskii, R. Häner, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2011-2014.

[112] H. Bittermann, D. Siegemund, V. L. Malinovskii, R. Häner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15285-15287.

[113] S. M. Langenegger, R. Häner, *Chem. Commun.* **2004**, 2792-2793.

[114] A. Weissbach, in *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance* (Hrsg.: J.-P. Jost, H.-P. Saluz), Birkhäuser Basel, Basel, **1993**, S. 1-10.

[115] R. D. Hotchkiss, *J. Biol. Chem.* **1948**, *175*, 315-332.

[116] D. B. Dunn, J. D. Smith, *Biochemical Journal* **1958**, *68*, 627-636.

[117] G. Medoff, S. Overholt, *J. Bacteriol.* **1970**, *102*, 213-216.

[118] K. Boulias, E. L. Greer, *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 411-428.

[119] F. R. Traube, T. Carell, *RNA Biol.* **2017**, *14*, 1099-1107.

[120] B. H. Ramsahoye, C. S. Davies, K. I. Mills, *Blood Rev.* **1996**, *10*, 249-261.

[121] M. Ehrlich, M. A. Gama-Sosa, L.-H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, C. Gehrke, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 2709-2721.

[122] G. Zhang, H. Huang, D. Liu, Y. Cheng, X. Liu, W. Zhang, R. Yin, D. Zhang, P. Zhang, J. Liu, C. Li, B. Liu, Y. Luo, Y. Zhu, N. Zhang, S. He, C. He, H. Wang, D. Chen, *Cell* **2015**, *161*, 893-906.

[123] Eric L. Greer, Mario A. Blanco, L. Gu, E. Sendinc, J. Liu, D. Aristizábal-Corrales, C.-H. Hsu, L. Aravind, C. He, Y. Shi, *Cell* **2015**, *161*, 868-878.

[124] Y. Fu, G.-Z. Luo, K. Chen, X. Deng, M. Yu, D. Han, Z. Hao, J. Liu, X. Lu, Louis C. Doré, X. Weng, Q. Ji, L. Mets, C. He, *Cell* **2015**, *161*, 879-892.

[125] M. J. Koziol, C. R. Bradshaw, G. E. Allen, A. S. H. Costa, C. Frezza, J. B. Gurdon, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 24-30.

[126] Y. Wang, X. Chen, Y. Sheng, Y. Liu, S. Gao, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 11594-11606.

[127] M. U. Musheev, A. Baumgärtner, L. Krebs, C. Niehrs, *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 630-634.

[128] Y. Kong, L. Cao, G. Deikus, Y. Fan, E. A. Mead, W. Lai, Y. Zhang, R. Yong, R. Sebra, H. Wang, X. S. Zhang, G. Fang, *Science* **2022**, *375*, 515-522.

[129] J. Liu, Y. Zhu, G.-Z. Luo, X. Wang, Y. Yue, X. Wang, X. Zong, K. Chen, H. Yin, Y. Fu, D. Han, Y. Wang, D. Chen, C. He, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13052.

[130] H. S. Jang, W. J. Shin, J. E. Lee, J. T. Do, *Genes* **2017**, *8*, 148.

[131] M. M. Suzuki, A. Bird, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 465-476.

[132] A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396-398.

[133] J. Sandhu, B. Kaur, C. Armstrong, C. J. Talbot, W. P. Steward, P. B. Farmer, R. Singh, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1957-1961.

[134] K. D. Robertson, P. A.Jones, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 461-467.

[135] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457-463.

[136] R. J. Klose, A. P. Bird, *Trends in Biochemical Sciences* **2006**, *31*, 89-97.

[137] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, *99*, 247-257.

[138] M. Kim, J. Costello, *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e322-e322.

[139] S. Kar, S. Parbin, M. Deb, A. Shilpi, D. Sengupta, S. K. Rath, M. Rakshit, A. Patra, S. K. Patra, *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 1017-1032.

[140] N. Besselink, J. Keijer, C. Vermeulen, S. Boymans, J. de Ridder, A. van Hoeck, E. Cuppen, E. Kuijk, *Sci Rep* **2023**, *13*, 6874.

[141] J. Zhu, Y. Yang, L. Li, J. Tang, R. Zhang, *Cancer Biol. Med.* **2023**, 20230403.

[142] L. Song, J. Jia, X. Peng, W. Xiao, Y. Li, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3032.

[143] Z. Liao, J. T. Guo, F. Yang, S. P. Wang, S. Y. Sun, *World J Clin Oncol* **2024**, *15*, 799-805.

[144] M. E. Hegi, A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, R. Stupp, *N Engl J Med* **2005**, *352*, 997-1003.

[145] U. Kurup, D. B. N. Lim, H. Palau, A. V. Maharaj, M. Ishida, J. H. Davies, H. L. Storr, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2024**, *109*, e1889-e1901.

[146] S. Younesian, M. H. Mohammadi, O. Younesian, M. Momeny, S. H. Ghaffari, D. Bashash, *Heliyon* **2024**, *10*, e32366.

[147] M. A. Sánchez-Romero, J. Casadesús, *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 7-20.

[148] Y. Fu, G.-Z. Luo, K. Chen, X. Deng, M. Yu, D. Han, Z. Hao, J. Liu, X. Lu, Louis C. Doré, X. Weng, Q. Ji, L. Mets, C. He, *Cell* **2015**, *161*, 879-892.

[149] Z. K. O'Brown, K. Boulias, J. Wang, S. Y. Wang, N. M. O'Brown, Z. Hao, H. Shibuya, P. E. Fady, Y. Shi, C. He, S. G. Megason, T. Liu, E. L. Greer, *BMC Genomics* **2019**, *20*, 445.

[150] X. Fang, H. Ke, L. Li, M.-J. Lin, *Dyes Pigment.* **2017**, *145*, 469-475.

[151] X. Feng, X. Cui, L.-S. Zhang, C. Ye, P. Wang, Y. Zhong, T. Wu, Z. Zheng, C. He, *Mol. Cell* **2024**, *84*, 596-610.e596.

[152] L.-Q. Chen, Z. Zhang, H.-X. Chen, J.-F. Xi, X.-H. Liu, D.-Z. Ma, Y.-H. Zhong, W. H. Ng, T. Chen, D. W. Mak, Q. Chen, Y.-Q. Chen, G.-Z. Luo, *Cell Discov.* **2022**, *8*, 138.

[153] W.-W. Liu, S.-Q. Zheng, T. Li, Y.-F. Fei, C. Wang, S. Zhang, F. Wang, G.-M. Jiang, H. Wang, *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 70.

[154] X. Zhang, W.-Y. Zhu, S.-Y. Shen, J.-H. Shen, X.-D. Chen, *Biology Direct* **2023**, *18*, 58.

[155] L. Trixl, A. Lusser, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2019**, *10*, e1510.

[156] X. Yang, Y. Yang, B. F. Sun, Y. S. Chen, J. W. Xu, W. Y. Lai, A. Li, X. Wang, D. P. Bhattarai, W. Xiao, H. Y. Sun, Q. Zhu, H. L. Ma, S. Adhikari, M. Sun, Y. J. Hao, B. Zhang, C. M. Huang, N. Huang, G. B. Jiang, Y. L. Zhao, H. L. Wang, Y. P. Sun, Y. G. Yang, *Cell Res.* **2017**, *27*, 606-625.

[157] S. Blanco, S. Dietmann, J. V. Flores, S. Hussain, C. Kutter, P. Humphreys, M. Lukk, P. Lombard, L. Treps, M. Popis, S. Kellner, S. M. Hölter, L. Garrett, W. Wurst, L. Becker, T. Klopstock, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, M. Hrabě de Angelis, R. T. Káradóttir, M. Helm, J. Ule, J. G. Gleeson, D. T. Odom, M. Frye, *EMBO J.* **2014**, *33*, 2020-2039.

[158] P. Li, D. Huang, *Cell. Signal.* **2024**, *123*, 111375.

[159] X. Zhang, K. An, X. Ge, Y. Sun, J. Wei, W. Ren, H. Wang, Y. Wang, Y. Du, L. He, O. Li, S. Zhou, Y. Shi, T. Ren, Y.-g. Yang, Q. Kan, X. Tian, *Breast Cancer Res.* **2024**, *26*, 94.

[160] J. Marcotrigiano, A.-C. Gingras, N. Sonenberg, S. K. Burley, *Cell* **1997**, *89*, 951-961.

[161] L. Volpon, M. J. Osborne, I. Topisirovic, N. Siddiqui, K. L. Borden, *EMBO J.* **2006**, *25*, 5138-5149.

[162] A. Ramanathan, G. B. Robb, S. H. Chan, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7511-7526.

[163] J. Li, L. Wang, Q. Hahn, R. P. Nowak, T. Viennet, E. A. Orellana, S. S. Roy Burman, H. Yue, M. Hunkeler, P. Fontana, H. Wu, H. Arthanari, E. S. Fischer, R. I. Gregory, *Nature* **2023**, *613*, 391-397.

[164] R. Züst, L. Cervantes-Barragan, M. Habjan, R. Maier, B. W. Neuman, J. Ziebuhr, K. J. Szretter, S. C. Baker, W. Barchet, M. S. Diamond, S. G. Siddell, B. Ludewig, V. Thiel, *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 137-143.

[165] G. D. Williams, N. S. Gokhale, D. L. Snider, S. M. Horner, *mSphere* **2020**, *5*, 10.1128/msphere.00202-00220.

[166] H. Zhou, I. J. Kimsey, E. N. Nikolova, B. Sathyamoorthy, G. Grazioli, J. McSally, T. Bai, C. H. Wunderlich, C. Kreutz, I. Andricioaei, H. M. Al-Hashimi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 803-810.

[167] M. Safra, A. Sas-Chen, R. Nir, R. Winkler, A. Nachshon, D. Bar-Yaacov, M. Erlacher, W. Rossmanith, N. Stern-Ginossar, S. Schwartz, *Nature* **2017**, *551*, 251-255.

[168] X. Wang, X. Ma, S. Chen, M. Fan, C. Jin, Y. Chen, S. Wang, Z. Wang, F. Meng, C. Zhang, L. Yang, *Front Immunol* **2024**, *15*, 1517604.

[169] X. Zhang, N. Qin, F. Ji, H. Su, H. Shang, H. Chen, D. Huang, Q. Li, J. Ren, W. Liu, Y. Wang, W. Kang, J. Wu, C.-C. Wong, Z. Cai, M. T. V. Chan, W. K. K. Wu, J. Yu, H. Chen, *Cancer Commun.* **2025**, *e70070*.

[170] Z. Qi, C. Zhang, H. Jian, M. Hou, Y. Lou, Y. Kang, W. Wang, Y. Lv, S. Shang, C. Wang, X. Li, S. Feng, H. Zhou, *Cell Death Discov* **2023**, *9*, 159.

[171] C. Roost, S. R. Lynch, P. J. Batista, K. Qu, H. Y. Chang, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2107-2115.

[172] H. Jin, Z. Shi, T. Zhou, S. Xie, *J Mol Cell Biol* **2024**, *16*.

[173] M. Bayoumi, M. Munir, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4548.

[174] X. Wang, Boxuan S. Zhao, Ian A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He, *Cell* **2015**, *161*, 1388-1399.

[175] S. Su, S. Li, T. Deng, M. Gao, Y. Yin, B. Wu, C. Peng, J. Liu, J. Ma, K. Zhang, *Cell Res.* **2022**, *32*, 982-994.

[176] R. Su, L. Dong, Y. Li, M. Gao, L. Han, M. Wunderlich, X. Deng, H. Li, Y. Huang, L. Gao, C. Li, Z. Zhao, S. Robinson, B. Tan, Y. Qing, X. Qin, E. Prince, J. Xie, H. Qin, W. Li, C. Shen, J. Sun, P. Kulkarni, H. Weng, H. Huang, Z. Chen, B. Zhang, X. Wu, M. J. Olsen, M. Müschen, G. Marcucci, R. Salgia, L. Li, A. T. Fathi, Z. Li, J. C. Mulloy, M. Wei, D. Horne, J. Chen, *Cancer Cell* **2020**, *38*, 79-96.e11.

[177] L. P. Vu, B. F. Pickering, Y. Cheng, S. Zaccara, D. Nguyen, G. Minuesa, T. Chou, A. Chow, Y. Saletore, M. MacKay, J. Schulman, C. Famulare, M. Patel, V. M. Klimek, F. E. Garrett-Bakelman, A. Melnick, M. Carroll, C. E. Mason, S. R. Jaffrey, M. G. Kharas, *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1369-1376.

[178] X. Zhang, H. Cai, H. Xu, S. Dong, H. Ma, *Front. Cardiovasc. Med.* **2023**, *Volume 10 - 2023*.

[179] M. A. Cameron, S. B. Cush, R. P. Hammer, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065-9069.

[180] E. Mao, C. K. Chung, Y. Ji, Y.-h. Lam, P. E. Maligres, *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 7529-7536.

[181] X. Liang, F. Zhang, Z.-P. Yan, Z.-G. Wu, Y. Zheng, G. Cheng, Y. Wang, J.-L. Zuo, Y. Pan, C.-M. Che, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2019**, *11*, 7184-7191.

[182] B. W. Metcalf, J. P. Burkhart, K. Jund, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 35-36.

[183] L. C. J. Gillet, J. Alzeer, O. D. Schärer, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1961-1969.

[184] A. M. Avino, R. Eritja, *Nucleosides and Nucleotides* **1994**, *13*, 2059-2069.

[185] M. P. Reddy, N. B. Hanna, F. Farooqui, *Nucleosides and Nucleotides* **1997**, *16*, 1589-1598.

[186] R. Zhu, X. Li, X. S. Zhao, A. Yu, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 5001-5007.

[187] R. Jing, Y. Li, K. Tajima, Y. Wan, N. Fukui, H. Shinokubo, Z. Kuang, A. Xia, *J. Phys. Chem. Lett.* **2024**, *15*, 1469-1476.

[188] P. Lasitha, *ChemistrySelect* **2021**, *6*, 7936-7943.

[189] J. B. Birks, L. G. Christophorou, *Nature* **1963**, *197*, 1064-1065.

[190] C. Kulkarni, S. J. George, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4537-4541.

[191] K. J. Kilpin, C. M. Clavel, F. Edafe, P. J. Dyson, *Organometallics* **2012**, *31*, 7031-7039.

[192] R. Al-Aqar, A. Atahan, A. C. Benniston, T. Perks, P. G. Waddell, A. Harriman, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 15420-15429.

[193] J. Zhou, C. Fang, Y. Liu, Y. Zhao, N. Zhang, X. Liu, F. Wang, D. Shangguan, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3931-3935.

[194] K. Guan, P. Wang, F. Zhou, Y. Wang, H.-W. Liu, Q. Xie, G. Song, X. Yin, S. Huan, X.-B. Zhang, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 14007-14010.

[195] J. Shorter, *Chem. unserer Zeit* **1985**, *19*, 197-208.

[196] S. Berndl, Universität Regensburg 2010.

[197] W. Saenger, in *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer New York, New York, NY, **1984**, S. 220-241.

[198] D. T. Mateusz, B.-W. Anna, S. Klaudia, W. Martyna, K. Przemysław, Z. W. Krzysztof, *J. Med. Chem.* **2019**, *15*, 550-560.

[199] M. S. Alexiou, V. Tychopoulos, S. Ghorbanian, J. H. P. Tyman, R. G. Brown, P. I. Brittain, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, 837-842.

[200] J. Winkler, E. Urban, D. Losert, V. Wacheck, H. Pehamberger, C. R. Noe, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 710-718.

9 Appendix

9.1 Unterstützende spektroskopische Daten

9.1.1 NMR- und Massespektren der Verbindungen

Verbindung 1

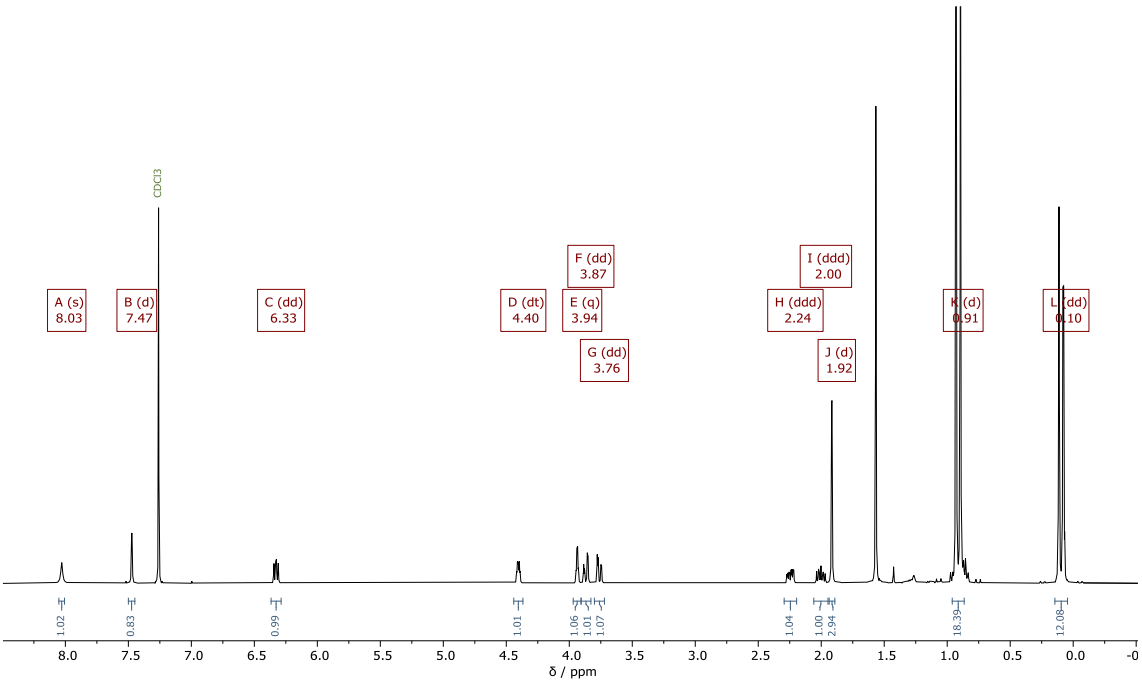


Abbildung A 1: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **1** in $CDCl_3$.

Verbindung 2

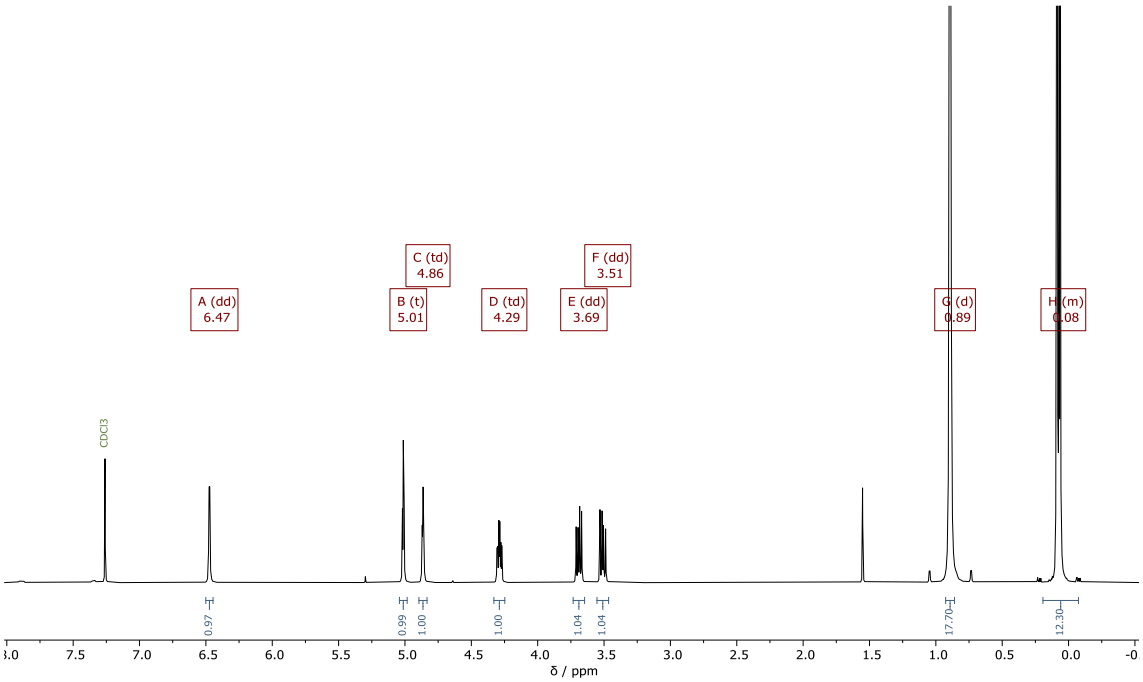


Abbildung A 2: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **2** in $CDCl_3$.

Verbindung 3

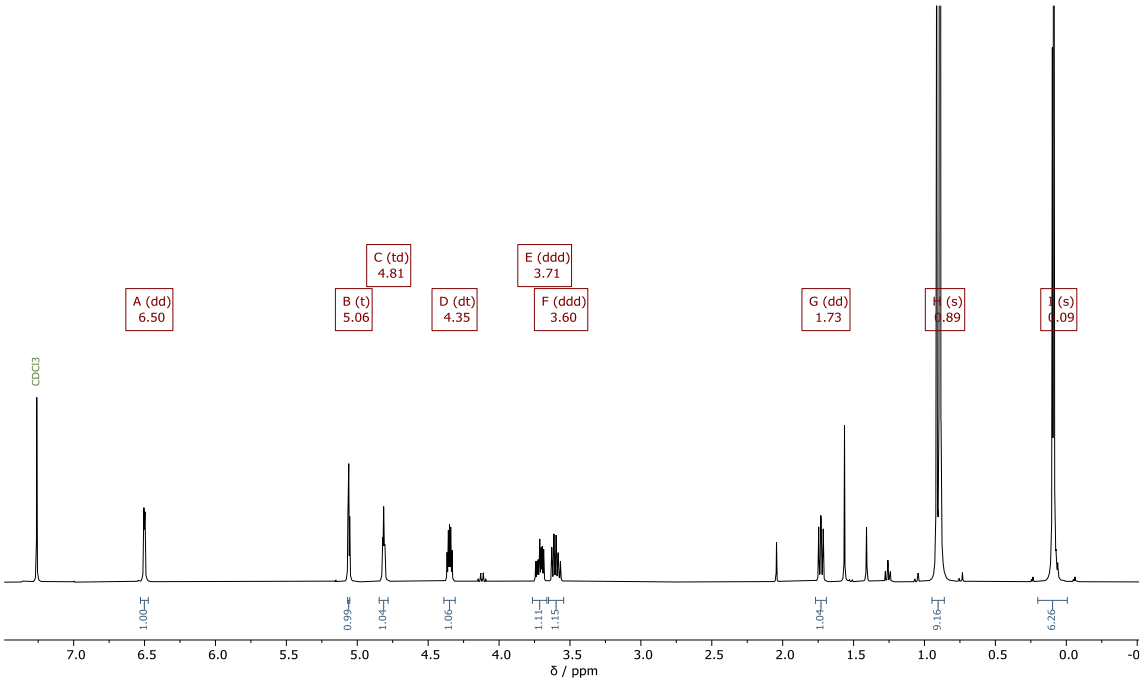


Abbildung A 3: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **3** in $CDCl_3$.

Verbindung 12

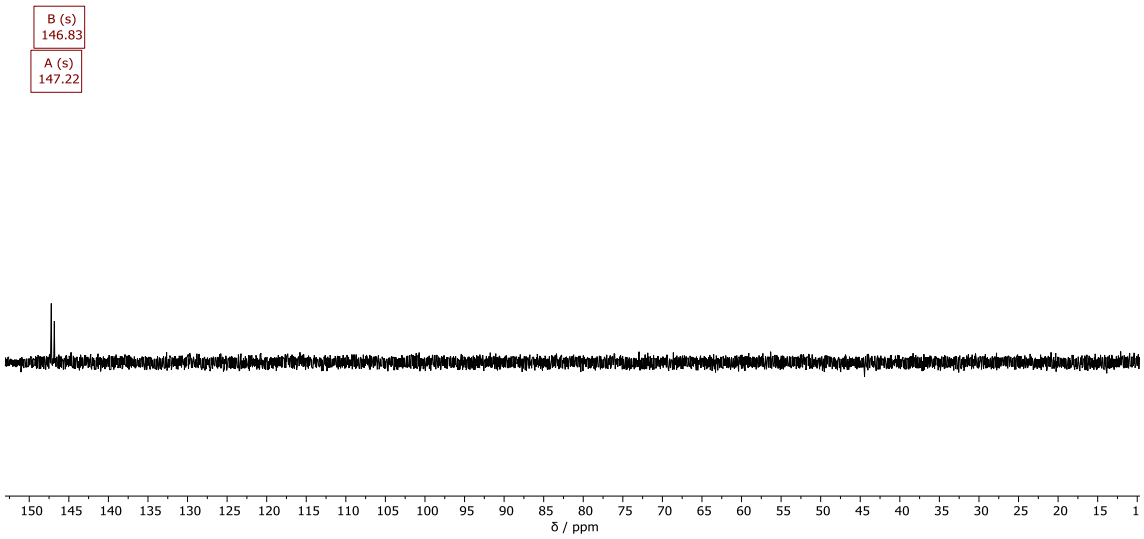


Abbildung A 4: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **12** in DMSO-d_6.

Verbindung 13

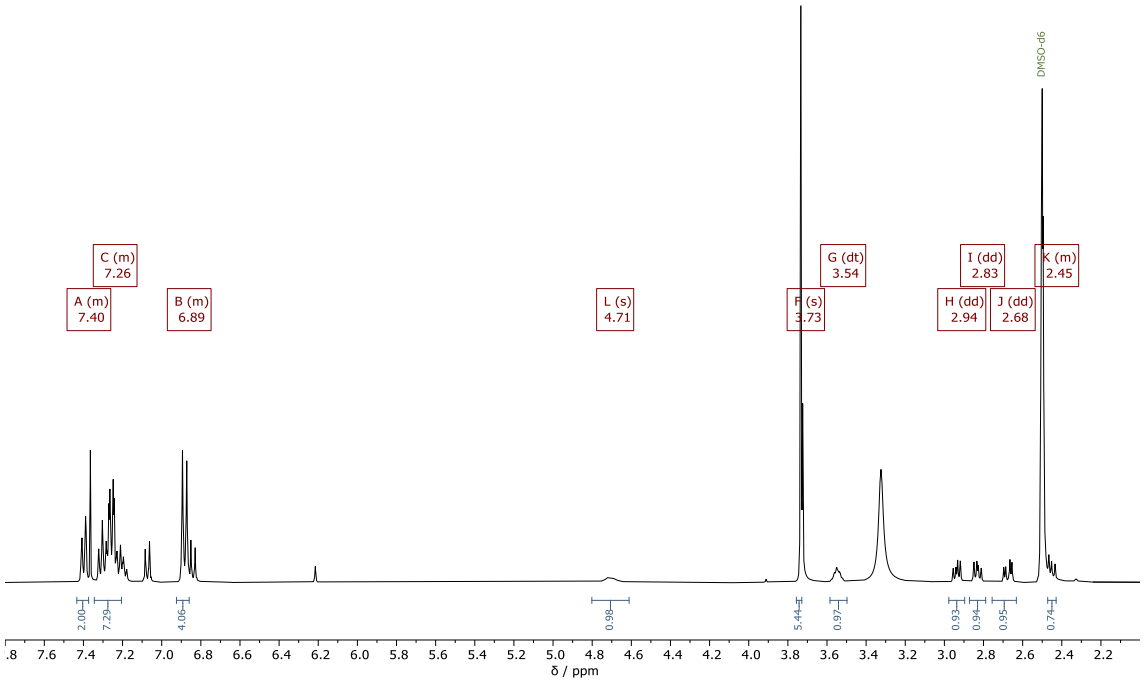


Abbildung A 5: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **13** in DMSO-d_6.

Verbindung14

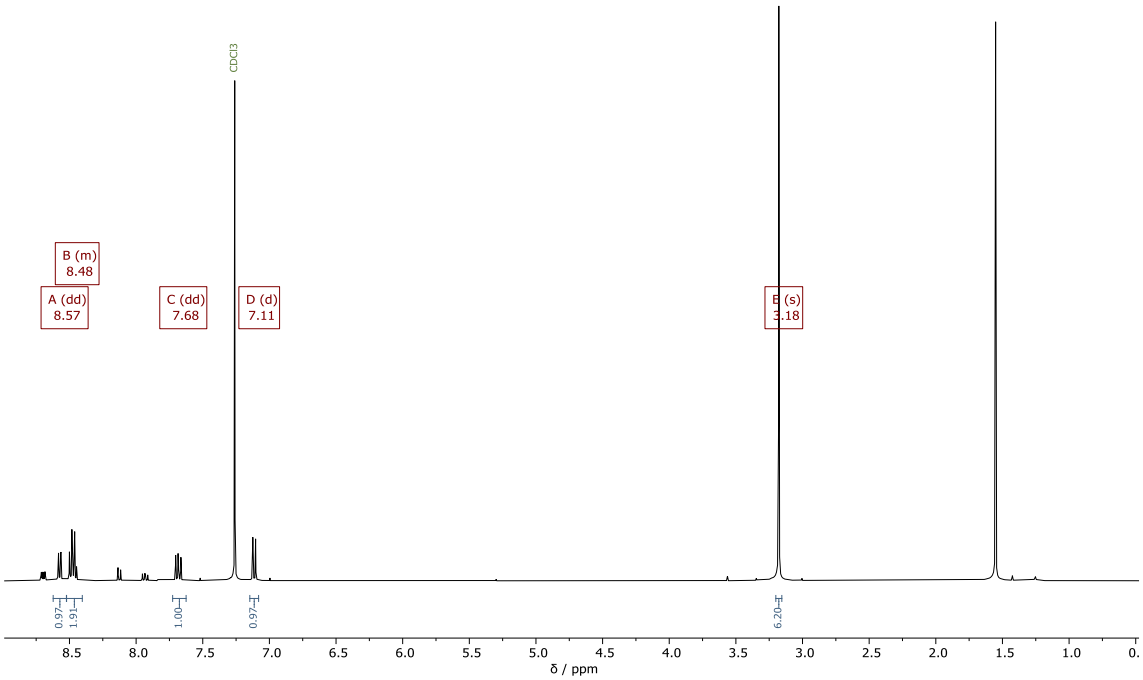


Abbildung A 6: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **14** in $CDCl_3$.

DMANI1

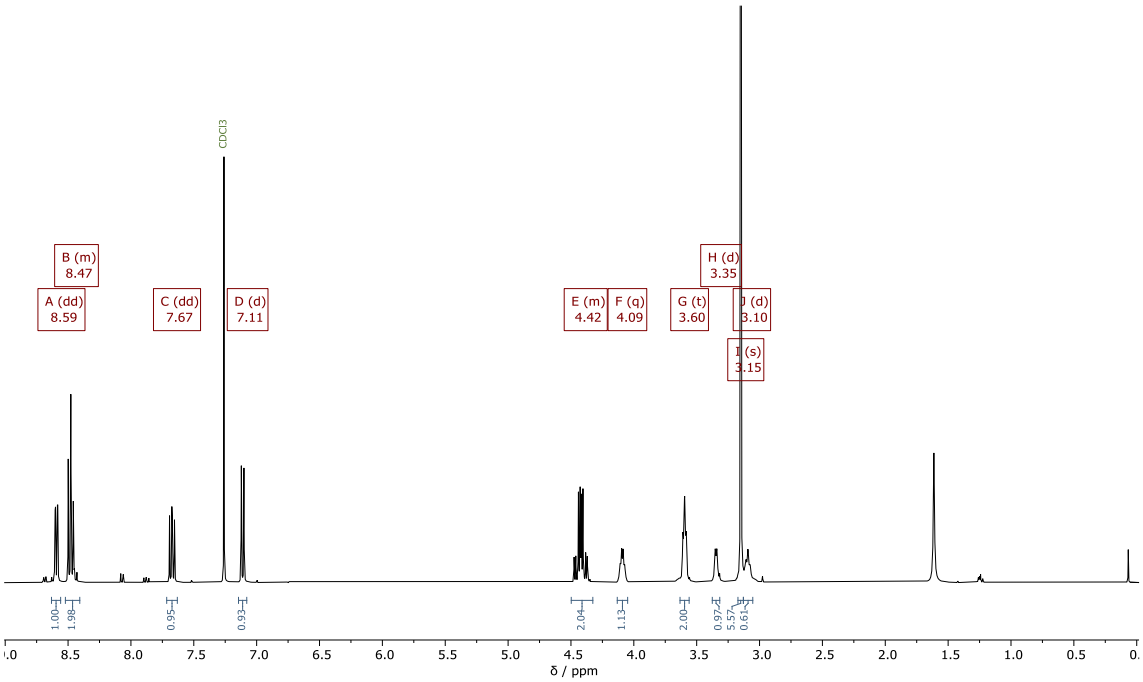


Abbildung A 7: ^{1}H-NMR-Spektrum von **DMANI1** in $CDCl_3$.

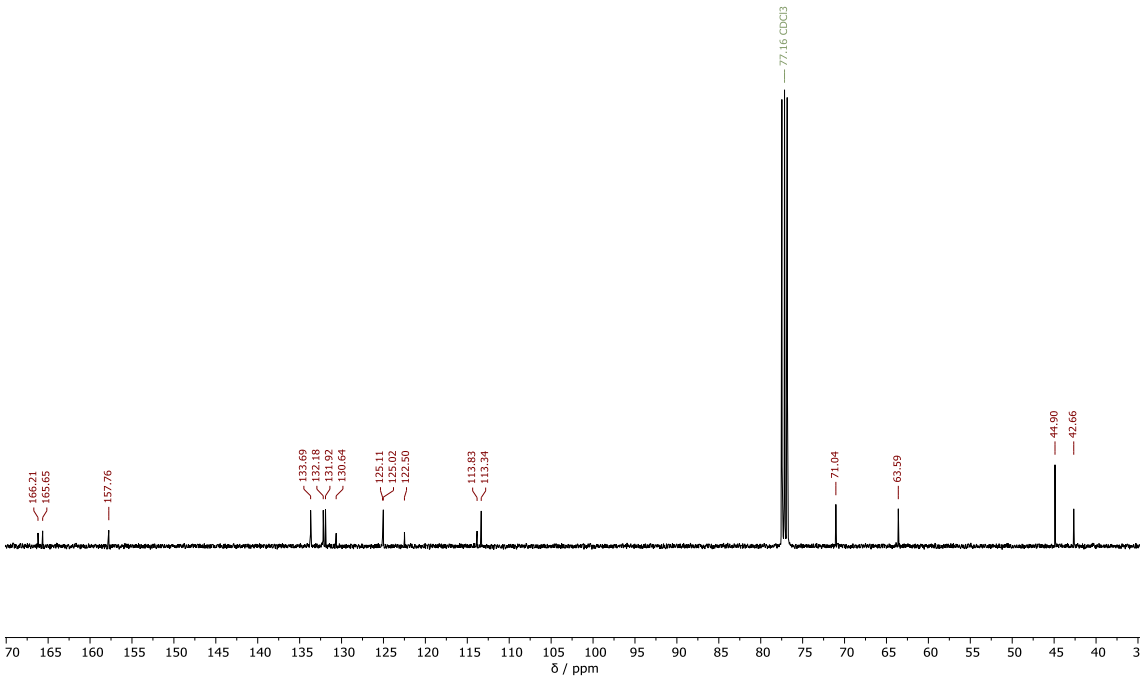


Abbildung A 8: ^{13}C-NMR-Spektrum von **DMANI1** in $CDCl_3$.

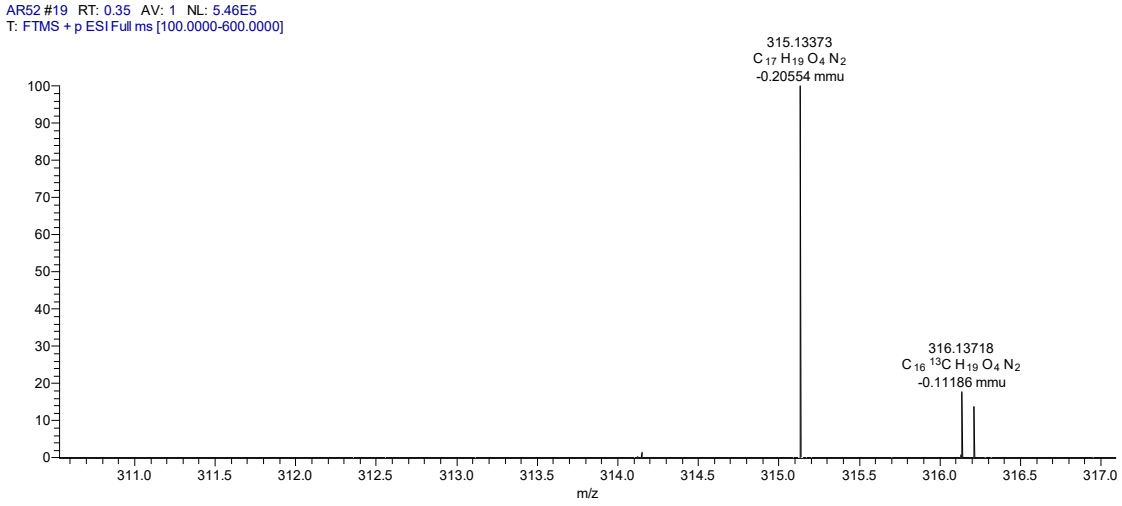


Abbildung A 9: HR-ESI-Massenspektrum von **DMANI1**.

Verbindung 15

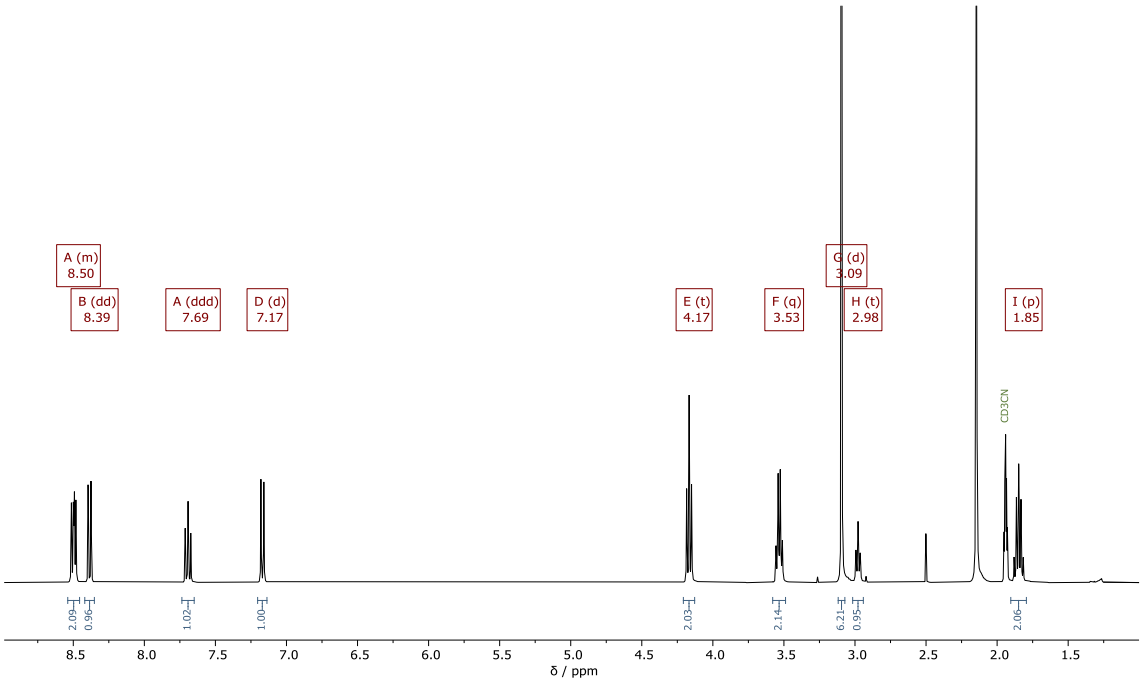


Abbildung A 10: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **15** in CD_3CN.

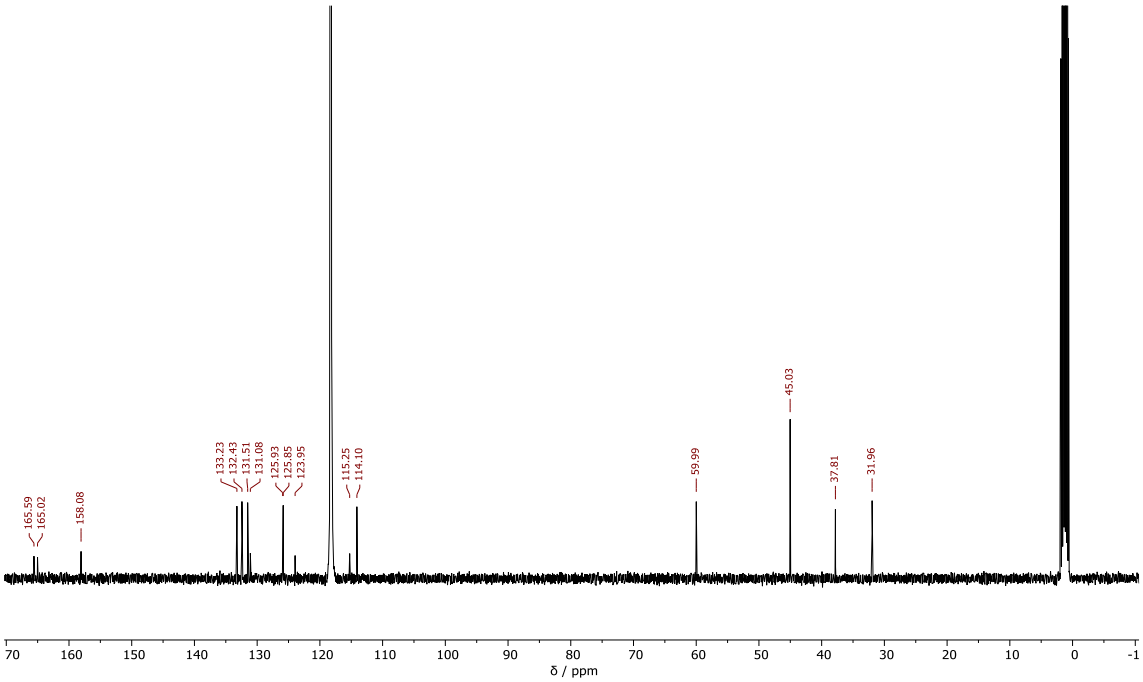


Abbildung A 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **15** in CD_3CN.

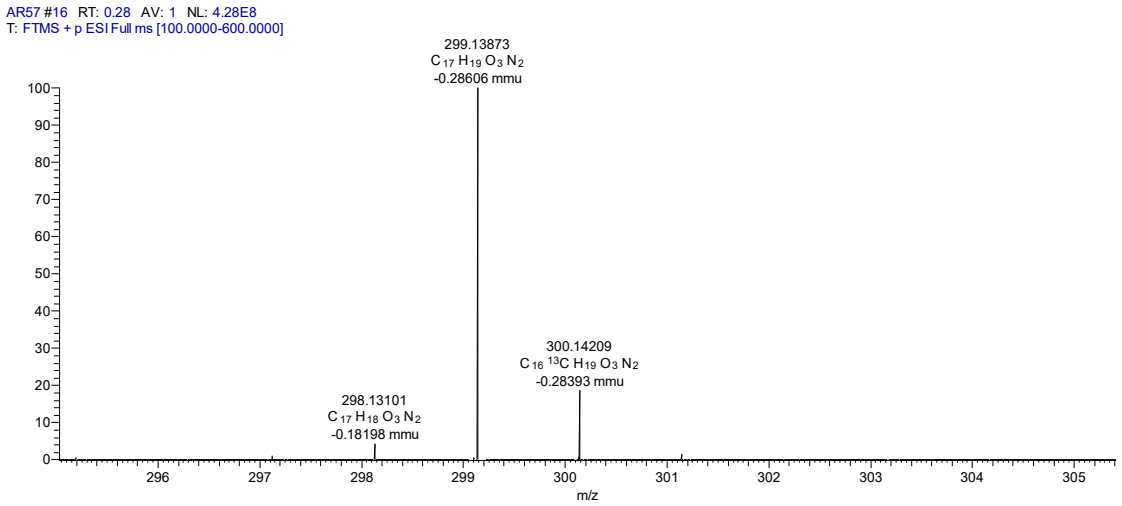


Abbildung A 12: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **15**.

Verbindung 16

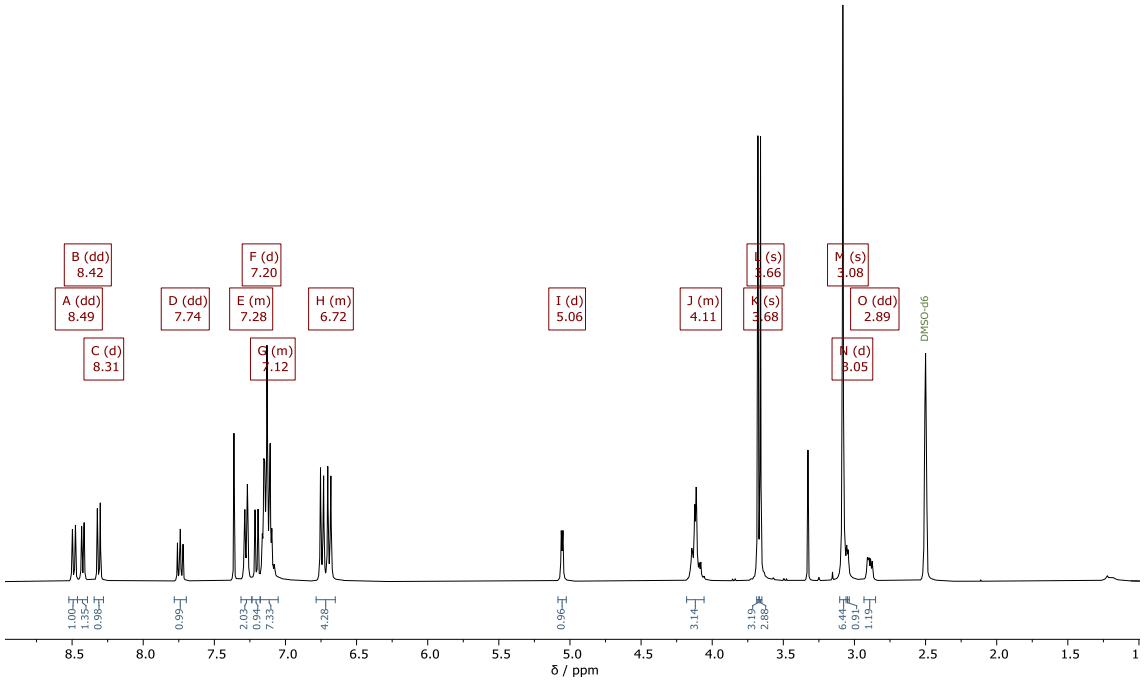


Abbildung A 13: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **16** in DMSO-d_6.

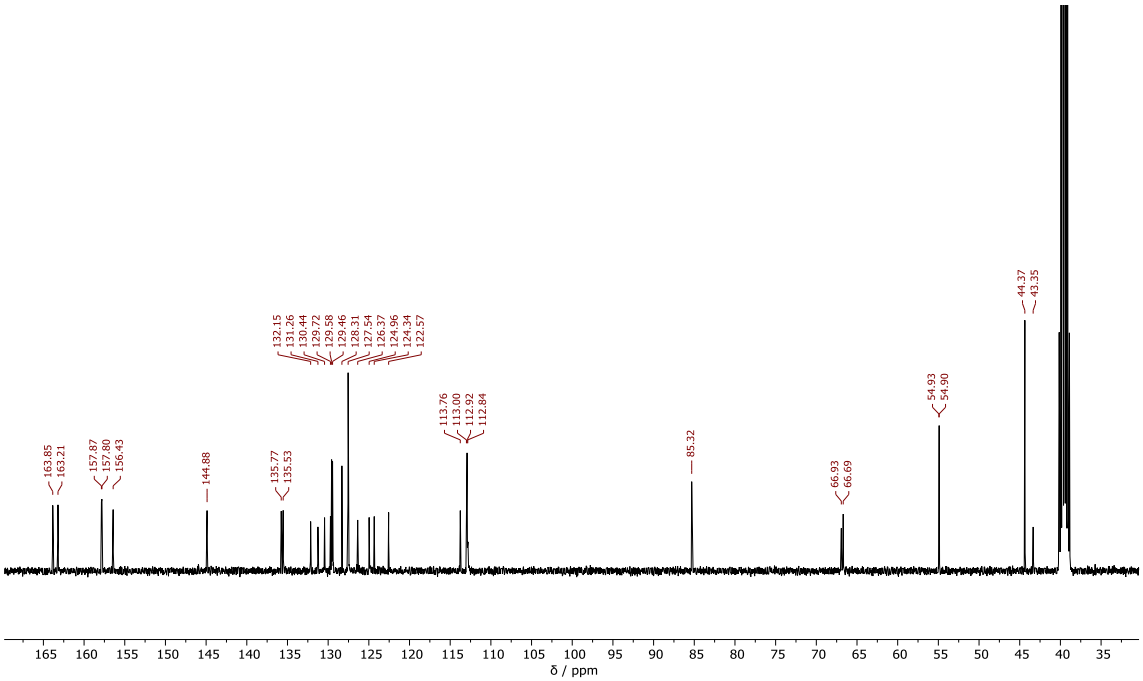


Abbildung A 14: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **16** in DMSO-d_6.

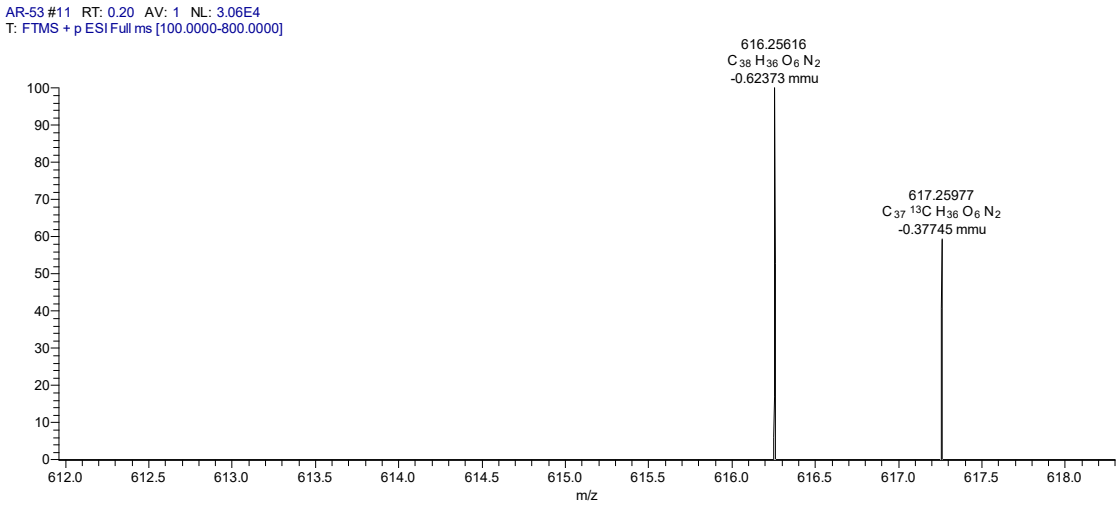


Abbildung A 15: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **16**.

Verbindung 17

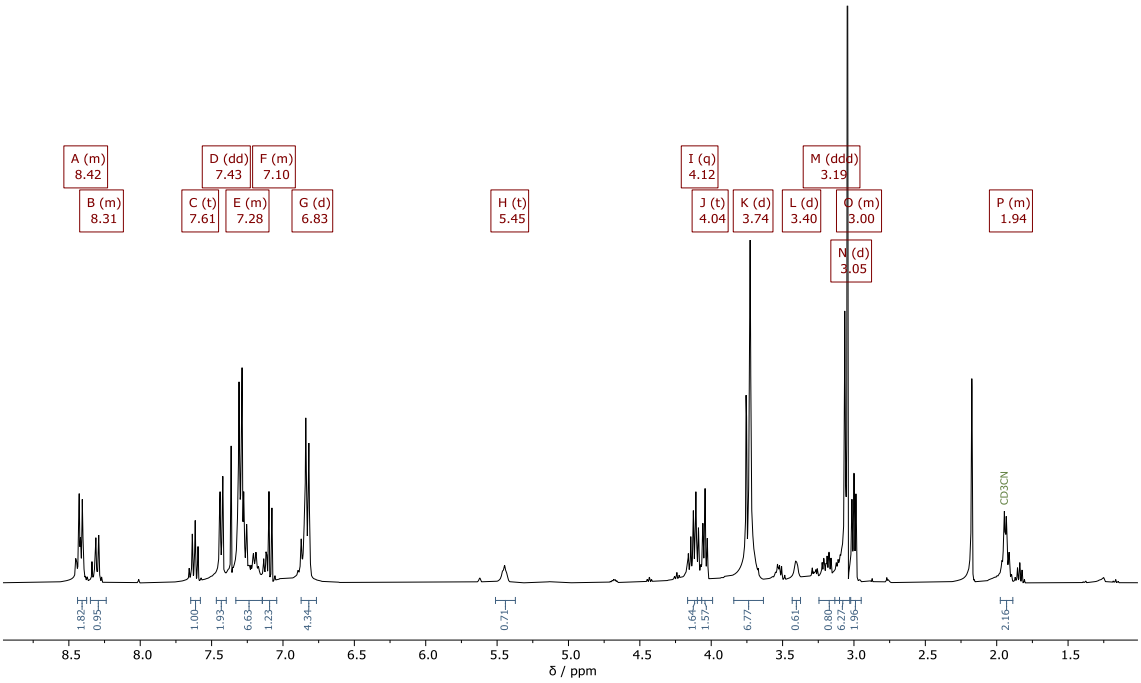


Abbildung A 16: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **17** in CD_3CN.

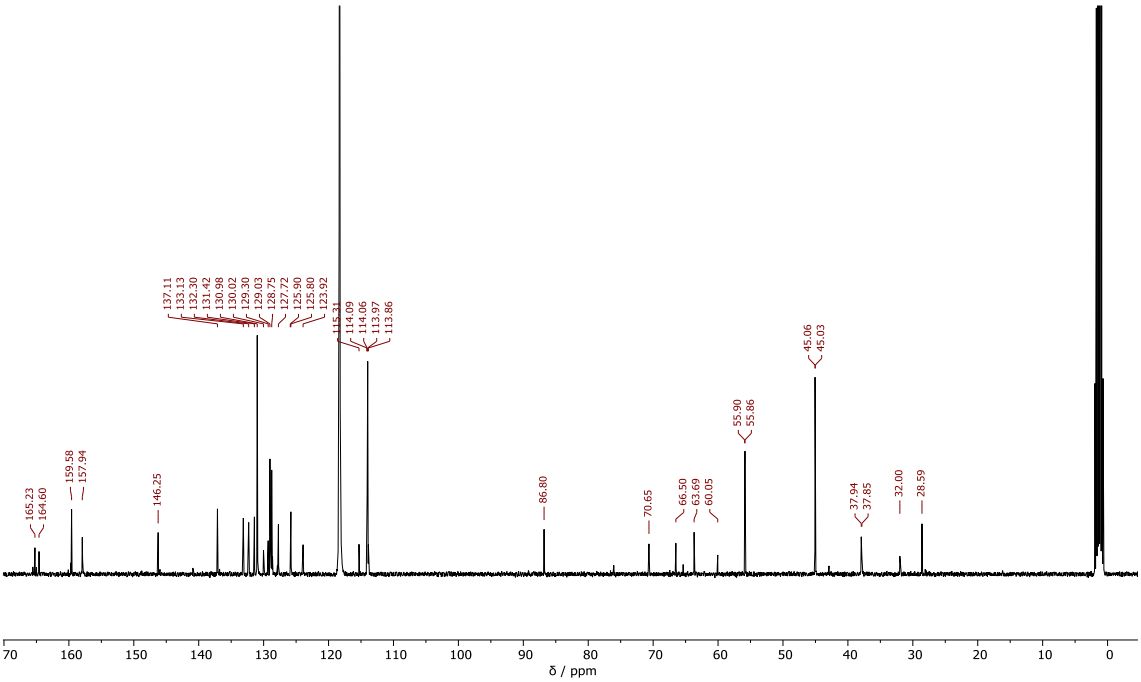


Abbildung A 17: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **17** in CD_3CN.

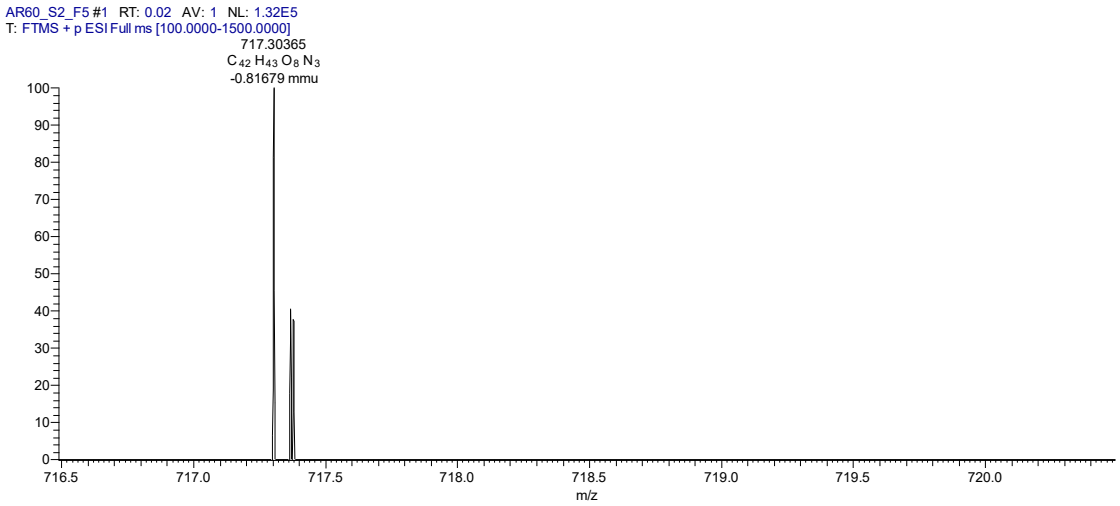


Abbildung A 18: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **17**.

Verbindung 18

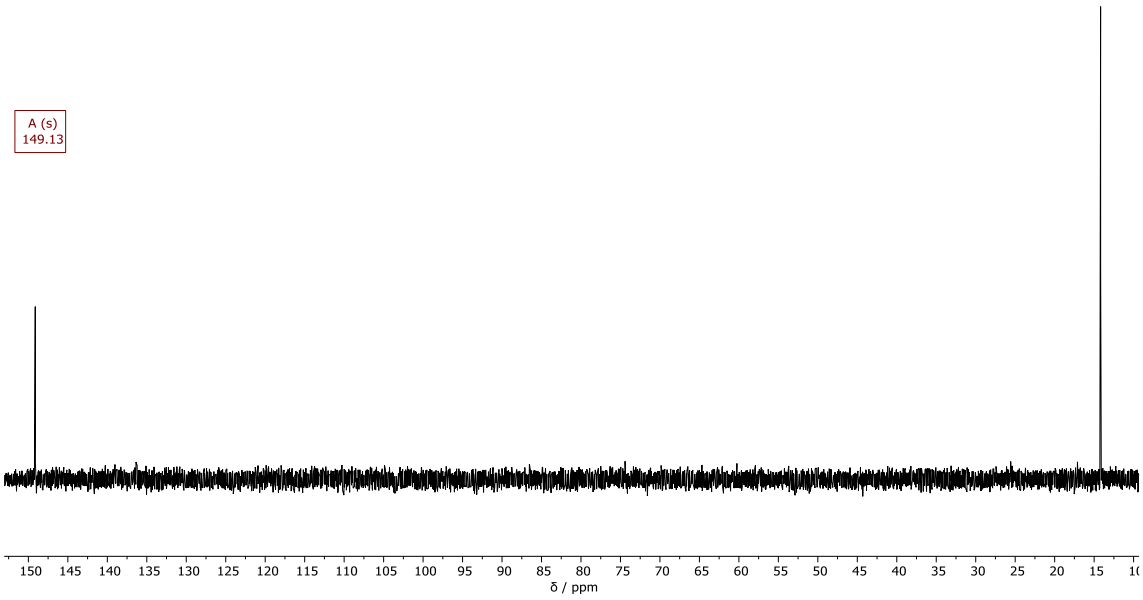


Abbildung A 19: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **18** in $CDCl_3$.

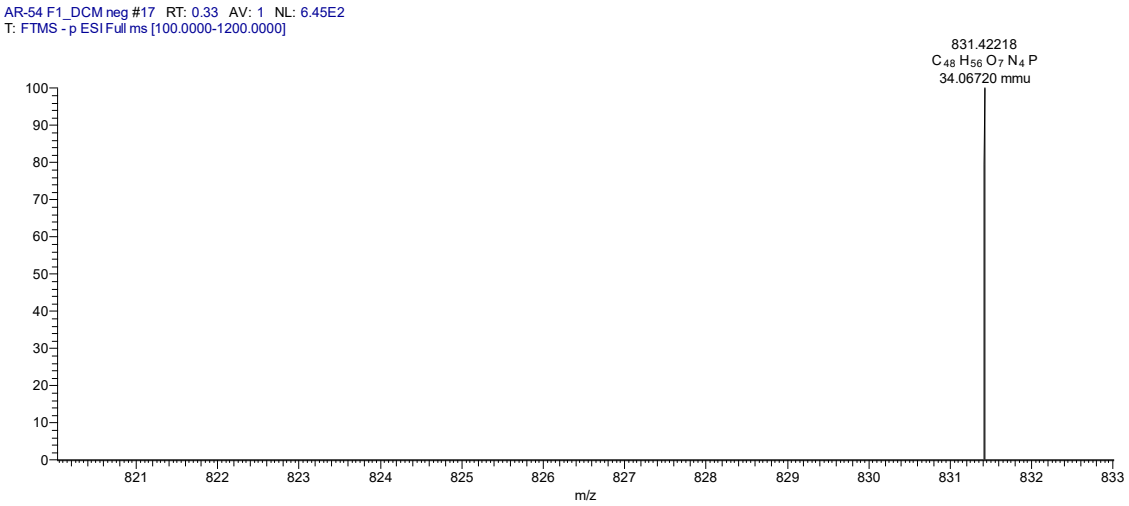


Abbildung A 20: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **18**.

Verbindung 19

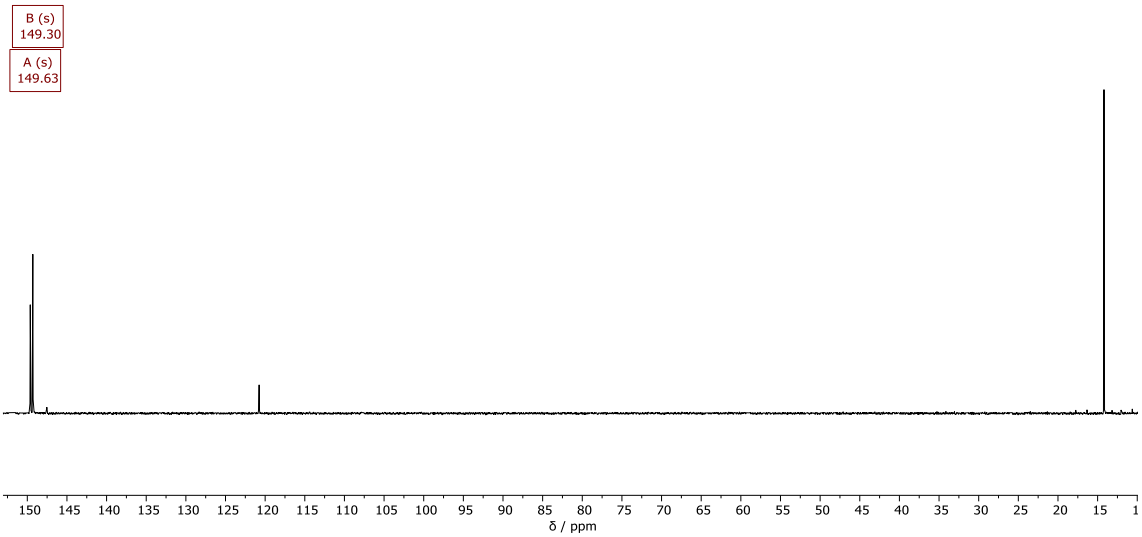


Abbildung A 21: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **19** in $CDCl_3$.

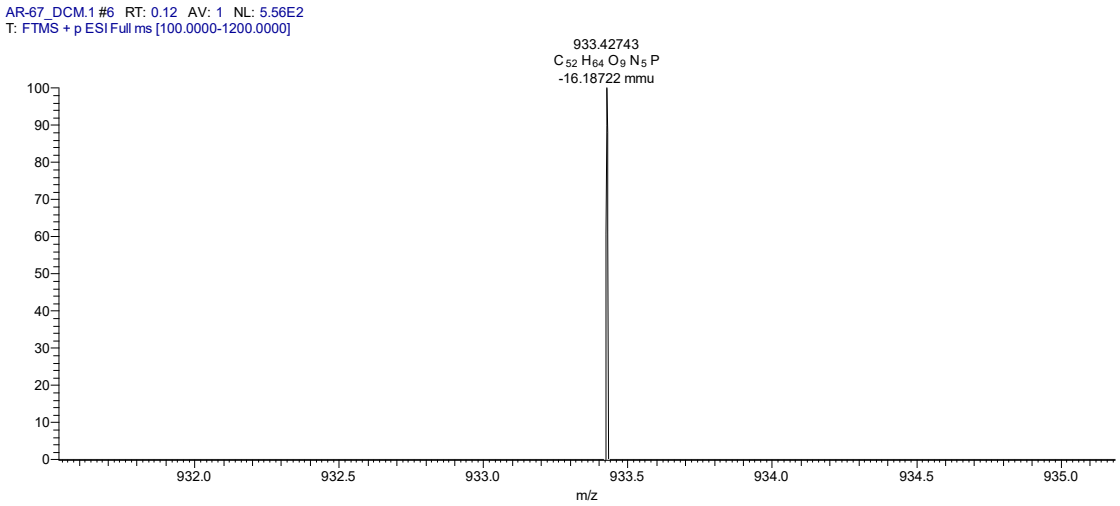


Abbildung A 22: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **19**.

Verbindung 20

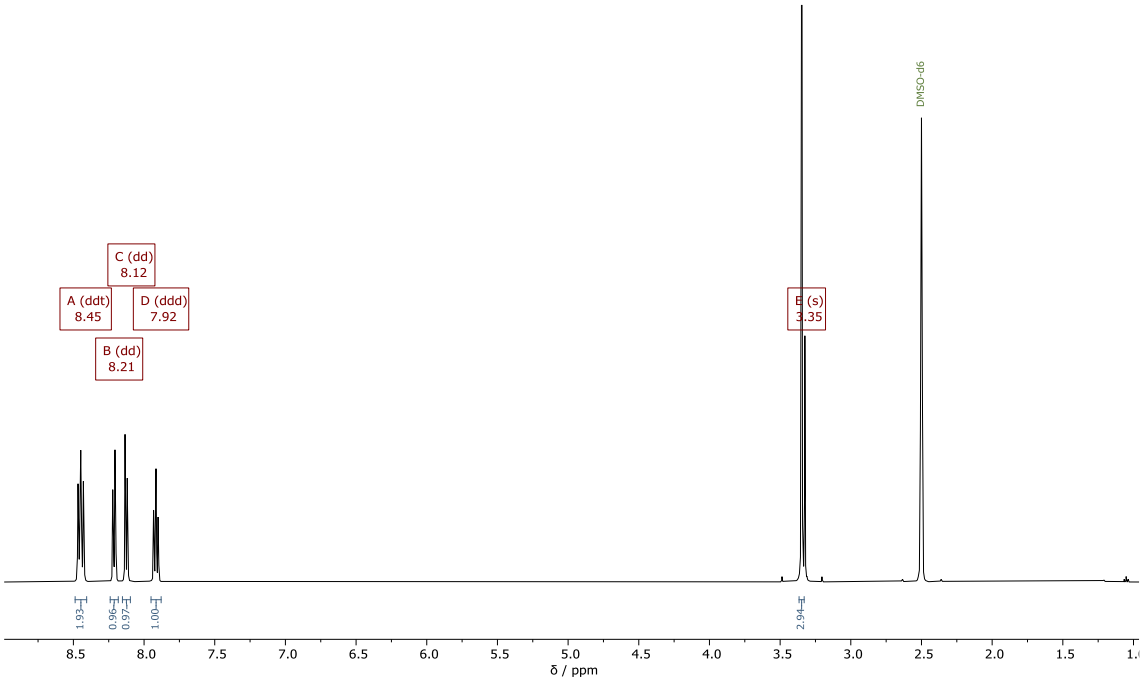


Abbildung A 23: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **20** in DMSO-d_6.

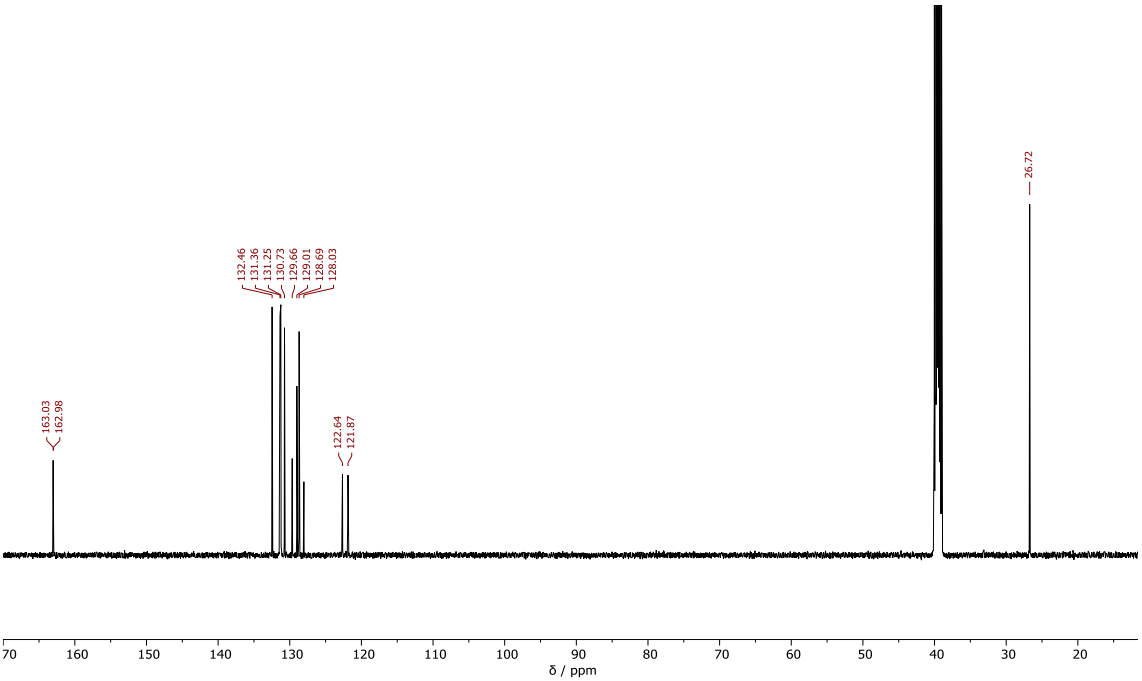


Abbildung A 24: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **20** in DMSO-d_6.

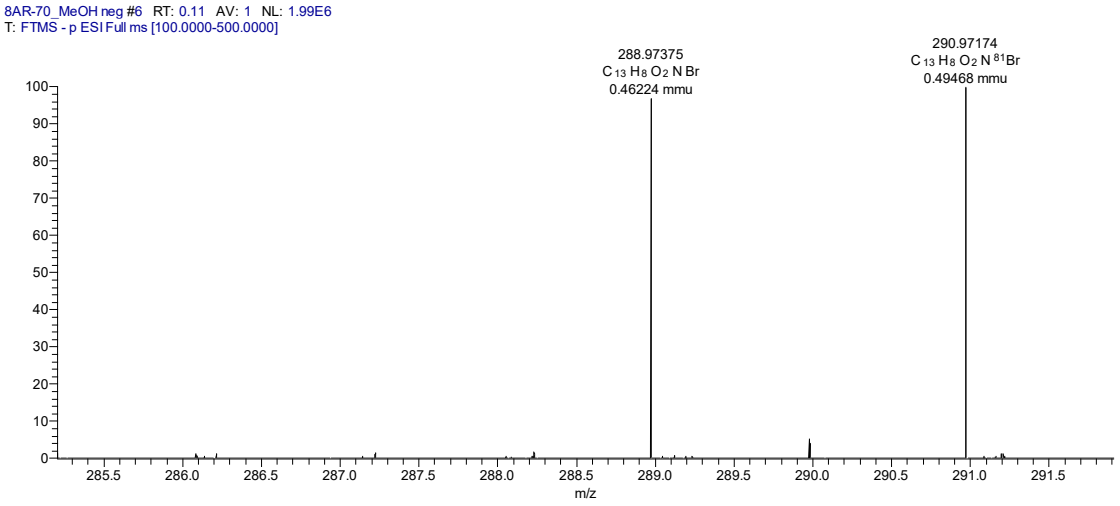


Abbildung A 25: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **20**.

Verbindung 21

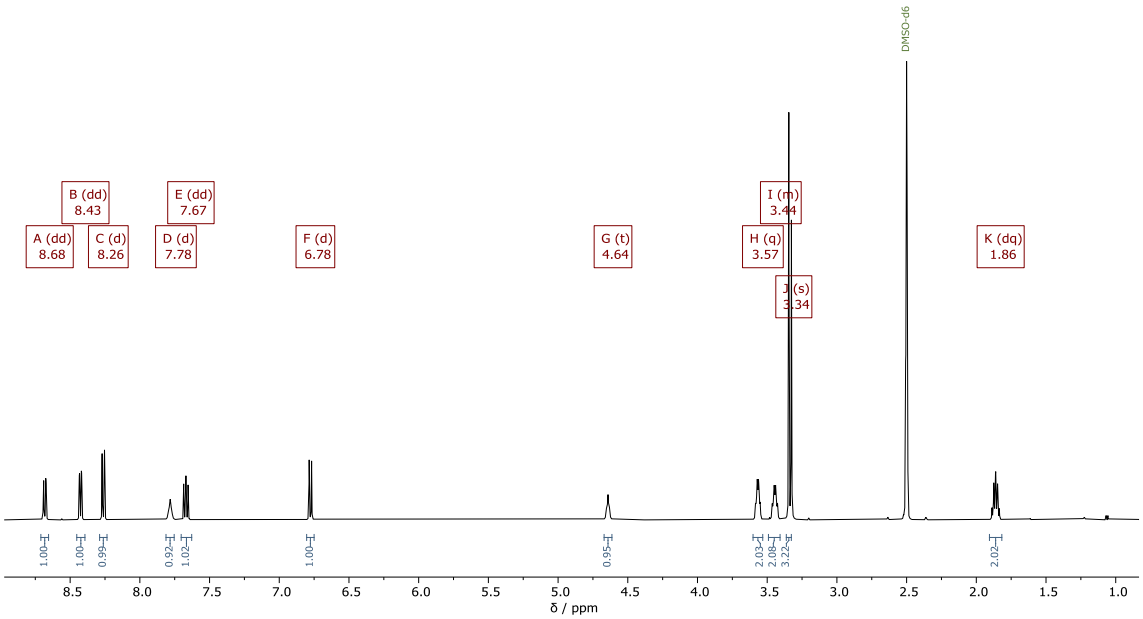


Abbildung A 26: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **21** in DMSO-d_6.

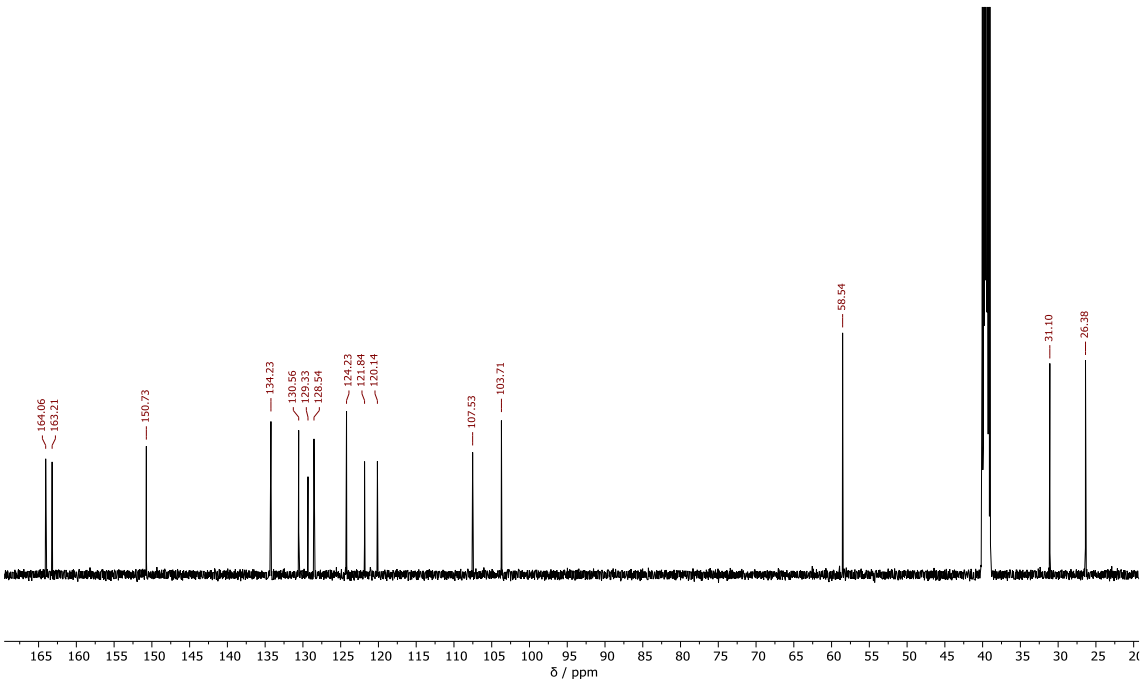


Abbildung A 27: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **21** in DMSO-d_6.

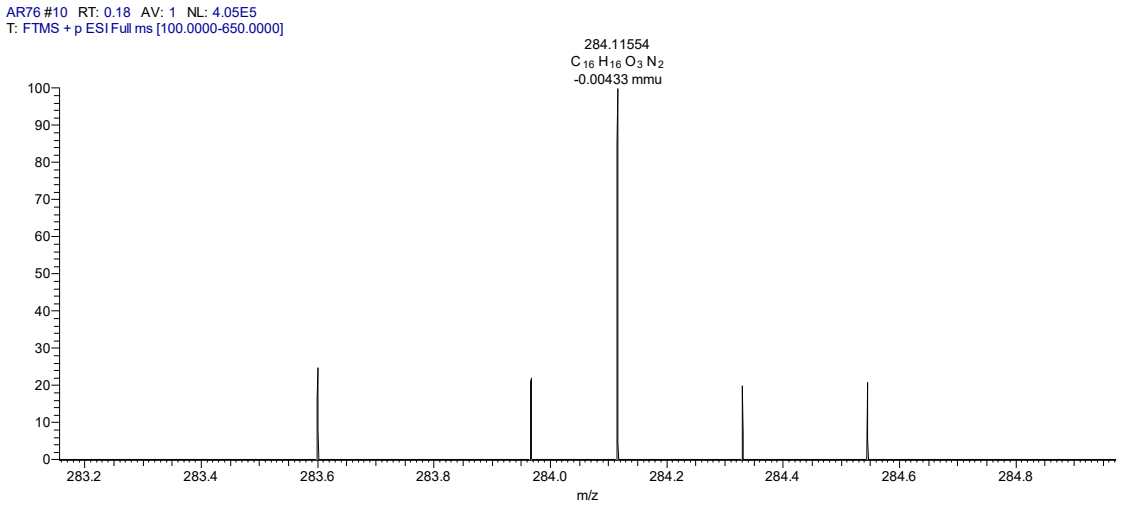


Abbildung A 28: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **21**.

Verbindung 22

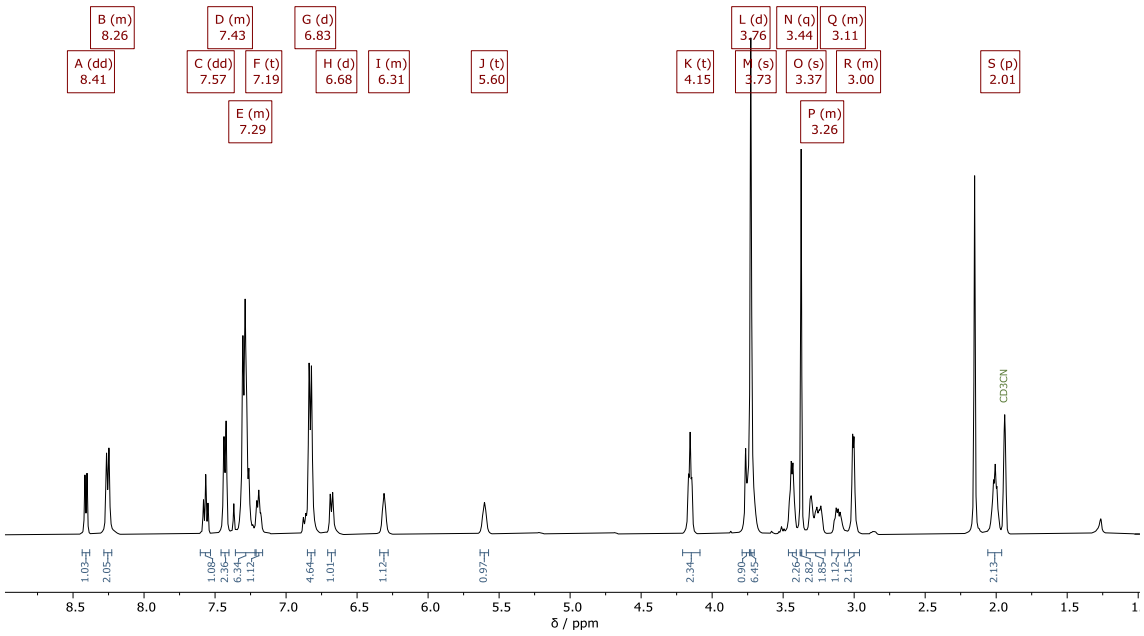


Abbildung A 29: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **22** in CD_3CN.

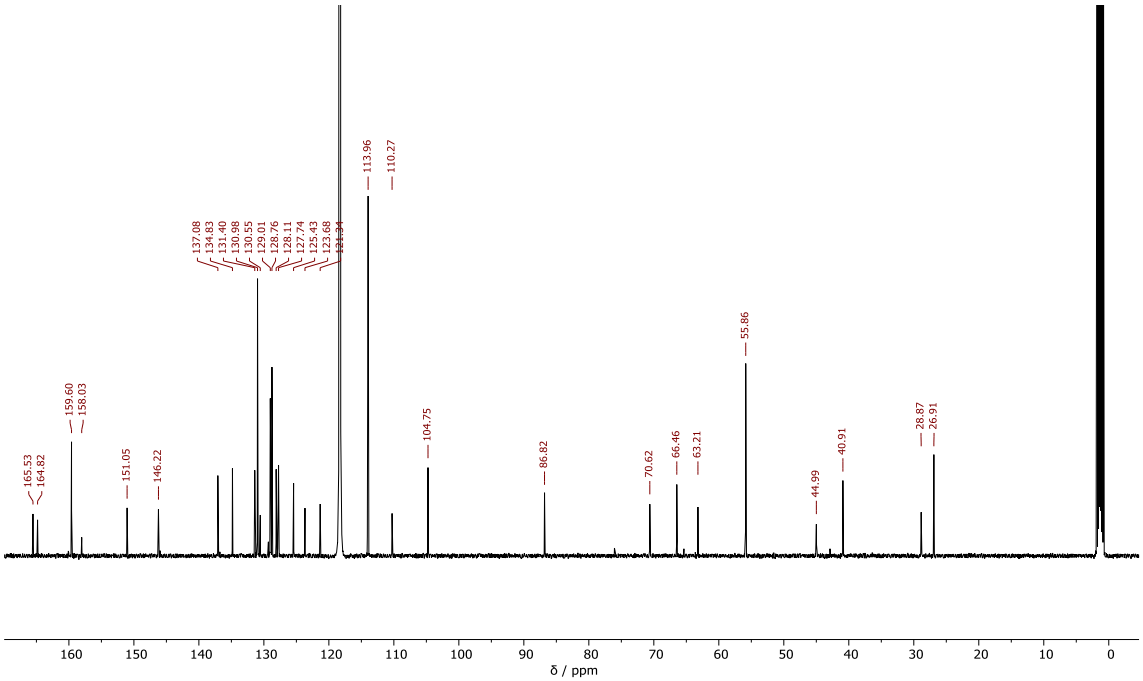


Abbildung A 30: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **22** in CD_3CN.

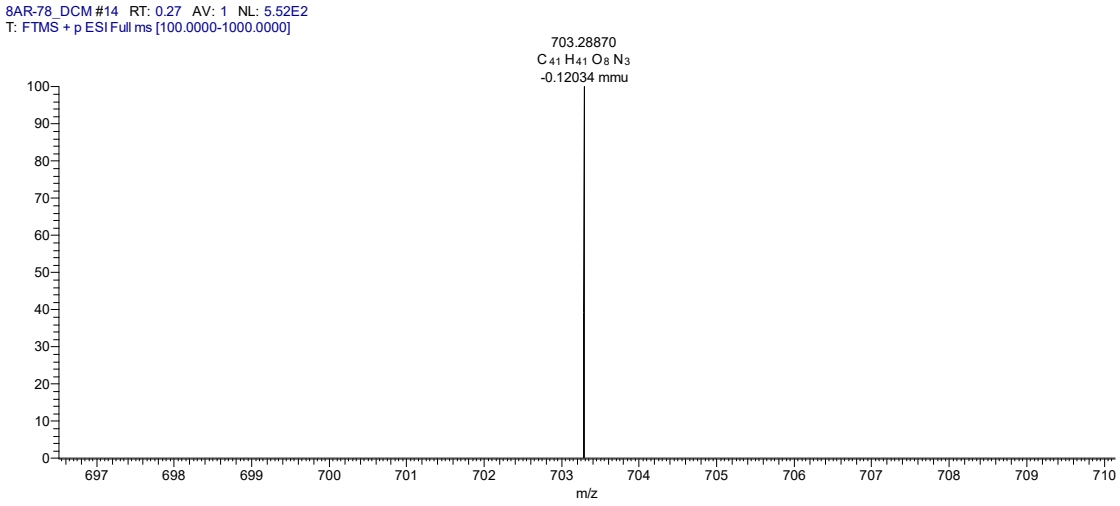


Abbildung A 31: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **22**.

Verbindung 23

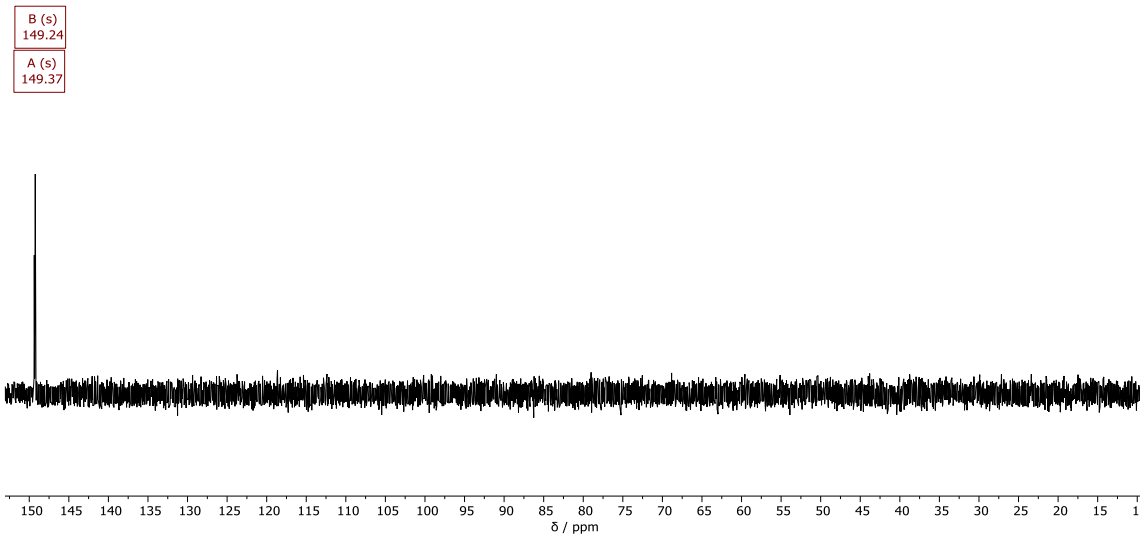


Abbildung A 32: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **23** in $CDCl_3$.

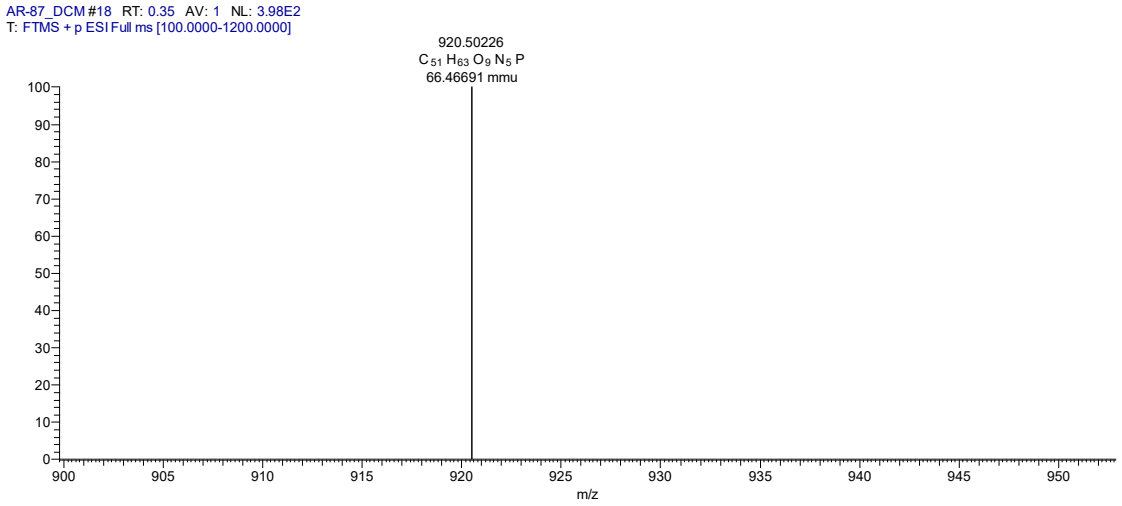


Abbildung A 33: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **23**.

Verbindung 24

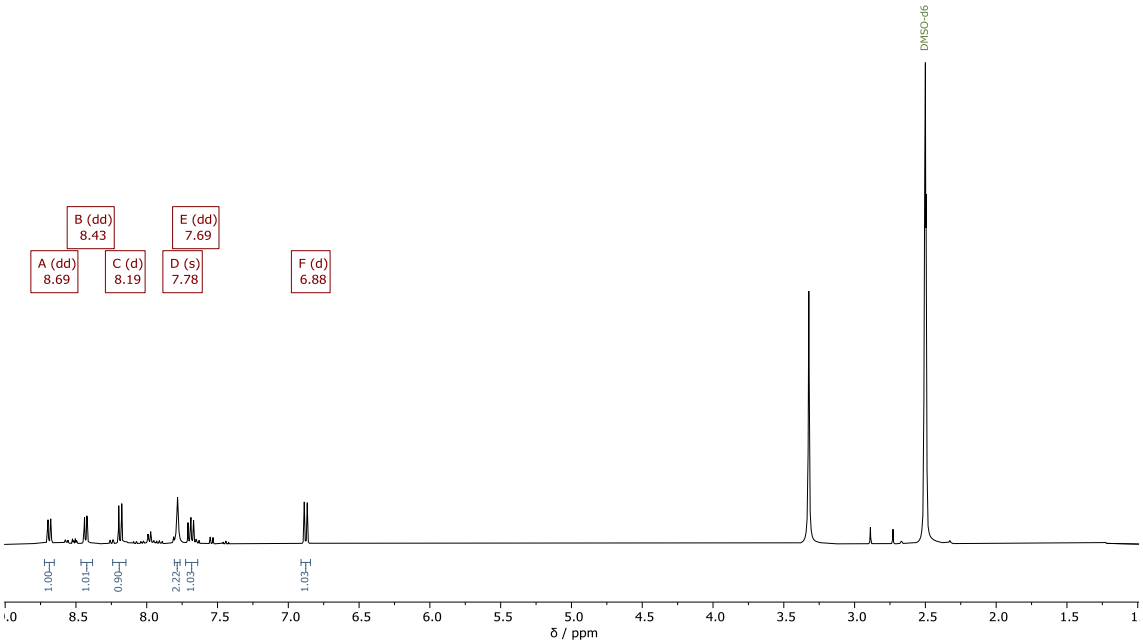


Abbildung A 34: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **24** in DMSO-d_6.

ANI1

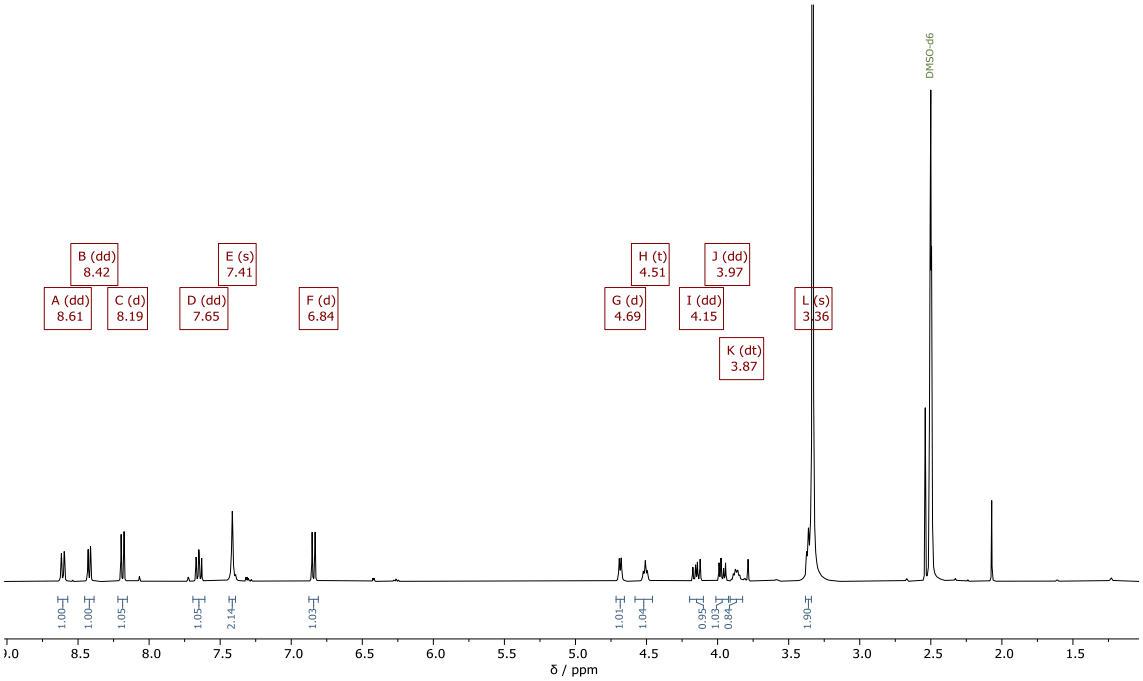


Abbildung A 35: ^{1}H-NMR-Spektrum von **ANI1** in DMSO-d_6.

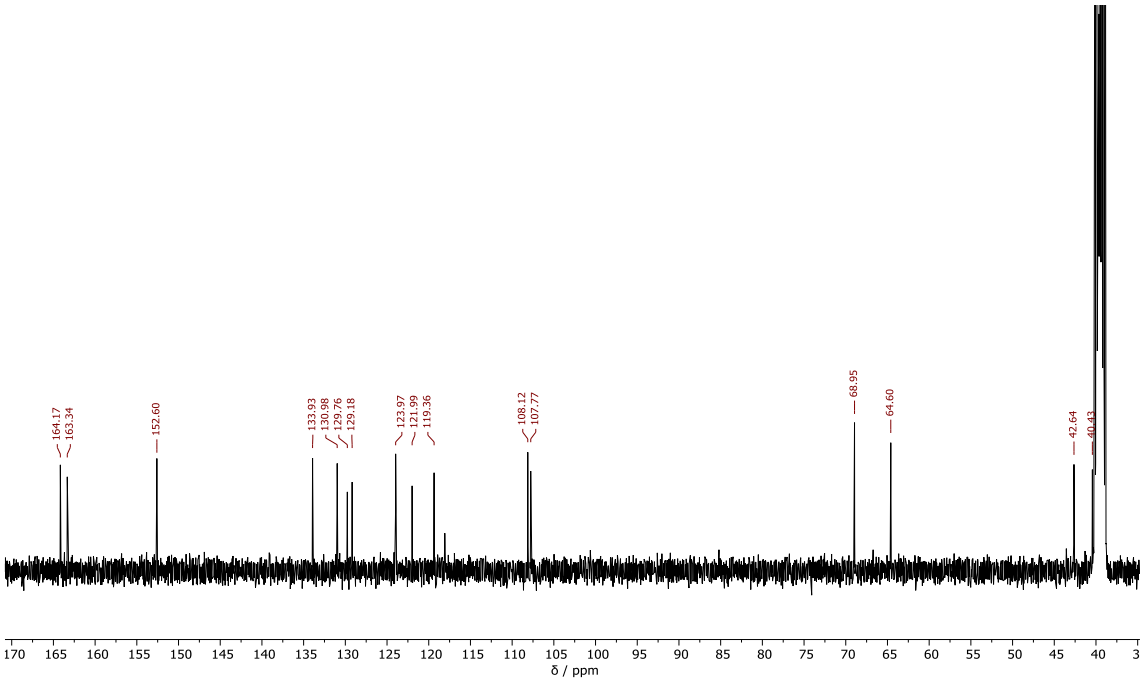


Abbildung A 36: ^{13}C-NMR-Spektrum von **ANI1** in DMSO-d_6.

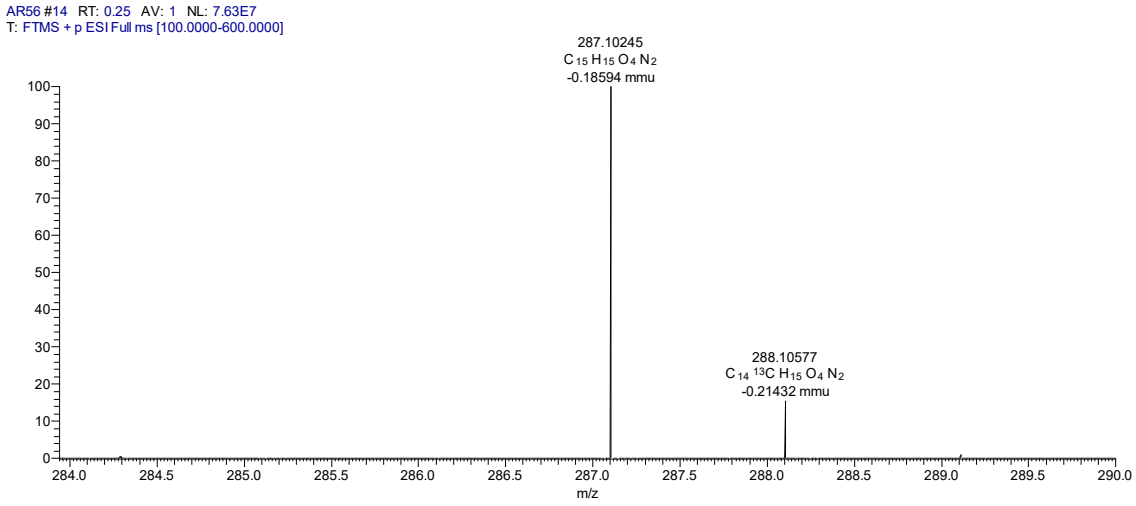


Abbildung A 37: HR-ESI-Massenspektrum von **ANI1**.

Verbindung 25

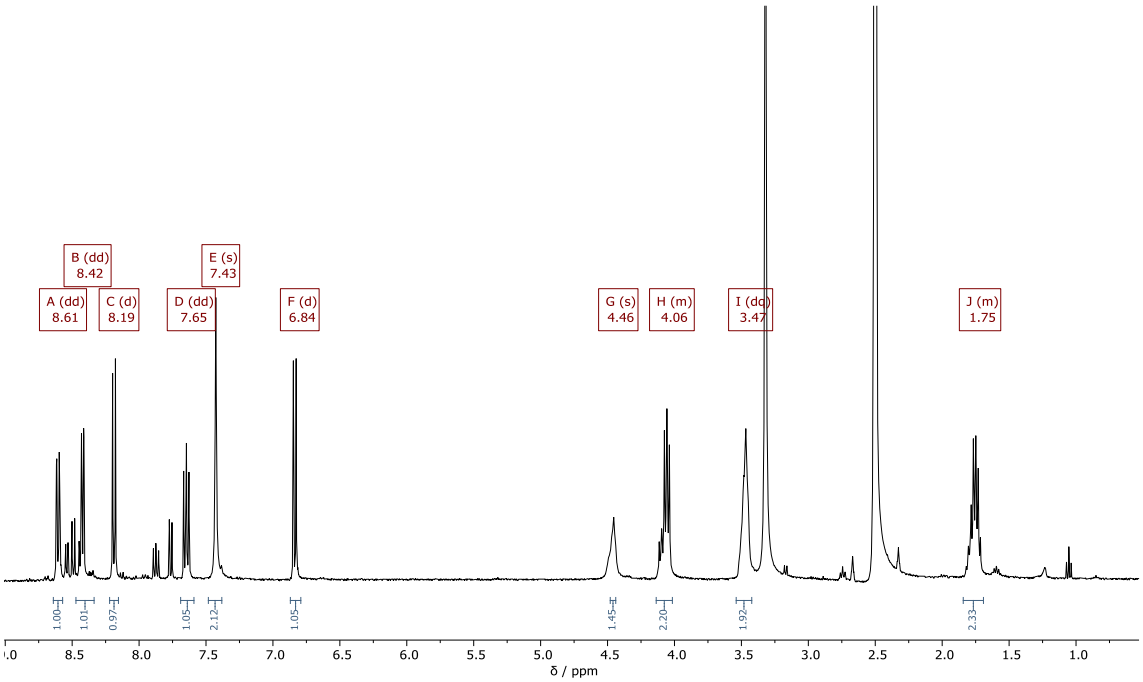


Abbildung A 38: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **25** in DMSO-d_6.

Verbindung 26

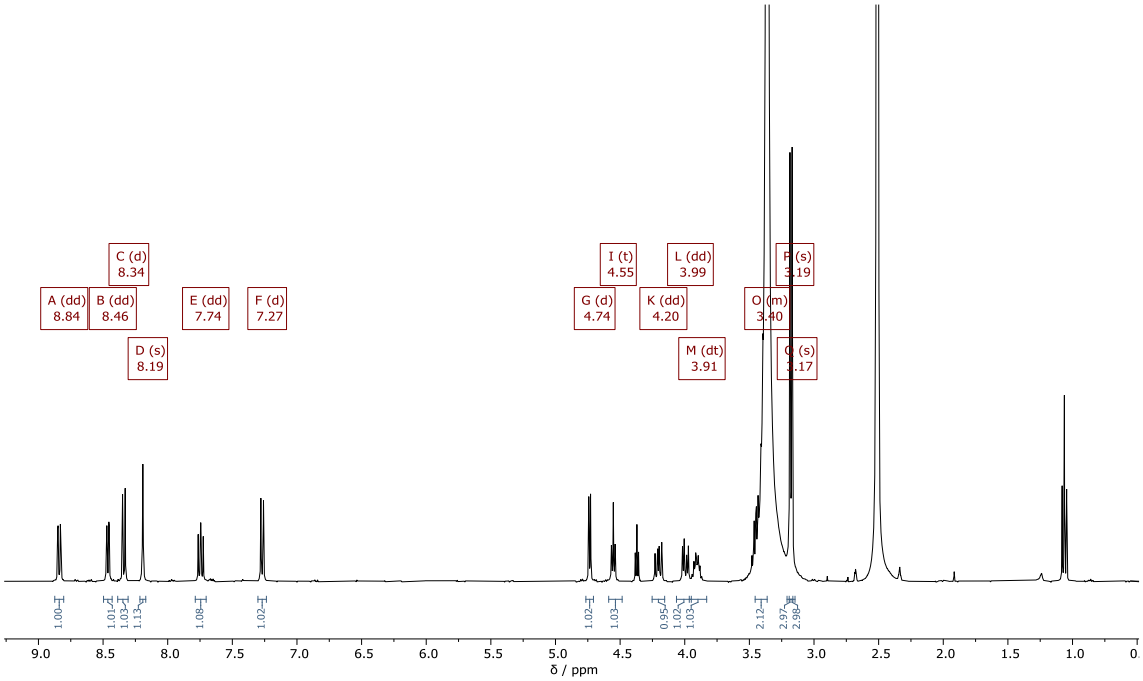


Abbildung A 39: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **26** in DMSO-d_6.

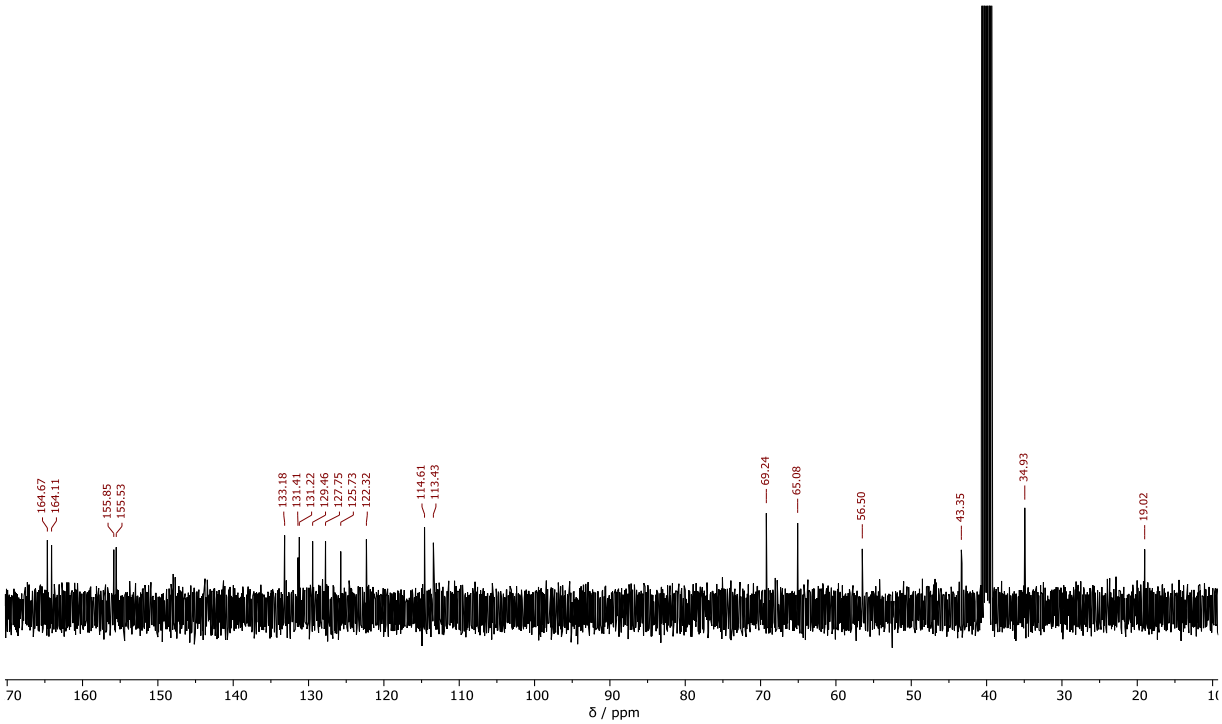


Abbildung A 40: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **26** in DMSO-d_6.

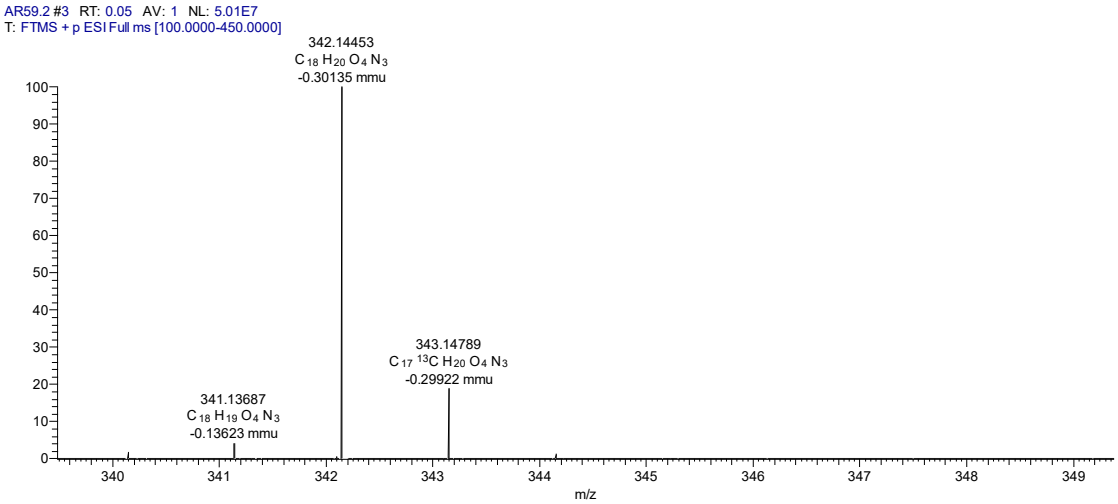


Abbildung A 41: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **26**.

Verbindung 27

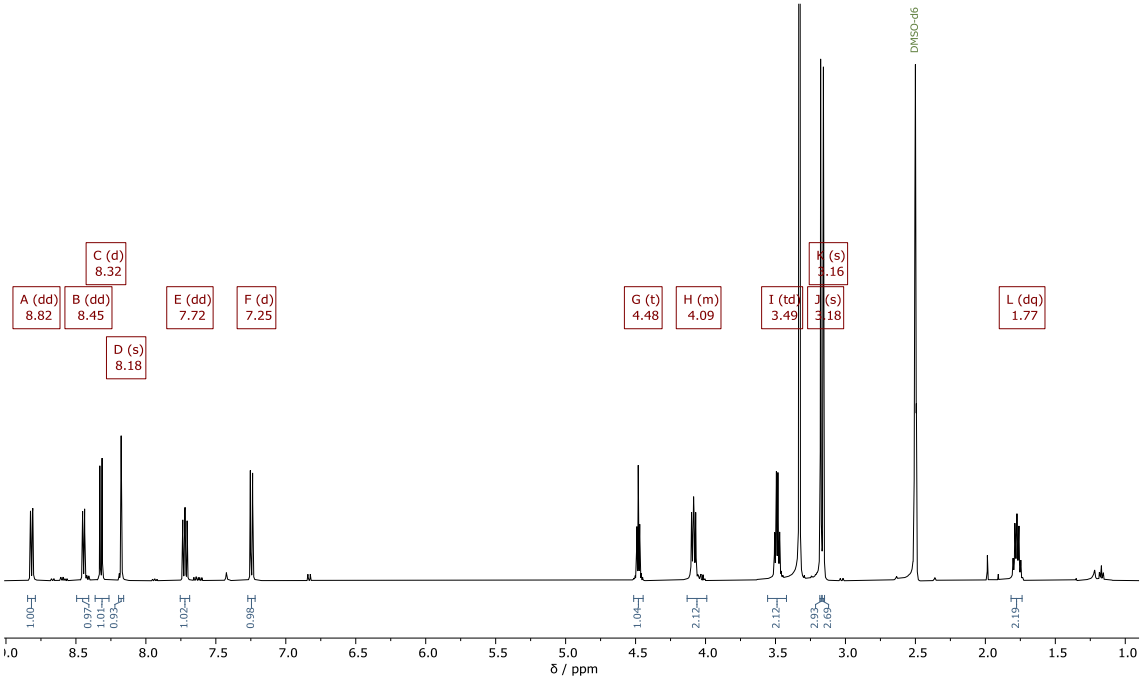


Abbildung A 42: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **27** in DMSO-d_6.

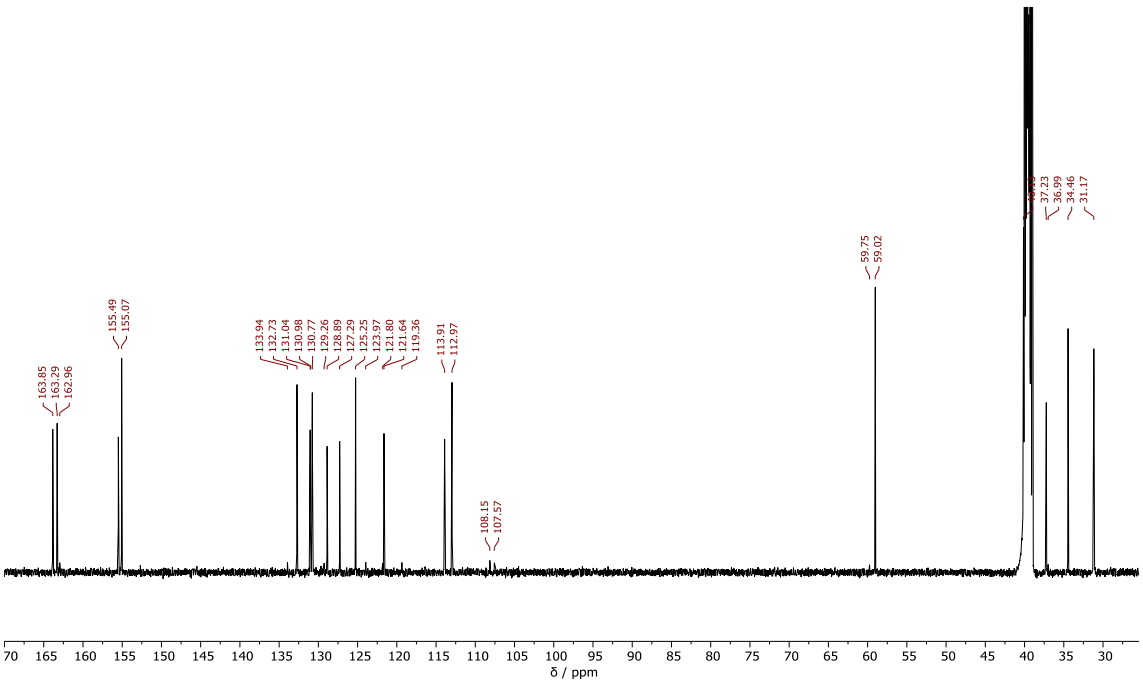


Abbildung A 43: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **27** in DMSO-d_6.

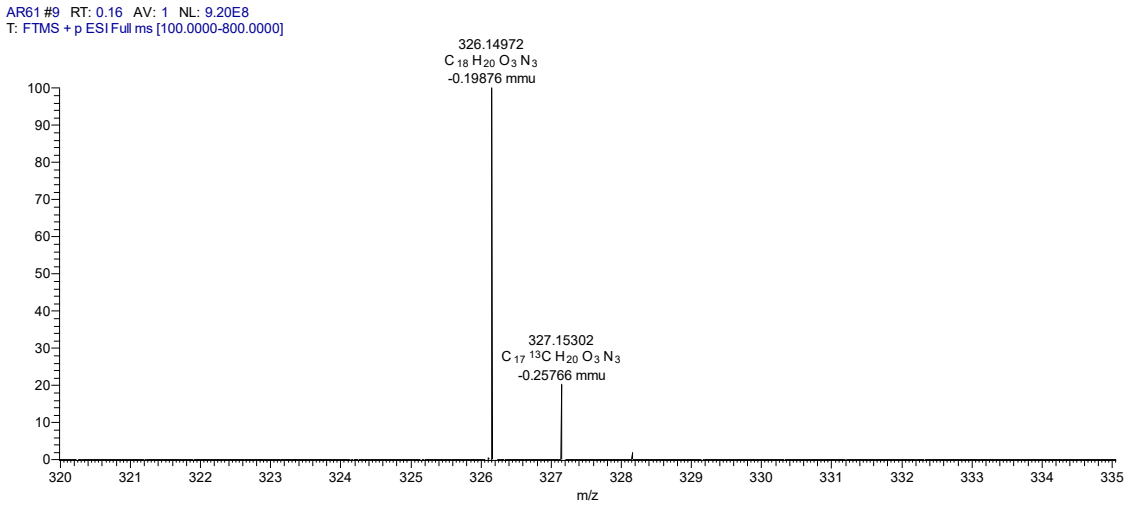


Abbildung A 44: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **27**.

Verbindung 28

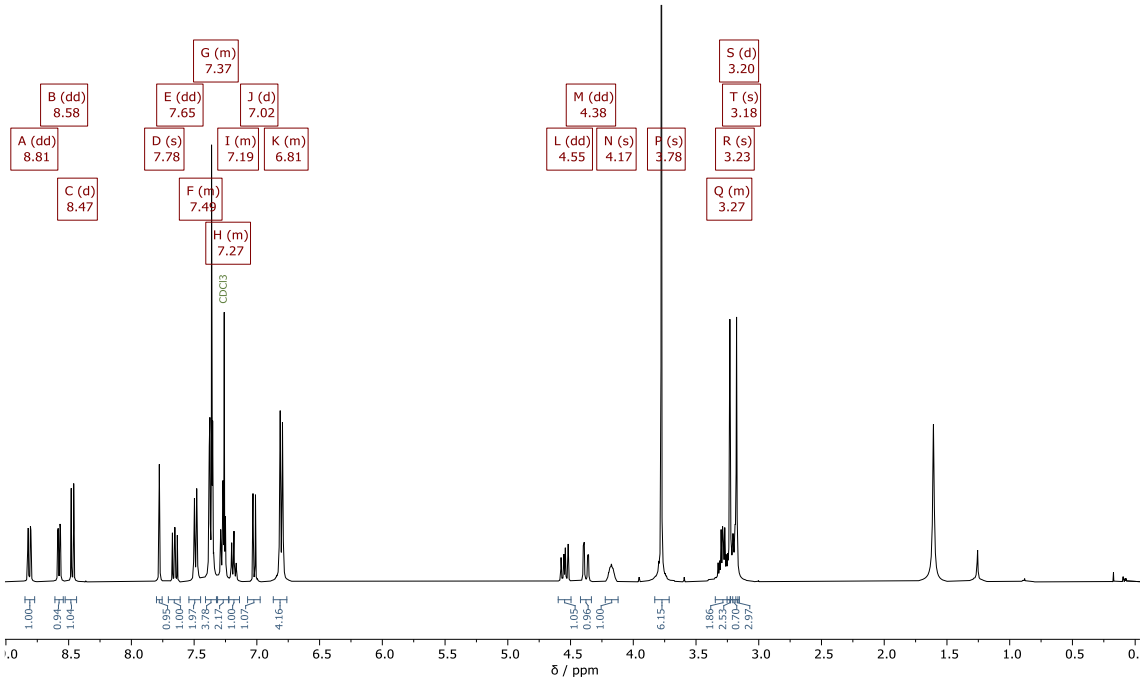


Abbildung A 45: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **28** in $CDCl_3$.

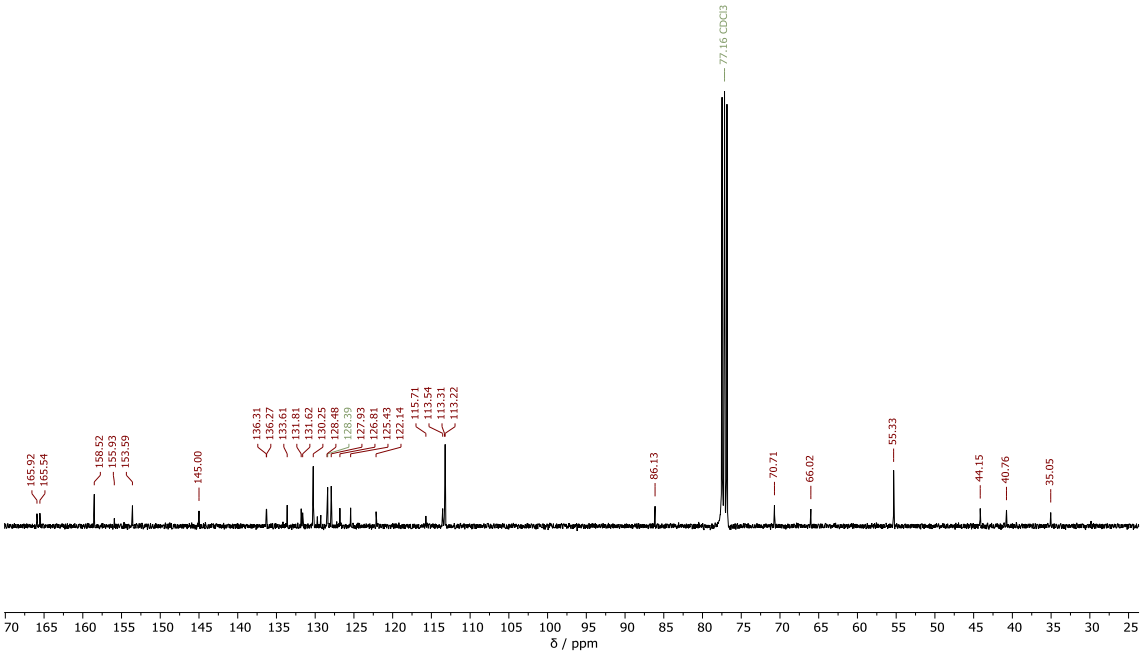


Abbildung A 46. ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **28** in $CDCl_3$.

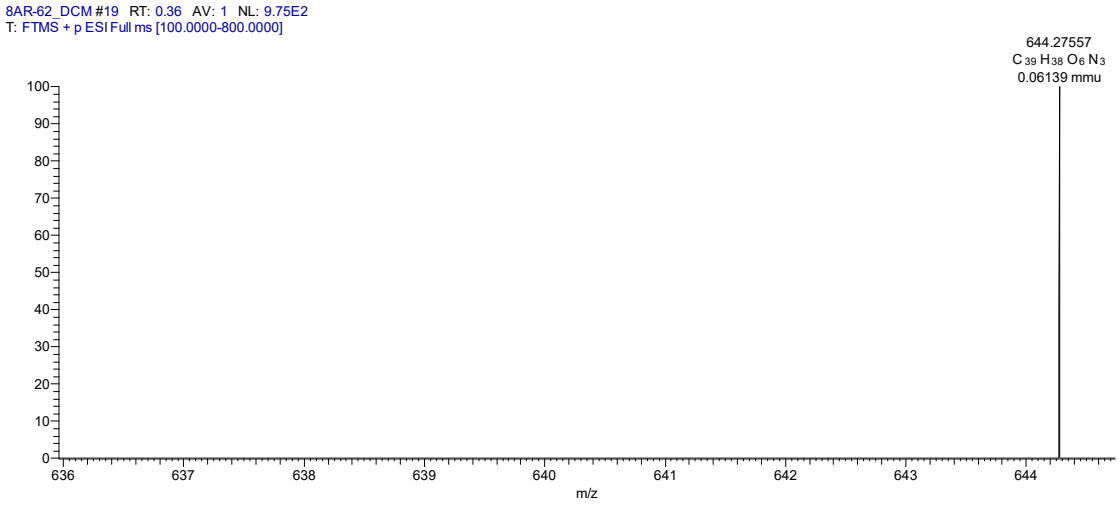


Abbildung A 47: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **28**.

Verbindung 29

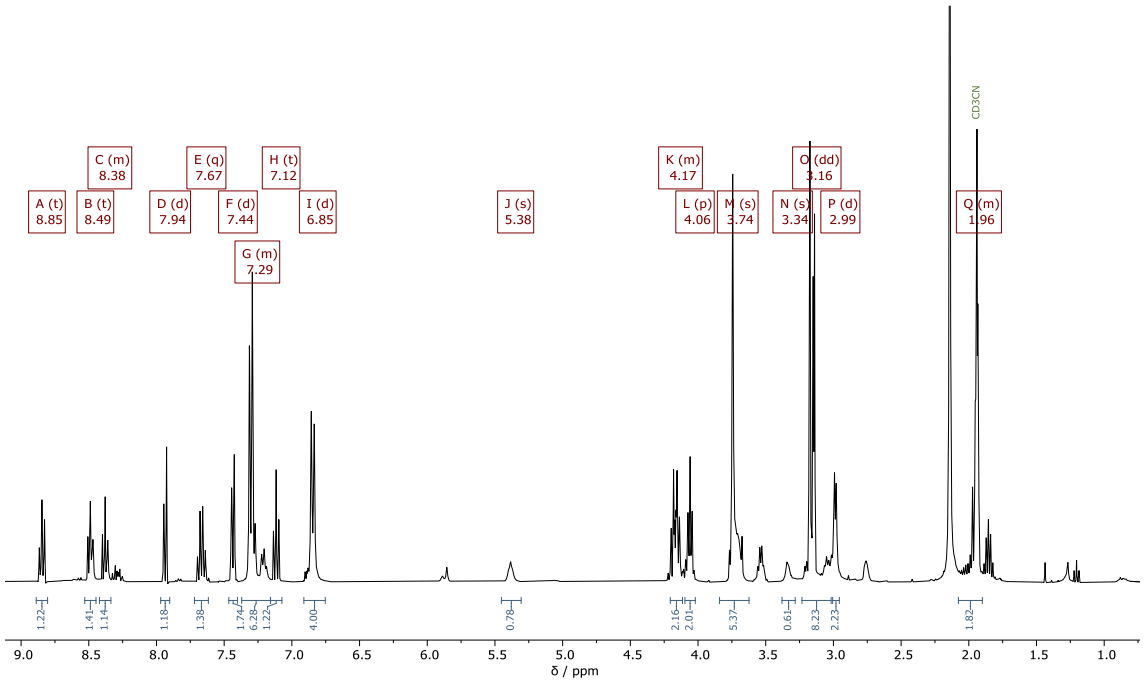


Abbildung A 48: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **29** in CD_3CN.

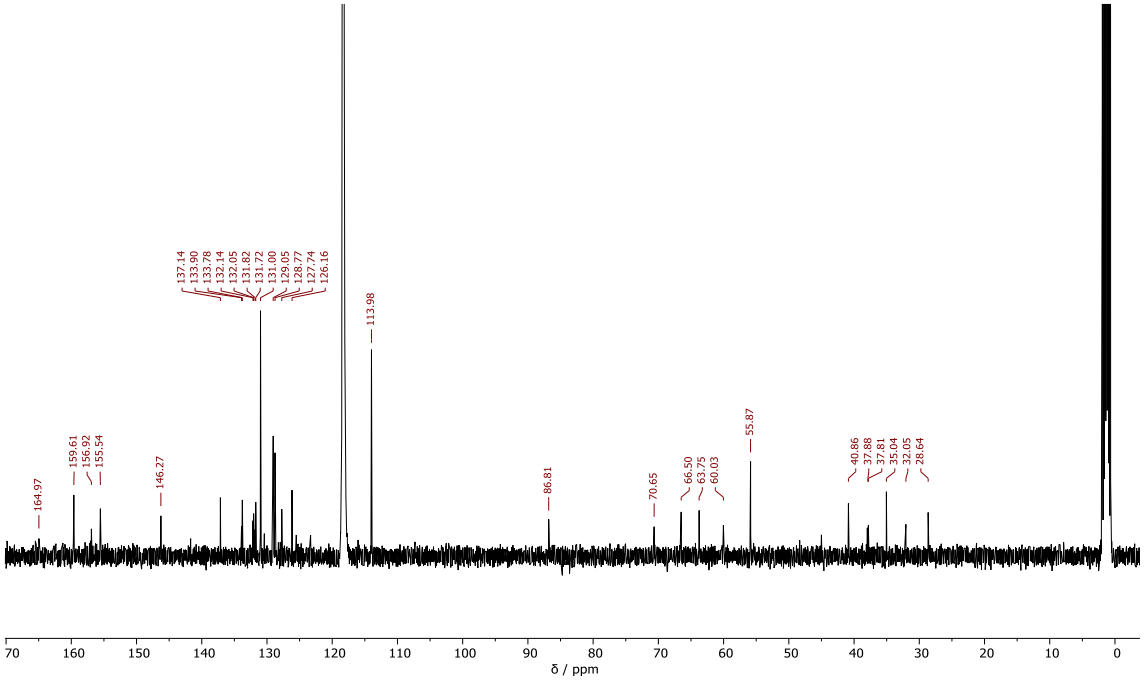


Abbildung A 49: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **29** in CD_3CN.

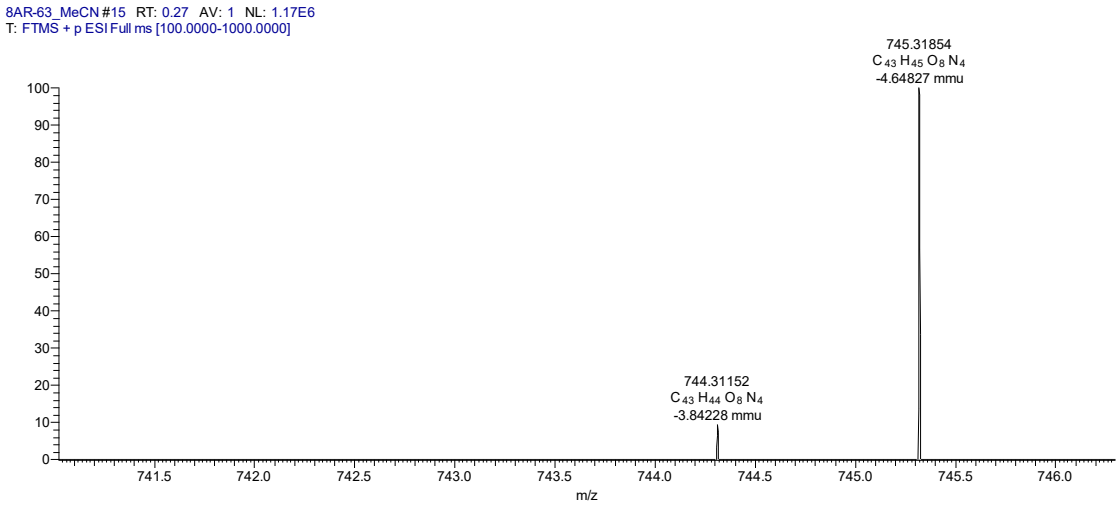


Abbildung A 50: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **29**.

Verbindung 30

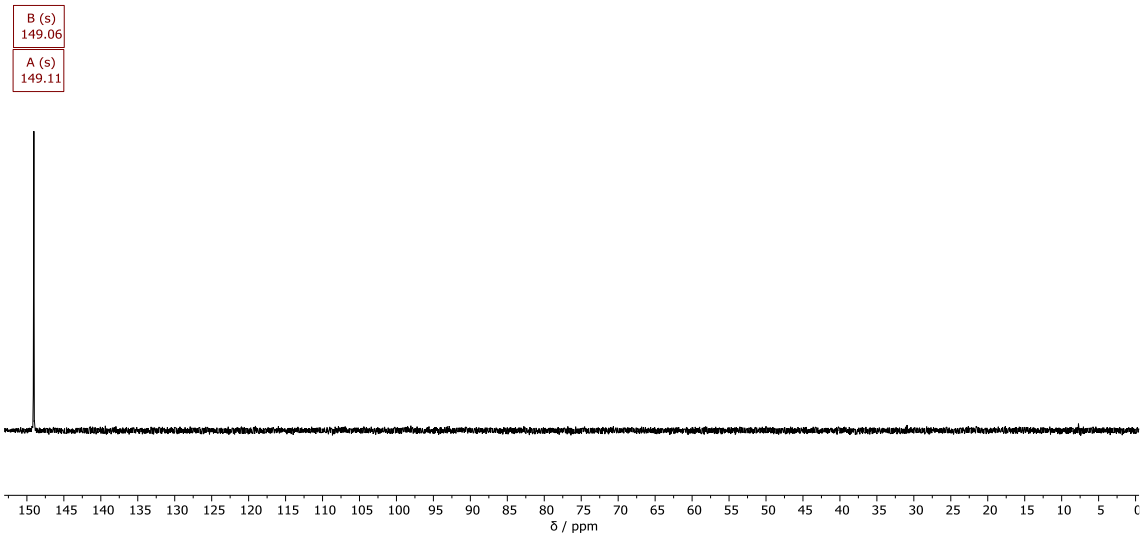


Abbildung A 51: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **30** in $CDCl_3$.

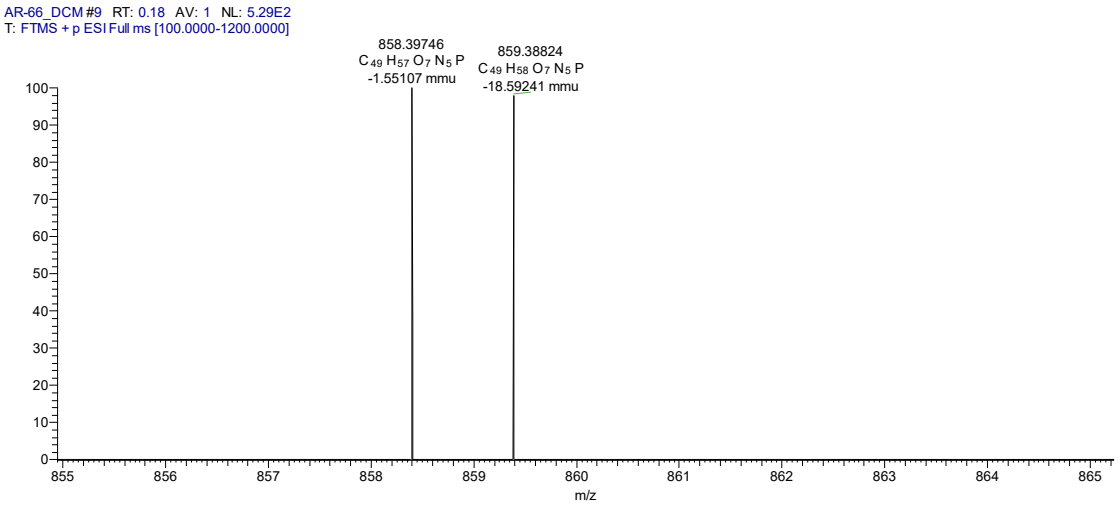


Abbildung A 52: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **30**.

Verbindung 31

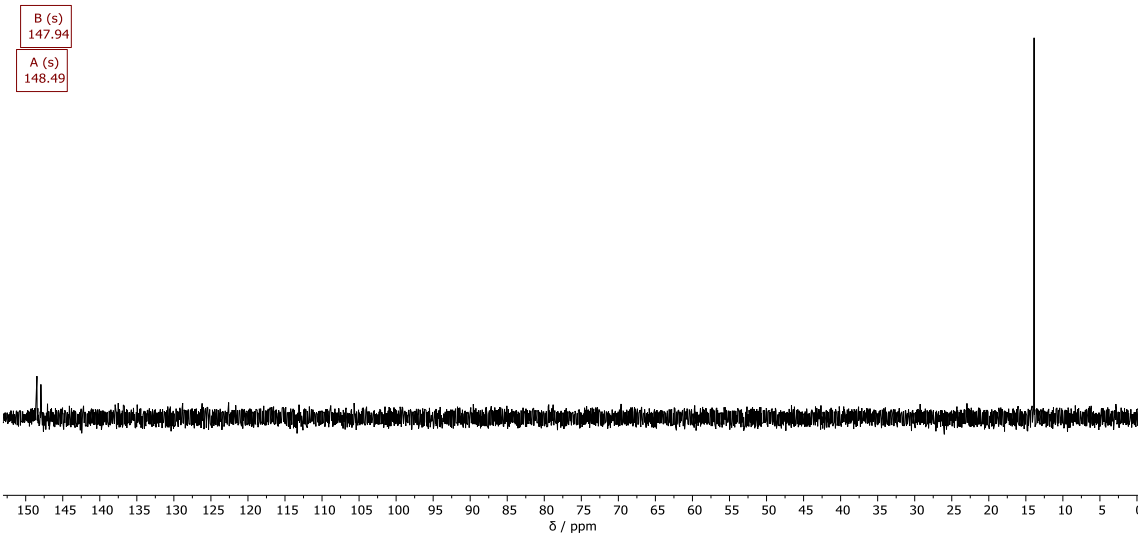


Abbildung A 53: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **31** in DMSO-d_6.

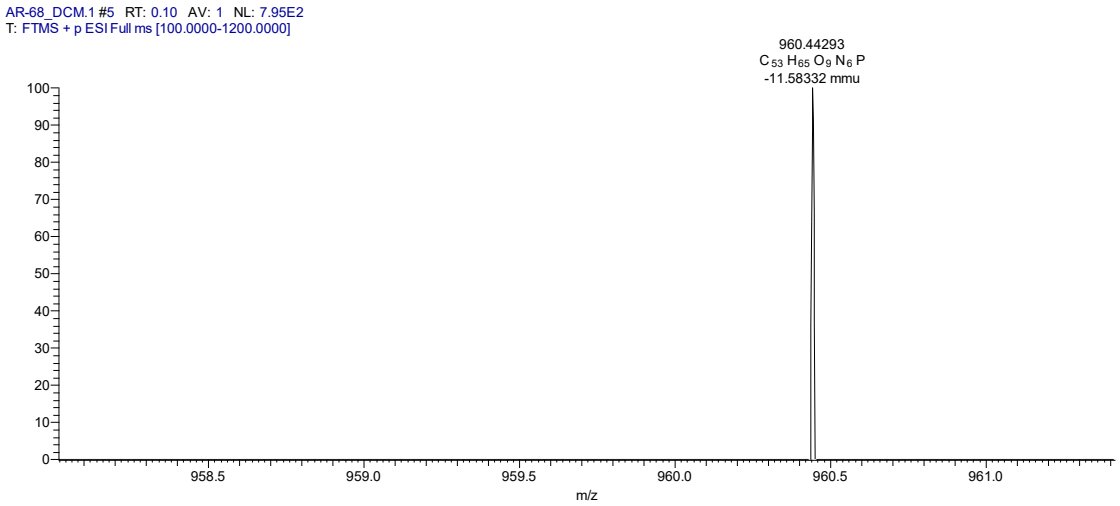


Abbildung A 54: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **31**.

Verbindung 32

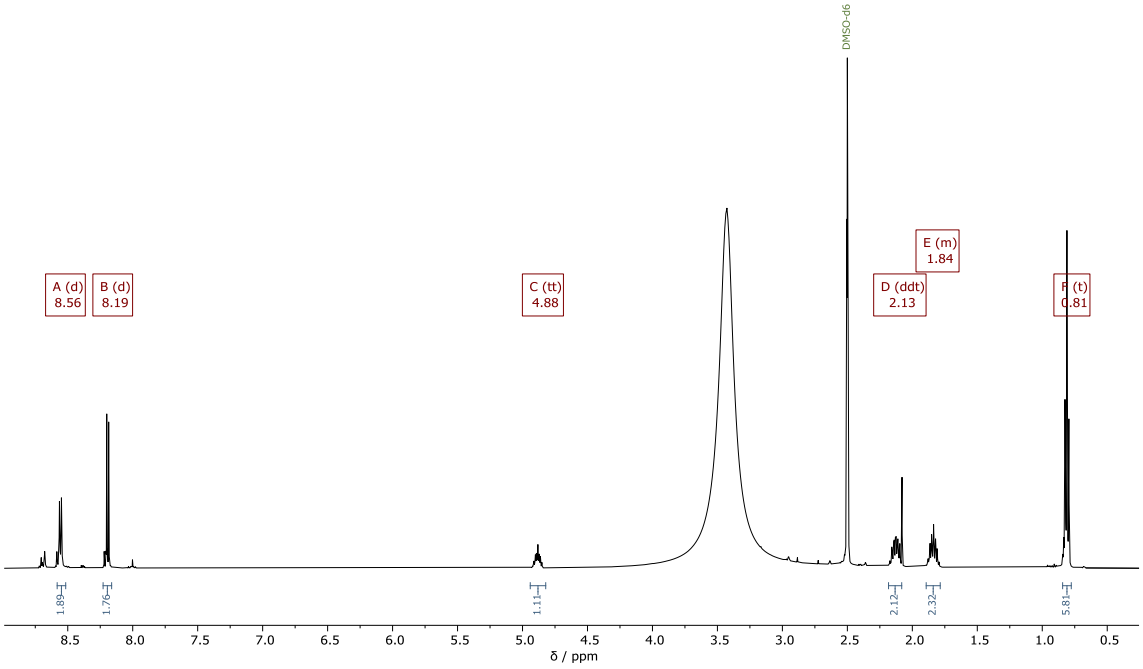


Abbildung A 55: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **32** in DMSO-d_6.

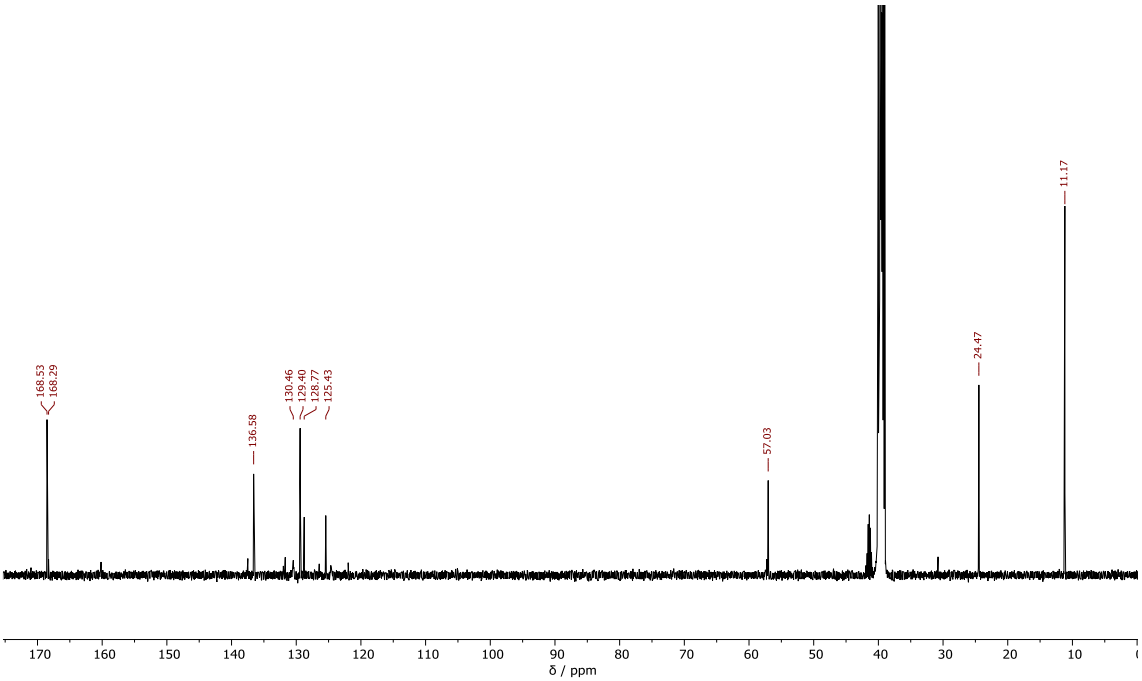


Abbildung A 56: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **32** in DMSO-d_6.

NDI1

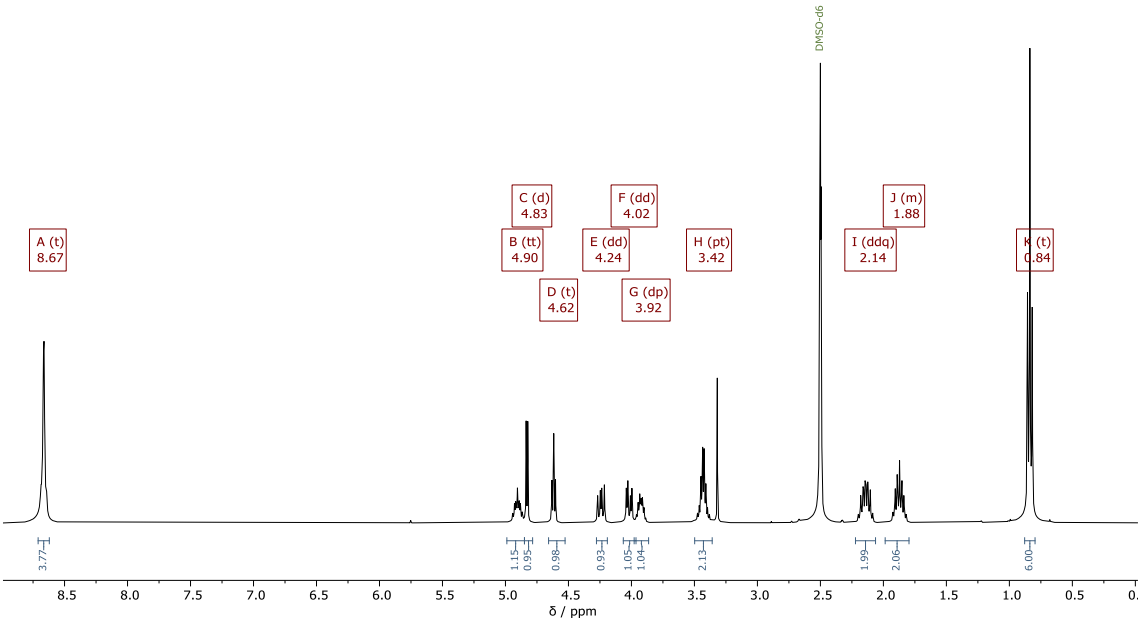


Abbildung A 57: ^{1}H-NMR-Spektrum von **NDI1** in DMSO-d_6.

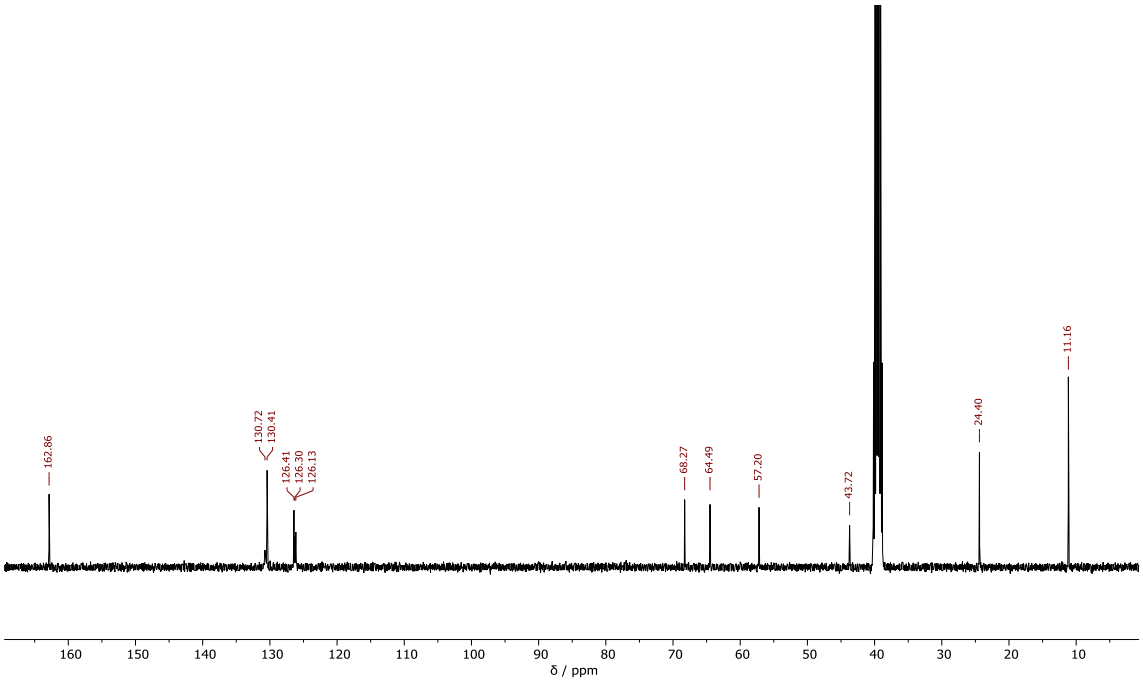


Abbildung A 58: ^{13}C-NMR-Spektrum von **NDI1** in DMSO-d_6.

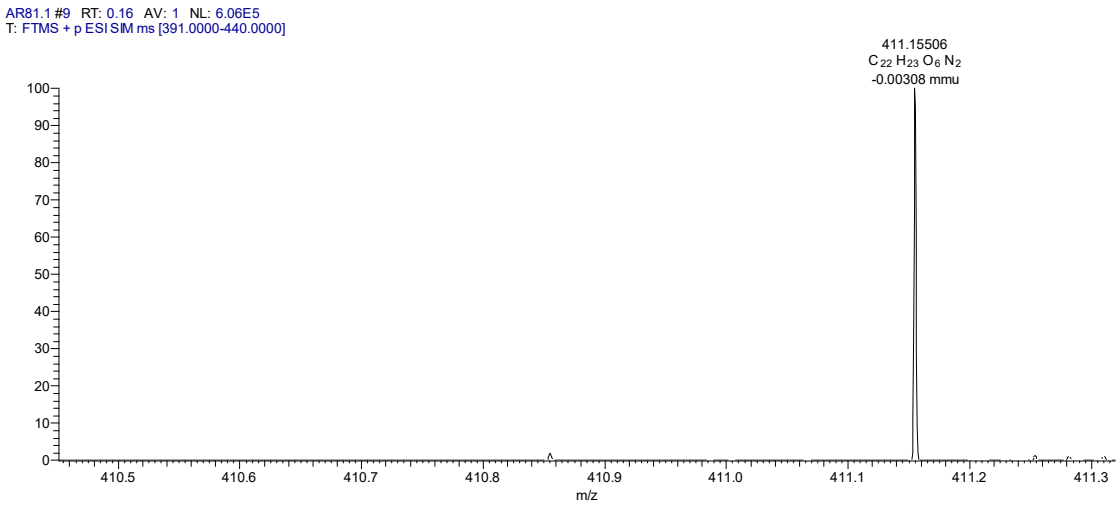


Abbildung A 59: HR-ESI-Massenspektrum von **NDI1**.

Verbindung 33

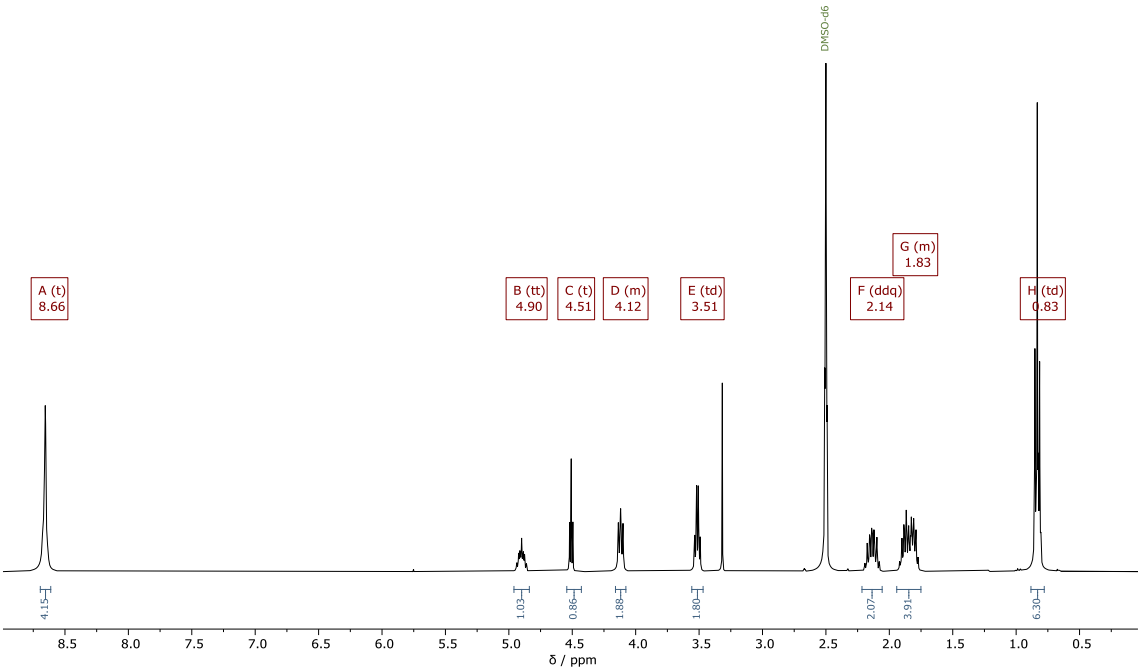


Abbildung A 60: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **33** in DMSO-d_6.

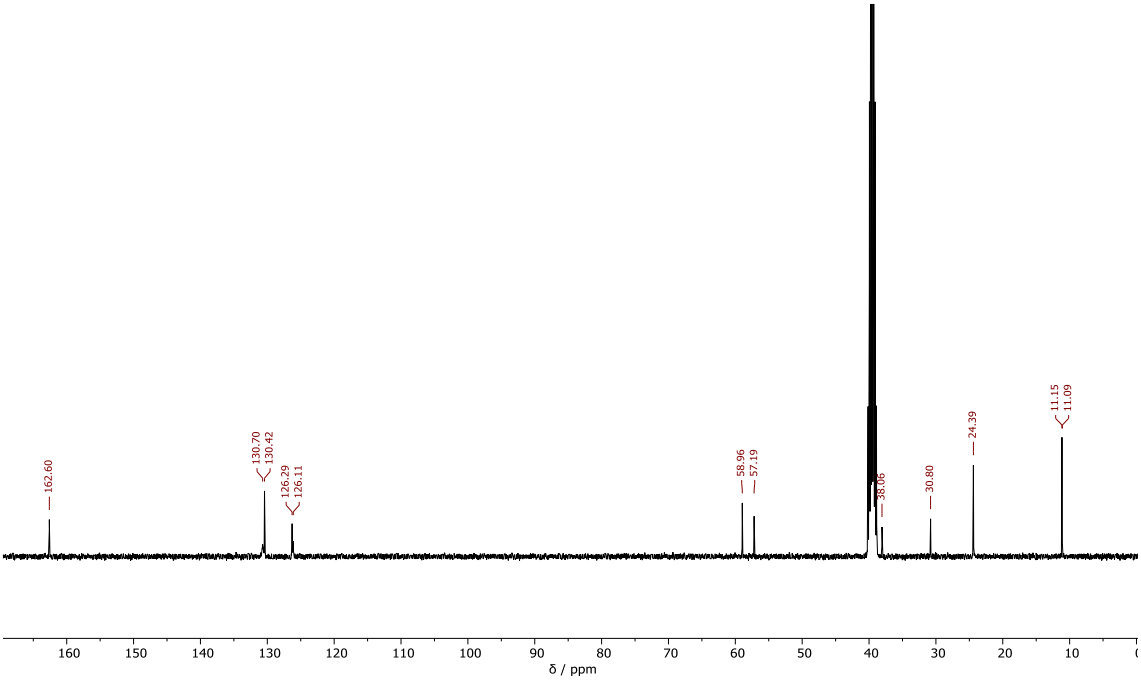


Abbildung A 61: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **33** in DMSO-d_6.

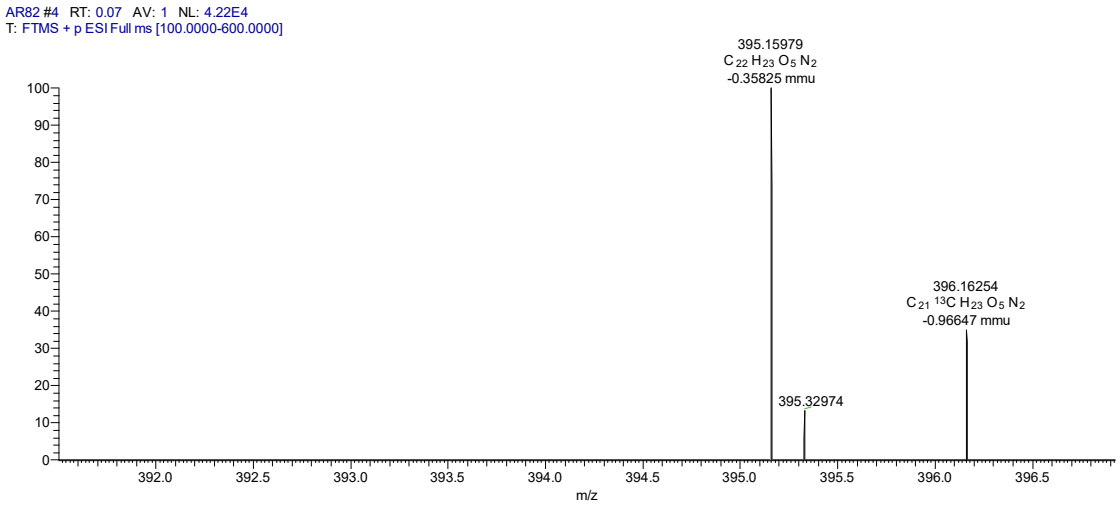


Abbildung A 62: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **33**.

Verbindung 34

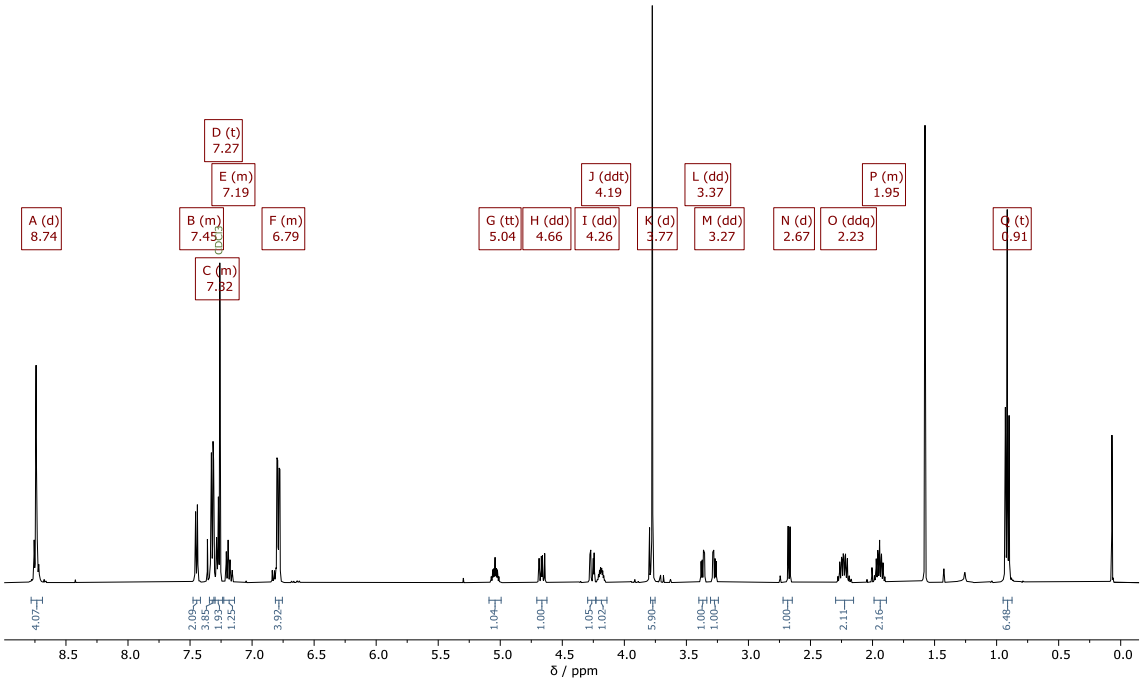


Abbildung A 63: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **34** in $CDCl_3$.

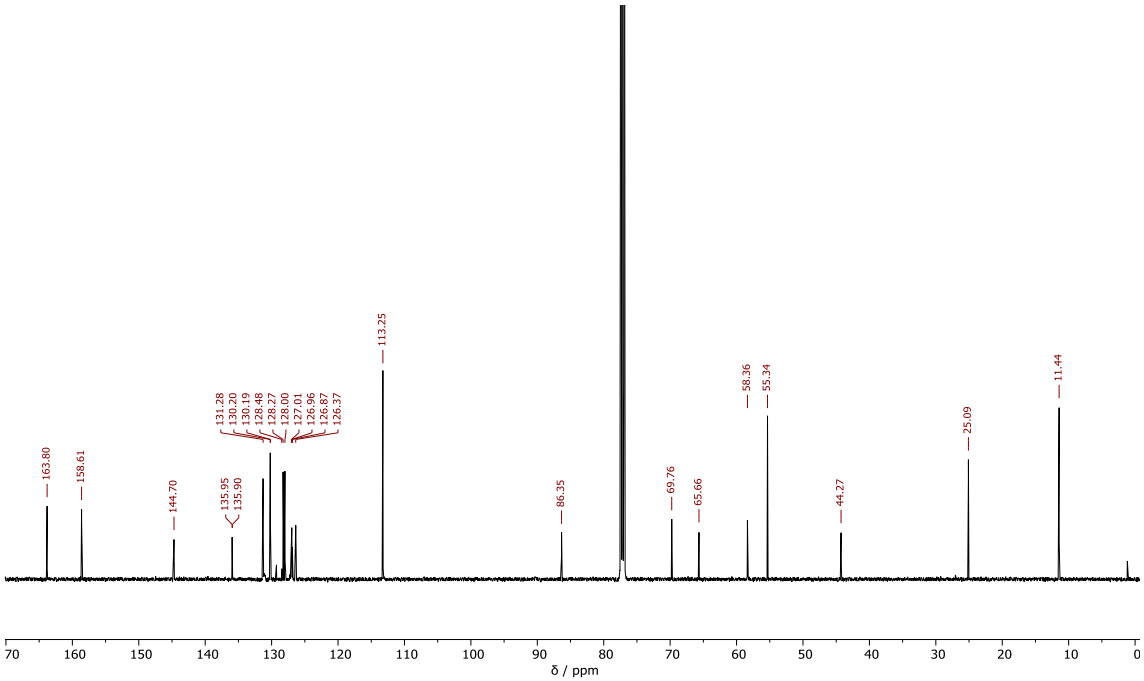


Abbildung A 64: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **34** in $CDCl_3$.

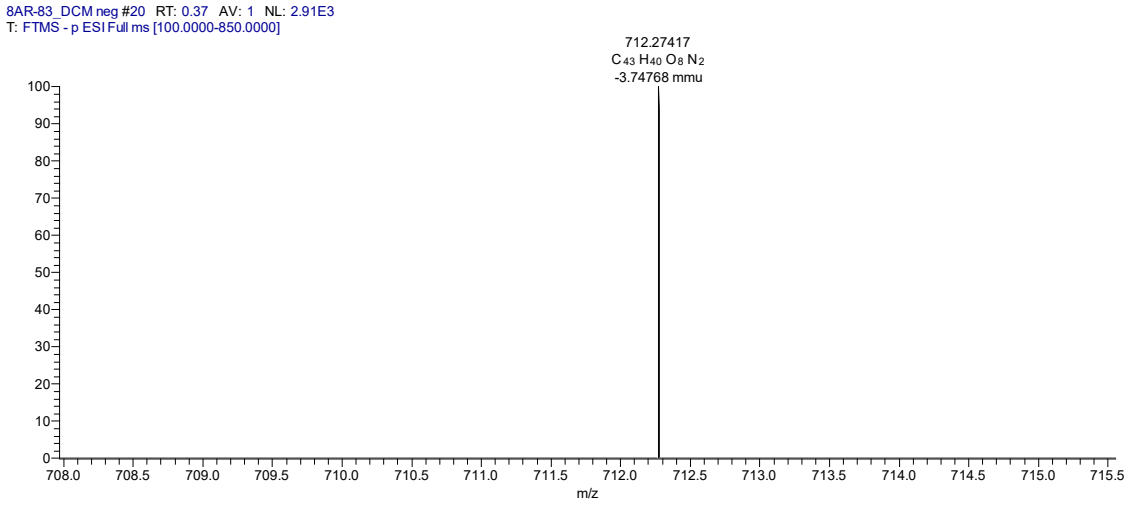


Abbildung A 65: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **34**.

Verbindung 35

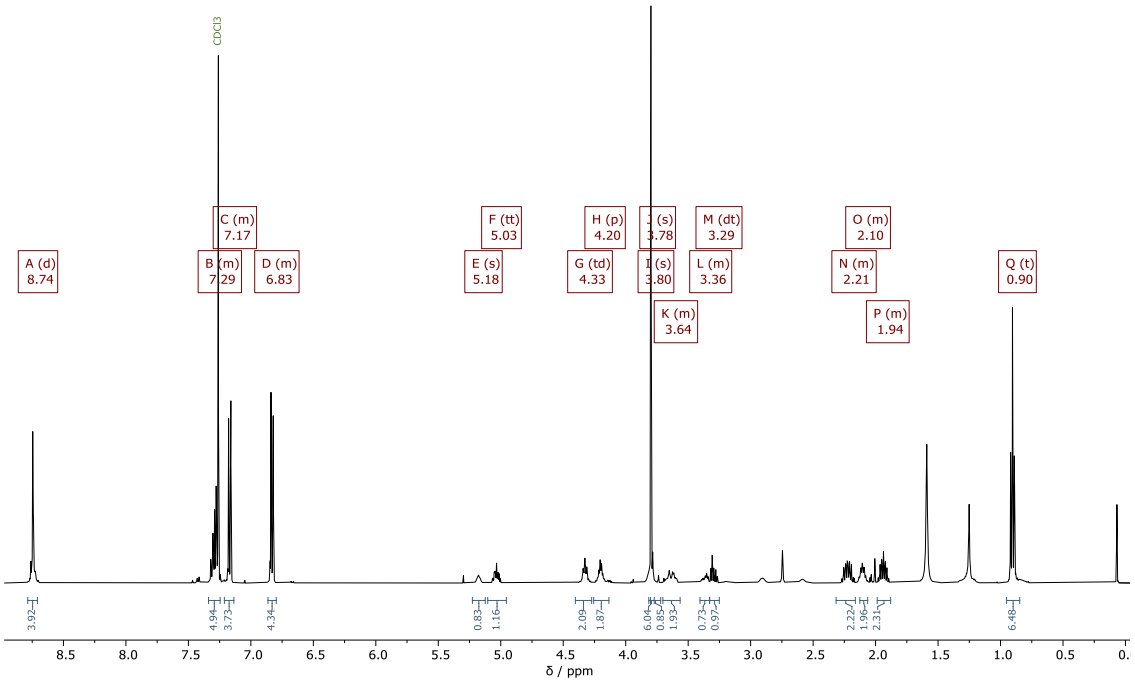


Abbildung A 66: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **35** in $CDCl_3$.

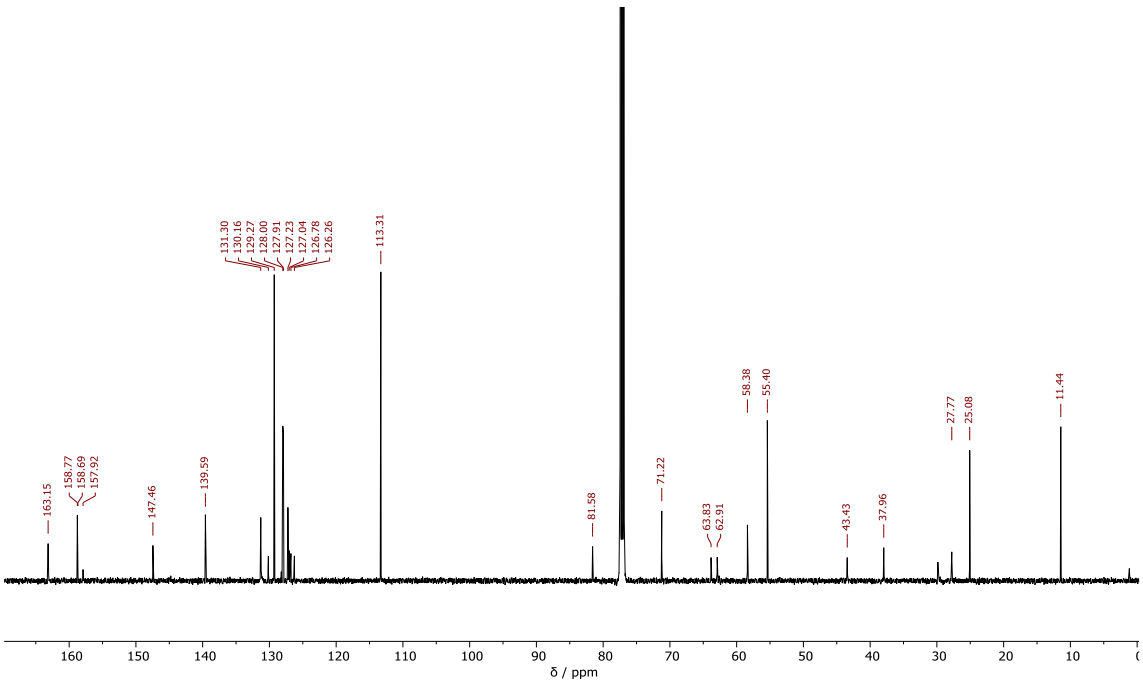


Abbildung A 67: ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **35** in $CDCl_3$.

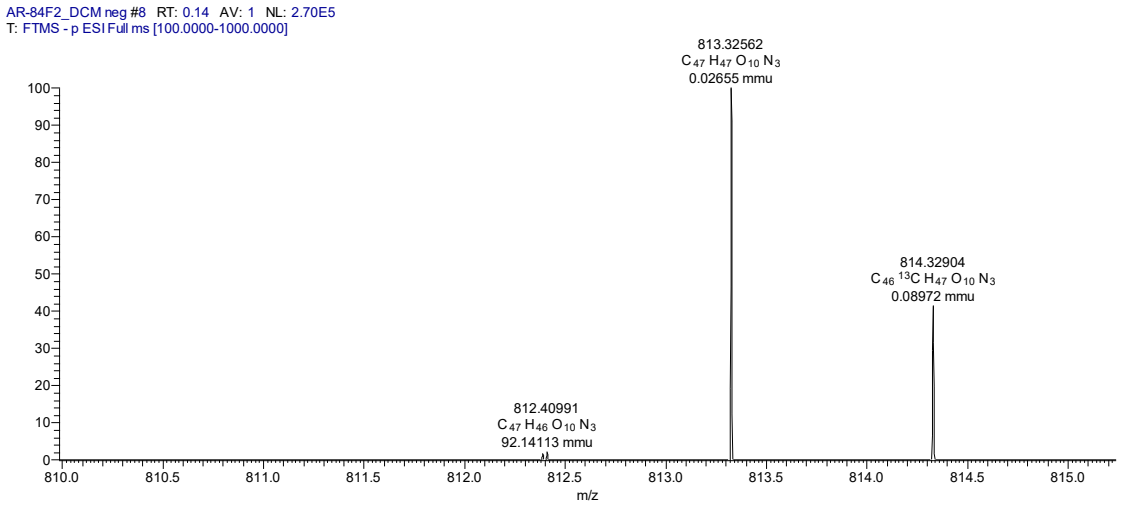


Abbildung A 68: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **35**.

Verbindung 36

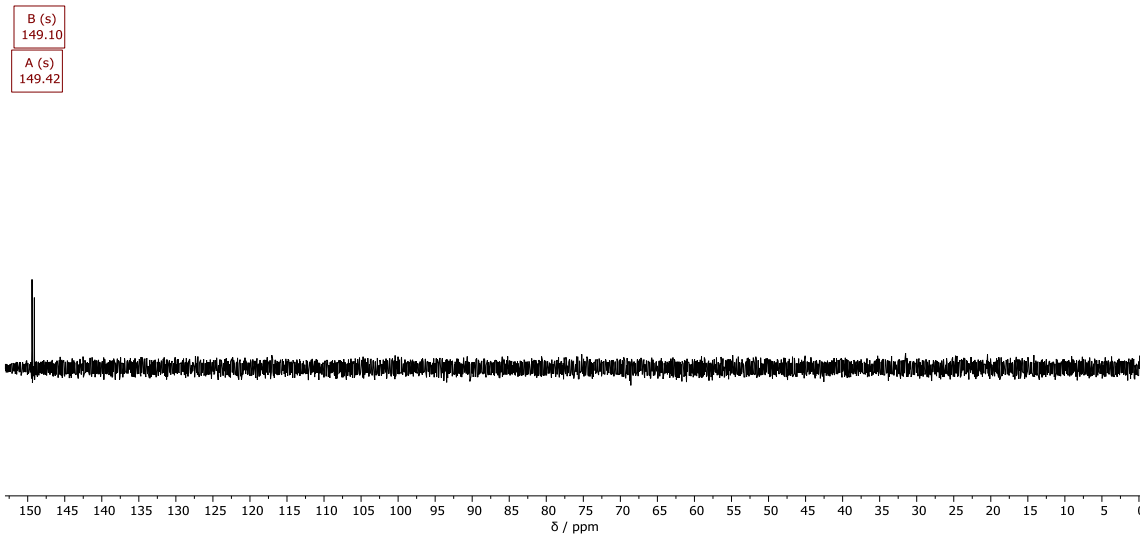


Abbildung A 69: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **36** in $CDCl_3$.

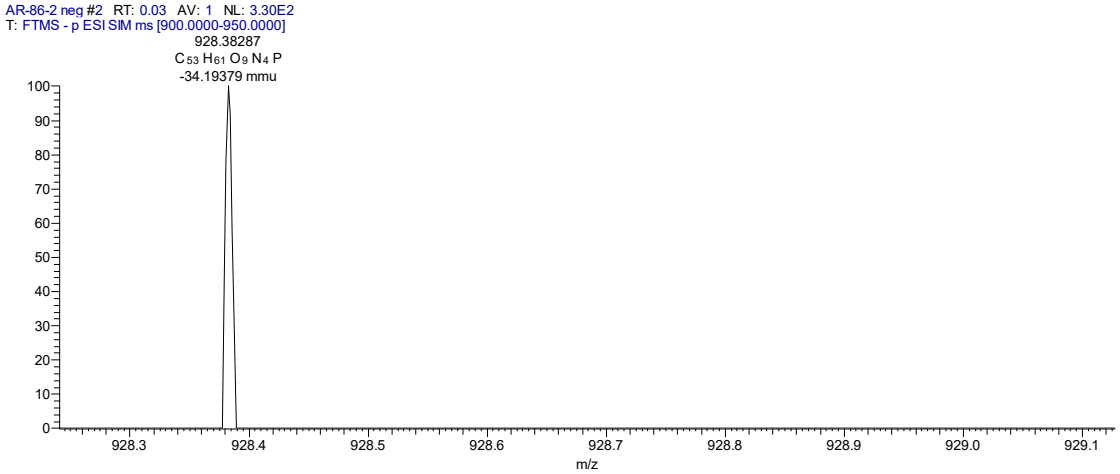


Abbildung A 70: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **36**.

Verbindung 37

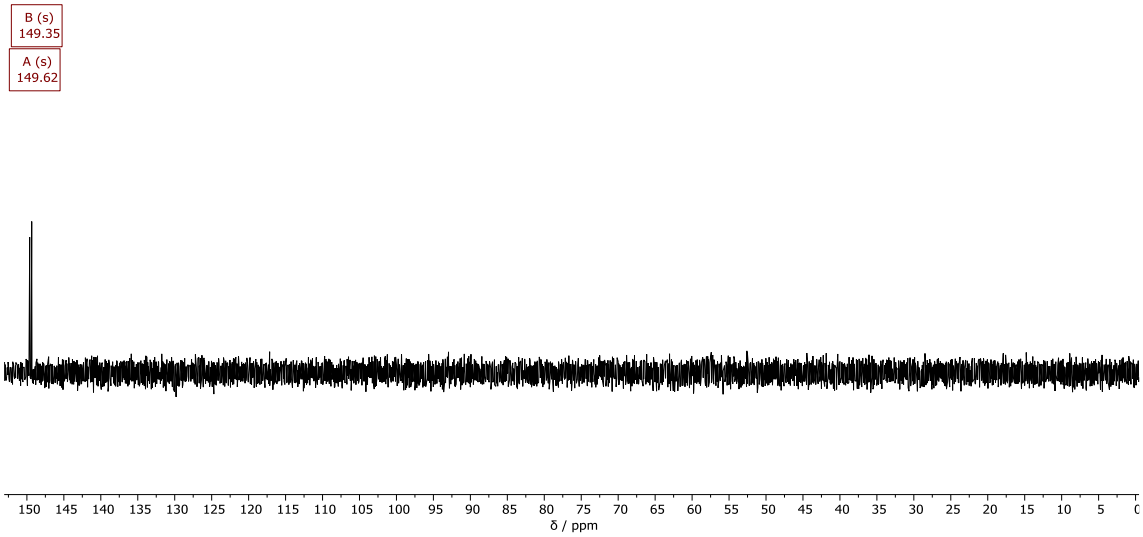


Abbildung A 71: ^{31}P-NMR-Spektrum von Verbindung **37** in $CDCl_3$.

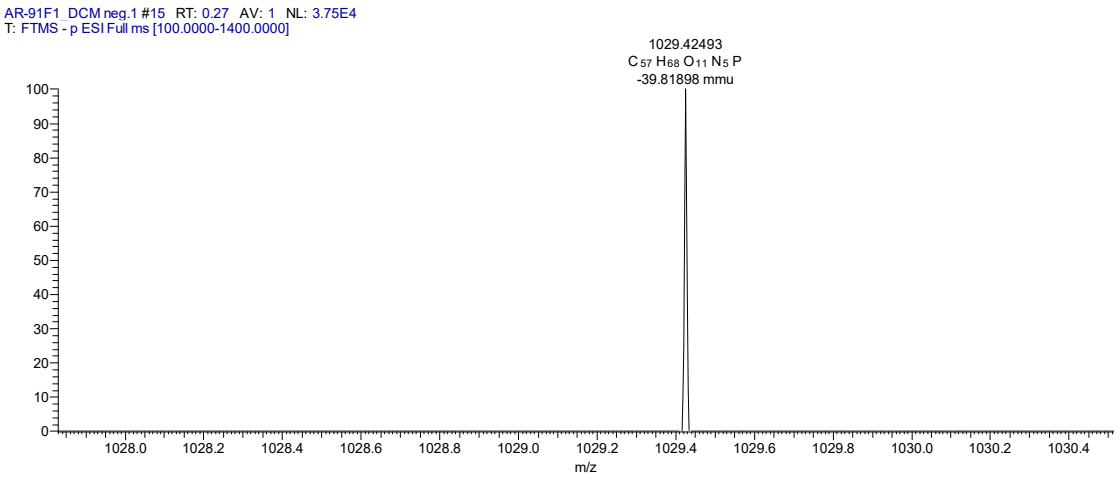


Abbildung A 72: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **37**.

9.1.2 HPLC- und Massespektren der Oligonukleotide

DNA1_*o*-4API

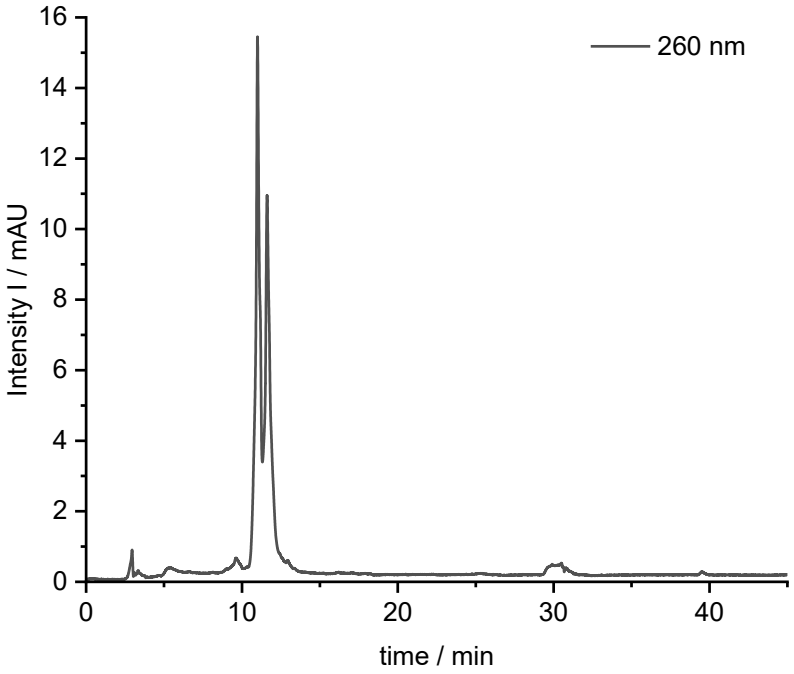


Abbildung A 73: HPLC-Chromatogramm von **DNA1_*o*-4API**.

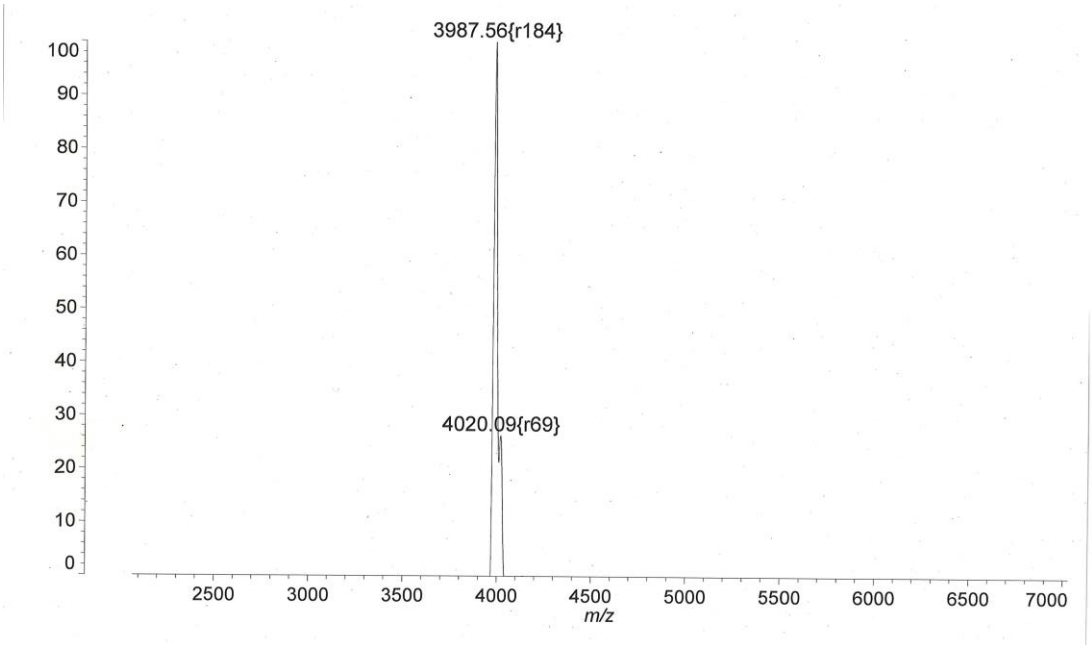


Abbildung A 74: MALDI-Massenspektrum von **DNA1_*o*-4API**.

DNA2_*o*-4API

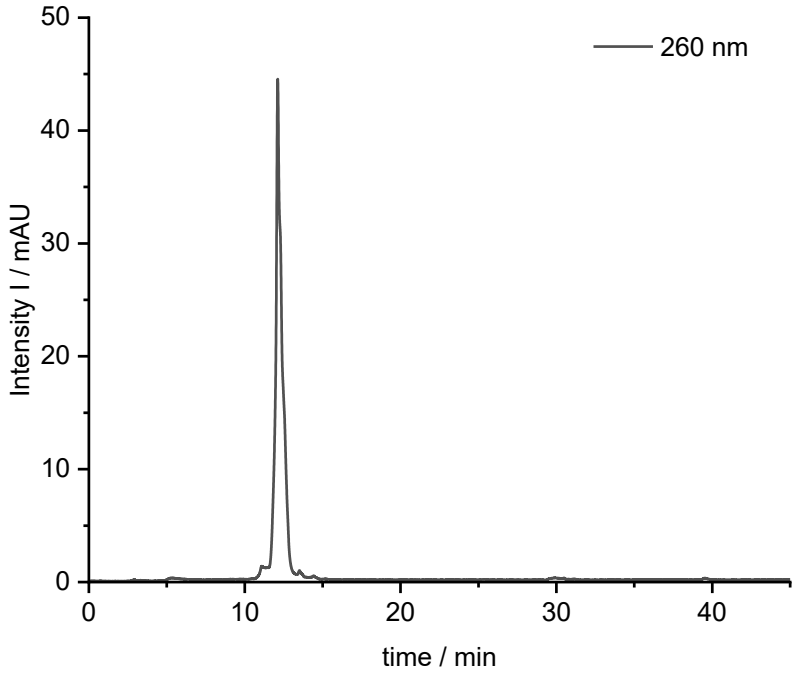


Abbildung A 75: HPLC-Chromatogramm von **DNA2_*o*-4API**.

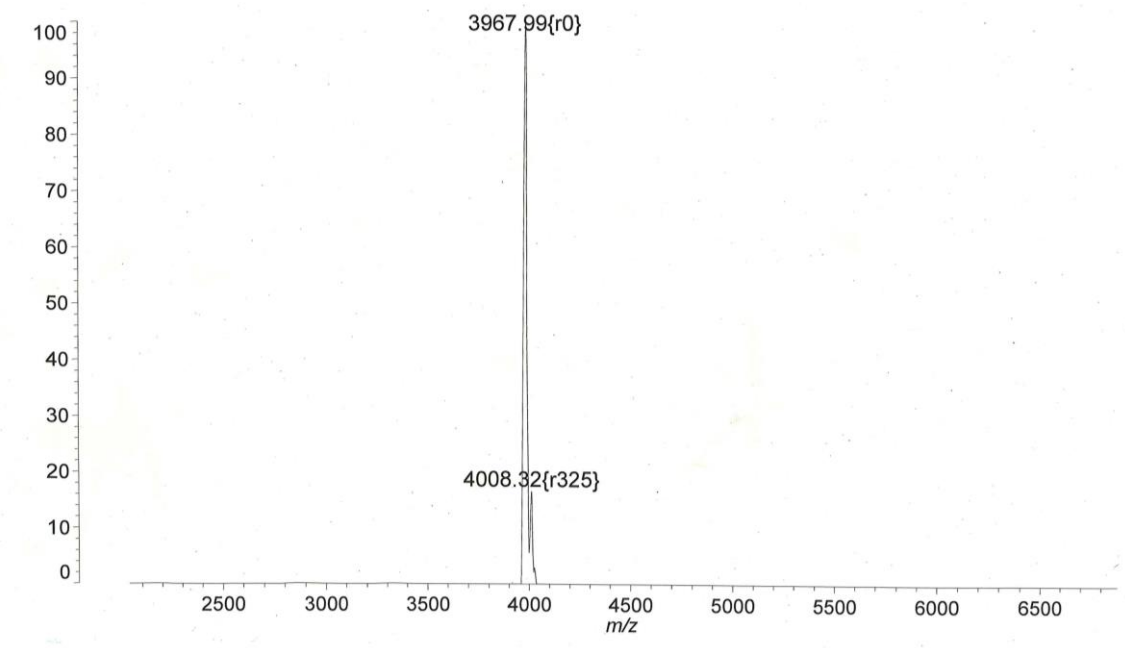


Abbildung A 76: MALDI-Massenspektrum von **DNA12_*o*-4API**.

DNA1_DMANI1

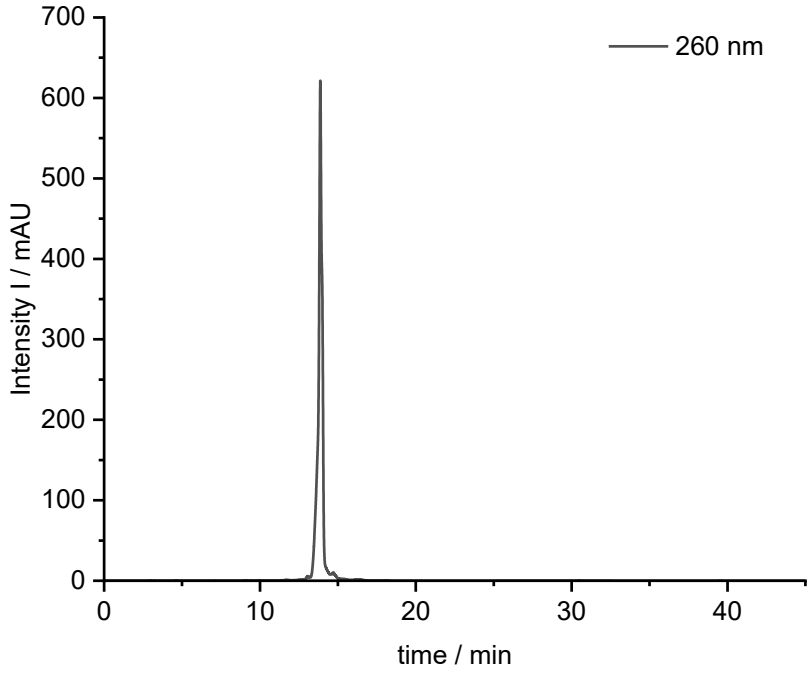


Abbildung A 77: HPLC-Chromatogramm von **DNA1_DMANI1**.

Abbildung A 78:

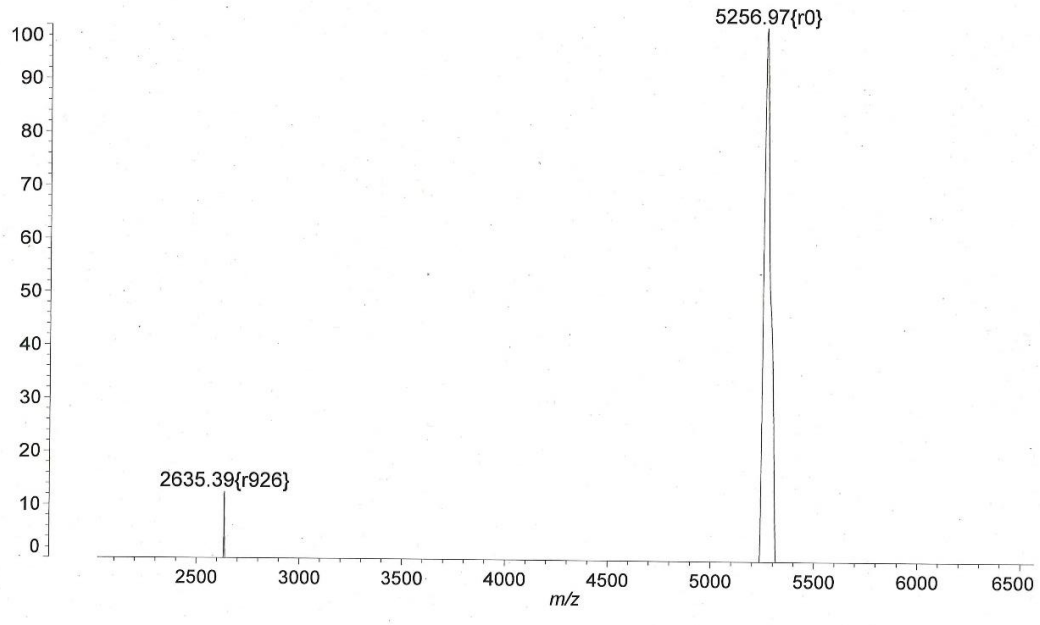


Abbildung A 79: MALDI-Massenspektrum von **DNA1_DMANI1**.

cs_DNA_DMANI1

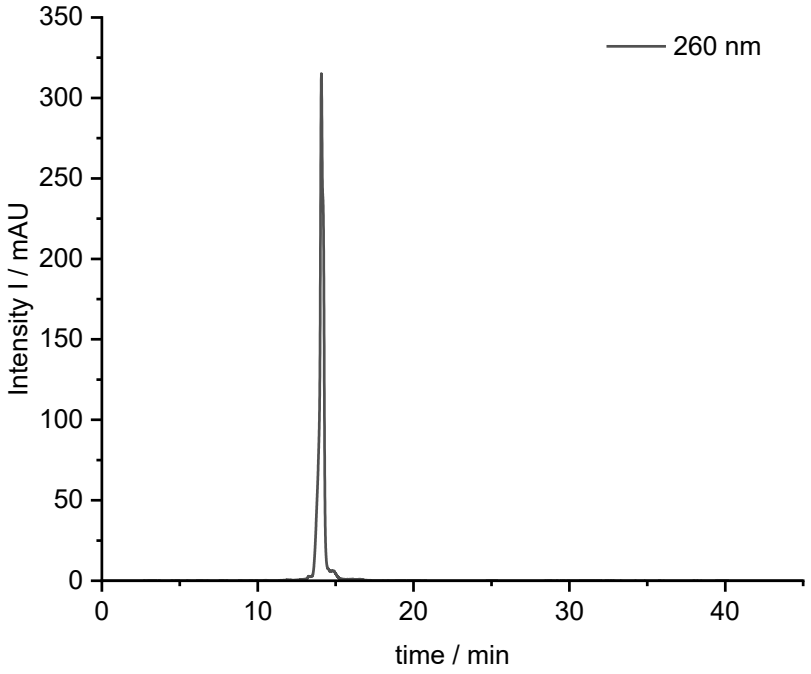


Abbildung A 80: HPLC-Chromatogramm von **cs_DNA_DMANI1**.

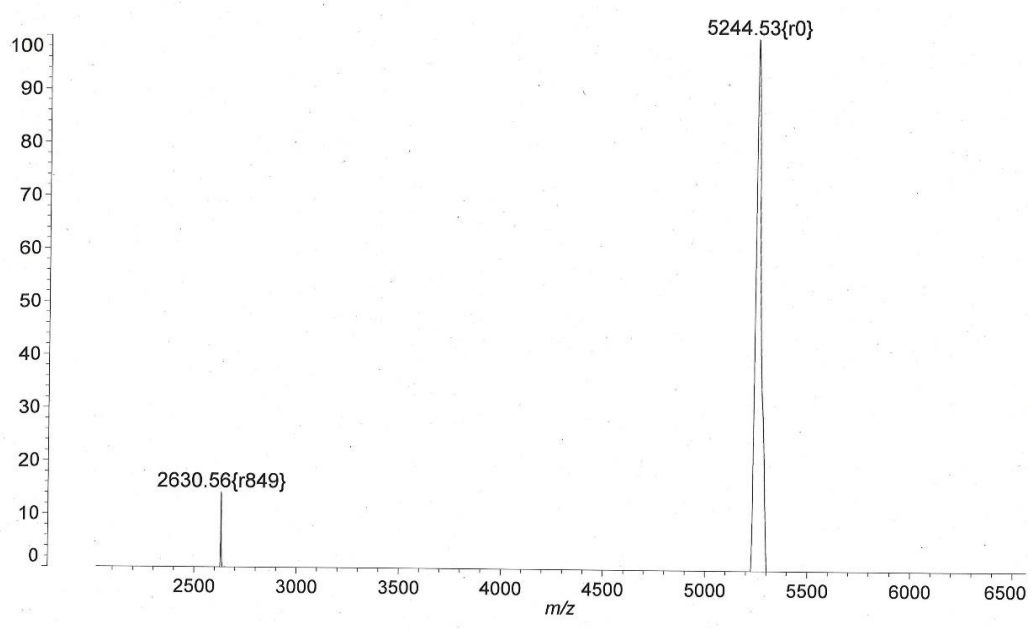


Abbildung A 81: MALDI-Massenspektrum von **cs_DNA_DMANI1**.

DNA3_DMANI1

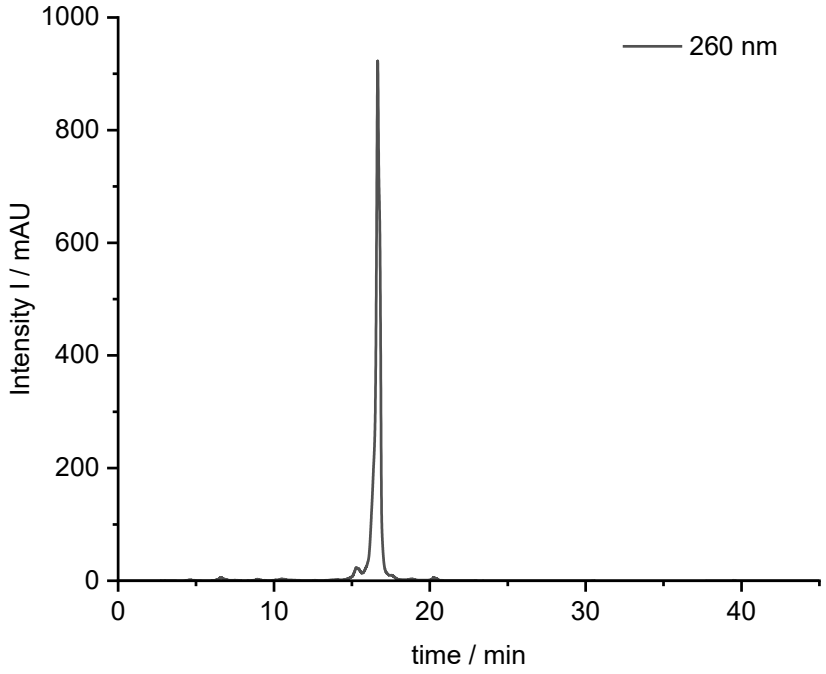


Abbildung A 82: HPLC-Chromatogramm von **DNA3_DMANI1**.

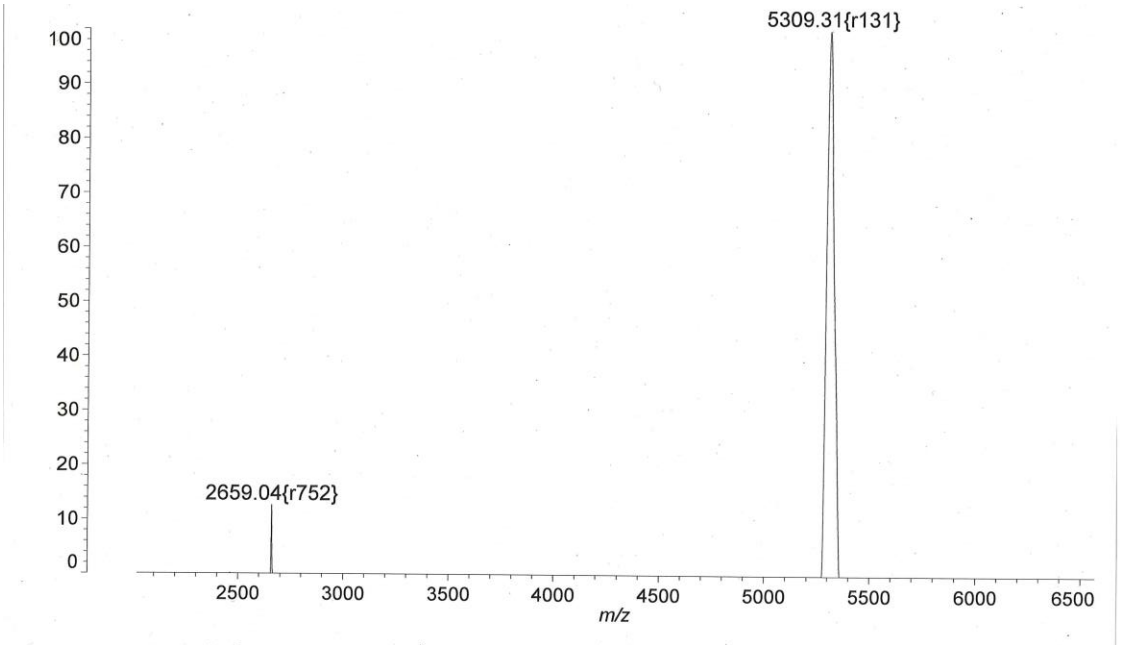


Abbildung A 83: MALDI-Massenspektrum von **DNA3_DMANI1**.

DNA1_DMANI2

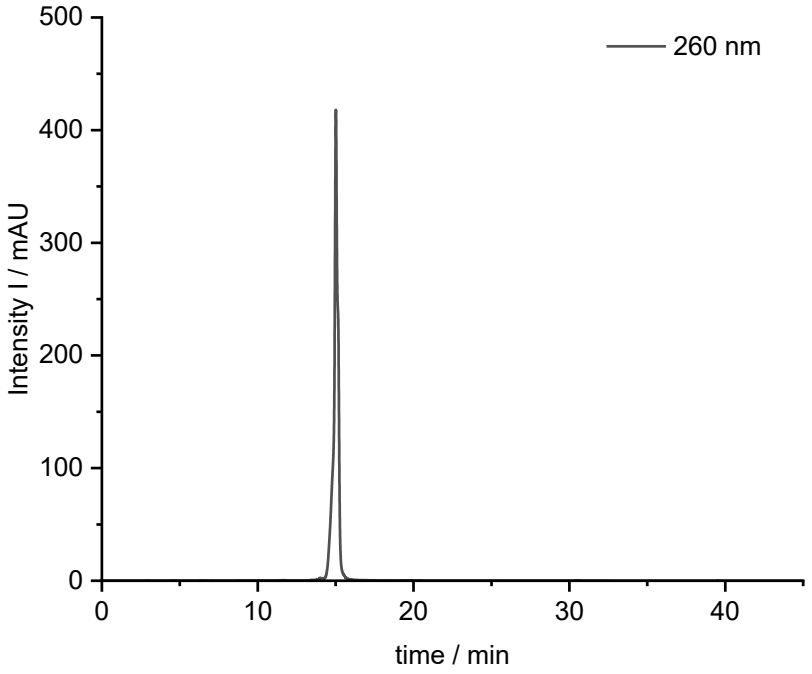


Abbildung A 84: HPLC-Chromatogramm von **DNA1_DMANI2**.

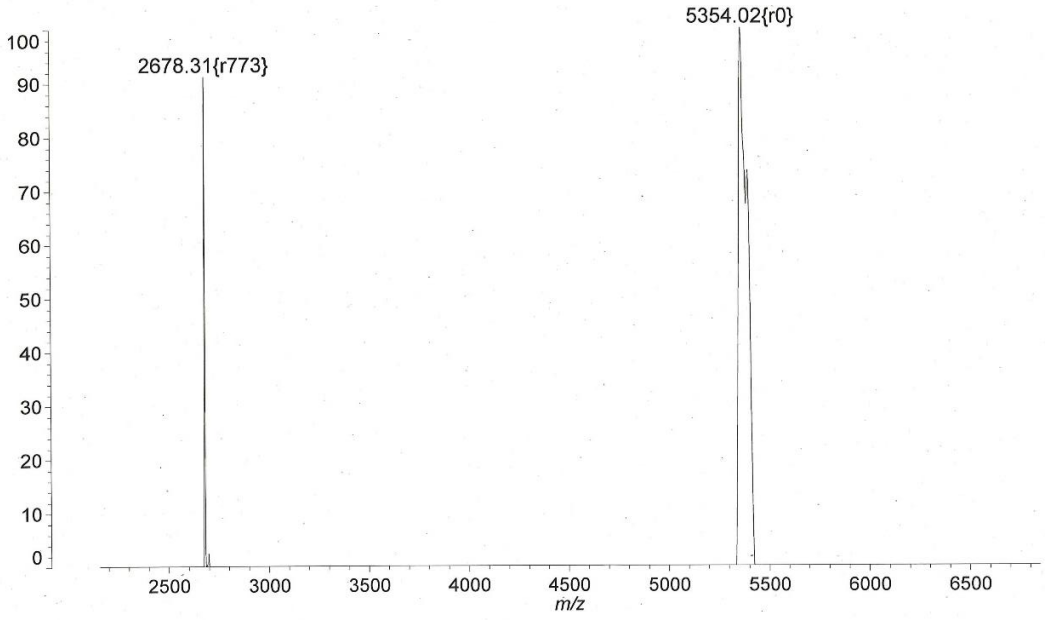


Abbildung A 85: MALDI-Massenspektrum von **DNA1_DMANI2**.

cs_DNA_DMANI2

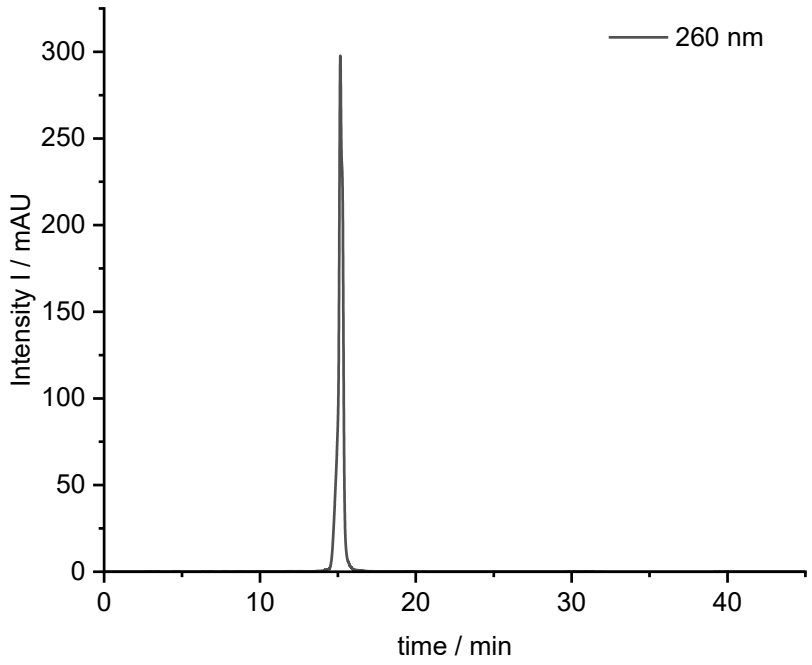


Abbildung A 86: HPLC-Chromatogramm von **cs_DNA_DMANI2**.

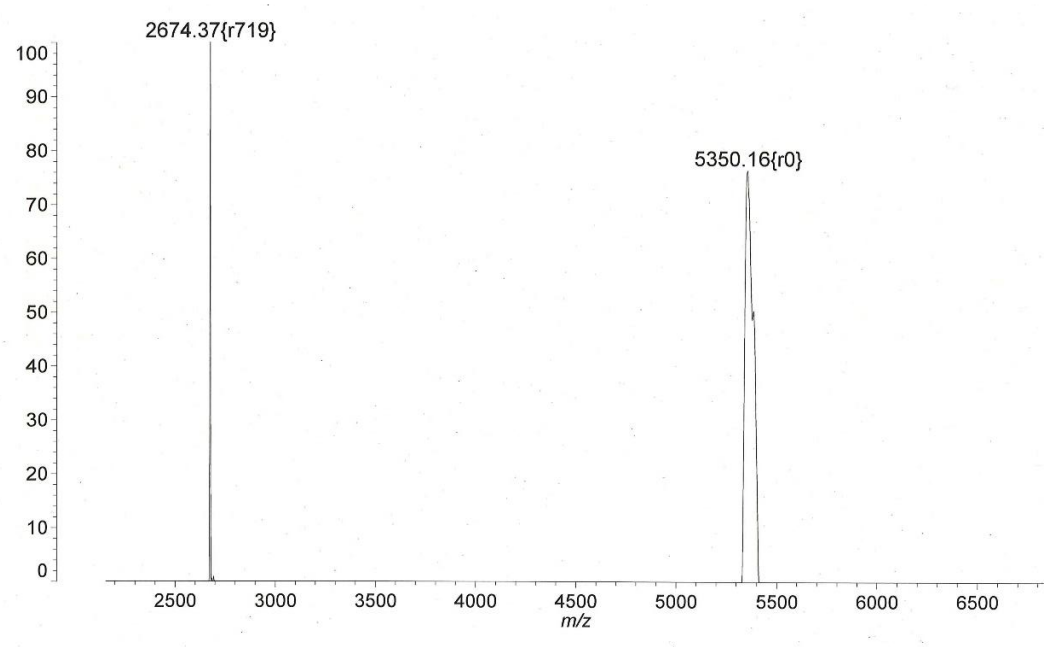


Abbildung A 87: MALDI-Massenspektrum von **cs_DNA_DMANI2**.

DNA3_DMANI2

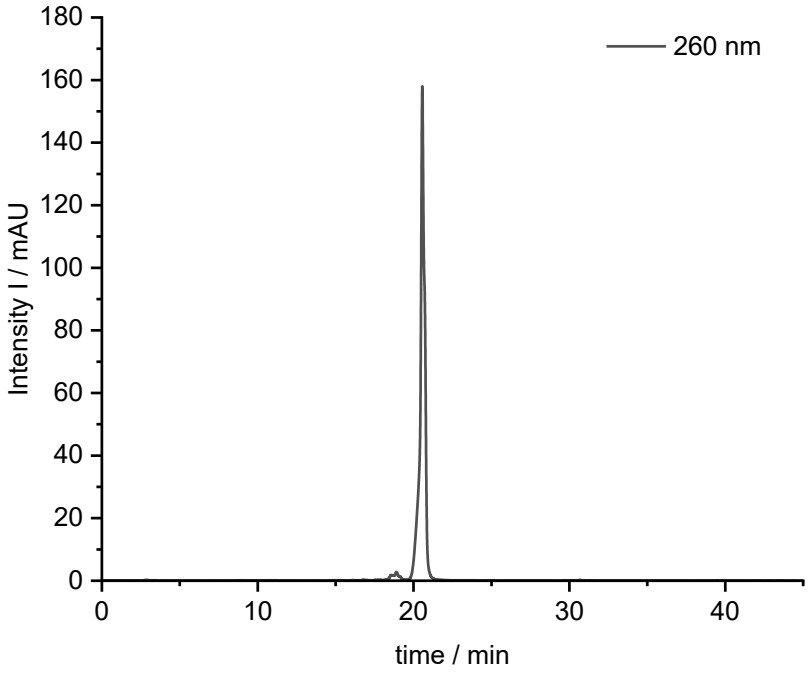


Abbildung A 88: HPLC-Chromatogramm von **DNA3_DMANI2**.

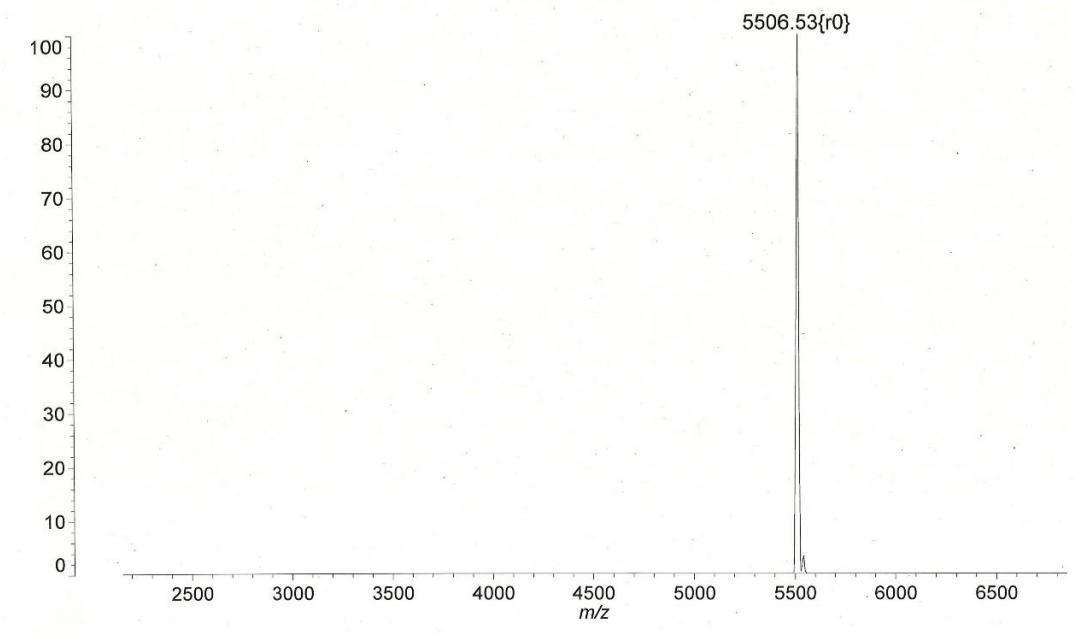


Abbildung A 89: MALDI-Massenspektrum von **DNA3_DMANI2**.

DNA1_ANI1

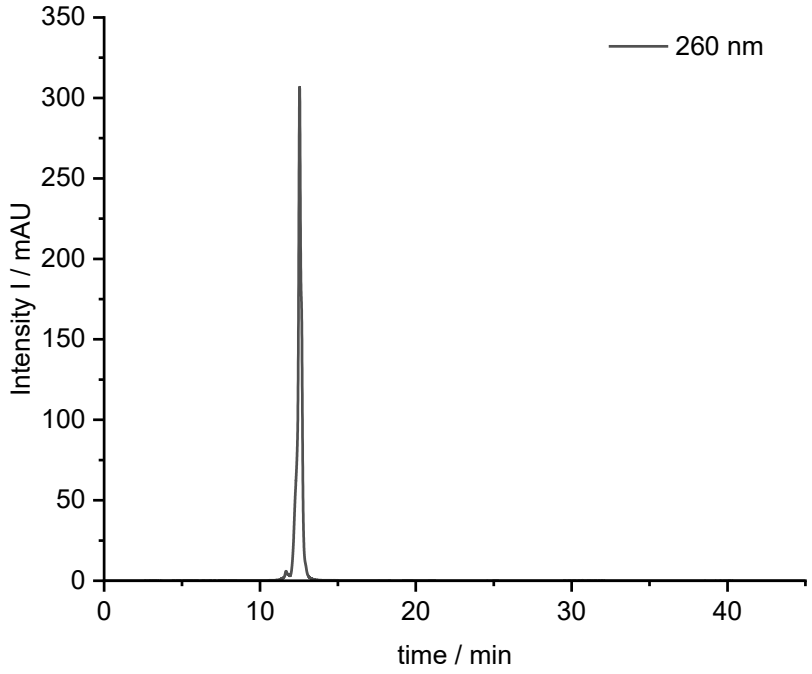


Abbildung A 90: HPLC-Chromatogramm von **DNA1_ANI1**.

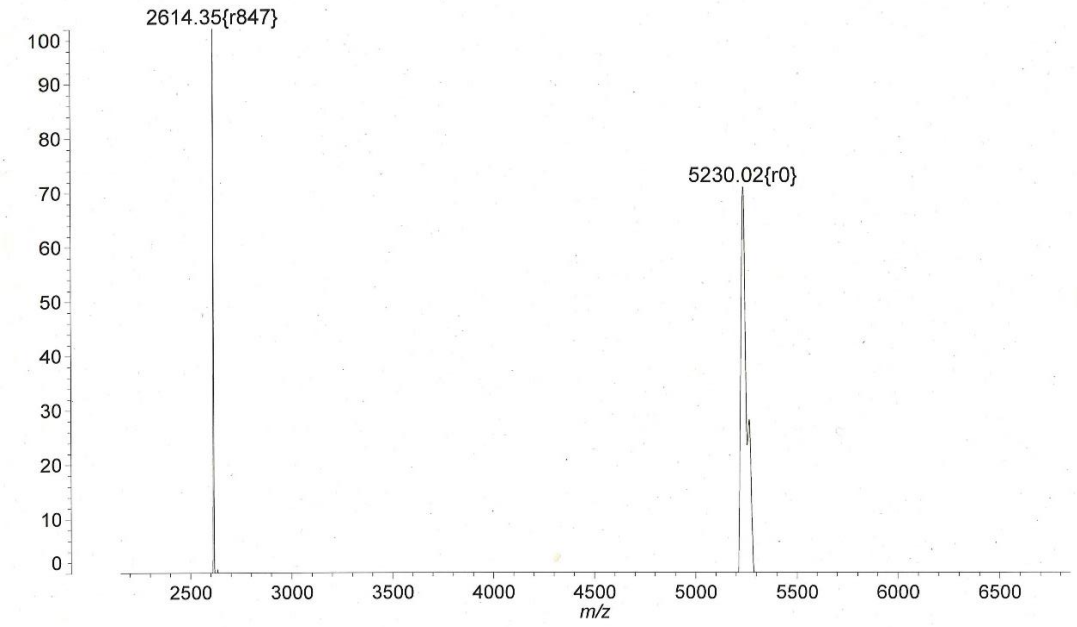


Abbildung A 91: MALDI-Massenspektrum von **DNA1_ANI1**.

cs_DNA_ANI1

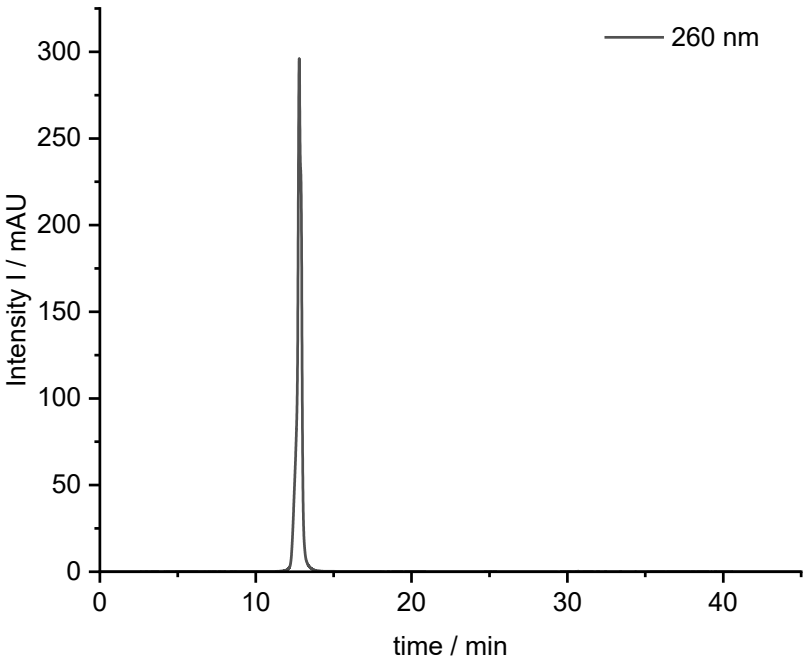


Abbildung A 92: HPLC-Chromatogramm von **cs_DNA_ANI1**.

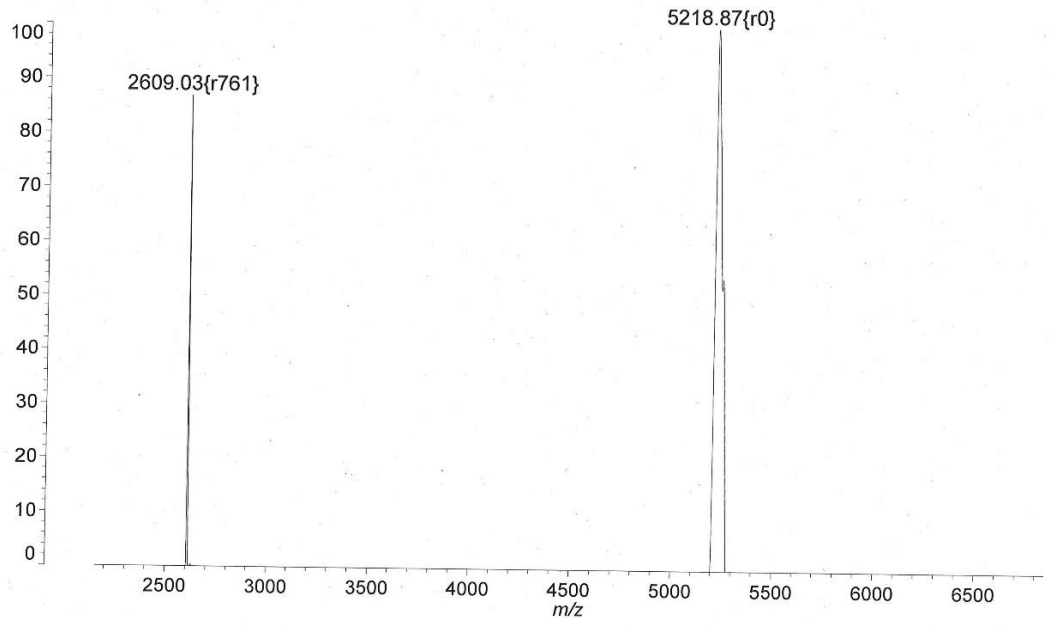


Abbildung A 93: MALDI-Massenspektrum von **cs_DNA_ANI1**.

DNA3_ANI1

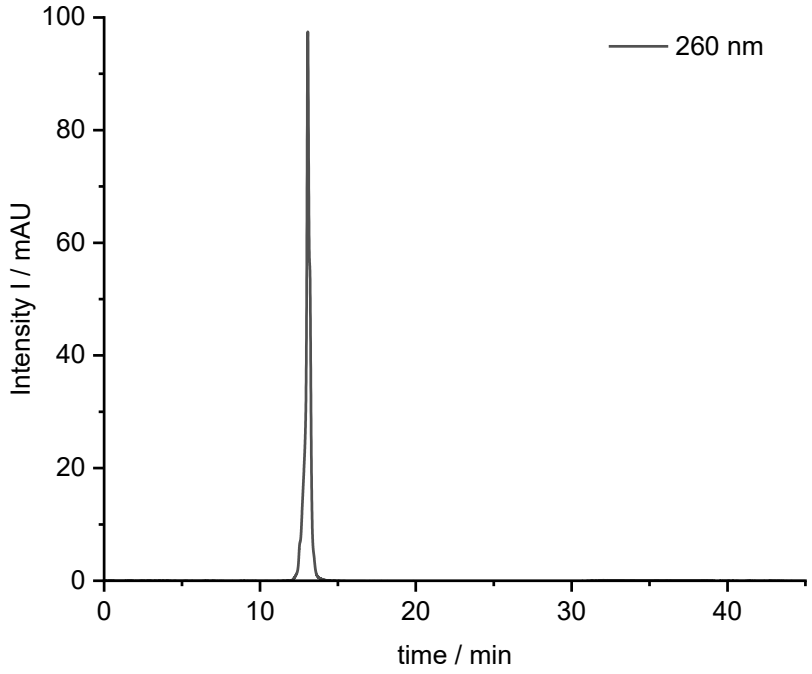


Abbildung A 94: HPLC-Chromatogramm von **DNA3_ANI1**.

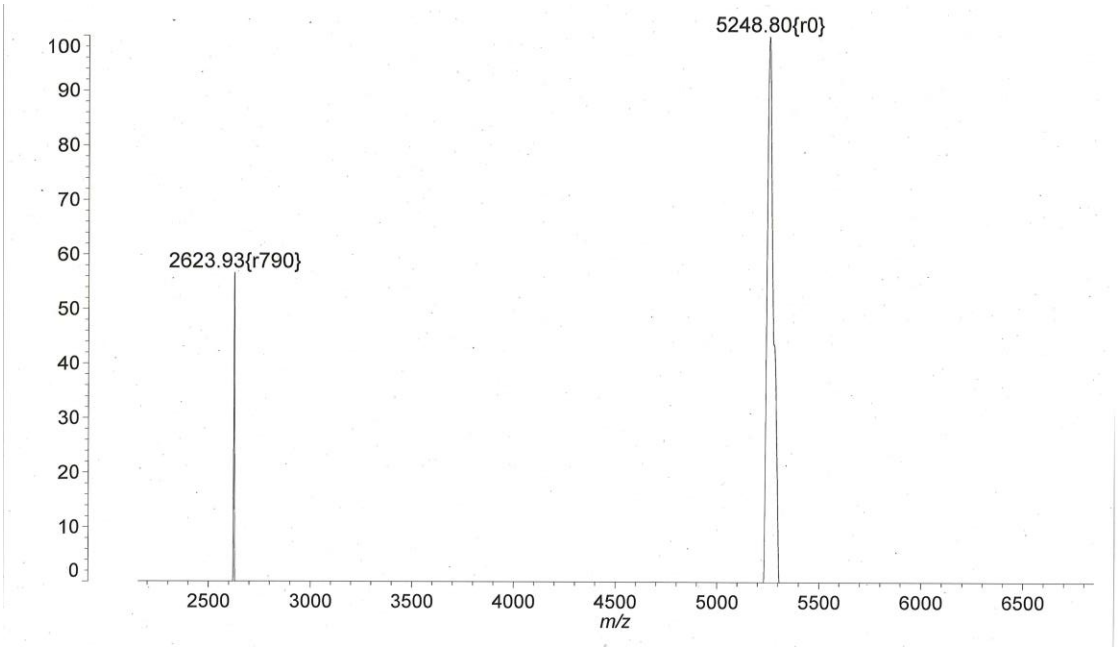


Abbildung A 95: MALDI-Massenspektrum von **DNA3_ANI1**.

DNA1_ANI2

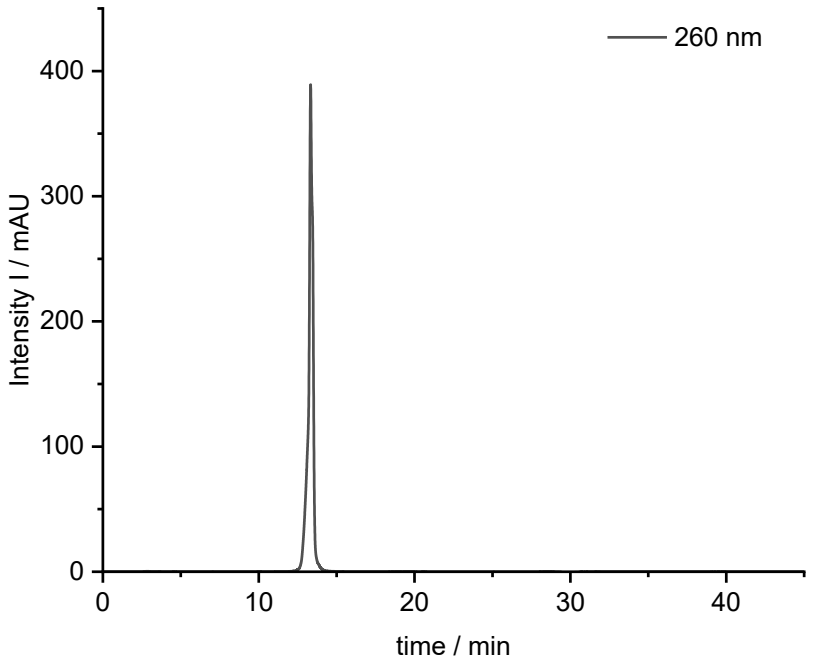


Abbildung A 96: HPLC-Chromatogramm von **DNA1_ANI2**.

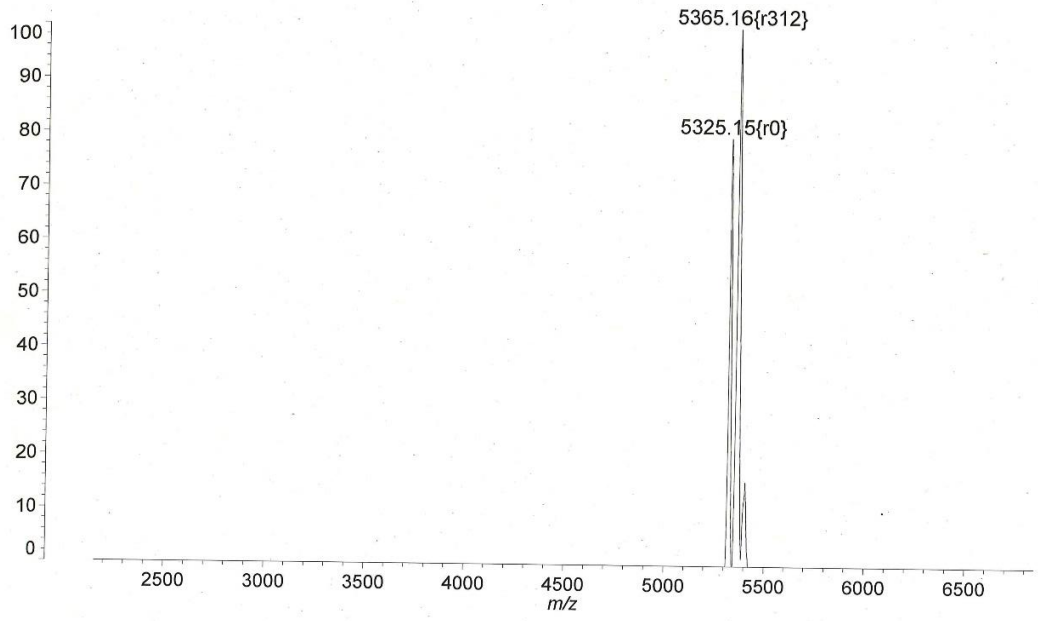


Abbildung A 97: MALDI-Massenspektrum von **DNA1_ANI2**.

cs_DNA_ANI2

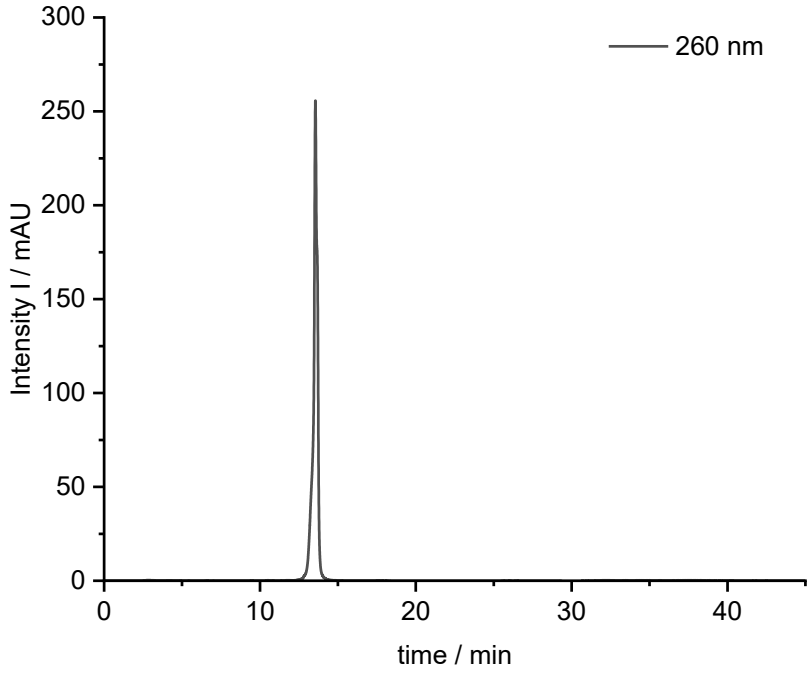


Abbildung A 98: HPLC-Chromatogramm von **cs_DNA_ANI2**.

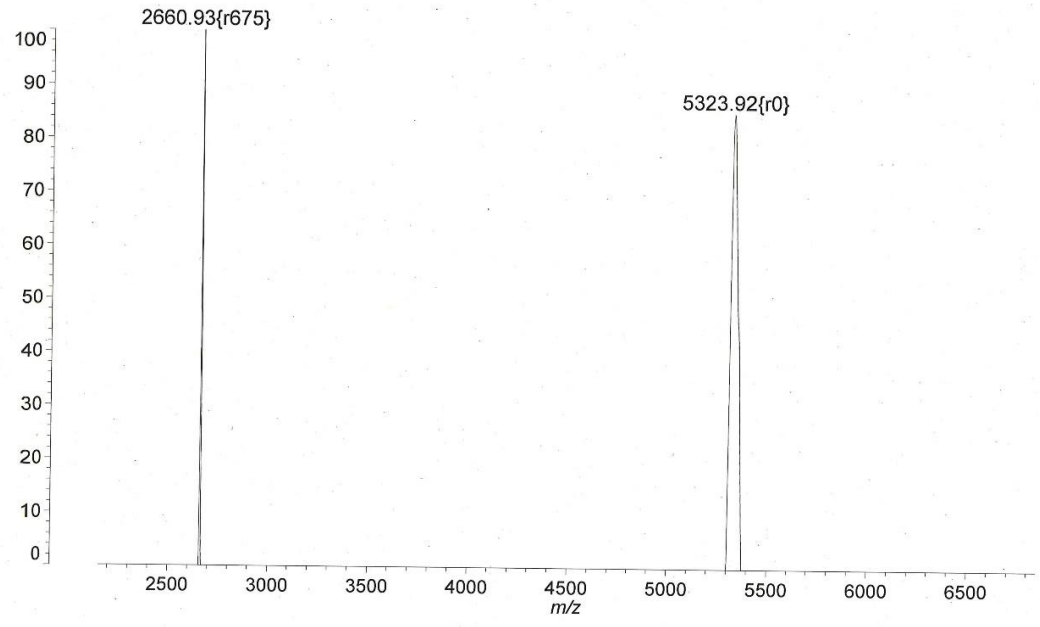


Abbildung A 99: MALDI-Massenspektrum von **cs_DNA_ANI2**.

DNA3_ANI2

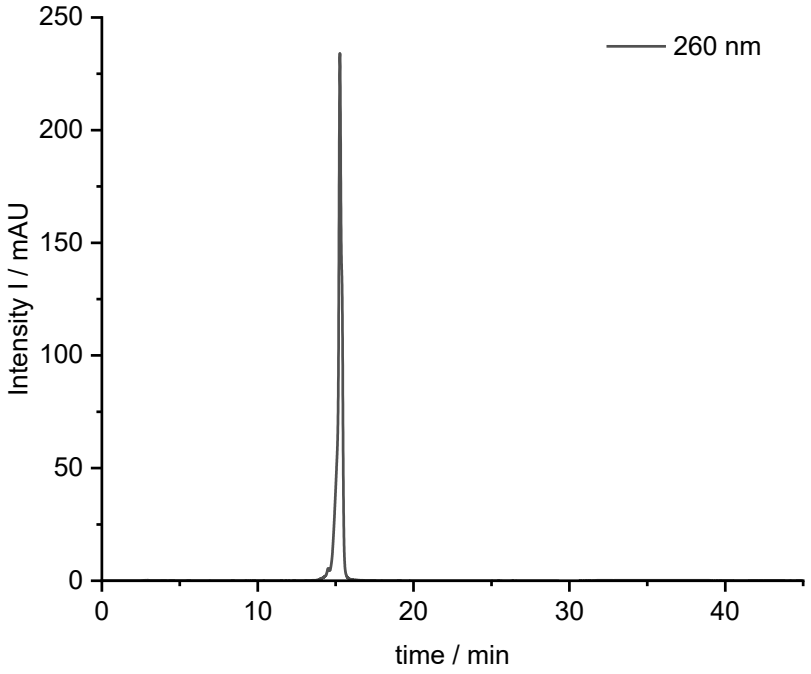


Abbildung A 100: HPLC-Chromatogramm von **DNA3_ANI2**.

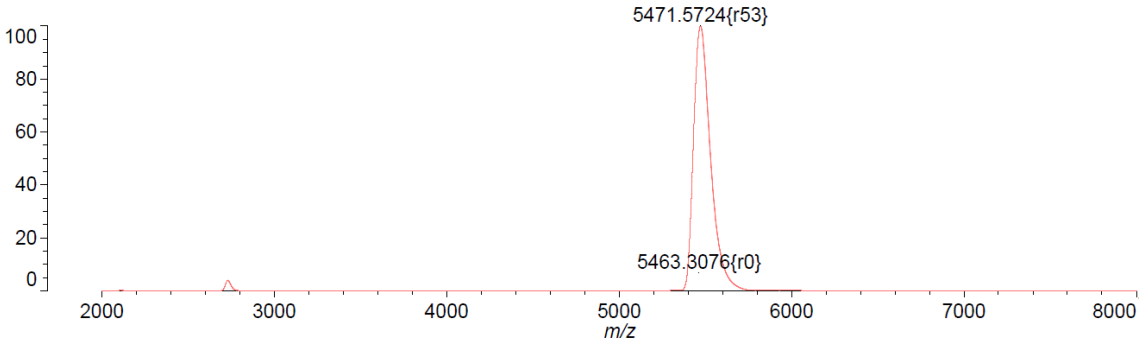


Abbildung A 101: MALDI-Massenspektrum von **DNA3_ANI2**.

DNA3_DMANI2/PANI

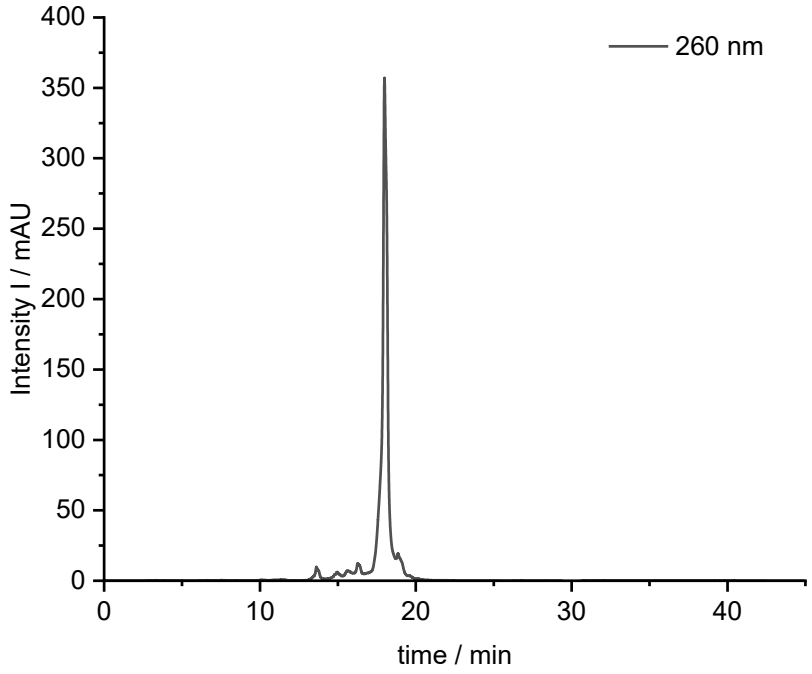


Abbildung A 102: HPLC-Chromatogramm von **DNA3_DMANI2/PANI**.

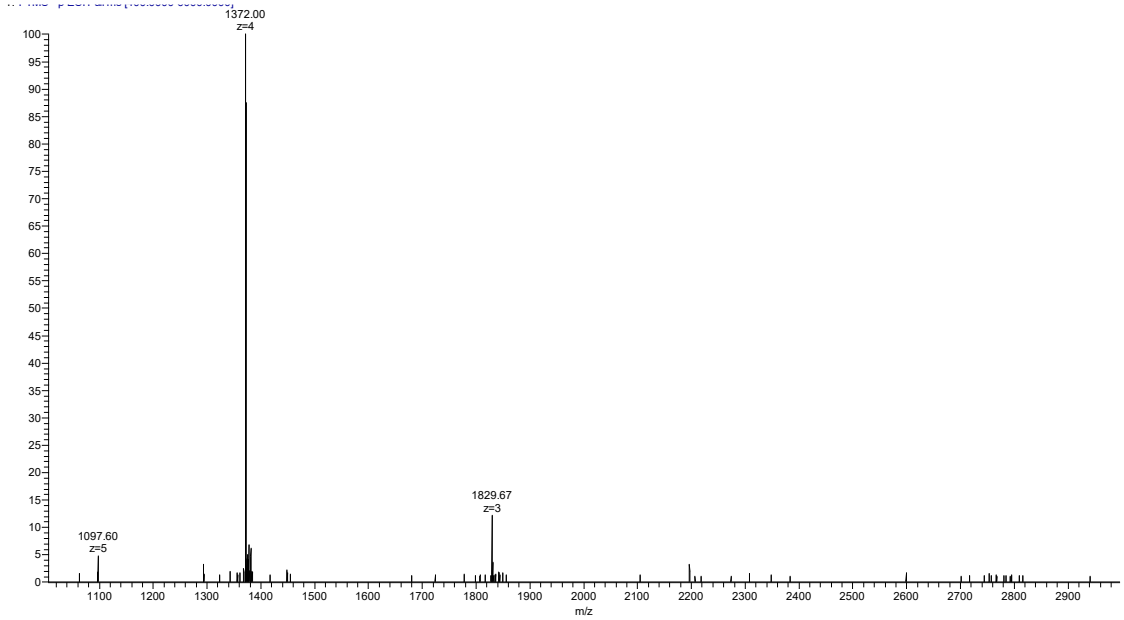


Abbildung A 103: ESI-Massenspektrum von **DNA3_DMANI2/PANI**.

DNA1_NDI1

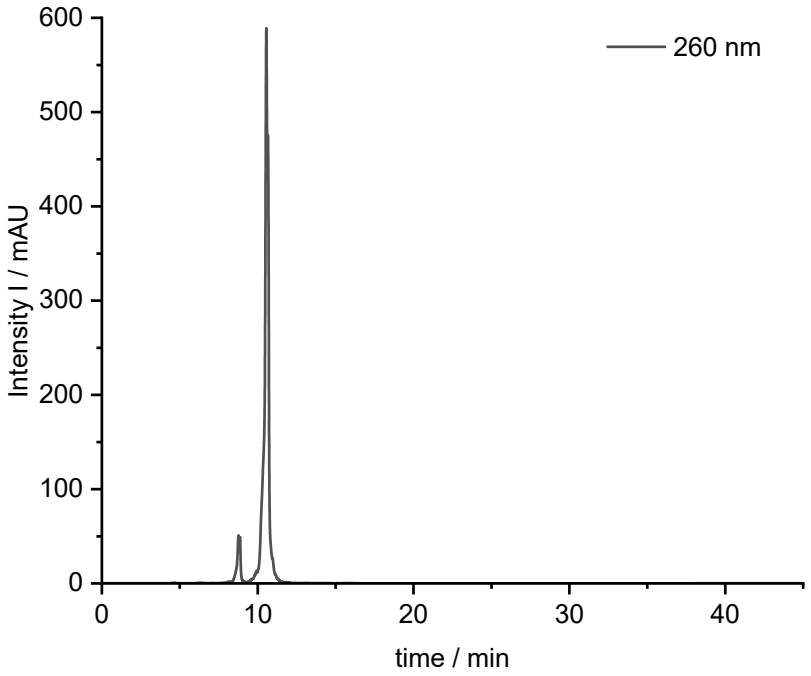


Abbildung A 104: HPLC-Chromatogramm von **DNA1_NDI1**.

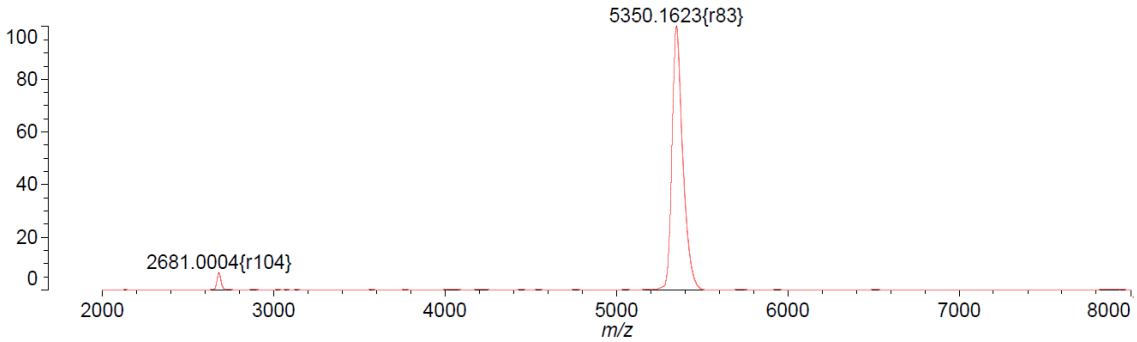


Abbildung A 105: MALDI-Massenspektrum von **DNA1_NDI1**.

cs_DNA_NDI1

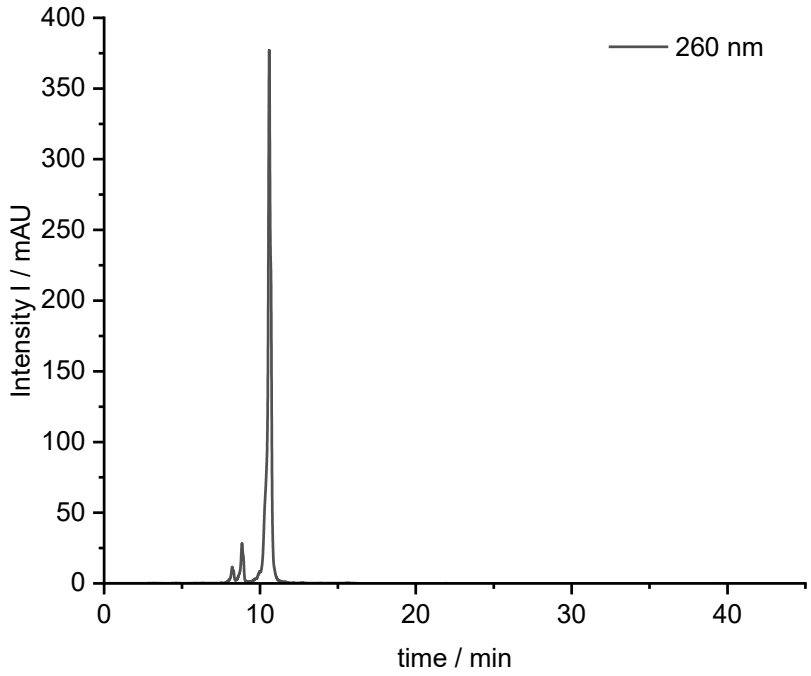


Abbildung A 106: HPLC-Chromatogramm von **cs_DNA_NDI1**.

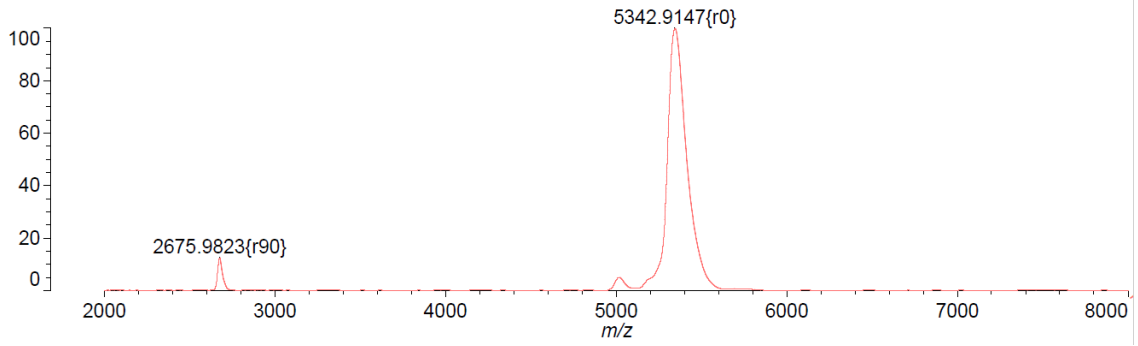


Abbildung A 107: MALDI-Massenspektrum von **cs_DNA_NDI1**.

DNA3_NDI1

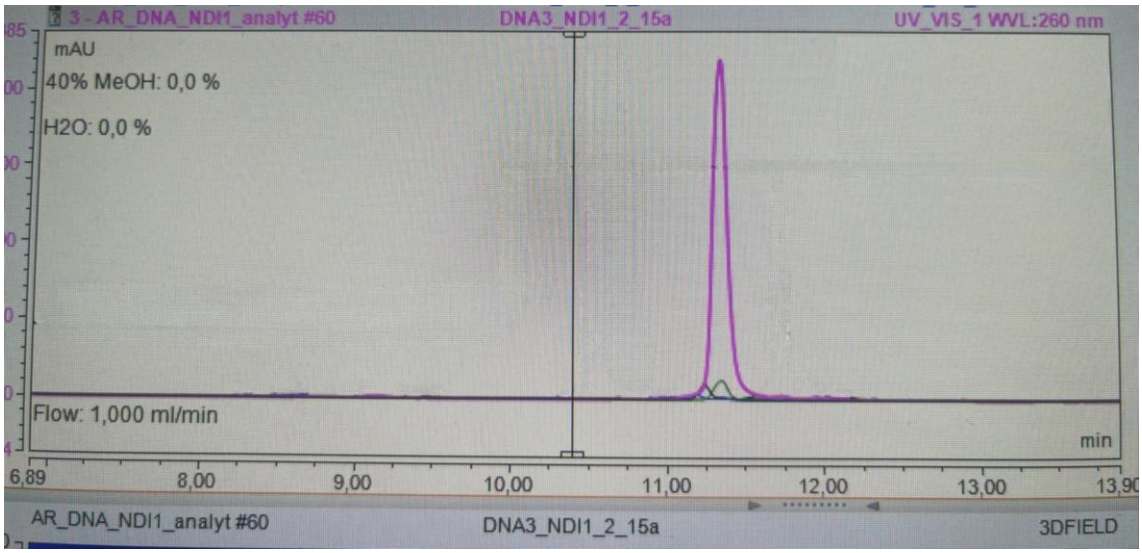


Abbildung A 108: HPLC-Chromatogramm von **DNA3_NDI1**.

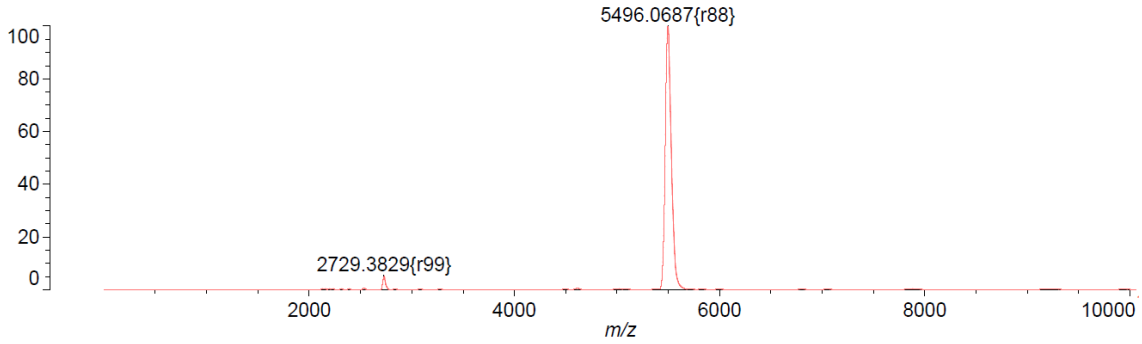


Abbildung A 109: MALDI- Massenspektrum von **DNA3_NDI1**.

DNA1_NDI2

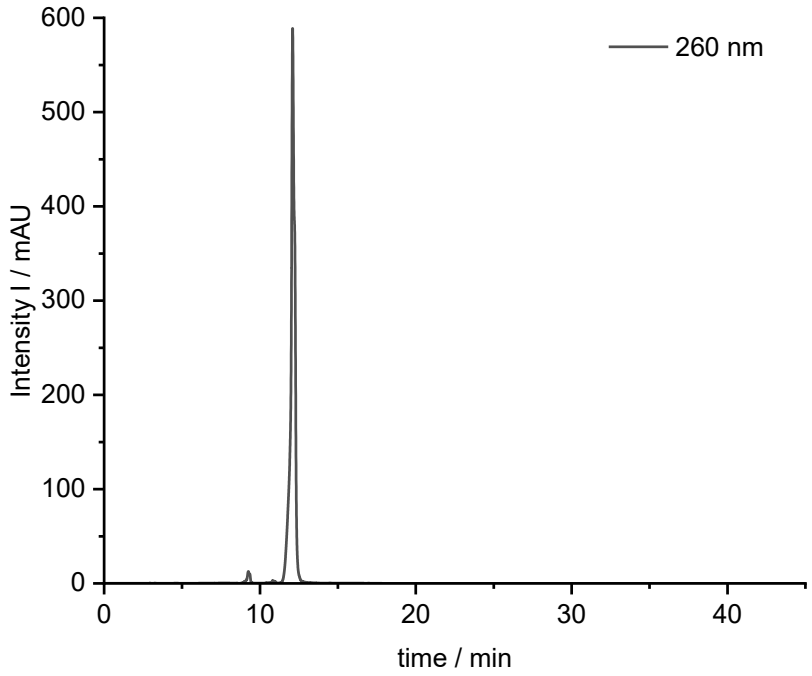


Abbildung A 110: HPLC-Chromatogramm von **DNA1_NDI2**.

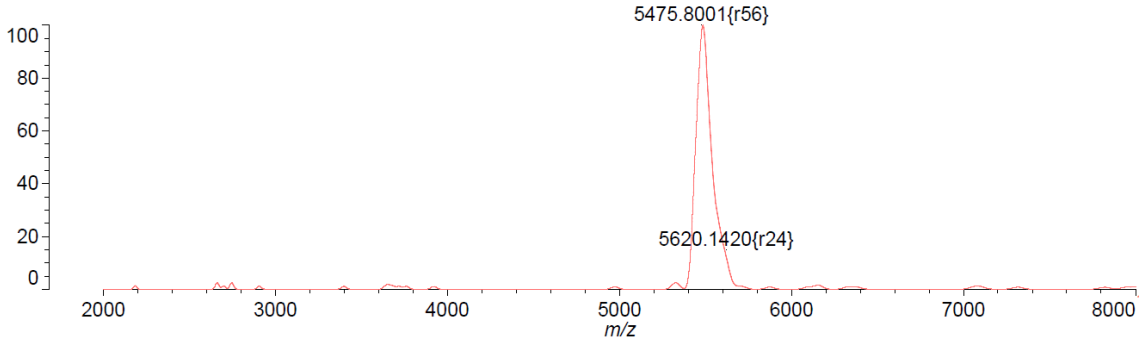


Abbildung A 111: MALDI-Massenspektrum von **DNA1_NDI2**.

cs_DNA_NDI2

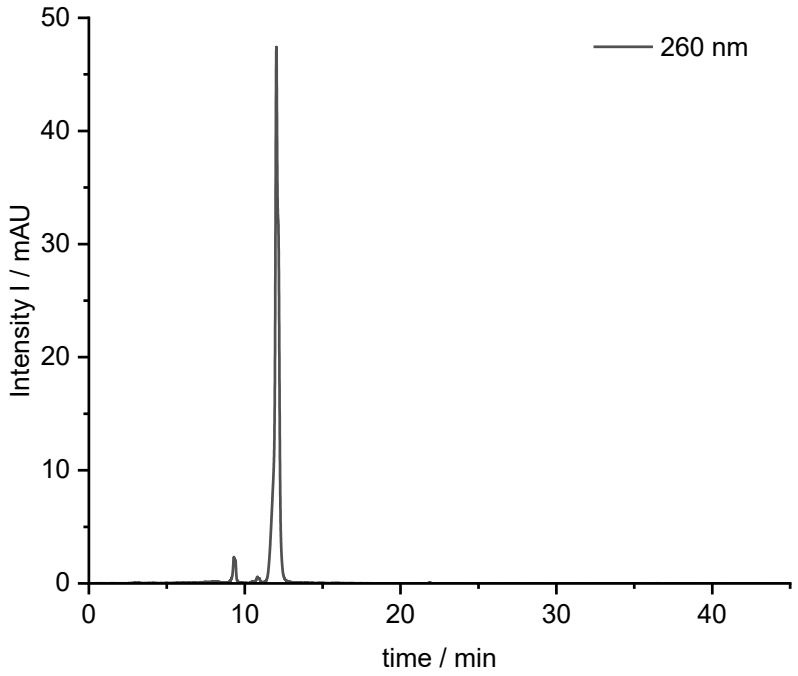


Abbildung A 112: HPLC-Chromatogramm von **cs_DNA_NDI2**.

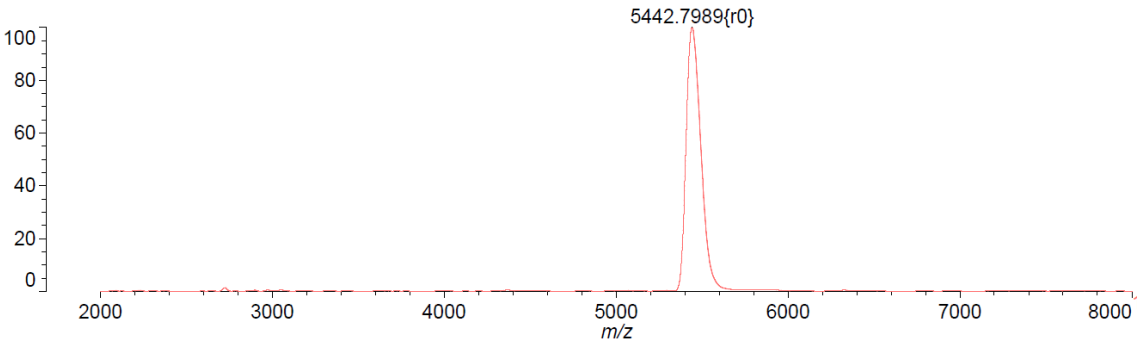


Abbildung A 113: MALDI-Massenspektrum von **cs_DNA_NDI2**.

DNA3_NDI2

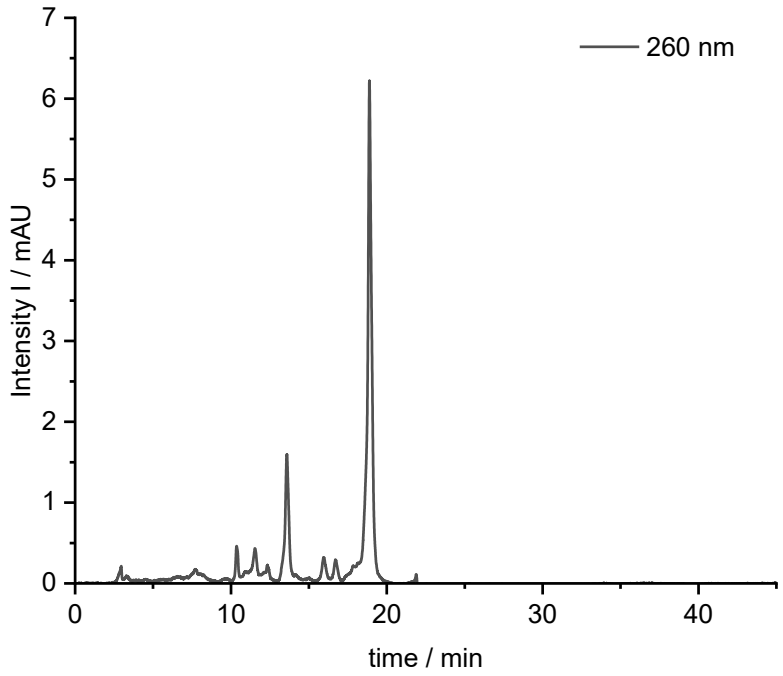


Abbildung A 114: HPLC-Chromatogramm von **DNA3_NDI2**.

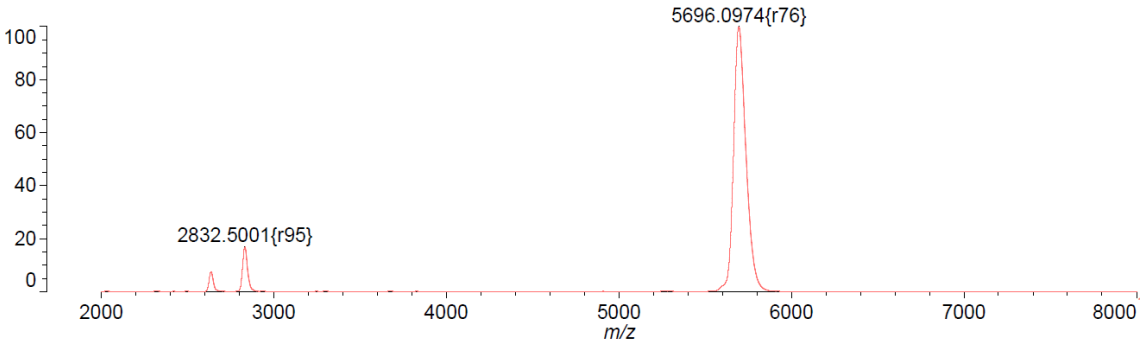


Abbildung A 115: MALDI-Massenspektrum von **DNA3_NDI2**.

RNA1_*o*-4API

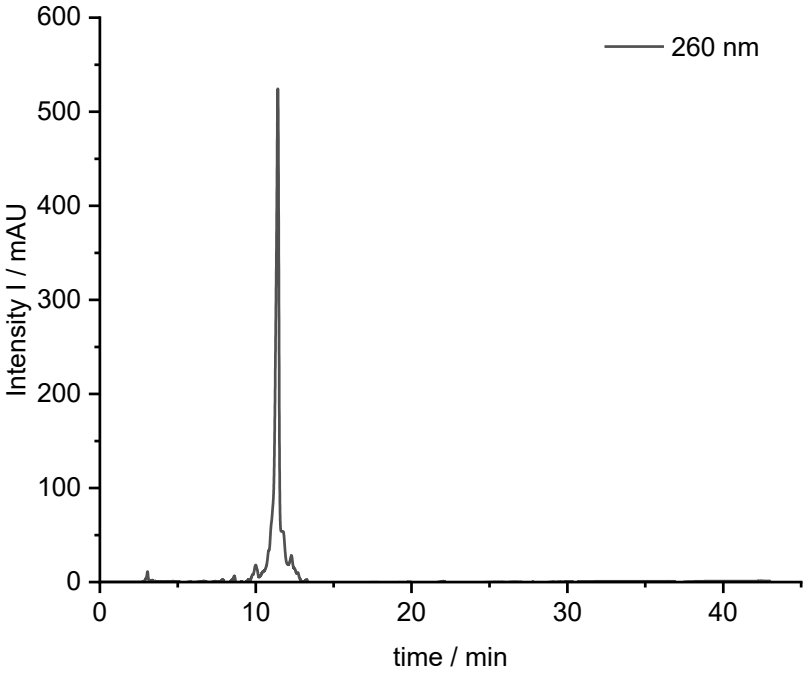


Abbildung A 116: HPLC-Chromatogramm von **RNA1_*o*-4API**.

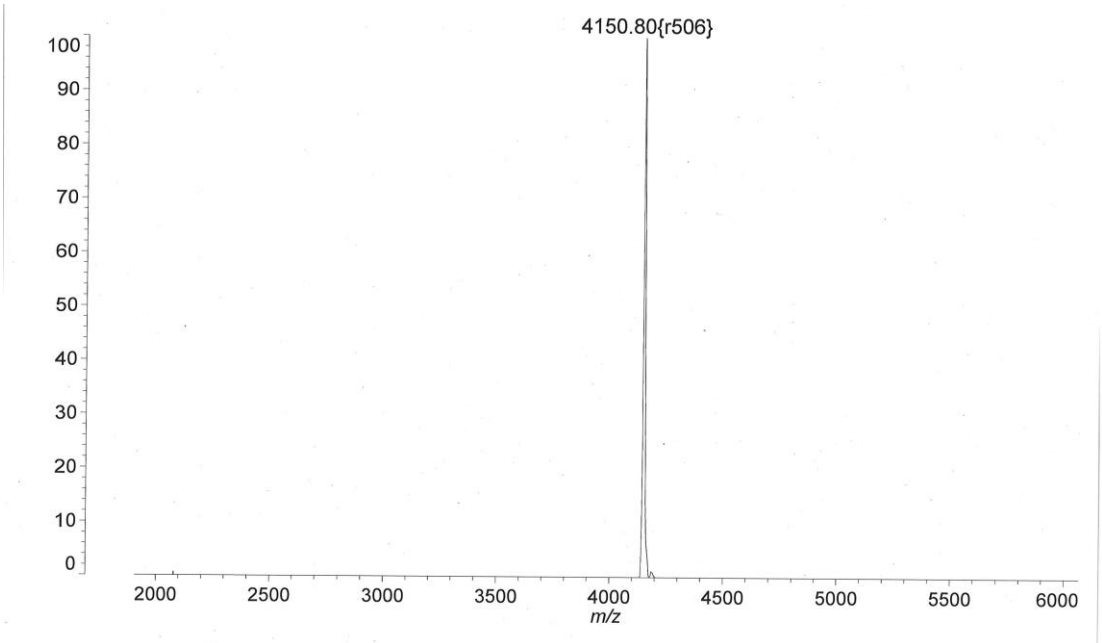


Abbildung A 117: MALDI-Massenspektrum von **RNA1_*o*-4API**.

RNA2_*o*-4API

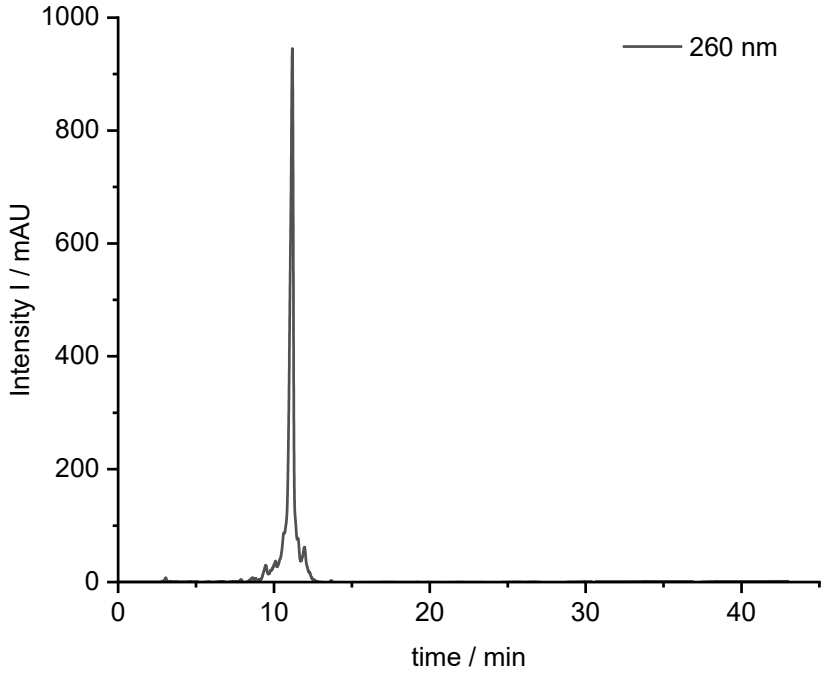


Abbildung A 118: HPLC-Chromatogramm von **RNA2_*o*-4API**.

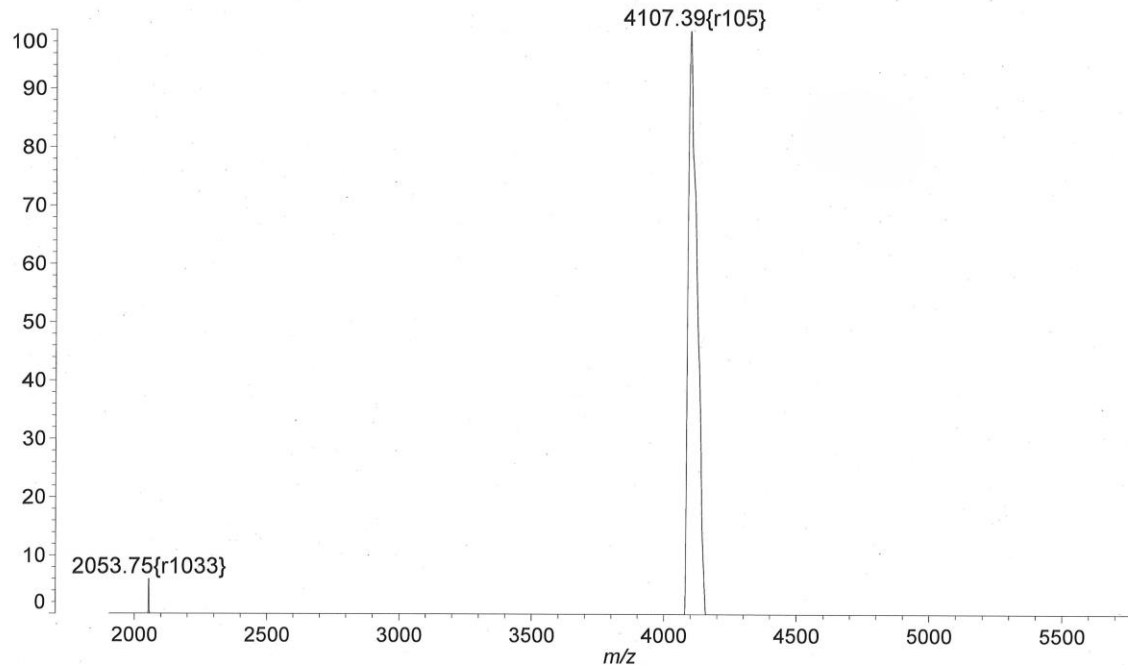


Abbildung A 119: MALDI-Massenspektrum von **RNA2_*o*-4API**.

RNA3_*o*-4API

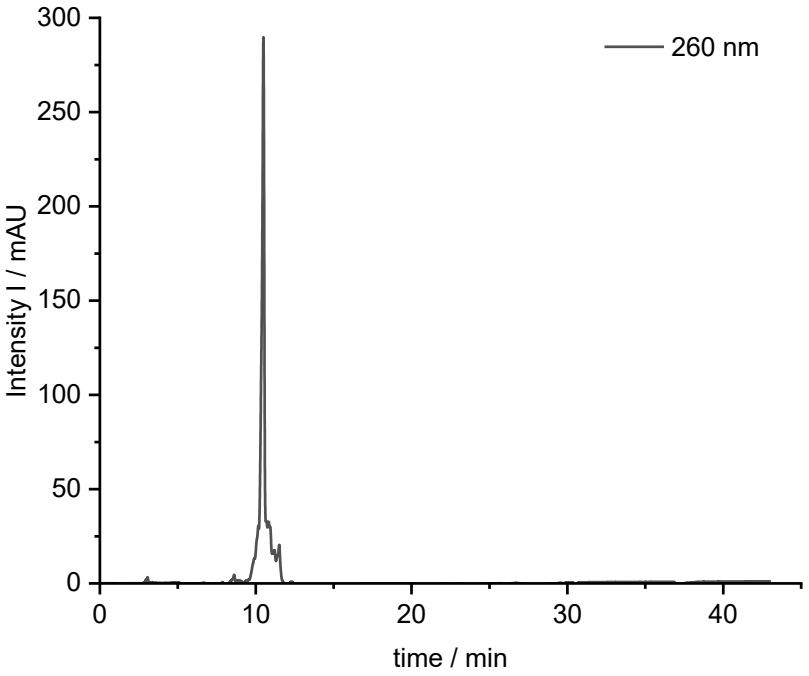


Abbildung A 120: HPLC-Chromatogramm von **RNA3_*o*-4API**.

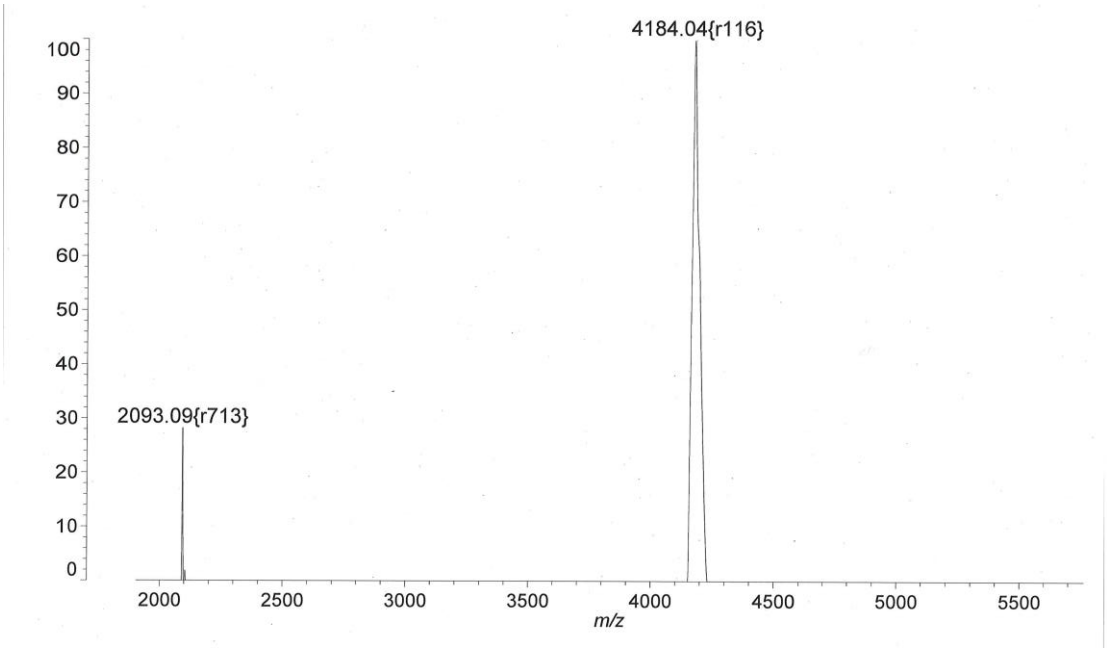


Abbildung A 121: MALDI-Massenspektrum von **RNA3_*o*-4API**.

RNA4_*o*-4API

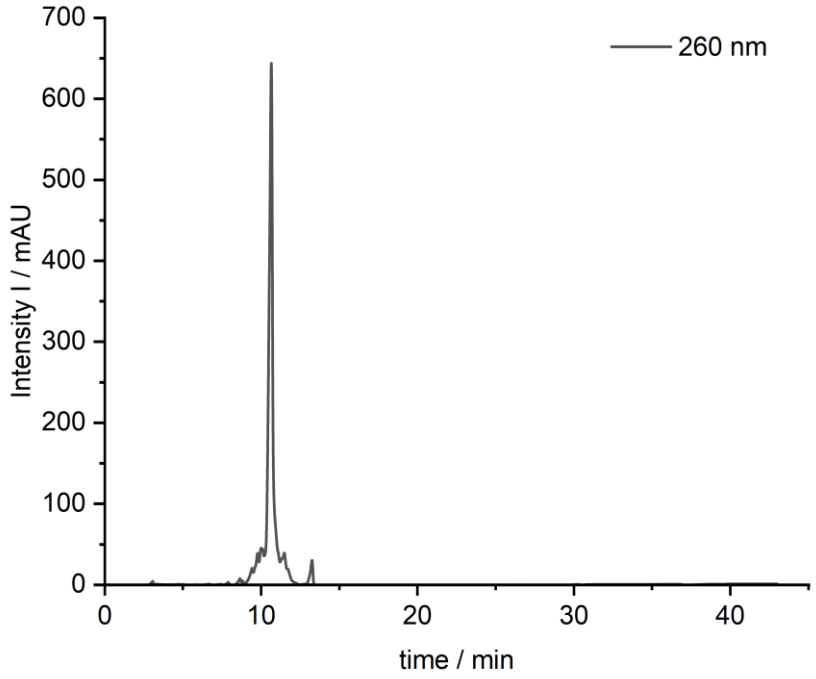


Abbildung A 122: HPLC-Chromatogramm von **RNA4_*o*-4API**.

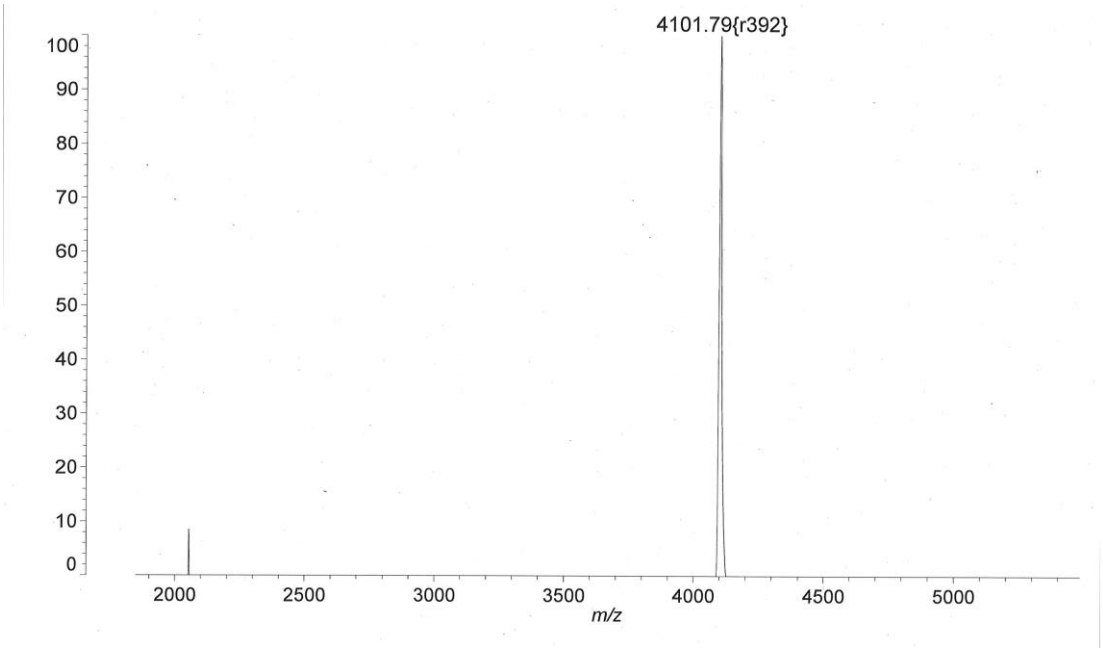


Abbildung A 123: MALDI-Massenspektrum von **RNA4_*o*-4API**.

cs_RNA1_m^{6}a

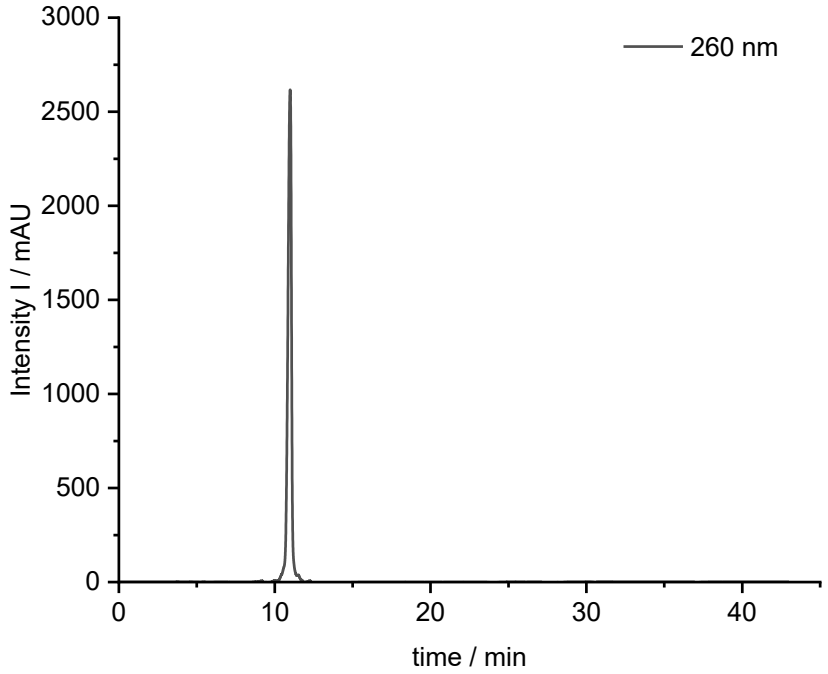


Abbildung A 124: HPLC-Chromatogramm von **cs_RNA1_m^{6}a**.

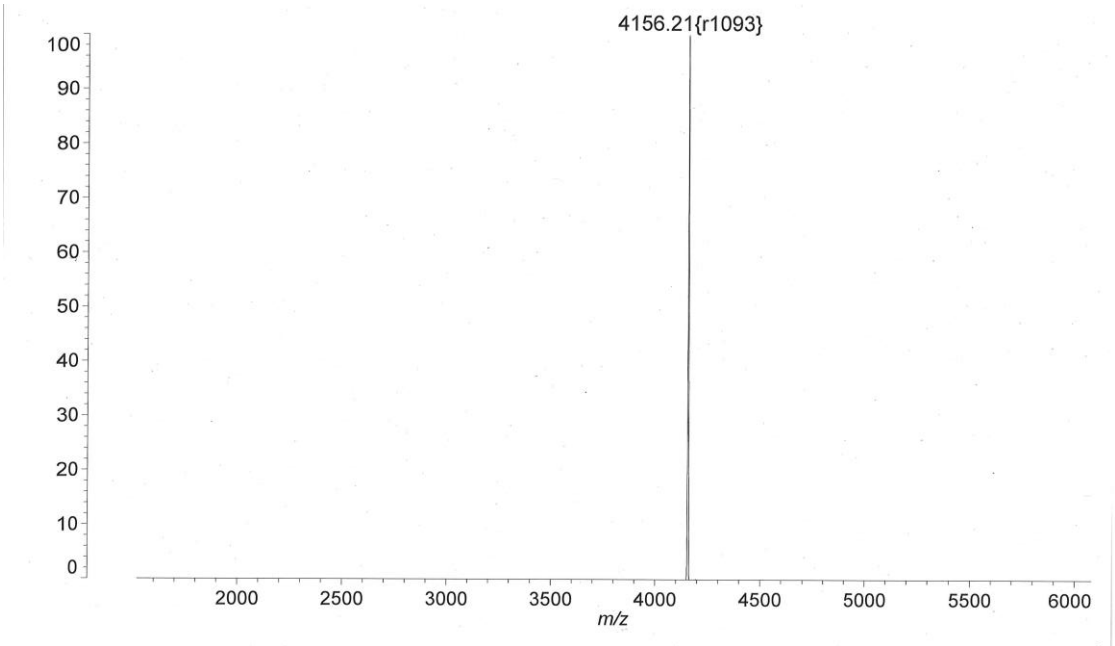


Abbildung A 125: MALDI-Massenspektrum von **cs_RNA1_m^{6}a**.

cs_RNA2_m⁶a

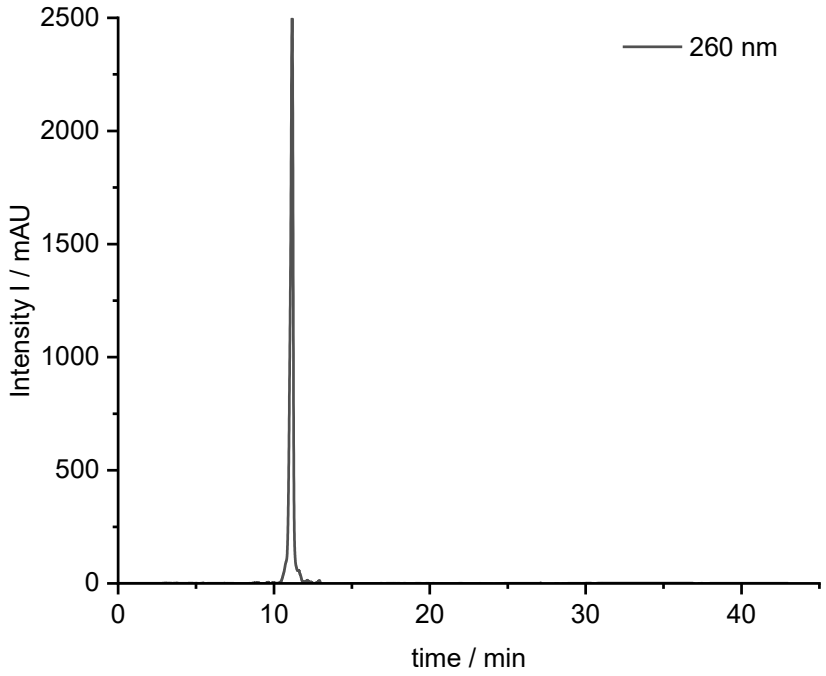


Abbildung A 126: HPLC-Chromatogramm von **cs_RNA2_m⁶a**.

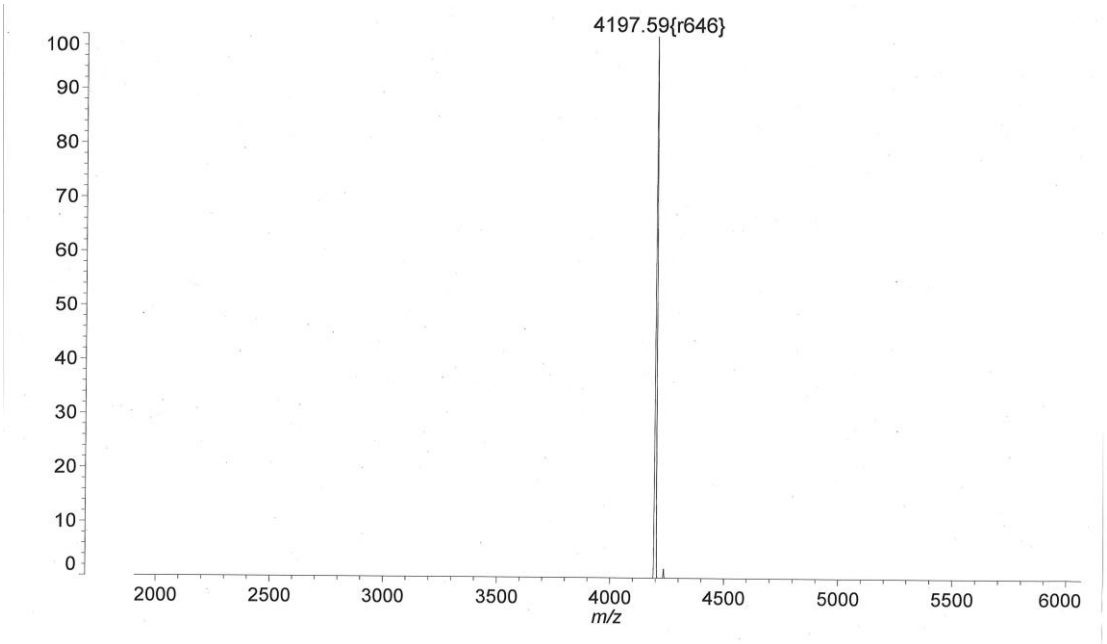


Abbildung A 127: MALDI-Massenspektrum von **cs_RNA2_m⁶a**.

cs_RNA3_m^{6}a

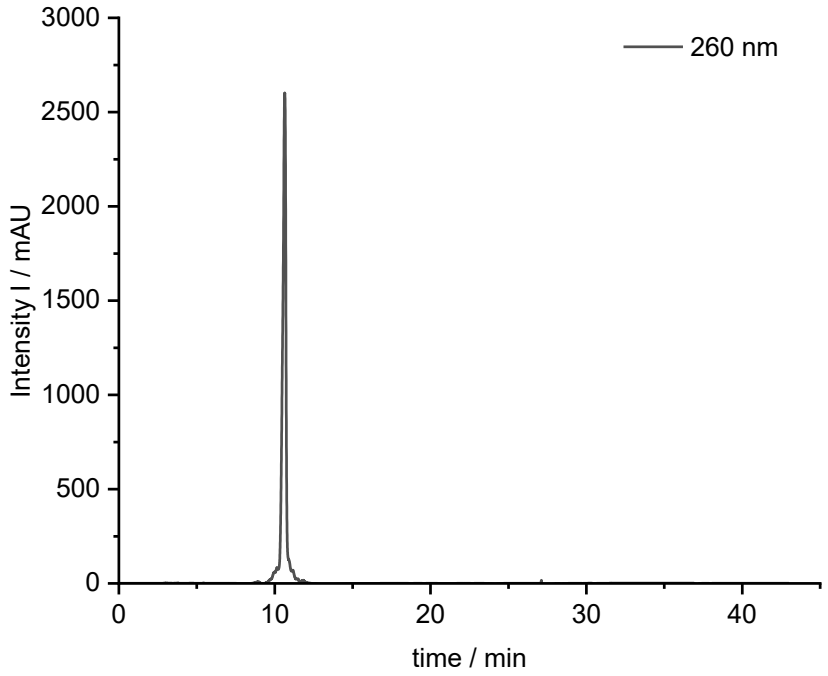


Abbildung A 128: HPLC-Chromatogramm von **cs_RNA3_m^{6}a**.

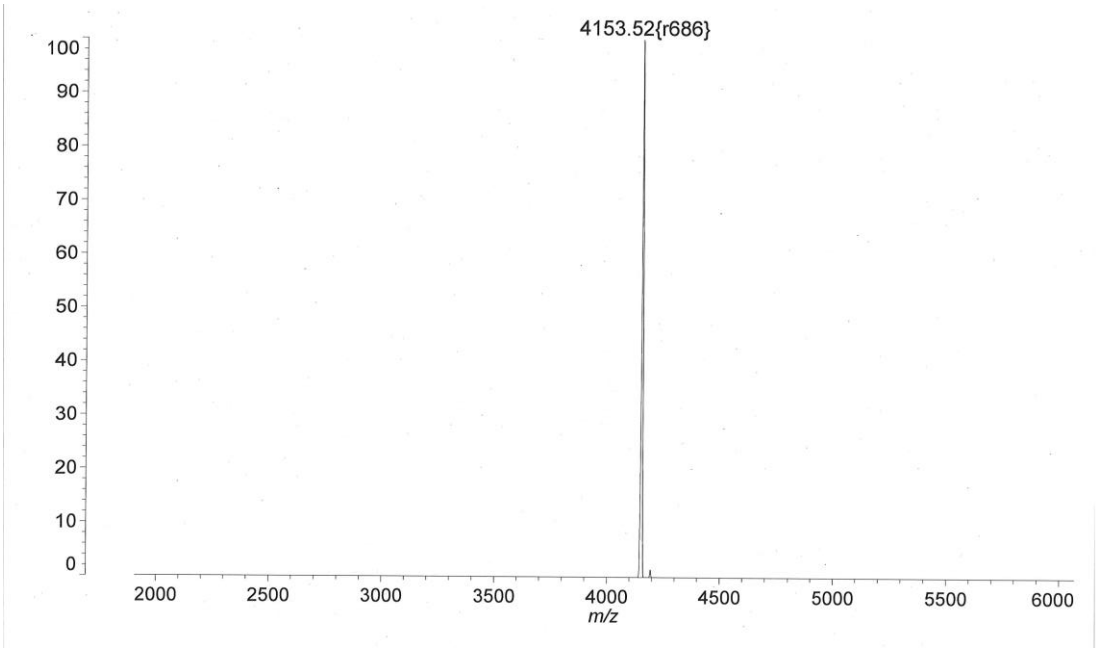


Abbildung A 129: MALDI-Massenspektrum von **cs_RNA3_m^{6}a**.

cs_RNA4_m⁶a

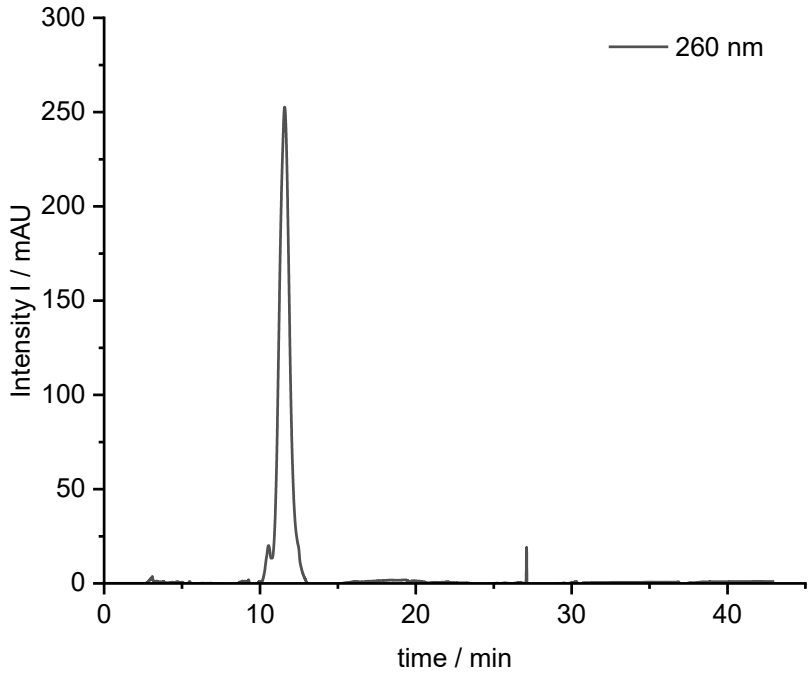


Abbildung A 130: HPLC-Chromatogramm von **cs_RNA4_m⁶a**.

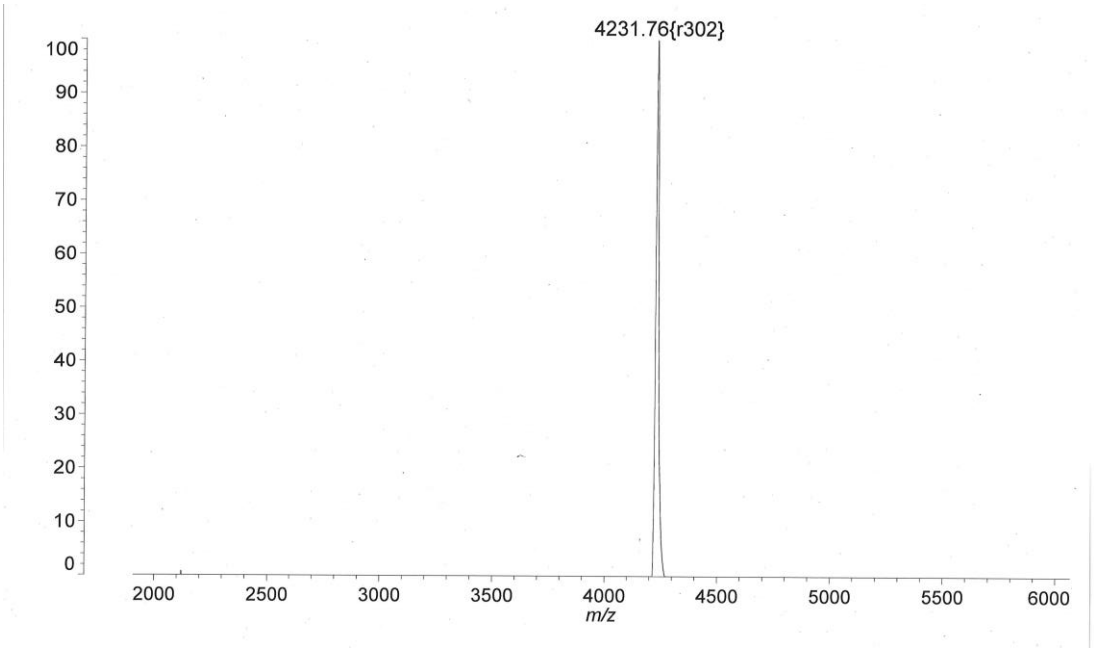


Abbildung A 131: MALDI-Massenspektrum von **cs_RNA4_m⁶a**.

cs_RNA5_m^{6}a

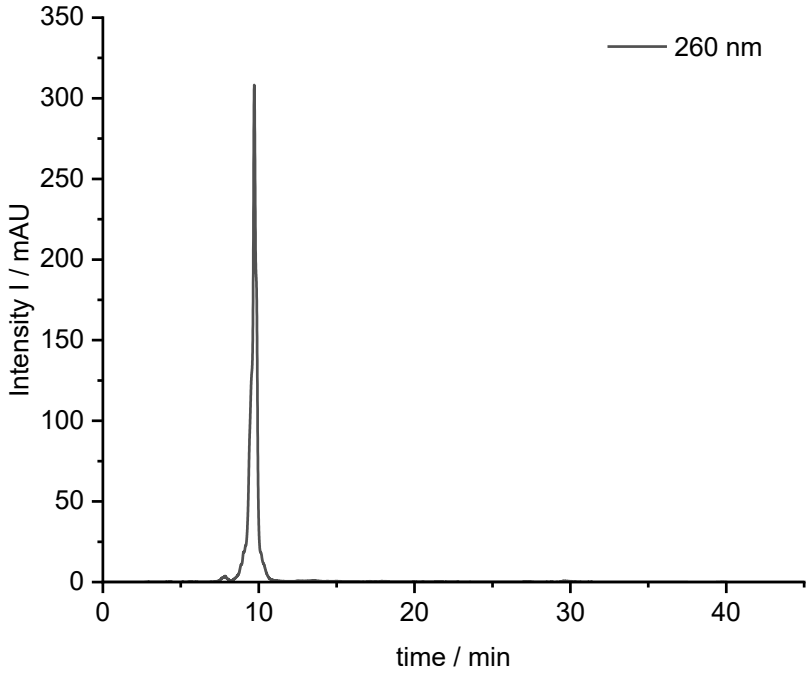


Abbildung A 132: HPLC-Chromatogramm von **cs_RNA5_m^{6}a**.

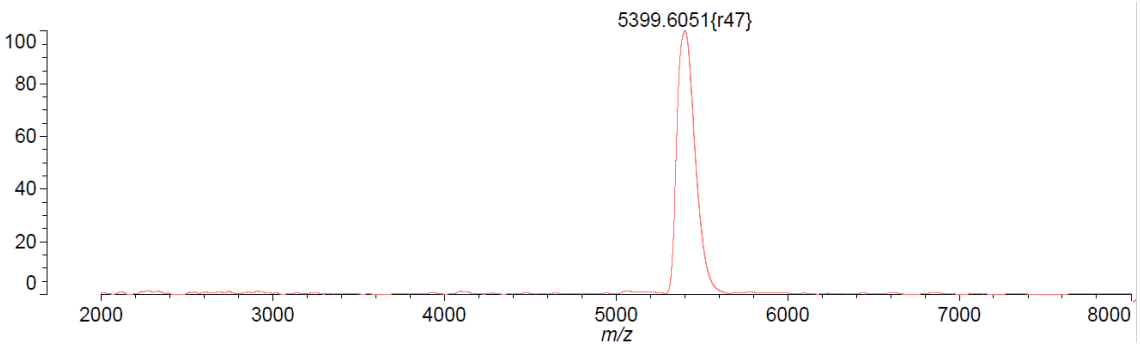


Abbildung A 133: MALDI-Massenspektrum von **cs_RNA 5_m^{6}a**.

9.1.3 Absorptionsspektren der *o*-4API-modifizierten Stränge

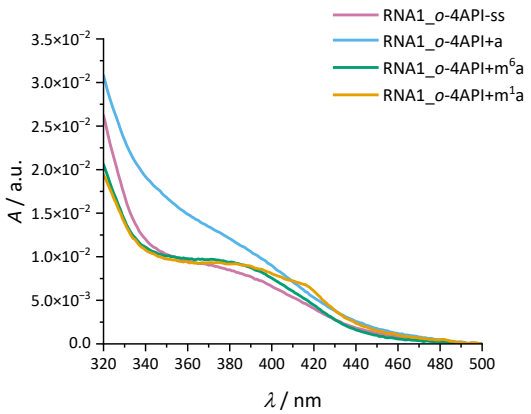


Abbildung A 134: UV/VIS Spektren der **RNA1_*o*-4API**-Stränge und Duplexe.

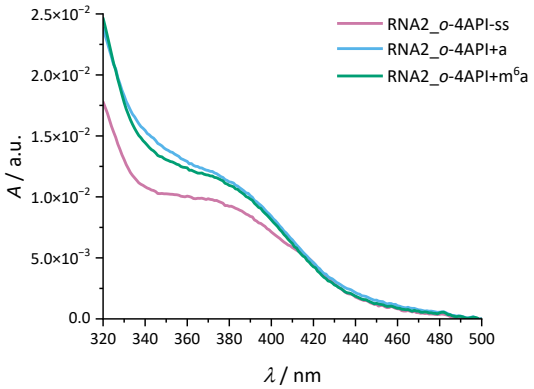


Abbildung A 135: UV/VIS Spektren der **RN2_*o*-4API**-Stränge und Duplexe.

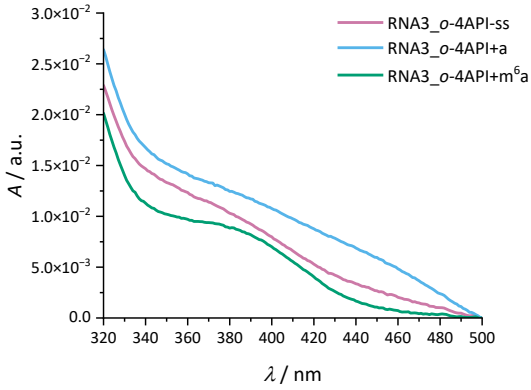


Abbildung A 136: UV/VIS Spektren der **RNA3_*o*-4API**-Stränge und Duplexe.

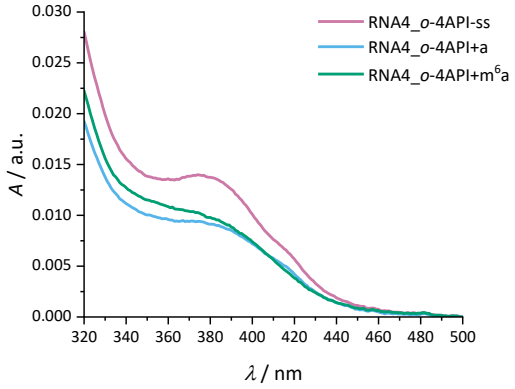


Abbildung A 137: UV/VIS Spektren der **RNA4_*o*-4API**-Stränge und Duplexe.

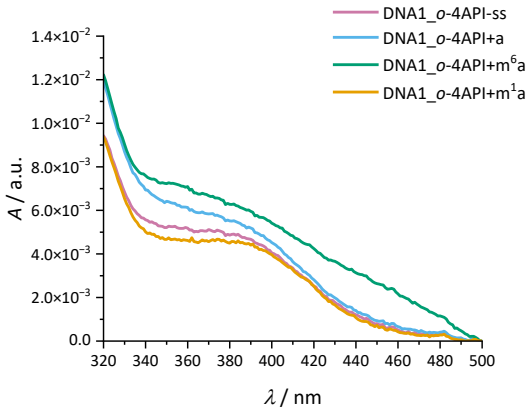


Abbildung A 138: UV/VIS Spektren der **DNA1_*o*-4API**-Stränge und Hybridduplexe.

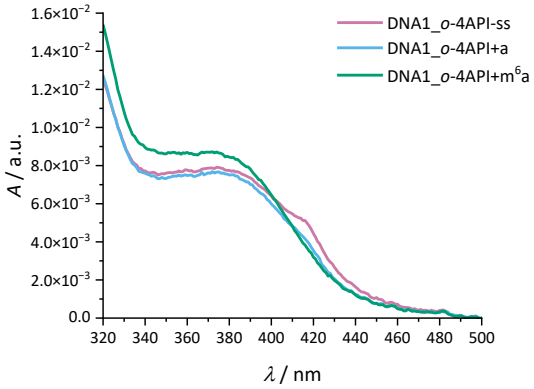


Abbildung A 139: UV/VIS Spektren der **DNA2_*o*-4API**-Stränge und Hybridduplexe.

9.1.4 Schmelztemperaturspektren

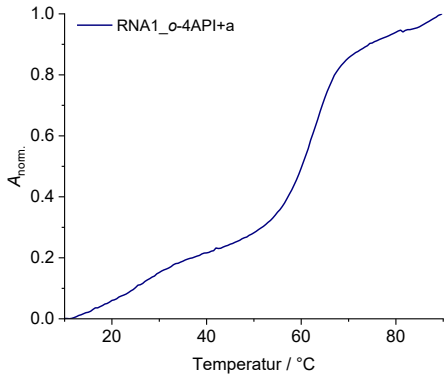


Abbildung A 140: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA1_*o*-4API+a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

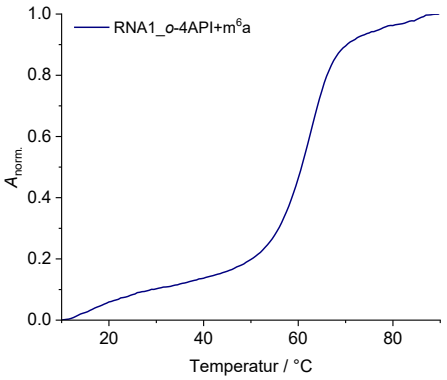


Abbildung A 141: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA1_*o*-4API+m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

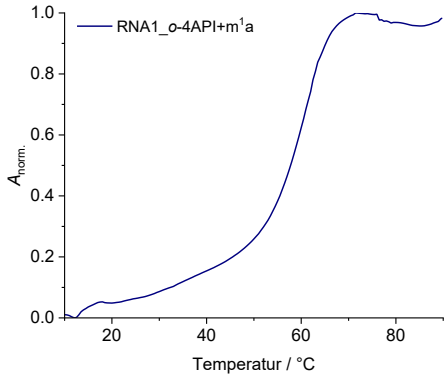


Abbildung A 142: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA1_*o*-4API+m^{1}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

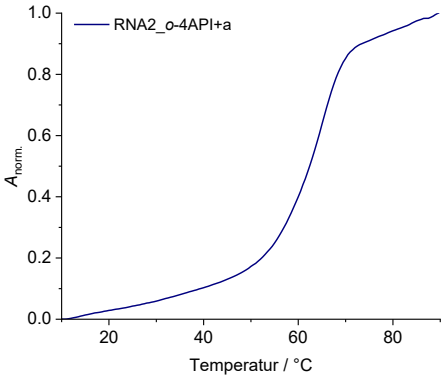


Abbildung A 143: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA2_*o*-4API+a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

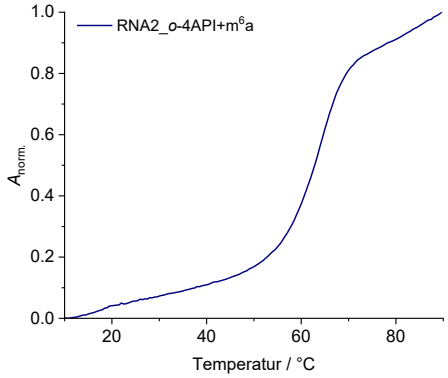


Abbildung A 144: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA2_*o*-4API+m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

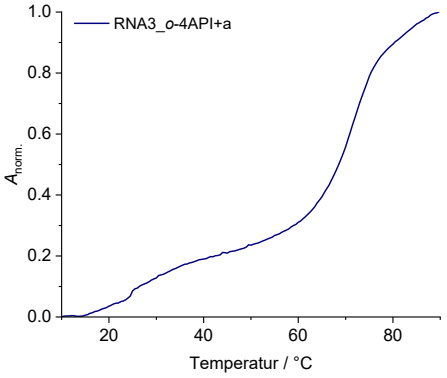


Abbildung A 145: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA3_*o*-4API+a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

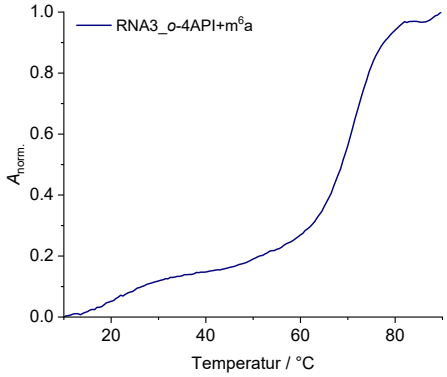


Abbildung A 146: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA3_*o*-4API+m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

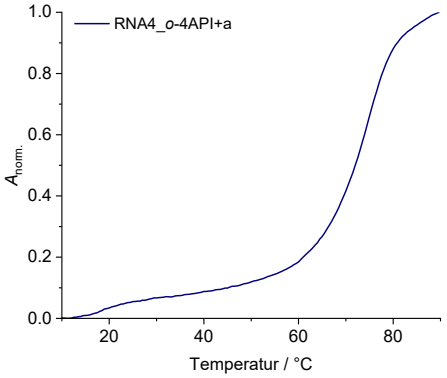


Abbildung A 147: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA4_*o*-4API+a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

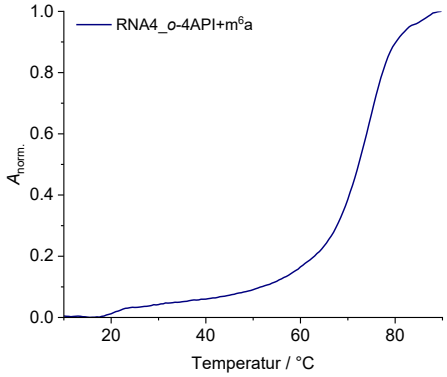


Abbildung A 148: Schmelztemperaturkurve von Duplex **RNA4_*o*-4API+m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

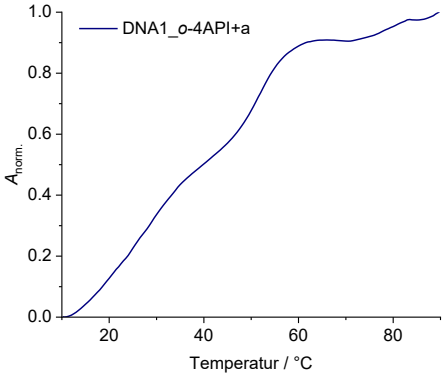


Abbildung A 149: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_*o*-4API+a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

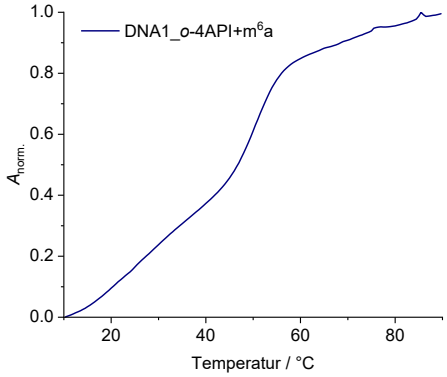


Abbildung A 150: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_*o*-4API+m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

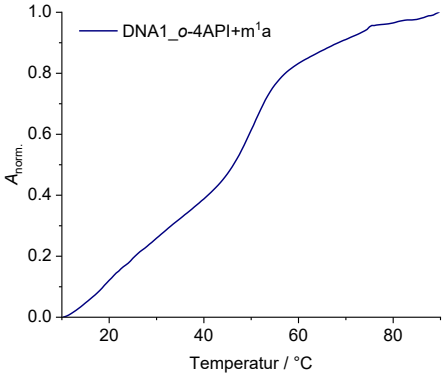


Abbildung A 151: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_*o*-4API+m^{1}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

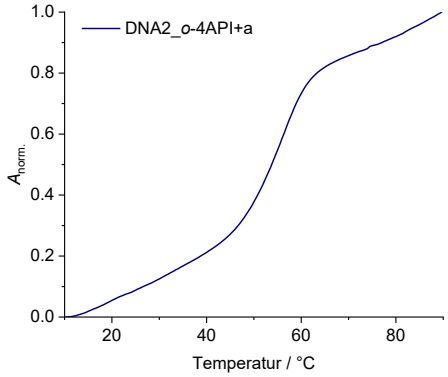


Abbildung A 152: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA2_*o*-4API+a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

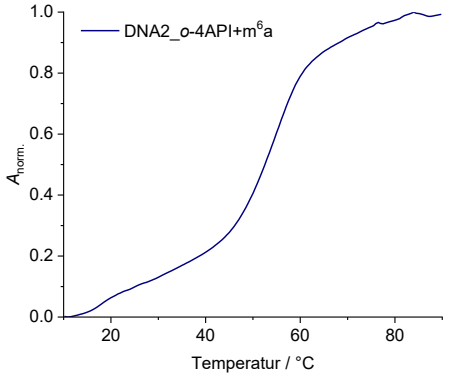


Abbildung A 153: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA2_*o*-4API+m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

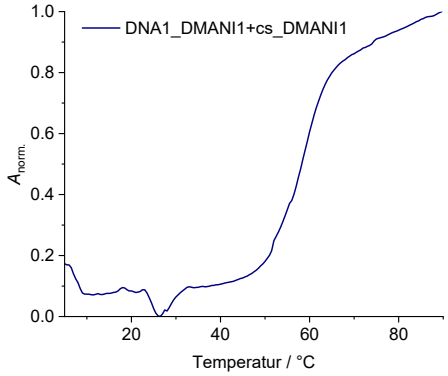


Abbildung A 154: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_DMANI1+cs_DMANI1** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

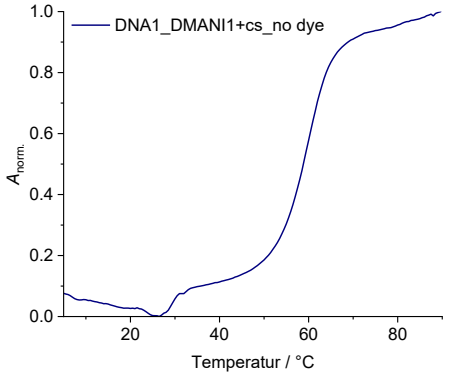


Abbildung A 155: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_DMANI1+cs_no dye** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

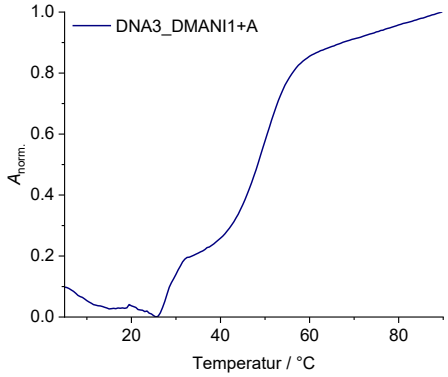


Abbildung A 156: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI1+A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

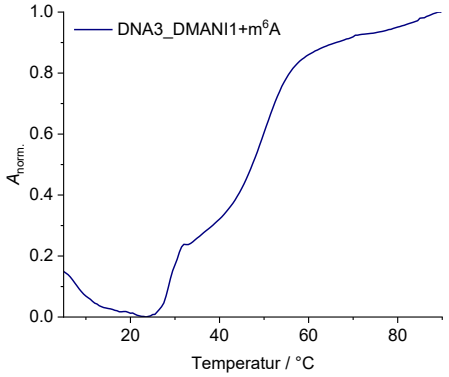


Abbildung A 157: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI1+m^{6}A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

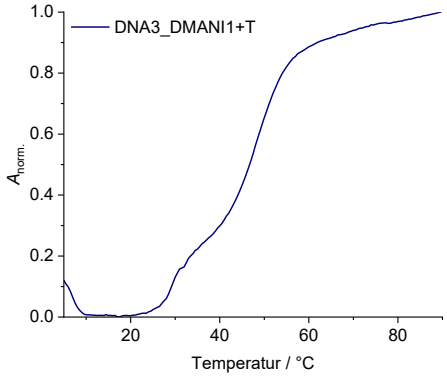


Abbildung A 158: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI1+T** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

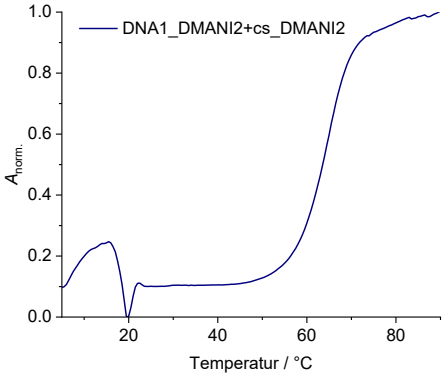


Abbildung A 159: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_DMANI2+cs_DMANI2** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

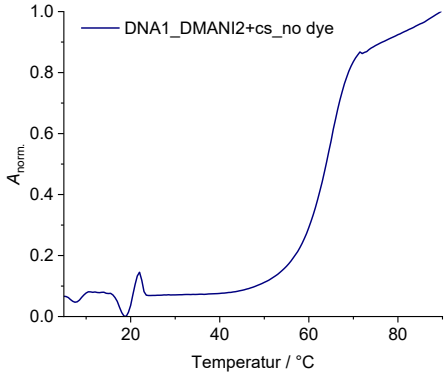


Abbildung A 160: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_DMANI2+cs_no dye** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

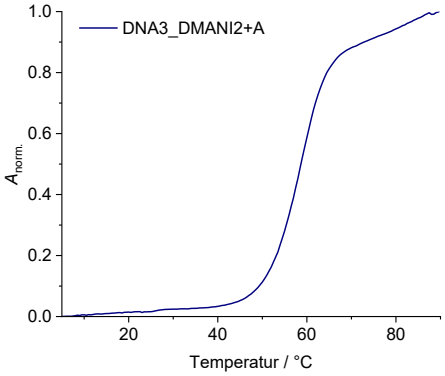


Abbildung A 161: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2+A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

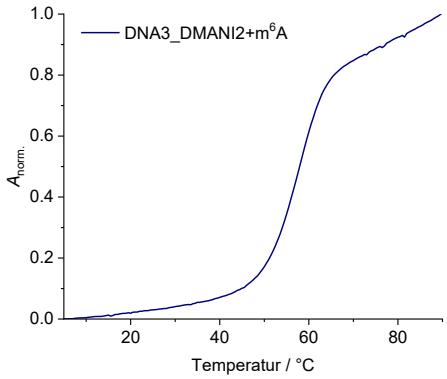


Abbildung A 162: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2+m^{6}A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

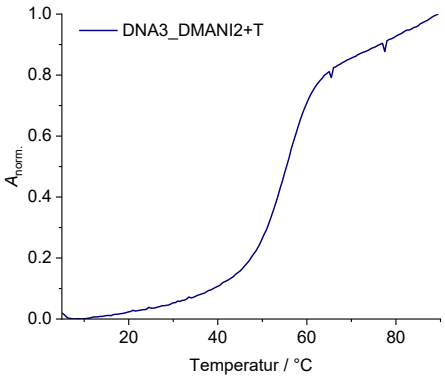


Abbildung A 163: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2+T** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

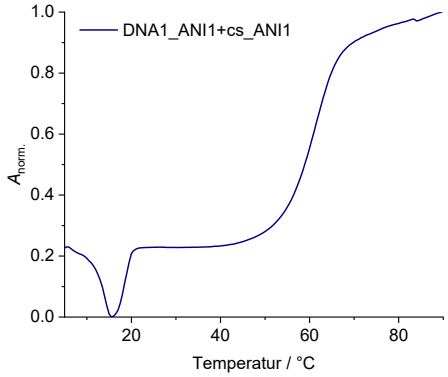


Abbildung A 164: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_ANI1+cs_ANI1** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

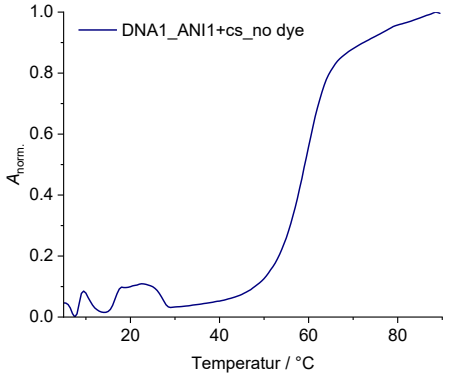


Abbildung A 165: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_ANI1+cs_no dye** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

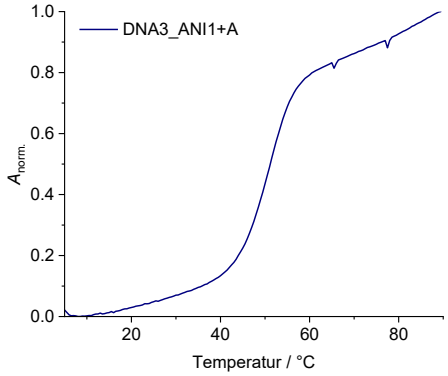


Abbildung A 166: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI1+A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

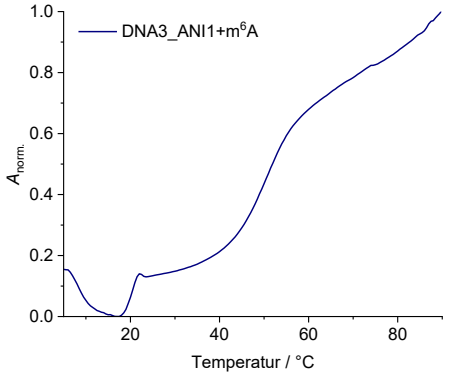


Abbildung A 167: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI1+m^{6}A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

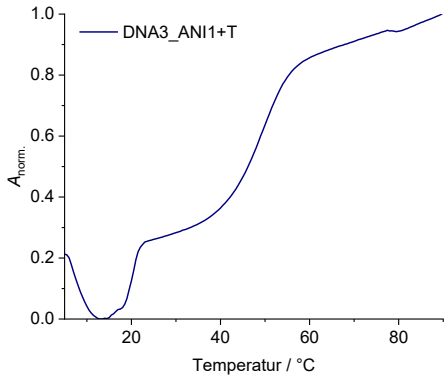


Abbildung A 168: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI1+T** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

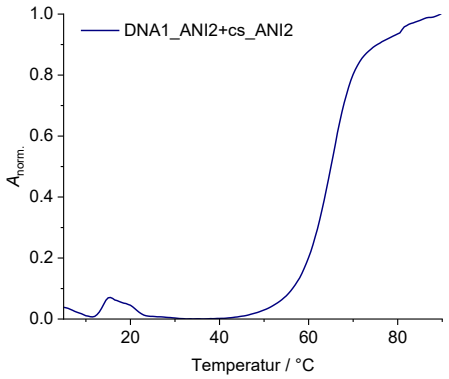


Abbildung A 169: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_ANI2+cs_ANI2** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

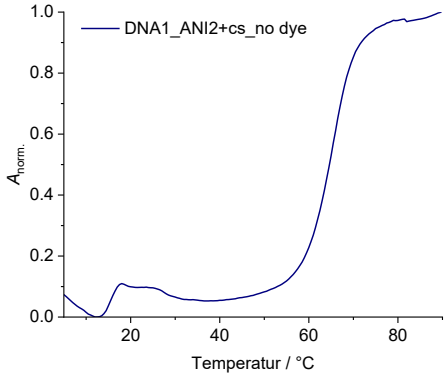


Abbildung A 170: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_ANI2+cs_no dye** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

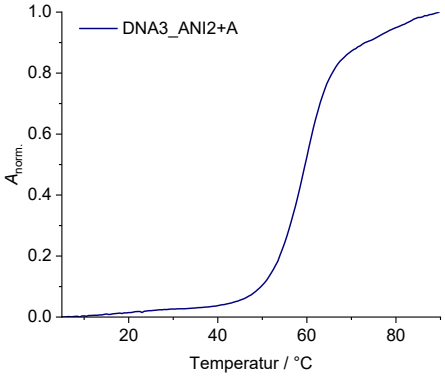


Abbildung A 171: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI2+A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

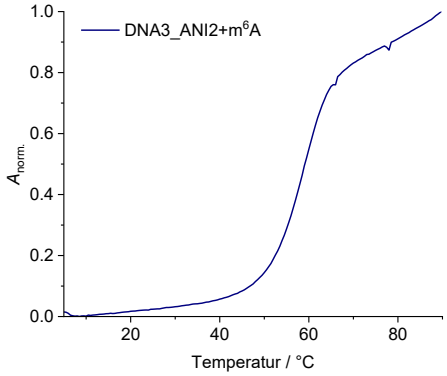


Abbildung A 172: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI2+m⁶A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

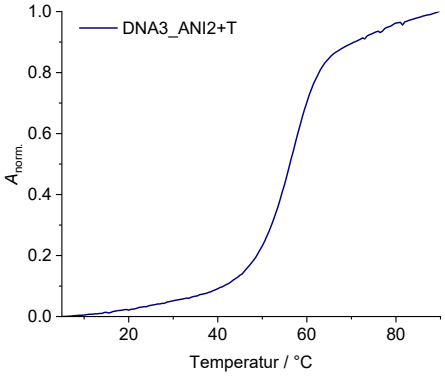


Abbildung A 173: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI2+T** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

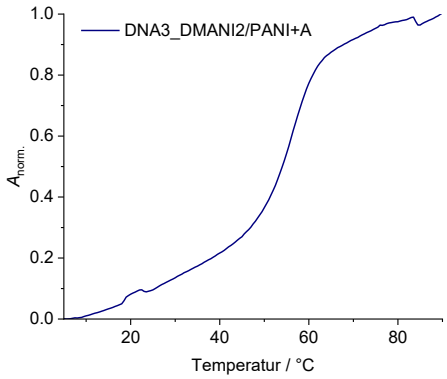


Abbildung A 174: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2/PANI+A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

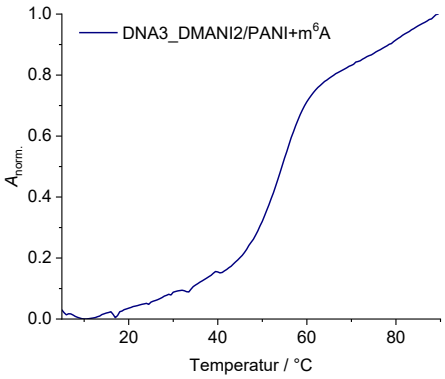


Abbildung A 175: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2/PANI+m⁶A** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

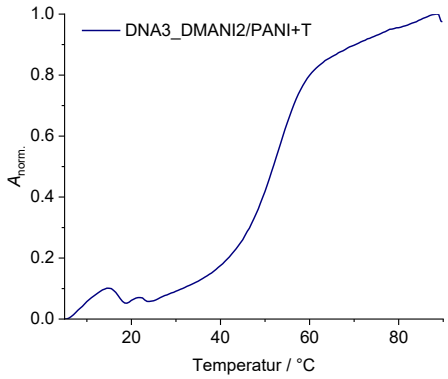


Abbildung A 176: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2/PANI+T** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

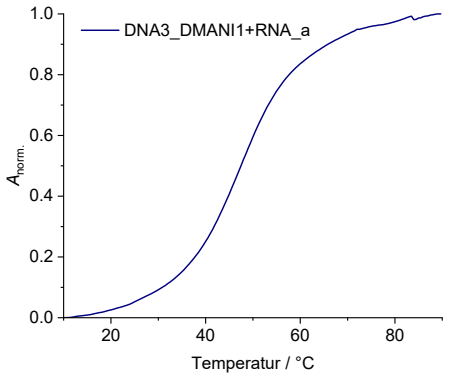


Abbildung A 177: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI1+RNA_a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

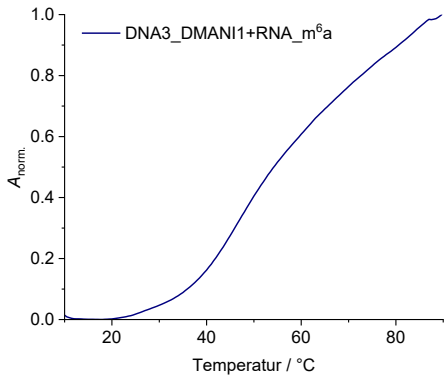


Abbildung A 178: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI1+RNA_m⁶a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

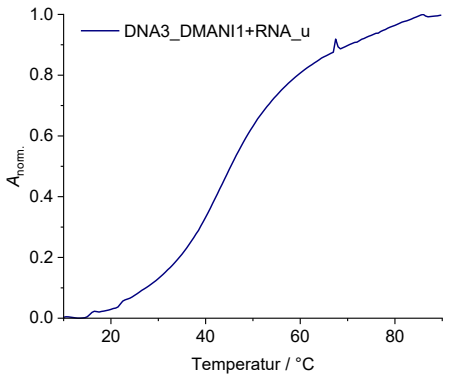


Abbildung A 179: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI1+RNA_u** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

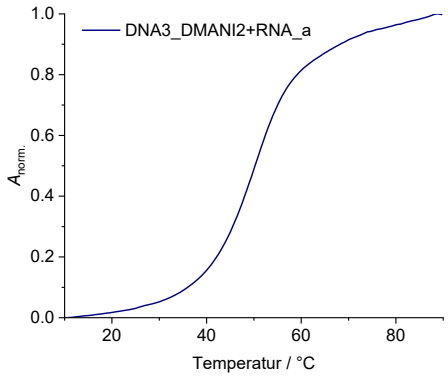


Abbildung A 180: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2+RNA_a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

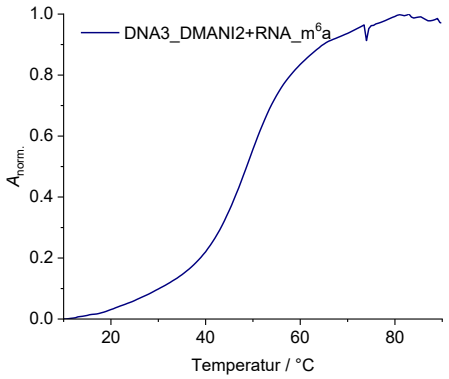


Abbildung A 181: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2+RNA_m⁶a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

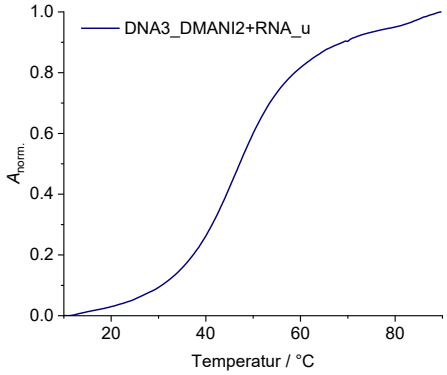


Abbildung A 182: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2+RNA_u** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

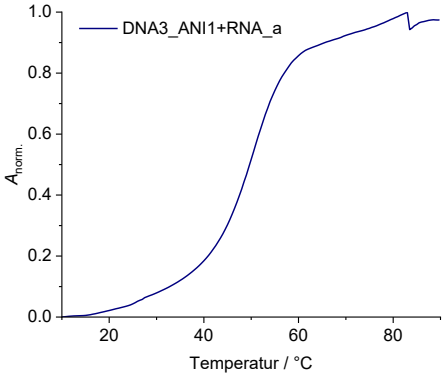


Abbildung A 183: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI1+RNA_a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

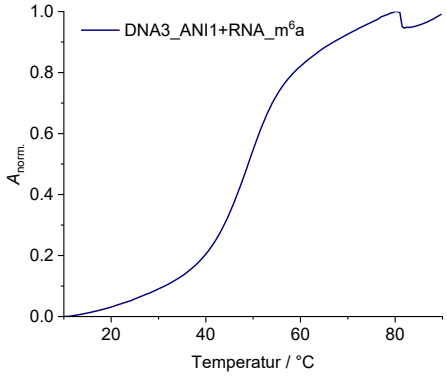


Abbildung A 184: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI1+RNA_m⁶a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

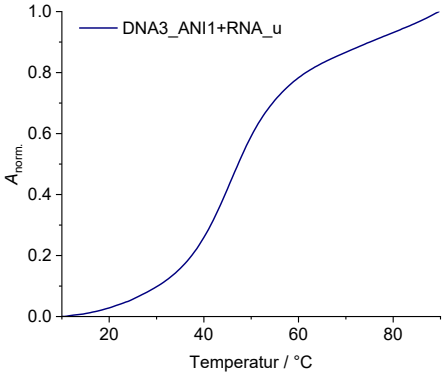


Abbildung A 185: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI1+RNA_u** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

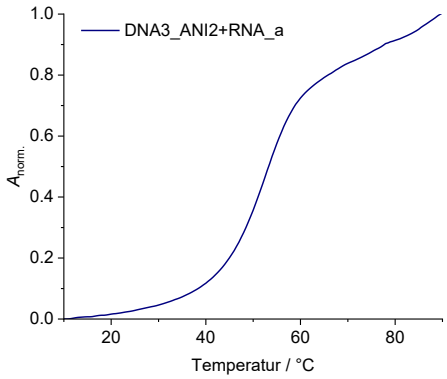


Abbildung A 186: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI2+RNA_a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

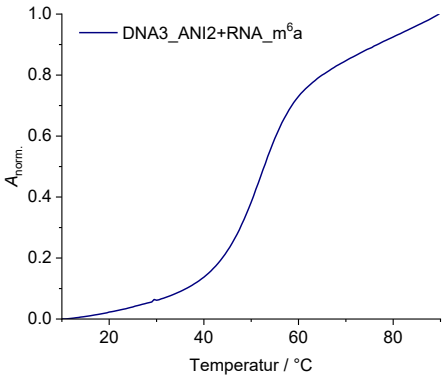


Abbildung A 187: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI2+RNA_m⁶a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

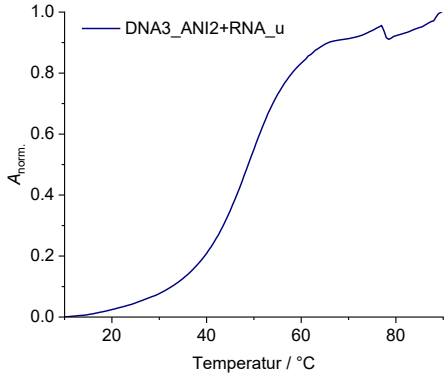


Abbildung A 188: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_ANI2+RNA_u** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

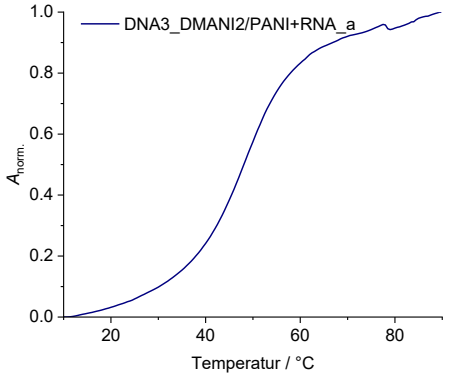


Abbildung A 189: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2/PANI+RNA_a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

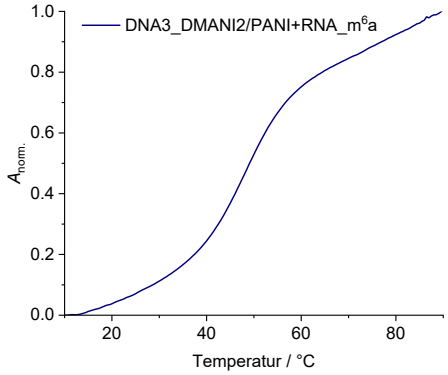


Abbildung A 190: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2/PANI+RNA_m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

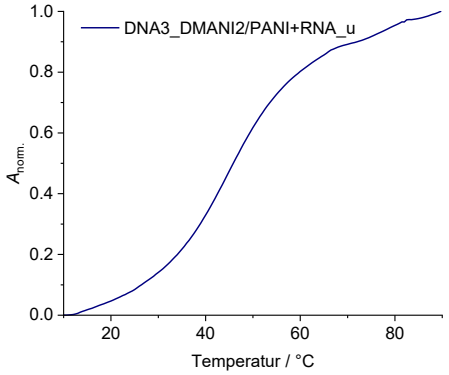


Abbildung A 191: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_DMANI2/PANI+RNA_u** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

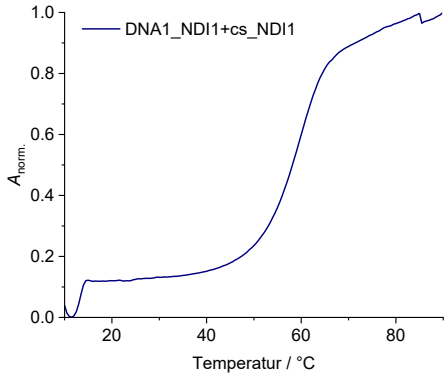


Abbildung A 192: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_NDI1+cs_NDI1** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

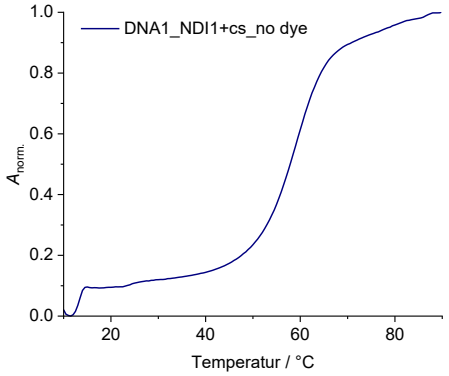


Abbildung A 193: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_NDI1+cs_no dye** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

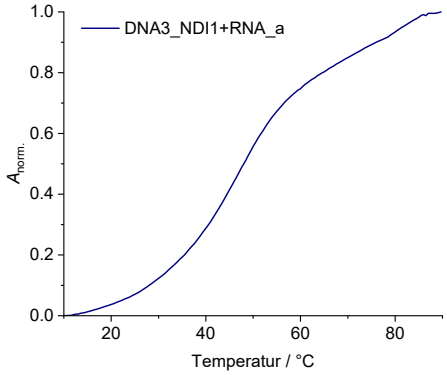


Abbildung A 194: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_NDI1+RNA_a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

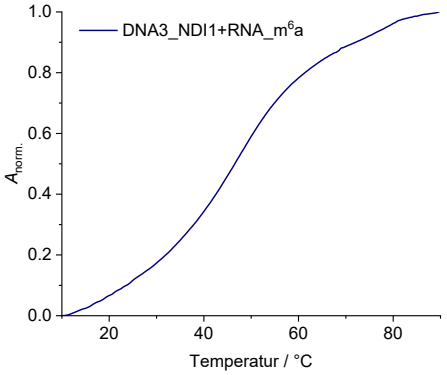


Abbildung A 195: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_NDI1+RNA_m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

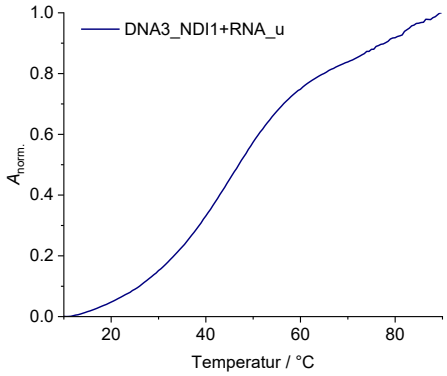


Abbildung A 196: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_NDI1+RNA_u** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

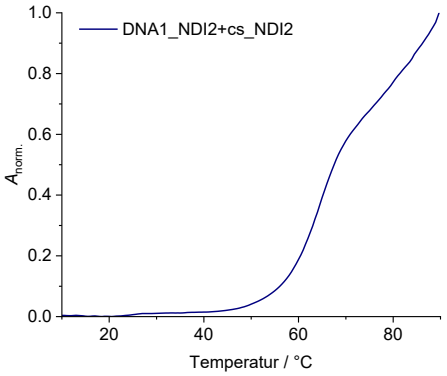


Abbildung A 197: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_NDI2+cs_NDI2** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

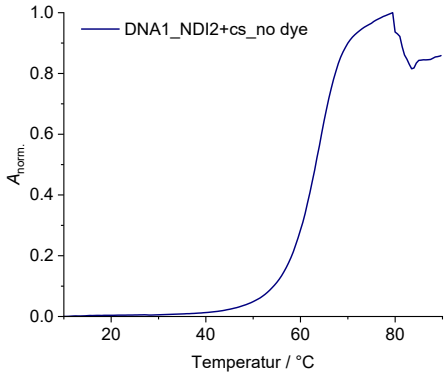


Abbildung A 198: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA1_NDI2+cs_no dye** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

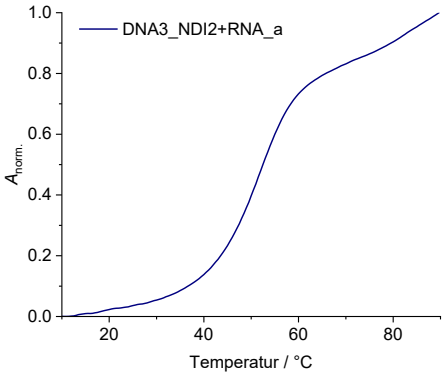


Abbildung A 199: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_NDI2+RNA_a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

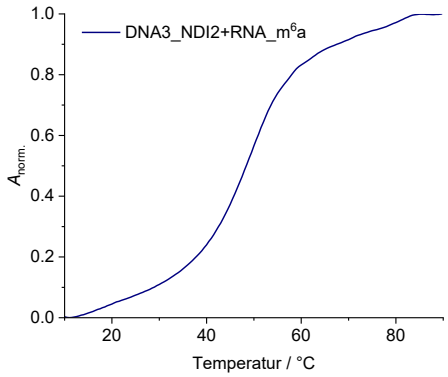


Abbildung A 200: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_NDI2+RNA_m^{6}a** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

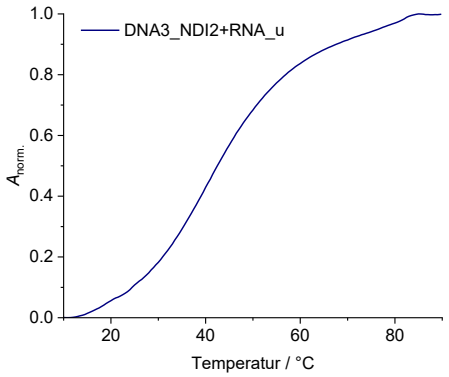


Abbildung A 201: Schmelztemperaturkurve von Duplex **DNA3_NDI2+RNA_u** bei $\lambda_{Abs.}$ = 260 nm.

9.1.5 Übersicht Fluoreszenzlebensdauern

Tabelle A 1: Übersicht aller ermittelten Fluoreszenzlebensdauern τ_x und deren gewichteten Anteile A_x (x = 1-3) sowie die daraus ermittelten mittleren Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{ø}$.

Probe	τ_1 [ns]	A_1 [%]	τ_2 [ns]	A_2 [%]	τ_3 [ns]	A_3 [%]	$\tau_{ø}$ [ns]
DNA1_DMANI1-ss	2.86	22	9.65	5	0.62	73	**1.56**
DNA1_DMANI1+cs_DMANI1	2.60	11	9.67	4	0.50	85	**1.09**
DNA1_DMANI1+cs_no dye	3.29	38	10.26	10	1.36	52	**2.99**
DNA3_DMANI1-ss	2.83	2	6.44	4	0.20	94	**0.51**
DNA3_DMANI1+A	2.98	28	10.52	4	0.92	68	**1.88**
DNA3_DMANI1+m^{6}A	2.93	19	11.69	2	0.95	79	**1.54**
DNA3_DMANI1+T	2.80	13	11.88	2	0.67	85	**1.17**
DNA1_DMANI2-ss	2.73	18	10.11	3	0.45	79	**1.15**
DNA1_DMANI2+cs_DMANI2	1.91	16	8.89	1	0.407	83	**0.73**
DNA1_DMANI2+cs_no dye	2.21	35	13.54	3	0.60	63	**1.54**
DNA3_DMANI2-ss	1.98	7	7.81	1	0.33	92	**0.52**
DNA3_DMANI2+A	2.14	22	8.71	1	0.48	78	**0.92**
DNA3_DMANI2+m^{6}A	1.92	15	9.18	1	0.44	84	**0.75**
DNA3_DMANI2+T	1.89	17	9.77	1	0.43	83	**0.77**
DNA1_ANI1-ss	7.50	72	12.24	28	-	-	**8.83**
DNA1_ANI1+cs_ANI1	4.36	16	9.65	25	0.53	59	**3.42**
DNA1_ANI1+cs_no dye	9.10	75	13.17	25	-	-	**10.12**
DNA3_ANI1-ss	3.21	33	7.98	67	-	-	**6.40**
DNA3_ANI1+A	6.39	26	9.83	74	-	-	**8.94**
DNA3_ANI1+m^{6}A	6.60	30	9.99	70	-	-	**8.98**
DNA3_ANI1+T	4.47	14	8.96	86	-	-	**8.34**
DNA1_ANI2-ss	5.13	39	11.01	61	-	-	**8.72**
DNA1_ANI2+cs_ANI2	5.15	36	11.49	64	-	-	**9.20**
DNA1_ANI2+cs_no dye	8.83	47	14.53	53	-	-	**11.85**
DNA3_ANI2-ss	9.04	29	4.77	27	0.42	43	**4.13**
DNA3_ANI2+A	3.98	18	9.75	82	-	-	**8.71**
DNA3_ANI2+m^{6}A	6.87	44	11.04	56	-	-	**9.20**
DNA3_ANI2+T	5.36	25	10.67	75	-	-	**9.34**

DNA3_DMANI2/PANI-ss	3.71	22	10.01	15	0.75	63	**2.79**
DNA3_ DMANI2/PANI +A	3.87	33	11.34	12	1.09	55	**3.24**
DNA3_ DMANI2/PANI +m⁶A	3.67	27	10.88	13	0.99	59	**3.02**
DNA3_ DMANI2/PANI +T	4.11	23	11.56	13	0.94	64	**3.05**
DNA3_DMANI1+RNA_a	2.97	29	12.69	1	0.70	71	**1.47**
DNA3_DMANI1+ RNA_m⁶a	2.86	18	14.14	1	0.69	81	**1.22**
DNA3_DMANI1+ RNA_u	3.47	26	11.70	1	0.65	73	**1.50**
DNA3_DMANI2+ RNA_a	1.72	24	6.64	1	0.40	75	**0.78**
DNA3_DMANI2+ RNA_m⁶a	1.88	20	8.05	1	0.46	79	**0.82**
DNA3_DMANI2+ RNA_u	1.67	12	7.37	1	0.33	87	**0.56**
DNA3_ANI1+RNA_a	6.38	43	10.05	57	-	-	**8.47**
DNA3_ANI1+ RNA_m⁶a	8.04	89	13.76	11	-	-	**8.67**
DNA3_ANI1+ RNA_u	4.61	13	8.82	87	-	-	**8.28**
DNA3_ANI2+ RNA_a	4.07	14	9.45	86	-	-	**8.70**
DNA3_ANI2+ RNA_m⁶a	3.15	16	9.32	84	-	-	**8.33**
DNA3_ANI2+ RNA_u	6.55	26	11.19	29	0.43	45	**5.14**
DNA3_DMANI2/PANI +RNA_a	2.90	31	9.87	10	0.63	59	**2.25**
DNA3_DMANI2/PANI + RNA_m⁶a	3.13	29	10.32	10	0.66	61	**2.34**
DNA3_DMANI2/PANI + RNA_u	3.16	22	10.09	12	0.58	66	**2.29**

9.2 Publikationsliste

1) *Synthesis of DNA Building Blocks With Aminonaphthalimides and Cyanovinylenes as Uncharged Fluorophores: Fluorescent Readout From Turn-On to Red-Shift*
J. Kunzmann**, A.-L. Ruopp**, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2026**, 29, e70634.
DOI: 10.1002/ejoc.70634
Teile dieser Publikation sind in die vorliegende Dissertation eingeflossen (siehe Kapitel 4, S. 59 ff.)

2) *Synthesis of DNA Building Blocks With Thiazole Fluorophores for Fluorescent Readout by Excimers and Energy Transfer*
A.-L. Ruopp, J. Kunzmann**,** H.-A. Wagenknecht*, ChemPlusChem*, **2026**.
DOI: 10.1002/cplu.70263

9.3 Konferenzen und Posterbeiträge

09/2023 XI. Nukleinsäurechemietreffen, Würzburg, **2023**
Aminophtalimide as fluorescent, isosteric base surrogate (Poster)

07/2025 Gordon Research Seminar on Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, Newport (RI, USA), **2025**
Fluorescent Probes for the Detection of Adenosine Methylation in DNA and RNA (Vortrag & Poster)

07/2025 Gordon Research Conference on Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, Newport (RI, USA), **2025**
Fluorescent Probes for the Detection of Adenosine Methylation in DNA and RNA (Poster)

09/2025 XII. Nukleinsäurechemietreffen, Hamburg, **2025**
Fluorescent Probes for the Detection of N^6-Methylation in DNA and RNA (Poster)

9.4 Lehre

SS2023	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums (für Studenten der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie) am KIT
SS2023	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-praktikums (für Studenten der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie) am KIT
WS2023/24	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-praktikums (für Studenten der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie) am KIT
12/2023 – 02/2024	Betreuung eines Vertieferpraktikums mit dem Titel *Aminophthalimide as a base surrogate for N-glycosidic nucleosides in RNA*
SS2024	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-praktikums (für Studenten der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie) am KIT
WS2024/25	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-praktikums (für Studenten der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie) am KIT
WS2024/25	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums (für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie und des Lehramts Chemie) am KIT

SS2025	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-praktikums (für Studenten der Chemie, Chemischen Biologie und M.Ed. Chemie) am KIT
SS2025	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums (für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie und des Lehramts Chemie) am KIT