Synthese von Cyanovinylen- und Dibenzothiazol-Fluorophoren für die photophysikalische Untersuchung in DNA-Sonden

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte

Dissertation

von

M. Sc. Jan Dominique Kunzmann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2026

Meiner Familie

„Perhaps that is the Secret – It´s not what we do, so much as why we do it."

Tyrion Lannister – a Clash of Kings

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2023 bis Juli 2026 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht bedanken. Die exzellente Betreuung sowie das Vertrauen in mich und meine Arbeit haben mir eine großartige Zeit in diesem Arbeitskreis ermöglicht und mich als Wissenschaftler geformt. Ich konnte jederzeit mit fachlichen Problemen oder Ideen vorbeikommen und Sie haben sich immer Zeit genommen, diese zu besprechen. Besonders weitergebracht hat mich der Freiraum, den Sie mir gegeben haben, meine Ideen auszuprobieren. Die hat sehr stark meine Weiterentwicklung gefördert. Zudem waren Sie auch immer menschlich für einen da, wenn Probleme außerhalb der Arbeit uns belastet haben. Für Ihre wertvolle Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken!

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Meier bedanken. Vielen Dank für die Übernahme des Zweitgutachters meiner Arbeit.

Ein weiteres Dankeschön gilt Claudia Sommer und Ariane Kahl. Egal welche Art von Hilfe ich gebraucht habe, Ihr beide habt mir immer umgehend geholfen. Gerade in organisatorischen Angelegenheiten wäre ich oftmals ohne euch aufgeschmissen gewesen. Dankeschön an den gesamten Arbeitskreis! Sowohl an die Aktuellen als auch an die ehemaligen Kollegen. Ihr habt maßgeblich zu der schönen Zeit beigetragen. Sei es bei fachlichen Gesprächen oder abseits des Laborgeschehens in der Mittagspause. Ohne diese Gemeinschaft wäre die Zeit nicht so schön gewesen!

Ein weiteres Dankeschön geht an Anna-Lena-Ruopp, Stephan Behling, Jonas Schmid und Kerstin Müller für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Anette Hochgesand, Lara Hirsch und Lukas Frey aussprechen. Danke für die Messung meiner Masse-Proben. Egal ob ich Maldi oder ESI gebraucht habe, jeder von euch hat schnellstmöglich und zuverlässig die Messungen durchgeführt, was eine große Hilfe war. Zudem möchte ich auch meinen Laborpartnern Kerstin Müller, Simon Heckmeier und Jonas Schmid ganz herzlich bedanken. Danke Kerstin für unendlich viele Hilfestellungen bei jeglicher Art der Laborarbeit. Ich konnte jedes Mal zu dir kommen, wenn ich Probleme bei einer Synthese oder auch beim DNA-Bau hatte. Du hast dir immer Zeit genommen und konntest immer hilfreichen Input geben. Danke dir Simon für die geile Zeit im Labor. Es hat immer Spaß gemacht tagtäglich den größten Unfug zu bequatschen und du hast immer gute Laune verbreitet, auch wenn die Chemie mal nicht mitspielen wollte. Vielen Dank an dich Jonas für ein gemeinsames Jahr im EG voller guter Gespräche, wertvollen fachlichen Ratschlägen und essentiellen Spazierpausen im Fasanengarten, die den Arbeitsalltag immer bereichert haben. Auch ein Dankeschön an Anna-Lena Ruopp, du hast dich in unser Themengebiet immer super eingebracht und zusammen war die Bewältigung der Probleme (meistens) gar nicht so schwierig. Ihr wart super Kollegen und ich würde jederzeit wieder gerne ein Labor mit euch teilen. Auch geht ein Dankeschön an Enrico Link, Sabrina Denzer

und Weronika Sharma-Musialek für die tatkräftige Unterstützung meiner Forschungsarbeit mit euren Projekten.

Zusätzlich möchte ich noch meinen Freunden Jan Kölmel, Philip Henkel, Nicolas-Günther-Schmidt und Simon Heckmeier danken. Mit euch waren das Studium und die Promotion eine absolut unvergessliche Zeit. Egal ob auf dem Campus, im Oxford, im Schlosspark oder auf Urlauben und Ausflügen, wir haben überall großartige Erlebnisse genießen dürfen.

Zuletzt möchte ich noch meiner Mutter, meinem Vater, meinem Bruder und Franzi danken. Vielen Dank für eure Unterstützung über die ganzen Jahre. Jeder von euch war immer hilfsbereit, wenn ich nicht weiterkam und ohne euch wäre das Alles nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1. Motivation und Zielsetzung ... 1
2. Theorie ... 4
2.1 Grundlagen der Photophysik ... 4
2.1.1 Elektronische Anregung und Relaxationsprozesse ... 4
2.1.2 Intermolekulare elektronische Wechselwirkungen ... 8
2.1.3 Fluoreszenzbasierter *Read-out* ... 11
2.2 DNA als strukturgebendes Gerüst ... 12
2.3 Linker für die Modifikation von DNA ... 14
2.4 Wellenlängenverschiebende Fluorophore in einem DNA-Gerüst ... 16
2.5 Cyanovinylen in DNA ... 20
2.6 Monomethin-Dibenzothiazol in DNA ... 22
2.7 Hybridisierungssensitive DNA-Sonden ... 23
2.7.1 Grundprinzipien von DNA-Sonden ... 23
2.7.2 Intensitätsbasierte DNA-Sonden ... 24
2.7.3 Wellenlängenverschiebende DNA-Sonden ... 29
3. Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen in DNA ... 33
3.1 Design der Fluorophorbausteine ... 33
3.2 Synthese der Fluorophore ... 35
3.2.1 Synthese der cyanovinylenmodifizierten DNA-Bausteine 9a und 9b ... 35
3.2.2 Synthese des dibenzothiazolmodifizierten DNA-Bausteins 17 ... 37
3.3 Untersuchung fluoreszenter Dimere in DNA ... 40
3.3.1 CV1-modifizierte Interstrang-Dimere ... 42
3.3.2 CV1-modifizierte Intrastrang-Dimere ... 47
3.3.3 CV1-basierte DNA-Sonde zur Detektion von m^6A ... 49
3.3.4 CV2-modifizierte Interstrang-Dimere ... 55
3.3.5 DB-modifizierte Interstrang-Dimere ... 59
3.3.6 DB-modifizierte Intrastrang-Dimere ... 62
3.3.7 Vergleich der Fluorophore CV1, CV2 und DB ... 66
3.4 DB-induzierter Energietransfer ... 68
4. Hybridisierungssensitive Nitroindol-Sonden ... 76
4.1 CV2-basierte Nitroindol-Sonden ... 77
4.2 DB-basierte Nitroindol-Sonden ... 79
4.3 Bestimmung der Oxidationspotentiale und Abschätzung zur freien Enthalpie ... 82
4.4 Zusammenfassung der Nitroindol-Sonden ... 86
5. DNA-Nanopartikel als Transportsystem in HeLa-Zellen ... 88
5.1 Synthese der DNA-Nanopartikel ... 88

5.2 Transfektion der DNA IOH-NP 90
5.3 *Gen-Knockdown* durch RNA-Nanopartikel 93
5.4 Zusammenfassung der IOH-NP 96
6. Zusammenfassung und Ausblick 98
7. Experimenteller Teil 101
7.1 Materialien und Methoden 101
7.2 Synthesevorschriften 110
7.3 DNA-Festphasen-Synthese 130
8. Anlagen 137
8.1 NMR Spektren 137
8.2 ESI-Spektren 149
8.3 HPLC-Chromatogramme der DNA-Stränge 155
8.4 MALDI-TOF-Massenspektren der DNA-Stränge 163
8.5 Ergänzende Spektren 169
8.6 Analyse der DNA-IOH-NP 182
9. Literatur- und Abbildungsverzeichnis 184
9.1 Literaturverzeichnis 184
9.2 Abbildungsverzeichnis 194
10. Appendix 204
10.1 Konferenzen und Posterbeiträge 205
10.2 Lehre 206
10.3 Publikationsliste 208

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
®	Registrierte Warenmarke
°	Grad
A	Adenin
2-AP	2-Aminopurin
α	Prozentualer Anteil
a.u.	*arbitrary unit*
AN	Aminophthalimid
Äq.	Äquivalent
arom.	Aromatisch
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CDI	1,1´-Carbonyldiimidazol
CPG	*controlled pore glass*
CV	Cyanovinylen
DABCYL	4-(4'-Dimethylamino phenylazo)benzoesäure
DC	Dünnschicht Chromatographie
DCM	Dichlormethan
DB	Dibenzothiazol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DRET	*dark resonance energy transfer*
EA	Elementaranalyse
ECHO	*exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotide*
EDANS	5-(2'-Aminoethyl) aminonaphthalen-1-sulfonsäure
EE	Essigsäureethylester
Et_3N	Triethylamin

ESI	Elektronenspray Ionisation
FCS	*fetal calf serum*
FIT	*forced intercalation of thiazol orange*
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FT-IR	Fourier-Transformations Infrarot
G	Guanin
g	Gramm
GFP	*green fluorescent protein*
h	Stunde
HOMO	*highest occupied molecular orbital*
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
I	Intensität
IOH-NP	*inorganic organic hybrid nanoparticles*
J	Kopplungskonstante
L	Liter
λ	Wellenlänge
LUMO	*lowest unoccupied molecular orbital*
M	Molar
m^6A	N^6-Methyladenosin
MALDI-TOF	*Matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight*
MB	*Molecular Beacon*
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
mRNA	*messenger* RNA
NaP_i	Natriumphosphat-Puffer
NI	Nitroindol
ODF	Oligodeoxyfluorosiden
p.a.	*pro analysi*
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
PEI	Polyethylenimin
PBI	Perylenbisimid
PNA	*peptide nucleic acid*
Ppm	*parts per million*

Quenching	Fluoreszenzlöschung
REM	Rasterlelektronenmikroskop
R_f	Retentionsfaktor
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RNA	*ribonucleic acid*
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	Singulett
τ	Fluoreszenzlebenszeit
T	Thymin
t	Triplett
tC	Tricyclisches Cytosin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TICT	*twisted intramolecular charge transfer*
TG	Thermogravimetrie
T_m	Schmelztemperatur
TO	Thiazol Orange
SHE	*Standard Hydrogen Electrode*
siRNA	*small interfering* RNA
SNP	*single nucleotide polymorphism*
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	Sichtbares Licht
WED	*white light emitting DNA*
XRD	*X-Ray Diffraction*

.

1. Motivation und Zielsetzung

Nukleinsäuren tragen genetische Informationen und bilden die Grundlage der Steuerung biologischer Prozesse in Organismen.[1-3] In der modernen Medizin werden Nukleinsäuren aufgrund ihrer spezifischen Wechselwirkungen in verschiedenen therapeutischen Ansätzen eingesetzt. Ein Beispiel ist die Regulation der Genexpression durch den Einsatz von *small interfering RNA* (siRNA).[4, 5] Zudem zeigt eine Impfung mit individualisierter mRNA vielversprechende Ergebnisse in Langzeitstudien bei der Bekämpfung von Pankreastumorzellen. Die Rückfallquote nach sechs Jahren konnte bei den Patienten, bei denen die Behandlung erfolgreich war, drastisch reduziert werden. Dies zeigt, wie wichtig Forschung an Nukleinsäuren ist, um zukünftige Therapien für Krankheiten wie Krebs zu entwickeln.[6-8] Neben dem Einsatz funktioneller Nukleinsäuren ist die Untersuchung dieser Makromoleküle essentiell, da bereits geringe Veränderungen der Sequenz, der Struktur oder epigenetischer Modifikationen funktionelle Beeinträchtigungen verursachen können.[9-11] Einige Krankheiten wie Mukoviszidose, Chorea-Huntington, Sichelzellanämie oder Krebserkrankungen stehen im Zusammenhang mit Abnormalitäten von Nukleinsäuren.[249, 250, 253-257] Eine zuverlässige Detektion dieser Veränderungen ist notwendig, um eine frühzeitige Erkennung und Behandlung zu gewährleisten. Diese Diagnostik kann über fluoreszierende DNA-Sonden erfolgen, die strukturelle Änderungen, Hybridisierungen oder Basenfehlpaarungen visualisieren.[12-14] Modifizierte Bausteine werden dabei an den gewünschten Positionen integriert, wobei deren Wechselwirkungen durch die DNA-Architektur beeinflusst werden.[3, 15-19] Eine Detektion kann durch eine Änderung der Fluoreszenzintensität oder durch eine Wellenlängenverschiebung der Emission visualisiert werden.[14, 20] Effekte, die einen solchen fluoreszenten *Read-Out* ermöglichen, sind zum Beispiel Excimerbildungen oder Energietransfermechanismen zwischen Fluorophoren, die zu charakteristischen Veränderungen der Emission führen.[21-23] Solche Veränderungen können durch Punktmutationen oder durch epigenetische Methylierung der Nukleobasen auftreten, die eine Rolle in der Genregulation und in der Entstehung von Krebs spielen.[22, 24-26] Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Untersuchung der fluoreszenten DNA-Architekturen **DNA1**, **DNA2**, **DNA3, DNA4**, **DNA5** sowie **N1** und **N2**. Durch eine Integration der funktionellen Farbstoffe **CV1**, **CV2** und **DB** soll unter Variation der Anzahl und der Positionierung die photophysikalischen Prozesse wie Dimerbildung, Förster-Resonanz-Elektronentransfer (FRET) oder photoinduzierter Elektronentransfer (PET) untersucht werden. Es soll gezeigt werden, wie die Wechselwirkungen durch das DNA-Gerüst gesteuert werden können, wodurch unterschiedliche fluoreszente Eigenschaften erzeugt werden. Zudem sollen diese für eine analytische Anwendung, wie die Detektion von Nukleinsäuren oder auch methyliertes Adenosin (m^6A) einer Zielsequenz genutzt werden. Anfangs sollen die neuen

fluoreszenten DNA-Bausteine **CV1**, **CV2** und **DB** synthetisiert sowie in definierte DNA-Sequenzen eingebaut werden (Abbildung 1 a)). Zunächst sollen Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen untersucht werden. Dabei soll geklärt werden, ob die integrierten Fluorophore durch den vorgegebenen Abstand und relative Orientierung zueinander zu einer Dimerbildung mit veränderter Fluoreszenz als *Read-Out* gebracht werden können. Zu Beginn sollen identische Fluorophore einfach oder doppelt in die Sequenzen **DNA1** oder **DNA2** positioniert werden, wodurch eine Bildung von Interstrang-Dimeren auftreten soll. Anschließend sollen zwei Farbstoffen in **DNA3** und **DNA4** integriert werden, wodurch die Bildung von Intrastrang-Dimeren sowie eine mögliche Detektion von m^{6}A in einer Zielsequenz durch Hybridisierung untersucht werden kann (Abbildung 1 b)). Durch den Vergleich der unterschiedlichen Positionierungen innerhalb der DNA-Architekturen soll der Einfluss des Oligonukleotids auf die photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore untersucht werden.

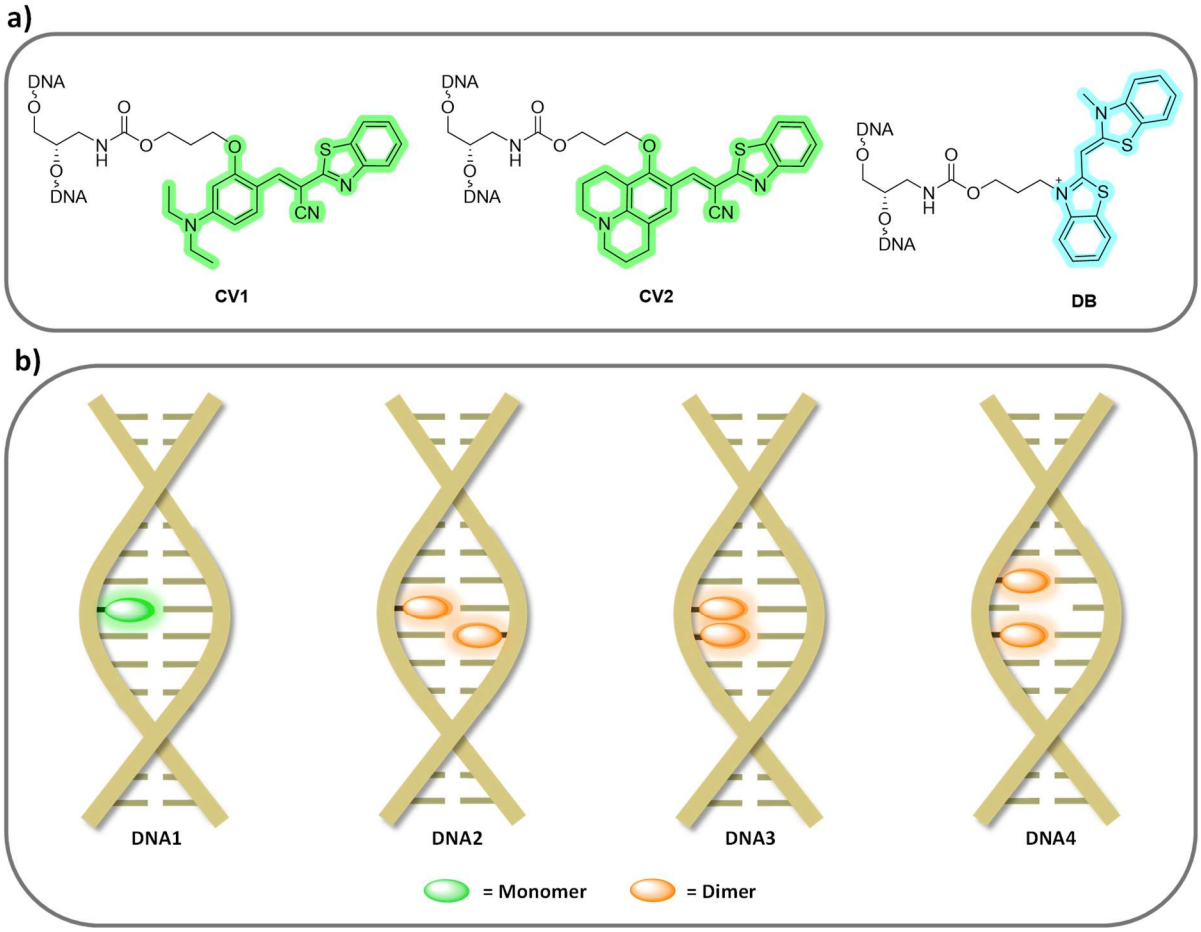


*Abbildung 1: a) Strukturen der integrierten Fluorophore **CV1**, **CV2** und **DB**; b) Darstellung der DNA-Architekturen **DNA1**, **DNA2**, **DNA3** und **DNA4** in Bezug einer möglichen Dimerbildung der integrierten Fluorophore in der DNA. Grün bezeichnet ein Monomer, während Orange ein Dimer darstellt.*

Des Weiteren sollen Interaktionen zwischen unterschiedlichen Farbstoffen in **DNA5** innerhalb einer DNA-Doppelhelix untersucht werden. Durch die Wahl verschiedener Fluorophore sollen Energietransferprozesse von einem Donor auf einen Akzeptor erzeugt werden. Als Donor soll **DB**

eingesetzt werden, während **CV1** und **CV2** sowie zwei Aminonaphthalimid- und ein Thiazol Orange-(TO)-Farbstoff als Akzeptoren dienen (Abbildung 2 a)). Ebenfalls soll in diesem Fall das DNA-Gerüst als Abstands- und Orientierungskontrolle fungieren. Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Systemen soll der fluoreszente *Read-Out* der synthetisierten Nitroindolsonden **N1** und **N2** nicht auf einer Verschiebung der Emissionswellenlänge basieren, sondern auf einem *Light-Up* der Fluoreszenz, welcher die Detektion einer Zielsequenz ermöglicht. Das Nitroindol soll hierbei als Löscher der Fluoreszenz im unhybridisierten Zustand dienen, welcher eine starke Abstandsabhängigkeit aufweist (Abbildung 2 b)). Zusätzlich zu den Wechselwirkungen der Fluorophore in DNA-Sequenzen soll ein Transportsystem entwickelt werden, welches Nukleinsäuren ohne signifikante Beeinträchtigung der Zellviabilität in HeLa-Zellen transfiziert. Dafür soll eine fluoreszenzmarkierte DNA zu *inorganic-organic-hybrid nanoparticles* (IOH-NP) synthetisiert werden. Die zelluläre Aufnahme und Verteilung in den Zellkompartimenten sowie eine mögliche Toxizität sollen analysiert werden (Abbildung 2 c)).

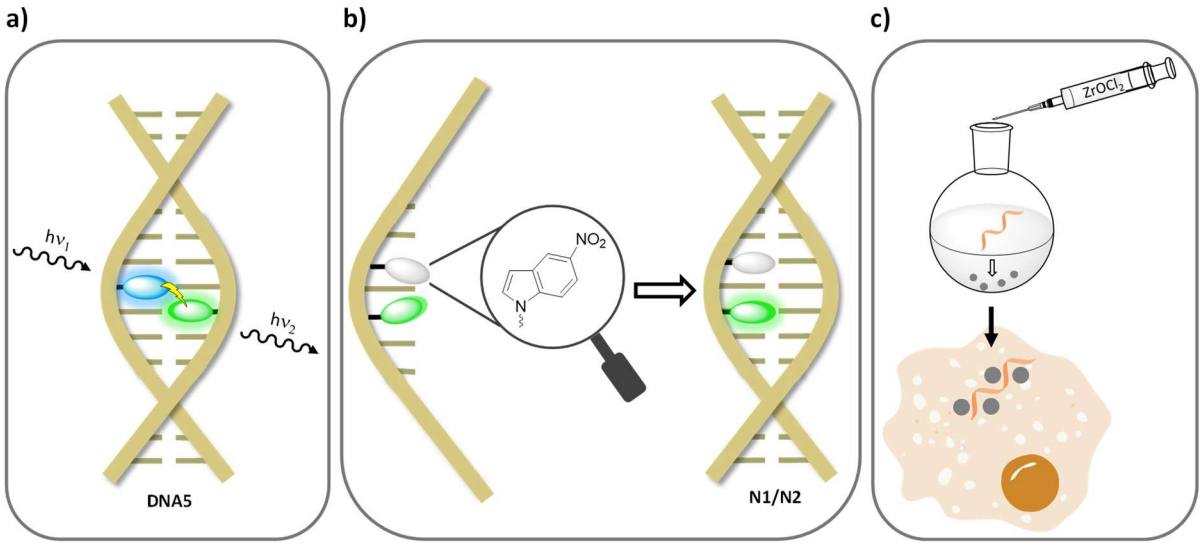


*Abbildung 2: a) Energietransfer von **DB** auf einen Akzeptor-Fluorophor in **DNA5**; b) Darstellung des Light-Up durch die Nitroindolsonden in **N1** und **N2**; c) Darstellung der Synthese der DNA-IOH-Nanopartikel sowie deren Transfektion in HeLa-Zellen.*

Diese Arbeit soll Fluorophor-Wechselwirkungen in DNA-Architekturen untersuchen und wie diese gesteuert werden können. Die Etablierung neuer fluorophorer DNA-Bausteine soll dazu beitragen, um zukünftige Detektionen an Oligonukleotiden zu ermöglichen. Zudem stellt das neu entwickelte Transportsystem eine Alternative zu den etablierten Varianten dar.

2. Theorie

2.1 Grundlagen der Photophysik

2.1.1 Elektronische Anregung und Relaxationsprozesse

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide sind mit Fluorophoren funktionalisiert, deren optische Eigenschaften zur Visualisierung von intermolekularen Wechselwirkungen genutzt werden. Fluoreszenz wird dabei als *Read-Out* genutzt. Die Absorption von Licht führt zur Anregung eines Elektrons vom elektronischen Grundzustand (S_0) in einen energetisch höher liegenden Zustand. Nach der Anregung relaxiert das Molekül in den energetisch niedrigsten Schwingungszustand des ersten angeregten Singulettzustands (S_1). Von diesem Zustand aus konkurrieren verschiedene strahlende und nicht strahlende Prozesse.[27] Nach der KASHA-Regel erfolgt die Fluoreszenzemission unabhängig von der Anregungswellenlänge aus dem niedrigsten angeregten elektronischen Zustand.[28] Da ein Teil der Anregungsenergie durch nicht-strahlende Relaxationsprozesse wie vibronische Relaxation verloren geht, erfolgt die Emission bei geringerer Energie als die Absorption, wobei die Differenz als STOKES-Verschiebung beschrieben wird. Unter idealen Bedingungen zeigen die Spektren ein annäherndes Spiegelbildverhalten, was auf ähnliche Schwingungseigenschaften des Grund- und des angeregten Zustands zurückzuführen ist.[27, 29]. Neben der Fluoreszenz kann der angeregte Zustand durch interne Konversion oder *Intersystem Crossing* (Interkombination) deaktiviert werden. Beim *Intersystem Crossing* erfolgt ein Übergang vom Singulett- in einen Triplettzustand. Ein Triplettzustand ist vergleichsweise langlebig und kann durch strahlungslose Prozesse oder Phosphoreszenz in den Grundzustand gelangen.[30] Zudem können Wechselwirkungen mit anderen Molekülen zu einer strahlungsfreien Desaktivierung führen.[31] Diese Mechanismen werden unter dem Begriff *Quenching* (engl. Fluoreszenzlöschung) zusammengefasst, welcher die Abnahme der Fluoreszenz beschreibt. Eine Möglichkeit ist die Kollision mit einem *Quencher*-Molekül, wodurch eine strahlungslose Deaktivierung erfolgt.[32] In Nukleinsäuren sind besonders die stoßfreien intermolekularen Energietransferprozesse von Bedeutung. Beim FÖRSTER-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) erfolgt die Übertragung der Anregungsenergie strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von einem Donor auf einen Akzeptor. Da kein Elektron übertragen wird, reicht die Distanz des Transfers über einen relativ großen Bereich von 10 bis 100 Å. Die Effizienz des FRET hängt stark vom Abstand sowie der Überlappung von Donoremission und Akzeptorabsorption und der relativen Orientierung der Übergangsdipole ab.[33] Dieser Zusammenhang wird durch die Förster-Gleichung beschrieben (1):[27]

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

Dabei beschreibt r den Abstand zwischen Donor und Akzeptor. R_0 ist der Förster-Radius, der den Radius definiert, bei dem die Effizienz des Energietransfers 50 % beträgt. Dieser Wert ist spezifisch für jedes Donor-Akzeptor-Paar (2):

$$R_0^6 = \frac{9000(ln10)\kappa^2 \Phi_D}{128\pi^5 n^4 N_A} J \quad (2)$$

κ^2 ist der Orientierungsfaktor der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor, Φ_D die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors, n der Brechungsindex des Lösungsmittels, N_A die Avogadro-Konstante und J das Überlappungsintegral zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption.[27, 33] WILHEMSSON *et al.* nutzten den FRET-Mechanismus in DNA, um Konformationsänderungen zu untersuchen. Dafür wurde tricyclisches Cytosin tC (Donor) und nitro tricyclisches Cytosin tC_{nitro} (Akzeptor) in die Nukleinsäure integriert, wobei der Energietransfer zu einer Löschung der Emission des Donors führte. Die Reduzierung der Intensität ermöglicht Rückschlüsse auf strukturelle Änderungen und eignet sich zur Untersuchung von Nukleinsäurestrukturen sowie DNA-Protein-Wechselwirkungen (Abbildung 3 a)).[14, 20, 34-40] Im Gegensatz dazu beruht der Dexter-Energietransfer auf einem Elektronenaustauschmechanismus von Donor und Akzeptor. Voraussetzung ist eine Überlappung der Molekülorbitale, weshalb dieser Prozess nur in kürzeren Abständen zwischen 5 – 10 Å ablaufen kann.[41] Energieübertragungen, die zu lichtinduzierten Photoschäden der DNA beitragen, können damit untersucht werden. Dies zeigte WAGENKNECHT *et al.*, indem Thioxanthon (Donor) und Naphthalin (Akzeptor) in DNA eingebaut wurden und dabei einen Triplett-Triplett-Energietransfer über einen Dexter-Mechanismus nachwiesen. Dieser Energietransfer ist dabei stark distanzabhängig (Abbildung 3 b)).[42-44]

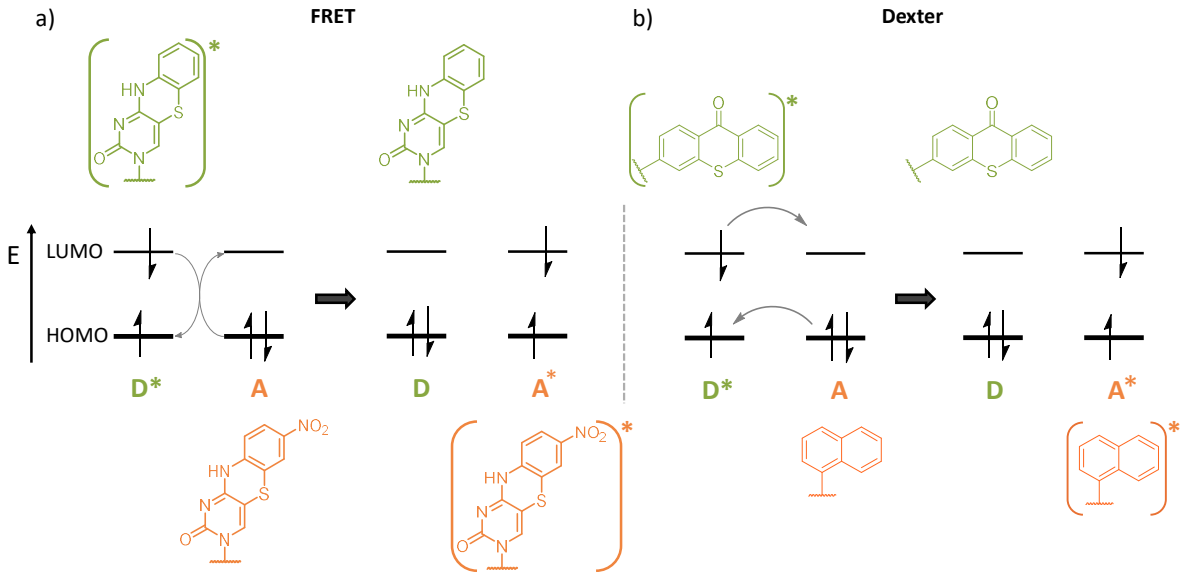


Abbildung 3: a) FRET-Energietransfer von tricyclischem Cytosin (tC) auf nitro tricyclisches Cytosin (tC_{nitro}) in DNA nach WILHEMSSON *et al.; b) Dexter-Energietransfer durch einen Elektronen-Austauschmechanismus von Thioxanthon auf Naphthalin in DNA nach* WAGENKNECHT *et al..*[40, 42]

Ein weiterer Mechanismus des Elektronentransfers ist der photoinduzierte Elektronentransfer (PET), bei dem im Gegensatz zum Dexter lediglich ein einzelnes Elektron übertragen wird. Dabei kann unterschieden werden, ob das Elektron vom angeregten Fluorophor auf den *Quencher* übergeht (oxidatives *Quenching*) oder ob ein Elektron vom *Quencher* auf den angeregten Fluorophor übertragen wird (reduktives *Quenching*). Ein ladungsgetrennter Zustand entsteht, der strahlungslos in den Grundzustand relaxiert und somit zur Abschwächung der Fluoreszenz führt (Abbildung 4).[45] Guanin besitzt das niedrigste Oxidationspotential der natürlichen Basen und kann die Fluoreszenz benachbarter Fluorophore löschen.[46, 47] Neben der Fluoreszenzlöschung von Guanin können zusätzliche *Quencher* in die DNA integriert werden, die einen PET-induzierten *Read-Out* ermöglichen.[12, 48] Sowohl Ethidium als auch TO sind in der Lage ein reduktives und ein oxidatives *Quenching* einzugehen. Dies zeigte WAGENKNECHT *et al.*, indem diese Farbstoffe mit Nitroindol (NI) als Elektronenakzeptor beziehungsweise 7-Deazaguanin als Elektronendonor in DNA eingebaut wurden. Abhängig von der Anordnung in der Sequenz und somit vom Abstand des Redox-Paares konnte die Fluoreszenz gelöscht werden.[49] Mit TO konnte eine hybridisierungssensitive Sonde entwickelt werden, deren Fluoreszenz durch Hybridisierung ansteigt.[48]

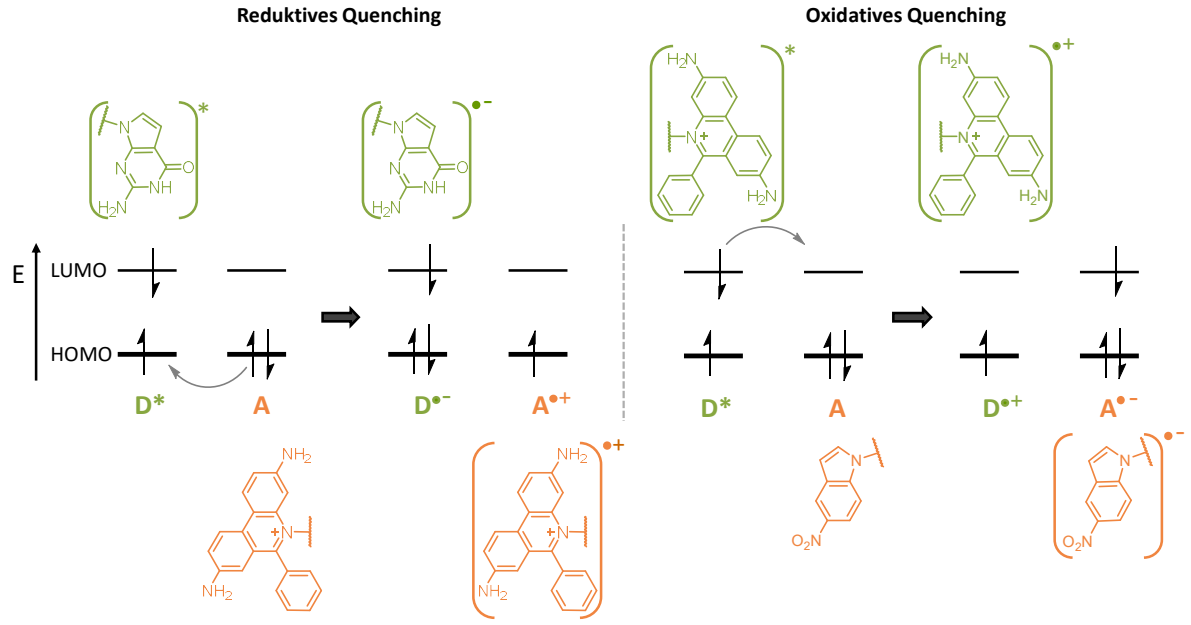


Abbildung 4: Elektronentransfer ausgelöst durch einen photoinduzierten Elektronentransfer (PET) nach WAGENKNECHT *et al.; links) ein Elektron wird beim reduktiven Quenching vom Akzeptor Ethidium auf den angeregten Donor 7-Deazaguanin in DNA übertragen; rechts) ein Elektron wird vom angeregten Donor Ethidium auf den Akzeptor Nitroindol (NI) in DNA übertragen.[49]. Die Fluoreszenz wird dabei gelöscht.*

Neben dem PET kann ein *twisted intramolecular charge transfer* (TICT) zu einer Fluoreszenzlöschung durch Ladungstrennung führen, welcher durch Rotation einer Bindung entsteht. Dieser verdrehte TICT-Zustand kann energetisch begünstigt sein, wobei die Relaxation in den Grundzustand strahlungslos erfolgt (Abbildung 5).[50] Wird ein verdrehbares Fluorophor in ein DNA-Gerüst eingebettet, wird der TICT unterbunden und die Fluoreszenzintensität nimmt zu. Dieses Prinzip nutzten GOH *et al.,* um Proteinbindungen an DNA zu untersuchen. Dabei wurde ein Acridinorange molekularer Rotor eingesetzt, welcher durch Interkalation in DNA keinen TICT mehr ausbilden kann, wodurch ein starker *Light-Up* der Fluoreszenz auftritt. Durch die Bindung der DNA an ein Protein wird der Farbstoff freigesetzt, wodurch der TICT-Zustand erneut auftreten kann und ein *Quenching* der Emission detektiert wird.[51-55]

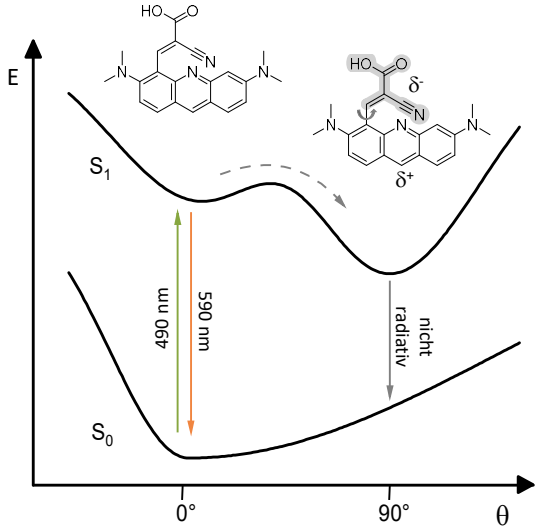


Abbildung 5: Energieschema zur Darstellung des Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) von Acridinorange nach GOH et al.. Eine Verdrehung des emittierenden planaren Zustands zu 90 ° bewirkt eine Absenkung der Energie, welche strahlungsfrei relaxiert. In Lösung wird die Fluoreszenz gelöscht, während interkaliert in DNA ein Light-Up der Fluoreszenz auftritt.[55]

Durch die Integration von Fluorophoren in die Doppelhelix werden die photophysikalischen Prozesse und somit die Emission verändert. Dadurch kann die DNA als Gerüst genutzt werden, um Abstand, Anzahl und relative Orientierung integrierter Fluorophore zu steuern, wodurch unterschiedliche Emissionsverhalten auftreten.

2.1.2 Intermolekulare elektronische Wechselwirkungen

Fluorophore können miteinander koppeln und einen delokalisierten angeregten Zustand erzeugen. Bildet ein angeregtes Molekül mit einem identischen Molekül im Grundzustand einen solchen angeregten Komplex, handelt es sich um ein Excimer (engl. *excited dimer*). Unterscheiden sich die interagierenden Moleküle, entsteht ein Exciplex (engl. *excited complex*). Während sich zwei Moleküle im elektronischen Grundzustand bei geringer Distanz Wechselwirkungen abstoßen, führt die Anregung in diesen Fällen zur Ausbildung eines stabilisierten angeregten Zustands.[56, 57] Excimere können in DNA-Gerüsten genutzt werden. KASHIDA *et al.* integrierten zwei Pyreneinheiten, die durch eine Base in der Sequenz getrennt sind. Durch Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz werden die Pyrene durch ein Basenpaar getrennt, wodurch die Monomeremission detektiert wird. Ist hingegen bei der Zielsequenz eine Basendeletion gegenüber der trennenden Base vorhanden, hybridisiert die restliche Sequenz, während die

Pyrene in einer Schlaufenstruktur abstehen. Durch diese Struktur treten die Fluorophore in räumliche Nähe, wodurch ein Excimer entsteht und die charakteristische bathochrom verschobene Fluoreszenz beobachtbar ist (Abbildung 6).[22]

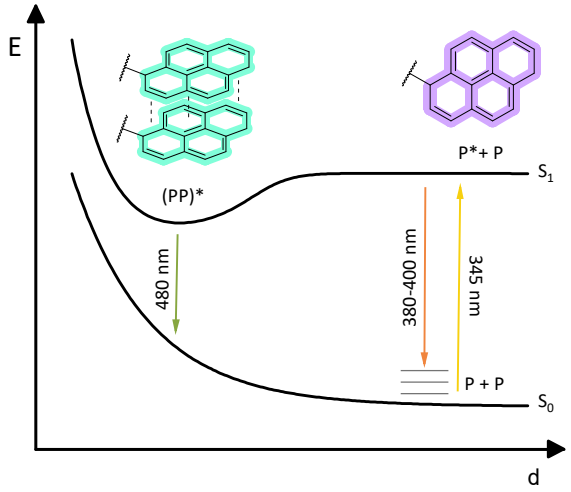


Abbildung 6: Darstellung einer Excimerbildung und der dazugehörigen Wellenlängenverschiebung der Emission von zwei Pyrenen (P) in DNA nach KASHIDA et al. zur Detektion einer Basendeletion.[22].

Während Excimere und Exciplexe ausschließlich im angeregten Zustand entstehen, können Fluorophore bereits im elektronischen Grundzustand Aggregate bilden.[58] In diesen Systemen führt die Wechselwirkung der Übergangsdipolmomente zu einer excitonischen Kopplung, die charakteristische Veränderungen der optischen Eigenschaften verursacht. Dadurch kommt es zur Aufspaltung des angeregten Zustands, der sogenannten DAVYDOV-Aufspaltung.[59] Dabei entstehen zwei energetisch unterschiedliche Zustände, ein energetisch abgesenkter und ein energetisch erhöhter Zustand. Die elektronische Anregung liegt delokalisiert vor und wird als Exciton-Zustand bezeichnet. Die Bildung der Aggregate hängt von der Orientierung der Übergangsdipolmomente ab. Bei einer parallelen *face-to-face*-Anordnung entsteht eine positive excitonische Kopplung, die mit einer hypsochromen Verschiebung der Absorption einhergeht und als H-Aggregate bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu führt eine *head-to-tail* Orientierung zu einer negativen Kopplung und einer bathochromen Verschiebung der Absorption, was zu sogenannten J-Aggregaten führt. Entscheidend ist hierfür der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten. Unterhalb eines Winkels von $\theta = 54{,}7°$ bei dem die Dipol-Dipol-Wechselwirkung verschwindet, entsteht eine negative Kopplung und damit ein J-Aggregat. Oberhalb dieses Winkels wirkt eine positive Kopplung und es bilden sich H-Aggregate.[33, 58] In einem H-Aggregat ist der energetisch höhere excitonische Zustand optisch erlaubt, während im J-Aggregat der niedrige Zustand erlaubt ist (Abbildung 7).[60, 61] Die Entstehung von H- und J-Aggregaten wird durch eine Dimerbildung

beschrieben, jedoch lässt sich der Mechanismus ebenfalls auf größere Aggregate, die aus mehreren Fluorophoren bestehen, übertragen.[62, 63] Excitonische Effekte beeinflussen auch die Emission. H-Aggregate zeigen typischerweise eine Fluoreszenzlöschung, während J-Aggregate häufig eine bathochrom verschobene und intensive Emission aufweisen.[61, 62]

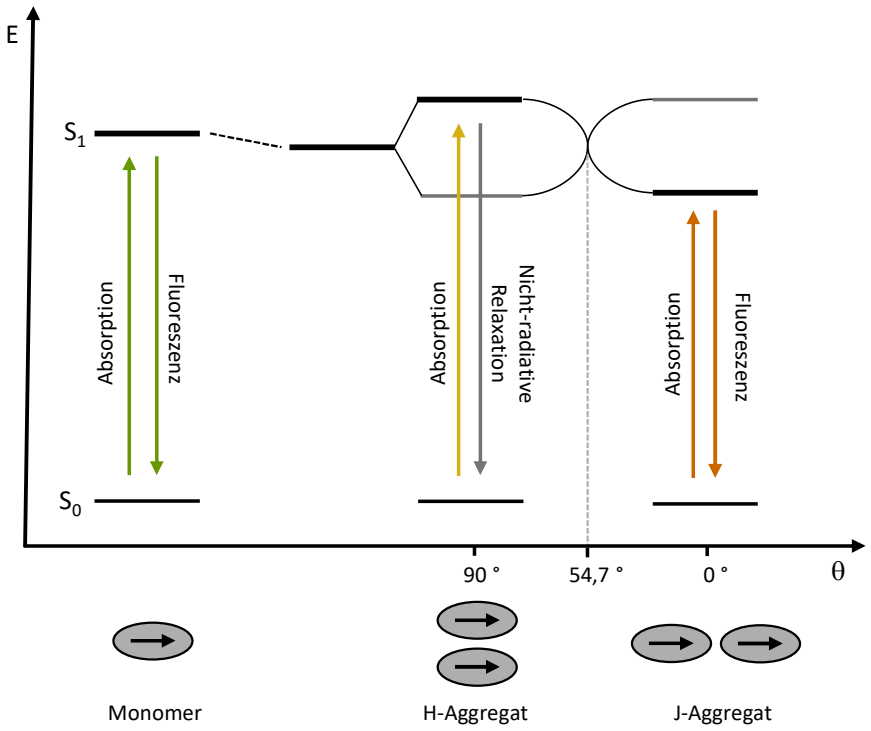


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Exciton-Aufspaltung mit der Besetzung der optisch erlaubten Niveaus für die Bildung von H-und J-Aggregaten, sowie die Ausrichtung der Übergangsdipolmomente.

Allerdings existieren Ausnahmen von gelöschten H-Aggregaten. WÜRTHNER und WORTHMANN *et al.* konnten zeigen, dass ein leichter Rotationswinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten die parallele *face-to-face*-Anordnung leicht verändert, wodurch der verbotene Übergang in das niedrigere Energieniveau ermöglicht wird. Dadurch zeigten die untersuchten Fluorophore keine vollständige Fluoreszenzlöschung, sondern eine bathochrome Verschiebung der Emission.[60, 61, 64] Dies zeigt, dass die photophysikalischen Eigenschaften von H-Aggregaten stark von der Geometrie der Übergangsdipolmomente abhängen und bereits kleine Abweichungen einen signifikanten Unterschied der Fluoreszenz auslösen können. So konnten bereits Excimere und H-Aggregate durch Hybridisierung modifizierter Oligonukleotide erzeugt werden.[19, 21] Zudem konnte der Wechsel von Monomer- zur Dimeremission auch genutzt werden, um eine Zielsequenz oder um *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) zu detektieren.[22, 65-67]

2.1.3 Fluoreszenzbasierter *Read-out*

Fluoreszenz ist ein dynamischer Prozess, der aus verschiedenen konkurrierenden Mechanismen im angeregten Zustand entsteht.[68] Die Emission hängt dabei von der Struktur des Moleküls und dem Lösungsmittel ab.[69-71] Änderungen der Fluoreszenzintensität entstehen durch neu auftretende Prozesse im angeregten Zustand, wie Energieübertragungen, Elektronentransfer- oder nicht strahlende Relaxationsprozesse. Eine Zunahme der Emission wird als *Light-Up* und eine Abnahme als *Quenching* bezeichnet. Solche Intensitätsänderungen treten vor allem durch eine Änderung der Beweglichkeit des Fluorophors oder durch Wechselwirkungen mit benachbarten Molekülen auf.[68, 72-74] Neben Intensitätsänderungen können auch Verschiebungen der Fluoreszenzwellenlänge als optischer *Read-Out* genutzt werden. Verschiebungen der emittierten Strahlung führen zu einer Änderung der auftretenden Emissionsfarbe und können auf Veränderungen der elektronischen Struktur des angeregten Zustands hinweisen.[69, 75, 76] Solche neuen elektronischen Zustände können durch Wechselwirkungen zwischen Fluorophoren unter der Ausbildung von Excimeren entstehen.[19, 56] In Systemen mit mehreren Emissionsbanden kann die Änderung der Fluoreszenzintensitäten der Banden ebenfalls einen *Read-Out* liefern.[77-79] Darüber hinaus können auch Änderungen der Fluoreszenzlebenszeit zur Detektion genutzt werden (Abbildung 8).[80-82]

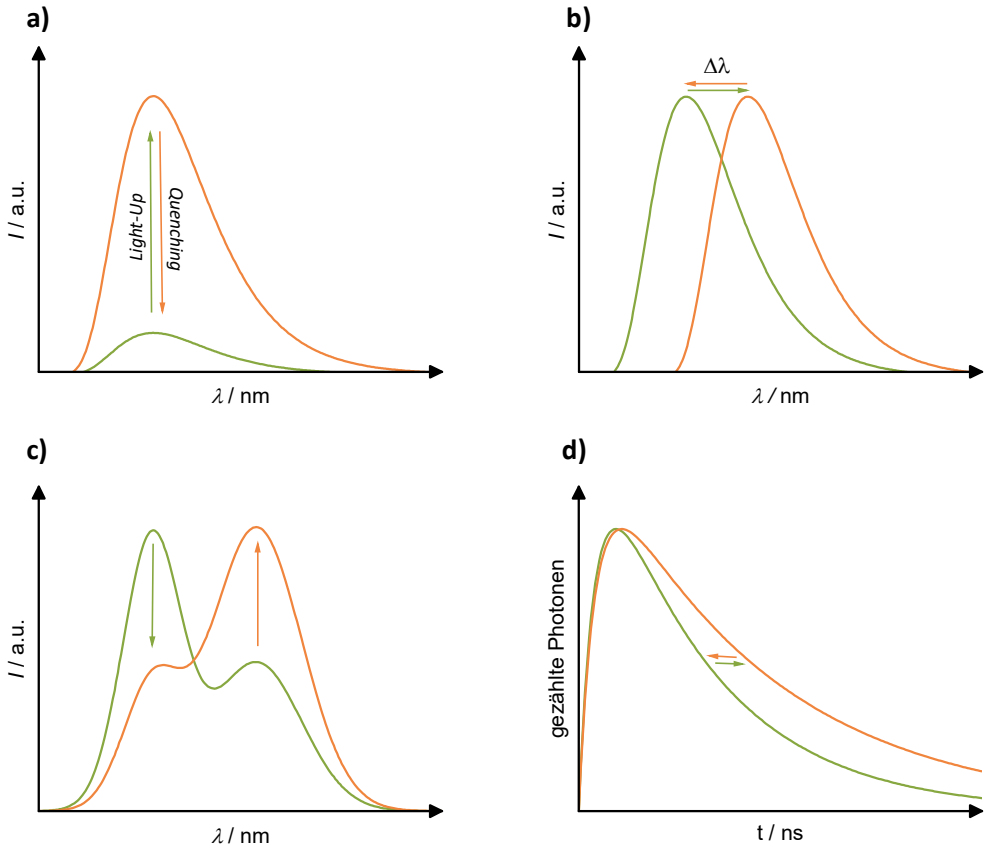


Abbildung 8: Veranschaulichung der messbaren Fluoreszenzparameter. a) Anstieg oder Löschung der Fluoreszenzintensität; b) Verschiebung der emittierten Wellenlänge; c) Inversion des Verhältnisses der beiden Fluoreszenzbanden; d) Verlängerung oder Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit.

Fluoreszenz kann damit als optischer *Read-Out* zur Visualisierung von Abstands- oder Orientierungsänderungen von Fluorophoren in DNA genutzt werden.

2.2 DNA als strukturgebendes Gerüst

Aufgebaut ist die DNA aus einer Sequenz der vier Nukleobasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Eine dreidimensionale Doppelhelix entsteht durch Hybridisierung mit einem komplementären Gegenstrang, wobei die WATSON-CRICK-Basenpaarung zwischen A und T sowie zwischen C und G ausgebildet wird.[3] Die am häufigsten vorkommende Konformation doppelsträngiger DNA ist die B-Form. Diese entspricht einer rechtsgängigen Doppelhelix, die sowohl große als auch kleine Furchen ausbildet. Die Basen sind in der Sequenz mit einem Abstand von 3,4 Å und einem Winkel von 36 ° angeordnet, wobei der Helixdurchmesser 2 nm beträgt (Abbildung 9 b)).[83, 84] Neben der WATSON-CRICK-Basenpaarung können noch weitere Interaktionen zwischen DNA-Einzelsträngen auftreten. Ein Vertreter der nicht-kanonischen

Basenpaarungen ist die HOOGSTEEN-Basenpaarung, bei der Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleobasen über andere Bindungsstellen ausgebildet werden. Purinbasen wechselwirken anstatt an N1 mit N7, wodurch eine veränderte Geometrie auftritt.[85] Dies erhöht die Variabilität der Ausbildung von weiteren Sekundärstrukturen wie die Ausbildung von G-Quadruplexen, bei denen vier Guaninbasen über hoogsteenähnliche Wechselwirkungen planar angeordnet werden. Die Ausbildung der G-Quadruplexe wird durch guaninreiche Sequenzen begünstigt (Abbildung 9 a)).[86] Neben intermolekulare Interaktionen können auch intramolekulare Wechselwirkungen eine Basenpaarung ermöglichen, wodurch eine Haarnadelstruktur entsteht.[87, 88]

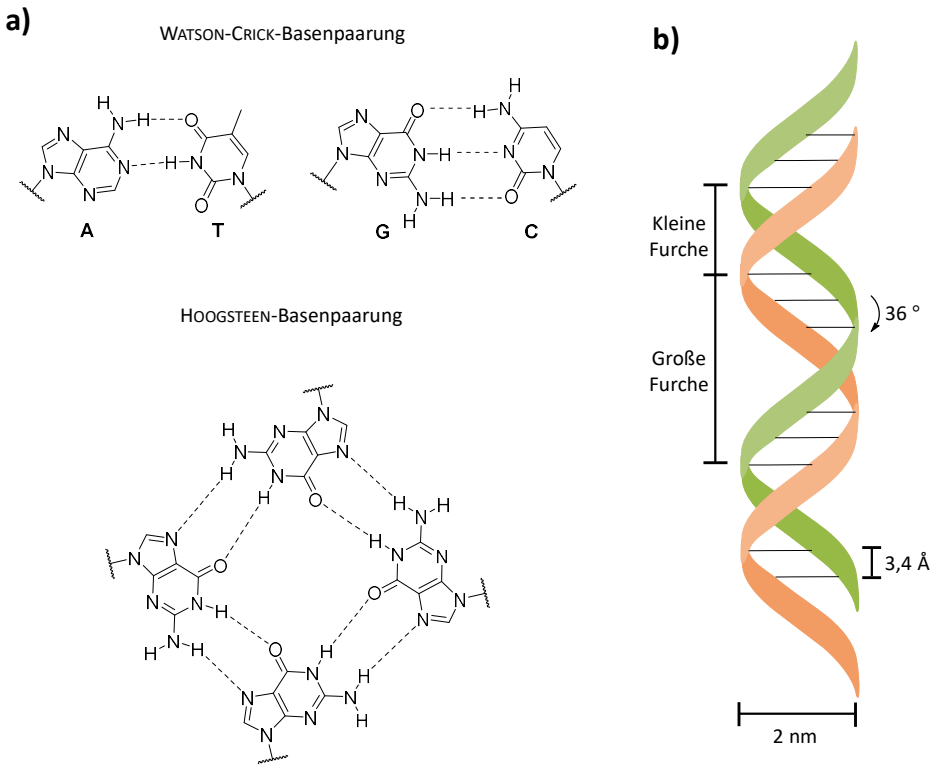


Abbildung 9: a) oben; WATSON-CRICK-Basenpaarung zwischen Adenin (A) und Thymin (T) sowie Guanin (G) und Cytosin (C), unten; HOOGSTEEN-Basenpaarung zur Bildung eines G-Quadruplex; b) strukturelle Darstellung einer B-förmigen DNA-Doppelhelix mit kleiner und großer Furche, dem Winkel und dem Abstand zwischen den Basen sowie dem Helixdurchmesser.

Ein Konzept für die Anwendung der DNA als strukturgebendes Gerüst ist das von ROTHEMUND *et al*. entwickelte DNA-Origami. Dabei dient eine einzelsträngige DNA als Grundgerüst, das durch eine Hybridisierung mit mehreren kürzeren Oligonukleotiden in eine spezifische Struktur gebracht wird. Durch diese definierte Anordnung der DNA-Moleküle faltet sich das Oligonukleotid in eine zweidimensionale Nanostruktur wie zum Beispiel Sterne, Dreiecke oder Schriftzüge.[89] Das Prinzip des DNA-Origamis wurde von DOUGLAS *et al*. erweitert, indem mehrere DNA-Helices

parallel angeordnet und miteinander verknüpft wurden. Auf diese Weise konnten dreidimensionale Strukturen erzeugt werden.[16, 90]

2.3 Linker für die Modifikation von DNA

Oligonukleotide können über eine postsynthetische Einbringung von Fluorophoren modifiziert werden. Bei diesem Ansatz wird ein modifizierter Linker in die Sequenz integriert, an den der Fluorophor nach abgeschlossener DNA-Synthese selektiv angebracht wird. Eine häufig verwendete Reaktion ist aufgrund ihrer hohen Chemoselektivität die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. Dabei wird ein Alkin-Linker in die Sequenz integriert und der Fluorophor wird mit einer Azidgruppe funktionalisiert. Eine Click-Reaktion verbindet das Fluorophor mit dem Oligonukleotid über eine Triazol-Einheit.[12, 91] Fluorophormodifikationen können neben der postsynthetischen Variante auch während der Oligonukleotid-Synthese erfolgen. Dafür wird das Fluorophor modifiziert, sodass dieser bei der automatisierten Phosphoramidit-Methode als DNA-Baustein verwendet werden kann. Eine solche Modifikation kann die Anbringung an ein natürliches Nukleosid sein, wobei die Position an der Nukleobase oder der 2´-Desoxy-Ribose sein kann. Diese Methode ermöglicht eine Positionierung des Fluorophors am Basenstapel, wodurch die photophysikalischen Eigenschaften durch Änderungen der Duplexstruktur beeinflusst werden.[92-94] Eine andere Variante ist das Fluorophor direkt als Basensurrogat einzusetzen, sodass das Fluorophor anstelle einer Nukleobase am Zucker angebracht wird, wodurch der Fluorophor in den Basenstapel integriert wird. Dieser Ansatz integriert den Fluorophor gegenüberliegend zur Base des komplementären Strangs, wobei die verschiedenen Wechselwirkungen der unterschiedlichen Basen das Fluoreszenzverhalten beeinflussen.[74, 95] Neben diesen Ansätzen können Fluorophore auch über einen synthetischen Linker in Nukleinsäuren eingeführt werden. Ein häufig eingesetzter Linker für die Markierung von Oligonukleotiden mit Fluorophoren sind Aminoalkyl-Linker wie der C6-Linker. Dieser Linker modifiziert das Oligonukleotid terminal, wodurch die Alkylkette eine hohe Flexibilität des angehängten Fluorophors ermöglicht und Wechselwirkungen mit dem Oligonukleotid reduziert werden.[14, 96, 97] Andere Varianten integrieren das Fluorophor nicht terminal, sondern direkt in die Sequenz. Dabei wird der Linker zwischen zwei Phosphaten in das Rückgrat der DNA eingebracht und ersetzt somit das Nukleosid. Diese Variante ermöglicht die Untersuchung verschiedener Abstände sowie Orientierungen und erlaubt die Integration mehrerer Fluorophore. Für die Integration von Fluorophoren in Oligonukleotidsequenzen über einen Linker sind mehrere Varianten etabliert. Ein Ansatz ist die Integration des achiralen und flexiblen Glycerol-Linkers, welcher von PEDERSEN *et al.* eingeführt wurde. Dieser Linker verändert leicht die natürliche Geometrie der Doppelhelix. Während natürliche Nukleotide ein chirales Zentrum

aufweisen, unterscheidet sich dieser Linker durch das Fehlen eines Stereozentrums. Aufgrund der hohen Flexibilität bietet der Glycerol-Linker eine räumliche Freiheit des integrierten Fluorophors, wodurch dieser Linker oft für die Integration sterisch anspruchsvoller Fluorophore eingesetzt wird.[98-100] Ein weiterer Linkertyp ist der D-Threoninol-Linker von ASANUMA *et al.,* der aufgrund seiner Chiralität eine Ähnlichkeit zur 2´-Desoxyribose aufweist. Dieser Linker beeinflusst das DNA-Gerüst im Vergleich zu einem natürlichen Baustein gering. Im Gegensatz zum Glycerol-Linker gibt dieser Ansatz eine Orientierung in der Doppelhelix vor. Dieser Linker wird aufgrund seiner Flexibilität und seiner vorgegebenen Orientierung für die Integration mehrerer Fluorophore eingesetzt, um Wechselwirkungen unter diesen zu ermöglichen. [13, 101] Ein ebenfalls chiraler Linker ist der (*S*)-Aminopropandiollinker. Die Chiralität und die Flexibilität ermöglichen eine Integration des Fluorophors in die DNA. Der Abstand im DNA-Rückgrat wird durch den Einsatz dieses Linkers etwas verkürzt, wodurch eine Destabilisierung des Duplexes auftreten kann. Die definierte Orientierung in DNA-Duplexen steuert die Positionierung integrierter Fluorophore. Dieser Linker wird eingesetzt, um Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen in DNA zu erzeugen (Abbildung 10).[19, 21, 102, 103]

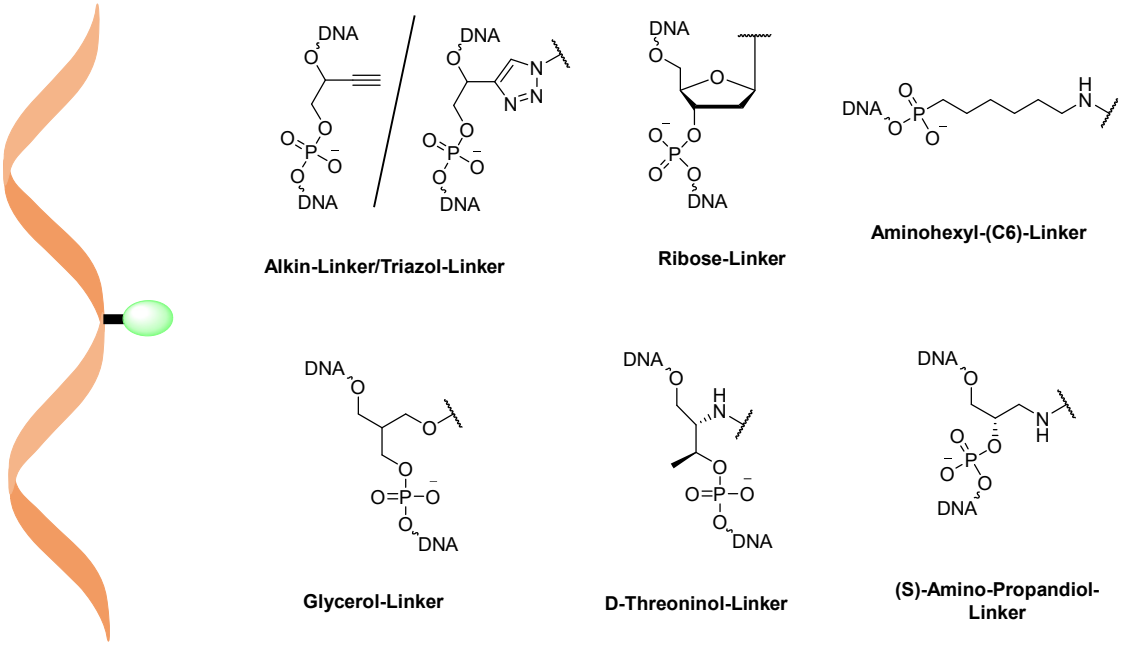


Abbildung 10: Strukturen der Anbringungsmöglichkeiten von Fluorophoren über Alkin-/Triazol-, Ribose-,Aminohexyl-, Glycerol-, D-Threoninol- und (S)-Amino-propandiollinker.

2.4 Wellenlängenverschiebende Fluorophore in einem DNA-Gerüst

DNA-Gerüste lassen sich nutzen, um Wechselwirkungen zwischen integrierten Farbstoffen zu steuern. Veränderungen der Struktur wie durch Hybridisierung haben einen direkten Einfluss auf diese Wechselwirkungen und somit auf die fluoreszenten Eigenschaften. Besonders interessant sind dabei Systeme, die eine Verschiebung der Wellenlänge verursachen. Den Einfluss eines DNA-Gerüsts auf die Emission der integrierten Fluorophore zeigen die Oligodeoxyfluoroside (ODFs) von KOOL *et al*.. In diesen Systemen werden verschiedene Fluorophore wie Naphthalin-, Phenanthren und Pyren-Derivate sowie weitere Farbstoffe als Nukleobasensurrogate in DNA eingebaut. Der geringe Abstand und die Orientierung zueinander ermöglichen Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen, die aus π-π-Stapelung, Excimer- und Exciplexbildung und Energietransferprozessen entstehen. Die auftretende Emission unterscheidet sich signifikant von denen der Monomere, da deutlich verschobene und verbreiterte Emissionsbanden erhalten werden. ODF-Bibliotheken, die nahezu den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich emittieren und bei Anregung einer einzigen Wellenlänge unterschiedliche Emissionsfarben aufweisen, konnten durch die Variation von Sequenz und Fluorophoren erzeugt werden. In diesen Systemen dient die DNA als Gerüst zur Positionierung der Fluorophore und steuert die Ausbildung der elektronischen Wechselwirkungen der Fluorophore.[18, 104-109] Ein weiteres Beispiel für die Steuerung von optischen Eigenschaften von Fluorophoren durch DNA entwickelten WAGENKNECHT *et al*. mit der sogenannten *white-light emitting DNA* (WED). In diesem System wird Pyren als Donor und Nilrot als Akzeptor in DNA integriert, wobei die elektronische Kopplung sowie der Energietransfer zwischen den Fluorophoren von ihrer Orientierung abhängen. Im Einzelstrang dominiert ein Energietransfer, wodurch die Akzeptoremission vorwiegend auftritt. Im Duplex hingegen überwiegt eine Dipolkopplung der Farbstoffe, wodurch eine neue Emissionsbande auftritt. Durch das Zusammenspiel der unterschiedlichen Emissionen kann weißes Licht induziert werden (Abbildung 11).[110]

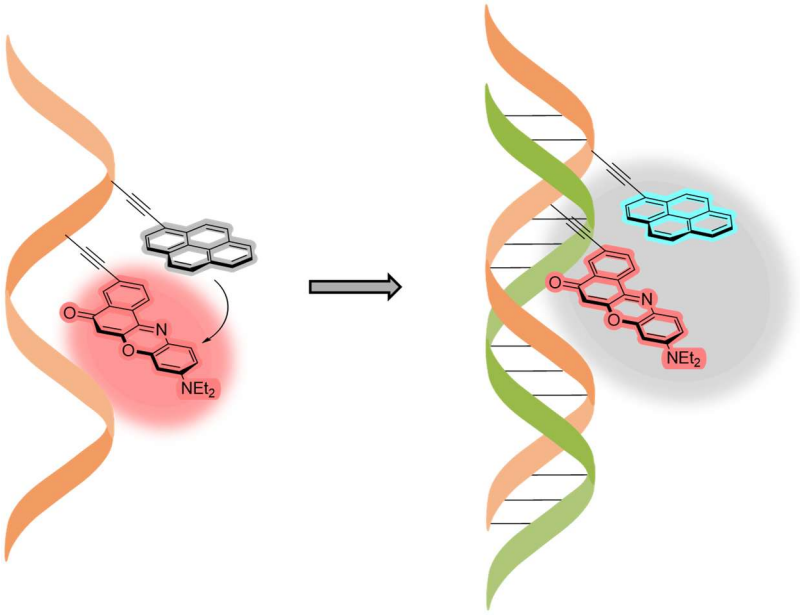


Abbildung 11: Darstellung der white-light-emitting DNA (WED) von WAGENKNECHT *et al. durch die Integration von Pyren und Nilrot.*[110]

Ein oft eingesetzter wellenlängenverschiebender Farbstoff in DNA ist Pyren. Mehrere Fluorophore in räumlicher Nähe zeigen keine Wechselwirkung im Grundzustand, jedoch können im angeregten Zustand Excimere mit bathochrom verschobener Emission auftreten. Dieses Phänomen ist stark abhängig von Distanz und Orientierung der Fluorophore zueinander. Die Integration von Pyren in DNA ermöglicht die Visualisierung von strukturellen Veränderungen durch das Umschalten von Monomer- zur Excimeremission. Durch Hybridisierung und der damit verbundenen strukturellen Anordnung können Pyren-Excimere in DNA erzeugt werden. Eine Denaturierung erzeugt wiederum den monomeren Zustand von Pyren, welcher durch eine Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge beobachtbar ist.[111-116] Zum Beispiel integrierten EBATA *et al*. zwei Pyren-Einheiten terminal in zwei verschiedene DNA-Sequenzen. Beide dieser Sequenzen sind dabei komplementär zu einer Ziel-Sequenz und durch Hybridisierung gelangen beide Fluorophore in räumliche Nähe, wodurch eine breite Excimer-Emission bei λ=495 nm auftritt. Das Pyren-Monomer hingegen weist eine Fluoreszenz bei λ=379 nm, λ=398 nm und λ=420 nm auf (Abbildung 12).[111] Die Position der Modifikation ist dabei entscheidend, da eine Wechselwirkung der Fluorophore im angeregten Zustand nur bei geeignetem Abstand auftreten kann. Neben der Hybridisierung können auch Basenfehlpaarungen die Struktur und dadurch die Konformation der Pyren-Fluorophore beeinflussen.[117, 118] Zudem kann die molekulare Umgebung von Pyren, integriert in DNA, ebenfalls die Fluoreszenz beeinflussen.[119, 120] Abhängig von der Basensequenz und das Vorliegen der DNA als Einzel- oder Doppelstrang zeigt sich ein unterschiedliches Fluoreszenzverhalten. Neben der Excimerbildung von integrierten Farbstoffen können auch excitonische Wechselwirkungen durch ein DNA-Gerüst erzeugt werden. So zeigt

unter anderem das Perylenbisimid (PBI) bei Anordnung in einem Basenstapel in der DNA sowohl eine excitonische Aufspaltung der Absorptionsbanden zu λ=506 nm und λ=545 nm als auch eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz. Die auftretende Grundzustandskopplung unterscheidet sich von einem Excimer, was auf eine Aggregation schließen lässt. Dieser Effekt konnte durch die Integration von zwei PBI-Fluorophoren in einer DNA-Doppelhelix von WAGENKNECHT *et al.* gezeigt werden, wobei eine Excimer-Emission bei λ=660 nm beobachtet werden konnte. Das PBI-Fluorophor wurde dabei an einen (*S*)-3-Amino-propandiol-Linker verknüpft. In einzelsträngiger DNA konnten die charakteristischen Monomeremissionen bei λ=550-558 nm und λ=603 nm beobachtet werden (Abbildung 12).[21] Einen anderen Ansatz verfolgten AURAS und FRIEND *et al*, die durch den Einsatz einer DNA-Architektur bis zu fünf PBI-Einheiten stapelten und dadurch eine Interaktion erzeugen konnten.[60, 61, 121] Sowohl Pyren als auch PBI bestehen aus einem ungeladenen π-System, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen in den Basenstapel einlagern. Im Gegensatz dazu besitzen kationische Fluorophore eine zusätzliche Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphaten im DNA-Rückgrat. Die zusätzliche Wechselwirkung begünstigt zusammen mit der π-Stapelung mit dem Basenstapel eine Grundzustandskopplung benachbarter Fluorophore, wodurch kationische Farbstoffe oftmals eine excitonische Kopplung in DNA zeigen. Ein Beispiel dafür ist der Cyaninfarbstoff TO, welcher häufig eine Anwendung in DNA durch seinen ausgeprägten *Light-Up*-Effekt durch Interkalation findet.[51, 93] Durch eine antiparallele Anordnung von zwei TO-Einheiten gegenüberliegend in einer DNA-Doppelhelix konnten WAGENKNECHT *et al*. ein fluoreszentes H-Aggregat erzeugen. Verknüpft wurden die beiden TO-Einheiten dabei an einen (*S*)-Aminopropandiol-Linker. Die vorgegebene räumliche Anordnung und relative Orientierung der Fluorophore zueinander erzeugt einen Rotationswinkel der Übergangsdipolmomente, wodurch das erniedrigte Exciton-Niveau besetzt werden kann. Diese TO-Dimere zeigen eine hypsochrome Verschiebung der Absorption und eine bathochrome Verschiebung der Emission.[19, 122] Das TO-Monomer weist sein Absorptionsmaximum bei λ=507 nm mit einer Schulter bei λ=486 nm auf, während das TO-Dimer das Maximum bei λ=486 nm mit einer Schulter bei λ=507 nm aufweist. In der Fluoreszenz besitzt das TO-Monomer das Maximum bei λ=530 nm und das TO-Dimer bei λ=580 nm (Abbildung 12).

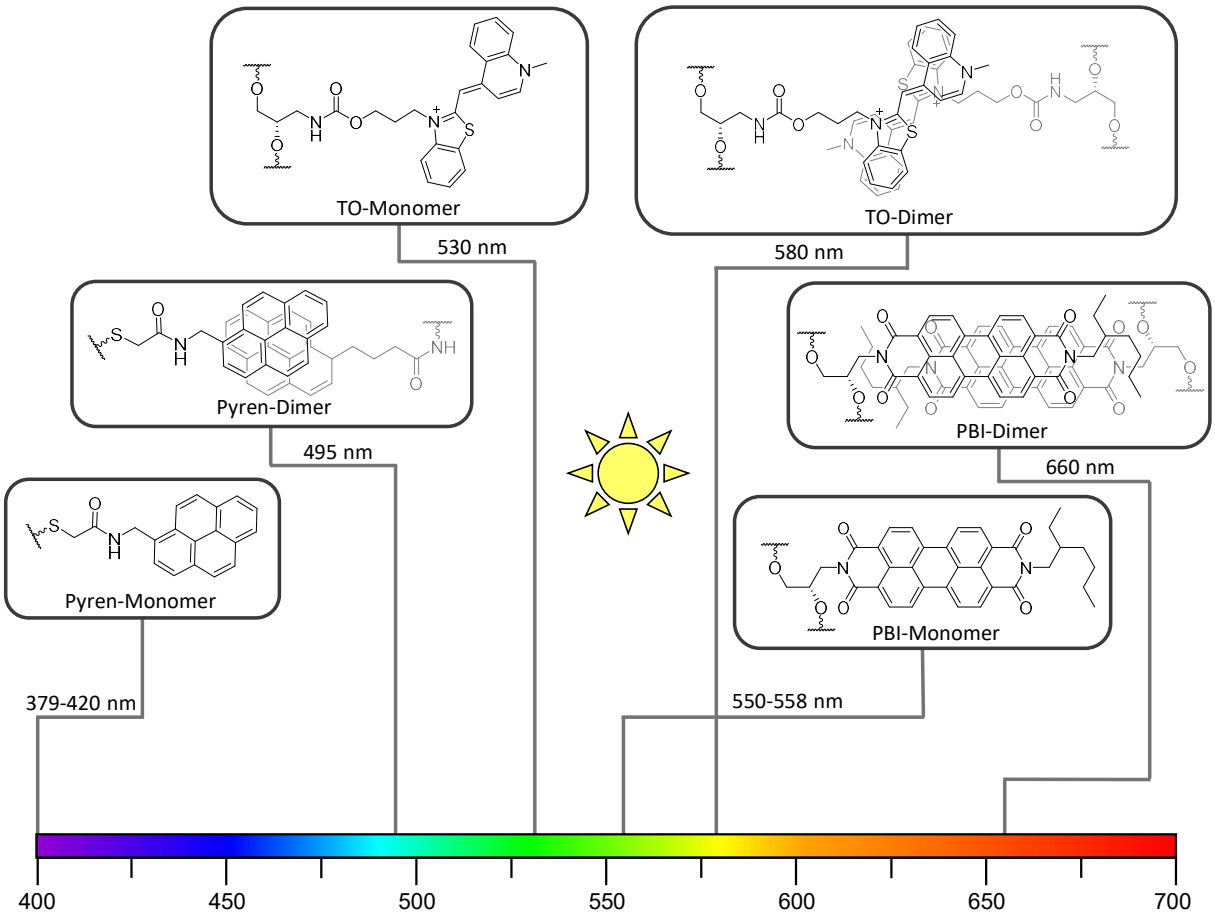


Abbildung 12: Fluoreszenzmaxima der in DNA integrierten Monomere und Dimere von Pyren von EBATA et al., sowie von TO und PBI von WAGENKNECHT et al..[19, 21, 111]

Des Weiteren integrierten LIEDL *et al.* zwei Cyanin-3-Fluorophore in DNA. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Fluorophor excitonische Wechselwirkungen zeigt, sollten zwei Farbstoffe bei passender Orientierung in räumliche Nähe in einem DNA-Gerüst gebracht werden.[123] Durch die Integration von mehreren Methyl-Rot-Fluorophoren in denselben Strang konnte ASANUMA *et al.* ebenfalls H-Aggregate erzeugen. Die Fluorophore sind dabei über einen D-Threoninol-Linker verknüpft und die Aggregatbildung konnte bereits im Einzelstrang nachgewiesen werden. Eine Hybridisierung unterbindet diese Interaktionen und die monomeren optischen Eigenschaften können beobachtet werden.[14, 66, 124, 125]

2.5 Cyanovinylen in DNA

Neben den etablierten und vielseitig eingesetzten Fluorophoren wurden die photophysikalischen Eigenschaften von Cyanovinylen (CV) bei Wechselwirkung mit DNA untersucht. Diese Systeme bestehen aus einem *Push-Pull*-System und einer elektronenziehenden Nitrilgruppe an der Ethenyl-Brücke.[126, 127] CV-Farbstoffe können durch Rotationsbewegungen eine intramolekulare Ladungstrennung erreichen. Dieser TICT-Zustand ermöglicht eine nicht-strahlende Relaxation und die Fluoreszenz wird gelöscht.[73, 128, 129] Wird die Beweglichkeit des Fluorophors eingeschränkt, wie durch eine Einbettung in ein DNA-Gerüst, wird der TICT unterbunden und die Fluoreszenz steigt an.[130-132] Zudem senkt die elektronenziehende Nitrilgruppe an der Ethenylbrücke die Reaktivität gegenüber Sauerstoff, wodurch die Photostabilität erhöht wird.[133, 134] KIM und BOUFFARD *et al.* konnten intermolekulare Wechselwirkungen zwischen CV-Farbstoffen erzeugen, die eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass CV in geringer Konzentration im grünen Wellenlängenbereich fluoresziert, jedoch bei erhöhter Konzentration eine bathochrom verschobene Excimeremission im roten Wellenlängenbereich aufweist. Die Farbstoffe liegen dabei in einer *face-to-face*-Orientierung vor. Durch die Modifikation mit einer kationischen Seitengruppe konnte eine Anlagerung an doppelsträngige DNA erreicht werden, wodurch die Excimeremission detektiert werden konnte. Die DNA dient dabei als Templat für eine Aggregation (Abbildung 13).[132]

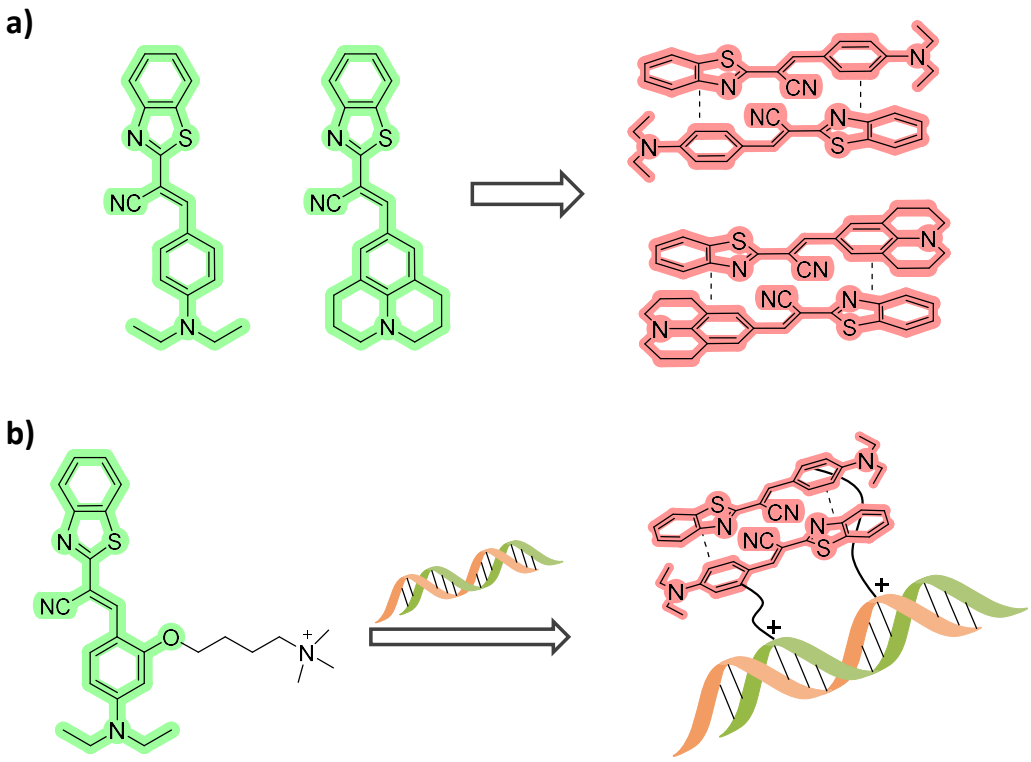


Abbildung 13: a) Strukturen der beiden Cyanovinylen-Derivate von KIM und BOUFFARD et al. als Monomer und als Excimer; b) DNA-gestützte Excimerbildung eines mit einem Linker modifizierten Cyanovinylen.[132]

KIM *et al.* entwickelten eine Sonde, die diese Eigenschaft zur Detektion von Caspase-3 nutzt. Dabei spaltet das Enzym ein CV-modifiziertes Substrat, welches zunächst grün fluoresziert. Nach der Spaltung aggregieren die CV-Farbstoffe und eine Excimer-Emission kann beobachtet werden. Die Änderung von Monomer- zur Dimeremission wurde zur Detektion genutzt.[135] Einen Nachweis für spezifische DNA-Moleküle durch den Einsatz von CV gelang BAE und KIM *et al.*. In wässriger Lösung bildet das mit CV modifizierte Molekül zunächst rot emittierende Aggregate. Durch Wechselwirkungen mit G-Quadruplexen wird die Aggregation der Farbstoffe aufgehoben, wodurch die Dimeremission verschwindet und die Monomer-Emission im grünen Wellenlängenbereich erhalten wird. Zudem tritt eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf, welche auf die Einschränkung der molekularen Flexibilität zurückzuführen ist. Anders als bei KIM und BOUFFARD *et al.* konnte der selektive Nachweis parallel gefalteter G-Quadruplexe und nicht von DNA-Doppelhelices gezeigt werden.[136] WANG und CHEN *et al.* entwickelten mit CV einen *Dual-Key*-Mechanismus, welcher sowohl die excimerbildende Eigenschaft als auch die fluoreszenzlöschende Rotation von CV nutzt. Das mit einer Azidfunktion modifizierte CV-Fluorophor weist eine Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich auf. Nach einer Click-Reaktion mit alkinmarkierter DNA, wird die Aggregation aufgelöst und eine grüne Monomeremission tritt auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine eingeschränkte Rotation durch Erhöhung der Viskosität einen Fluoreszenzanstieg auslöst.[129] Die bathochrome Verschiebung der Emission der

Excimere im Vergleich zur Monomeremission kann genutzt werden, um Wechselwirkungen mit Biomolekülen wie DNA zur Detektion zu ermöglichen. Neben der Wellenlängenverschiebung zeigt eine mögliche intramolekulare Rotation eine Abnahme der Fluoreszenz, was als zusätzlicher *Read-Out* ausgenutzt werden kann.

2.6 Monomethin-Dibenzothiazol in DNA

Symmetrische Monomethin-Dibenzothiazol-Fluorophore gehören zur Klasse der Cyanin-Farbstoffe, deren fluoreszente Eigenschaften durch DNA gesteuert werden können. Cyanin-Farbstoffe besitzen oftmals Absorption- und Emissionseigenschaften im sichtbaren Wellenlängenbereich und werden häufig für fluoreszente *Read-Outs* verwendet.[122, 137, 138] Ein Merkmal dieser Farbstoffe ist ihre Sensitivität gegenüber ihrer molekularen Umgebung. Eine intramolekulare Rotation kann zu einer nicht-strahlenden Deaktivierung und damit zur Fluoreszenzlöschung führen.[139-141] Eine Unterdrückung dieser Rotation kann durch die Einbettung in eine DNA-Doppelhelix erfolgen, wodurch die Fluoreszenzintensität ansteigt.[131, 142] Darüber hinaus zeigen Cyanin-Farbstoffe häufig eine Excimerbildung.[19, 123, 143] Monomethin-Dibenzothiazol-Fluorophore bestehen aus zwei Benzothiazol-Einheiten, die über eine Methin-Brücke verbunden sind. Es konnte gezeigt werden, dass Wechselwirkungen mit DNA die molekulare Flexibilität einschränkt, wodurch ein *Light-Up* der Fluoreszenz eintritt.[144] Ein Vertreter von Monomethin-Dibenzothiazol-Farbstoffen ist K21. ZHOU *et al*. konnten zeigen, dass sich K21 an DNA-Duplexe anlagert, wodurch Änderungen der Absorption und Emission des Farbstoffes auftreten. Diese Anlagerung von K21 konnte ausgenutzt werden, um einen Energietransfer durch die Doppelhelix zu ermöglichen. Die sogenannten „*Exciton-Wires*“ transportieren die Anregungsenergie von einem Donor zu einem geeigneten Akzeptor.[145] Weitere Wechselwirkungen dieses Farbstoffs mit DNA konnte von CHEN *et al*. gezeigt werden. Durch *DNA-Breathing* können K21-Fluorophore in die DNA interkalieren und bilden in DNA Excimere mit bathochrom verschobener Emission (Abbildung 14).

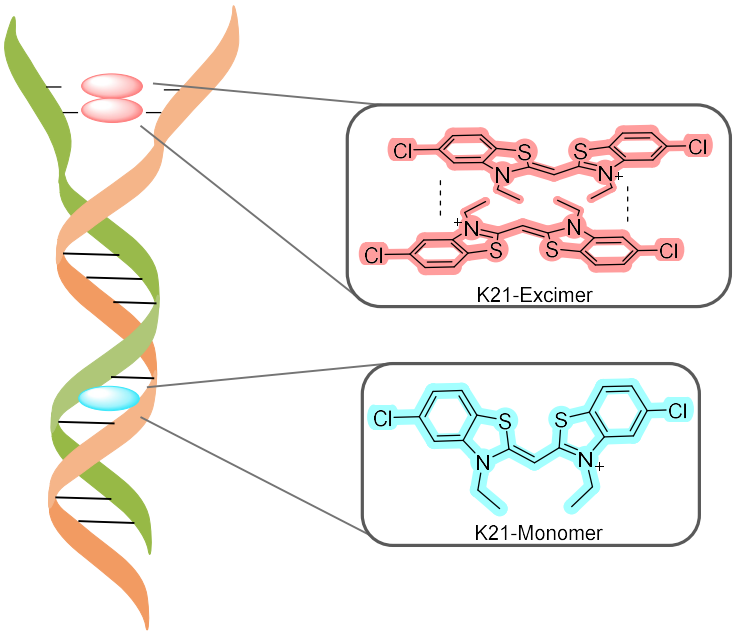


Abbildung 14: K21-Monomer interkaliert in DNA und K21-Excimer durch Anlagerung in geöffneter DNA beim DNA-Breathing nach CHEN *et al.*.[146]

Diese Arbeit zeigt, dass Monomethin-Benzothiazol-Derivate Excimere in DNA ausbilden können und durch strukturelle Veränderungen der Doppelhelix beeinflusst werden.[146] Durch die Nutzung von DNA-Nanostrukturen konnten LI *et al.* die verschiedenen emittierenden Zustände von K21 beeinflussen. Die unterschiedlichen DNA-Gerüste bestimmen die räumliche Anordnung und somit die auftretenden intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren. Durch Variation von Farbstoffkonzentration und der räumlichen Organisation der DNA konnten sowohl monomere als auch aggregierte Zustände mit bathochrom verschobener Emission erzeugt werden.[147]

2.7 Hybridisierungssensitive DNA-Sonden

2.7.1 Grundprinzipien von DNA-Sonden

Die charakteristischen Wechselwirkungen zwischen Fluorophoren und DNA können in DNA-Sonden genutzt werden. Dabei handelt es sich um synthetische, modifizierte Oligonukleotid-Einzelstränge, die Hybridisierungen über einen optischen *Read-Out* visualisieren. Strukturelle Veränderungen wie Duplexbildung oder Fehlpaarungen werden über eine Änderung der Fluoreszenz detektiert. Die DNA dient hierbei als Gerüst zur räumlichen Positionierung der Fluorophore. Abhängig vom Mechanismus äußert sich das Signal entweder in einer Intensitätsänderung oder in einer Wellenlängenverschiebung der Emission.[12, 14, 23, 148, 154]

2.7.2 Intensitätsbasierte DNA-Sonden

Intensitätsbasierte DNA-Sonden beruhen auf einem *Quenching* oder einem *Light-Up* der Fluoreszenz. Eine Variante intensitätsbasierter Sonden sind fluoreszierende Basenanaloga, wobei eine Base der Erkennungssequenz durch einen Fluorophor ausgetauscht wird. WARD *et al*. entwickelten die 2-Aminopurin (2-AP) Sonde, deren Emission stark von der Sequenz abhängt. 2-AP kann WATSON-CRICK-Basenpaarungen mit Adenin (A), Thymin (T) und Uracil (U) ausbilden. Durch Hybridisierung und der damit verbundenen Integration des Fluorophors in die Doppelhelix wird die Fluoreszenz gelöscht.[74] Ein umgebungsunabhängiges fluoreszentes Basensurrogat ist das tricyclische Cytosin (tC), welches von WILHELMSSON *et al.* stammt. Diese Variante ähnelt dem natürlichen Cytosin und bildet mit Guanin eine WATSON-CRICK-Basenpaarung aus, wodurch eine hohe Fluoreszenzintensität erhalten wird (Abbildung 15).[95]

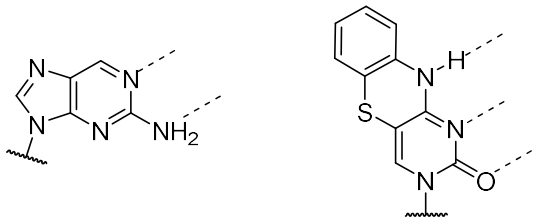


Abbildung 15: links) Molekulare Struktur von 2-Aminopurin (2-AP) von WARD et al.; rechts) Molekulare Struktur von tricyclischen Cytosin (tC) von WILHELMSSON et al..; jeweils mit angedeuteten ausgebildeten Wasserstoffbrücken.[74, 95]

Eine weiterentwickelte Strategie nutzt einen separaten *Quencher*, der die Fluoreszenz eines Fluorophors im Einzelstrang unterdrückt. Ein etabliertes System sind die *Molecular Beacons* (MB) von TYAGI *et al*.. Diese bestehen aus einem einzelsträngigen Oligonukleotid mit komplementären Enden, die eine Haarnadelstruktur ausbilden. Fluorophor und *Quencher* befinden sich an den jeweiligen Enden. Im geschlossenen Zustand werden sie in unmittelbare Nähe gebracht, wodurch die Emission gelöscht wird. Die Erkennungssequenz der Sonde befindet sich in der Schlaufe des MB. Eine Hybridisierung mit der Zielsequenz öffnet die Haarnadelstruktur, wodurch Fluorophor und *Quencher* getrennt werden und die Emission ansteigt (Abbildung 16).[14, 148]

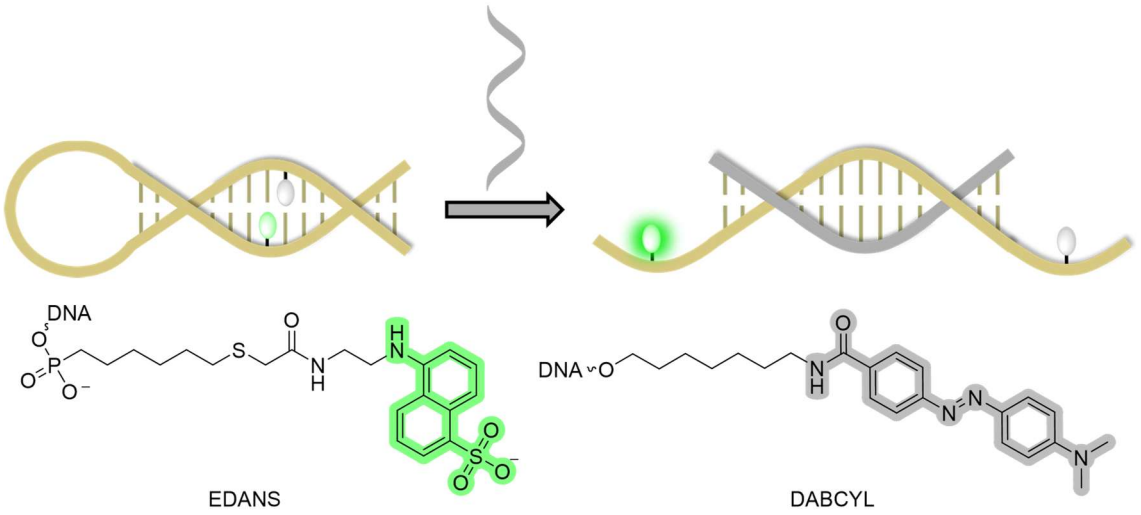


Abbildung 16: Oben) Wirkungsprinzip eines Molecular Beacons (MB). Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden Fluorophor und Quencher getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophor 5-(2´-Aminoethyl)aminonaphthalen-1-sulfonsäure (EDANS) und dem Quencher 4-(4´-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL) nach TYAGI et al..[14]

Ein Konzept, bei dem der Fluorophor und *Quencher* in derselben Erkennungssequenz sind und lediglich einen geringen Abstand aufweisen, sind die Nitroindol-(NI)-Sonden. Ungebunden unterdrückt das NI die Fluoreszenz im Einzelstrang durch einen abstandsabhängigen PET. Eine Hybridisierung vergrößert den Abstand zwischen Fluorophor und *Quencher*, wodurch der PET unterbunden wird und die Fluoreszenzintensität ansteigt. Diese Art von hybridisierungssensitiven Sonden konnte bereits für die Detektion von DNA und RNA eingesetzt werden (Abbildung 17).[12, 48]

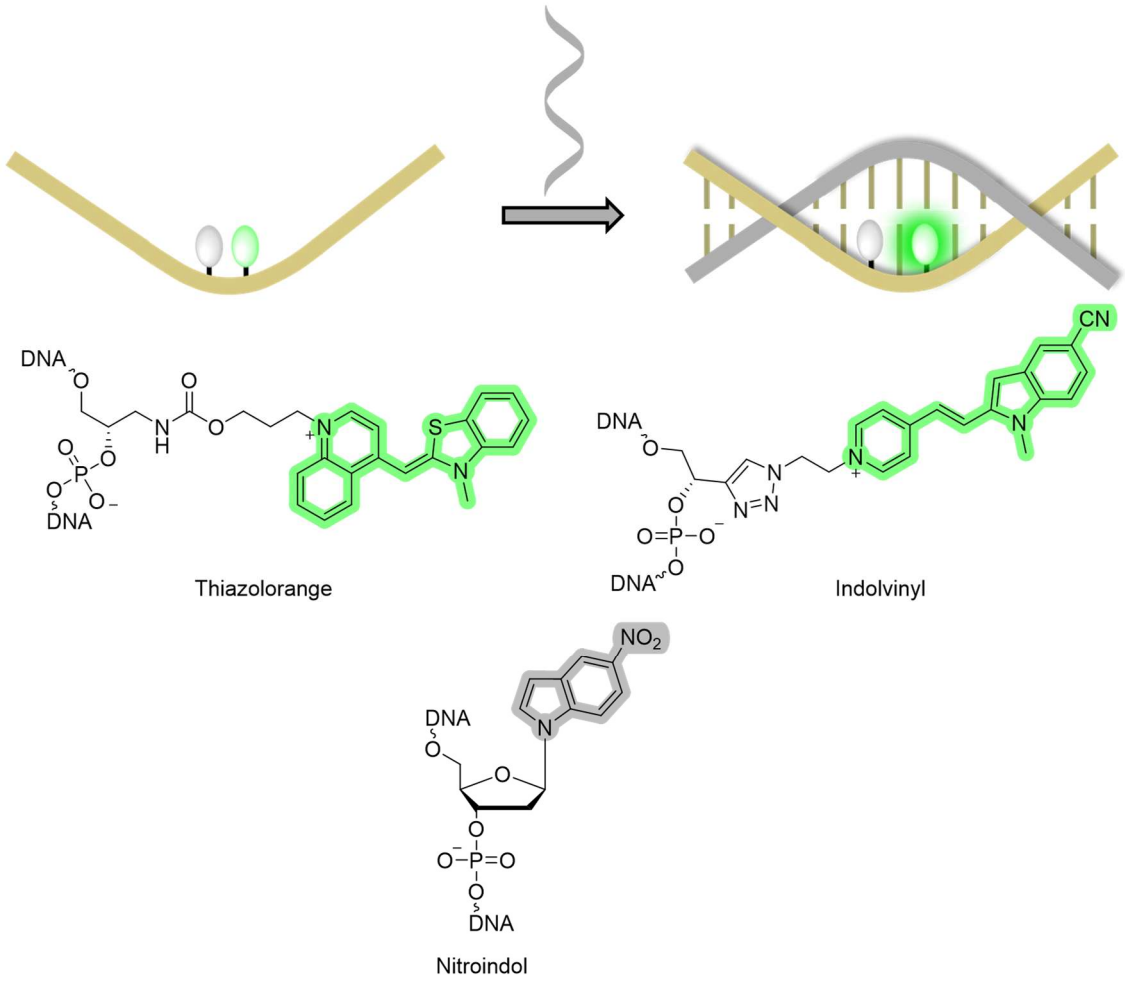


Abbildung 17: Oben) Wirkungsprinzip einer Nitroindol-Sonde. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden Fluorophor und Quencher getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur der eingesetzten Fluorophore Thiazol Orange und Indolvinyl sowie der Quencher Nitroindol nach WAGENKNECHT *et al..*[12, 48]

Neben dem Einsatz von *Quenchern* nutzen andere Systeme mehrere identische Fluorophore innerhalb einer Sequenz, deren Wechselwirkung zum *Quenching* führt. ASANUMA *et al.* entwickelten eine Sonde mit mehreren Peryleneinheiten, die über einen acyclischen D-Threoninol *acid* (D-aTNA)-Linker verbunden sind. Die Flexibilität erlaubt im Einzelstrang eine Annäherung der Fluorophore, wodurch excitonische Wechselwirkungen auftreten und die Fluoreszenz unterdrückt wird. Nach Hybridisierung bewirkt das Helixgerüst eine definierte räumliche Anordnung, wodurch die Wechselwirkungen abnehmen und die Emission zunimmt (Abbildung 18).[13]

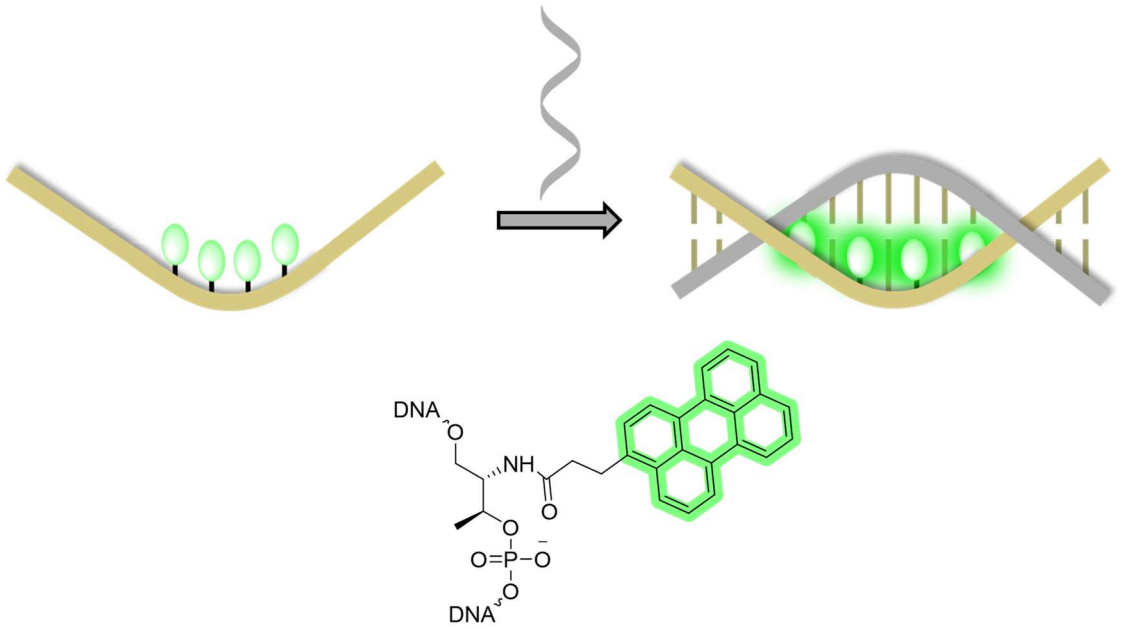


Abbildung 18: Oben) Wirkungsprinzip einer mit mehreren Peryleneinheiten ausgestatteten Sonde. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore räumlich getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur der eingesetzten Perylen-Fluorophore nach ASANUMA *et al..*[13]

Ein ähnliches Prinzip nutzen die *exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotides*-(ECHO)-Sonden von OKAMOTO *et al.*. Hier sind zwei TO-Einheiten über einen verzweigten Linker an einem Basensurrogat verknüpft. Im Einzelstrang treten excitonische Wechselwirkungen auf, die zur Emissionslöschung führen. Durch Hybridisierung interkalieren beide Fluorophore in die Doppelhelix, wodurch die Kopplung unterbunden wird und die Fluoreszenzintensität steigt an (Abbildung 19).[93]

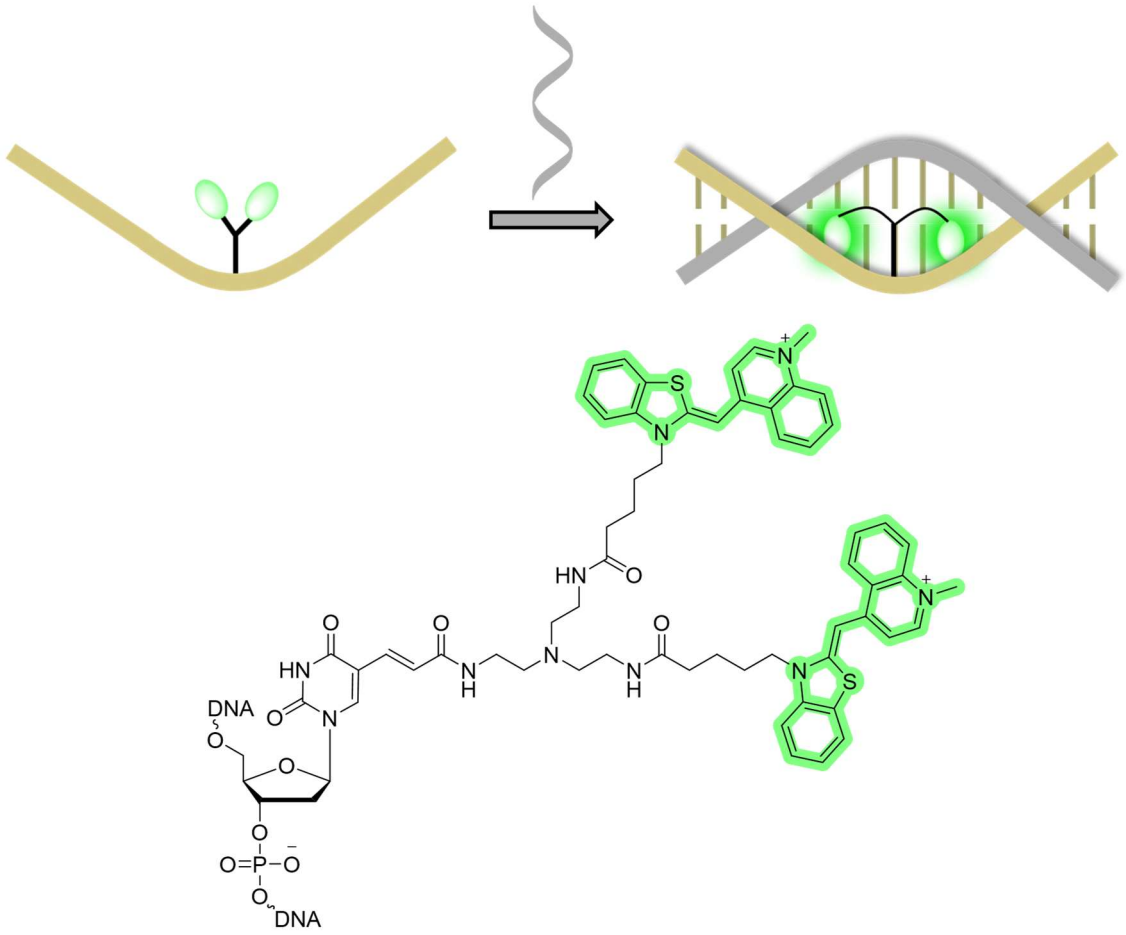


Abbildung 19: Oben) Wirkungsprinzip der exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotides (ECHO)-Sonden. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophor-Baustein nach OKAMOTO *et al..*[93]

SEITZ *et al*. entwickelten die *forced intercalation of thiazole orange* (FIT)-Sonden, bei denen TO als Basensurrogat in die Erkennungssequenz integriert wird. Dieses Konzept wurde zuerst in PNA-Sonden und später ebenfalls in DNA-Sonden eingesetzt. Durch den Einsatz eines kurzen Linkers wird der Fluorophor durch Hybridisierung in den Basenstapel der Doppelhelix integriert, wodurch das Fluoreszenzsignal ansteigt (Abbildung 20).[51, 131]

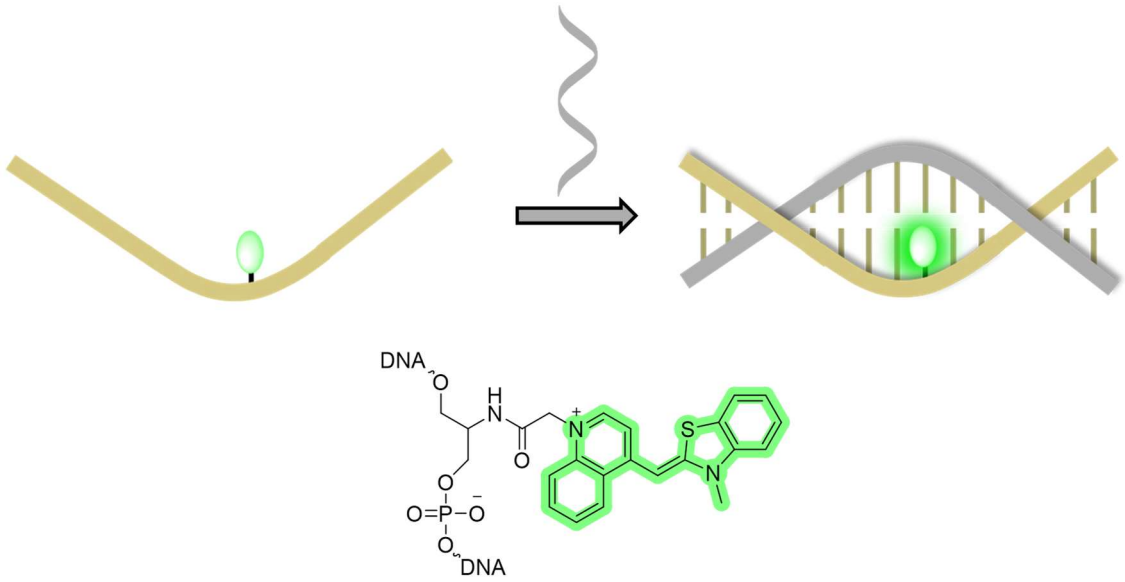


Abbildung 20: Oben) Wirkungsprinzip der forced intercalation of thiazol orange (FIT)-Sonden. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz wird die molekulare Flexibilität eingeschränkt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophors Thiazol Orange nach SEITZ *et al..*[51, 142]

2.7.3 Wellenlängenverschiebende DNA-Sonden

Neben einer Änderung der Fluoreszenzintensität kann auch eine Verschiebung der emittierenden Strahlung als *Read-Out* von DNA-Sonden genutzt werden. Solche Konzepte beruhen entweder auf einem Energietransfer zwischen zwei unterschiedlichen Fluorophoren oder auf elektronische Wechselwirkung identischer Farbstoffe. Ein häufig vorkommendes Prinzip ist die Nutzung eines FRET-Paares bestehend aus einem Donor- und einem Akzeptor-Fluorophor. Eine Weiterentwicklung des klassischen MB nutzt den Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren. In diesen MB wurde der *Quencher* durch einen ebenfalls emittierenden Donor ersetzt, wodurch in der geschlossenen Haarnadel-Struktur die Akzeptor-Fluoreszenz beobachtbar ist. Bindet die Erkennungssequenz an eine Zielsequenz, wird der FRET aufgehoben und die Donor-Emission tritt auf.[14, 149, 150] Ein ähnliches Prinzip nutzen die *Binary Probes*, jedoch auf intermolekulare Weise. Hier binden zwei Sequenzen an eine Zielsequenz, die beide jeweils terminal mit einem Fluorophor eines FRET-Paares ausgestattet sind. Durch Hybridisierung gelangen die beiden Fluorophore in räumliche Nähe, wodurch ein Energietransfer und somit die Akzeptoremission detektiert werden kann (Abbildung 21).[151-153] Im Fall der *dark resonance energy transfer* (DRET) Sonden, wird ein nicht-strahlender Donor eingesetzt, wodurch ungebunden keine Fluoreszenz und gebunden die Akzeptorfluoreszenz beobachtbar wird.[34]

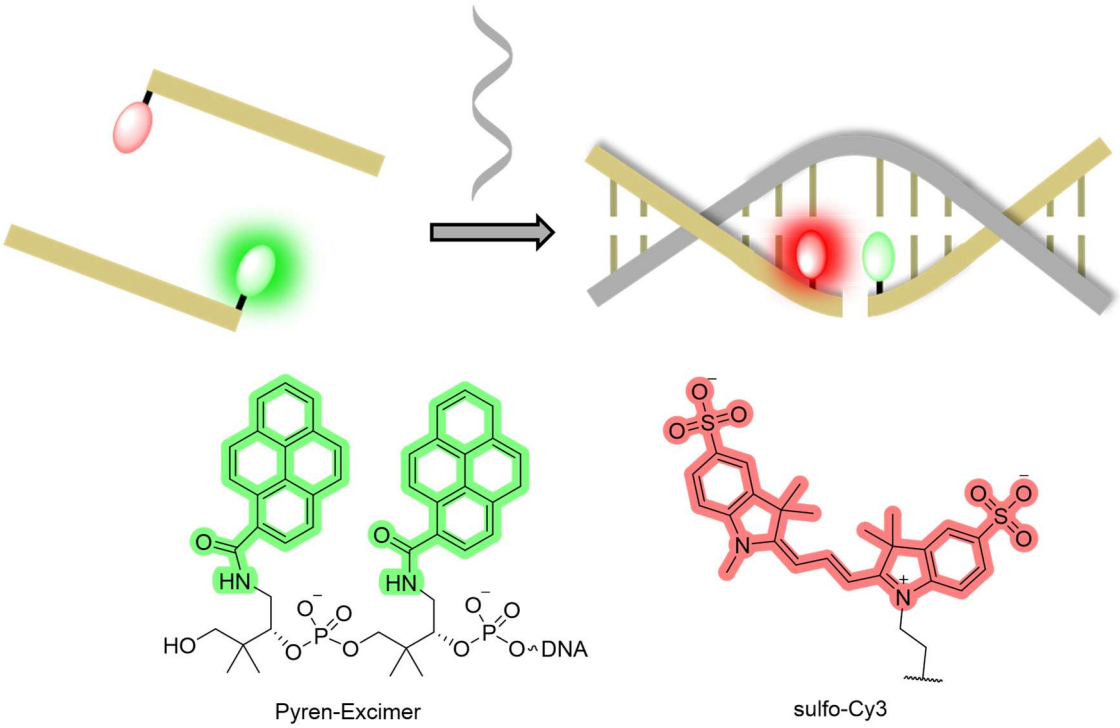


Abbildung 21: Oben) Wirkungsprinzip der Binary Probes. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore in räumliche Nähe gebracht, wodurch ein FRET einsetzt; unten) Struktur des eingesetzten Donor-Pyren-Bausteins und des Akzeptor Sulfo-Cy3-Bausteins nach APARIN *et al.*.[153]

Einen komplementären Ansatz entwickelten WAGENKNECHT *et al*. mit den *DNA-Traffic-Lights*. In diesem System befinden sich Donor- und Akzeptorfarbstoff innerhalb eines doppelsträngigen DNA-Gerüsts. Im ungebundenen Zustand ermöglicht die Anordnung einen Energietransfer und damit die Emission des Akzeptors. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz wird das FRET-Paar räumlich getrennt, wodurch die Donoremission sichtbar wird. Auch hier führt die Hybridisierung zu einer Änderung der Emissionsfarbe (Abbildung 22).[23, 154]

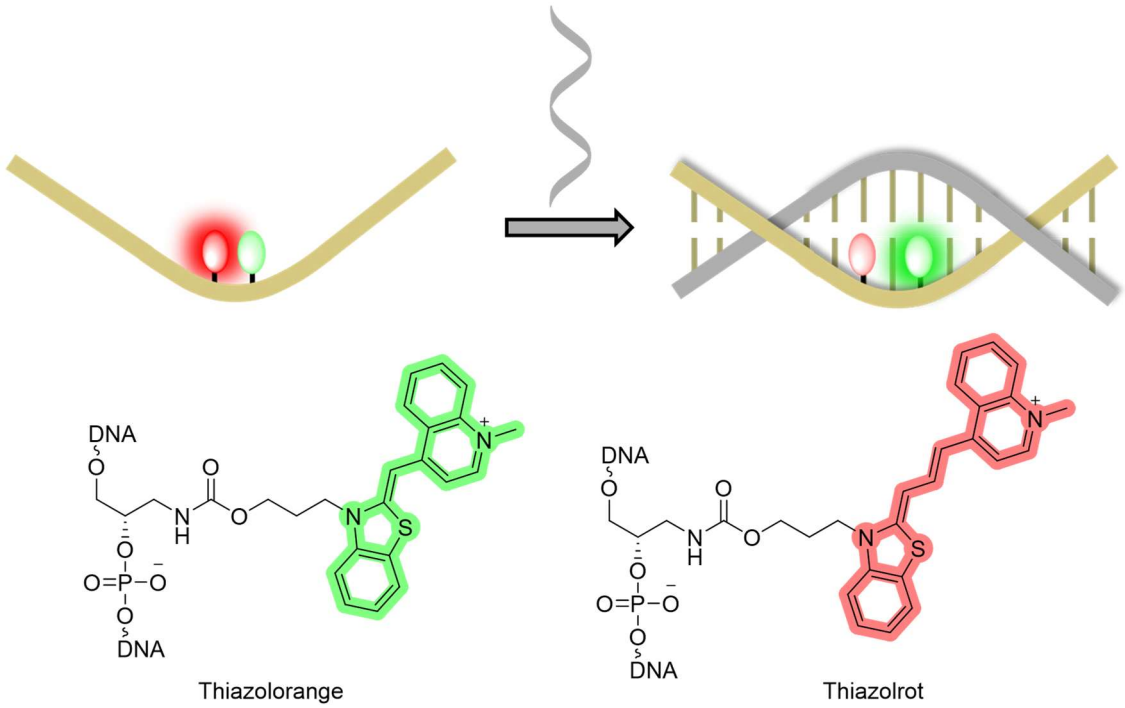


Abbildung 22: Oben) Wirkungsprinzip der DNA-Traffic-Lights. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore getrennt, wodurch der FRET aufgehoben wird; unten) Struktur der eingesetzten Fluorophore Thiazol Orange (Donor) und Thiazolrot (Akzeptor) nach WAGENKNECHT *et al.*.[23]

Neben einem Energietransfer zwischen unterschiedlichen Fluorophoren können auch elektronische Kopplungen zwischen identischen Fluorophoren zu einer Wellenlängenverschiebung in DNA-Sonden führen. HÄNER *et al*. entwickelten einen MB, der zwei Pyrene und zwei PBI trägt. Im geschlossenen Haarnadel-Zustand wird die Fluoreszenz aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren gelöscht. Eine Hybridisierung öffnet diese Struktur und die Pyren-Einheiten gelangen in räumliche Nähe, wodurch die charakteristische bathochrom verschobene Excimerfluoreszenz auftritt (Abbildung 23).[67]

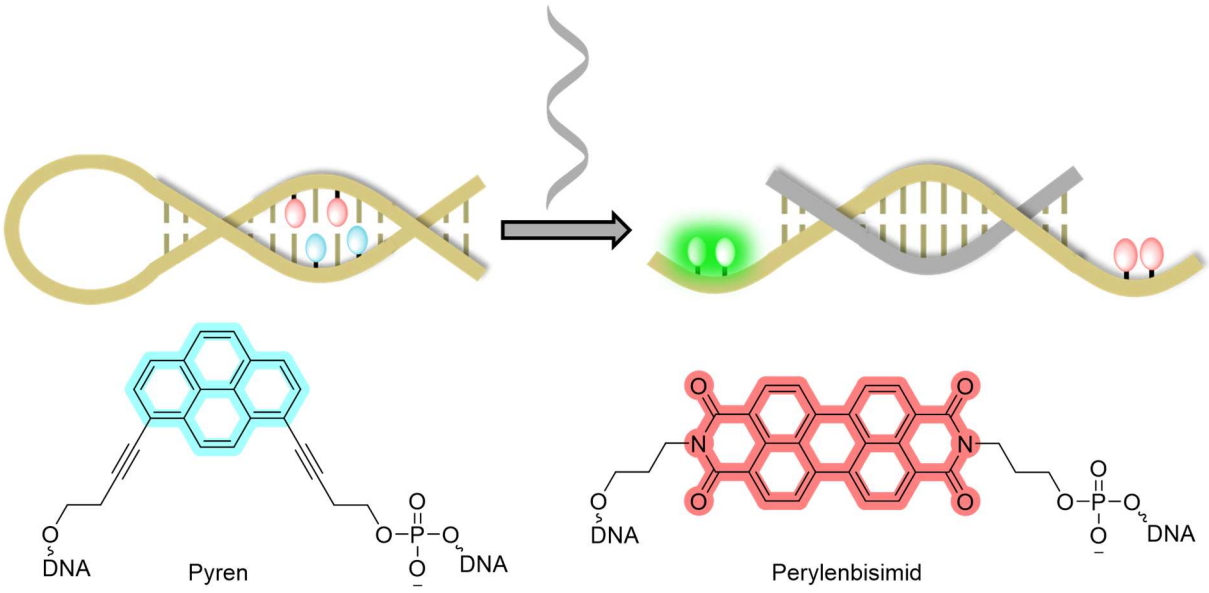


Abbildung 23: Oben) Wirkungsprinzip eines Molecular Beacons (MB) durch excitonische Wechselwirkungen. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophor getrennt, wodurch das Quenching unterbunden wird und die beiden Pyrene ein Excimer bilden; unten) Struktur des eingesetzten Pyren und Perylenbisimid nach HÄNER et al..[67]

Darüber hinaus kann auch TO eine Hybridisierung durch Verschiebung der Emissionswellenlänge nachweisen. Eine Aggregation der Farbstoffe führt zu einer charakteristischen Verschiebung in Absorption und Emission, wodurch Änderungen des Fluorophorabstands durch Hybridisierung einen *Read-Out* liefern (Abbildung 24).[19, 48]

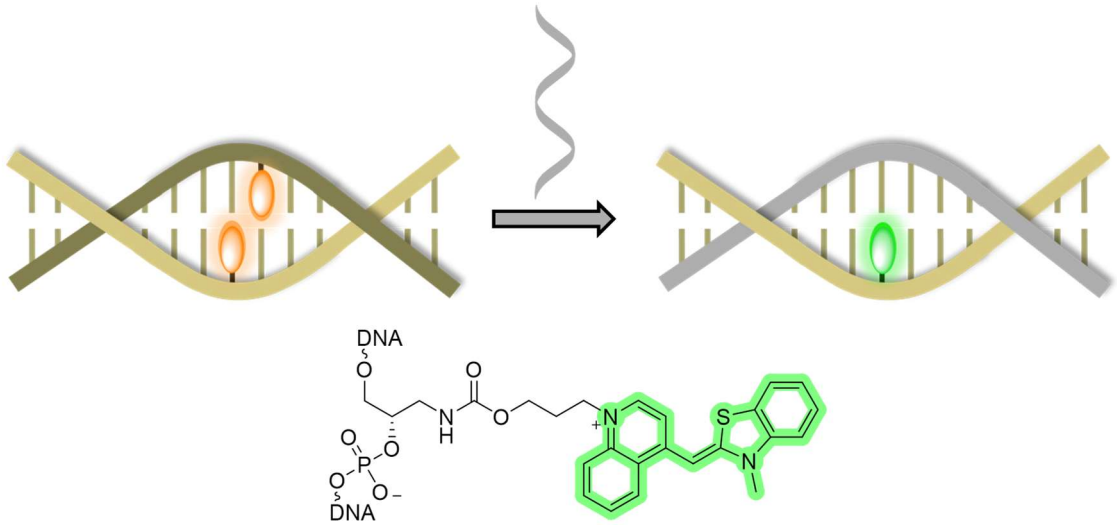


Abbildung 24: Oben) Wirkungsprinzip von Thiazol Orange Excitonen in DNA. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore getrennt, wodurch die Monomer-Emission auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophors Thiazol Orange nach WAGENKNECHT et al..[19, 122]

3. Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen in DNA

3.1 Design der Fluorophorbausteine

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei strukturell verwandte Cyanovinylen-Fluorophore entwickelt, um den Einfluss der molekularen Flexibilität auf das photophysikalische Verhalten in DNA-Gerüsten zu untersuchen (Abbildung 25).

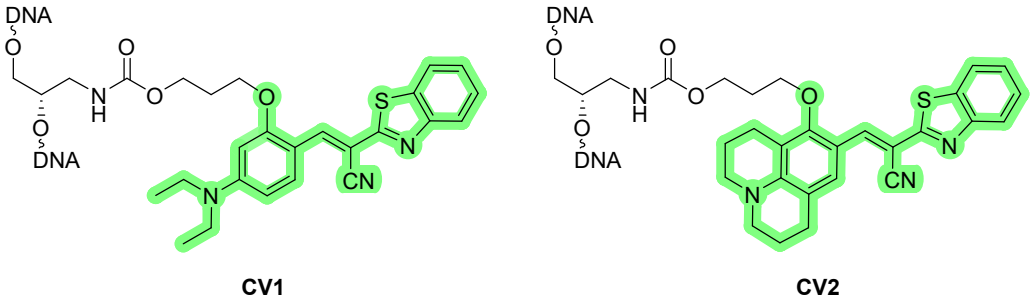


*Abbildung 25: Strukturen der integrierten modifizierten DNA-Bausteine **CV1** und **CV2**.*

Die beiden DNA-Bausteine **CV1** und **CV2** unterscheiden sich anhand der Substituenten des tertiären Amins. **CV1** besitzt zwei frei rotierbare Ethylreste, während **CV2** eine starre cyclisierte Aminstruktur aufweist. Dadurch sollte untersucht werden, wie sich die eingeschränkte Rotationsfreiheit auf die Fluoreszenzeigenschaften sowie auf mögliche Wechselwirkungen zwischen benachbarten Fluorophoren innerhalb einer DNA-Doppelhelix auswirkt (Abbildung 26).

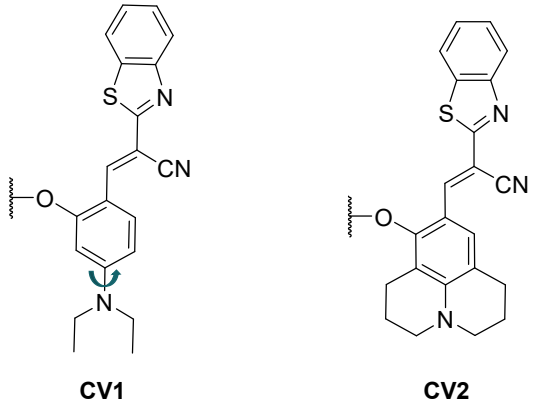
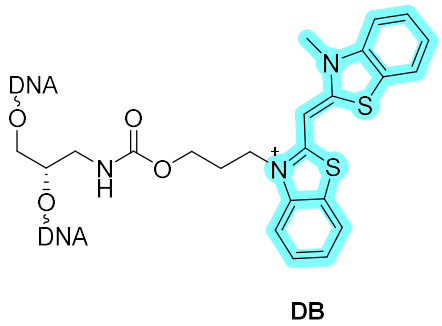


*Abbildung 26: Molekülstrukturen von **CV1** und **CV2** mit angedeuteter Rotierbarkeit der tertiären Amingruppe von **CV1** im Vergleich zur starren Cyclisierung von **CV2**.*

3. Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen in DNA

Neben den Cyanovinyl-Fluorophoren wurde zusätzlich ein Dibenzothiazol-(**DB**)-Baustein synthetisiert (Abbildung 27).



DB

*Abbildung 27: Struktur des integrierten modifizierten DNA-Bausteins **DB**.*

Das Dibenzothiazol-Derivate mit DNA interagieren und auch in der Lage sind Excimere auszubilden, konnte bereits gezeigt werden.[144-147] Sowohl die Wechselwirkung mit DNA als auch die Fähigkeit Excimere zu bilden, macht Dibenzothiazol-Derivate zu potenziellen Kandidaten, um durch verschiedene Anordnungen in DNA-Gerüsten einen fluoreszenten *Read-Out* zu liefern. Zur Untersuchung dieser Effekte wurden die Fluorophore über einen acyclischen (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker in verschiedene Oligonukleotide integriert.[102] Dieses Linkersystem ersetzt die natürlich vorkommende Riboseeinheit und ermöglicht eine Positionierung innerhalb des Basenstapels.[155].

3.2 Synthese der Fluorophore

Für die kovalente Integration der Fluorophore in Oligonukleotide wurde ein acyclisches Propandiol-Linkersystem **4** gewählt. Dieser flexible nicht-nukleosidische DNA-Baustein wurde bereits vielfach für den Einbau unterschiedlicher Farbstoffe in Oligonukleotide eingesetzt.[19, 102, 103, 155, 156] Dieser Linker stellt eine chemisch stabile Alternative zum natürlichen 2´-Desoxyribofuranosid dar und erlaubt die Integration des Fluorophors in das Rückgrat der DNA.[102] Die Synthese des Dimethoxytrityl-(DMT)-geschützten Linkers **4** erfolgte gemäß dem publizierten Verfahren. Zunächst wurde die Aminfunktion von (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol (**1**) unter Verwendung von Trifluoressigsäureethylester durch eine Trifluoracetyl-Schutzgruppe geschützt, wodurch die Verbindung **2** in einer Ausbeute von 89 % erhalten wurde. Anschließend wurde die primäre Hydroxygruppe von **2** mit der säurelabilen DMT-Gruppe unter der Zugabe von Dimethoxytritylchlorid (DMT-Cl) in einer Ausbeute von 92 % geschützt, wodurch Verbindung **3** entstand. Im letzten Schritt erfolgte die Abspaltung der Trifluoracetyl-Gruppe von **3** unter basischen Bedingungen mittels konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung, wobei der DMT-geschützte Linker **4** in einer Ausbeute von 92 % erhalten wurde (Abbildung 28).[102]

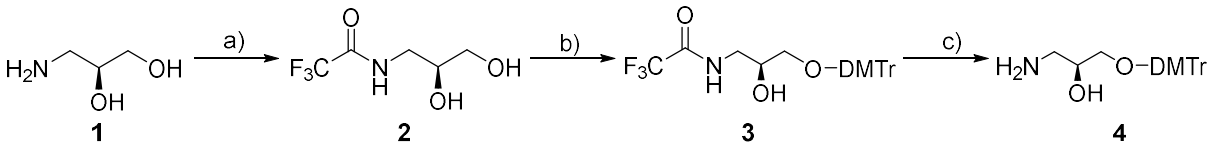


*Abbildung 28: Synthese des acyclischen Linker **4**; a) Trifluoressigsäurethylester, 16 h RT, 89 %; b) DMT-Cl, Et_3N, MeOH, THF, 16 h, RT, 92 %; c) konz. NH_4OH, MeOH, THF. 16 h, RT. 92 %.*[102]

Der so hergestellte Linker diente für die Synthese der farbstoffmodifizierten Phosphoramidite **9a**, **9b** und **17** und konnte für die automatisierte DNA-Synthese eingesetzt werden.

3.2.1 Synthese der cyanovinylenmodifizierten DNA-Bausteine 9a und 9b

Für die Integration der DNA-Bausteine **CV1** und **CV2** wurden die Phosphoramidite **9a** und **9b** synthetisiert. Die Synthese von **9a** und **9b** erfolgte ähnlich, wobei sich die Substituenten der Ausgangsverbindungen **5a** und **5b** am tertiären Amin unterscheiden. Im ersten Schritt wurde eine Linkerverlängerung durch Umsetzung von **5a**/**5b** mit 3-Brompropan-1-ol unter Verwendung von Natriumhydroxid in H_2O durchgeführt. Nach Deprotonierung der Hydroxyfunktion erfolgte eine nukleophile Substitution des primären Bromids, wodurch die Verbindungen **6a** und **6b** in einer

Ausbeute von a) 49 % und b) 35 % erhalten wurden. Durch diesen Schritt wurde eine primäre Hydroxygruppe eingeführt, die im späteren Verlauf der Syntheseroute als Anknüpfungsstelle für den DNA-Linker diente. Im anschließenden Schritt wurden die Verbindungen **6a/6b** mit Benzothiazolacetonitril unter Verwendung von Piperidin in Ethanol kondensiert. Diese Kondensationsreaktion führt zur Ausbildung der Cyanovinylen-Brücke und damit zum konjugierten π-System zwischen dem tertiären Amin und der Nitrilgruppe der entstandenen modifizierten Cyanovinylen-Farbstoffe **7a/7b**, welche mit einer Ausbeute von 65 % erhalten wurden (Abbildung 29).[251]

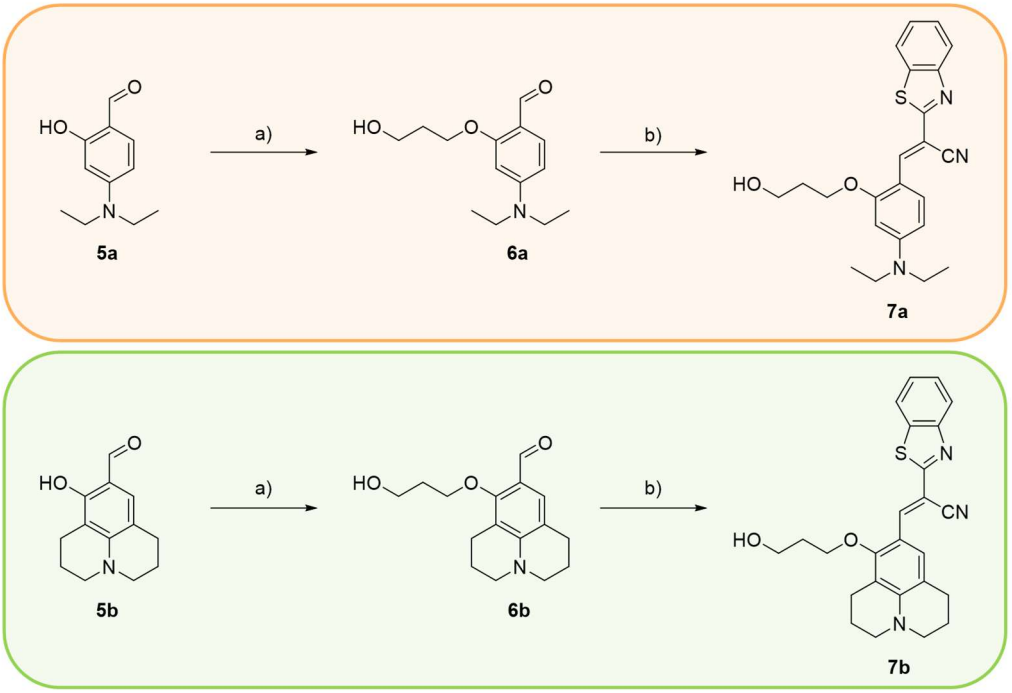


*Abbildung 29: Synthese von **7a/7b**; a) 3-Brom-1-propanol, NaOH, H_2O, 16 h, 100 °C, a: 49 %, b:35 %; b) Benzothiazolacetonitril, Piperidin, EtOH, 16 h, RT, 65 %.*[251]

Zur Anbindung der Farbstoffe an das DNA-Rückgrat wurde die Hydroxygruppe der Verbindungen **7a/7b** zunächst mit 1,1´-Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert. Diese Aktivierung ermöglicht die anschließende Umsetzung mit dem Linker **4**, wodurch unter Ausbildung einer Carbamatbindung die Verbindungen **8a/8b** in einer Ausbeute von 33 % erhalten wurden. Die Carbamatfunktion stellt eine stabile Verbindung zwischen Fluorophor und Linker dar und ist geeignet für die Oligonukleotidsynthese. Im letzten Syntheseschritt wurde die freie Hydroxyfunktion des Linkers mit 2-Cyanoethyl-*N*,*N*-diisopropylchlorphosphoramidit in die Phosphoramidite **9a** und **9b** in quantitativer Ausbeute umgesetzt (Abbildung 30).[251]

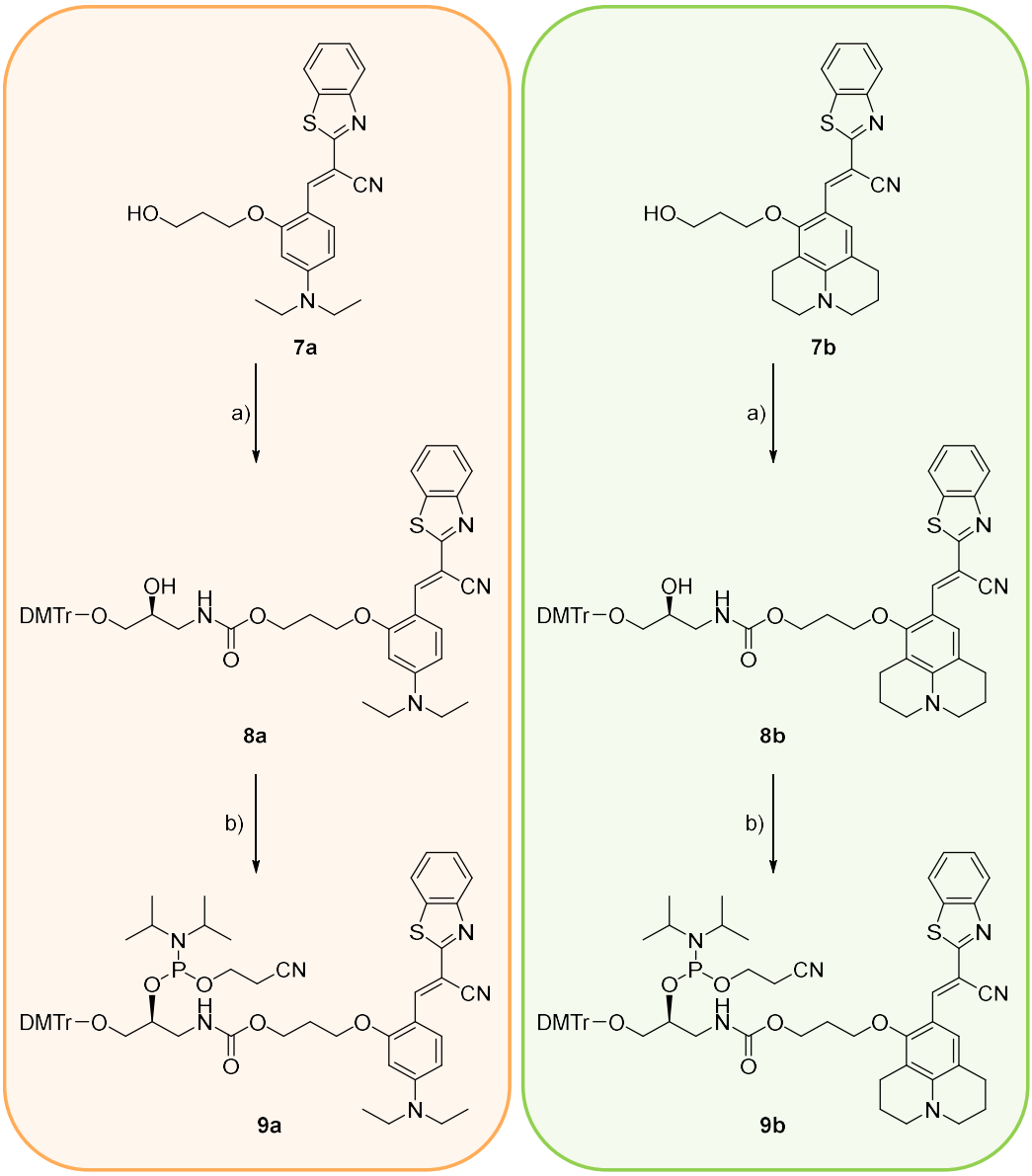


*Abbildung 30: Synthese der Phosphoramidite **9a/9b**; a) 1: 1,1´-Carbonyldiimidazol (CDI), DMF, 3 h, RT; 2: (S)-3-Amino-1,2-propandiol **4**, DMF, RT, 33 %; b) Diisopropylethylamin (DIPEA), 2- Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DCM, 3 h, RT, quant.*[251]

Die Phosphoramidite **9a** und **9b** stellen für die automatisierte DNA-Festphasensynthese die CV-Bausteine dar.

3.2.2 Synthese des dibenzothiazolmodifizierten DNA-Bausteins 17

Für die kovalente Integration von **DB** in Oligonukleotide wurde das Phosphoramidit **17** synthetisiert. Erneut wurde das acyclische Linkersystem **4** verwendet. Die Synthese für den Farbstoff begann ausgehend von 3-Chlorpropan-1-ol (**10**), das zunächst durch eine Finkelstein-Reaktion in das reaktivere 3-Iodpropan-1-ol (**11**) in einer Ausbeute von 60 % überführt

wurde.[247] Der Austausch von Chlorid gegen Iodid erhöht die Reaktivität. Im nächsten Schritt wurde **11** mit 2-Methylbenzothiazol umgesetzt, wodurch eine Linkerverlängerung durch eine N-Alkylierung eingeführt wurde und das quartäre Benzothiazolium-Derivat **12** mit einer Ausbeute von 44 % erhalten wurde.[19, 169] Der zweite Benzothiazolium-Baustein wurde über eine nachfolgende Syntheseroute erhalten. Dafür wurde 2-Methylthiobenzothiazol (**13**) mit Methyliodid am Stickstoff methyliert, wobei das N-methylierte Benzothiazolium-Salz **14** in einer Ausbeute von 77 % entstand.[248] Durch eine anschließende basenkatalysierte Kondensation unter der Verwendung von Triethylamin der beiden Verbindungen **12** und **14** in Ethanol und unter Abspaltung der Methylthio-Abgangsgruppe wurde der modifizierte **DB**-Farbstoff **15** in einer Ausbeute von 75 % erhalten (Abbildung 31).[252]

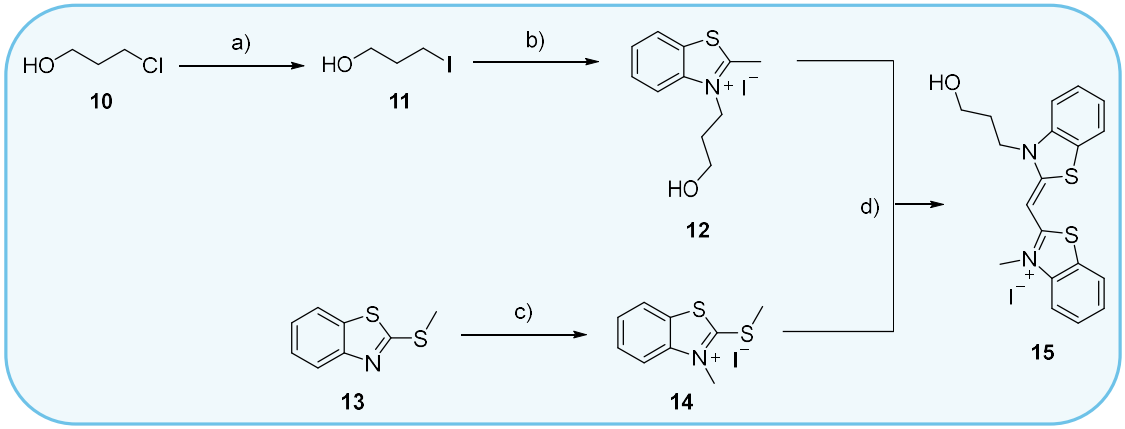


*Abbildung 31: Synthese von **15**; a) NaI, Aceton, 16 h, RT, 60 %; b) 2-Methylbenzothiazol, MeCN, 72 h, 82 °C, 44 %; c) MeI, DMF, 24 h, 60 °C, 77 %; d) Et_3N, EtOH, 1: 1 h, 80 °C, 2: 16 h, RT, 75 %.[252]*

Für die Verknüpfung des Farbstoffes an den DNA-Linker wurde die Hydroxyfunktion der Propanolseitenkette von **15** zunächst mit CDI aktiviert. Die so gebildete Zwischenstufe wurde anschließend mit dem DMT-geschützten Linker **4** umgesetzt. Dabei wurde eine Carbamatfunktion gebildet und die Verbindung **16** konnte in einer Ausbeute von 32 % isoliert werden.[252]

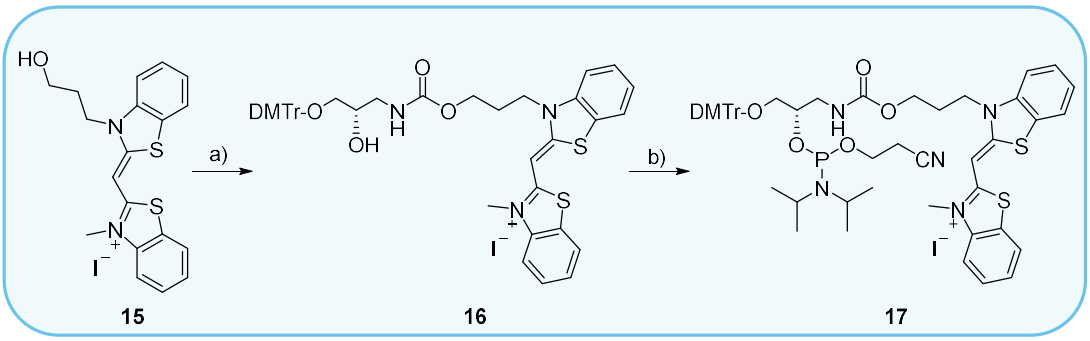


*Abbildung 32: Synthese des Phosphoramidits **17**; a) 1: 1,1´-Carbonyldiimidazol (CDI), DMF, 3 h, RT, 2: (S)-3-Amino-1,2-propandiol **4**, DMF, RT 32 %; b) Diisopropylethylamin (DIPEA), 2-Cyanoethyl-N,N-Diisopropylchlorophosphoramidit, DCM, 3 h, RT, quant.[252]*

Im letzten Syntheseschritt wurde die freie Hydroxyfunktion des Linkers mit 2-Cyanoethyl-*N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidit umgesetzt, wodurch das Phosphoramidit **17** durch quantitativen Umsatz erhalten wurde (Abbildung 32).[252] **17** wurde anschließend direkt für die automatisierte DNA-Festphasensynthese verwendet.

3.3 Untersuchung fluoreszenter Dimere in DNA

Zur Untersuchung möglicher elektronischer Wechselwirkungen wurden die Farbstoffe **CV1**, **CV2** und **DB** in Oligonukleotide integriert. Dafür wurden die Phosphoramidite **9a** (**CV1**), **9b** (**CV2**) und **17** (**DB**) in die Sequenzen **DNA1ss** und **DNA1cs** eingebaut. Die automatisierte DNA-Synthese der **CV**-modifizierten Oligonukleotide verlief unter der Anwendung der Ultramild-Methode, während die Integration von **DB** unter den Standard-Bedingungen erfolgte.[157-159] Durch Hybridisierung entstanden drei Oligonukleotide, die unterschiedliche räumliche Anordnungen der Fluorophore aufweisen und dadurch unterschiedliche Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen ermöglichen. **DNA1ss** (*single strand*) soll die Eigenschaften der Fluorophore im Einzelstrang zeigen. Durch Hybridisierung mit ausschließlich natürlichen Nukleobasen entsteht **DNA1**. Dieser DNA-Duplex beinhaltet einen isolierten Fluorophor in der Doppelhelix und soll mögliche Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften einer Hybridisierung zeigen. Durch die Hybridisierung von **DNA1ss** mit **DNA1cs** wird der Duplex **DNA2** erhalten. Da beide Einzelstränge einen modifizierten Fluorophor enthalten, enthält dieser Duplex zwei Fluorophore. Die Sequenzen sind so gewählt, dass sich die beiden Fluorophore in antiparalleler Ausrichtung gegenüberstehen und durch die räumliche Anordnung der Doppelhelix in räumliche Nähe treten (Abbildung 33).

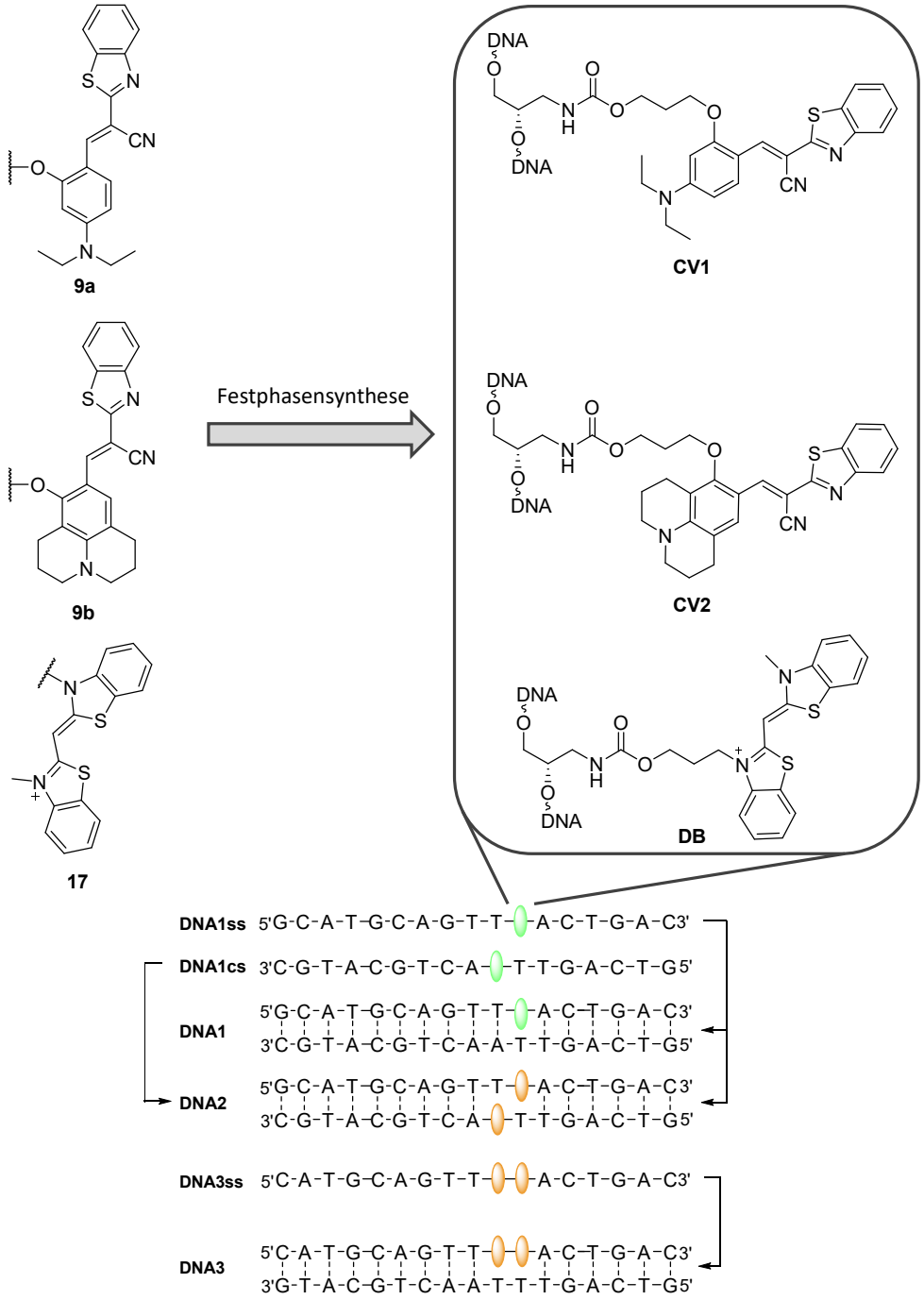


*Abbildung 33: Strukturen der Phosphoramidite **9a**, **9b** und **17**, sowie die dazugehörigen in DNA integrierten Fluorophore **CV1**, **CV2** und **DB**. Zudem die synthetisierten DNA-Sequenzen **DNA1ss**, **DNA1cs** und **DNA3ss** sowie die dazugehörigen Duplexe **DNA1**, **DNA2** und **DNA3**. **DNA1** und **DNA3** enthalten als Gegenstrang ausschließlich natürliche Nukleobasen.*

Zusätzlich zur gegenüberliegenden Anordnung der Fluorophore in DNA-Duplexen wurde ebenfalls der Einfluss einer Positionierung direkt nebeneinander innerhalb einer Sequenz untersucht. Hierzu wurde die Sequenz **DNA3ss** synthetisiert, die zwei Farbstoffe in direkter Nachbarschaft aufweist. Diese Anordnung ermöglicht eine Untersuchung von Farbstoff-Interaktionen bei paralleler Anordnung und geringem Abstand. Neben der Analyse des Einzelstrangs **DNA3ss** wurde mit ausschließlich natürlichen Nukleobasen zu **DNA3** hybridisiert,

wodurch der Einfluss einer Duplexbildung auf die photophysikalischen Eigenschaften untersucht wurde (Abbildung 33).

3.3.1 CV1-modifizierte Interstrang-Dimere

Integriertes **CV1** in den Sequenzen **DNA1ss** und **DNA1cs** werden als **CV1-DNA1ss** bzw. **CV1-DNA1cs** bezeichnet. Um mögliche Grundzustandswechselwirkungen zu untersuchen, wurde die UV/Vis-Absorption gemessen. Für **CV1** weisen alle Oligonukleotide eine Absorption bei λ=465 nm und λ=500 nm auf, die sich jedoch in der Feinstruktur unterscheiden. **CV1-DNA1ss** besitzt das Absorptionsmaximum bei der hypsochromen Bande bei λ=465 nm mit einer Schulter bei λ=500 nm. Solche hypsochromen Verschiebungen sind charakteristisch für die Bildung von H-Aggregaten.[19, 123] Die Bildung der Aggregate kann durch die hohe Flexibilität der einzelsträngigen DNA begünstigt werden, wodurch **CV1**-Einheiten aus unterschiedlichen Strängen in räumliche Nähe gelangen können.[160-162] Der einfach modifizierte Duplex **CV1-DNA1** zeigt eine veränderte Feinstruktur. Zwar sind weiterhin beide Banden bei λ=465 nm und λ=500 nm vorhanden, jedoch herrscht eine Inversion der Intensitäten, wodurch die bathochrome Bande das Maximum darstellt. Der Fluorophor ist isoliert in der Doppelhelix und kann daher keine Annäherung zu anderen Fluorophoren stattfinden.[163, 164] Im Gegensatz dazu werden die beiden **CV1**-Farbstoffe in **CV1-DNA2** in räumliche Nähe gezwungen, was sich in der Absorption widerspiegelt. Die hypsochrome Bande bei λ=465 nm ist das Maximum mit einer schwach ausgeprägten Schulter bei λ=500 nm.[251] Die anitparallele Anordnung der Farbstoffe innerhalb des Duplexes begünstigt eine elektronische Kopplung, die eine hypsochrome Verschiebung der Absorption zur Folge hat (Abbildung 34).[19, 21]

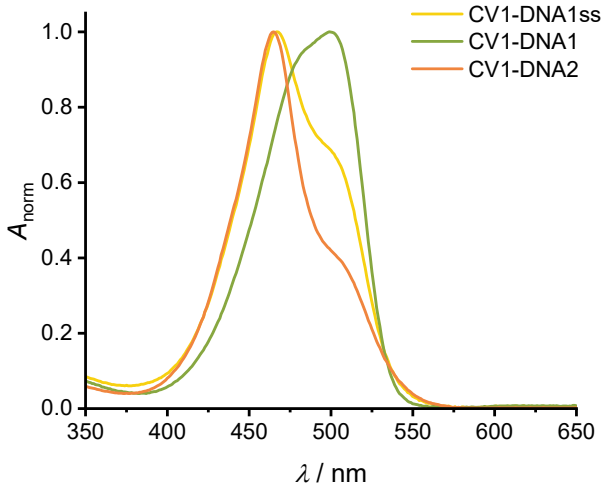


*Abbildung 34: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA2**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Zur weiteren Untersuchung der optischen Eigenschaften wurden die Fluoreszenzen von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA2** bei einer Anregungswellenlänge von λ_{exc}=465 nm gemessen. Der Einzelstrang **CV1-DNA1ss** zeigt das Emissionsmaximum bei λ=532 nm mit einer relativ gering ausgeprägten Schulter bei λ=570 nm. Das Emissionsmaximum von λ=532 nm kann der Monomeremission zugeordnet werden und die Schulter bei λ=570 nm der Dimeremission.[19, 132] Bereits die Absorption zeigte eine schwache Aggregatbildung im Einzelstrang, was die schwach ausgeprägte bathochrom verschobene Emission ebenfalls bestätigt.[165] Der isolierende Duplex **CV1-DNA1** besitzt ebenfalls sein Emissionsmaximum bei λ=532 nm, wobei die Fluoreszenzintensität stark ansteigt.[51] Der Duplex **CV1-DNA2** zeigt im Vergleich zu den monomodifizierten Oligonukleotiden eine starke Veränderung der Emission. Die Fluoreszenzintensität nimmt ab und das Emissionsspektrum verbreitert sich deutlich. Zudem ist das Emissionsmaximum bathochrom verschoben bei λ=582 nm mit einer Schulter bei λ=532 nm. Partiell ist noch die Monomeremission vorhanden, jedoch ist die neu auftretende Excimeremission deutlich stärker ausgeprägt.[252] Sowohl die breite Emission als auch die bathochrome Wellenlängenverschiebung zeigen die Ausbildung eines fluoreszentes H-Aggregat in **CV1-DNA2** (Abbildung 35).[19, 21, 166]

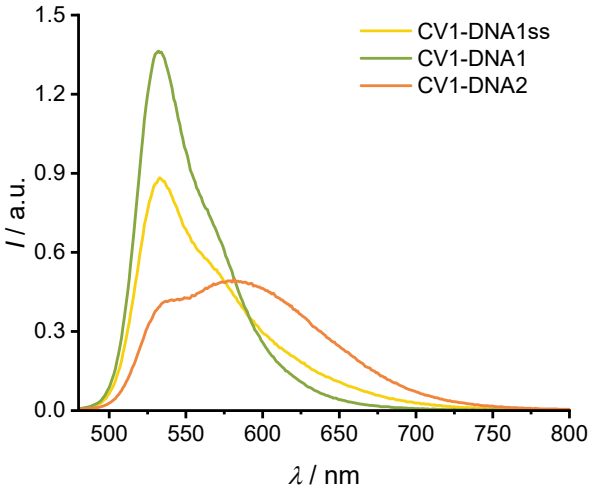


*Abbildung 35: Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA2**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=465 nm, 20 °C.*

Sowohl die hypsochrom verschobene Absorption als auch die bathochrom verschobene Emission weisen auf die Bildung eines H-Aggregats.[60] **CV1-DNA2** zeigt eine ausgeprägte breite und bathochrom verschobene Emission und keine vollständige Löschung der Fluoreszenz. Vermutlich liegen die beiden **CV1**-Fluorophore leicht verdreht und nicht ideal *face-to-face* zueinander vor. Der Rotationswinkel macht den verbotenen Übergang in das niedrigere Exciton-Niveau möglich.[58, 60, 61, 166] Neben der bathochromen Wellenlängenverschiebung der Fluoreszenz zeigt sich ebenfalls eine starke Verbreiterung des Emissionsspektrums, was auf einen excimerähnlichen Zustand deutet. Die hypsochrom verschobene Absorption zeigt eine Grundzustandskopplung, während die bathochrom verschobene Fluoreszenz auf einen delokalisierten Zustand deutet.[56, 167] Da auch in **CV1-DNA2** noch ein Anteil an Monomeremission auftritt, koexistieren lokalisierte und delokalisierte angeregte Zustände (Abbildung 36).

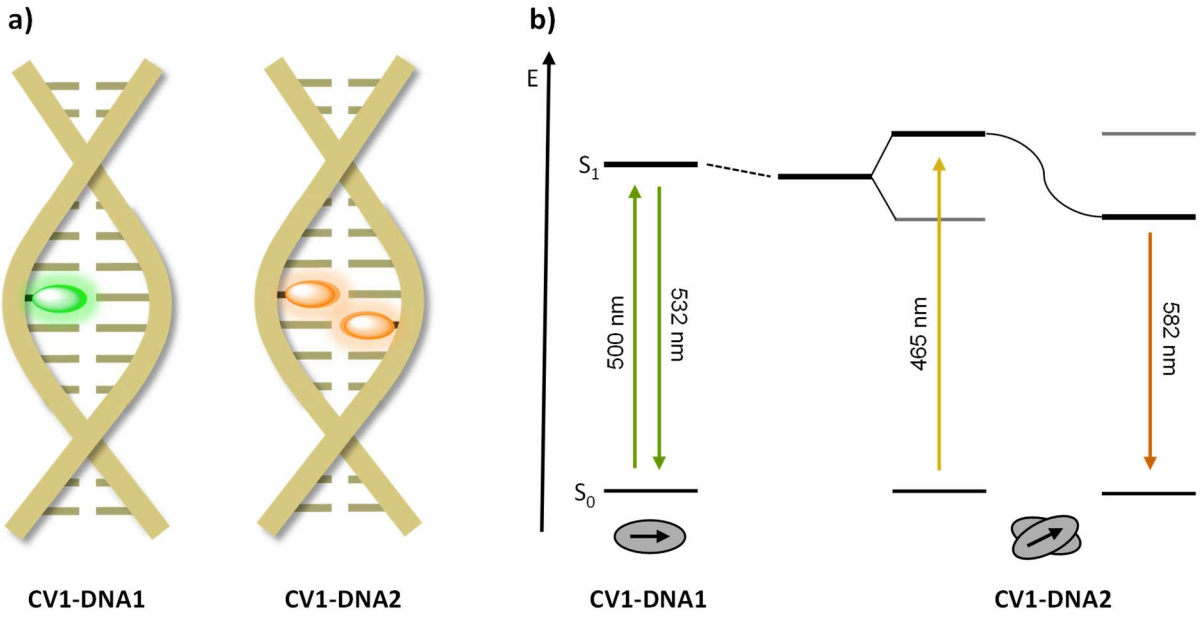


*Abbildung 36: a) Schematische Darstellung eines Einfacheinbaus von **CV1** in **DNA1** und eines Zweifacheinbaus in **DNA2**; b) Darstellung der Bildung eines fluoreszenten H-Aggregates von **CV1** durch einen Rotationswinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten.*

Um die beobachteten Fluoreszenzänderungen weiter zu untersuchen, wurden zudem die Quantenausbeuten sowie die Fluoreszenzlebenszeiten bestimmt. Der Einzelstrang **CV1-DNA1ss** besitzt eine Quantenausbeute von Φ_F=6,6 % und der Doppelstrang **CV1-DNA1** von Φ_F=7,1 %. Beide Oligonukleotide beinhalten ein **CV1**-Fluorophor, jedoch steigt durch Hybridisierung die Quantenausbeute. Dieses *Light-Up*-Verhalten konnte bereits in der Literatur für mehrere Farbstoffe beobachtet werden, wobei der Anstieg der Fluoreszenz für literaturbekannte Farbstoffe, wie im Beispiel von TO, deutlich höher ausfallen können.[51, 142, 168] **CV1-DNA2** besitzt eine erniedrigte Quantenausbeute von Φ_F=4,5 %. Die Interaktion von **CV1**-Fluorophoren in antiparalleler Ausrichtung bei gegenüberliegender Positionierung sorgt somit für eine verminderte Fluoreszenz. Dies ist ein charakteristisches Verhalten für fluoreszente H-Aggregate und wurde für andere Fluorophore in DNA bereits beobachtet.[58, 61, 169] Zudem weist **CV1-DNA2** eine weitere verlängerte Komponente der Fluoreszenzlebenszeit auf. Die erste Lebenszeit beträgt τ_1=2,42 ns und die zweite τ_2=6,35 ns. Eine solche Komponente mit erhöhter Fluoreszenzlebenszeit wurde bei fluoreszierenden H-Aggregaten in DNA bereits nachgewiesen(Tabelle 1).[170]

*Tabelle 1: UV/Vis Absorption-Maximum λ_{abs}, Fluoreszenz-Maximum λ_{em}, Verhältnis von Monomer zur Dimer Absorption $\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$ und Fluoreszenz $\lambda_{emM.}/\lambda_{emD.}$, Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F, Fluoreszenzlebenszeiten τ_n und Schmelztemperaturen T_m von **CV1-DNA1ss**, **CV-DNA1** und **CV1-DNA2**.*

	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	$\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$	$\lambda_{emM.}/\lambda_{emD.}$	Φ_F / %	τ_1 / ns (± 0,1)	τ_2 / ns (± 0,1)	T_m / °C
CV1-DNA1ss	465/500	532/570	0,69	1,66	6,6	2,41	-	-
CV1-DNA1	500	532	1,38	2,01	7,1	2,21	-	60,0
CV1-DNA2	465	582	0,42	0,78	4,5	2,26	6,35	65,5

Die Wellenlängenverschiebung beeinflusst die Emissionsfarbe der Oligonukleotide. **CV1-DNA1ss** zeigt eine grün-gelbliche Emission, was auf die dominante Bande bei λ=532 nm mit einer langwelligen Schulter zurückzuführen ist. Der isolierende Duplex **CV1-DNA1** fluoresziert hingegen grün, da die Emission nahezu ausschließlich vom Maximum bei λ=532 nm kommt. **CV1-DNA2** zeigt eine orangefarbene Emissionsfarbe, was auf die Verschiebung des Maximums um 50 nm zu λ=582 nm zurückzuführen ist (Abbildung 37).

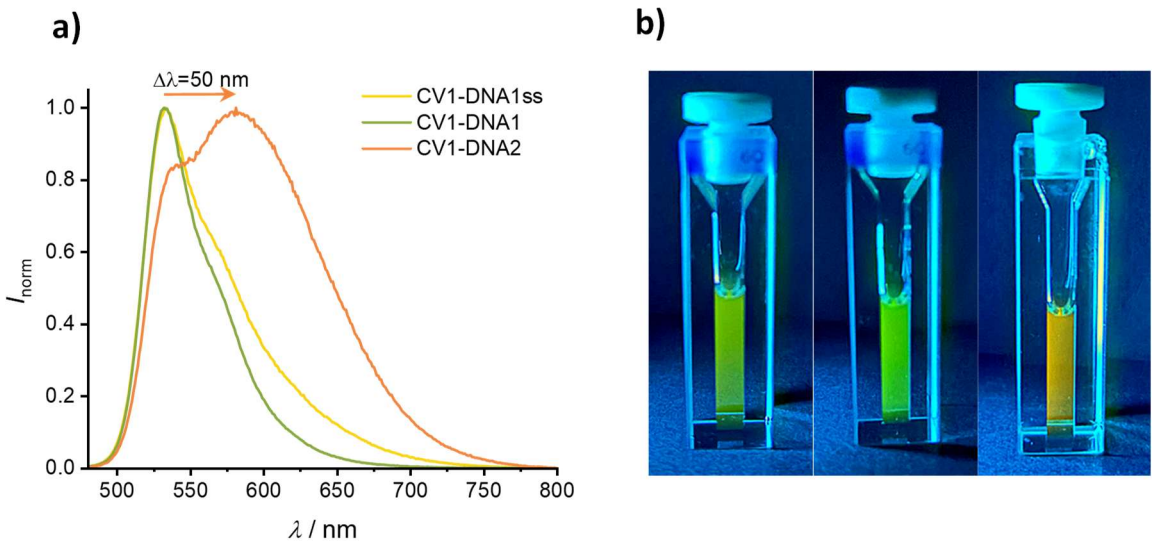


*Abbildung 37: a) normierte Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA2**; b) Küvetten mit **CV1-DNA1ss** (links mit grün-gelblicher Emissionsfarbe), **CV1-DNA1** (mittig mit grüner Emissionsfarbe), und **CV1-DNA2** (rechts mit orangener Emissionsfarbe) angeregt mit einer handgehaltenen UV-Lampe mit einer Wellenlänge von λ=254 nm; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Die Positionierung von **CV1** in DNA hat einen entscheidenden Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften. Es konnten sowohl isolierte Monomerzustände als auch excimerartige Zustände in DNA erzeugt werden.

3.3.2 CV1-modifizierte Intrastrang-Dimere

Während in den zuvor untersuchten Systemen die Farbstoffe auf komplementären DNA-Strängen positioniert waren, wurde nun eine direkte Nachbarschaft der Fluorophore innerhalb desselben Strangs untersucht. Sowohl der Einzelstrang **CV1-DNA3ss** als auch der dazugehörige Duplex **CV1-DNA3** wurden optisch untersucht. In beiden Oligonukleotiden befindet sich das Absorptionsmaximum bei λ=472 nm mit einer Schulter bei λ=500 nm und die Feinstruktur ist nahezu identisch. Das Verhältnis vom Absorptionsmaximum zur Schulter zeigt lediglich einen geringen Unterschied, weshalb eine Hybridisierung auf die Absorption der **CV1**-Fluorophore nur einen geringen Einfluss hat. Im Einzelstrang als auch im Duplex ist eine hypsochrome Verschiebung der Absorption zu erkennen, was auf eine elektronische Kopplung der Farbstoffe hindeutet (Abbildung 38). Im Vergleich zum doppelmodifizierten Duplex **CV1-DNA2** ist der Intensitätsunterschied zwischen den beiden Banden jedoch weniger stark ausgeprägt (Tabelle 2).

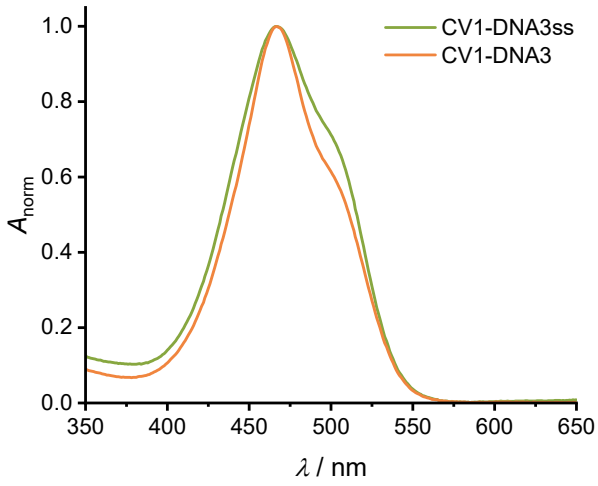


*Abbildung 38: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA3ss** und **CV1-DNA3**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Der flexible Einzelstrang **CV1-DNA3ss** besitzt das Emissionsmaximum bei λ=535 nm mit einer schwach ausgeprägten bathochrom verschobenen Schulter bei λ=575 nm. Das Auftreten der langwelligeren Bande und das breite Emissionsspektrum weisen auf Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen hin. Eine Hybridisierung zeigt einen geringen Einfluss auf die Feinstruktur der Fluoreszenz. Während die Intensität des Emissionsmaximum bei λ=535 nm in beiden Oligonukleotiden nahezu identisch ist, nimmt die Intensität der bathochrom verschobenen Schulter bei λ=575 nm im Duplex zu, wodurch das Emissionsspektrum flacher abfällt. Sowohl

CV1-DNA3ss als auch **CV1-DNA3** zeigen Interaktionen der integrierten Farbstoffe (Abbildung 39).

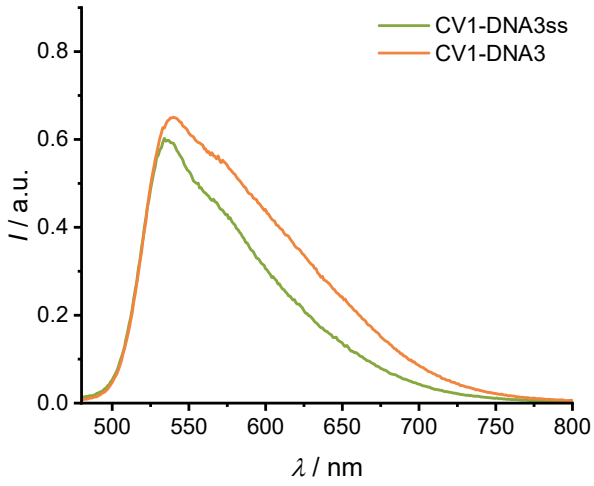


*Abbildung 39: Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA3ss** und **CV1-DNA3**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=465 nm, 20 °C.*

Die beobachteten Unterschiede sprechen für eine eingeschränkte Kopplung der Übergangsdipolmomente. In direkter Nachbarschaft im selben Strang beträgt der Abstand 3,4 Å, jedoch befinden sich die Fluorophore nicht in einer optimalen *face-to-face*-Orientierung. Es treten excitonische Kopplungen im Grundzustand auf, jedoch ist die Ausprägung geringer als in **CV1-DNA2**, wodurch das Verhältnis vom hypsochrom verschobenen Maximum im Vergleich zur bathochromen Schulter geringer ausfällt (Tabelle 2). Auch die Fluoreszenz zeigt eine leichte bathochrome Verschiebung, jedoch weniger stark ausgeprägt als in **CV1-DNA2** (Abbildung 40).[58, 60, 61]

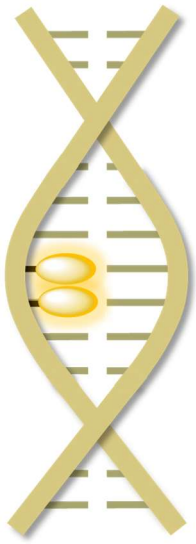


*Abbildung 40: Schematische Darstellung eines Intrastrang-Dimers von **CV1** in **DNA3**.*

Der Einzelstrang **CV1-DNA3ss** besitzt eine Quantenausbeute von Φ_F=2,6 % und der dazugehörige Duplex **CV1-DNA3** Φ_F=2,9 %. Beide Oligonukleotide mit zwei **CV1**-Fluorophoren direkt nebeneinander in derselben Sequenz weisen eine niedrigere Quantenausbeute im Vergleich zu den Interstrang-Dimeren auf. Die Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkung führt zu einem *Quenching*.[58, 60, 61] Die direkte Nachbarschaft zweier **CV1**-Fluorophore innerhalb eines DNA-Strangs zeigt eine elektronische Kopplung und die Ausbildung eines excimerartigen Zustandes.

3.3.3 CV1-basierte DNA-Sonde zur Detektion von m^{6}A

Die Basenabfolge des Genoms beinhaltet den genetischen Code eines Organismus, jedoch werden nicht alle Gene gleichermaßen exprimiert. Die nicht sequenzabhängige Regulation der Translation wird als Epigenetik bezeichnet und kann durch chemische Modifikationen der DNA erfolgen.[26, 171] Eine dieser Modifikationen des Genoms ist eine Methylierung der Basen C oder A, wodurch neben der Genexpression, die embryonale Entwicklung, die DNA-Reparatur und die Erkennung von Fremd-DNA beeinflusst werden. Zudem werden solche Methylierungen auf Tumorsuppresorgenen mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht.[24, 25, 172-175] Die Methylierung von A geschieht oftmals an der exocyclischen Amingruppe, wodurch die modifizierte Nukleobase N^6-Methyladenosin (m^{6}A) entsteht. Dies beeinflusst die WATSON-CRICK-Basenpaarung in der Doppelhelix, da die Amingruppe eine Wasserstoffbrückenbildung mit einem gegenüberliegenden T eingeht.[176, 177] Nicht modifiziertes A bindet mit T, während die Bindung von m^{6}A aufgrund zweier Konformationsisomere weniger stark ausgeprägt ist. Das anti-Isomer

kann wie A mit T binden, während das syn-Isomer aufgrund der Sterik dazu nicht in der Lage ist (Abbildung 41).[178, 179]

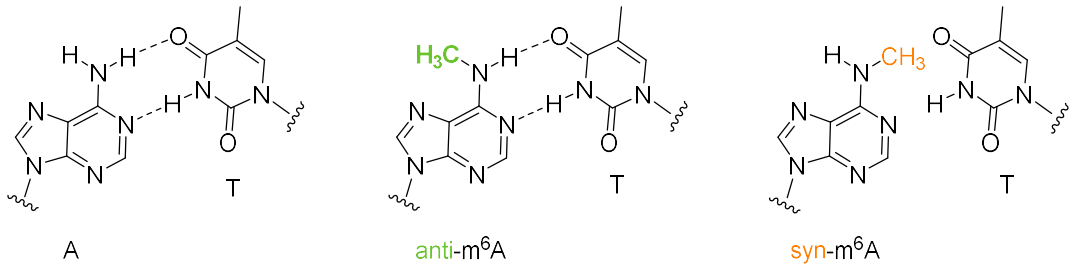


Abbildung 41: Basenpaare aus Adenin (A), Thymin (T) und syn- und anti-m⁶A. Zudem die schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleobasen.

Das geringe Vorkommen von m⁶A sowie die geringfügige strukturelle Änderung der Doppelhelix stellen eine Herausforderung in der Detektion dar. Fluoreszenzbasierte DNA-Sonden können eine Modifikation einer einzelnen Base aufgrund der strukturellen Änderungen in ein optisches Signal umwandeln.[179-181] In dieser Arbeit sollte die wellenlängenverschiebende Eigenschaft von zwei **CV1**-Fluorophoren in DNA genutzt werden, um eine funktionale DNA-Sonde für den Nachweis von m⁶A zu entwickeln. Hierzu wurde die Sequenz **CV1-DNA4ss** synthetisiert, welche zwei **CV1**-Farbstoffe getrennt durch ein T enthält. Das Design der Sonde basiert auf der unterschiedlichen räumlichen Anordnung der Fluorophore, je nachdem, ob das trennende T mit einem A im Gegenstrang eine stabile Basenpaarung eingeht, wohingegen die Bindung zu m⁶A abgeschwächt ist. Durch die Basenpaarung mit A sollen die beiden **CV1**-Farbstoffe räumlich voneinander getrennt vorliegen, wodurch keine Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung auftreten kann und die Monomeremission auftritt. Ist hingegen m⁶A im Gegenstrang und die Duplexbildung wird aufgrund der Methylgruppe lokal geschwächt, können die beiden Fluorophore in räumliche Nähe treten, wodurch eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz auftreten kann. Zur Untersuchung dieses Konzepts wurde der Einzelstrang **CV1-DNA4ss**, sowie die Duplexe **CV1-DNA4A**, **CV1-DNA4T** und **CV1-DNA4M** untersucht. Die untersuchten Duplexe unterscheiden sich dabei in der zum trennenden T gegenüberliegenden Base. **CV1-DNA4A** besitzt A, **CV1-DNA4T** besitzt T und **CV1-DNA4M** besitzt m⁶A als Gegenbase. **CV1-DNA4T** dient dabei als Referenz für eine vollständige Basenfehlpaarung (Abbildung 42).

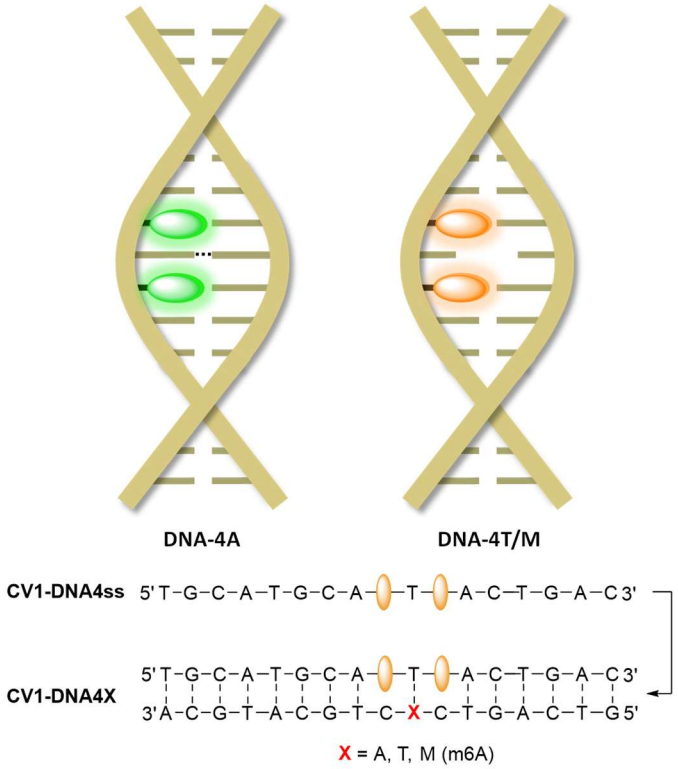


*Abbildung 42: Schematische Darstellung von **CV1** in **DNA4A** und **DNAT/M**, sowie die Sequenz der DNA-Sonde **CV1-DNA4ss** und der dazugehörigen Duplexen **CV1-DNA4X**, wobei sich die Gegenstränge in einer Base X unterscheiden. X ist A, T oder M (m^6A).*

In der Absorption weisen alle Oligonukleotide das Maximum bei λ=470 nm mit einer Schulter bei λ=500 nm auf. Die hypsochrome Verschiebung des Maximums in allen Proben deutet auf Wechselwirkungen zwischen den beiden Farbstoffen hin, obwohl diese in der Sequenz durch ein T getrennt sind. Die Variation der Gegenbase zeigt lediglich für A einen geringen Einfluss auf das Absorptionsverhalten (Tabelle 2). Bei A ist das Verhältnis von der Schulter zum Absorptionsmaximum stärker ausgeprägt als bei den anderen Proben, jedoch ist dies kein signifikanter Unterschied, was gegen die Hypothese der separierenden Basenpaarung von **CV1-DNA4A** spricht (Abbildung 43).[251]

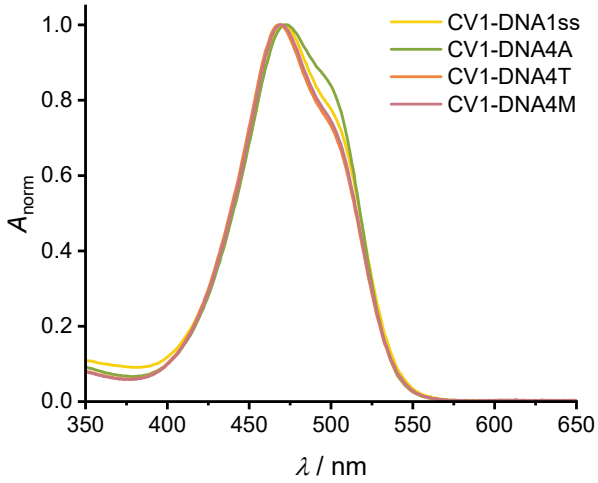


*Abbildung 43: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA4ss**, **CV1-DNA4A**, **CV1-DNA4M**, **CV1-DNA4T**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Alle Proben zeigen bei einer Anregungswellenlänge von λ_{exc}=465 nm das Emissionsmaximum bei λ=535 nm mit einer relativ schwach ausgeprägten Schulter bei λ=575 nm. Das Maximum entspricht damit der Monomeremission, während die bathochrom verschobene Schulter für eine Excimeremission steht. Eine klare Unterscheidung zwischen A, T und M konnte anhand einer Wellenlängenverschiebung dabei nicht beobachtet werden. Stattdessen zeigen sich Unterschiede in der Fluoreszenzintensität. Alle Duplexe weisen im Vergleich zum Einzelstrang **CV1-DNA1ss** eine erhöhte Fluoreszenzintensität auf, wobei der *Match*-Duplex **CV1-DNA4A** den höchsten Anstieg zeigt. Die Duplexe **CV1-DNA4T** und **CV1-DNA4M** besitzen hingegen einen geringeren und nahezu identischen Anstieg der Intensität. Dieses Verhalten deutet daraufhin, dass m^6A im Duplex einen ähnlichen Einfluss wie ein T-*Mismatch* besitzt (Abbildung 44 a)). Ein weiterer Unterschied zwischen den Duplexen zeigt sich im Verhältnis der Emissionsbanden bei λ=536 nm zur Schulter bei λ=575 nm. Die Hybridisierung mit A als Gegenbase reduziert den Excimeranteil. Ist T oder m^6A als Gegenbase vorhanden, steigt der Excimeranteil an. m^6A zeigt ähnliche optische Eigenschaften wie ein *Mismatch* und nicht wie ein *Match* (Abbildung 44 b)).[251]

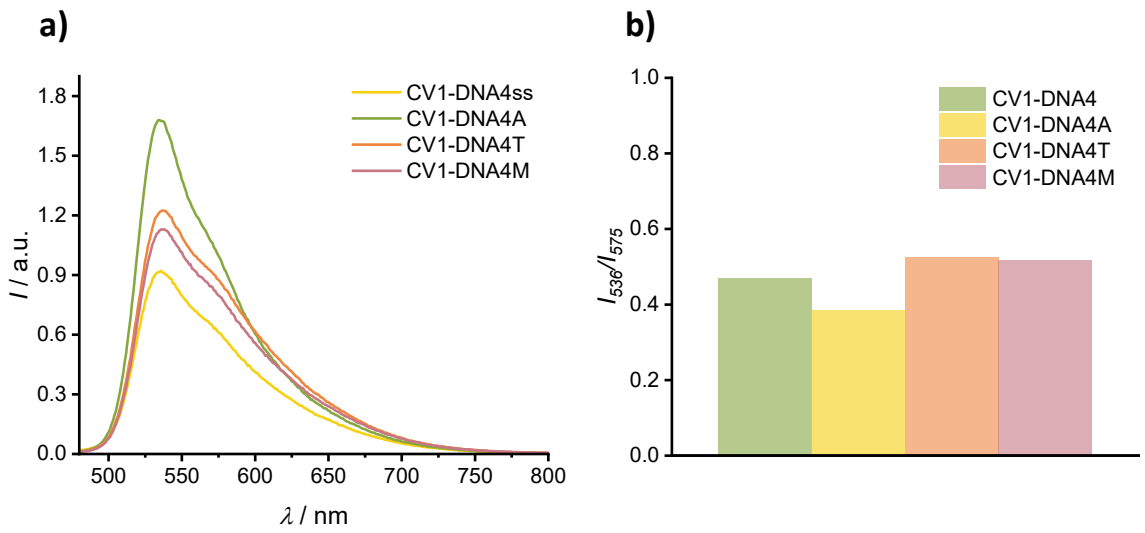


*Abbildung 44: a) Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA4ss**, **CV1-DNA4A**, **CV1-DNA4T** und **CV1-DNA4M**; b) Darstellung des Verhältnisses des Fluoreszenzmaximum bei λ=536 nm zur bathochrom verschobenen Schulter bei λ=575 nm; 2,5 µM in ddH₂O, 10 mM NaPᵢ, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=465 nm.*

Obwohl Unterschiede in der Fluoreszenzintensität und im Verhältnis der Emissionsbanden beobachtet werden können, sind diese Effekte nicht ausreichend, um eine zuverlässige Detektion von m⁶A zu ermöglichen. Die schwach ausgeprägten Unterschiede zwischen den untersuchten Duplexen könnten darauf zurückzuführen sein, dass die strukturellen Veränderungen, die durch die Methylierung von Adenin verursacht werden, relativ gering sind. Sowohl m⁶A als auch ein T-*Mismatch* scheinen die Basenpaarung zu destabilisieren, jedoch ist dieser Effekt nicht stark genug ausgeprägt, um die Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung ausreichend stark zu ermöglichen. Die Monomeremission ist stets das Maximum der Emission. Zudem zeigt bereits der Einzelstrang eine partielle Wechselwirkung der beiden Farbstoffe, wodurch der *Read-Out* eingeschränkt ist. Die unterschiedlichen Ausprägungen der Emission spiegeln sich in den Quantenausbeuten wider. Das einzelsträngige Oligonukleotid **CV1-DNA4ss** weist eine Quantenausbeute von Φ_F =2,9 % auf, während sowohl der *Mismatch* Duplex **CV1-DNA4T** als auch der m⁶A-haltige Duplex **CV1-DNA4M** identische Werte von Φ_F =3,0 % besitzen. Die Hybridisierung mit einem *Mismatch* oder mit m⁶A zeigt somit keinen Einfluss auf die Quantenausbeute der DNA-Sonde. Im Gegensatz dazu führt die Hybridisierung mit dem *Match*-Strang **CV1-DNA4A** zu einem leichten Anstieg auf Φ_F =3,5 %. Der leichte Anstieg in der Quantenausbeute ist auf die WATSON-CRICK-Basenpaarung zwischen A und T zurückzuführen, wodurch die Helixstruktur stabilisiert wird (Tabelle 2).[51, 168, 178] Der beobachtete Effekt ist jedoch zu gering, um eine eindeutige Detektion zu ermöglichen. Dies deutet daraufhin, dass sowohl m⁶A als auch T als *Mismatch* die lokale DNA-Struktur beeinflusst, jedoch diese Veränderungen nicht ausreichen, um die Wechselwirkungen der Fluorophore und die damit verbundene Emission signifikant zu beeinflussen.[251]

*Tabelle 2: UV/Vis Absorption-Maximum λ_{abs}, Fluoreszenz-Maximum λ_{em}, Verhältnis von Monomer zur Dimer Absorption $\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$ und Fluoreszenz $\lambda_{emM.}/\lambda_{emD.}$, Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F, Fluoreszenzlebenszeit τ und Schmelztemperaturen T_m der **CV1**-doppelmodifizierten Oligonukleotide.*

	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	$\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$	$\lambda_{emM.}/\lambda_{emD.}$	Φ_F / %	τ / ns (± 0,1)	T_m / °C
CV1-DNA3ss	466/500	535/575	0,71	1,41	2,6	2,36	-
CV1-DNA3	466/500	535/575	0,61	1,21	2,9	2,49	49,5
CV1-DNA4ss	470/500	535	0,78	1,51	2,9	2,51	-
CV1-DNA4A	470/500	535	0,84	1,69	3,5	2,31	49,5
CV1-DNA4T	470/500	535	0,73	1,40	3,0	2,71	46,5
CV1-DNA4M	470/500	535	0,74	1,42	3,0	2,48	48,5

Zwei gegenüberliegende Fluorophore in **CV1-DNA2** zeigen ausgeprägte Wechselwirkungen, wodurch eine breite und bathochrom verschobene Emissionsbande entsteht, während zwei nebeneinander positionierte Fluorophore innerhalb derselben Sequenz in **CV1-DNA3ss** und **CV1-DNA3** nur geringe Effekte aufweisen. Zusammen mit der hypsochrom verschobenen Absorption weisen die Farbstoffe in **CV1-DNA2** auf die Bildung eines fluoreszenten H-Aggregats. Die Einbettung der Fluorophore in die DNA-Doppelhelix schränkt die Rotationsfreiheit ein, wodurch die Quantenausbeute beeinflusst wird. Zudem weist die verlängerte Lebenszeitkomponente im doppelmodifizierten **CV1-DNA2** auf die Ausbildung eines delokalisierten angeregten Zustands hin.[58, 60, 61] Durch den Einsatz der m^{6}A-Detektionssonde **CV1-DNA4ss** konnte gezeigt werden, dass selbst geringste strukturelle Änderungen der Doppelhelix Veränderungen der Fluoreszenz verursachen können. Die Anzahl und die Position der integrierten **CV1**-Fluorophoren in DNA beeinflussen die Wechselwirkungen, wodurch excimerartige Zustände, aber auch isolierte Monomerzustände entstehen.

3.3.4 CV2-modifizierte Interstrang-Dimere

Der Farbstoff **CV2** wurde ebenfalls auf seine optischen Eigenschaften in verschiedenen DNA-Architekturen untersucht, um einen möglichen Einfluss der Cyclisierung des tertiären Amins festzustellen. Für die Untersuchung möglicher Intrastrang-Dimere wurde das Phosphoramidit **9b** in dieselben Sequenzen **DNA1-ss** und **DNA1-cs** eingebaut. **CV2-DNA1ss** besitzt das Absorptionsmaximum bei λ=482 nm mit einer Schulter bei λ=515 nm. Auch **CV2** zeigt im Einzelstrang eine hypsochrome Verschiebung der Absorption. Der Unterschied der Banden ist jedoch weniger stark ausgeprägt als für **CV1**. Der Duplex **CV2-DNA1** besitzt das Maximum der Absorption bei λ=515 nm, während die Schulter bei λ=482 nm fast gänzlich verschwindet. Wie zuvor bei **CV1** sorgt die Einbettung des Fluorophors in die Doppelhelix für eine Isolation, wodurch Wechselwirkungen mit Farbstoffen anderer Oligonukleotide unterbunden werden.[51, 168] Werden die beiden Farbstoffe in **CV2-DNA2** in antiparalleler Anordnung in räumliche Nähe gebracht, ist das Absorptionsmaximum bei λ=482 nm mit einer Schulter bei λ=515 nm. Die Intensitätsunterschiede der beiden Banden ist stärker ausgeprägt als im Einzelstrang, was für eine stärkere elektronische Kopplung der Farbstoffe spricht.[19, 162, 166] Die Absorption von **CV2**-modifizierten Oligonukleotide zeigt ein ähnliches Verhalten wie für **CV1**, jedoch sind die Effekte weniger stark ausgeprägt (Abbildung 45).[251]

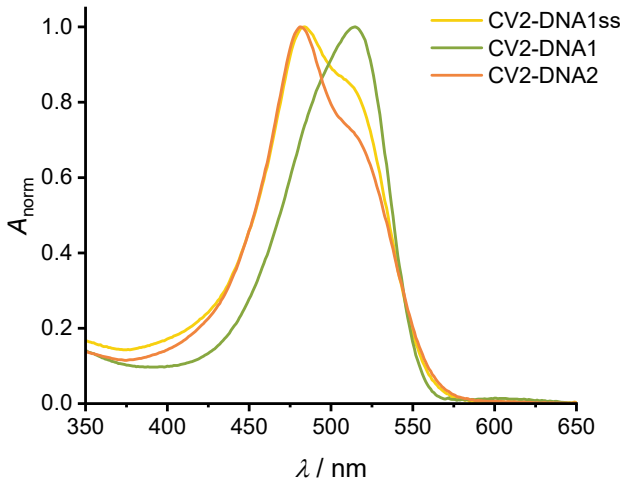


*Abbildung 45: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Das einzelsträngige Oligonukleotid **CV2-DNA1ss** besitzt bei einer Anregungswellenlänge von λ_{exc}=480 nm das Emissionsmaximum bei λ=550 nm ohne eine erkennbare Schulter. Im Gegensatz zur Absorption zeigt die Emission keine Wellenlängenverschiebung. Der isolierende Duplex **CV2-DNA1** weist ebenfalls das Maximum der Emission hei λ=550 nm auf, jedoch zeigt sich ein

signifikanter Anstieg der Fluoreszenz.[51, 168] Auch dieses Oligonukleotid weist keine neu auftretende Emissionsbande auf. Im Gegensatz dazu zeigt der doppelmodifizierte Duplex **CV2-DNA2** ein *Quenching* der Fluoreszenz. Zusammen mit der hypsochrom verschobenen Fluoreszenz spricht dies für die Bildung eines klassischen H-Aggregats.[58, 60, 61] Wie schon zuvor für **CV1** werden die optischen Eigenschaften von **CV2** vom DNA-Gerüst beeinflusst (Abbildung 46).[251]

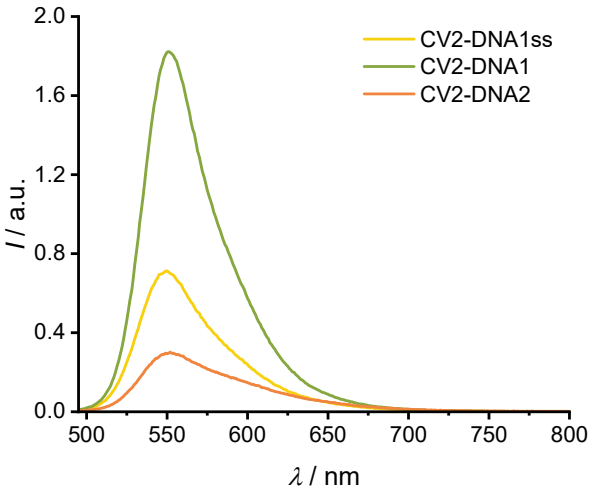


*Abbildung 46: Fluoreszenzspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=480 nm, 20 °C.*

Der Vergleich von **CV1** zu **CV2** zeigt, dass beide Farbstoffe in der Absorption eine hypsochrome Verschiebung aufweisen, wenn sich die Fluorophore in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Während die Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen von **CV1** in **CV1-DNA2** eine starke Wellenlängenverschiebung der Fluoreszenz auslösen, bewirken die Interaktionen von **CV2** in **CV2-DNA2** ein *Quenching*.[251] Zusammen mit der hypsochrom verschobenen Schulter deutet dies auf die Ausbildung eines klassischen H-Aggregats.[58] Die Cyclisierung von **CV2** verhindert die Bildung eines fluoreszenten H-Aggregats.[58, 60] (Abbildung 47).

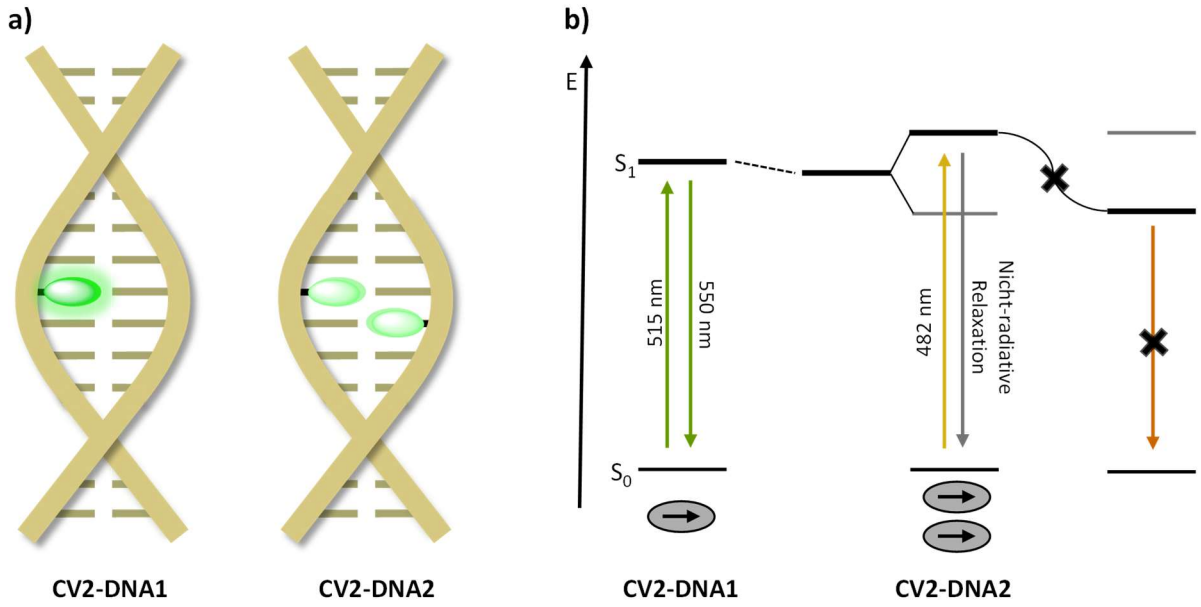


*Abbildung 47: a) Schematische Darstellung eines Einfacheinbaus von **CV2** in **DNA1** und eines Zweifacheinbaus in **DNA2**; b) Darstellung der Bildung eines gelöschten H-Aggregates von **CV2** durch eine parallele Ausrichtung der Übergangsdipolmomente.*

Der flexible Einzelstrang **CV2-DNA1ss** besitzt eine Quantenausbeute von Φ_F=13,1 %, welche durch Hybridisierung zu **CV2-DNA1** auf Φ_F=31,4 % ansteigt. Die deutlich erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute von **CV2** im Vergleich zu **CV1** ist auf die starre Struktur von **CV2** zurückzuführen.[73, 128] Das beobachtete *Quenching* der Fluoreszenz der beiden wechselwirkenden **CV2**-Fluorophore spiegelt sich in der Quantenausbeute wider. Der Interstrang-Duplex **CV2-DNA2** besitzt eine Fluoreszenzquantenausbeute von Φ_F=3,9 % und liegt damit deutlich unter denen der monomodifizierten Oligonukleotide. Auch die Quantenausbeuten deuten auf die Bildung eines klassischen H-Aggregats in **CV2-DNA2**. **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2** weisen eine vergleichbare Fluoreszenzlebenszeit ohne zweite Komponente auf (Tabelle 3).[58, 60, 61] Die photophysikalischen Eigenschaften von **CV2** hängen stark von der Positionierung in einem DNA-Gerüst ab. Der isolierte Fluorophor im Duplex zeigt einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zum Einzelstrang, während zwei Fluorophore in einer DNA-Doppelhelix zu einem *Quenching* führen. Dieses Verhalten weist auf die Ausbildung eines klassischen H-Aggregats, welches eine hypsochrome Absorption aufweist, jedoch mit einem starken *Quenching* einhergeht.

*Tabelle 3: UV/Vis Absorption-Maximum $\lambda_{abs,}$ Fluoreszenz-Maximum λ_{em}, Verhältnis von Monomer zur Dimer Absorption $\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$, Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{F,}$ Fluoreszenzlebenszeit τ und Schmelztemperaturen T_m von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2**.*

	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	$\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$	Φ_F / %	τ / ns (± 0,1)	T_m / °C
CV2-DNA1ss	482/515	550	0,83	13,1	2,76	-
CV2-DNA1	515	550	1,41	31,4	2,54	60,5
CV2-DNA2	482/515	550	0,71	3,90	2,74	67,5

3.3.5 DB-modifizierte Interstrang-Dimere

Für die Untersuchung möglicher Interstrang-Dimere von **DB** wurde das Phosphoramidit **17** ebenfalls in die Sequenzen **DNA1ss** und **DNA1cs** eingebaut. UV/Vis-Absorptionsmessungen wurden aufgenommen, um mögliche Fluorophor-Interaktionen im Grundzustand zu untersuchen. **DB-DNA1ss** besitzt das Absorptionsmaximum bei λ=430 nm mit einer Schulter bei λ=407 nm. Diese Feinstruktur weist auf eine schwach ausgeprägte elektronische Kopplung der Fluorophore im Grundzustand hin. Auch der isolierende Duplex **DB-DNA1** zeigt das Absorptionsmaximum bei λ=430 nm mit einer Schulter bei λ=407 nm. In diesem Oligonukleotid werden die Farbstoff-Interaktionen aufgrund der Isolation in der Doppelhelix unterdrückt. Anders als bei den Cyanovinylen-Bausteinen zeigt **DB** im Einzelstrang keine Verschiebung der Absorption. Es ist eine hypsochrom verschobene Schulter zu erkennen, die jedoch nicht das Maximum der Absorption darstellt. Im Gegensatz dazu zeigt **DB-DNA2** eine hypsochrome Verschiebung der Absorption. Das Absorptionsmaximum ist bei λ=407 nm mit einer Schulter bei λ=430 nm, wodurch die Absorptionsmessung die Bildung eines H-Aggregates andeutet.[58, 60, 61] Der Farbstoff **DB** zeigt nur dann eine Verschiebung der Absorption, wenn sich zwei Fluorophore antiparallel in der Doppelhelix gegenüberstehen (Abbildung 48).[252] Dieses Verhalten wurde bereits für andere Cyanin-Farbstoffe wie TO in Oligonukleotiden beschrieben.[19]

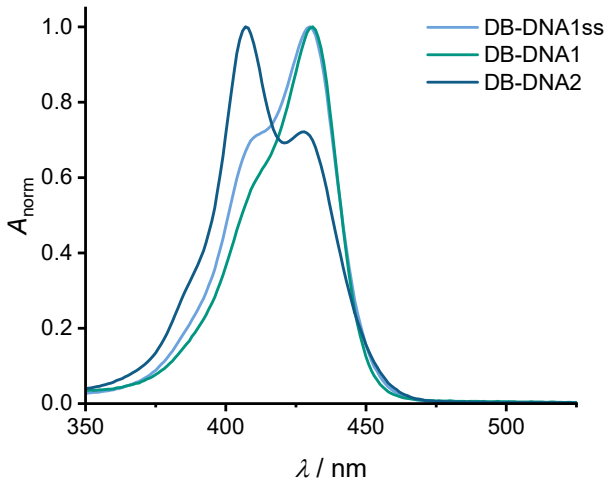


*Abbildung 48: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1** und **DB-DNA2**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Angeregt bei λ_{exc}=400 nm zeigt der Einzelstrang **DB-DNA1ss** das Emissionsmaximum bei λ=466 nm, während der Duplex **DB-DNA1** das Emissionsmaximum bei λ=460 nm aufweist. Wie schon zuvor bei den CV-Fluorophoren zeigt der isolierende Duplex eine niedrigere Wellenlänge des Emissionsmaximum. **DB-DNA1** weist einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich

zum Einzelstrang **DB-DNA1ss** auf. Auch hier führt eine Hybridisierung und die damit verbundene Einbettung des Fluorophors in die Doppelhelix zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Ein solcher *Light-Up* wurde für andere Cyanin-Farbstoffe , wie TO, bereits beobachtet und ist auf eine eingeschränkte Rotation zurückzuführen.[51, 168] Der Duplex **DB-DNA2** zeigt hingegen das Emissionsmaximum bei λ=472 nm, wobei die Fluoreszenzintensität stärker ausgeprägt ist als im Einzelstrang **DB-DNA1ss**, jedoch geringer als im Duplex **DB-DNA1**. Im Vergleich zu den anderen **DB**-modifizierten Oligonukleotiden ist die Emission leicht bathochrom verschoben (Abbildung 49).[252]

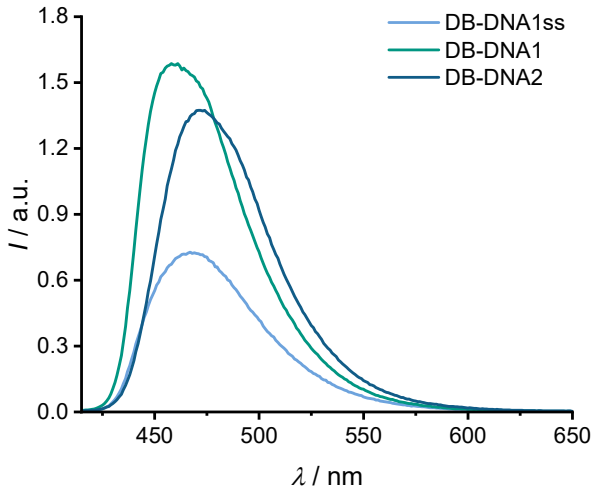


*Abbildung 49: Fluoreszenzspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1** und **DB-DNA2**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C.*

Eine antiparallele Ausrichtung zweier gegenüberliegender **DB**-Fluorophore in einer DNA-Doppelhelix ermöglicht eine Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkung.[19, 21, 58, 60, 61] Die hypsochrome Verschiebung der Absorption von **DB-DNA2** zeigt, dass eine Grundzustandskopplung bei antiparalleler Anordnung der beiden **DB**-Fluorophore innerhalb der Doppelhelix auftritt. Zusätzlich weist **DB-DNA2** eine bathochrom verschobene Fluoreszenz auf, was auf eine nicht ideale *face-to-face-Anordnung* der Übergangsdipolmomente hindeutet. Die hypsochrom verschobene Absorption zusammen mit der moderaten bathochrom verschobenen Emission weist auf die Bildung eines fluoreszenten H-Aggregats.[19, 21, 58, 60, 61] Im Vergleich zu **CV1** fällt die bathochrome Verschiebung deutlich geringer aus.

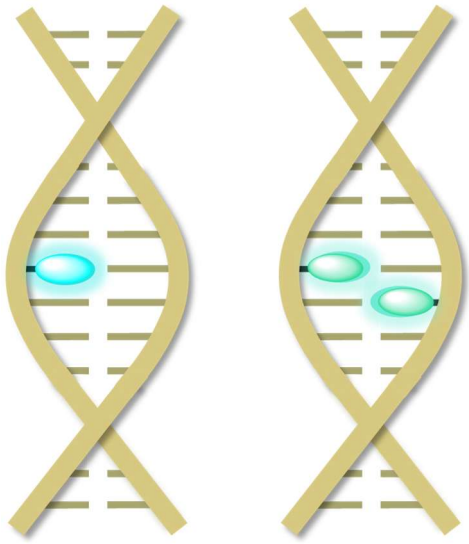


*Abbildung 50: links) Schematische Darstellung eines Einfacheinbaus von **DB** in **DNA1**; rechts) Schematische Darstellung eines Interstrang-Dimers von **DB** in **DNA2**.*

Der ähnliche Farbstoff K21 zeigte eine deutlich größere bathochrome Wellenlängenverschiebung in DNA.[146, 147] Dies könnte auf mehrere Unterschiede zurückzuführen sein. Ein signifikanter Unterschied von **DB** zu K21 ist die unterschiedliche Integration der Fluorophore. **DB** ist kovalent an das Rückgrat der DNA über einen Linker angebracht, während K21 durch Interkalation in die Doppelhelix eingelagert wird. Die kovalente Integration erzwingt die Anordnung und die Orientierung des Farbstoffes in der DNA und dadurch auch die relative Orientierung der beiden **DB**-Einheiten in **DB-DNA2**. Bei einer Interkalation können sich die Farbstoffe frei in der Doppelhelix anordnen, was zu unterschiedlichen relativen Orientierungen der Farbstoffe führt. Es ist möglich, dass die Interkalation im Vergleich zum kovalenten Einbau die Excimerbildung begünstigt, die zur stark bathochrom verschobenen Emission führt.[182, 183] Ein anderer Unterschied findet sich in der Struktur der beiden Fluorophore. K21 ist mit jeweils einem Chloratom an den beiden Benzothiazoleinheiten modifiziert. Diese Chloratome beeinflussen einerseits aufgrund ihrer elektronenziehenden Eigenschaften die elektronischen Eigenschaften des Farbstoffes und andererseits spielen sie eine Rolle in der räumlichen Anordnung der Farbstoffe. Aus sterischen Gründen können die Farbstoffe nicht parallel gestapelt vorliegen, sondern müssen leicht verdreht interagieren.[146, 184] Diese Verdrehung könnte ebenfalls die fluoreszenten Eigenschaften des angeregten Dimers beeinflussen. Der Einzelstrang **DB-DNA1ss** weist eine Quantenausbeute von Φ_F=33,3 % auf, die durch Hybridisierung zum Duplex **DB-DNA1** auf Φ_F=66,5 % ansteigt. Auffällig ist die hohe Quantenausbeute von **DB** im Vergleich zu den Cyanovinylen-Farbstoffen.[170, 185, 186] Auch im doppelmodifizierten Duplex **DB-DNA2** ist die Quantenausbeute mit Φ_F=30,0 % relativ hoch, obwohl im Grundzustand eine elektronische Kopplung vorliegt.[58, 60, 61] **DB-DNA2** weist eine zusätzliche verlängerte Komponente der

Fluoreszenzlebenszeit im Vergleich zu den monomodifizierten **DB**-modifizierten Oligonukleotiden bei τ=5,69 ns auf, was auf die Ausbildung eines fluoreszierenden delokalisierten Zustands hindeutet (Tabelle 4).[170, 185, 252]

*Tabelle 4: UV/Vis Absorption-Maximum λ_{abs}, Fluoreszenz-Maximum λ_{em}, Verhältnis von Monomer zur Dimer Absorption $\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$ und Fluoreszenz $\lambda_{emM.}/\lambda_{emD.}$, Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F, Fluoreszenzlebenszeiten τ_n und Schmelztemperaturen T_m von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1** und **DB-DNA2**.*

	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	$\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$	Φ_F / %	τ_1 / ns (± 0,1)	τ_2 / ns (± 0,1)	τ_3 / ns (± 0,1)	T_m / °C
DB-DNA1ss	407/430	466	1,50	33,3	1,20	3,17	-	-
DB-DNA1	407/430	460	1,90	66,5	1,17	3,38	-	66,0
DB-DNA2	407/430	472	0,71	30,0	1,20	3,22	5,69	68,0

3.3.6 DB-modifizierte Intrastrang-Dimere

Um den Einfluss der Anordnung und der relativen Orientierung der Farbstoffe zueinander im DNA-Gerüst zu untersuchen, wurden zwei **DB**-Farbstoffe nebeneinander in **DB-DNA3ss** eingebaut. Ebenfalls wurde der dazugehörige Duplex **DB-DNA3** untersucht, um einen möglichen Einfluss einer Hybridisierung auf diese Struktur zu zeigen. In der Absorption weisen **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3** das Maximum bei λ=407 nm mit einer Schulter bei λ=428 nm auf. Beide Oligonukleotide weisen eine hypsochrome Verschiebung der Absorption auf, wobei der Unterschied der Banden im Einzelstrang stärker ausgeprägt ist.[58] Die Banden und die Feinstruktur entsprechen dabei denen des Duplexes **DB-DNA2** (Tabelle 5). Eine Hybridisierung beeinflusst das Verhältnis vom Absorptionsmaximum zur Schulter (Abbildung 51).[252]

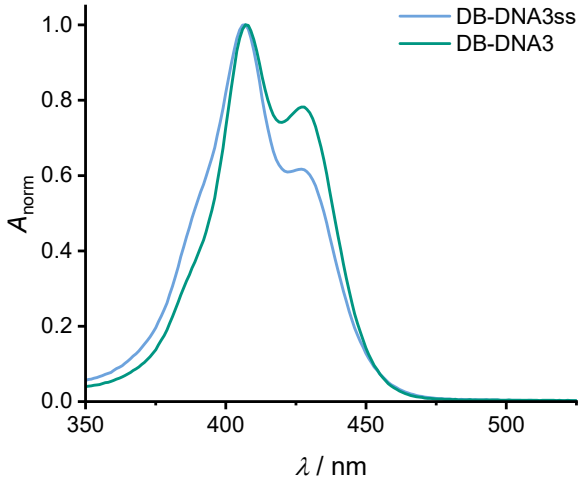


*Abbildung 51: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Im Gegensatz zur Absorption zeigen die Emissionsspektren einen Unterschied zwischen **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3**. Der Duplex **DB-DNA3** zeigt eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu **DB-DNA3ss**. Auch in dieser Sequenz sorgt eine Hybridisierung für einen Fluoreszenzanstieg der integrierten Fluorophore. Neben der Fluoreszenzintensität unterscheiden sich die Oligonukleotide auch im Emissionsmaximum. Der flexible Einzelstrang **DB-DNA3ss** weist das Maximum der Fluoreszenz bei λ=487 nm und der Duplex **DB-DNA3** bei λ=480 nm auf. Im Vergleich zu den Oligonukleotiden, die pro Sequenz nur einen **DB**-Fluorophor beinhalten, zeigen beide Proben eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz. Dabei ist die Fluoreszenz im Einzelstrang stärker verschoben (Tabelle 5). In **DB-DNA3ss** ist die Feinstruktur der hypsochromen Verschiebung der Absorption stärker zugunsten der Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung ausgeprägt. Von allen untersuchten **DB**-modifizierten Oligonukleotiden zeigt **DB-DNA3ss** die stärkste bathochrome Verschiebung der Emission. Die parallele Anordnung direkt nebeneinander in der Sequenz scheint somit die Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen am Stärksten zu ermöglichen.[58, 60, 61] Die Wellenlängenverschiebung aller **DB**-modifizierten Oligonukleotide zeigt sich durch die Normierung der Fluoreszenzen (Abbildung 52).[252]

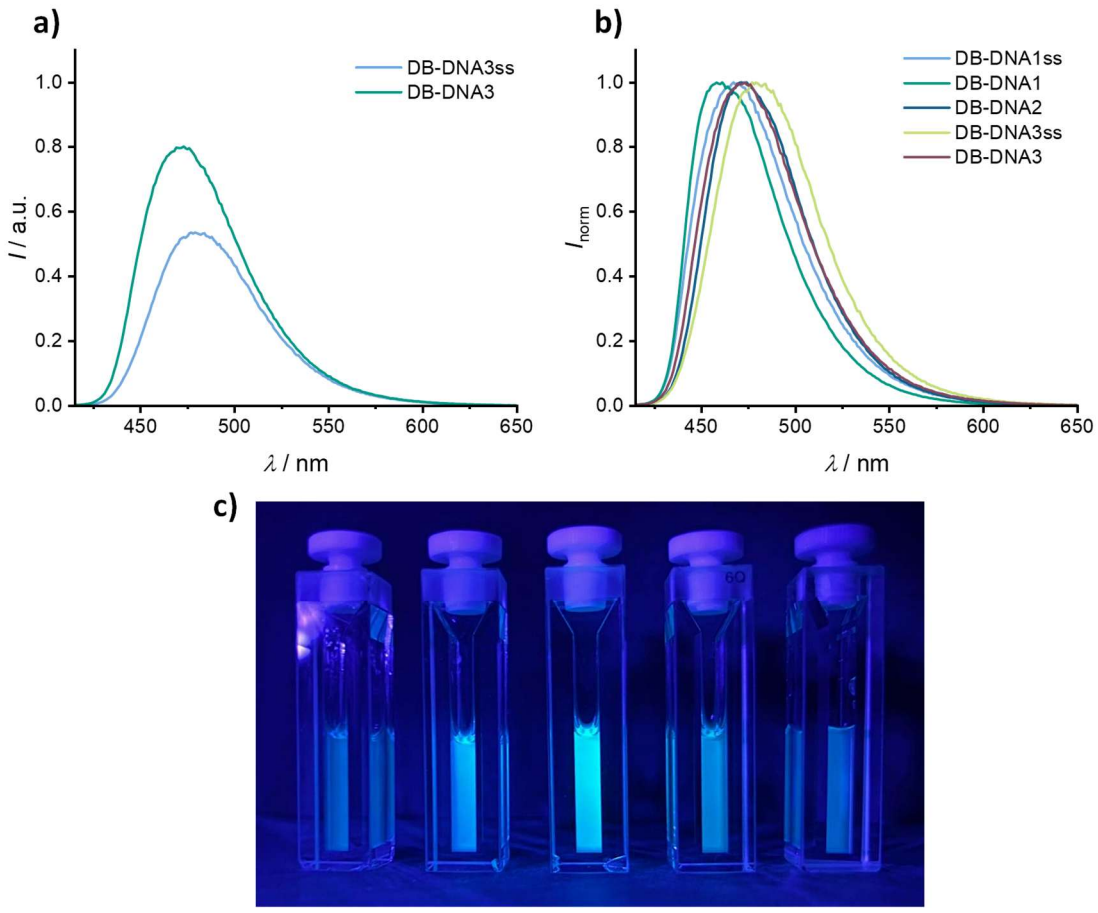


*Abbildung 52: a) Fluoreszenzspektren von **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3**; b) normierte Emissionsspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1**, **DB-DNA2**, **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. c) Küvetten mit **DB-DNA1ss**, **DB1-DNA1**, **DB1-DNA2**, **DB-DNA3ss**, **DB-DNA3** angeregt mit einer handgehaltenen UV-Lampe mit einer Wellenlänge von λ=365 nm; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Die beobachtete Wellenlängenverschiebung von **DB** ist im Vergleich zu anderen excimerbildenden Farbstoffen relativ gering und eignet sich somit nur eingeschränkt als wellenlängenverschiebende DNA-Sonde.[187, 188]

*Tabelle 5: UV/Vis Absorption-Maximum λ_{abs}, Fluoreszenz-Maximum λ_{em}, Verhältnis von Monomer zur Dimer Absorption $\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$, Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F und Schmelztemperaturen T_m der **DB**-modifizierten Oligonukleotide.*

	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	$\lambda_{absM.}/\lambda_{absD.}$	Φ_F / %	T_m / °C
DB-DNA3ss	407/428	487	0,61	15,3	-
DB-DNA3	407/428	480	0,78	22,1	55,0

DB zeigt ein von **CV1** und **CV2** abweichendes Emissionsverhalten. Während im Einzelstrang und im monomodifizierten Duplex keine ausgeprägte Grundzustandskopplung beobachtet wurde, zeigt **DB-DNA2** eine hypsochrome Verschiebung der Absorption. Im Gegensatz zu klassischen

gelöschten H-Aggregaten zeigte dieser Duplex eine leicht bathochrom verschobene Emission, die auf die Ausbildung eines fluoreszenten, delokalisierten angeregten Zustands deutet.[58, 60, 61] Die Intrastrang-Dimere weisen eine Kopplung der Farbstoffe auf, jedoch ist diese weniger stark ausgeprägt.

3.3.7 Vergleich der Fluorophore CV1, CV2 und DB

Die im Zuge dieser Arbeit entwickelten Fluorophore **CV1**, **CV2** und **DB** wurden über denselben Linker und in dieselben Sequenzen eingebaut, jedoch unterscheiden sie sich im Emissionsverhalten. Die Anzahl und relative Orientierung der Fluorophore beeinflussen die photophysikalischen Eigenschaften der Oligonukleotide. Eine Gemeinsamkeit von **CV1**, **CV2** und **DB** ist eine hypsochrome Verschiebung der Absorption, sollten sich zwei Fluorophore innerhalb der DNA-Struktur annähern. Dieses Verhalten weist auf die Ausbildung eines H-Aggregates hin. Die Ausbildung dieser Wechselwirkung unterscheidet sich jedoch zwischen den drei Farbstoffen. Für **CV1** ist eine besonders ausgeprägte Kopplung im Grundzustand bei zwei gegenüberliegenden Farbstoffen im Duplex zu beobachten. Diese Wechselwirkung beeinflusst auch das Emissionsverhalten. Bei dieser Anordnung tritt eine strukturlose bathochrom verschobene Emission auf, was charakteristisch für einen delokalisierten excimerartigen Zustand ist. Die molekulare Flexibilität von **CV1** ermöglicht einen Rotationswinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der Fluorophore. **CV2** zeigt in DNA ebenfalls eine hypsochrome Verschiebung der Absorption, jedoch tritt keine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz auf. Stattdessen tritt ein *Quenching* der Fluoreszenz auf. Die starre Cyclisierung am tertiären Amin verhindert einen Rotationswinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten. **CV1** bildet ein fluoreszierendes- und **CV2** ein klassisches H-Aggregat. Im Vergleich zu den CV-modifizierten Einsträngen zeigt der **DB**-Einzelstrang eine nur leicht auftretende Grundzustandswechselwirkung. Lediglich beim Einbau von zwei **DB**-Fluorophoren in ein Oligonukleotid kann eine hypsochrome Verschiebung und somit eine ausgeprägte Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung im Grundzustand beobachtet werden. Die Emission dieses Aggregats zeigt ebenfalls eine leichte bathochrome Verschiebung, jedoch fällt diese deutlich geringer aus als für **CV1**. Zudem zeigt **DB** kein ausgeprägtes *Quenching* wie **CV2**.[58, 60, 61] Neben der Wahl des Farbstoffes beeinflusst auch die Positionierung die Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung. Dies wird deutlich beim Vergleich der Interstrang-Dimere, bei denen zwei Fluorophore in der DNA-Doppelhelix antiparallel gegenüberstehen, und den Intrastrang-Dimeren, bei denen die beiden Fluorophore direkt nebeneinander in derselben Sequenz angeordnet werden. Die Positionierung der beiden Fluorophore nebeneinander zeigt schwächere Wechselwirkungen. In der Absorption zeigt sich zwar erneut eine hypsochrome Verschiebung, jedoch ist diese weniger stark ausgeprägt. Für **CV1** führt dies zu einer Ausbildung einer relativ schwach ausgeprägten bathochrom verschobenen Schulter der Emission. **DB** zeigt ebenfalls eine Grundzustandskopplung, welche sich in der Emission durch *Quenching* und eine leichte bathochrome Verschiebung zeigt. [189] Die Unterschiede in den optischen Eigenschaften der Cyanovinylen-Derivaten **CV1** und **CV2** lassen sich auf den strukturellen Unterschied am tertiären Amin zurückführen. Die fehlende Flexibilität von **CV2** führt zur Unterdrückung eines TICT-Zustands und zu höheren Quantenausbeuten im

Vergleich zu **CV1**. Zudem wurde die Wechselwirkung von **CV1** ausgenutzt, um eine Sonde für die m^{6}A-Detektions zu synthetisieren. Eine Basenpaarung mit A trennt die beiden Fluorophore und die Fluoreszenzintensität stieg an, während T und m^{6}A als Gegenbase eine geringe strukturelle Destabilisierung des Duplexes auslösten, wodurch der Fluoreszenzanstieg geringer war. Obwohl ein geringer Unterschied im Verhältnis von Monomer- zu Dimeremission festgestellt wurde, reichten die optischen Unterschiede nicht aus, um m^{6}A zweifelsfrei zu detektieren (Abbildung 53).

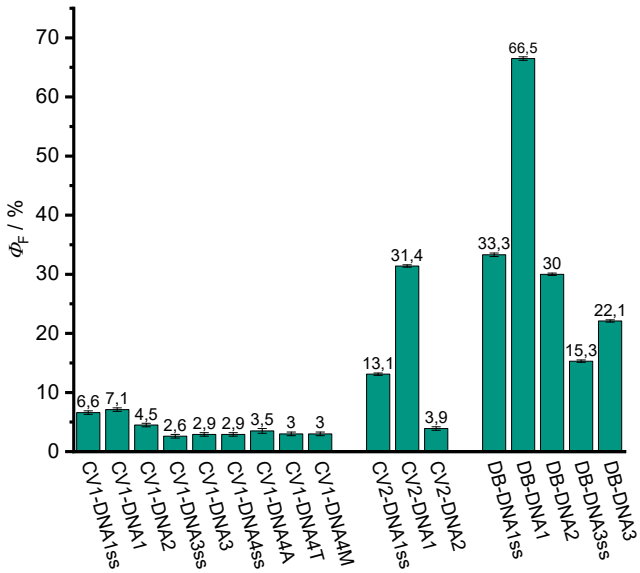


*Abbildung 53: Quantenausbeuten Φ_F der Sequenzen aller untersuchten Sequenzen mit den Fluorophoren **CV1**, **CV2** und **DB**.*

DB besitzt in DNA deutlich höhere Quantenausbeuten. Die Fluoreszenzlebenszeiten von den Interstrangdimeren **CV1-DNA2** und **DB-DNA2** weisen eine zusätzliche verlängerte Komponente auf. **CV2-DNA2** zeigt dies hingegen nicht. [170] Die photophysikalischen Eigenschaften der drei entwickelten DNA-Bausteine hängen von der elektronischen Kopplung, der relativen Orientierung zueinander und der intramolekularen Flexibilität ab. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Emissionseigenschaften der Fluorophore in DNA steuern lassen.

3.4 DB-induzierter Energietransfer

Neben den zuvor beschriebenen Wechselwirkungen zweier gleicher Fluorophore können auch Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen zwischen zwei unterschiedlichen Fluorophoren auftreten. Durch die Anregung eines Donorfluorophors kann die Anregungsenergie auf einen Akzeptorfluorophor übertragen werden, wodurch der Akzeptor emittiert.[190, 191] Darüber hinaus können zwischen zwei unterschiedlichen Fluorophoren auch Exciplexe entstehen, die eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz aufweisen.[57, 192] Solche Donor-Akzeptor-Paare liefern eine weitere Möglichkeit einen fluoreszenten *Read-Out* zu erzielen. Für einen effizienten Energieübertrag von Donor auf Akzeptor muss die Emission des Donors mit der Absorption des Akzeptors überlappen (Abbildung 54)[193]

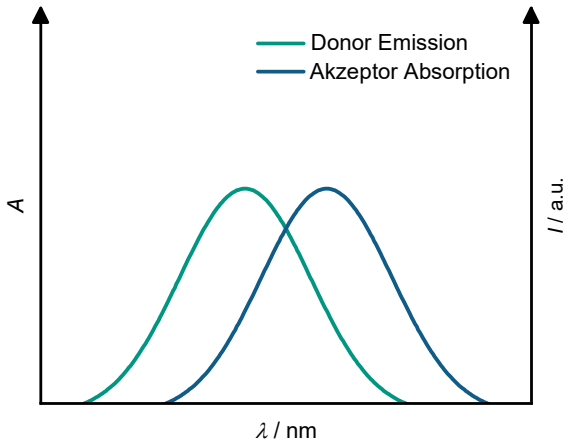


Abbildung 54: Darstellung der Überlappung der Donor-Emission mit der Akzeptor-Emission eines Donor-Akzeptor-Paares.

DB wurde als Donor gewählt und **CV1**, **CV2** und der TO-Baustein **TO**, sowie die Aminonaphthalimide **AN1** und **AN2** als Akzeptoren. **CV1** und **CV2** wurden bereits eingeführt. **TO** besitzt das Absorptionsmaximum bei λ=490 nm und wurde im Zuge meiner Masterarbeit entwickelt. **AN1** und **AN2** absorbieren bei λ=453 nm und wurden von ANNA-LENA-RUOPP aus dem Arbeitskreis WAGENKNECHT am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) synthetisiert und in DNA eingebaut (Abbildung 55).[251, 252]

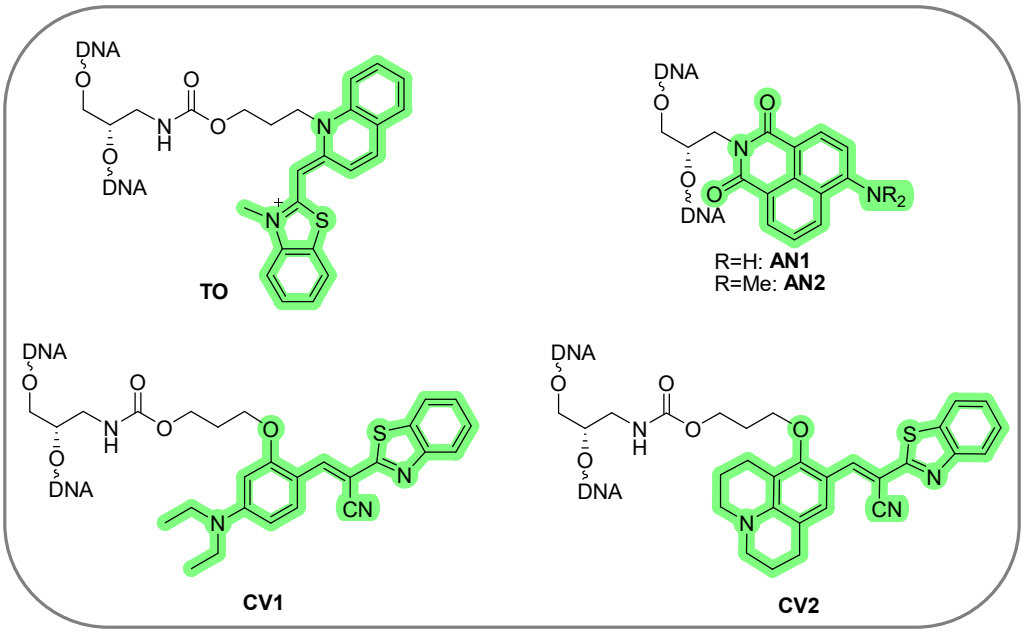


*Abbildung 55: Strukturen der in **DNA1** integrierten Akzeptorfluorophore **TO**, **CV1**, **CV2**, **AN1** und **AN2**.[251, 252]*

Das Maximum der Emission von **DB-DNA1** liegt bei λ=460 nm mit einer Quantenausbeute von Φ_F=66,5 %, was mit den Absorptionsbanden aller gewählten Akzeptorfluorophore überlappt. Die Akzeptorfluorophore sind jeweils in die Sequenz **DNA-1ss** integriert, wobei **DB** in **DNA-1cs** eingebaut wurde. Durch Hybridisierung werden die Fluorophor-Paare in räumliche Nähe innerhalb der Doppelhelix gebracht, wodurch der Duplex **X-DNA5** erhalten wird (Abbildung 56).

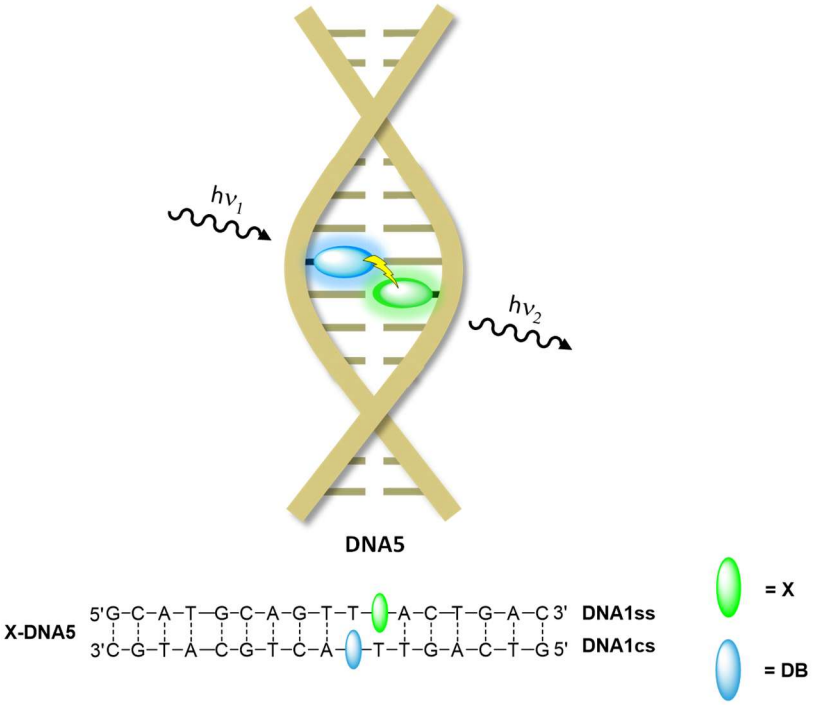


*Abbildung 56: Schematische Darstellung eines Energietransfers eines angeregten Donors auf einen emittierenden Akzeptor, sowie die Darstellung des Duplexes **X-DNA5**. X beschreibt dabei die möglichen Akzeptorfluorophore, während **DB** stets als Donor dient.*[252]

Der geringe Abstand von Donor zu Akzeptor ermöglicht neben dem Energietransfer ebenfalls excitonische Wechselwirkungen. Dennoch wurde diese Anordnung gewählt, da geringe Abstände von Fluorophoren in funktionellen Oligonukleotiden wie siRNA oder Aptameren oftmals vorhanden sind.[194-197] Für **TO-DNA5**, **CV1-DNA5** und **CV2-DNA5** zeigen die Absorptionen die charakteristischen Absorptionsbanden für **DB** und den jeweiligen Akzeptorfarbstoffen. Im Fall der Aminonaphthalimide, **AN1-DNA5** und **AN2-DNA5**, ist die Absorptionsbande von **DB** mit einer leichten Verbreiterung zu beobachten. Dies ist auf die spektrale Überlappung sowie den deutlich höheren molaren Extinktionskoeffzienten in DNA zurückzuführen. **DB** besitzt einen Extinktionskoeffizienten von ε_{430nm}=8,6 *10^4 M^{-1}cm^{-1}, während **AN1** und **AN2** einen Extinktionskoeffizienten von ε_{453nm}=1,4 *10^4 M^{-1}cm^{-1} besitzen (Abbildung 57).

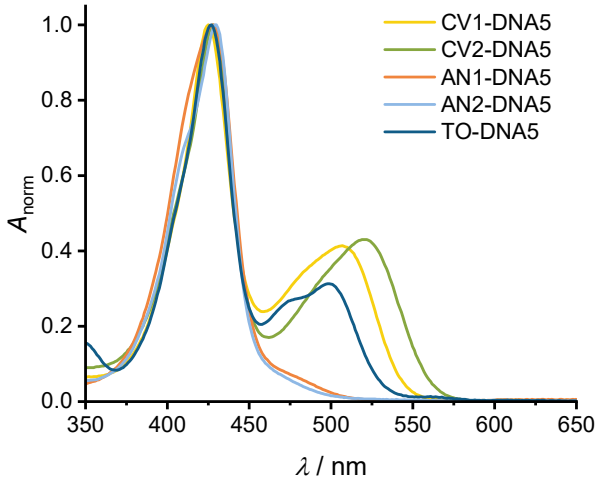


*Abbildung 57: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren der Donor-Akzeptor-Duplexe **CV1-DNA5**, **CV2-DNA5**, **AN1-DNA5**, **AN2-DNA5** und **TO-DNA5**. Die Akzeptorfluorophore befinden sich dabei in **DNA1ss**, während der Donorfluorophor **DB** im komplementären Gegenstrang **DNA-1cs** integriert ist; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.*

Zur Untersuchung eines Energietransfer von Donor auf Akzeptor oder einer Exciplexbildung, wurden die Fluoreszenzen aller **X-DNA5** Proben bei einer Anregungswellenlänge von λ_{exc}=400 nm bestimmt. Zum Vergleich wurden die Akzeptorfarbstoffe auch einzeln in **DNA-1ss** und **DNA-1** unter denselben Bedingungen untersucht, um eine direkte Anregung auszuschließen. Alle Akzeptorfluorophore zeigen ohne die Anwesenheit von **DB** eine geringe Fluoreszenz, wodurch eine mögliche Intensitätszunahme in den Duplexen **X-DNA5** auf einen Energietransfer mit **DB** zurückzuführen ist. Wird **TO** einzeln in **TO-DNA1ss** oder **TO-DNA1** bei λ_{exc}=400 nm angeregt, wird eine geringe Emission bei λ=532 nm beobachtet. Im Duplex **TO-DNA5** ist die Donoremission bei λ=465 nm sowie eine deutlich verstärkte Emissionsbande bei λ=532 nm vorhanden. Die Donor-Emission ist stark reduziert und die Akzeptoremission stark erhöht, wodurch von einem effizienten Energietransfer von **DB** auf **TO** ausgegangen werden kann (Abbildung 58).[252]

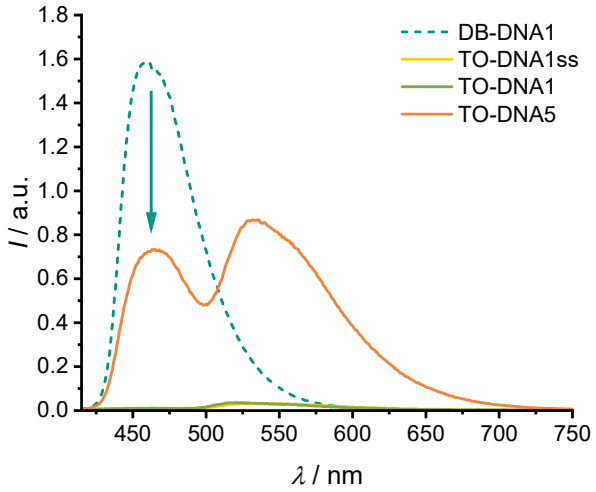


*Abbildung 58: Fluoreszenzspektren von **TO-DNA1ss**, **TO-DNA1** und **TO-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C.*

Für die Cyanovinylen-Derivate **CV1** und **CV2** wird ebenfalls eine Donor-Akzeptor-Wechselwirkung beobachtet. Sowohl **CV1** als auch **CV2** zeigen im Einzel- als auch im Doppelstrang lediglich eine geringe Fluoreszenz bei ihren jeweiligen Emissionsmaxima. **CV1** bei λ=532 nm und **CV2** bei λ=550 nm. Nach Hybridisierung mit **DB-DNA1cs** ändert sich das Emissionsverhalten für beide CV-Fluorophore deutlich. **CV1-DNA5** zeigt die reduzierte Donoremission bei λ=465 nm, jedoch tritt eine neue stark erhöhte Fluoreszenzbande bei λ=552 nm auf. Für dieses Donor-Akzeptor-Paar ist neben einem effizienten Energietransfer zusätzlich eine Wellenlängenverschiebung der Emission um λ=20 nm zu beobachten, was auf eine Exciplexbildung hindeutet.[57] Ein ähnliches Verhalten zeigt **CV2-DNA5**. Ebenfalls wird hier eine verminderte Emission von **DB** erhalten, jedoch tritt eine rotverschobene, stark erhöhte Emissionsbande bei λ=563 nm auf. Neben der starken Intensitätszunahme tritt für **CV2-DNA5** eine bathochrome Wellenlängenverschiebung von λ=13 nm auf, was ebenfalls auf einen Exciplex deutet (Abbildung 59).[57, 252]

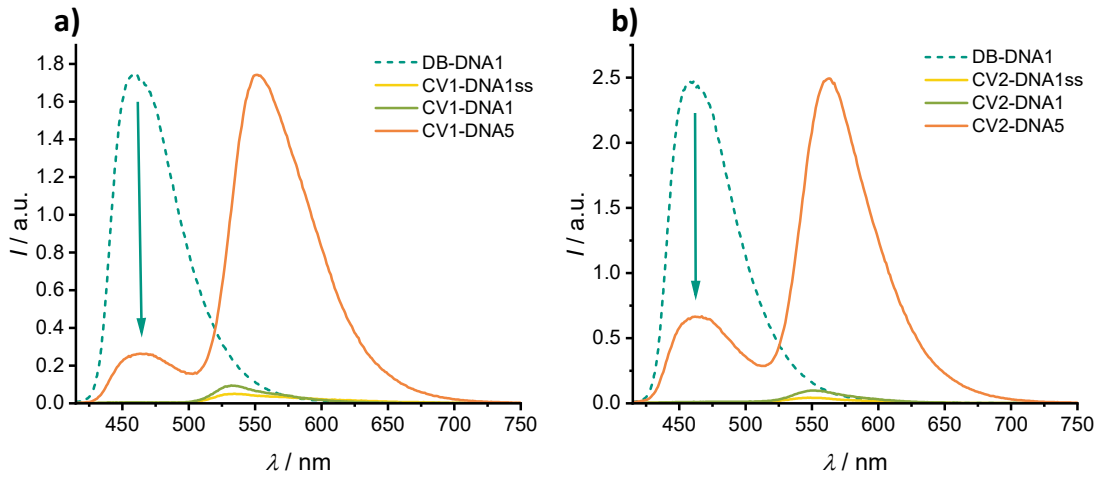


*Abbildung 59: a) Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; b) Emissionsspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C.*

Die Aminonaphthalimide **AN1** und **AN2** unterscheiden sich in der Substitution der Aminogruppe. **AN1** besitzt ein freies Amin (NH_2), während **AN2** ein dimethyliertes Amin (NMe_2) trägt. **AN1-DNA1ss** und **AN1-DNA1** zeigen eine schwache Fluoreszenz mit einem Maximum bei λ=532 nm. In **AN1-DNA5** ist neben einer reduzierten Donoremission eine deutliche Verstärkung der Akzeptoremission ohne Wellenlängenverschiebung zu sehen. Ein ähnliches Verhalten zeigt **AN2**. **AN2-DNA1ss** und **AN2-DNA1** zeigen bei der gewählten Anregung eine geringe Fluoreszenz, während **AN2-DNA5** neben der reduzierten Donoremission eine starke Fluoreszenzerhöhung der Akzeptoremission aufweist.[252] Beide Aminonaphthalimide zeigen einen starken Anstieg der Fluoreszenzintensität, sollte **DB** gegenüberliegend in der Doppelhelix vorhanden sein (Abbildung 60).[190, 191]

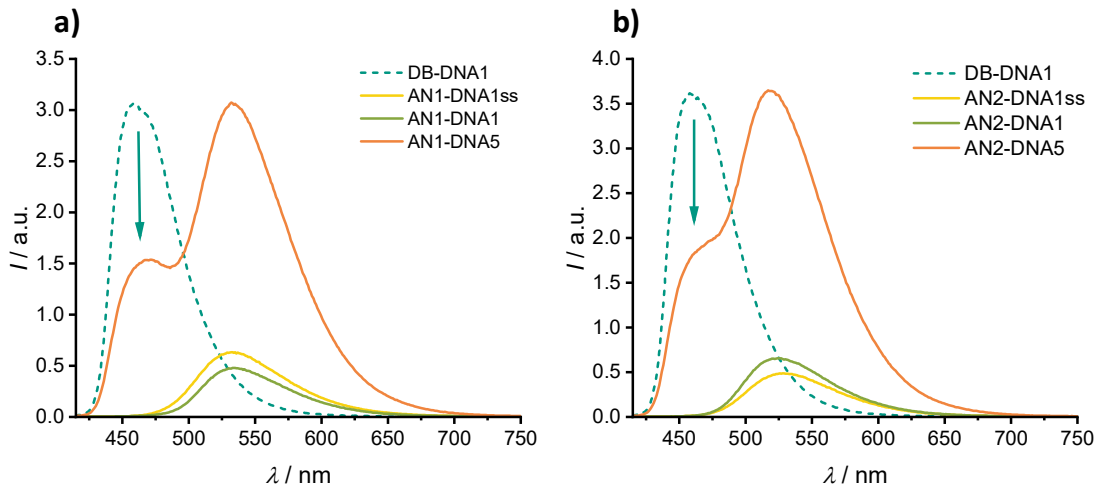


*Abbildung 60: a) Fluoreszenzspektren von **AN1-DNA1ss**, **AN1-DNA1** und **AN1-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; b) Emissionsspektren von **AN2-DNA1ss**, **AN2-DNA1** und **AN2-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C.*

Für **TO-DNA5** sind die Intensitäten der Donor- und Akzeptoremissionsbanden in etwa vergleichbar stark ausgeprägt, während bei den Duplexen **CV1-DNA5**, **CV2-DNA5**, **AN1-DNA5** und **AN2-DNA5** die bathochrom verschobene Emission deutlich stärker ausgeprägt ist. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Donor-Akzeptor-Paaren lassen sich durch verschiedene Wechselwirkungen der Fluorophore erklären. **DB** eignet sich aufgrund seiner Emission im blauen Bereich als Energiedonor, da diese mit den Absorptionsbanden der gewählten Fluorophore überlappt. Zudem führt die Positionierung der Fluorophore innerhalb des DNA-Duplexes zu einer definierten räumlichen Anordnung, wodurch delokalisierte Zustände entstehen. Besonders ausgeprägt ist die intermolekulare Wechselwirkung mit den Cyanovinylenen **CV1** und **CV2**. Diese Fluorophore zeigen eine starke elektronische Kopplung mit **DB**. Die bathochrome Verschiebung der Emission deutet daraufhin, dass neben einem Energietransfer exciplexartige Zustände entstehen. **CV1** zeigt eine Wellenlängenverschiebung von λ=20 nm und **CV2** von λ=13 nm.[57] Im Vergleich dazu zeigen **AN1** und **AN2** eine deutliche Intensitätszunahme der Fluoreszenz, jedoch ohne eine Verschiebung der Emissionswellenlänge. Es tritt ein Energietransfer auf, der den Akzeptor emittieren lässt. Die unterschiedlichen Substitutionen am Amin zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Wechselwirkung mit **DB**.[190, 191] Auch für **TO** konnte ein Energietransfer mit **DB** beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Cyanovinylen- und Aminonaphthalimid-Farbstoffen besitzen die Emissionsbanden von Donor und Akpzeptor in etwa dieselbe Intensität (Tabelle 6). Zudem zeigt dieses Paar auch keine Wellenlängenverschiebung der Emission, weshalb auch hier von keinem delokalisierten angeregten Zustand ausgegangen werden kann.[190, 191] Die Ergebnisse zeigen, dass **DB** innerhalb eines DNA-Duplexes als Energiedonor für verschiedene Akzeptor-Fluorophore eingesetzt werden kann.[252]

Tabelle 6: Fluoreszenz-Maximum λ_{em}, Verhältnis von Maximum der Donoremission zur Akzeptoremission $\lambda_{emDo.}/\lambda_{emAk.}$, Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F, Fluoreszenzlebenszeiten τ_n und Schmelztemperaturen T_m der Donor-Akzeptor-Duplexe.

	λ_{em} / nm	$I_{Do.}/I_{Ak.}$	Φ_F / %	τ_1 / ns (± 0,1 ns)	τ_2 / ns (± 0,1 ns)	T_m / °C
TO-DNA5	532	0,84	15,1	1,05	3,58	66,5
CV1-DNA5	552	0,15	21,7	3,66	8,15	67,5
CV2-DNA5	563	0,26	26,3	2,71	5,55	68,0
AN1-DNA5	532	0,49	36,1	1,48	9,97	63,5
AN2-DNA5	519	0,51	8,0	2,48	13,3	64,0

Dies verdeutlicht den Einfluss des DNA-Gerüsts auf die photophysikalischen Eigenschaften der integrierten Fluorophore. Neben den Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen existieren auch Konzepte, bei denen Fluoreszenzänderungen durch elektronische Wechselwirkungen mit einem nicht-emittierenden *Quencher* entstehen. Ein Beispiel dafür sind die Nitroindol-Sonden, bei denen ein PET durch ein DNA-Gerüst gesteuert wird, sodass ein *Light-Up* durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz entsteht. Diese Variante wird im nächsten Kapitel erläutert.

4. Hybridisierungssensitive Nitroindol-Sonden

Intensitätsbasierte Sonden beruhen entweder auf einer Löschung oder einem Anstieg der Fluoreszenz. *Light-Up*-Sonden sind dabei aussagekräftiger, da eine Löschung der Fluoreszenz durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden kann.[198] Eine Variante ist die Nutzung von interkalierenden Farbstoffen, deren molekulare Flexibilität durch die Einbettung in die Doppelhelix eingeschränkt wird.[144] Neben dieser Methode können auch Elektronentransferprozesse innerhalb der DNA-Sonde genutzt werden, um einen Fluoreszenzanstieg durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz zu erreichen.[199] Diesen Ansatz nutzen unter anderem die Nitroindol-(NI)-Sonden. Der *Read-Out* dieser Sonden beruht auf dem *Turn-On* der Fluoreszenz von der ungebundenen Sonde zum hybridisierten Duplex. NI kann die Fluoreszenz von Fluorophoren über einen PET löschen.[48, 200] Wird nun dieser *Quencher* in geringem Abstand in dieselbe Sequenz wie ein Fluorophor eingebaut, tritt im flexiblen Einzelstrang der PET ein und die Emission der einzelsträngigen DNA-Sonde wird gelöscht (Abbildung 61).

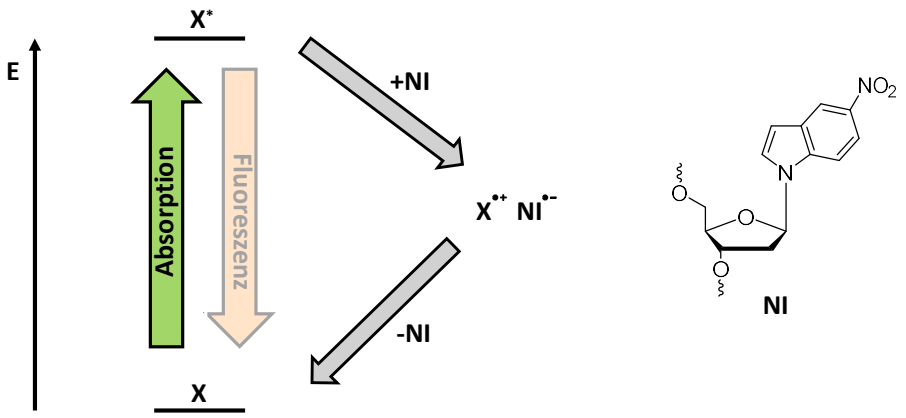


Abbildung 61: Schematische Darstellung eines PET von einem Fluorophor X auf Nitroindol (NI), sowie die molekulare Struktur des NI-DNA-Bausteins.

Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz bildet sich die Doppelhelixstruktur aus, wodurch der Abstand von NI und Fluorophor erhöht wird. Der Elektronentransfer wird unterbrochen und ein *Light-Up* der Fluoreszenz tritt auf. NI-*Light-Up*-Sonden wurde bereits von MORITZ RUBNER mit den Fluorophoren TO und Cyanin-3 etabliert.[48] Zudem synthetisierte JULIAN GEBHARD eine NI-*Light-Up*-Sonde mit Indolvinyl als Fluorophor, welcher postsynthetisch an die DNA angebracht wurde.[12] In dieser Arbeit wurden *Light-Up*-Sonden synthetisiert, die NI als *Quencher* und **CV2** oder **DB** als Fluorophor aufweisen. Um den Einfluss des Abstandes von NI und Fluorophor auf den *Light-Up* der DNA-Sonde zu ermitteln, wurden die Sequenzen **N1** und **N2** synthetisiert (Abbildung 62).

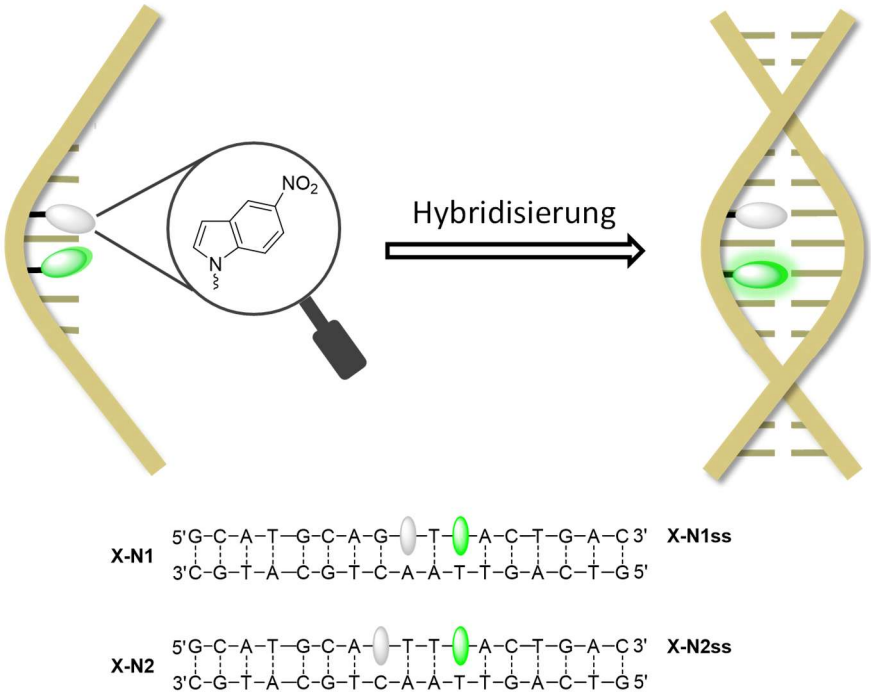


*Abbildung 62: Schematische Darstellung des Quenchings eines Fluorophors ausgehend von Nitroindol (NI) in einem DNA-Einzelstrang und der Light-Up-Effekt durch Hybridisierung, sowie die synthetisierten hybridisierungssensitiven Sequenzen **X-N1ss** und **X-N2ss** mit ihren zugehörigen Duplexen. X steht dabei für die Fluorophore **CV2** oder **DB**.*

In **N1** sind NI und Fluorophor durch eine und in **N2** durch zwei T getrennt. Die Basenabfolge der Sequenz wurde so gewählt, dass diese identisch mit **DNA1ss** ist und zur Vergleichbarkeit mit demselben Gegenstrang hybridisiert.

4.1 CV2-basierte Nitroindol-Sonden

Für die Integration von **CV2** in die Sonden wurde das Phosphoramidit **9b** verwendet. Der Farbstoff **CV2** zeigte durch Hybridisierung im Duplex **CV2-DNA1** bereits einen Fluoreszenzanstieg, weshalb dieser Baustein gewählt wurde. Durch die Kombination von *Light-Up* durch Interkalation und *Light-Up* durch die Aufhebung des PETs soll ein möglichst großer *Turn-On* der Emission erreicht werden. Der Fluoreszenzanstieg von **CV2-DNA1ss** zu **CV2-DNA1** dient dabei als Referenz. Die Fluoreszenzen der **CV2**-modifizierten NI-Sonden wurden bei einer Anregungswellenlänge von λ_{exc}=480 nm ermittelt. Auffallend ist die geringe Fluoreszenzintensität von **CV2-N1ss** im Vergleich zu **CV2-DNA1ss**. Der PET im tritt flexiblen Einzelstrang ein, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird. Der Duplex **CV2-N1** weist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Einzelstrang auf (Abbildung 63).

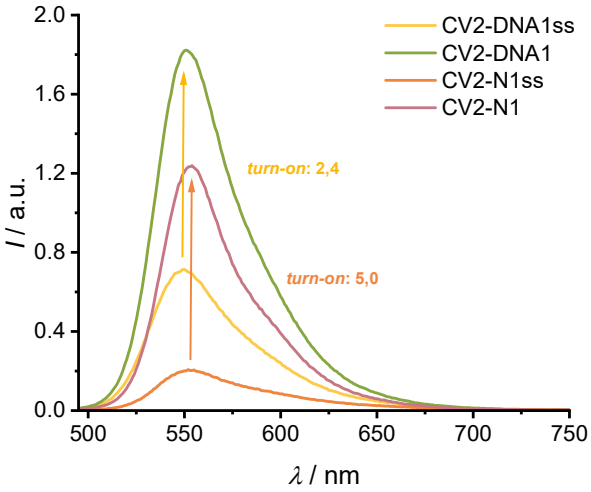


*Abbildung 63: Fluoreszenzspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1**, **CV2-N1ss** und **CV2-N1**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=480 nm, 20 °C.*

Die Fluoreszenz steigt jedoch nicht auf dieselbe Intensität wie bei **CV2-DNA1** an. Die Duplexbildung und dadurch die Vergrößerung des Abstandes von *Quencher* und **CV2** reicht nicht aus, um den PET vollständig zu unterdrücken. Nichtsdestotrotz zeigt sich ein *Turn-On* von **CV2-N1ss** zu **CV2-N1** von 5,0, während der *Turn-On* von **CV2-DNA1ss** zu **CV2-DNA1** 2,4 beträgt. Dies zeigt, dass der *Turn-On* und der damit auftretende *Read-Out* durch die Integration von NI verbessert werden konnte. Da jedoch der PET im DNA-Gerüst nicht vollständig unterdrückt wurde, sollte eine Vergrößerung des Abstandes zwischen *Quencher* und Fluorophor untersucht werden. Dies wurde in **CV2-N2ss** untersucht, indem der Abstand des Redox-Paares auf zwei Basen erweitert wurde. In diesem Einzelstrang ist das *Quenching* im Vergleich zu **CV2-DNA1ss** schwächer ausgeprägt. Die Erhöhung des Abstandes von *Quencher* zu Fluorophor führt zu einer Unterdrückung des PET-Mechanismus, wodurch die Fluoreszenzlöschung nahezu unterbunden wird. Die Fluoreszenzintensität von **CV2-N2** ist nahezu auf die von **CV2-DNA1** angestiegen. Die Unterdrückung des PET im Duplex konnte durch die Abstandsvergrößerung von NI zu **CV2** innerhalb der Sequenz erhöht werden (Abbildung 64).

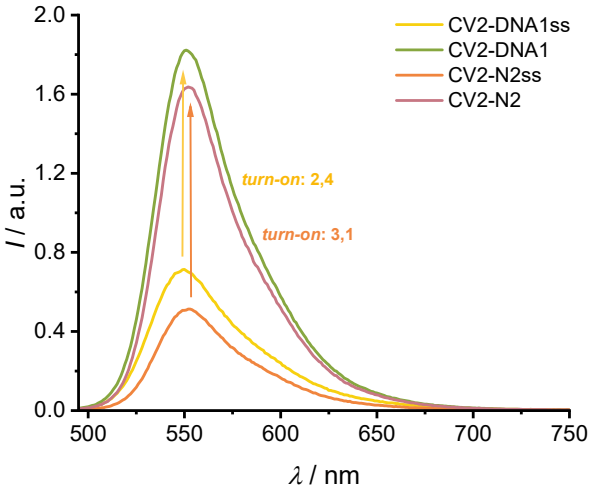


*Abbildung 64: Fluoreszenzspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1**, **CV2-N2ss** und **CV2-N2**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=480 nm, 20 °C.*

Der *Turn-On* von **CV2-N2ss** zu **CV2-N2** beträgt 3,1. Dieser Wert ist niedriger als für **CV2-N1ss** zu **CV2-N1** und nur leicht höher als für **CV2** in DNA ohne NI. Sowohl der Einbau von NI als auch der Abstand zwischen NI und **CV2** haben einen erheblichen Einfluss auf die Fluoreszenz des Farbstoffs. Eine trennende Base ermöglicht einen löschenden PET, welcher größtenteils durch Hybridisierung aufgehoben werden konnte. Der dadurch erzielte *Light-Up* ist dabei in Anwesenheit des NI erhöht. Eine Vergrößerung des Abstandes innerhalb der Sequenz unterdrückt größtenteils den PET bereits im Einzelstrang, wodurch der *Turn-On* nur geringfügig verbessert werden konnte im Vergleich zu **CV2** in DNA ohne NI.

4.2 DB-basierte Nitroindol-Sonden

Analog zu den zuvor beschriebenen **CV2**-modifizierten NI-Sonden wurde das Phosphoramidit **17** in die Sequenzen **N1ss** und **N2ss** eingebaut. Ebenfalls dienen **DB-DNA1ss** und **DB-DNA1** als Referenz. **DB1-N1ss** zeigt im Vergleich zu **DB-DNA1ss** eine deutliche Erniedrigung der Fluoreszenzintensität. **DB-N1** zeigt einen Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zu **DB-N1ss**, jedoch ist die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu **DB-DNA1** deutlich niedriger. Die Hybridisierung erhöht zwar die Fluoreszenz in dieser DNA-Sonde, jedoch kann der PET dadurch nicht unterbunden werden (Abbildung 65).

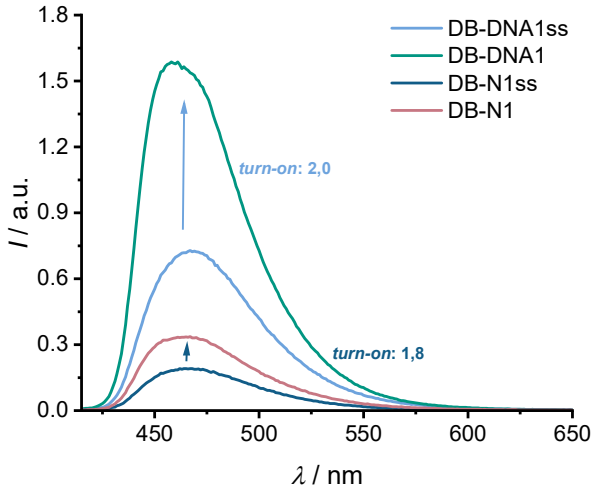


*Abbildung 65: Fluoreszenzspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1**, **DB-N1ss** und **DB-N1**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C.*

Der *Turn-On* von **DB-N1ss** zu **DB-N1** beträgt 1,8 und von **DB-DNA1ss** zu **DB-DNA1** 2,0. Der *Light-Up*-Effekt konnte durch den Einsatz von NI nicht erhöht werden. Der PET von NI über eine Base hinweg zu **DB** findet sowohl im Einzelstrang als auch im Doppelstrang statt. Aufgrund des *Quenchings* durch den PET im Duplex wurde der Abstand zwischen **DB** und NI von einer auf zwei Basen in **DB-N2ss** erweitert. Durch die Abstandserweiterung soll der PET zwar im Einzelstrang weiterhin stattfinden, jedoch im Duplex unterbunden werden. **DB-N2ss** zeigt im Vergleich zu **DB-DNA1ss** eine deutlich niedrigere Fluoreszenz. Dies zeigt, dass der PET von NI und **DB** im flexiblen Einzelstrang auch bei einem vergrößerten Abstand von zwei Basen stattfindet. Die Fluoreszenz von **DB-N1ss** und **DB-N2ss** ist nahezu identisch, was zeigt, dass das *Quenching* im Einzelstrang über zwei Basen vergleichbar ist wie für eine trennende Base. Im Gegensatz zu **DB-N1** steigt die Fluoreszenz in **DB-N2** deutlich an. Die Fluoreszenzintensität ist auch in diesem mit NI-modifizierten Duplex niedriger als bei **DB-DNA1**, jedoch ist der Fluoreszenzanstieg im Vergleich zu **DB-N2ss** signifikant (Abbildung 66).

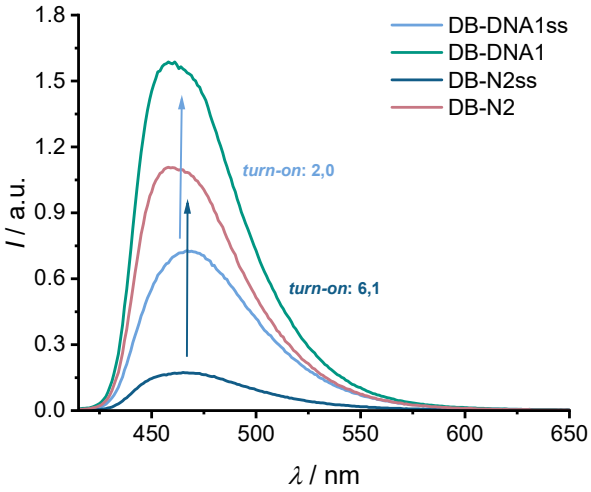


*Abbildung 66: Fluoreszenzspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1**, **DB-N2ss** und **DB-N2**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C.*

Der *Turn-On* von **DB-N2ss** zu **DB-N2** beträgt 6,1. Dieser *Light-Up* übersteigt den Wert von 2,0, welcher für **DB** ohne NI in **DB-DNA1ss** zu **DB-DNA1** erreicht wurde. Zwar ist das *Quenching* im Duplex auch durch die Abstandserweiterung noch leicht vorhanden, jedoch ist im Einzelstrang das *Quenching* der Fluoreszenz so stark ausgeprägt, dass der *Light-Up* enorm gesteigert werden konnte. Damit zeigt **DB-N2ss** durch Hybridisierung den höchsten *Turn-On* mit einem Wert von 6,1 der in dieser Arbeit vermessenen Oligonukleotide. Im Gegensatz zu **CV2** ist für **DB** die Abstandserweiterung von einer auf zwei Basen für NI-basierte *Light-Up* Sonden eine Verbesserung. Der *Turn-On* konnte von 1,8 für **DB-N1ss** zu 6,1 für **DB-N2ss** erhöht werden (Tabelle 7). Die Ergebnisse dieser Messungen weisen darauf hin, dass **DB** über einen größeren Abstand einen effizienten PET mit NI eingehen kann als **CV2**.

Tabelle 7: Turn-On der Fluoreszenz von einzelsträngiger DNA zum zugehörigen Duplex, Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F und Schmelztemperaturen T_m der CV2- und DB-modifizierten Nitroindol-Sonden.

	Turn-On	Φ_F / %	T_m / °C
CV2-N1ss	-	4,2	-
CV2-N1	5,0	20,0	58,0
CV2-N2ss	-	9,2	-
CV2-N2	3,1	27,4	54,5
DB-N1ss	-	9,0	-
DB-N1	1,8	15,2	59,5
DB-N2ss	-	8,1	-
DB-N2	6,1	47,4	56,5

Ein möglicher Grund hierfür könnten die unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften der beiden Fluorophore sein. Die Effizienz des PET hängt nicht nur vom Abstand, sondern auch durch die energetische Lage ab. Entscheidend dafür sind die Redoxeigenschaften vom Donor-Akzeptor-Paar. Da NI aufgrund der elektronenziehenden Nitrogruppe als Elektronenakzeptor wirkt, kann von einem angeregten Fluorophor ein Elektron übertragen werden.[201] Eine mögliche Erklärung ist, dass **DB** leichter oxidierbar ist, wodurch der PET auch über zwei Basen hinweg abläuft, während dieser Mechanismus für **CV2** nur mit einer Base Abstand stattfindet. Neben den elektronischen Eigenschaften der Fluorophore im angeregten Zustand hängen Elektronentransferprozesse in DNA von der Stapelung der Basen ab. Eine stärkere Einbettung des Fluorophors in den Basenstapel begünstigt den Ladungstransfer.[145, 202, 203] Aufgrund des ionischen Charakters von **DB** könnte dieser Fluorophor besser in den Basenstapel interkalieren, wodurch der Elektronentransfer über einen größeren Abstand in der DNA ablaufen kann.[145] Die Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss der DNA auf die photophysikalischen Eigenschaften der integrierten Fluorophore. Durch die Abstandsvariation von Fluorophor und *Quencher* sowie die Einbettung in den Basenstapel einer Doppelhelix wird die Effizienz des PETs und somit auch der fluoreszente *Read-Out* gesteuert.

4.3 Bestimmung der Oxidationspotentiale und Abschätzung zur freien Enthalpie

Das *Quenching*-Verhalten von **CV2** und **DB** ist in den NI-Sonden unterschiedlich stark ausgeprägt und ist vom Abstand zwischen Fluorophor und *Quencher* abhängig. Für **CV2** wurde der ausgeprägteste *Light-Up* durch Hybridisierung erhalten, sollte eine Base zwischen **CV2** und NI in der Sequenz vorhanden sein. **DB** zeigt ein abweichendes Verhalten. Für diesen Fluorophor ist ein Abstand von zwei Basen ideal, während bei lediglich einer trennenden Base das ausgeprägte *Quenching* auch nach der Hybridisierung erhalten bleibt. Zur Aufklärung dieser unterschiedlichen Abstandsabhängigkeit wurde der elektronische Mechanismus des PET untersucht. Entscheidend ist hierbei die Triebkraft des elektronischen Übergangs vom Donor auf den Akzeptor.[204, 205] Eine Abschätzung der Effizienz dieses Prozesses kann für eine Erklärung der Abstandsabhängigkeiten genutzt werden. Für die Untersuchung der Triebkraft des PET wurde das Oxidationspotential von **CV2** und **DB** mittels Cyclovoltammetrie bestimmt. Die Messungen wurden von JEROME WAGNER aus dem Arbeitskreis BRÄSE am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt. Mit dem erhaltenen Potential und der REHM-WELLER-Gleichung kann die thermodynamische Triebkraft bestimmt werden.[205, 206] Sowohl **CV2** als auch **DB** gehen mit NI ein oxidatives *Quenching* ein, weshalb das erste Oxidationspotential für dieses System entscheidend ist.[205] Stellvertretend für **CV2** und **DB** wurden die Fluorophore **7b** und **15**

vermessen. Die NI-Sonden wurden in wässriger Lösung getestet, während die Oxidationspotentiale der Fluorophore **7b** und **15** in Acetonitril bestimmt wurden. Zudem kann die lokale Umgebung durch Einbettung in die DNA die Redoxpotentiale beeinflussen.[207, 208] Diese Näherung erlaubt dennoch eine Abschätzung, ob und mit welcher Effizienz der PET abläuft (Abbildung 67).

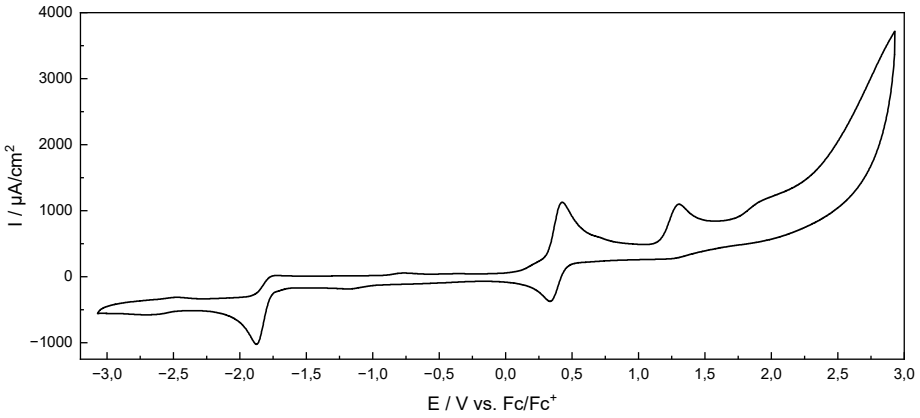


*Abbildung 67: Cyclovoltammogramm von **7b** aufgenommen in einer 0,1 M Elektrolytlösung aus $TBAPF_6$ in MeCN gegen Fc^+/Fc in Volt (V).*

Der Fluorophor **7b** zeigt ein Oxidationspotential von $E_{ox}(\mathbf{7b}^{\cdot+}/\mathbf{7b})$=+0,38 V vs. Fc^+/Fc. Der Fluorophor **15** zeigt dagegen ein deutlich niedrigeres Oxidationspotential von $E_{ox}(\mathbf{15}^{\cdot+}/\mathbf{15})$=+0,03 V vs. Fc^+/Fc (Abbildung 68).

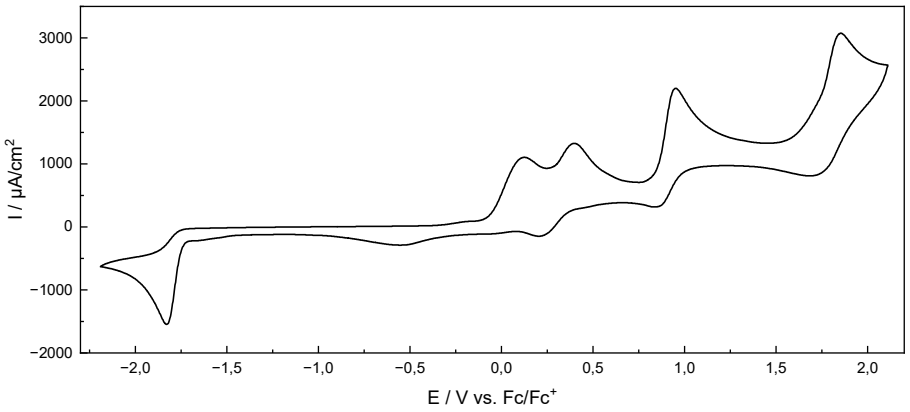


*Abbildung 68: Cyclovoltammogramm von **15** aufgenommen in einer 0,1 M Elektrolytlösung aus $TBAPF_6$ in MeCN gegen Fc^+/Fc in Volt (V).*

Im Gegensatz zu **7b** zeigt **15** ein irreversibles Potential. Mithilfe der REHM-WELLER-Gleichung kann die Änderung der freien Enthalpie ΔG_{PET} des Elektronentransfers ermittelt werden. Dabei wird

das Reduktionspotential des Akzeptors ($E_{red}(A)$), das Oxidationspotential des Donors ($E_{ox}(D)$), die Anregungsenergie (E_{00}) und der Coulomb-Term (E_C) einbezogen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen im Radikalionpaar werden durch E_C beschrieben, welche in polaren Lösungsmitteln jedoch gering sind (< 100 mV) und deswegen vernachlässigt werden *(3)*. Ein negativer ΔG_{PET} gibt an, dass ein Prozess thermodynamisch begünstigt ist und spontan abläuft.[204]

$$\Delta G_{PET} = e[E_{ox}(D) - E_{red}(A)] - E_{00} + E_C \qquad (3)$$

Es erfolgte eine Umrechnung auf das Potential der Standard-Wasserstoffelektrode (SHE).[209] Für **7b** ergibt sich dadurch $E_{ox}(\mathbf{7b}^{\cdot+}/\mathbf{7b})$=+1,02 V vs. SHE und für **15** $E_{ox}(\mathbf{15}^{\cdot+}/\mathbf{15})$=+0,67 V vs. SHE.[209] Das Reduktionspotential von NI ist literaturbekannt und beträgt $E_{red}(NI^{\cdot-}/NI)$=-0,30 V vs. SHE.[201] Die Abschätzung der HOMO-LUMO-Lücke erfolgte durch die Bestimmung der Schnittpunkte der normierten Absorption gegen die normierte Fluoreszenz der jeweiligen Duplexe (**DNA1**).

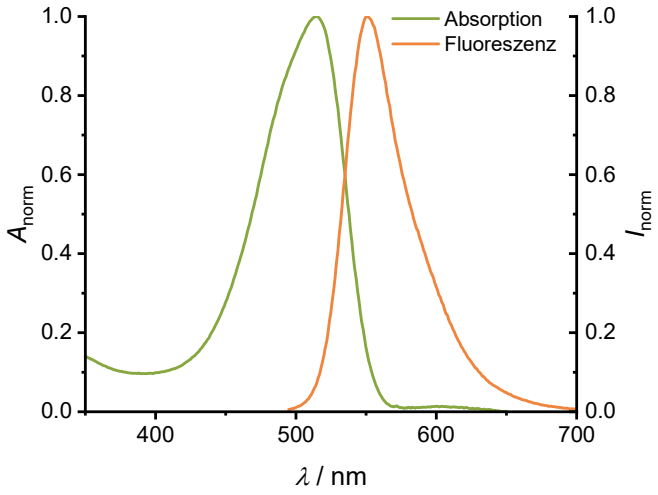


*Abbildung 69: normierte Absorption und normierte Fluoreszenz von **CV2-DNA1**; 2,5 µM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, λ_{exc}=480 nm.*

Der Schnittpunkt für **CV2** liegt bei λ=535 nm (Abbildung 69), womit sich die HOMO-LUMO-Lücke berechnen lässt (Formel 4).

$$E_{00}(CV2) = \frac{hc}{\lambda_{00}(nm)} = \frac{1240\ eV * nm}{535\ nm} = 2{,}32\ eV \qquad (4)$$

Es wird eine HOMO-LUMO-Lücke für **CV2** von 2,32 eV erhalten.

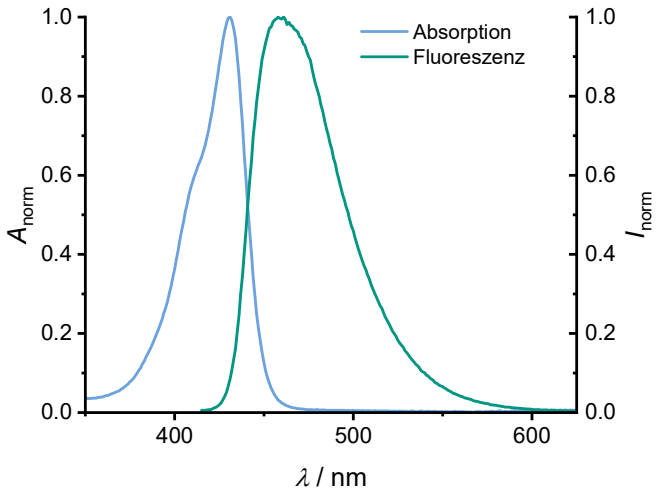


*Abbildung 70: normierte Absorption und normierte Fluoreszenz von **DB-DNA1**; 2,5 µM in ddH₂O, 10 mM NaPᵢ, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, λ_{exc}=400 nm.*

Im Gegensatz dazu schneiden sich die normierte Absorption und die normierte Fluoreszenz bei **DB-DNA1** bei λ=441 nm (5).

$$E_{00}(DB) = \frac{hc}{\lambda_{00}(nm)} = \frac{1240\ eV * nm}{441\ nm} = 2{,}81\ eV \qquad (5)$$

Damit wird eine HOMO-LUMO-Lücke für **DB** von 2,81 eV erhalten. Mit den berechneten Energien lässt sich die Differenz der freien Enthalpie des PET für **CV2** (6) und **DB** (7) berechnen:

$$\Delta G_{PET}(CV2) = e[1{,}02\ V(CV2) - (-0{,}30\ V)(NI)] - 2{,}32\ eV + \mathrm{E}_C = -1{,}00\ eV \qquad (6)$$

$$\Delta G_{PET}(DB) = e[0{,}67\ V(DB) - (-0{,}30\ V)(NI)] - 2{,}81\ eV + \mathrm{E}_C = -1{,}84\ eV \qquad (7)$$

Mit den aus der REHM-WELLER-Gleichung ermittelten Triebkräften kann gezeigt werden, dass für beide Systeme der PET vom Fluorophor auf das NI thermodynamisch begünstigt ist und spontan abläuft. Der Vergleich der beiden Fluorophore zeigt, dass die Differenz der freien Enthalpie für **15** (-1,84 eV) deutlich exergonischer ist als bei **7b** (-1,00 eV). Damit ist der Elektronentransfer im **DB**-System stärker begünstigt und deutet daraufhin, dass Elektronentransferprozesse auch über größere Distanzen noch ablaufen können, da die Rate des Elektronentransfers mit zunehmender

negativer freier Enthalpie steigt.[206, 210] Die ermittelten Differenzen der thermodynamischen Triebkräfte des Elektronentransfers ist konsistent mit dem Fluoreszenzverhalten der Oligonukleotide. Somit ist die Effizienz des PET nicht nur durch die Distanzänderung vom Einzelstrang zum Duplex, sondern auch durch die unterschiedlichen Oxidationspotentiale der Fluorophore beeinflussbar. Der Elektronentransfer und dadurch auch der fluoreszente *Read-Out* können somit durch den Abstand von Fluorophor und NI, als auch durch die Wahl des Fluorophors gesteuert werden.

4.4 Zusammenfassung der Nitroindol-Sonden

Die untersuchten NI-Sonden zeigen, dass die Integration von **CV2** oder **DB** mit NI in einen Einzelstrang eine Hybridisierung durch einen Anstieg der Fluoreszenz detektieren können. Der Abstand zwischen den redoxaktiven Spezies sowie die elektronischen Eigenschaften des Fluorophors beeinflussen dabei den *Read-Out* signifikant. Für **CV2** konnte die Emission durch NI im Einzelstrang mit einer trennenden Base effizient gelöscht werden, während eine Hybridisierung zu einer Erhöhung des Abstands und somit zu einem *Light-Up*-Effekt führte. Bei der Einführung von zwei Basen als Abstand wurde der PET selbst im Einzelstrang unterbunden, wodurch der *Light-Up*-Effekt durch Hybridisierung stark eingeschränkt wurde. Dadurch wurde gezeigt, dass die ideale Anordnung für **CV2** und NI für eine hybridisierungssensitive DNA-Sonde eine Base zwischen den redoxaktiven Gruppen ist. Für **DB**-basierte NI-Sonden zeigt sich dagegen ein anderes Bild. Das PET-induzierte *Quenching* konnte durch Hybridisierung nicht aufgehoben werden, sollte eine trennende Base vorhanden sein, wodurch in diesem System der *Light-Up* stark eingeschränkt beobachtet werden konnte. Der Einzelstrang mit zwei trennenden Basen zeigte ebenfalls eine stark reduzierte Emission, welche jedoch durch Hybridisierung aufgehoben werden konnte. Der Abstand von zwei trennenden Basen ist somit die geeignete Anordnung von **DB** und NI für eine hybridisierungssensitive DNA-Sonde. Zur Ermittlung der Effizienz des PET wurden die Oxidationspotentiale der Fluorophore mittels Cyclovoltammetrie ermittelt und anschließend die Differenz der freien Enthalpie mithilfe der REHM-WELLER-Gleichung bestimmt. Im Unterschied zu den in Wasser untersuchten Oligonukleotiden wurden die freien Fluorophore in Acetonitril gemessen, weshalb dies eine Näherung darstellt. Durch diese Bestimmung konnte gezeigt werden, dass die Elektronentransferprozesse für beide Fluorophore thermodynamisch begünstigt sind und daher spontan ablaufen. Zudem besitzt **DB** eine negativere Triebkraft für diesen Prozess als **CV2** (Abbildung 71).

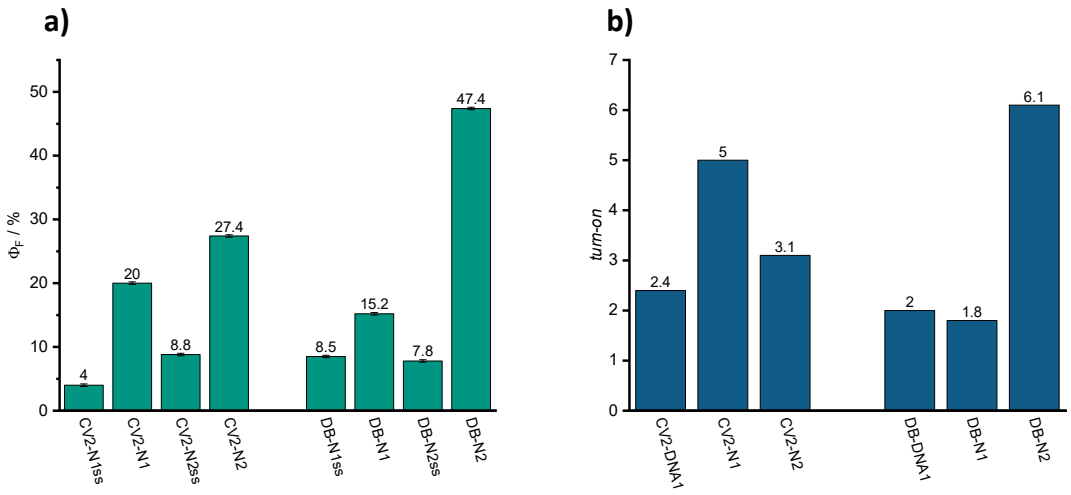


*Abbildung 71: a) Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F von **CV2-N1ss**, **CV1-N1**, **CV2-N2ss**, **CV2-N2**, **DB-N1ss**, **DB-N1**, **DB-N2ss** und **DB-N2**; b) Turn-On der Duplexe **CV2-DNA1**, **CV2-N1**, **CV2-N2**, **DB-DNA1**, **DB-N1** und **DB-N2** zu ihren jeweiligen Einzelsträngen*

Neben den Redoxeigenschaften der Fluorophore und des *Quenchers* beeinflusst das DNA-Gerüst die Emission. Die räumliche Anordnung des PET-Paares innerhalb der Sequenz und die strukturellen Unterschiede zwischen dem flexiblen Einzelstrang und der Doppelhelix verändern den Abstand und die Orientierung zueinander, wodurch die Effizienz des PET gesteuert wird.

5. DNA-Nanopartikel als Transportsystem in HeLa-Zellen

Die Transfektion von Nukleinsäuren in Zellen ist von großem Interesse für die zellbiologische Forschung sowie für diverse medizinische Behandlungen.[211, 212] Beispielsweise werden bei der Gentherapie DNA-Moleküle eingebracht, um defekte Gene einer Genkrankheit auszugleichen und somit die Symptome eines Krankheitsbilds zu reduzieren.[213] Neben Ansätzen der Gentherapie haben sich mRNA-Impfstoffe seit der COVID-19-Pandemie etabliert.[214, 215] Trotz mehrerer Anwendungsmöglichkeiten ist das Potenzial nukleinsäurebasierter Medizin jedoch noch nicht vollständig ausgeschöpft. Die erste Hürde, die eine Nukleinsäure überwinden muss, um an den Zielort in der Zelle zu gelangen, ist die Zellmembran. Die negative Ladung der Zellmembran ermöglicht keine passive Aufnahme der ebenfalls negativ geladenen Oligonukleotide.[216] Ein weiteres Problem ist die geringe Stabilität in Zellen, da freie Nukleinsäuren durch Nukleobasen abgebaut werden.[216, 217] Daher benötigt die Aufnahme ein geeignetes Transportsystem, welches die Penetration der Zellmembran ermöglicht, eine intrazelluläre Freisetzung am Zielort gewährleistet und nicht zelltoxisch wirkt. Ein möglicher Ansatz bieten *inorganic-organic* Hybridnanopartikel (IOH-NPs), welche aus anorganischen Kationen und organischen Anionen bestehen. Die Synthese dieser Alternative lässt sich in Wasser durchführen.[218, 219] Das Ziel der vorliegender Arbeit ist die Entwicklung DNA-basierter IOH-NP, welche als Transportsystem für DNA als auch für RNA in HeLa-Zellen eingesetzt werden sollen.

5.1 Synthese der DNA-Nanopartikel

Für die Herstellung und Analyse der IOH-NP wurden zwei unterschiedliche DNA-Stränge verwendet. Für die Bestimmung der Zusammensetzung wurde die Sequenz **G-DNA1ss** synthetisiert, welche ausschließlich aus natürlichen Nukleobasen besteht. Für die zellbiologischen Tests wurde eine mit **TO** versehene Sequenz **TO-DNA1ss** synthetisiert. Der Fluorophor ist dabei über den flexiblen (*S*)-3-Amino-1,2-propandiollinker verknüpft. Die Synthese dieses TO-DNA-Bausteins wurde im Rahmen meiner Masterarbeit entwickelt.[252] Die Synthese der IOH-NP basiert auf den elektrostatischen Wechselwirkungen der negativ geladenen Phosphate des Rückgrats der DNA mit positiv geladenen Metallionen. Als kationische Spezies wurde das Zirkonyl-Ion gewählt, da dieses bereits mit der Phosphatgruppe des Therapeutikums Gemicitabin IOH-NP bildete und in Zellen transfiziert wurde.[219] Durchgeführt wurde die Synthese in Kooperation mit KAI-CHING FAN aus dem Arbeitskreis FELDMANN am Institut für Anorganische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Die Analyse der Nanopartikel wurde von KAI-CHING FAN durchgeführt. Zunächst wurden die DNA-Sequenzen in ddH_2O gelöst,

bevor durch die Injektion und Rühren eine wässrige Lösung von Zirkonylchlorid zugegeben wurde.[220, 221] Die Aufreinigung erfolgte durch wiederholte Zentrifugation und Waschen mit ddH_2O. Die Größe der erhaltenen IOH-NP wurde per SEM und DLS bestimmt. Die SEM-Aufnahmen zeigten sphärische Nanopartikel mit etwa 40 +- 10 nm, während die DLS-Analyse einen hydrodynamischen Durchmesser von 70-80 nm aufwiesen. Der Unterschied in der Größe ist auf eine hydratisierte Oberfläche in wässriger Lösung bei der DLS-Messung zurückzuführen.[222, 223] Eine hohe Stabilität bei physiologischem pH lieferte die Messung des Zeta-Potentials von etwa -60 mV. [223, 224] Es konnte eine Zusammensetzung von $[ZrO]_{16}$[**G-DNA1ss**] bestimmt werden (Abbildung 72).

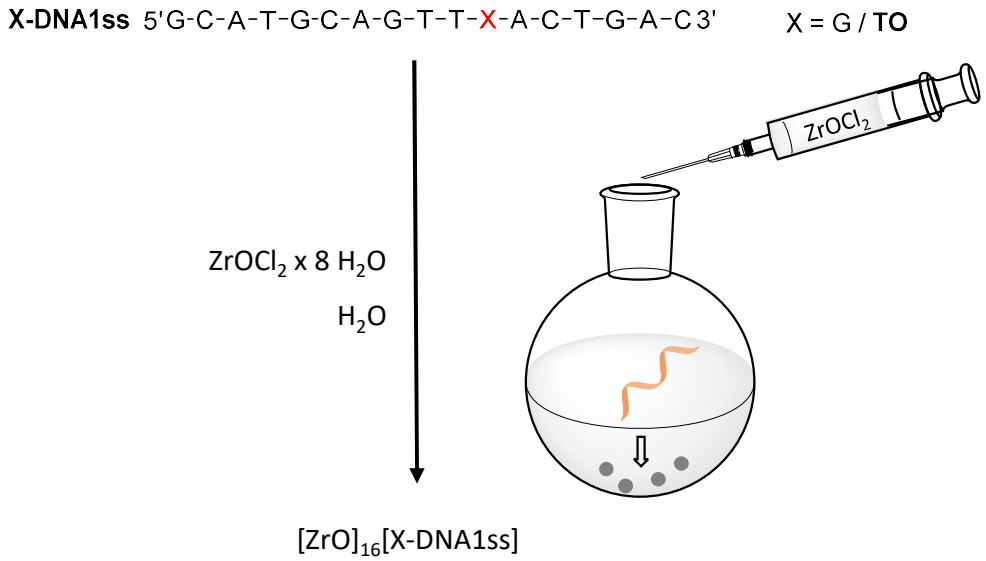


*Abbildung 72: Synthese der DNA-IOH-NP durch die Injektion von $ZrOCl_2$ zur **X-DNA1ss** in ddH_2O.*

G-DNA1ss enthält 17 Phosphate, was näherungsweise der Anzahl der Kationen entspricht. Es ist davon auszugehen, dass die ZrO^{2+}-Ionen bevorzugt an die Phosphatgruppen binden und zusätzliche Wechselwirkungen mit den Nukleobasen der DNA auftreten, wie sie bereits für anderen Metallionen beobachtet wurden.[225] Die wichtigsten Bindungsstellen sind dabei die N7-Position von Guanin, N7 und N1 von Adenin sowie N3 und O2 von Cytosin und O2 und O4 von Thymin.[225, 226] Durch die Zugabe von einem 20-fachen Überschuss an Na_2HPO_4 konnte TO-DNA-NP wieder in Lösung gebracht werden, da $[HPO_4]^{2-}$ eine stärkere Wechselwirkung mit $[ZrO]^{2+}$ im Vergleich zur DNA eingeht. Die freigesetzte und intakte **TO-DNA1ss** konnte anschließend per Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Die Analyse wurde auf die fluoreszenzmarkierte DNA-Sequenz **TO-DNA1ss** übertragen, welche eine vergleichbare Größe und Stabilität aufwiesen und für weitere biologische Zelltests eingesetzt wurden.

5.2 Transfektion der DNA IOH-NP

Die Transfektion der DNA-IOH-NP wurde unter der Anleitung von JULIANA OTT aus dem Arbeitskreis SCHEPERS am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) an HeLa-Zellen untersucht. Die Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten DNA-IOH-NP erfolgte mit einer Konzentration von 50 µg/mL. Auf eine Zugabe eines zusätzlichen Transfektionsreagenz wurde verzichtet. Um eine erfolgreiche Aufnahme der fluoreszenzmarkierten DNA-IOH-NP nachzuweisen, wurden die Zellen nach 2 h, 6 h und 24 h mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (λ_{exc}=490 nm). Nicht transfizierte NP wurden vor der Mikroskopie entfernt, um eine fehlerhafte Detektion auszuschließen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h konnte eine leichte Fluoreszenz des integrierten TO Fluorophors beobachtet werden. Nach 6 h Inkubation kann eine Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden, was auf eine fortschreitende Aufnahme über einen längeren Zeitraum deutet. Die abschließende Fluoreszenzmikroskopie nach 24 h zeigte eine stark ausgeprägte Fluoreszenz in nahezu allen Bereichen der Zelle. Die Analyse der Aufnahme zu verschiedenen Zeitpunkten zeigt eine effiziente und zeitabhängige Aufnahme der DNA-IOH-NPs (Abbildung 73).

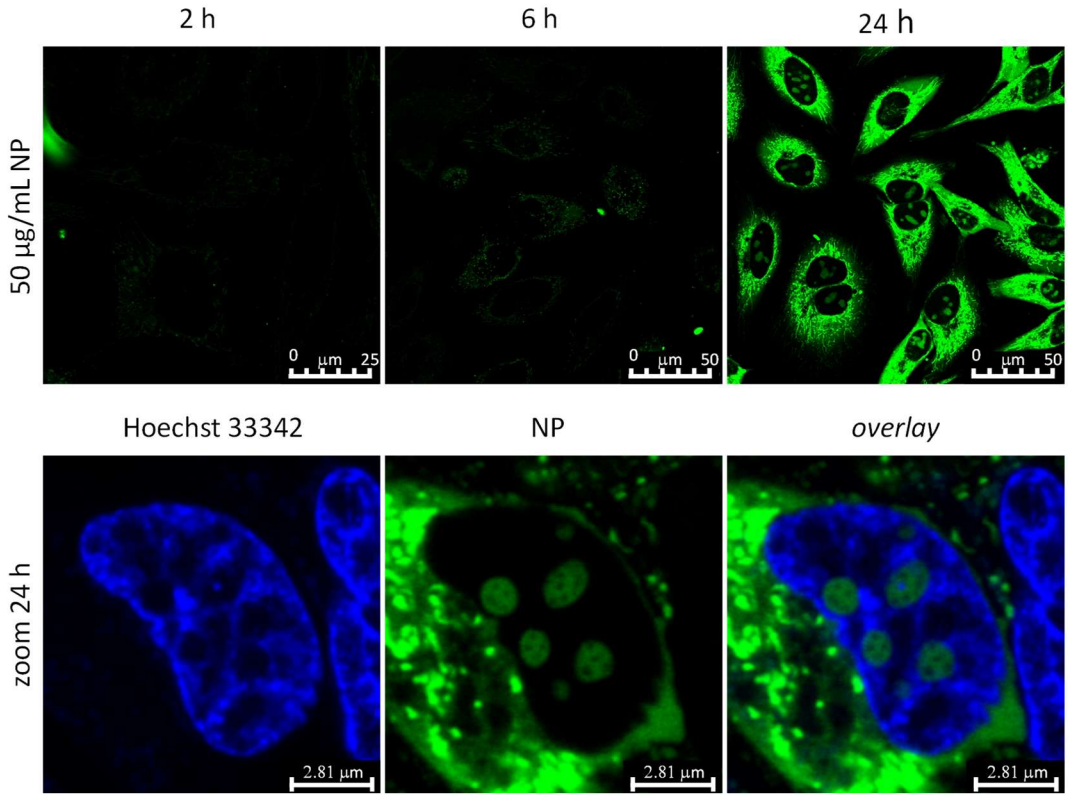


Abbildung 73: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von a) HeLa-Zellen nach 2 h, 6 h und 24 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 µg/mL; λ_{exc}=490 nm) b) zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst 33342 nach 24 h (λ_{exc}=405 nm).

Durch die Fluoreszenzmikroskopie konnte die zelluläre Aufnahme der Hybridnanopartikel nachgewiesen werden, jedoch konnte hierbei ihre intrazelluläre Lokalisation noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Bestimmung der subzellulären Verteilung ist essenziell, um die Überführung der DNA in das Zytoplasma nachzuweisen. Nur durch diesen Schritt wird der Zugang zum Zellkern ermöglicht, welcher die Voraussetzung für eine anschließende Genexpression bildet. Die Untersuchung der exakten subzellulären Lokalisation wurde durch Kolokalisationsstudien durchgeführt. Hierfür wurde der Zellkern mit dem Hoechst 33342-Farbstoff angefärbt. Durch anschließende Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Überlagerung der TO Fluoreszenz mit der des Zellkernmarkers in den Bereichen der Nukleoli festgestellt werden. Dies weist daraufhin, dass die Nanopartikel in die Nukleoli des Zellkerns transportiert werden (Abbildung 73). Neben dem Zellkern wurden die Mitochondrien mit einem *MitoTracker* markiert. Im *Overlay* der Fluoreszenzen zeigt sich eine klare Überlagerung von TO und dem *MitoTracker*. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die NP wie der *MitoTracker* in unmittelbarer Nähe zur inneren Membran Mitochondrien lokalisiert sind und somit in die Mitochondrien der Zelle aufgenommen werden (Abbildung 74).

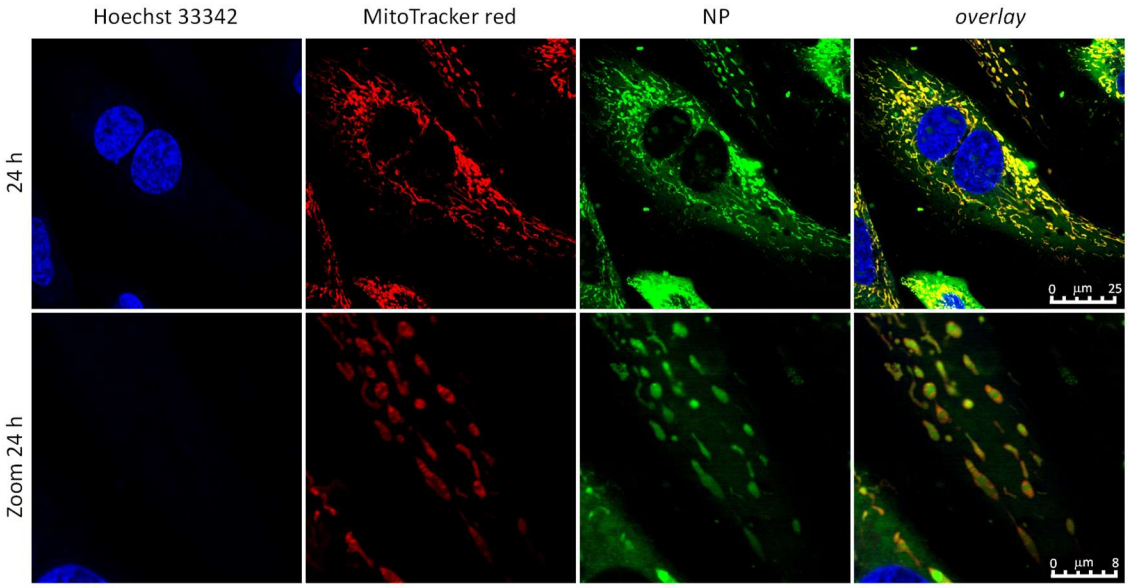


Abbildung 74: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den angefärbten Zellkompartimenten von HeLa-Zellen nach 24 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 µg/mL); Zellkern angefärbt mit Hoechst 33342 (λ_{exc}=405 nm), Mitochondrien angefärbt mit MitoTracker red (λ_{exc}=573 nm), Transfektion von TO-DNA-NP (λ_{exc}=490 nm); Overlay der Fluoreszenz der TO-DNA-NP und dem Mitotracker red.

Zuletzt wurde das Lysosom angefärbt, da die Aufnahme von Nanopartikeln häufig über den endozytotischen Weg erfolgt. Hierbei konnte keine Co-Lokalisation mit den NP festgestellt werden. Da die NP nicht in den Lysosomen lokalisiert sind, scheint die Aufnahme nicht über den klassischen endozytotischen Weg abzulaufen oder nach der Aufnahme zeitnah aus den lysosomalen Kompartimente zu entweichen (Abbildung 75).

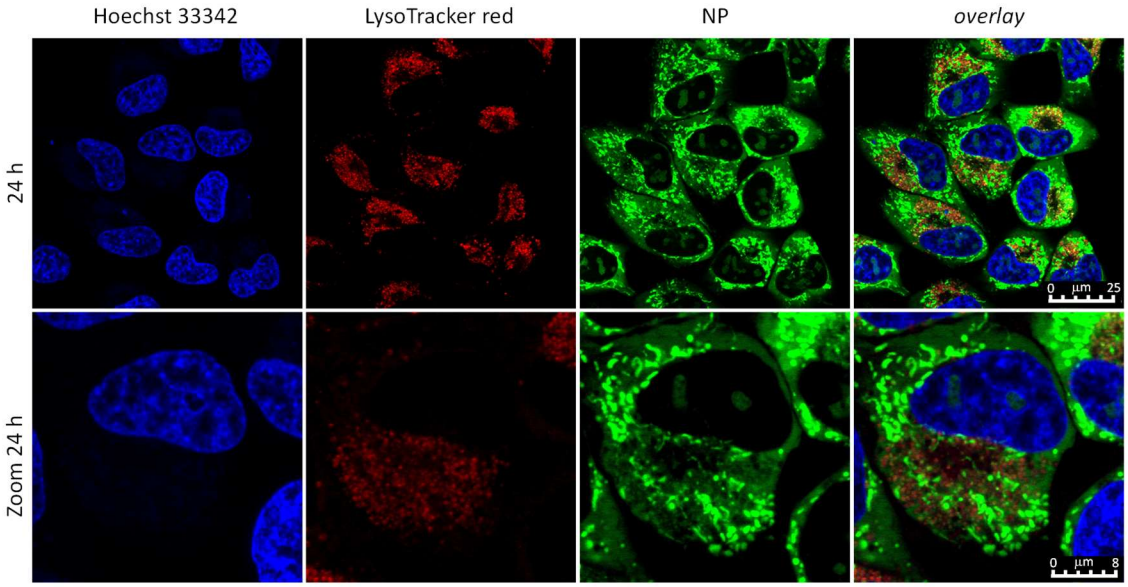


Abbildung 75: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den angefärbten Zellkompartimenten von HeLa-Zellen nach 24 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 µg/mL; Zellkern angefärbt mit Hoechst 33342 (λ_{exc}=405 nm), Lysosom angefärbt mit Lysotracker red (λ_{exc}=573 nm), Transfektion von TO-DNA-NP (λ_{exc}=490 nm); Overlay der Fluoreszenz der TO-DNA-NP und dem Lysotracker red.

Die zellbiologischen Tests zeigten, dass die synthetisierten DNA-IOH-NP effizient in Zellen aufgenommen werden und sich in verschiedenen Zellkompartimenten wie Zytoplasma, Nukleoli und Mitochondrien verteilen. Hervorzuheben ist, dass die Transfektion ohne die Zugabe eines zusätzlichen Transfektionsreagenz erfolgte. Die Zellviabilität nach Inkubation mit den DNA-IOH-NP wurde mit einem MTT-Test bestimmt. Dieses Verfahren dient zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen und erlaubt so Rückschlüsse auf ihre Zellviabilität. Lebende Zellen verstoffwechseln durch mitochondriale Aktivität das gelbe Tetrazoliumsalz MTT enzymatisch zu dem unlöslichen und violettem Formazan. Die gebildete Menge an Formazan ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen und damit zur Anzahl lebender Zellen. Um den Einfluss der NP auf die Viabilität von HeLa-Zellen zu testen, wurden unterschiedliche Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 h getestet. Die getesteten Konzentrationen lagen in einem Bereich von 0,05 bis 500 µg/mL und schließen damit die für die Zelltests eingesetzte Konzentration von 50 µg/mL ein. Die Auswertung des MTT-Tests zeigt, dass bis zu einer Konzentration von 100 µg/mL keine signifikante Reduktion der Viabilität zu beobachten ist. Die Behandlung der Zellen mit einer Maximalkonzentration von 500 µg/mL führte zu einer signifikanten Reduktion der metabolischen Aktivität auf 63 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Daraus lässt sich ein IC_{50}-Wert von näherungsweise 673 µg/mL berechnen. Trotz der hohen Dosierung wurde kein vollständiger Zelltod der Zellpopulation erreicht, was auf eine vergleichsweise geringe intrinsische Toxizität der Testsubstanz gegenüber dem verwendeten Zellmodell schließen lässt (Abbildung 76).

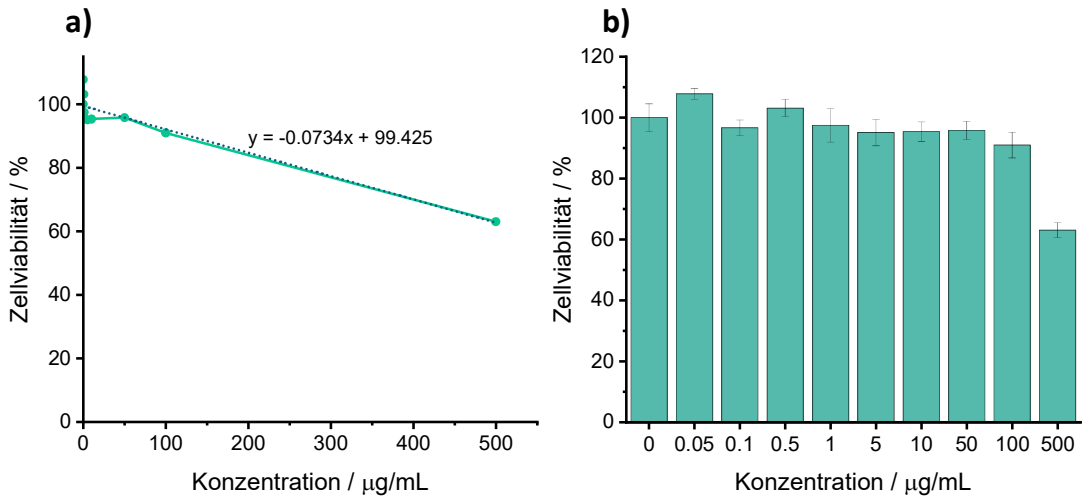
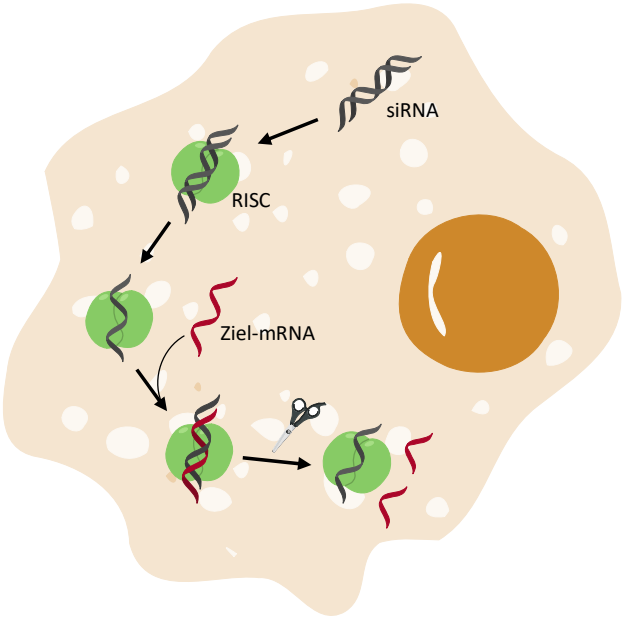


Abbildung 76: a) Zellviabilität in Abhängigkeit zur Konzentration der transfizierten TO-DNA-NP mit linearem Fit; b) Zellviabilität in Abhängigkeit zur Konzentration der transfizierten TO-DNA-NP als Balkendiagramm.

Durch die Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit des MTT-Tests konnte gezeigt werden, dass die für die zellbiologischen Test eingesetzte Konzentration von 50 µg/mL die Zellviabilität geringfügig beeinflusst und dass die DNA-IOH-NP somit eine geringe Zelltoxizität aufweisen.

5.3 *Gen-Knockdown* durch RNA-Nanopartikel

Das neu eingeführte zelluläre Transportsystem von DNA soll genutzt werden, um eine funktionale Nukleinsäure zu transfizieren und damit biologische Prozesse in HeLa-Zellen zu steuern. Hierfür wurde eine RNA-Sequenz gewählt, die die Genexpression regulieren soll. Genregulierende Ansätze auf Basis von RNA greifen direkt nach der Transkription in die Proteinbiosynthese ein und unterdrücken damit die Translation und somit die Bildung von Proteinen.[227] Grundlage hierfür ist die RNA-Interferenz (RNAi), welche einen natürlichen posttranskriptionalen Regulationsmechanismus darstellt.[4] Der Abbau geschieht durch die Erkennung doppelsträngiger RNA durch das Enzym *Dicer*, welches den Duplex spaltet und *small interfering RNAs* (siRNAs) erzeugt. Die siRNA bestehen aus einem *Sense*-Strang, welcher die Information des transkribierten Gens enthält und einem *Antisense*-Strang. Diese kurzen siRNA-Sequenzen gelangen anschließend in den *RNA-induced silencing complex* (RISC), der den Duplex in die Einzelstränge denaturiert. Als Erkennungssequenz verbleibt der *Antisense-Strang* der siRNA im RISC und bindet komplementäre mRNA. Wird Ziel-mRNA erkannt und gebunden, wird diese enzymatisch durch den RISC gespalten und durch RNAsen abgebaut. Eine anschließende Translation der mRNA in Peptide wird unterbunden, wodurch das entsprechende Protein von der Zelle nicht mehr gebildet wird. Die Genexpression wird unterdrückt (Abbildung 77).[228-230]



RNA-*Antisense* 5' g–a–a–c–u–u–c–a–g–g–g–u–c–a–g–c–u–u–g–c–g–g 3'

Abbildung 77: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von siRNA zur Spaltung von mRNA sowie die Sequenz der eingesetzten Antisense-RNA.

Aktuelle therapeutische Ansätze nutzen dieses Prinzip bereits für die Behandlung von Genkrankheiten.[227, 230] Optimierungsbedarf besteht hierbei in der Stabilität der RNA und eine effiziente zelluläre Aufnahme.[229, 231, 232] Aus diesem Grund wird das zuvor vorgestellte nanopartikelbasierte Transportsystem auf eine funktionale RNA angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Verwendung doppelsträngiger siRNA verzichtet, stattdessen wurde ein Ansatz basierend auf einzelsträngiger *Antisense*-RNA verfolgt. Das entwickelte Nanopartikel-Transportsystem wurde ausschließlich für einzelsträngige DNA untersucht, sodass unklar ist, ob dieses System auch Duplexe stabil bindet und nach der Aufnahme intakt freisetzt. Es wurden genetisch modifizierte GFP-HeLa-Zellen verwendet, die das *Green-Fluorescent-Protein* (GFP) produzieren. Die verwendete *Antisense*-RNA ist komplementär zur mRNA des GFP und durch Hybridisierung soll die codierende mRNA gebunden werden, wodurch die Translation an den Ribosomen nicht mehr durchgeführt werden kann. Die Transfektion der *Antisense*-RNA soll somit einen *Gen-Knockdown* auslösen, welcher über Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden soll. Ohne die Anwesenheit der *Antisense*-RNA wird das GFP produziert, wodurch eine grüne Fluoreszenz auftritt. Nach der Transfektion soll dieses Protein nicht weiter gebildet werden, wodurch die Fluoreszenz verschwindet.[233] Der Einsatz von einzelsträngiger RNA bietet ein vereinfachtes System im Vergleich zur RISC Bildung unter dem Einsatz von siRNA. Vorteile einzelsträngiger RNA ist die vereinfachte Synthese, Modifikation und Bereitstellung in großer Menge.[234, 235]

Für die Synthese sowie folgende Aufreinigungsschritte wurden analog zu den DNA-IOH-NP durchgeführt, jedoch wurde strikt unter RNAse freien Bedingungen gearbeitet. Es ist davon auszugehen, dass die strukturelle Ähnlichkeit von RNA zur DNA zu einem vergleichbaren Mechanismus der Partikelbildung führt und dadurch zu einer vergleichbaren Zusammensetzung. Die GFP-HeLa-Zellen wurden mit 50 µg/mL der RNA-IOH-NP transfiziert und für 48 h inkubiert. Per Fluoreszenzmikroskopie wurde auf eine mögliche Abnahme der GFP-Fluoreszenz überprüft. Zusätzlich wurde der Zellkern mit Hoechst 33342 angefärbt. Als Kontrolle dienten nicht behandelte Zellen (Abbildung 78).

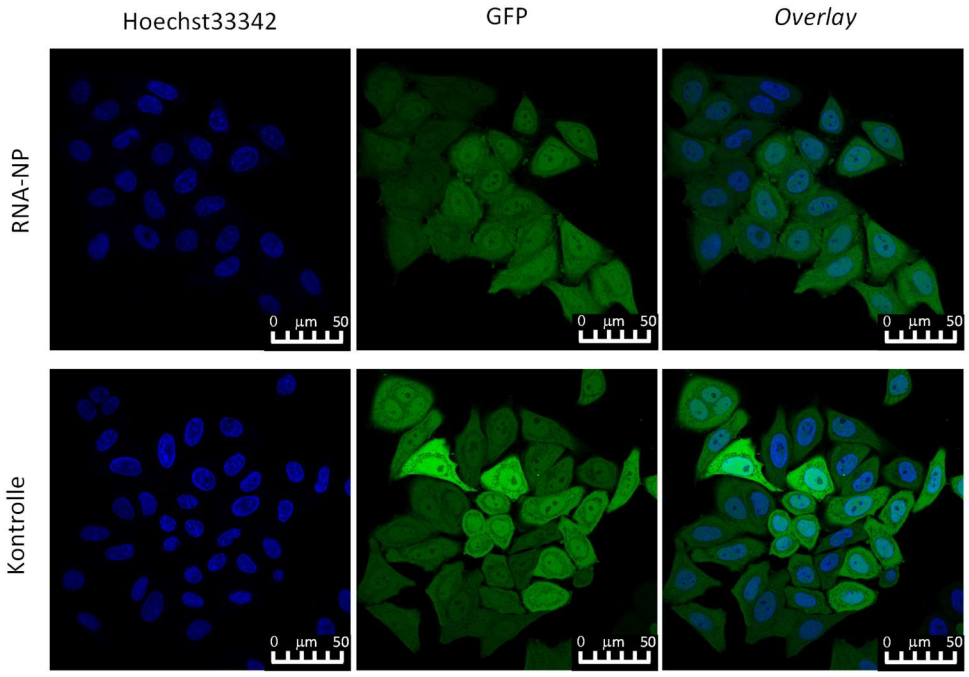


Abbildung 78: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen a) von GFP- HeLa-Zellen nach 48 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 µg/mL; λ_{exc}=490 nm) mit zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst 33342 und dem Overlay der beiden Kanäle; b) von GFP- HeLa-Zellen nach 48 h ohne Transfektion mit TO-DNA-NP mit zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst 33342 und dem Overlay der beiden Kanäle.

Die Analyse zeigte keine eindeutige Abnahme der Fluoreszenz. Sowohl die unbehandelte Kontrolle als auch die mit den RNA-IOH-NP behandelten GFP-HeLa-Zellen zeigen vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Der Gen-*Knockdown* durch die Transfektion der *Antisense*-RNA mittels Nanopartikel konnte unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben des gewünschten Effekts könnte der intrazelluläre Transport und die Lokalisation der RNA sein. Es ist denkbar, dass die RNA nach der Aufnahme nicht ausreichend an den Zielort gelangt oder in zellulären Kompartimenten verbleibt, in denen kein effektiver Kontakt zur Ziel-mRNA stattfinden kann. Dies wäre ein Unterschied in der intrazellulären Verteilung im Vergleich zur DNA, die durch Co-Lokalisation im Zytoplasma, im

Zellkern und in den Mitochondrien lokalisierbar war. Die Lokalisation der RNA könnte durch die Verwendung von ebenfalls fluoreszenzmarkierte RNA nachgewiesen werden. Neben der intrazellulären Akkumulation der RNA könnte ebenfalls der zugrunde liegende Wirkmechanismus für die ausbleibende Funktion verantwortlich sein. Die Transfektion einzelsträngiger RNA sollte die mRNA binden und dadurch eine Translation verhindern. Es könnte sein, dass die *Antisense*-RNA zwar zum Zielort gelangt, jedoch die Bindungseffizienz zur mRNA nicht ausreichend ist, um eine merkliche Abnahme der GFP-Fluoreszenz zu bewirken. Eine Alternative könnte der Einsatz doppelsträngiger siRNA darstellen. Bisher wurde noch nicht getestet, ob die DNA/RNA-IOH-NP Synthese sowie die folgende Transfektion ebenfalls mit Duplexen funktioniert, jedoch wäre dies ein möglicher Lösungsansatz. siRNA wäre in der Lage, die Ziel-mRNA enzymatisch zu spalten und somit die Genexpression zu unterdrücken.

5.4 Zusammenfassung der IOH-NP

Es wurde ein neues Transportsystem für die Transfektion von Nukleinsäuren basierend auf Zirkonylnanopartikel entwickelt und untersucht. Ziel war es, die Transfektion ohne die Zugabe eines zusätzlichen Transfektionsreagenz zu ermöglichen und somit die Zelltoxizität zu reduzieren. DNA wurde dafür mit kationischen ZrO^{2+}-Ionen zu IOH-NP synthetisiert. Als Zusammensetzung konnte $[ZrO]_{16}$[**G-DNA1ss**] bestimmt werden. Neben den elektrostatischen Wechselwirkungen von Phosphat und Zirkonium scheinen weitere Wechselwirkungen mit den Nukleobasen aufzutreten. Zellbiologische Tests an HeLa-Zellen zeigten eine zeitabhängige Aufnahme der fluoreszenzmarkierten TO-DNA-NP. Nach 24 h konnte per Fluoreszenzmikroskopie ein enormer Anstieg der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Lokalisationsexperimente zeigten eine intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel im Zytoplasma, sowie in den Nukleoli und den Mitochondrien. Im Lysosom konnte dies nicht beobachtet werden. Dies weist auf einen nicht endozytotischen Aufnahmeweg hin oder auf ein Verlassen der endosomalen Kompartimente nach der zellulären Aufnahme. Eine geringe Toxizität der verwendeten Konzentration der TO-DNA-NP konnte mit einem MTT-Test nachgewiesen werden. Erst weit über der für die Zelltests gewählten Konzentration konnte eine Abnahme der Zellviabilität festgestellt werden. Darauf aufbauend wurde eine funktionale RNA-Sequenz gewählt, die durch Transfektion einen Gen-*Knockdown* des GFP-Gens von genetisch modifizierten GFP-HeLa-Zellen auslösen sollten. Eine einzelsträngige *Antisense*-RNA wurde zu RNA-Nanopartikeln synthetisiert und transfiziert. Nach 48 h konnte jedoch keine merkliche Abnahme der Fluoreszenz des GFP festgestellt werden. Der Gen-*Knockdown* konnte unter den gewählten Bedingungen nicht realisiert werden.

Mögliche Ursachen sind dabei eine unzureichende intrazelluläre Lokalisation der *Antisense*-RNA an der mRNA des GFP-Gens oder eine nicht ausreichende Effizienz des zugrunde liegenden Wirkmechanismus. Die Lokalisation in den verschiedenen Zellkompartimenten konnte für die DNA-NP nachgewiesen werden, jedoch bleibt unklar, ob die RNA-NP in ausreichendem Maße an den Zielort gelangen. Zudem könnte die Bindungseffizienz einzelsträngiger *Antisense*-RNA an die mRNA nicht ausreichen, um die Genexpression signifikant zu unterdrücken. Eine effektive Hemmung könnte der Einsatz doppelsträngiger siRNA bewirken. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten sich auf die Transfektion funktionaler Nukleinsäuren sowie die Synthese und Charakterisierung doppelsträngiger Nukleinsäuren konzentrieren.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Entwicklung und Untersuchung fluoreszenter DNA-Architekturen durchgeführt. Die neuen Bausteine **CV1**, **CV2** und **DB** wurden in verschiedene DNA-Sequenzen integriert, um eine Steuerung der photophysikalischen Eigenschaften und der damit verbundenen Emission zu erreichen. Dadurch konnten wichtige Einflüsse, wie die Anzahl, die Positionierung und die relative Orientierung der Fluorophore zueinander, auf die optischen Eigenschaften aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die DNA die Emission maßgeblich beeinflusst und genutzt werden kann, um einen optischen *Read-Out* zu erhalten. Durch die Kontrolle der Fluorophore konnten elektronische Kopplungen, wie die Bildung von H-Aggregaten, in DNA gesteuert werden. Durch den Vergleich der Fluorophore wurde der Einfluss der konformationellen Flexibilität auf die Fluoreszenz deutlich. Die strukturelle Beweglichkeit von **CV1** führte zu strahlenden delokalisierten Zuständen mit bathochrom verschobener Fluoreszenz, während die cyclisierte Struktur von **CV2** vorwiegend zu nicht-strahlenden angeregten Zuständen und somit zu einem *Quenching* der Fluoreszenz führte. Die gewonnenen Erkenntnisse der Fluorophorwechselwirkungen von **CV1** in DNA wurden genutzt, um eine funktionale Detektionssonde für m^6A zu entwickeln. Dabei führten die lokalen strukturellen Veränderungen der Doppelhelix, die durch die Methylierung ausgelöst werden, zwar zu geringfügigen Unterschiede der Emission, jedoch konnte keine eindeutige Detektion erreicht werden. Der Cyaninfarbstoff **DB** wies ebenfalls eine Grundzustandskopplung auf, jedoch konnte keine stark bathochrom verschobene Fluoreszenz erhalten werden. Die Erkenntnisse der Steuerung von Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen leisten einen Beitrag zur Konzeption von funktionellen fluoreszenten Nukleinsäuresonden. Des Weiteren wurden Energietransferprozesse von einem Donor auf einen Akzeptor innerhalb einer DNA-Doppelhelix untersucht. **DB** wurde als Donor gewählt, während **CV1**, **CV2**, zwei Aminonaphthalimid- sowie ein TO-Baustein als Akzeptoren eingesetzt wurden. Für die beiden Aminonaphthalimide und für das TO konnte eine Abnahme der Donoremission sowie ein starker Anstieg der Akzeptoremission beobachtet werden, was auf einen effizienten Energietransfer schließen lässt. Im Falle der Akzeptoren **CV1** und **CV2** konnte eine Abnahme der Donoremission sowie eine bathochrome Wellenlängenverschiebung beobachtet werden. Die neu auftretende Emissionsbande deutet auf einen exciplexartigen Zustand hin. Neben der Wechselwirkung von zwei Fluorophoren wurde zudem die Auswirkung eines Nitroindols als *Quencher* untersucht. Als Fluorophore wurden **CV2** und **DB** eingesetzt, wobei der Einfluss des Abstandes zum integrierten Nitroindol durch eine Trennung von einer beziehungsweise zwei Basen untersucht wurde. Für **CV2** wurde der am stärksten ausgeprägte *Light-Up*-Effekt mit einer separierenden Base erhalten, während die geeignetste Anordnung für **DB** zwei trennende Basen war. Durch die spektroskopischen Analysen

der verschiedenen Positionierungen des Redox-Paares im DNA-Gerüst sowie elektrochemischen Analysen der Fluorophore konnte der zugrunde liegende Mechanismus untersucht werden. Neben der Untersuchung von potenziellen Nukleinsäuresonden wurde ein nicht toxisches Transportsystem für Nukleinsäuren in HeLa-Zellen entwickelt. Dafür wurden IOH-DNA-Nanopartikel synthetisiert, die ohne den Einsatz eines Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht werden konnten. Dabei konnte die erfolgreiche Aufnahme sowie die zelluläre Lokalisation im Zytoplasma, in den Mitochondrien sowie in den Nucleoli durch fluoreszenzmarkierte DNA nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein Gen-*Knockdown* von GFP in GFP-HeLa-Zellen durch die Transfektion von *Antisense*-RNA über den neu entwickelten Transportweg getestet. Es konnte kein *Knockdown* nachgewiesen werden, was möglicherweise durch die Lokalisation oder den Wirkmechanismus der eingebrachten RNA zurückzuführen ist. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass DNA-Architekturen in der Lage sind, elektronische Kopplungen, Energietransfermechanismen und Elektronentransferprozesse zu steuern. Zukünftige Forschung auf diesem Themengebiet könnte die Sensitivität des optischen *Read-Outs* für die Detektion von m^6A optimieren. Durch die Integration von *Spacern* wie Tetrahydrofuran- oder Propyl-Derivaten neben den Fluorophoren in **DNA4** würde die konformationelle Bewegungsfreiheit erhöht werden, wodurch die Fluorophore sich möglicherweise effizienter anordnen könnten. Dieser Ansatz könnte die Excimerbildung, ähnlich wie in **CV1-DNA2**, in der Detektionssonde begünstigen, wodurch ein eindeutiger Nachweis der lokal veränderten Struktur der Doppelhelix aufgrund der Methylgruppe möglich wäre (Abbildung 79 a)).[236-238] Des Weiteren könnte die ratiometrische Analyse des durch **DB** induzierten Energietransfers für funktionale Sonden genutzt werden. Insbesondere die Kombination von **DB** mit **CV1** oder **CV2** scheint ein geeignetes Fluorophor-Paar zu sein, um SNPs über einen fluoreszenten *Read-Out* zu detektieren. Alle in dieser Arbeit untersuchten Fluorophor-Wechselwirkungen, wie Excimerbildung, Energietransferprozesse sowie Elektronentransferprozesse, könnten in etablierte DNA-Sonden wie *Binary Probes*, *Molecular Beacons*, ECHO-Sonden oder *DNA Traffic Lights* integriert werden, um eine Zielsequenz zu detektieren. Zudem könnten die Systeme ebenfalls zu Detektion von Proteinen, Metaboliten, kleinen Molekülen oder Ionen in geeigneten Aptameren eingesetzt werden.[239-244] Die hybridisierungssensitiven Nitroindol-Sonden könnten zukünftig in biologischen Anwendungen, wie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Zebrafischen, eingesetzt werden, um spezifische Nukleinsäuren über ihre Fluoreszenz zu visualisieren.[245, 246] Besonders interessant wäre die Kombination der FRET-Paare in Nukleinsäuren mit dem neu entwickelten Transportsystem auf Nanopartikelbasis. Eine einzelsträngige funktionale RNA könnte mit einem FRET-Paar versehen werden, um das Ausbleiben des Gen-*Knockdown*-Versuchs aufzuklären. Über die Fluoreszenz könnten sowohl die intrazelluläre Lokalisation als auch der enzymatische Abbau der RNA in Echtzeit verfolgt werden. Ein weiterer Vorteil wäre die Entwicklung und Untersuchung

von doppelsträngiger siRNA für die Nanopartikel. siRNA ist in der Lage, den Abbau von mRNA des Zielgens zu induzieren, wodurch der Wirkmechanismus des *Knockdowns* weiter untersucht werden könnte. Ebenfalls wäre eine Anbringung eines FRET-Paares sinnvoll, da über die veränderliche Fluoreszenz ebenfalls die Lokalisation aber auch der Wirkmechanismus verfolgt werden könnte (Abbildung 79 b)).

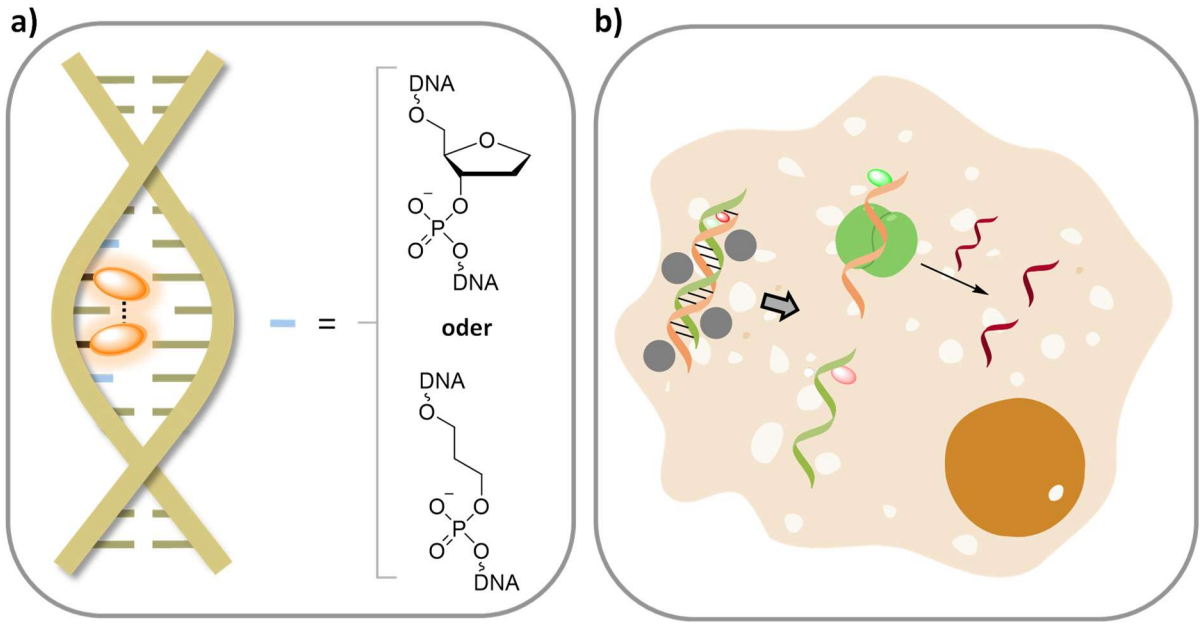


Abbildung 79: a) Positionierung von Spacern, um die konformationelle Flexibilität der Fluorophore einer m⁶A-Detektionssonde zu erhöhen, sowie die Strukturen der möglichen Tetrahydrofuran- und Propyl-Spacer; b) FRET-markierte siRNA als Nanopartikel zur Transfektion und mRNA-Abbau in Zellen.

Somit zeigt die vorliegende Arbeit, dass die photophysikalischen Eigenschaften von eingebrachten Fluorophoren in DNA-Architekturen gesteuert werden können, wodurch fluoreszente funktionelle Sonden für analytische und biologische Anwendungen entwickelt werden können.

7. Experimenteller Teil

7.1 Materialien und Methoden

Reagenzien

Die für die Synthesen und analytischen Untersuchungen verwendeten Reagenzien und Chemikalien wurden von ABCR, ACROS ORGANICS (THERMO FISHER SCIENTIFIC), ALFA AESAR, BLD PHARM, CARL ROTH, FLUKA, SIGMA-ALDRICH (MERCK), TCI und VWR (AVANTOR) bezogen. Die Substanzen wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Lösungsmittel

Die für die Synthese eingesetzten Lösungsmittel besaßen mindestens die Reinheitsstufe p.a. (*pro analysi).* Wasserfreie Lösungsmittel wurden von Fisher Scientific (ACROSEAL) bezogen und unter Argon-Atmosphäre, teilweise über Molekularsieb, gelagert. Für HPLC Aufreinigungen und analytische Untersuchungen wurden organische Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet. Deionisiertes Wasser wurde mittels einer Milli-Q Direct 8 Anlage (MERCK) erzeugt.

Reaktionsführung

Empfindliche Reaktionen gegenüber Luft und/oder Feuchtigkeit wurden unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon (ALPHAGAZ™ 1 Argon, 99,999%, AIR LIQUIDE) durchgeführt. Zur Gewährleistung wasserfreier und sauerstofffreier Bedingungen wurden die verwendeten Glasapparaturen vorab im Hochvakuum mit einem Heißluftföhn getrocknet und anschließend mehrfach mit Argon gespült.

Sofern keine Temperatur angegeben ist, erfolgten die Umsetzungen bei Raumtemperatur (RT). Reaktionen unter Erwärmung wurden unter Rühren mit einer beheizbaren Magnetrührplatte durchgeführt. Die Abtrennung der Lösungsmittel erfolgte unter vermindertem Druck mittels Rotationsverdampfer bei 40 °C. Lösungsmittel mit höherem Siedepunkt wurden bei 70 °C entfernt.

Flüssige Reagenzien wurden unter Verwendung von Kunststoffspritzen mit V2A-Stahlaknülen zugegeben. Feste Substanzen wurden als Pulver eingewogen und direkt in das Reaktionsgefäß überführt.

Die Überwachung des Reaktionsverlaufs erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (DC).

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für chromatographische Kontrollanalysen wurden Kieselgel-DC-Platten (Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0,25 mm, Aluminiumträger, MERCK) verwendet. Die Visualisierung UV-aktiver Substanzen erfolgte durch Bestrahlung bei 254 nm bzw. 366 nm, wobei die Detektion über Fluoreszenzlöschung des Indikators stattfand. Nicht UV-aktive Verbindungen wurden durch Erwärmen der Platte mit einem Heißluftföhn sichtbar gemacht.

Säulenchromatographie

Zur präparativen Aufreinigung wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 40-63 µm (SIGMA-ALDRICH) als stationäre Phase eingesetzt. Die Chromatographiesäulen wurden im Nasspackverfahren (*wet load*) vorbereitet oder adsorbiert mit Kieselgel (*dry load*) vorbereitet und mit Seesand (reinst, mit HCl gereinigt, BERND KRAFT) überdeckt. Als Eluenten dienten reine Lösungsmittel oder definierte Löungsmittelgemische. Mischungen wurden vor der Verwendung volumetrisch hergestellt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung mittels HPLC wurde an einem Ultimate 3000 System (THERMO FISHER SCIENTIFIC) durchgeführt. Das Gerät war ausgestattet mit einem Autosampler (SIL-10AD), einem Pumpenmodul (LC-10AD), einem Entgaser (DGU-14A), einem Säulenofen (CTO-10AS), einem Multidiodenarray-Detektor (SPD-M20A) sowie einer Steuereinheit (SCL-10A). Die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit der Software *Chromeleon.*

Die Chromatographie wurde bei einer Säulentemperatur von 40 °C und einer Flussrate von 2,50 mL/min durchgeführt.

NMR

Die NMR-Spektren wurden an einem BRUKER Avance 400 Spektrometer aufgenommen (^{1}H: 400 MHz, ^{13}C: 101 MHz). Als Lösungsmittel wurden deuterierte Lösungsmittel der Firma EURISO-TOP verwendet. Für die Messungen wurden etwa 5-10 mg der jeweiligen Substanz in 0,4 mL Lösungsmittel gelöst und in 5 mm NMR-Röhrchen überführt.

Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und wurden unter Verwendung der Referenzsignale der jeweiligen Lösungsmittel kalibriert. Es wurden folgende Referenzwerte verwendet:

$CDCl_3$	^1H: δ = 7,26 ppm	^{13}C: δ = 77,16 ppm
DMSO-d_6	^1H: δ = 2,50 ppm	^{13}C: δ = 39,52 ppm

Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Multiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d(Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Pentett) oder m (Multiplett).

Die Auswertung erfolgte mit der Software *MestReNova.*

Festphasensynthese

Die Festphasensynthese erfolgte unter Argonatmosphäre an einem *PerSpective Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma APPLIED BIOSYSTEMS. Als feste Phase diente CPG (*controlled pore glass*) mit einer Beladung von 1 µmol (500 Å). Die Phosphoramidite und CPG-Säulen wurden von den Firmen SIGMA ALDRICH, CHEM GENES, PROLIGO und GLEN RESEARCH bezogen.

Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden durch die Analytikabteilung des Instituts für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt.

MALDI-TOF (MS)

Die massenspektrometrische Charakterisierung per MALDI-TOF wurde an einem AXIMA Confidence Massenspektrometer (SHIMADZU) durchgeführt. Für die Analyse von Oligonukleotiden wurde eine Matrixmischung verwendet:

3-Hydroxypicolinsäure (ges. in MeCN/H_2O 1:1) / Diammoniumhydrogencitrat (0,44 M in H_2O) = 9:1 HPA

ESI (MS)

Die hochauflösende Massendetektion wurde mit eine Q Exactive Plus Orbitrap (THERMO SCIENTIFIC) unter Nutzung der Elektrospray-Ionisation (ESI) durchgeführt.

Nanodrop

Die Konzentration der synthetisierten DNA-Oligonukleotide wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm in wässriger Lösung bestimmt. Hierfür wurde in NanoDrop ND-1000 Spektrometer (NANODROP TECHNOLOGIES) verwendet.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte auf Grundlage des Lambert-Beer´schen Gesetzes unter Verwendung des sequenzspezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ε bei 260 nm. Dieser wurde aus den Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleobasen gemäß folgender Formel berechnet.

$$\varepsilon_{260} = nX * \varepsilon_X + (nA*\varepsilon_A + nC*\varepsilon_C + nG*\varepsilon_G + nT*\varepsilon_T) *0,9$$

E molarer Extinktionskoeffizient

n Anzahl der DNA-Bausteine

X modifizierte Fluorophor-Bausteine

Die molaren Extinktionskoeffizienten von Cyanovinylen sind 12400 $Lmol^{-1}cm^{-1}$ und von Dibenzothiazol 6900 $Lmol^{-1}cm^{-1}$.

Absorptionsspektroskopie

Absorptionsmessungen wurden bei 20 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 1,00 cm, STARNA) durchgeführt. Die Aufnahme der UV/Vis-Absorptionsspektren erfolgte mit einem Cary 3550 Multicell UV/Vis-Spektrometer (AGILENT TECHNOLOGIES), ausgestattet mit einem Peltier-Temperiersystem. Die Datenerfassung und Auswertung wurde mithilfe der *Software Cary WinUV Scan Application* durchgeführt.

Schmelztemperaturen

Die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden ebenfalls am Cary 3550 Multicell UV/Vis-Spektrometer (AGILENT TECHNOLOGIES) mit denselben Quarzküvetten ermittelt. Hierfür wurde photometrisch die temperaturabhängige Absorption bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die Messungen wurden im Temperaturbereich von 5-90 °C durchgeführt. Die Aufheiz- und Abkühlrate betrug jeweils 1,0 °C/min, wobei die Absorption in Intervallen von 0,5 °C aufgezeichnet wurde. Zu Beginn sowie am Ende jeder Messung wurde die Temperatur für jeweils 10 min konstant gehalten.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden ebenfalls mit denselben Quarzküvetten bei 20 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einem FluoroMax Plus Spektrofluorometer (HORIBA JOBIN YVON). Vor den Messungen wurde das Gerät anhand der Raman-Streuung von Wasser kalibriert. Zur Korrektur der Spektren wurde jeweils das entsprechende Lösungsmittelspektrum aufgenommen und vom Probenspektrum subtrahiert.

Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden mit einem Quantaurus-QY C11347 (HAMAMATSU PHOTONICS) bei 20 °C bestimmt. Für die Messungen wurde ein Probenvolumen von 2,0 mL verwendet.

Fluoreszenzlebenszeiten

Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurden mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC) durchgeführt. Hierzu wurde in FluoroMax-4 Spektrofluorometer(HORIBA JOBIN YVON) verwendet.

Die Anregung erfolgte mit einer gepulsten NanoLED™-455 (Pulsdauer 1,2 ns, HORIBA SCIENTIFIC), betrieben bei einer Pulswiederholrate von 1 MHz und gesteuert über einen NL-C2 Pulsed Diode Controller. Als Synchronisationseinheit kam ein DH-HAT Deltahub™ (HORIBA SCIENTIFIC) zum Einsatz.

Die Messzeit betrug 200 ns bei einer Detektorspannung von 1100 V. Zur Aufnahme der Instrumentenantwort (Prompt) wurde eine 0,01 % wässrige Suspension von Ludox A30 kolloidales Siliciumdioxid (SIGMA-ALDRICH) verwendet.

CV-Farbstoffe wurde bei einer Anregungswellenlänge von λ=455 nm und DB bei λ=370 nm untersucht.

Die Datenauswertung erfolgte mit der Software DataStation (Version 2.7).

Vakuumkonzentrator

Zur Entfernung des Lösungsmittels aus den Oligonukleotidproben wurde ein RVC 2-25 CDplus Midi-Vakuumkonzentrator eingesetzt, gekoppelt an einen Alpha 2-4 LSCbasic Eiskondensator (MARTIN CHRIST GEFRIERTROCKNUNGSANLAGEN).

Cyclovoltammetrie

Die Cyclovoltammetrie wurde von JEROME WAGNER aus dem Arbeitskreis BRÄSE am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt. Diese wurde in einer Stickstoff-Atmosphäre unter Verwendung eines Potentiostat vom Typ Gamry Interface 1010B in einer Drei-Elektroden-Anordnung durchgeführt. Als Arbeitselektrode diente eine Glaskohlenstoffelektrode (*glassy carbon*) ALS SGCE mit einem Radius von r=0,05 mm. Als Gegenelektrode wurde eine Platinelektrode ALS SPTE mit einem Radius r=0,08 mm und als Referenzelektrode eine Ag/Ag^+-Elektrode ALS RE-7 (10 mM $AgNO_3$, 10 mM $TBAPF_6$ in MeCN) eingesetzt. Die Scan-Rate betrug 100 mVs^{-1}. Ferrocen (Fc/Fc^+) wurde nach der Messung als interner Standard hinzugefügt.

Analyse der IOH-DNA-Nanopartikel

Die Analyse der IOH-DNA-Nanopartikel (DNA-IOH-NP) wurde von KAI-CHING-FAN aus dem Arbeitskreis FELDMANN am Institut für Anorganische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt.

Dynamische-Lichstreuung (DLS)

DLS der DNA-IOH-NP wurde an einem Nanosizer ZS (MALVEN INSTRUMENTS) durchgeführt. Die Suspension wurde in Polystyrol-Küvetten vermessen.

Zeta-potential

Das Zeta-Potential wurde an einem Nanosizer ZS (MALVEN INSTRUMENTS) mit einem automatischen Titrator MPT-2 gemessen. Die Titration erfolgte durch 0,1 M HCl oder 0,01 M NaOH.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Aufnahmen der REM wurden an einem Zeiss Supra 40 VP (ZEISS) durchgeführt, welches mit einer Feldemissionskanone ausgestatte war und eine Auflösung von 1,3 nm (bei 15 kV) aufwies. Um die Zersetzung der Probe zu minimieren, wurde die Probe bei 5 kV gemessen.

Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDXS)

Die Energiedispersive Röntgenspektroskopie wurde mit einem Ametek EDAX-Gerät (AMETEK) durchgeführt, das auf dem Zeiss Supra 40 VP montiert war. Dafür wurden Pulverproben der getrockneten DNA-IOH-NP mit Hilfe von leitfähigen Kohlenstoffpads auf Aluminium-Probenhaltern fixiert.

Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

XRD wurde an einem Stadi-P-Diffraktometer (STOE) mit Ge-monochromatisierter Cu-Ka-Strahlung durchgeführt.

Fourier-Transform-Infrarotspektren (FT-IR)

FT-IR-Spektren wurden an einem Bruker Vertex 70 FTIT-Spektrometer (BRUKER) im Bereich 4000-450 cm^{-1} aufgenommen. Es wurden ca. 1 mg Probe mit 400 mg KBr vermischt und zu einem Pellet gepresst, dass im Transmissionsmodus analysiert wurde.

Thermogravimetrie (TG)

TG wurde an einem STA409C-Gerät (NETZSCH) durchgeführt. Alle Messungen wurden an der Luft durchgeführt. Die DNA-IOH-NP wurden vorgetrocknet (60 °, 12 h) und anschließend mit einer Aufheizrate von 5 K/min auf 1200 °C erhitzt (15 mg, Korundtiegel).

Elementaranalyse (EA)

Die Analyse der Zusammensetzung (C/H/N/S) wurde mittels thermischer Verbrennung mit einem Elementar Vario Microcube (ELEMENTAR) bei einer Temperatur von ca. 1100 ° durchgeführt.

Zellbiologische Untersuchungen

Für die zellbiologischen Experimente wurden humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) von ATCC verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturinkubator von BINDER. Die Zellen wurden in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, 4,50 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat)

von GIBCO™ kultiviert, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie Penicillin (60,0 µg/mL) und Stryptomycin (100 µg/mL) ergänzt war. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu erfolgte zunächst eine Waschung mit DPBS, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation mit 0,25 % Trypsin-EDTA bei 37 °C. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Kulturmedium beendet und in neue Kulturgefäße überführt. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubaur-Zählkammer bestimmt. Für Experimente wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung in 96-Well-Platten oder µ-Slides (ibidi) ausgesät.

Alle Arbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Safemate 1.2, BIOAIR) durchgeführt. Arbeitsflächen, Geräte und Handschuhe wurden vor Beginn mit 80 % Ethanol desinfiziert.

Verbrauchsmaterialien oder Reagenzien wurden von BIOZYM SCIENTIFIC, CARL ROTH, EPPENDORF, GIBCO, GREINER BIO-ONE, SIGMA-ALDRICH und FISHER SCIENTIFIC bezogen und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Zytotoxizitätsuntersuchungen (MTT-Assay)

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test (MTT Cell Proliferation Kit I) von ROCHE bestimmt. Hierzu wurden Zellen mit einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen/mL in 96-Well-Platten ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit den jeweiligen Testverbindungen in geeigneten Konzentrationen 100 µL pro Well). Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Zur Minimierung von Verdunstungen wurden *Wells* am Rand mit DPBS befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde den entsprechenden Wells Triton X-100 (20 %) zur Erzeugung einer Positivkontrolle zugesetzt. Danach wurden 15 µL MTT-Reagenz pro Well hinzugegeben und die Zellen weitere 3 h inkubiert. Zur Solubilisierung des gebildeten Formazans wurde Lysis-Puffer zugesetzt und die Platte 24 h bei 37 °C inkubiert. Die photometrische Auswertung erfolgte durch einen Microplate-Reader.

Mikroplattenlesegerät (Microplate Reader)

Der MTT-Test wurde an einem CLARIOstar Plus von BMG LABTECH ausgewertet. Die Analyse erfolgte durch die Absorption bei λ=570 nm und λ=595 nm.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation wurden die behandelten Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie an einem LEICA STELLARIS 5 analysiert. Der Zellkern wurde durch Anfärbung mit Hoechst 33342 visualisiert. Zur Darstellung der Mitochondrien wurde ein *MitoTracker red* und für die Lysosome *LysoTracker red* eingesetzt. Nach Inkubation mit den entsprechenden Färbelösungen wurden die Zellen gewaschen und unmittelbar mikroskopisch untersucht.

Hoechst – exc. 405 nm, em. 415-445 nm, Intensität 1%, Gain 50

MitoTracker – exc. 573, em. 579-750 nm, Intensität 2%, Gain 18-43

LysoTracker – exc. 573 nm, em. 579-750 nm, Intensität 5-10%, Gain 101-120

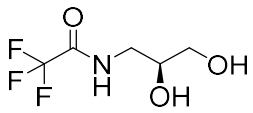
TO-DNA-NP – exc. 490 nm, em. 495-567 nm, Intensität 16%, Gain 126-170

Arbeiten unter RNAse freien Bedingungen

Bei der Handhabung von RNA-Proben wurden stets Nitrilhandschuhe getragen, die zuvor mir RNAse Away© (MOLECULAR BIOPRODUCTS) gereinigt wurden. Jegliche Oberfläche und Glasgeräte wurden ebenfalls mit RNAse Away© oder EtOH behandelt. Als Verbrauchsmaterialien wurden ausschließlich vom Hersteller als RNAse frei deklariert verwendet. RNAse freies Wasser wurde durch die Zugabe von 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DPEC) hergestellt. Dafür wurde für 16 h gerührt und anschließend für 30 min zum Sieden erhitzt.

7.2 Synthesevorschriften

(S)-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (2)



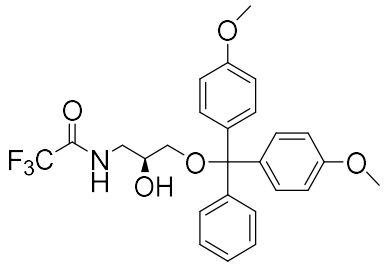
$C_5H_8F_3NO_3$
187,12 g/mol

Es wurden in einer Argonatmosphäre 3,60 g (*S*)-1-Amino-propan-2,3-diol (39,5 mmol, 1,00 Äq) in 22,0 mL Trifluoressigsäureethylester (26,2 g, 140 mmol, 3,50 Äq.) gelöst und für 16 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit 15,0 mL Benzol lyophilisiert. Es wurden 6,59 g (35,2 mmol, 89 %) einer stark viskosen, farblosen Flüssigkeit als Produkt erhalten.

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 9.29 (s, 1H, NH), 4.87 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, OH), 4.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, OH), 3.60 (m, 1H, CHOH), 3.20 (m, 2H, CH_2OH), 3.10 (m, 1H, CH_2NH).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[102]

(S)-N-(3-(Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (3)



$C_{26}H_{26}F_3NO_5$
489,49 g/mol

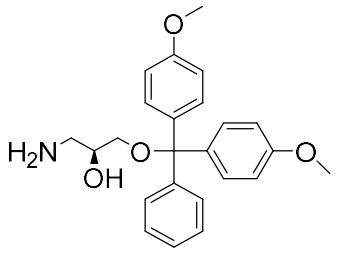
Unter Argon wurden 1,00 g **2** (5,34 mmol, 1,00 Äq.) in 25,0 mL Tetrahydrofuran gelöst und 1,20 mL Triethylamin (876 mg, 8,66 mmol. 1,62 Äq.) hinzugegeben. Anschließend wurden 1,81 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (5,34 mmol, 1,00 Äq.) hinzugegeben und für 16 h bei RT gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 1,70 mL Methanol und weiteres Rühren für eine Stunde. Anschließend wurde das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 35,0 mL EE aufgenommen und drei Mal mit 25 mL gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2,40 g (4,91 mmol, 92 %) einer stark viskosen, gelben Flüssigkeit erhalten.

DC (DCM/MeOH 50:1) R_f= 0.33

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 9.29 (s. 1H, NH), 7.40 (m, 2H, arom.), 7.28 (m, 7H, arom.), 6.86 (m, 4H, arom.), 5.13 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, OH), 3.81 (m, 1H, CHOH), 3.73 (s, 6H, OCH_3), 3.32 (m, 1H, CH_2NH), 3.13 (m, 1H, CH_2NH), 2.95 (m, 1H, CH_2O), 2.86 (m, 1H, CH_2O).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[102]

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



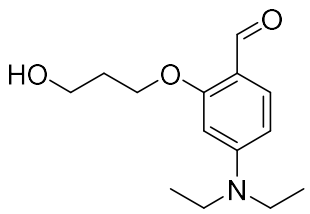
$C_{24}H_{27}NO_4$
393,48 g/mol

Es wurden 2,40 g **3** (4,91 mmol, 1.00 Äq.) in einem Lösungsmittelgemisch aus 11,0 mL Tetrahydrofuran, 30,0 mL Methanol und 30,0 mL konzentrierter Ammoniaklösung gelöst und für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurden Tetrahydrofuran und Methanol unter vermindertem Druck entfernt und der wässrige Rückstand wurde drei Mal mit je 150 mL DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden zwei Mal mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt wurde lyophilisiert. Es wurden 1,82 g (4,62 mmol, 94 %) eines weißen Schaums als Produkt erhalten.

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.38 (m, 2H, arom.), 7.25 (m, 7H, arom.), 6.86 (m, 4H, arom.), 3.73 (s, 6H, OCH_3), 3.55 (m, 1H, CHOH), 3.30 (bs, 2H, NH_2), 2.94 (m, 1H, CH_2O), 2.83 (m, 1H, CH_2O), 2.68 (m, 1H, CH_2NH), 2.45 (m, 1H, CH_2NH).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[102]

4-(diethylamino)-2-(3-hydroxypropoxy)benzaldehyde (6a)



$C_{14}H_{21}NO_3$
251,33 g/mol

5,03 g 4-(Diethylamino)salicylaldehyd (26,0 mmol, 1,10 Äq.) wurden portionsweise zu einer Lösung von 1,04 g Natriumhydroxid (26,0 mmol, 1,10 Äq.) in 30,0 mL Wasser gegeben. Anschließend wurden 2,24 mL 3-Brompropanol (3,29 g, 23,7 mmol, 1,00 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch 16 h bei 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Natriumhydroxid bis zu einem pH-Wert von 10 zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit DCM (4 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde per Flash-Säulenchromatographie gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat = 10:1 → 5:1 → 1:1 → 1:2). Es wurden 2.94 g eines gelblichen Feststoffs erhalten (11,7 mmol, 49 %).

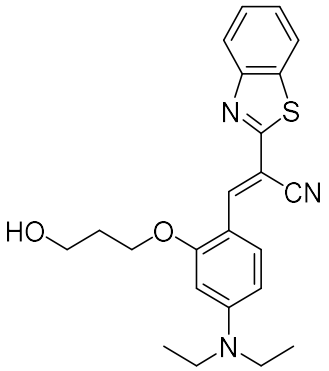
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2) R*f* = 0.4

^{1}H-NMR: (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 9.94 (s, 1 H, CHO), 7.59 (d, J=8.9 Hz, 1H, arom.), 6.28 (dd, J=8.9, 2.3 Hz, 1H, arom.), 6.05 (d, J=2.3 Hz, 1H, arom.), 4.18 (t, J=5.9 Hz, 2H, arom.-CH_2), 3.88 (q, J=5.3 Hz, 2H, OH-CH_2), 3.41 (q, J=7.1 Hz, 4H, N-CH_2), 2.10 (quin, J=5.8 Hz, 2H, CH_2), 1.21 (t, J=7.1 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C-NMR: (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 187.49, 162.77, 153.76, 133.39, 114.18, 104.16, 93.35, 66.28, 44.81, 31.97, 12.58.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 251.1521 [M^+], 252.1594 [MH^+]; m/z (gefunden) = 252.1593 [MH^+].

(E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-(diethylamino)-2-(3-hydroxypropoxy)phenyl)acrylonitrile (7a)



$C_{23}H_{25}N_3O_2S$
407,53 g/mol

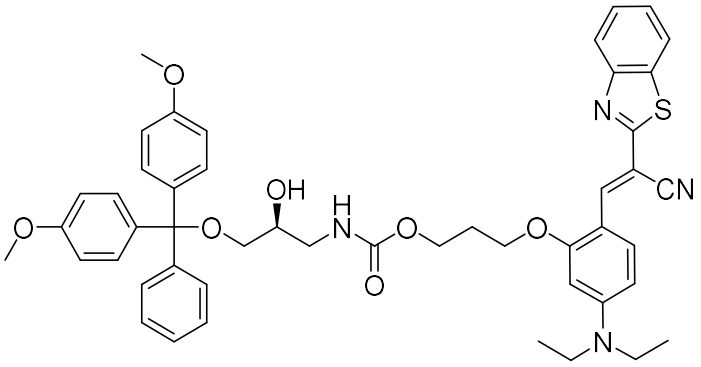
Es wurden 2,50 g **6a** (9,95 mmol, 1,00 Äq.) und 1,73 g 2-Benzothiazolacetonitril (9,95 mmol, 1,00 Äq.) in 70,0 mL Ethanol gelöst, bevor 9,83 mL Piperidin (8,47 mg, 99,5 mmol, 10,0 Äq.) zugegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Feststoff wurde abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Es wurden 2,63 g (6,47 mmol, 65 %) eines roten Feststoffs erhalten.

^{1}H-NMR: (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.42 (s, 1H, CH), 8.35 (d, J = 9.2 Hz, 1H, arom.), 7.97 (dt, J = 0.8 Hz, 1H, arom.), 7.76 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H, arom.), 7.40 (ddd, J = 8.3, 7.2, 1.3 Hz, 1H, arom.), 7.32 – 7.23 (m, 1H, arom.), 6.30 (dd, J = 9.2, 2.4, Hz, 1H, arom.), 6.04 (d, J = 2.5 Hz, 1H, arom.), 4.17 (t, H = 5.9 Hz, 2H, O-CH_2), 4.00 (t, J = 5.9 Hz, 2H, OH-CH_2), 3.35 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH_3-CH_2), 2.79 (bs, 1H, OH), 2.14 (q, J = 5.9 Hz, 2H, CH_2OH-CH_2), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C-NMR: (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 166.30, 161.07, 153.85, 152.81, 141.05, 134.30, 130.42, 126.40, 124.89, 122.74, 118.66, 110.09, 105.51, 95.62, 94.54, 65.70, 59.04, 44.91, 32.15, 12.82, 1.13

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 407.1667 [M^+], 408.1740 [MH^+]; m/z (gefunden) = 408.1743 [MH^+].

(E)-3-(2-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-cyanovinyl)-5-(diethylamino)phenoxy)propyl (S)-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)carbamate(8a)



$C_{48}H_{50}N_4O_7S$
827,01 g/mol

Unter Argon wurden 500 mg **7a** (1,23 mmol, 1,00 Äq.) in 8,00 mL DMF gelöst und anschließend 219 mg 1,1´-Carbonyldiimidazol (1,35 mmol, 1,10 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, woraufhin 531 mg der Verbindung **4** (1,35 mmol, 1,10 Äq.) zugegeben und die Reaktion für 48 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat = 10:1 → 5:1 → 1:1 → 1:2) gereinigt. Es wurden 335 mg (406 μmol, 33 %) eines roten Schaums erhalten.

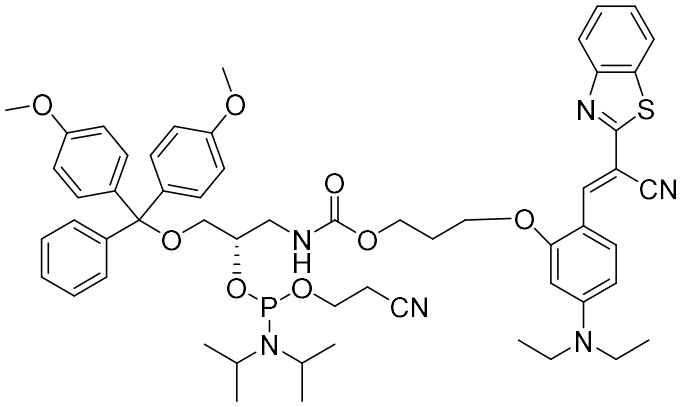
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2) R*f* = 0.35

^{1}H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.49 (ppm) = (s, 1H, CH), 8.35 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, arom.-CV), 7.95 – 7.86 (m, 1H, arom.-CV), 7.74 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, arom.-CV), 7.36 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 1.3 Hz, 1H,arom.-CV), 7.30 – 7.25 (m, 2H, arom.-DMT), 7.25 – 7.13 (m, 7H, arom.-DMT), 7.13 – 7.08 (m, 1H, arom.-CV), 6.79 – 6.66 (m, 4H, arom.-DMT), 6.29 (dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 1H, arom.-CV), 5.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, arom.-CV), 5.48 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 4.26 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, O-CH_2), 4.05 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, COO-CH_2), 3.69 (s, 6H, O-CH_3), 3.35 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH_3-CH_2), 3.25 (m, 1H, NH-CH), 3.10 – 3.05 (m, 1H, NH-CH), 3.02 (m, 2H, DMT-CH2), 2.76 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, OH-CH), 2.14 (quint, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH_2), 1.66 (bs, 1H, OH), 1.16 (t, *J* = 7.1, 6.0 Hz, 6H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 160.91, 158.73, 158.63, 157.64, 153.98, 152.84, 144.73, 141.14, 135.89, 135.86, 134.46, 130.59, 130.08, 129.25, 128.13, 127.97, 127.88, 126.96, 126.50, 124.98, 122.81, 121.47, 113.27, 109.95, 105.35, 93.69, 86.32, 77.48, 77.16, 76.84, 70.66, 65.81, 65.03, 62.46, 55.37, 55.32, 44.97, 44.37, 29.11, 12.84.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 826.3400 [M^+], 827.3473 [MH^+]; m/z (gefunden) = 827.3459 [MH^+].

3-(2-((E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-cyanovinyl)-5-(diethylamino)phenoxy)propyl ((2S)-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propyl)carbamate (9a)



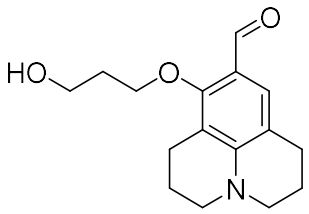
$C_{57}H_{67}N_6O_8PS$
1027,23 g/mol

280 mg **8a** (339 µmol, 1,00 Äq.) wurden unter Argon in 18,0 mL trockenem DCM gelöst. Anschließend wurden 176 µL *N*,*N*-Diisopropylamin (130 mg, 1,01 mmol, 3,00 Äq.) sowie 106 mL 2-Cyanoethyl-*N*,*N*-Diisopropylchlorophosphoramidit (112 mg, 475 µmol, 1,40 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit frisch hergestellter gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in quantitativer Ausbeute als roter Schaum erhalten, in 3,30 mL trockenem Acetonitril gelöst und ohne weitere Reinigung direkt für die automatisierte DNA-Synthese verwendet.

^{31}P-NMR: (151 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 149.57, 149.32.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 1026.4479 [M^+],1027.4552 [MH^+]; m/z (gefunden) = 1027.4550 [MH^+].

8-(3-hydroxypropoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-carbaldehyd (6b)



$C_{16}H_{21}NO_3$
275,35 g/mol

Es wurden 0,55 g Natriumhydroxid (13,8 mmol, 1,10 Äq.) in 15,0 mL Wasser gelöst, gefolgt von der Zugabe von 3,00 g 8-Hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-iJ]quinolin-9-carbaldehyd (13,8 mmol, 1,10 Äq.). Anschließend wurden 1,37 mL 3-Brompropanol (2,10 g, 12,5 mmol, 1,00 Äq.) tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch für 16 h bei 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Natriumhydroxid bis zu einem pH-Wert von 10 zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (4 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde per Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat = 10:1 → 5:1 → 1:1 → 1:2) gereinigt. Es wurden 1,20 g (4,37 mmol, 35 %) eines leicht gelben Feststoffs erhalten.

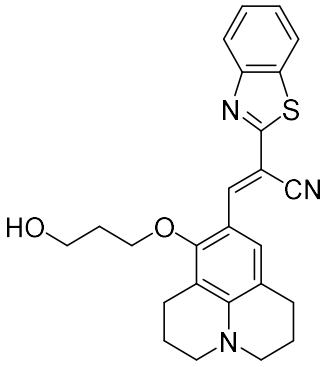
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2) R*f* = 0.4

^{1}H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.80 (ppm) = (s, 1H, CHO), 7.22 (s, 1H, arom.), 3.97 (t, *J* = 11.7 Hz, 2H, O-CH_2), 3.91 (t, *J* = 11.5 Hz, 2H, OH-CH_2), 3.28 – 3.22 (m, 4H, N-CH_2), 3.02 (bs, 1H, OH), 2.75 – 2.66 (m, 4H, arom.-CH_2), 2.05 – 1.97 (m, 2H, CH_2), 1.96 – 1.85 (m, 4H, NCH_2-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 188.07, 158.47, 149.13, 129.69, 117.01, 116.82, 113.04, 72.44, 60.11, 50.11, 49.80, 32.76, 27.38, 21.40, 20.89, 20.82.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 275.1521 [M^+], 276.1594 [MH^+]; m/z (gefunden) = 276.1594 [MH^+].

(E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-(8-(3-hydroxypropoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)acrylonitril (7b)



$C_{25}H_{25}N_3O_2S$
431,55 g/mol

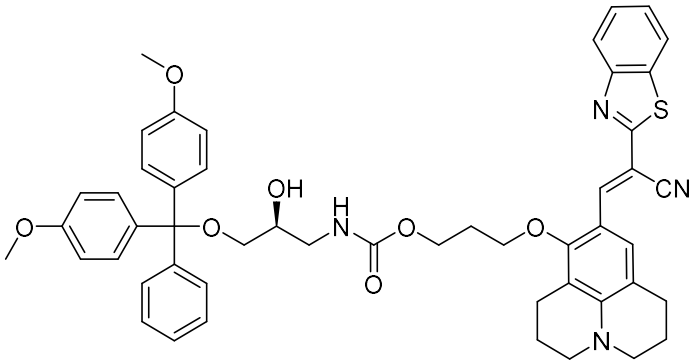
1,20 g **6b** (4,37 mmol, 1,00 Äq.) und 760 mg 2-Benzothiazolacetonitril (4,37 mmol, 1,00 Äq.) wurden in 42,0 mL Ethanol gelöst und anschließend wurde 4,32 mL Piperidin (3,72 g, 43,7 mmol, 10,0 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Feststoff wurde abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Es wurden 1,22 g (2,84 mmol, 65 %) eines roten Feststoffs erhalten.

^{1}H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.55 (s, 1H, CH), 8.07 (s, 1H, arom.), 8.03 – 7.96 (m, 1H, arom.), 7.83 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, arom.), 7.46 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.3 Hz, 1H, arom.), 7.37 – 7.28 (m, 1H, arom.), 5.00 (s, 1H, OH), 4.14 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, O-CH_2), 3.95 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, OH-CH_2), 3.34 – 3.25 (m, 4H, N-CH_2), 2.79 – 2.72 (m, 4H, arom.-CH_2), 2.03 (p, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH_2), 1.99 – 1.88 (m, 4H, NCH_2-CH_2).

^{13}C NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 166.64, 157.76, 153.50, 148.49, 140.77, 134.29, 126.73, 126.71, 124.85, 122.15, 121.58, 119.17, 118.20, 113.51, 112.55, 93.73, 70.65, 57.11, 50.30, 49.94, 32.69, 27.71, 21.45, 21.26, 20.83.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 431.1667 [M^+], 432.1740 [MH^+]; m/z (gefunden) = 432.1743 [MH^+].

(E)-3-((9-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-cyanovinyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-yl)oxy)propyl (*S*)-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)carbamat (8b)



$C_{50}H_{50}N_4O_7S$
851,03 g/mol

Unter Argon wurden 500 mg **7b** (1,16 mmol, 1,10 Äq.) in 8,00 mL DMF gelöst und anschließend 208 mg 1,1´Carbonyldiimidazol (1,28 mmol, 1,10 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde 504 mg der Verbindung **4** (1,28 mmol, 1,10 Äq.) zugegeben und die Reaktion weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat = 10:1 → 5:1 → 1:1 → 1:2) gereinigt. Es wurden 326 mg (383 µmol, 33 %) eines roten Schaums erhalten.

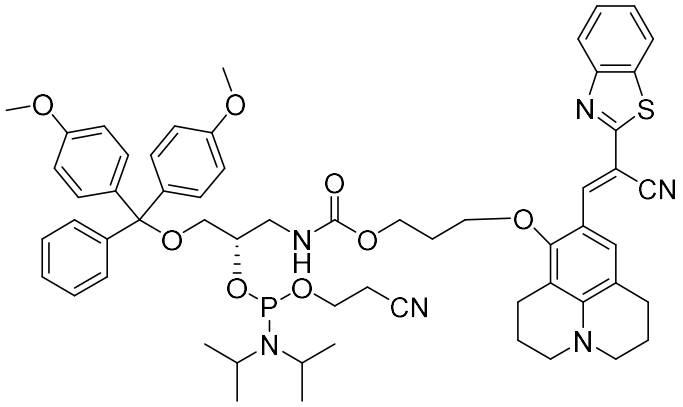
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2) R*f* = 0.35

^{1}H-NMR: (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.30 (s, 1H, CH), 8.05 (s, 1H, arom.-CV), 7.98 (dt, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H, arom.-CV), 7.83 – 7.76 (m, 1H, arom.-CV), 7.47 – 7.39 (m, 1H), 7.39 – 7.32 (m, 2H, arom.-DMT), 7.32 – 7.21 (m, 7H, arom.-DMT), 7.21 – 7.13 (m, 1H, arom.-CV), 6.85 – 6.75 (m, 4 H, arom.-DMT), 5.16 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 4.35 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, O-CH2), 4.17 – 4.03 (m, 1H, OH-CH), 3.83 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, COO-CH_2), 3.75 (s, 6H, CH_3), 3.33 – 3.29 (m, 1H,), 3.27 (d, *J* = 5.8 Hz, 4H, N-CH_2), 3.12 – 3.04 (m, 2H,DMT-CH_2), 2.72 (dt, *J* = 20.0, 6.2 Hz, 4H, arom.-CH_2), 2.15 (dd, *J* = 7.4, 5.0 Hz, 2H, CH_2), 2.03 (s, 1H,NH-CH_2), 1.97 – 1.85 (m, 4H, CH_2), 1.72 (bs, 1 H, OH), 1.28 – 1.18 (m, 1H,NH-CH_2).

^{13}C-NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 166.07, 158.65, 157.35, 154.07, 148.15, 144.72, 141.65, 135.86, 134.37, 130.09, 128.15, 127.99, 127.00, 126.77, 126.73, 126.51, 125.04, 123.00, 121.42, 118.47, 118.10, 113.28, 113.13, 112.82, 96.47, 86.35, 71.68, 70.51, 65.00, 61.98, 55.33, 50.27, 49.84, 44.23, 29.86, 27.69, 21.49, 21.41, 20.89.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 850.3400 [M^+]; m/z (gefunden) = 850.3396 [M^+].

3-((9-((E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-cyanovinyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-yl)oxy)propyl((2S)-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propyl)carbamate (9b)



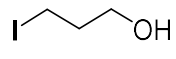
$C_{59}H_{67}N_6O_8PS$
1051,25 g/mol

Es wurden 326 mg **8b** (383 µmol, 1,00 Äq.) in 18,0 mL trockenem DCM gelöst. Anschließend wurden 200 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin (149 mg, 1,15 mmol, 3,00 Äq.) sowie 120 µL 2-Cyanoethyl-*N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidit (127 mg, 536 µmol, 1,40 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in quantitativer Ausbeute als roter Schaum erhalten, in 3,80 mL trockenem Acetonitril gelöst und ohne weitere Reinigung direkt für die automatisierte DNA-Synthese verwendet.

^{31}P-NMR: (151 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 148.48, 148.08.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 1050.4479 [M^+], 1051.4552 [MH^+]; m/z (gefunden) = 1051.4568 [MH^+].

3-Iodopropan-1-ol (11)



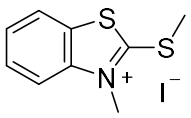
C_3H_7IO
185,99 g/mol

Es wurden 9,45 g 3-Chlorpropanol (0,10 mol, 1.00 Äq.) und 75,0 g Natriumiodid (0,50 mol, 5,00 Äq.) in 100 mL trockenem Aceton gelöst und für 24 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Substanz wurde in 100 mL Diethylether und Hexan (1:1) gelöst und erneut filtriert. Es wurde mit 50 mL einer verdünnten Natriumthiosulfat-Lösung, 50 mL Wasser und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 11,2 g einer gelben Flüssigkeit (60,0 mmol, 60 %) erhalten.

^{1}H-NMR: (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.72 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH_2OH), 3.29 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH_2I), 2.03 (m, 2H, CH_2).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[247]

3-Methyl-2-(methylthio)benzo[d]thiazol-3-ium-iodid (14)



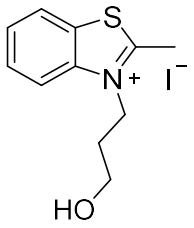
$C_9H_{10}INS_2$
323,32 g/mol

In 18 mL DMF wurden 5,00 g Methylthiobenzothiazol (27,6 mmol, 1,00 Äq.) und 6,85 mL Methyliodid (15,6 g, 110 mmol, 4,00 Äq.) vorgelegt und für 24 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 20,0 mL EE verdünnt und der Niederschlag wurde abfiltriert. Es wurden 6,89 g eines weißen Feststoffs (21,3 mmol, 77 %) isoliert.

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H, arom.), 8.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom.), 7.85 (ddd, J = 8.5, 7.3, 1.0 Hz, 1H, arom.), 7.73 (ddd, J = 8.2, 7.3, 1.0 Hz, 1H, arom.), 4.12 (s, 3H, CH_3N), 3.13 (s, 3H, CH_3S).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[248]

3-(3-Hydroxypropyl)-2-methylbenzo[d]thiazol-3-ium-iodid (12)



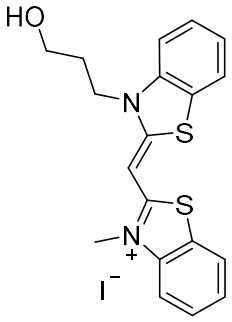
$C_{11}H_{14}INOS$
335,21 g/mol

Es wurden 15,0 mL 2-Methyl-Benzothiazol (17,6 g, 118 mmol, 2,00 Äq.) und 11,0 g 3-Iodpropanol (59,0 mmol, 1,00 Äq.) in 35 mL MeCN gelöst und bei 82 °C für 72 h gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit 15,0 mL Diethylether gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 8,72 g (26,0 mmol, 44 %) eines weisen Feststoffs als Produkt erhalten.

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.45 (dd, *J* = 8.2 Hz, 1H, arom.), 8.31 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, arom.), 7.92-7.86 (m, 1H, arom.), 7.85 – 7.76 (m, 1H, arom.), 4.83 (t, J = 4.9 Hz, 1H, OH), 4.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH_2N), 3.52 (q, J = 5.3 Hz, 2H,. CH_2O), 3.22 (s, 3H, CH_3), 2.10 – 1.98 (m, 2H, CH_2).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.[19, 169]

(Z)-2-((3-(3-hydroxypropyl)benzo[d]thiazol-2(3H)-ylidene)methyl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium (15)



$C_{19}H_{19}IN_2OS_2$
482,40 g/mol

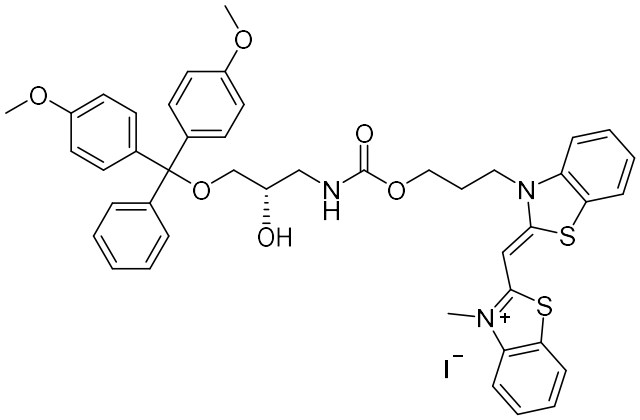
500 mg der Verbindung **12** (1,49 mmol, 1,00 Äq.) und 530 mg **14** (1,64 mmol, 1,10 Äq.) wurden in 50,0 mL Ethanol gelöst. Anschließend wurden 0,62 mL Triethylamin (452 mg, 4,47 mmol, 3,00 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 1 h bei 80 °C gerührt und anschließend für weitere 16 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde durch Filtration abgetrennt und zweimal mit Ethanol und anschließend mit Diethylether (je 2 x 30 mL) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurden 535 mg eines gelben Feststoffs erhalten (1,11 mmol, 75 %).

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.18 (d, J = 9.6 Hz, 2H, arom.), 7.83 (dt, J = 9.6 Hz, 2H, arom.) 7.66 – 7.57 (m, 2H, arom.), 7.48 – 7.39 (m, 2H, arom.), 6.77 (s, 1H, CH), 4.97 (t, J = 4.8 Hz, 1H, OH), 4.62 (t, J = 6.9 Hz, 2H, NCH_2), 3.98 (s, 3H, CH_3), 3.55 (q, J = 5.4 Hz, 2H, OCH_2), 1.99 (p, J = 66 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C-NMR: (101 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) = 161.93, 161.55, 140. 59, 140.13, 128.49, 128.49, 128.42, 124.80, 124.70, 123.48, 123.40, 113.62, 82.71, 57.12, 43.50, 34.08, 29.93.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 355.0933 [M^+]; m/z (gefunden) = 355.0930 [M^+].

(S,Z)-3-(3-(((3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)carbamoyl)oxy)propyl)-2-((3-methylbenzo[d]thiazol-2(3H)-ylidene)methyl)benzo[d]thiazol-3-ium-iodide (16)



$C_{44}H_{44}IN_3O_6S_2$
901,88 g/mol

Es wurden 600 mg **15** (1,24 mmol, 1,00 Äq.) und 242 mg 1,1´-Carbonyldiimidazol (1,49 mmol, 1,20 Äq.) unter Argon in 12,0 mL trockenem DMF gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 586 mg des Linkers **4** (1,40 mmol, 1,20 Äq.) zugegeben und für weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend per Flash-Säulenchromatographie unter Verwendung eines Gradienten aus MeOH in DCM (0 – 5 %) gereinigt. Es wurden 385 mg eines orangefarbenen Feststoffs (397 μmol, 32 %) erhalten.

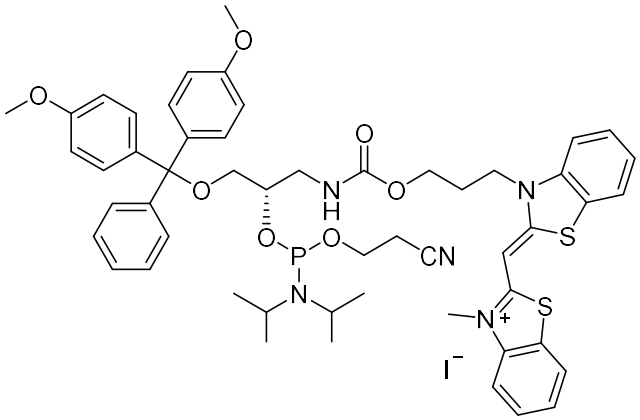
DC (DCM/MeOH 9:1) R*f* = 0.45

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.23-8.17 (m, 2H, arom.-DB), 7.86-7.80 (m, 2H, arom.-DB), 7.70-7.60 (m, 2H, arom.), 7.51-7.43 (m, 2H, arom.-DB), 7.40-7.35 (m, 2H, arom.-DMT), 7.30-7.19 (m, 7H, arom.-DMT), 7.07-7.01 (m, 1H, arom.-DMT), 6.87-6.83 (m, 3H, arom.-DMT), 6.67 (s, 1H, CH-DB), 4,97 (d, J = 5.3 Hz, 1H, OH), 4,66 (t, J = 7.3 Hz, 2H, N-CH_2), 4.09 (t, J = 6.2 Hz, 2H, O-CH_2), 4.00 (s, 3H, CH_3), 3.73 (m, 1H, NH), 3.70 (s, 6H, DMT-CH_3), 3.24-3.14 (m, 1H, CH), 2.99-2.90 (m, 2H, NH-CH_2), 2.89-2.80 (m, DMT-CH_2), 2.17-2.07 (m, 2H, CH_2).

^{13}C-NMR: (101 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) = 162.25, 161.62, 157.96, 156.11, 145.03, 140.65, 140.06, 135.75, 135.72, 129.70, 128.57, 128.49, 127.71, 126.53, 124.93, 124.85, 124.79, 123.56, 123.44, 113.82, 113.54, 113.05, 85.17, 82.54, 68.73, 65.64, 60.73, 44.23, 43.28, 35.77, 34.20, 26.47.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 774.2666 [M^+]; m/z (gefunden) = 774.2669 [M^+].

2-((Z)-(3-(3-((((2S)-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propyl)carbamoyl)oxy)propyl)benzo[d]thiazol-2(3H)-ylidene)methyl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium-iodide (17)



$C_{53}H_{61}IN_5O_7PS_2$
1102,10 g/mol

Unter Argon wurden 276 mg **16** (0,31 mmol, 1,00 Äq.) in 18,0 mL trockenem DCM gelöst. Anschließend wurden 160 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin (0,92 mmol, 3,00 Äq.) zugegeben, gefolgt von der Zugabe von 102 µL 2-Cyanoethyl-*N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1,03 mg, 0,46 mmol, 1,50 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und danach mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Als Produkt wurde quantitativ als orangefarbener Feststoff erhalten und in 3,00 mL trockenem Acetonitril gelöst. Ohne weitere Aufreinigung wurde es für die automatisierte DNA-Synthese verwendet.

^{31}P-NMR: (151 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 147.86, 148.45.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 974.3745 [M^+]; m/z (gefunden) = 974.3742 [M^+].

7.3 DNA-Festphasen-Synthese

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten modifizierten DNA-Sequenzen erfolgte mittels automatisierter Phosphoramidit-Chemie mit einem modifizierten Kopplungsprotokoll auf einem H-6 DNA/RNA Syntesizer (K&A LABORGERÄTE). Unmodifizierte Oligonukleotide wurden ebenfalls mit dem Standardkopplungsprotokoll synthetisiert oder kommerziell erworben (METABION). Als Trägermaterial wurden *Controlled-Pore-Glass*-(CPG)-Säulen (1 µmol Beladung, 500 Å Porengröße) verwendet. Kommerzielle Phosphoramdite sowie Synthesereagenzien wurden von SIGMA-ALDRICH, GLEN RESEARCH (EUROGENTEC), CHEMGENES oder BLD PHARM bezogen. Das 5-Nitroindol-Phosphoramidit wurde von GLEN-RESEARCH bezogen. Die Standardnukleotide wurden als 0,067 M Lösungen in trockenem Acetonitril unter dem Standardkopplungsprotokoll eingesetzt (Tabelle 8). Für die in dieser Arbeit synthetisierten modifizierten Phosphoramidite wurde eine Konzentration von 0,100 M in trockenem Acetonitril verwendet. Alle Sequenzen wurden im DMT-on-Modus synthetisiert, sodass diese Gruppe für eine anschließende Aufreinigung genutzt werden konnte. Die mit DB-modifizierten Stränge wurden mit den Standardschutzgruppen versehen, sodass die standardmäßige Entschützung mit einer wässrigen konzentrierten NH_3-Lösung durchgeführt werden konnte. Für CV-modifizierte Stränge wurde eine angepasste Schutzgruppenstrategie verwendet, damit die Entschützung mit K_2CO_3 in Methanol nach dem Ultramild Protokoll stattfinden konnte. Nach Abschluss der Synthese wurden die Oligonukleotide entweder lyophilisiert oder in ddH_2O gelöst und bei -32°°C gelagert.

Tabelle 8: Standardkopplungsprotokoll für kommerziell erworbene Phosphoramidite.

Schritte	Zeit [0.1s]	Reagenzien	Mischungen	Zielort	S.Col.Ptr.	Kopplungszeit [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		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
5	10	ACN		M_W		50	
6	10	ACN		COL	ON		
7					ON		
8	35	GAS		COL			
9	20	GAS		M_W			
			Branch				
1	4	TET		COL	ON		
2	8	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						10	
5	6	AMD	TET	COL	ON		
6					ON		
7						5	
8	10	ACN		M_W			

9	10	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		2	
12	30	GAS		COL			
				Oxidation			
1	35	OXI		COL	ON		
2					ON		
3	10	ACN		M_W		9	
4						9	
5		WTH				150	
6		WTH				150	
7	30	GAS		COL			
8	2	ACN		M_W			
9	16	ACN		COL	ON		
10					ON		
11	20						
12	30	GAS		COL			
13	2	ACN		M_W			
14	15	ACN		COL	ON		
15					ON		
16	40						
17	15	ACN		COL	ON		
18					ON		
19	50						
20	10	GAS		M_W			

21	30	GAS		COL			
				Branch			
1	4	TET		COL	ON		
2	4	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						60	
5						60	
6						60	
7						60	
8	4	AMD	TET	COL	ON		
9					ON		
10						60	
11						60	
12						60	
13						60	
14	4	TET		COL	ON		
15					ON		
16	20	ACN		M_W			
17	20	GAS		M_W			

Die Integration der synthetisierten Bausteine erfolgte über ein verlängertes Syntheseprotokoll (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verlängertes Kopplungsprotokoll für den Einbau der Sonderbausteine.

Schritte	Zeit [0.1s]	Reagenzien	Mischungen	Zielort	S.Col.Ptr.	Kopplungszeit [s]	Branch
				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			

Aufreinigung

Nach Abschluss der automatisierten Festphasensynthese wurde das CPG-Trägermaterial zunächst im Vakuum getrocknet. Für die DB-modifizierten Oligonukleotide erfolgte die Abspaltung von der festen Phase sowie die der Schutzgruppen durch eine wässrige konzentrierte Ammoniaklösung. Hierzu wurde das CPG-Material mit 1 mL Ammoniaklösung versetzt und für 16 h bei 55 °C erhitzt. Nach Abkühlung wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Für die CV-modifizierten Sequenzen wurde ein milderes Entschützungsverfahren gewählt. Hierzu wurde das getrocknete CPG mit 0,05 M K_2CO_3 in Methanol versetzt und für 24 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert.

Glen-Pak

Die Oligonukleotide wurden im DMT-on-Zustand mittels GlenPak™ *DNA Purification Cartridges* (GLEN RESEARCH) gereinigt. Zunächst wurde die Säule mit 0,5 mL MeCN und anschließend mit 1,0 mL 2 M Triethylammoniumacetat (TEAA) äquilibriert. Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1 mL einer NaCl-Lösung (100 mg/mL) versetzt und anschließend auf die Säule aufgebracht. Zur Entfernung von Abbruchsträngen erfolgte eine Reinigung mit 2 mL einer Salzlösung (100 mg/mL NaCl in H_2O, 5 % MeCN). Die Abspaltung der DMT-Gruppe wurde durch Behandlung mit 2 mL einer 2%igen Trifluoressigsäurelösung in H_2O durchgeführt. Nachfolgend wurden verbleibende Säure- und Salzreste durch Spülen mit 2 mL H_2O entfernt. Die Elution erfolgte mit 1,5 mL einer Mischung aus MeCN/H_2O (1:1) unter Zusatz von 0,5 % Ammoniumhydroxid. Das Lösungsmittel wurde anschließend in einem Vakuumkonzentrator bei 25 °C und 0,1 mbar entfernt.

Semipräparative HPLC

Zur Entfernung verbleibender Nebenprodukte wurde eine weitere Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC durchgeführt. Hierzu wurde der getrocknete Rückstand in 300 µL H_2O (Milli-Q) aufgenommen und auf eine HPLC injiziert. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines Gradienten aus 0,05 M NH_4OAc-Puffer und MeCN. Für CV-modifizierte Oligonukleotide wurde der MeCN-Anteil innerhalb von 30 min von 0 auf 30 % und für DB-modifizierte Stränge von 0 auf 20 % erhöht, gefolgt von einer Haltezeit von 10 min. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Die Detektion der modifizierten Oligonukleotide erfolgte photometrisch bei 260 nm sowie zusätzlich die charakteristischen Absorptionswellenlängen der jeweiligen Chromophore (400 nm für DB, 490 nm für CV). Entsprechende Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und anschließend vom Lösungsmittel befreit.

Analytische HPLC

Die Charakterisierung der gereinigten Oligonukleotide erfolgte mittels analytischer HPLC. Es wurden die gleichen Lösungsmittel wie bei der semipräparativen HPLC verwendet und für alle Proben wurde der MeCN-Anteil innerhalb von 30 min von 0 auf 30 % erhöht. Die Charakterisierung wurde ebenfalls bei 40 °C durchgeführt.

MALDI-TOF der Oligonukleotide

Die während der semipräparativen HPLC gesammelten Fraktionen wurden zunächst vom Lösungsmittel befreit und anschließend in 50 mL ddH_2O gelöst. Anschließend erfolgte eine massenspektrometrische Analyse per MALDI-TOF, welche durch die analytische Abteilung des Karlsruher Instituts für Technologie durchgeführt wurde.

Hybridisierung

Zur Ausbildung von DNA-Duplexstrukturen wurden die jeweiligen Einzelstränge mit ihren komplementären Sequenzen zusammengeführt. Die Hybridisierung erfolgte in einem Puffer aus 10 mM Natriumphosphat und 250 mM NaCl in Wasser bei pH 7 mit einer Konzentration der Oligonukleotide von 2,5 μM mit einem Endvolumen von 1 mL.

War der komplementäre Strang ebenfalls mit einem Fluorophor modifiziert, wurde dieser mit 1,0 Äq. hinzugegeben. Unmodifizierte Gegenstränge wurden mit einem Überschuss von 1,1 Äq. eingesetzt.

Die Lösungen wurden für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

8. Anlagen

8.1 NMR Spektren

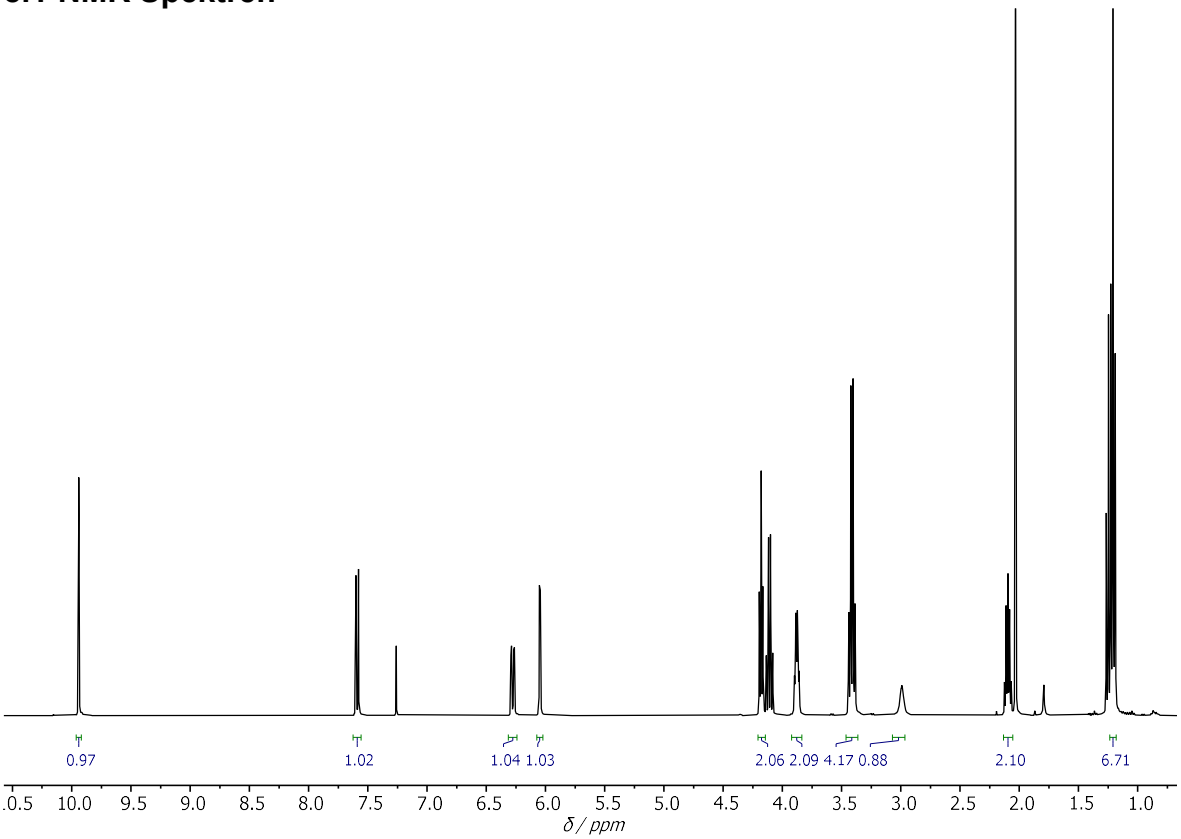


*Abbildung 80: ^{1}H-NMR-Spektrum von **6a**.*

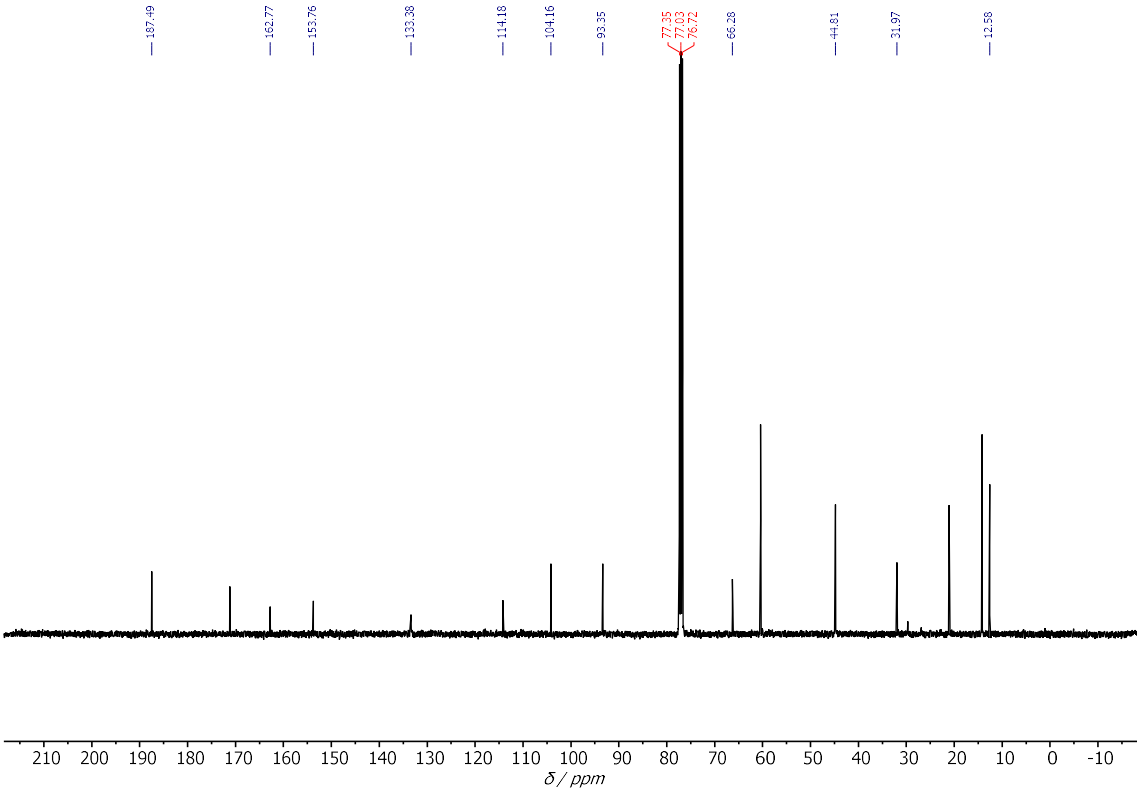


*Abbildung 81: [13]C-NMR-Spektrum von **6a**.*

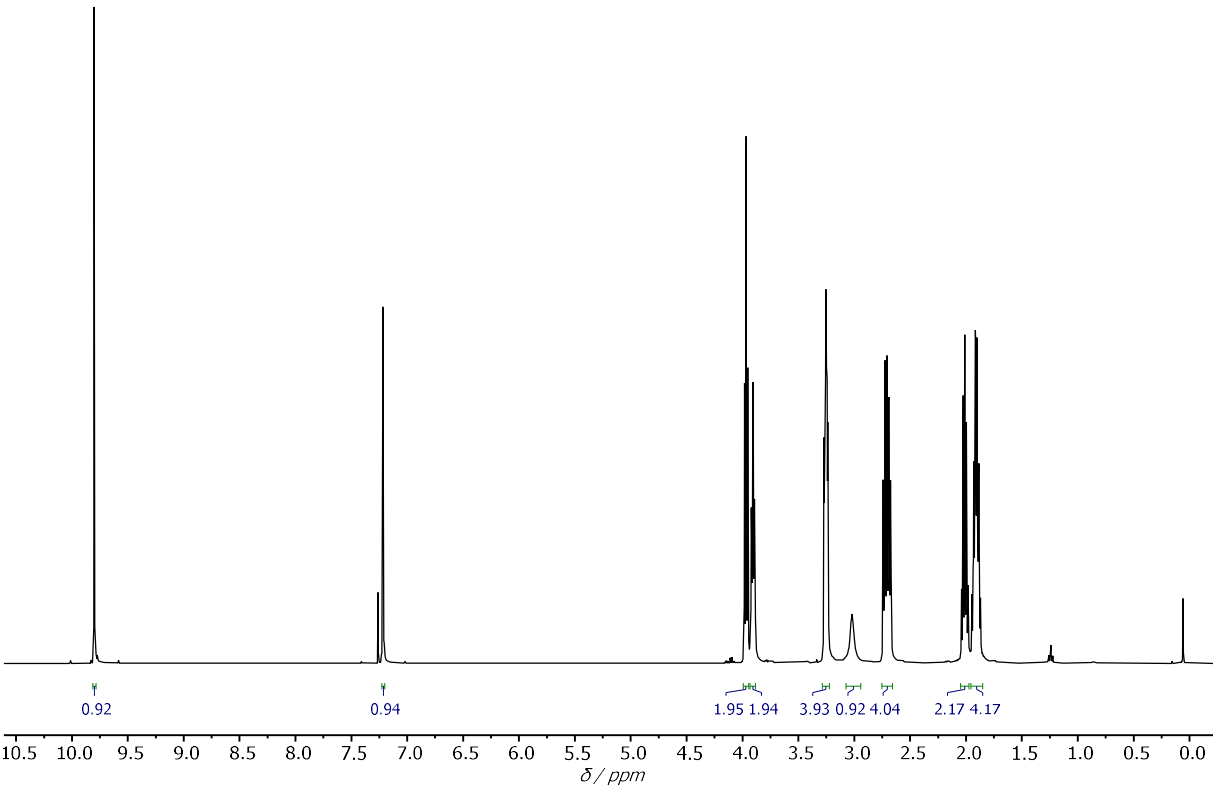


*Abbildung 82: [1]H-NMR-Spektrum von **6b**.*

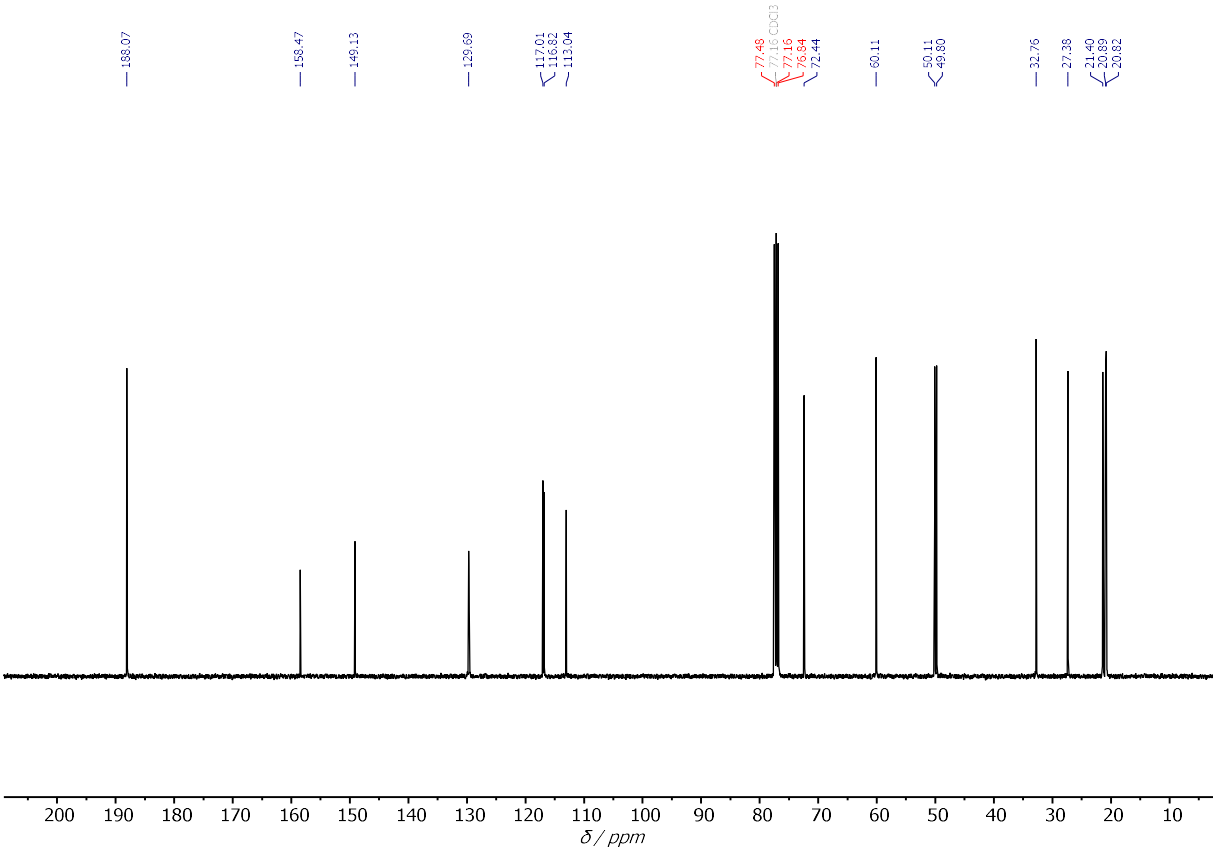


*Abbildung 83: [13]C-NMR-Spektrum von **6b**.*

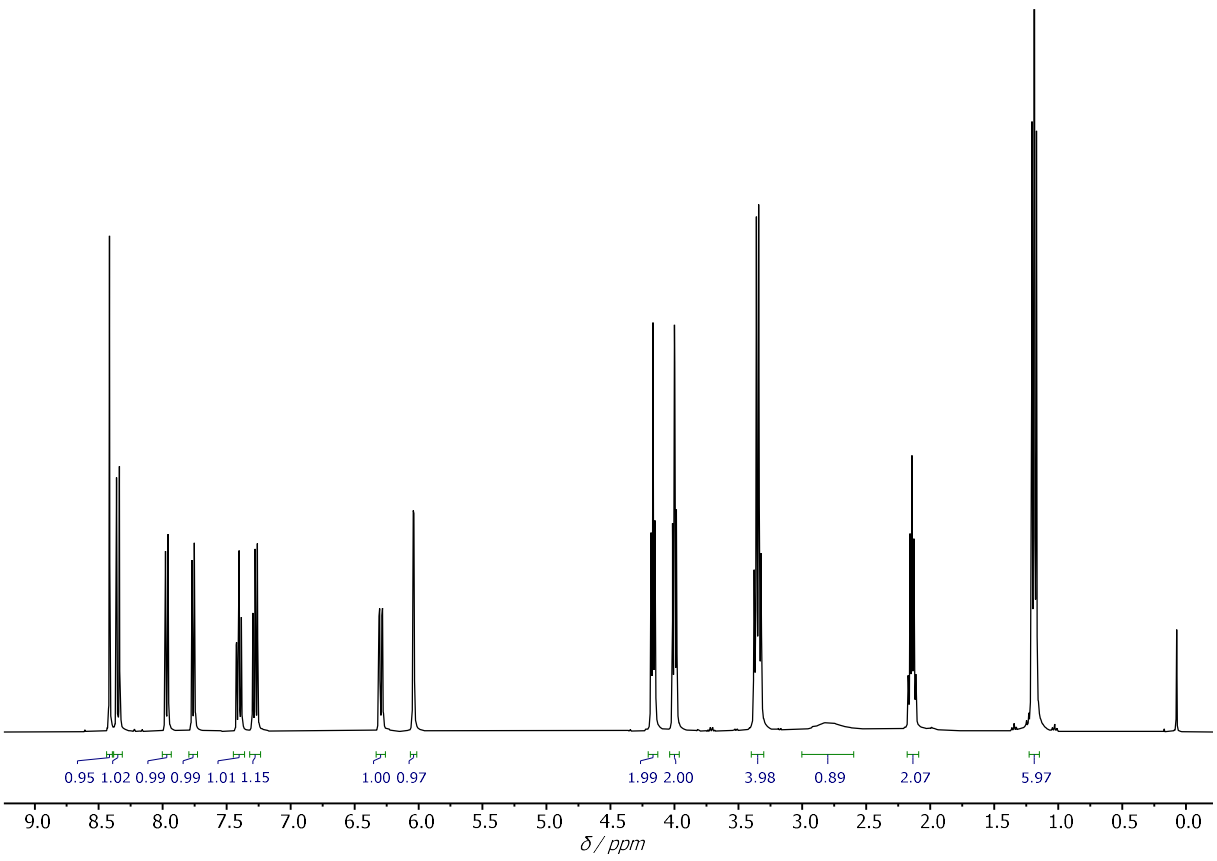


*Abbildung 84: [1]H-NMR-Spektrum von **7a**.*

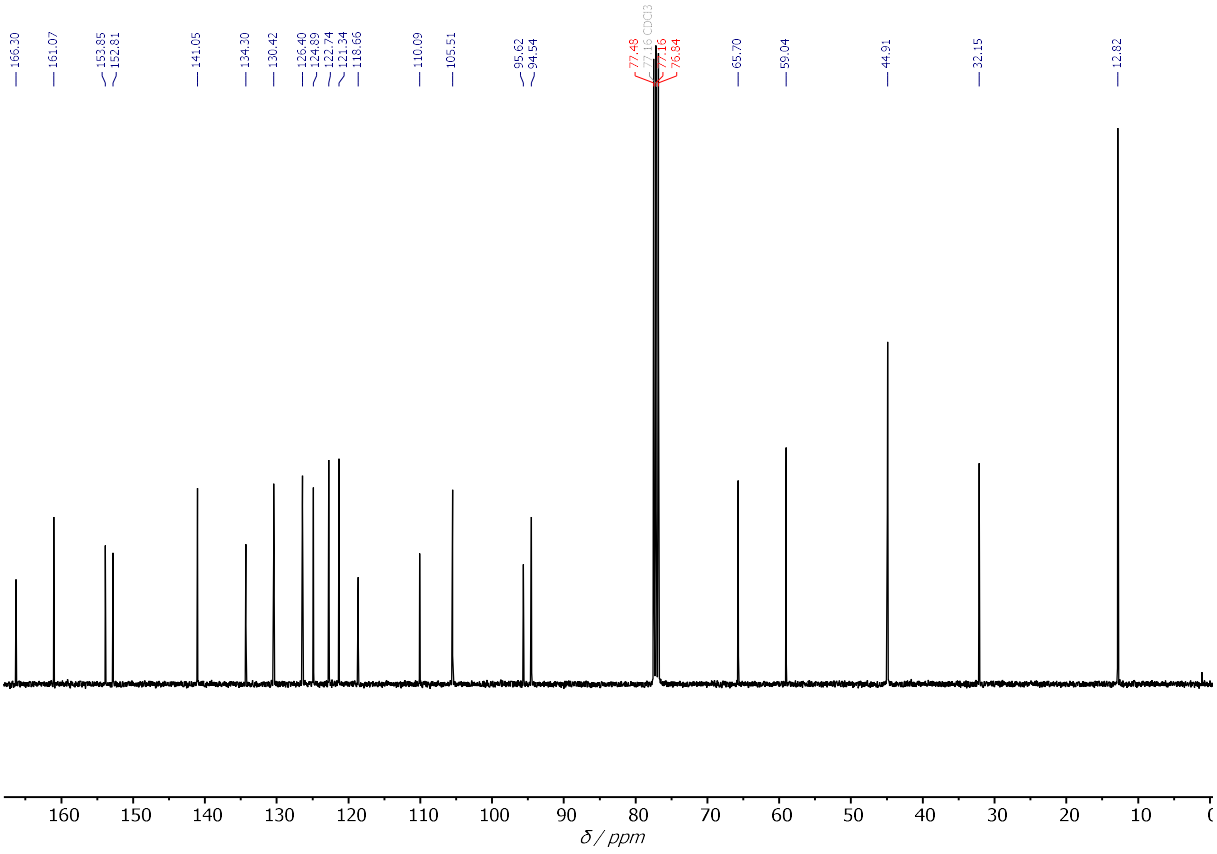


*Abbildung 85: [13]C-NMR-Spektrum von **7a**.*

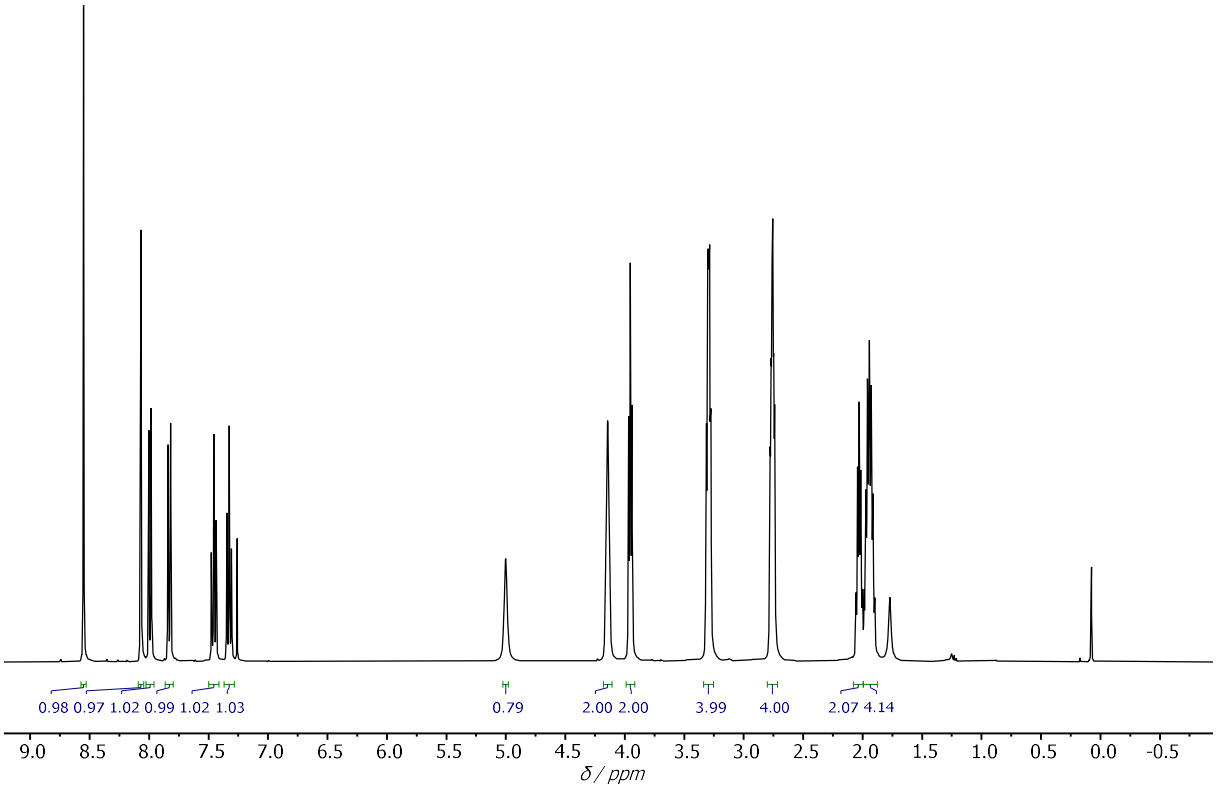


*Abbildung 86: [1]H-NMR-Spektrum von **7b**.*

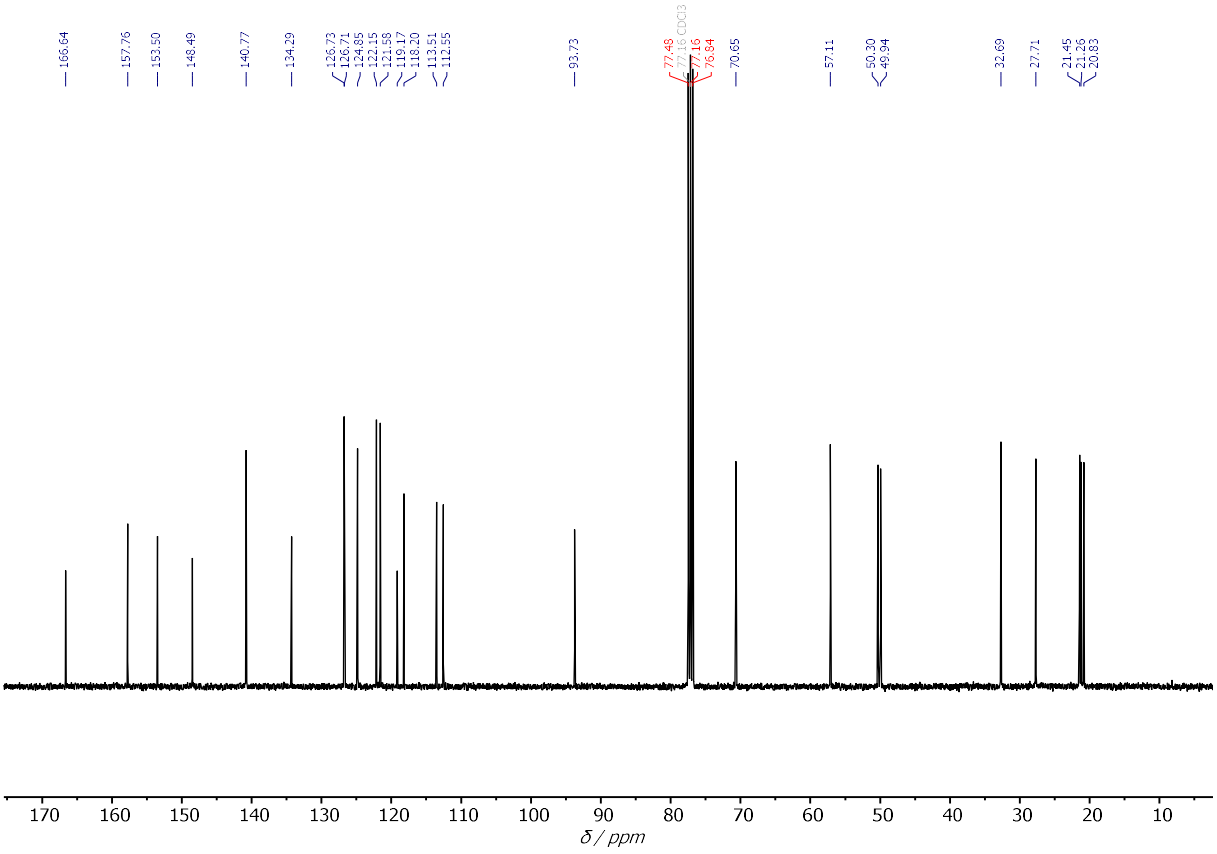


*Abbildung 87: [13]C-NMR-Spektrum von **7b**.*

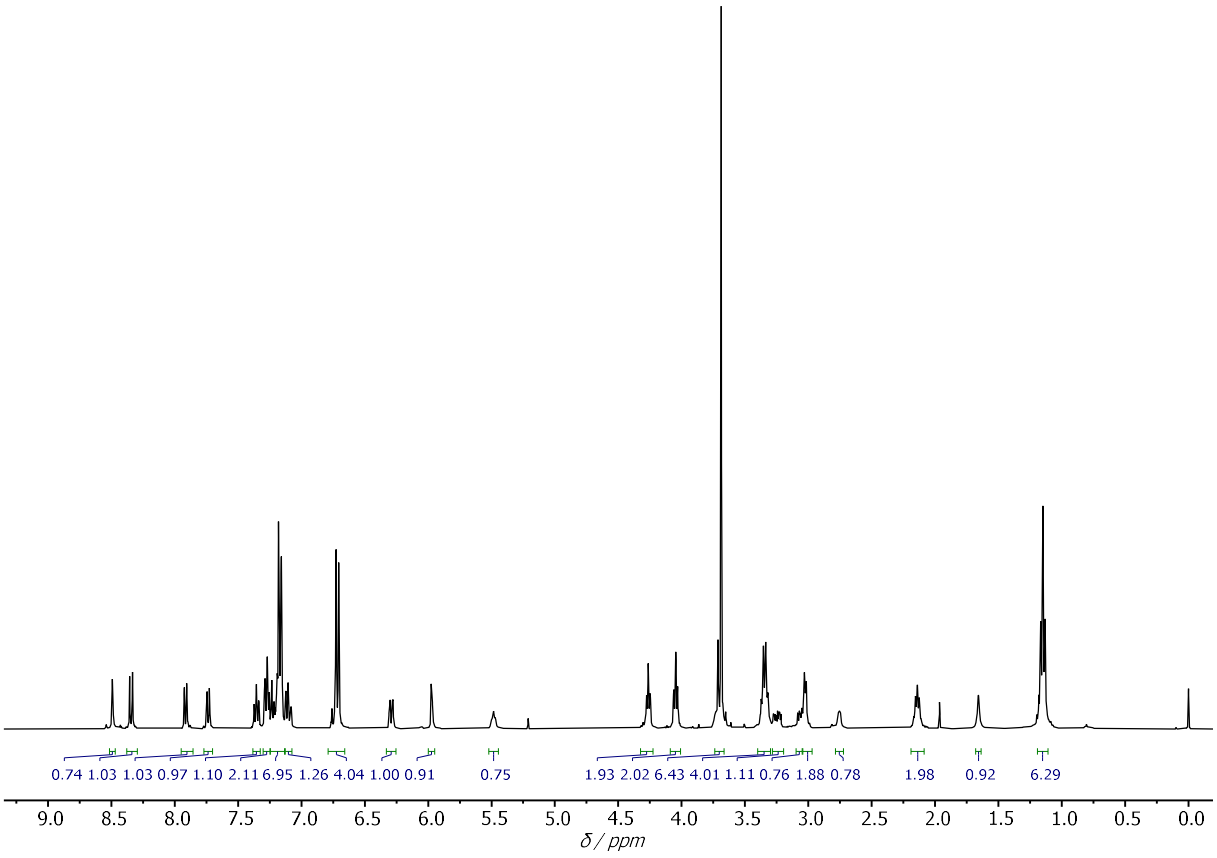


*Abbildung 88: [1]H-NMR-Spektrum von **8a**.*

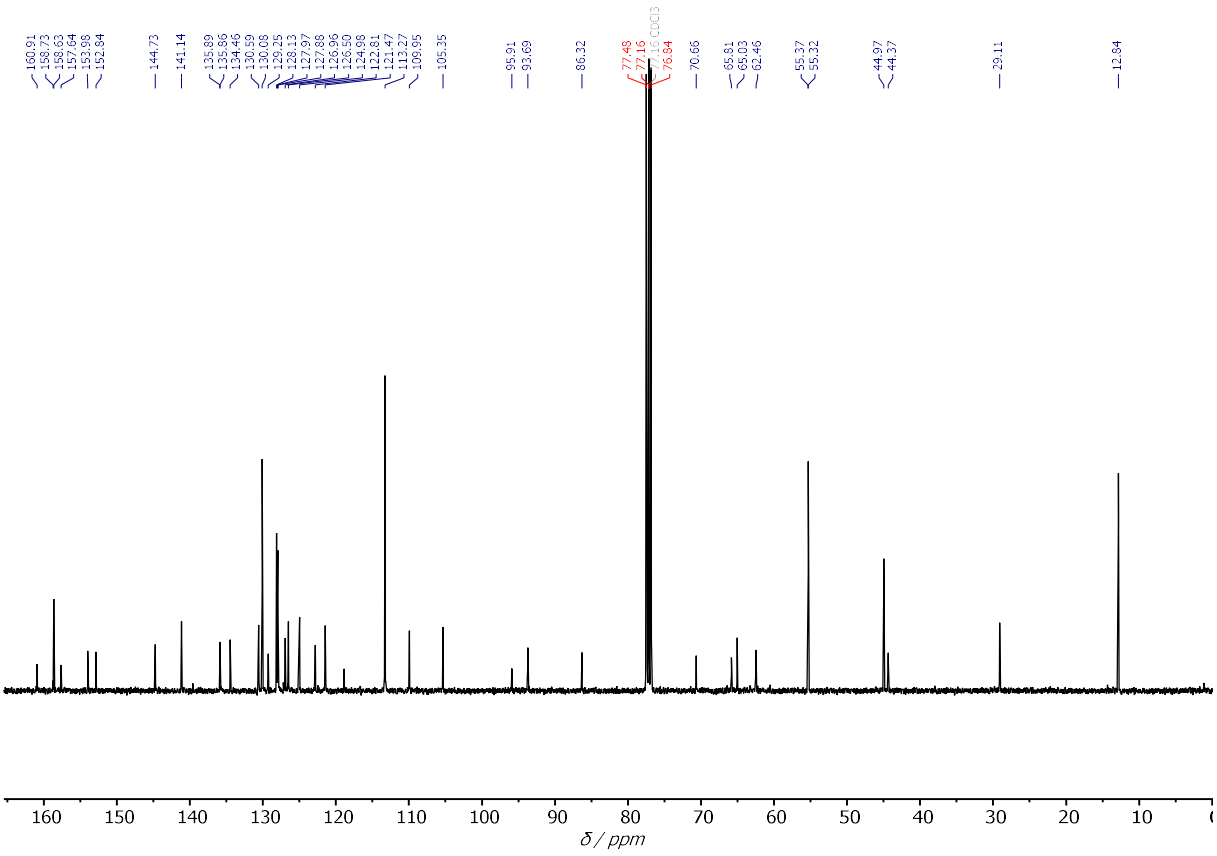


*Abbildung 89: [13]C-NMR-Spektrum von **8a.***

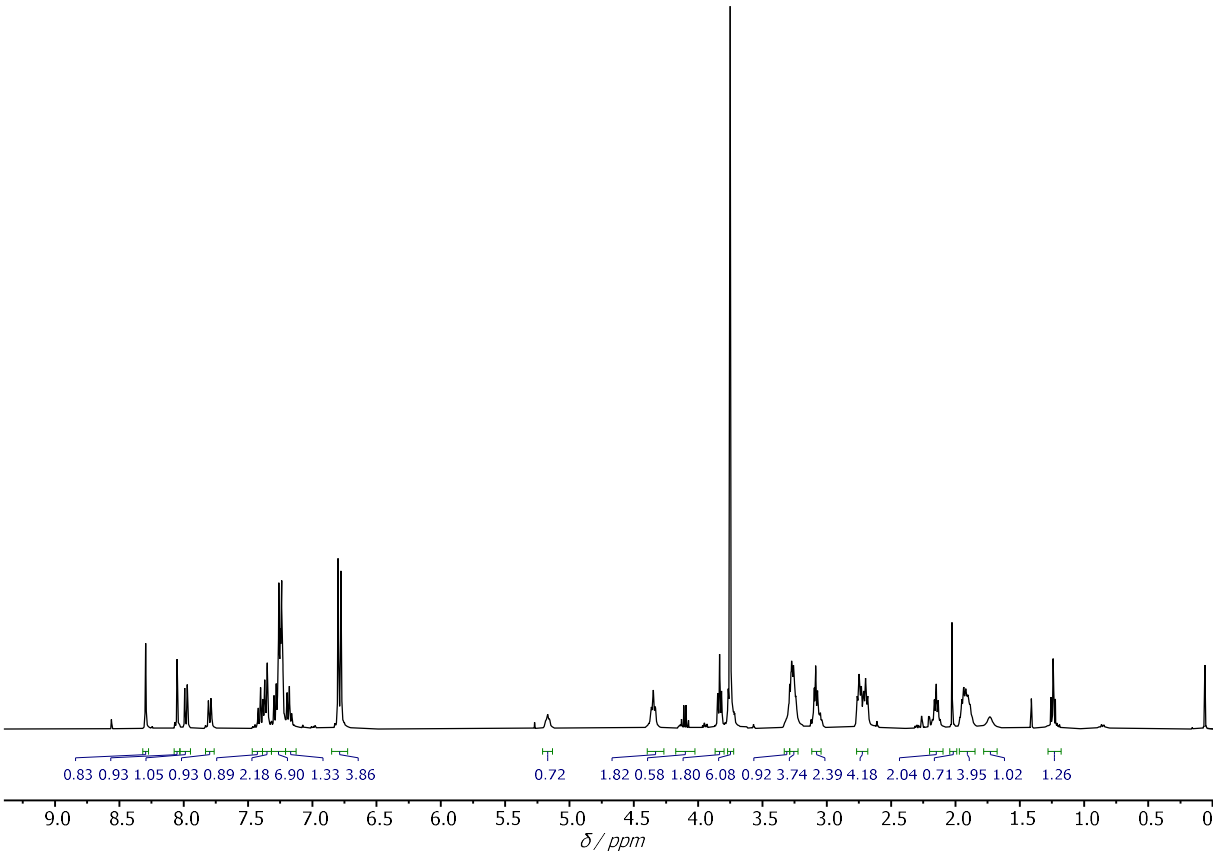


*Abbildung 90: [1]H-NMR-Spektrum von **8b.***

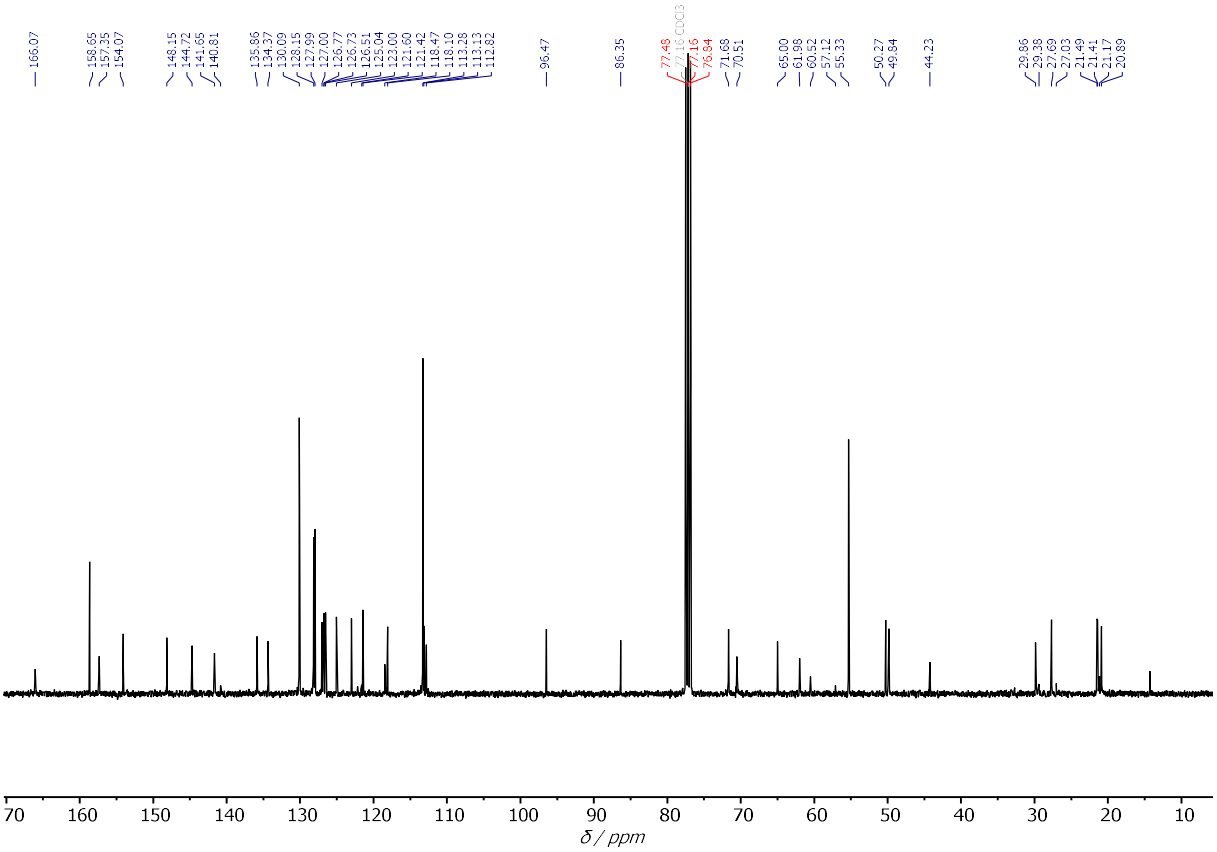


*Abbildung 91: [13]C-NMR-Spektrum von **8b**.*

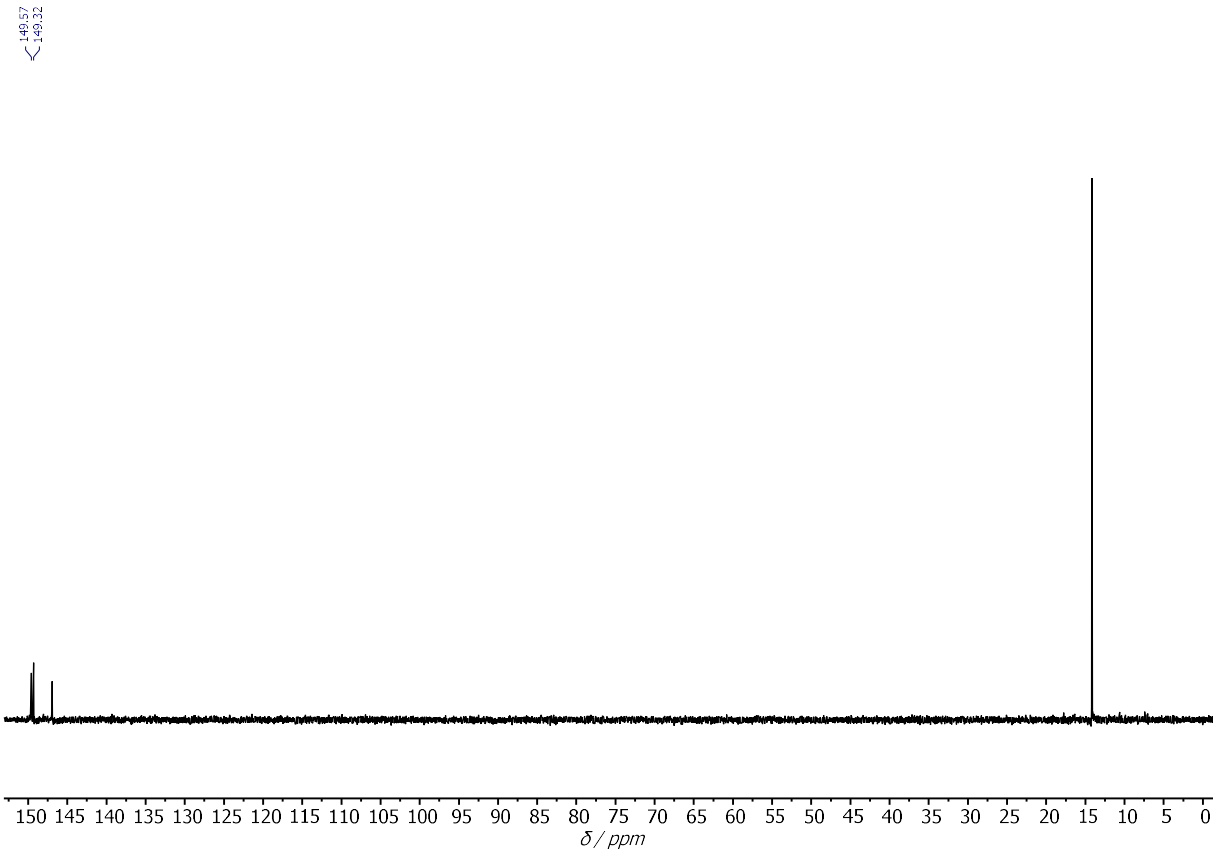


*Abbildung 92: [31]P-NMR-Spektrum von **9a**.*

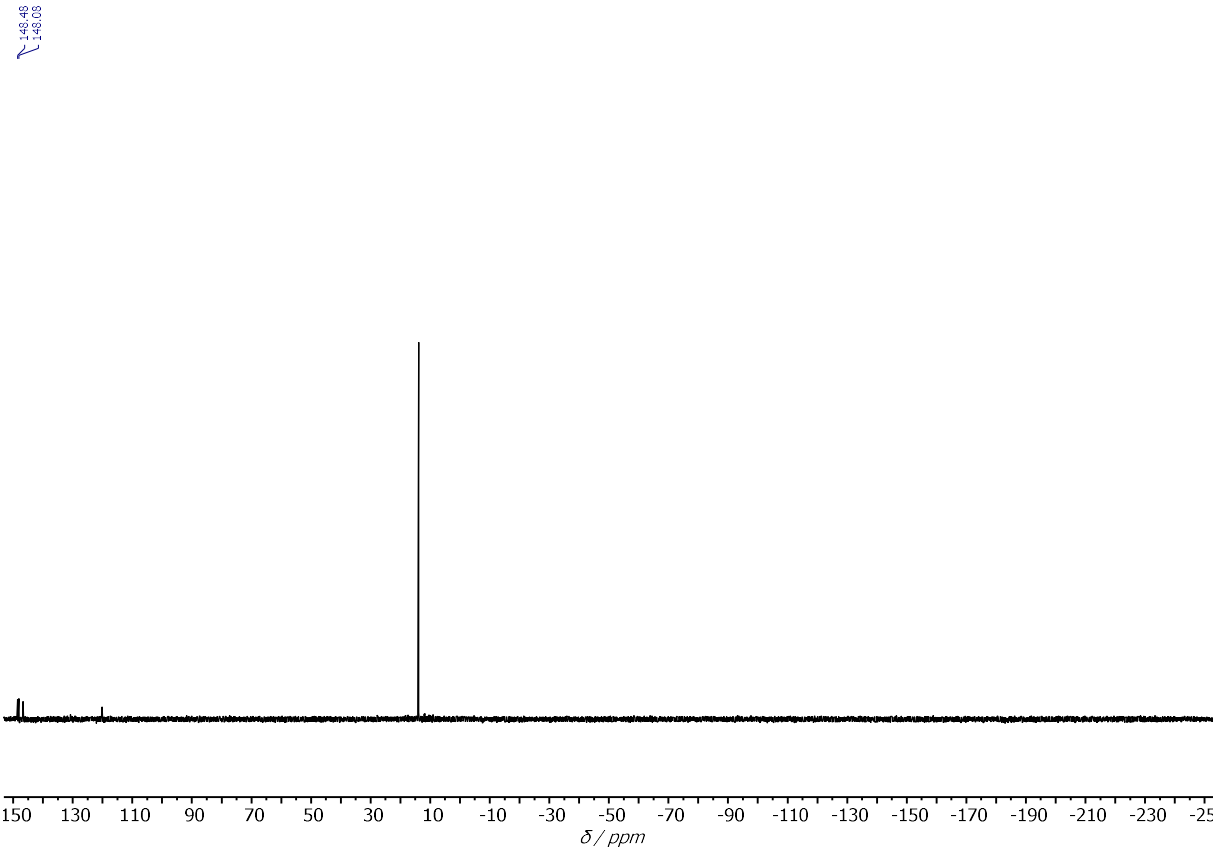


*Abbildung 93: ^{31}P-NMR-Spektrum von **9b**.*

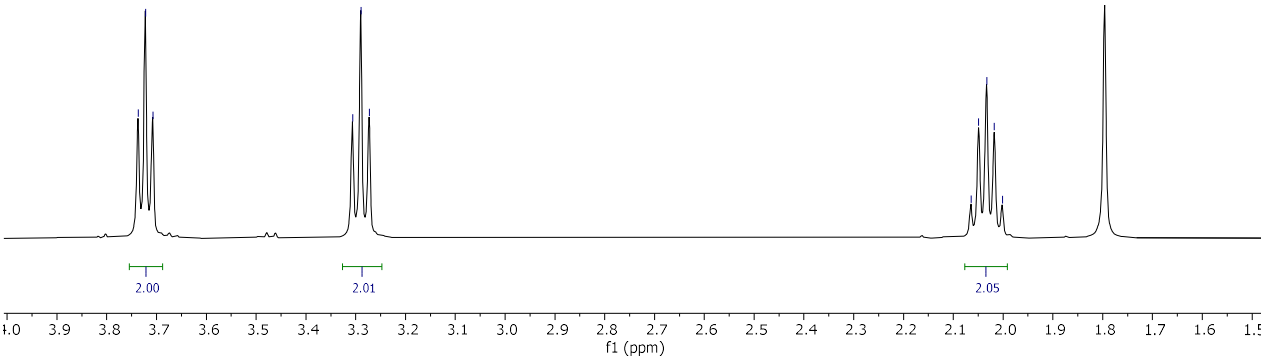


*Abbildung 94: ^{1}H-NMR-Spektrum von **10.***

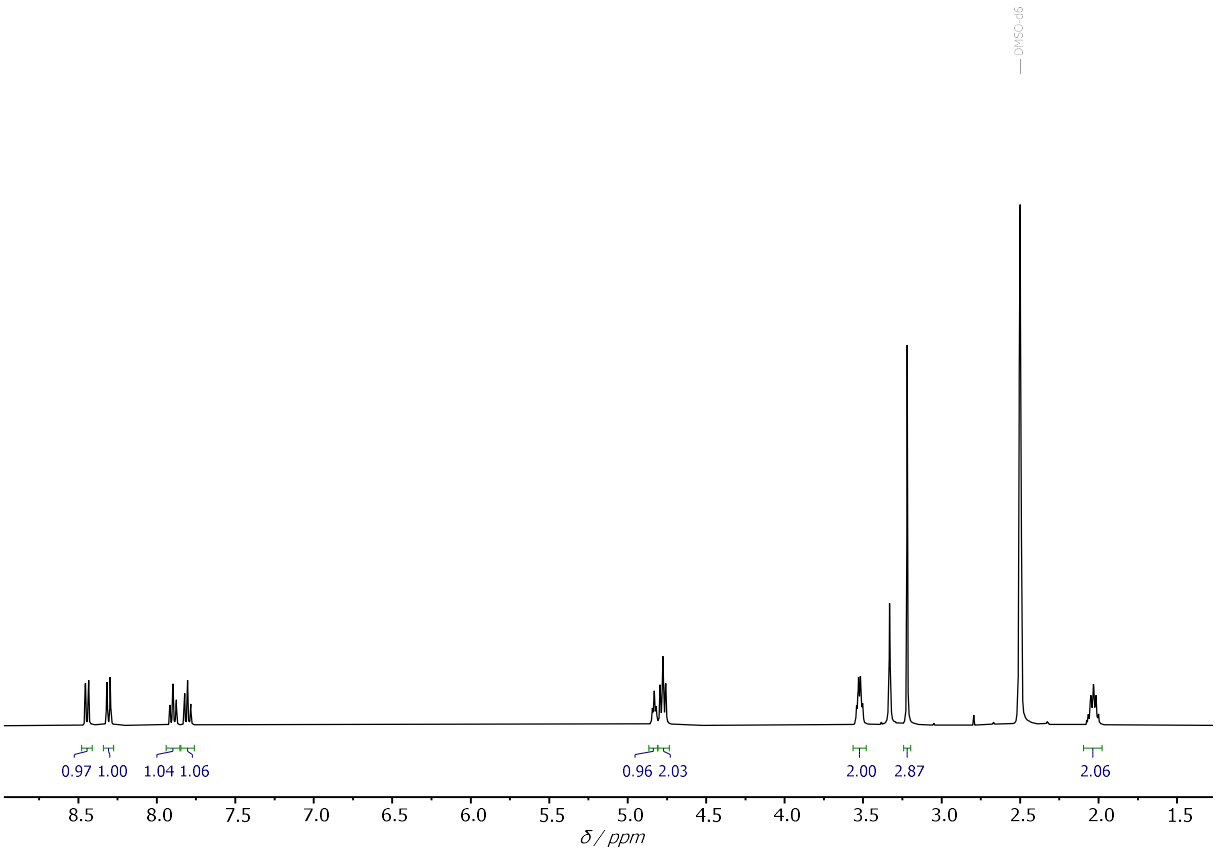


*Abbildung 95: ^{1}H-NMR-Spektrum von **12**.*

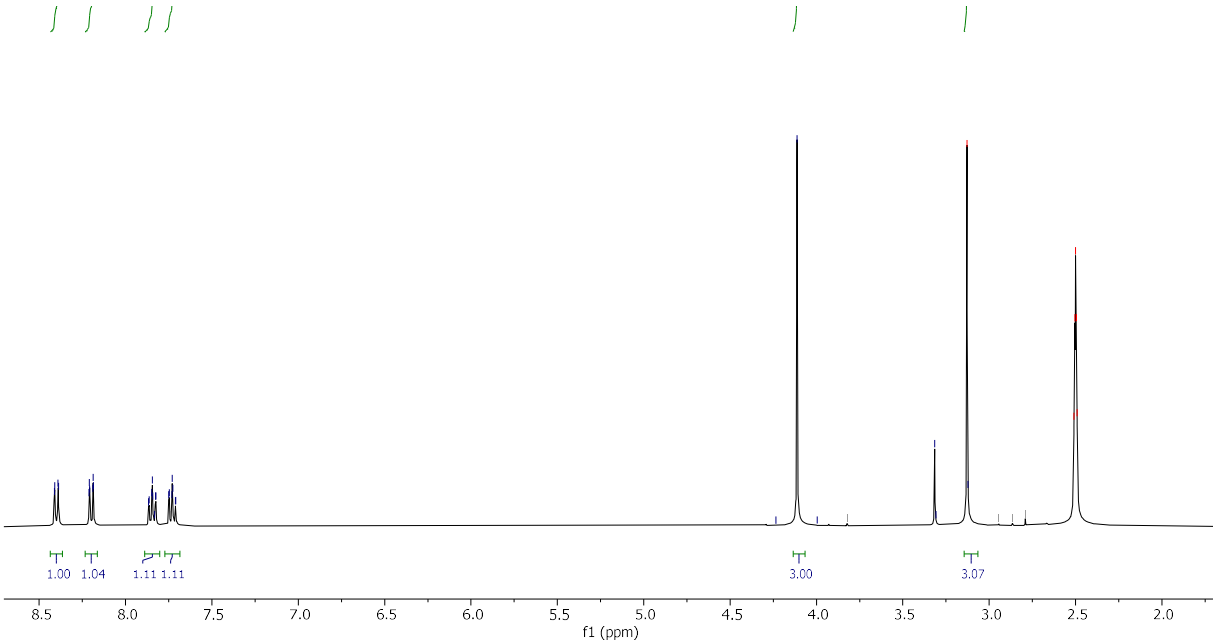


*Abbildung 96: ^{1}H-NMR-Spektrum von **14**.*

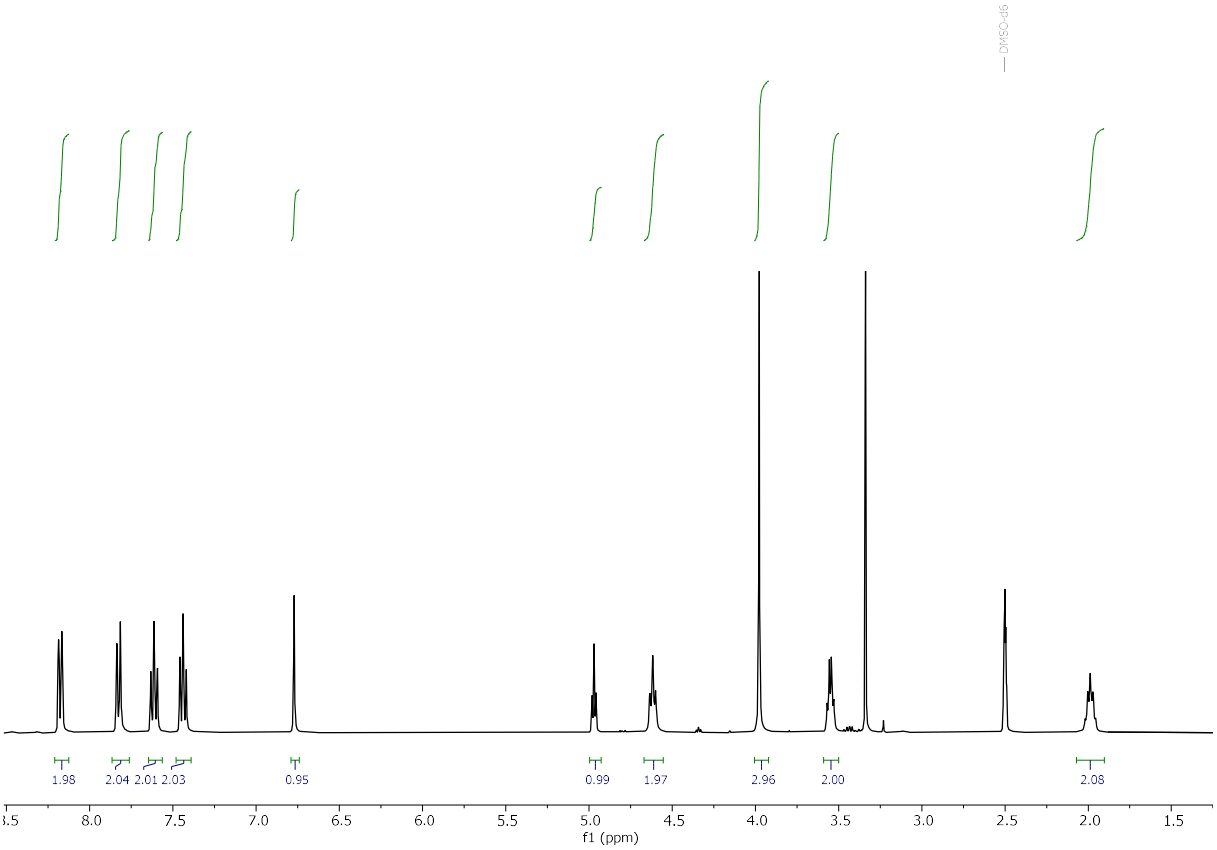


*Abbildung 97: [1]H-NMR-Spektrum von **15.***

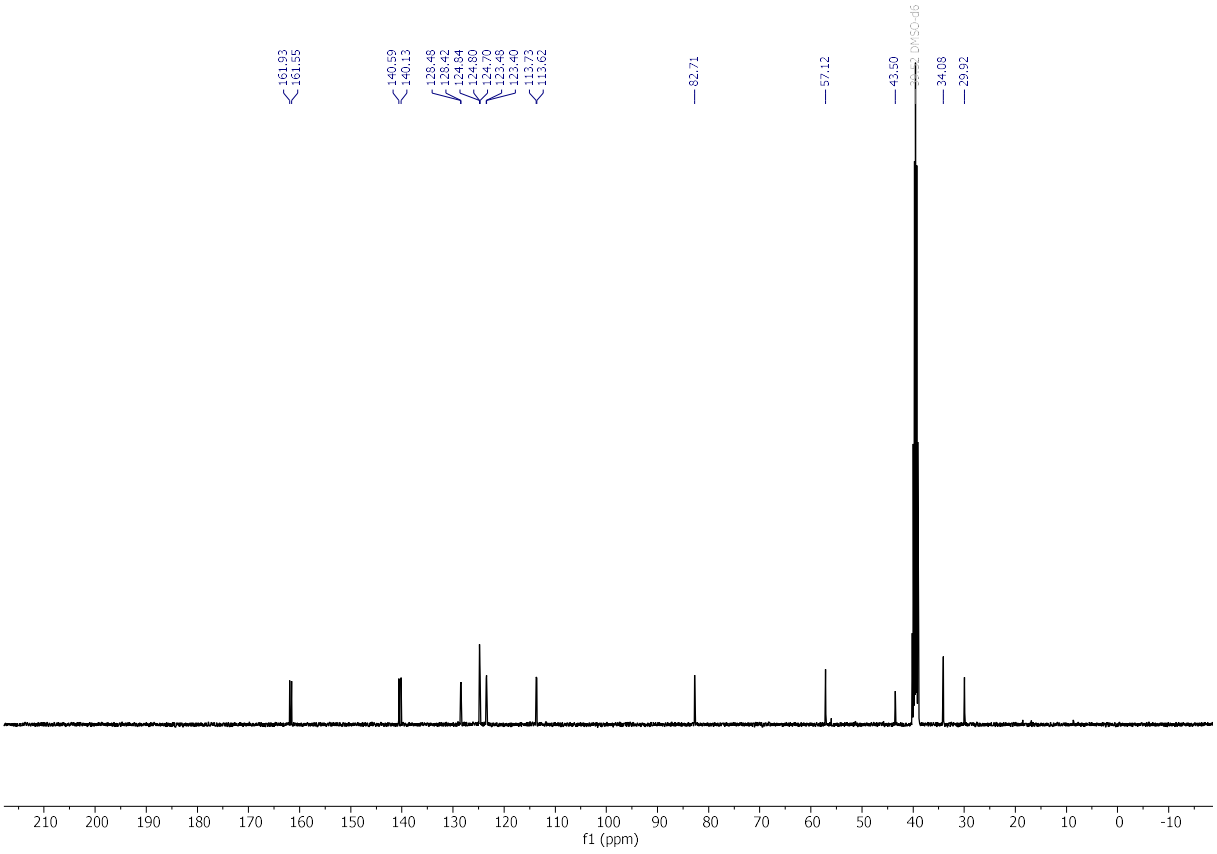


*Abbildung 98: [13]C-NMR-Spektrum von **15.***

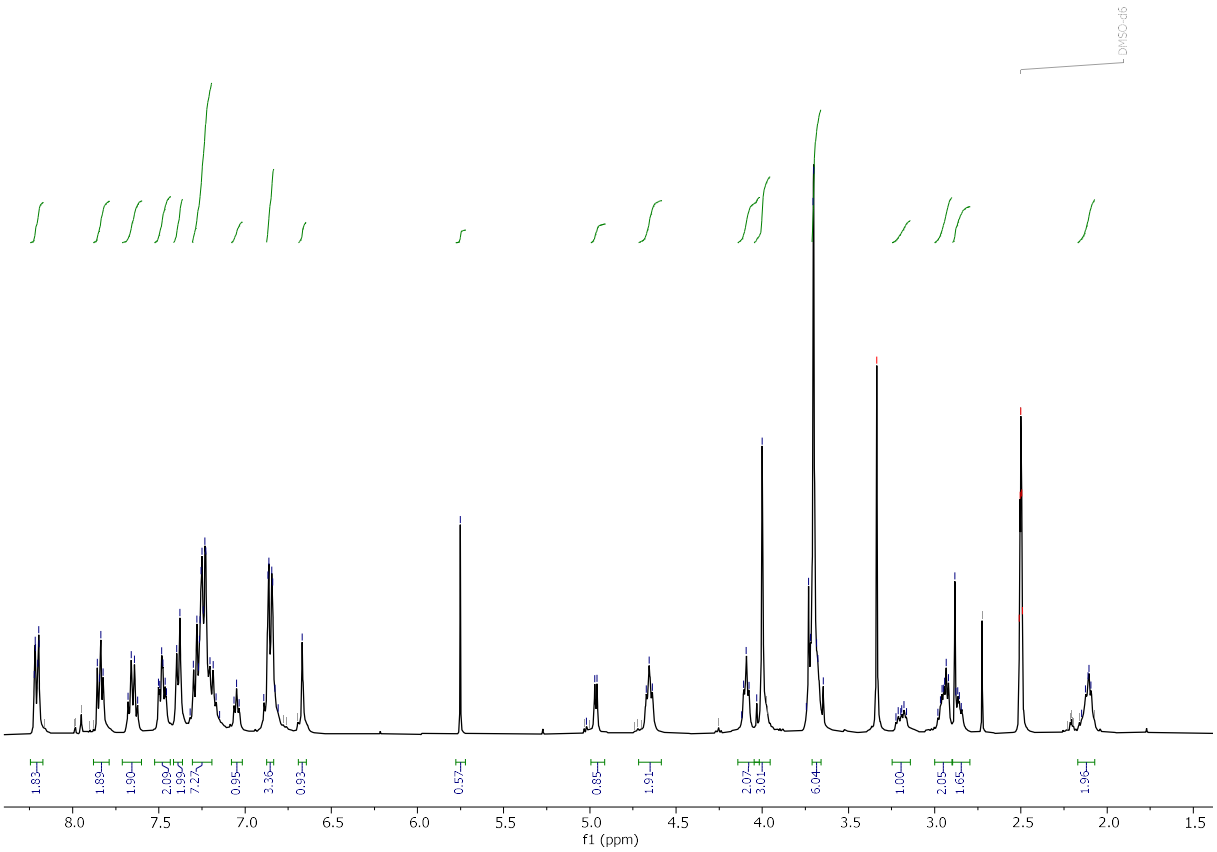


*Abbildung 99: ^{1}H-NMR-Spektrum von **16**.*

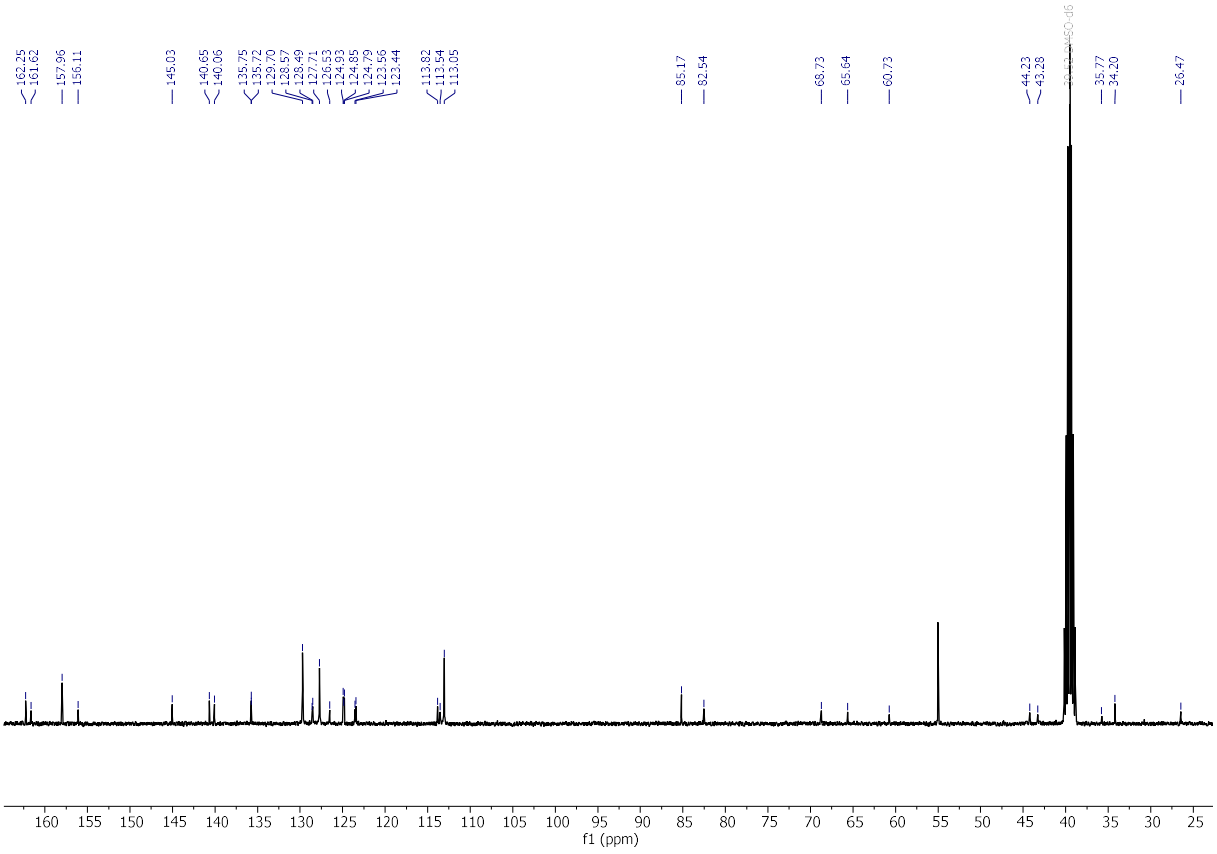


*Abbildung 100: ^{13}C-NMR-Spektrum von **16**.*

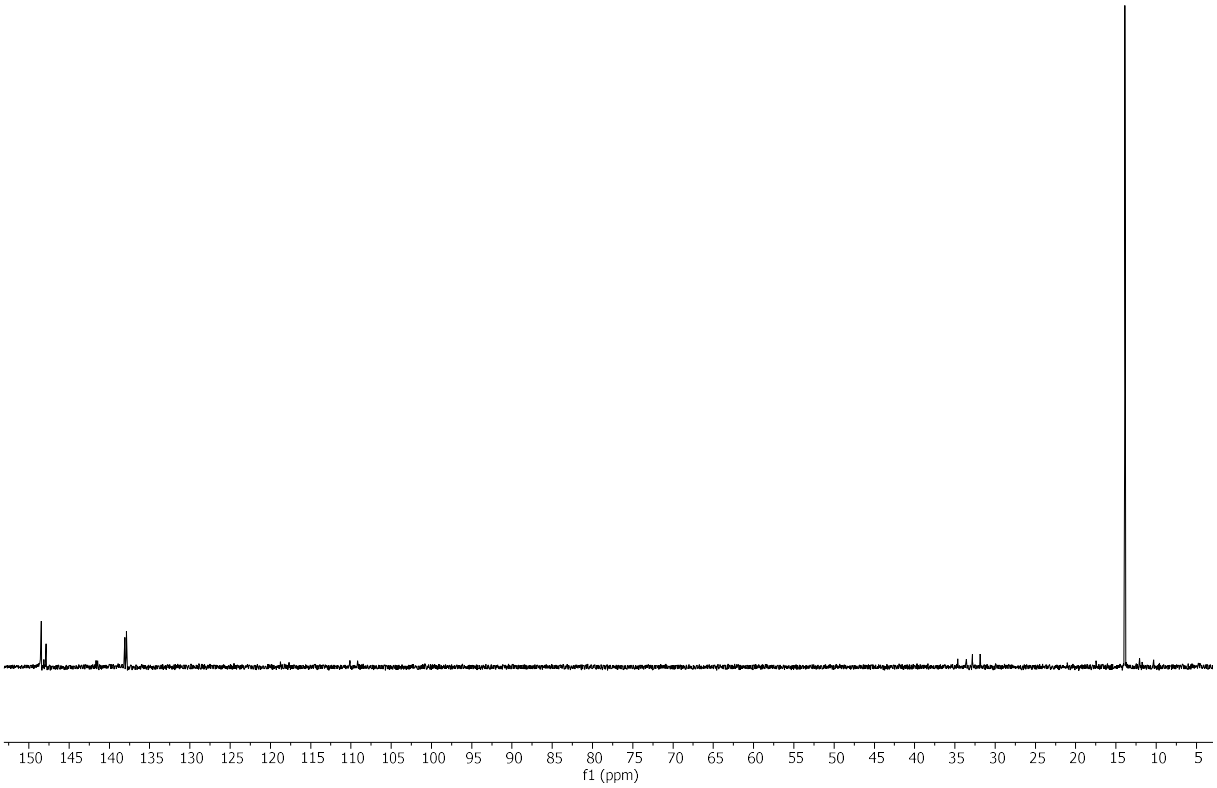


*Abbildung 101: ^{31}P-NMR-Spektrum von **17.***

8.2 ESI-Spektren

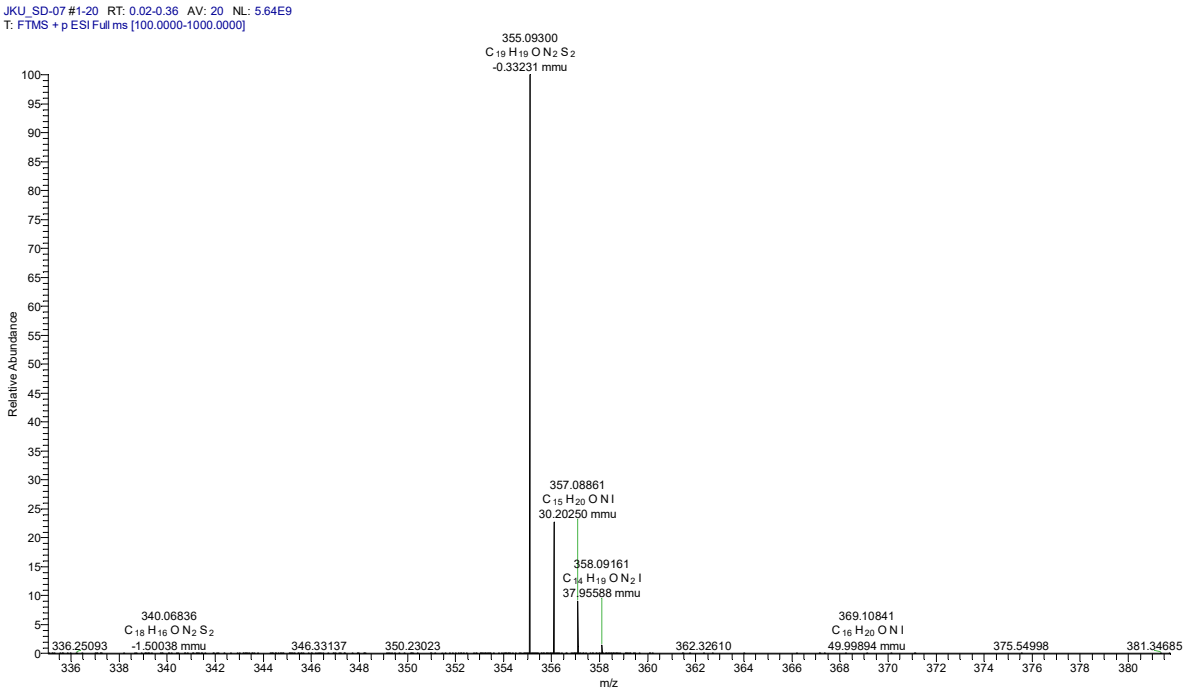


*Abbildung 102: ESI-Masse-Spektrum von **6a.***

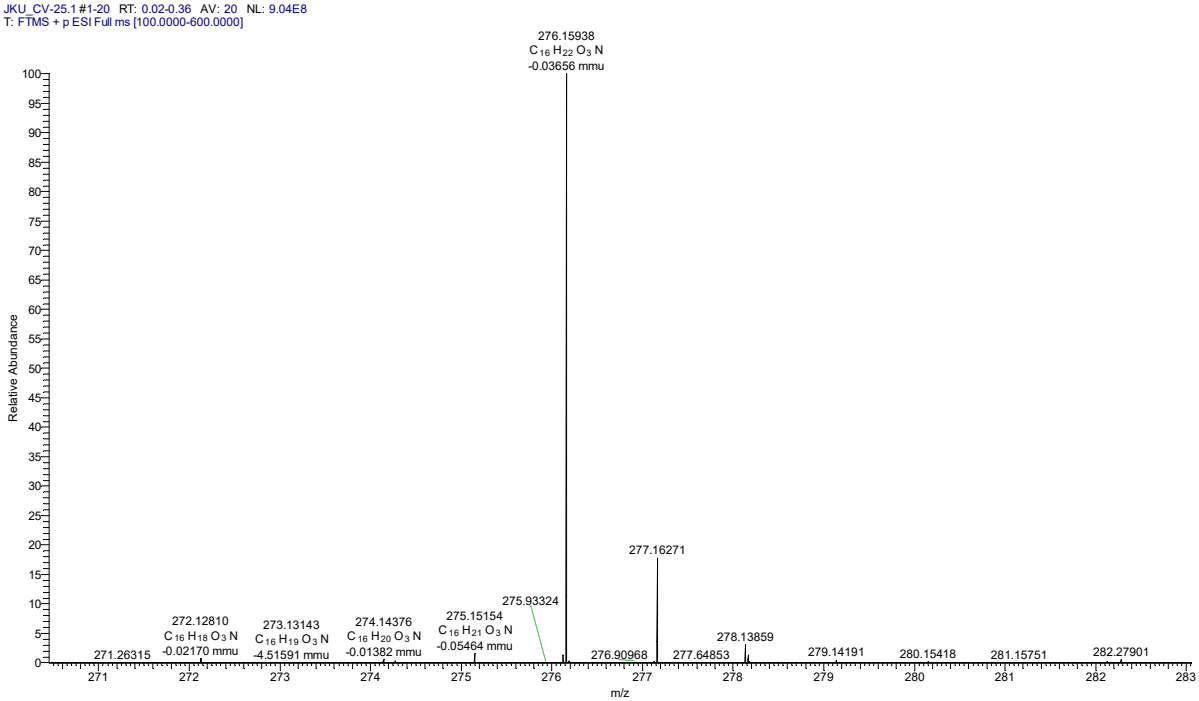


*Abbildung 103: ESI-Masse-Spektrum von **6b.***

8. Anlagen

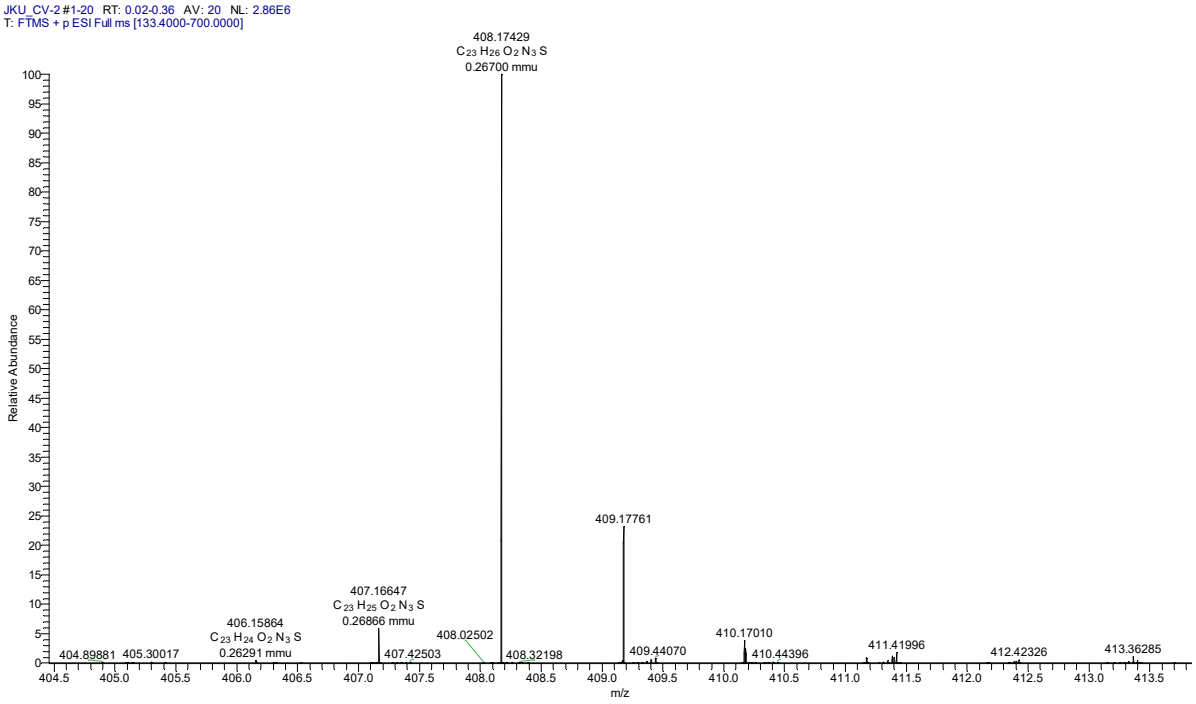


*Abbildung 104: ESI-Masse-Spektrum von **7a.***

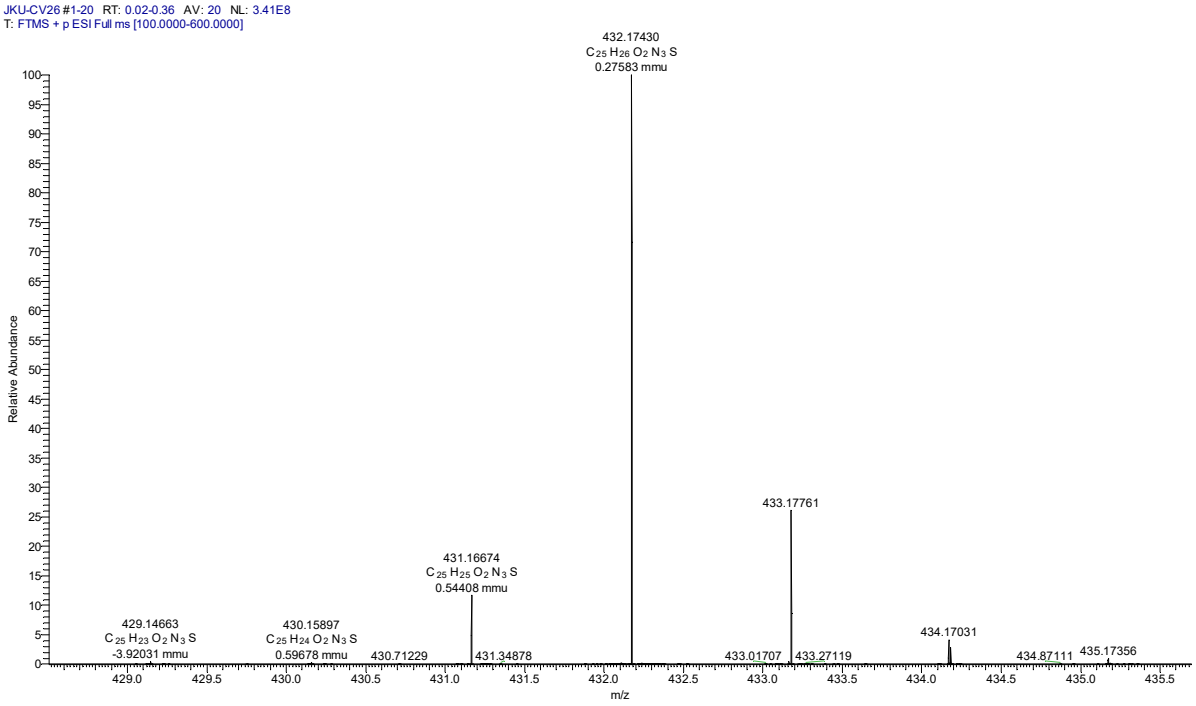


*Abbildung 105: ESI-Masse-Spektrum von **7b.***

8. Anlagen

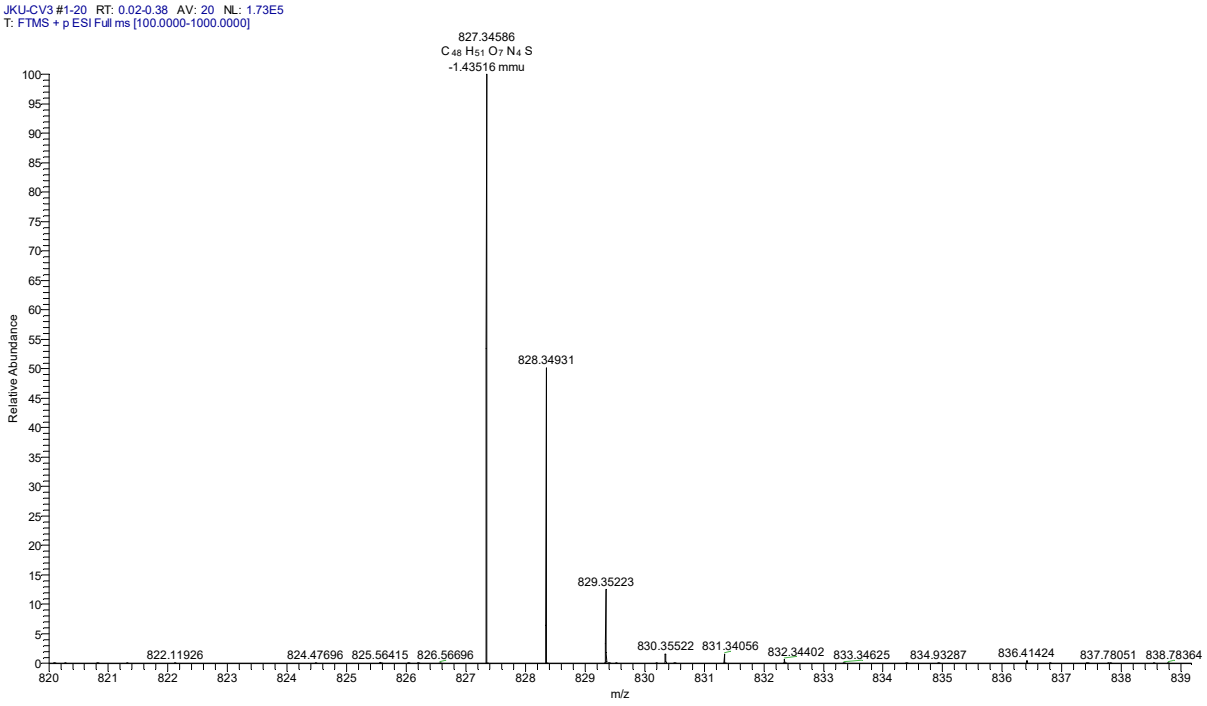


*Abbildung 106: ESI-Masse-Spektrum von **8a.***

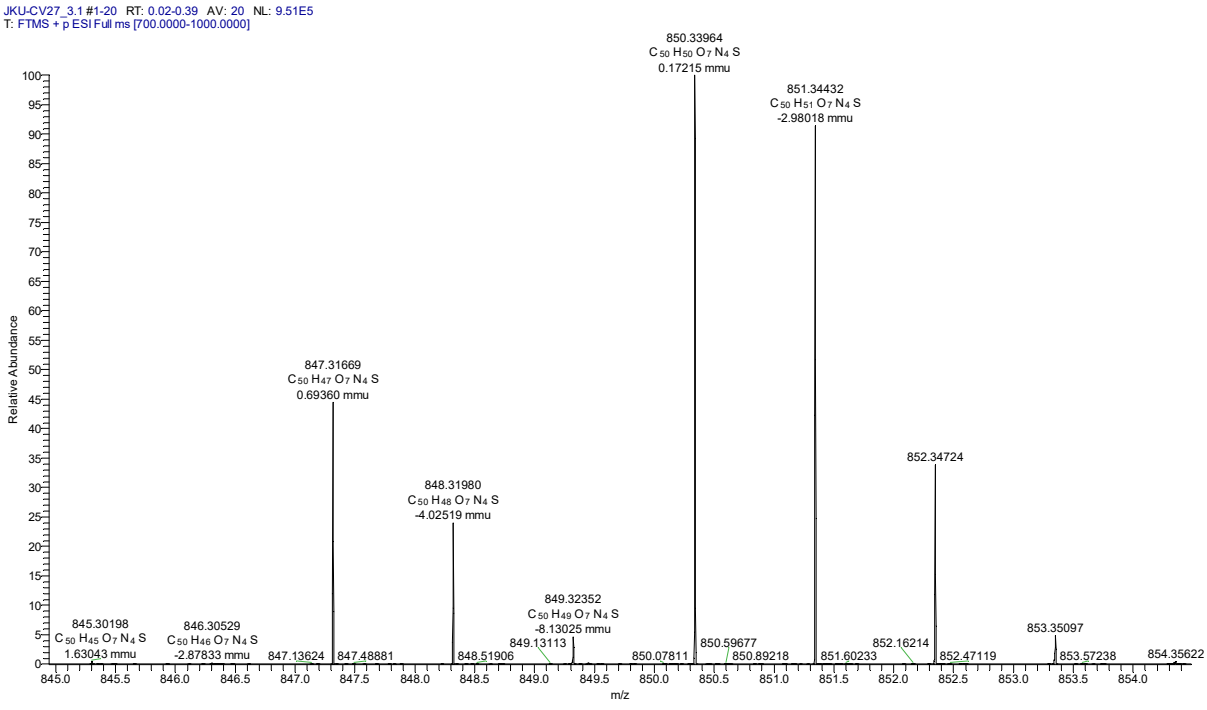


*Abbildung 107: ESI-Masse-Spektrum von **8b.***

8. Anlagen

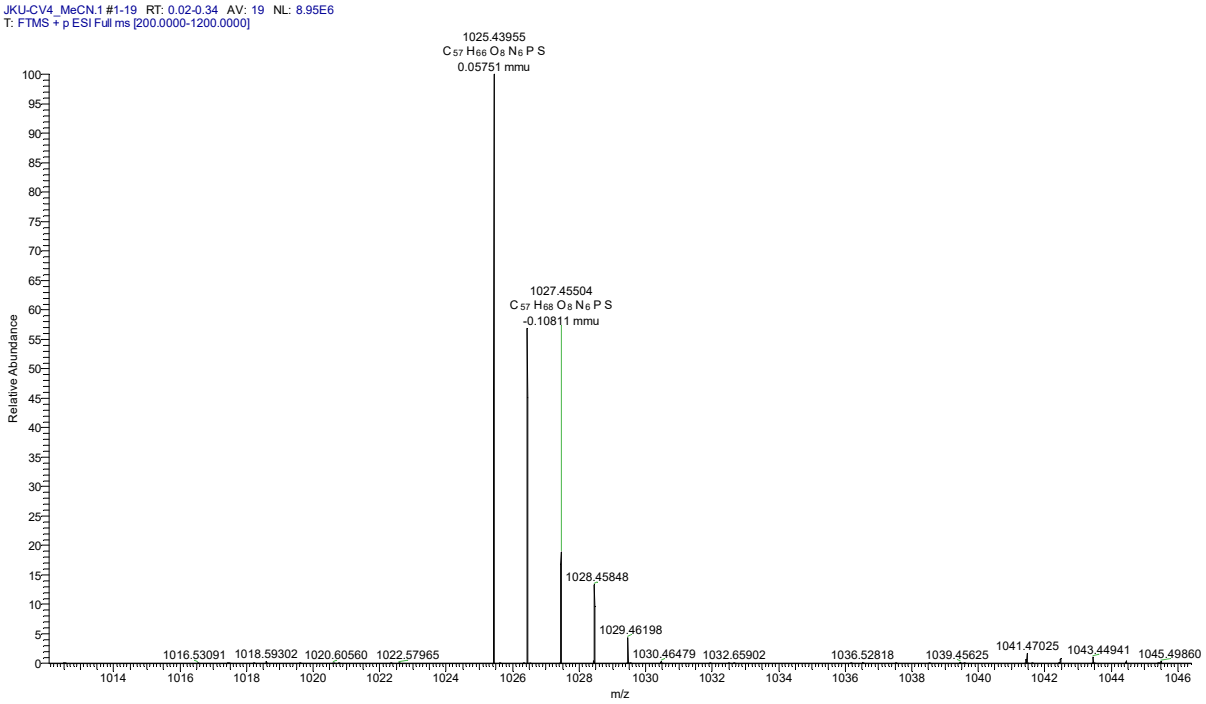


*Abbildung 108: ESI-Masse-Spektrum von **9a.***

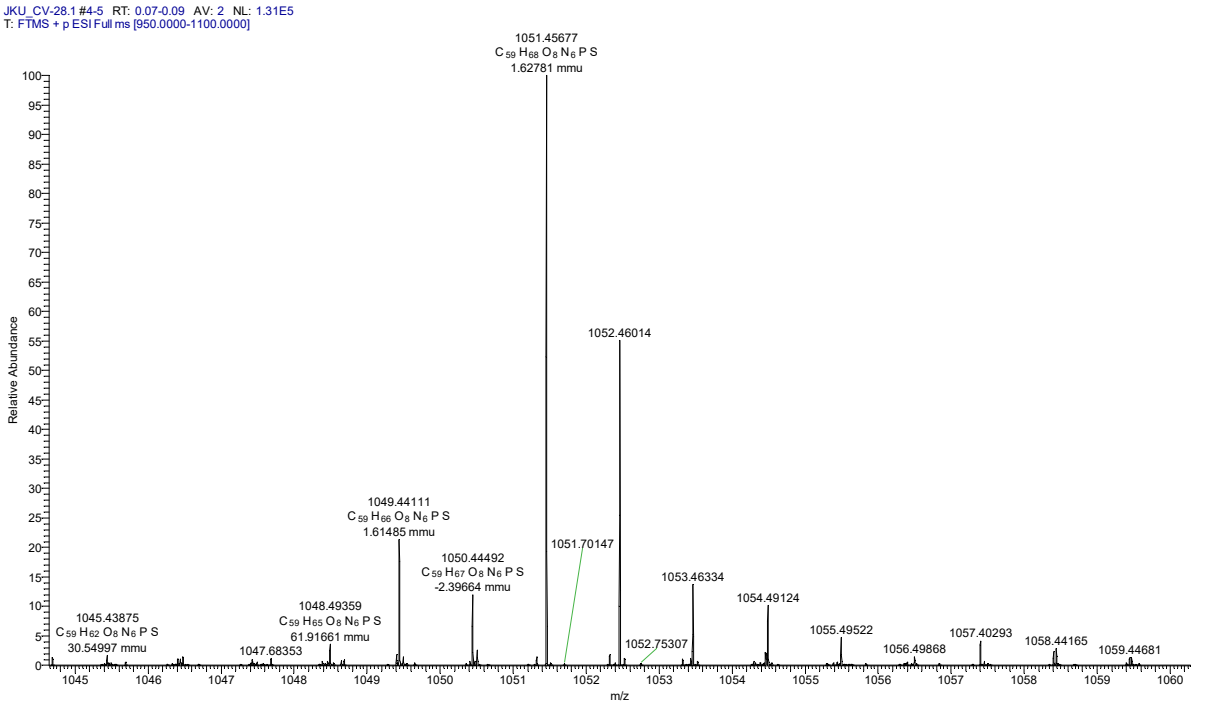


*Abbildung 109: ESI-Masse-Spektrum von **9b.***

8. Anlagen

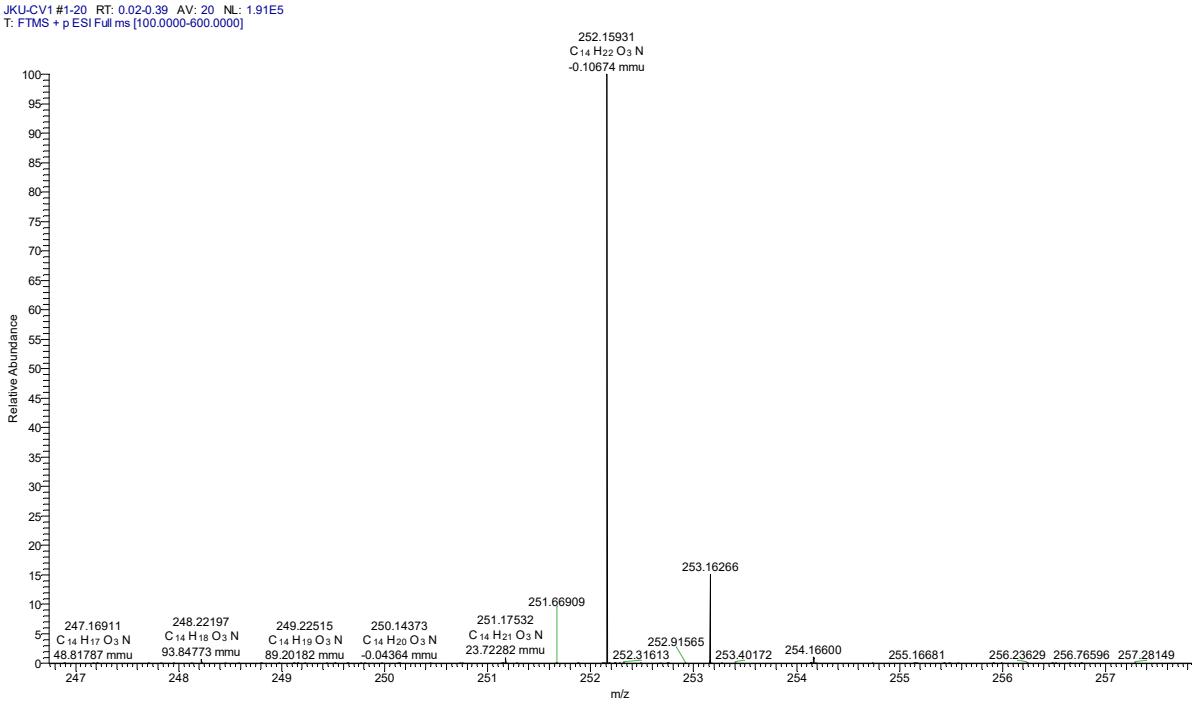


*Abbildung 110: ESI-Masse-Spektrum von **15.***

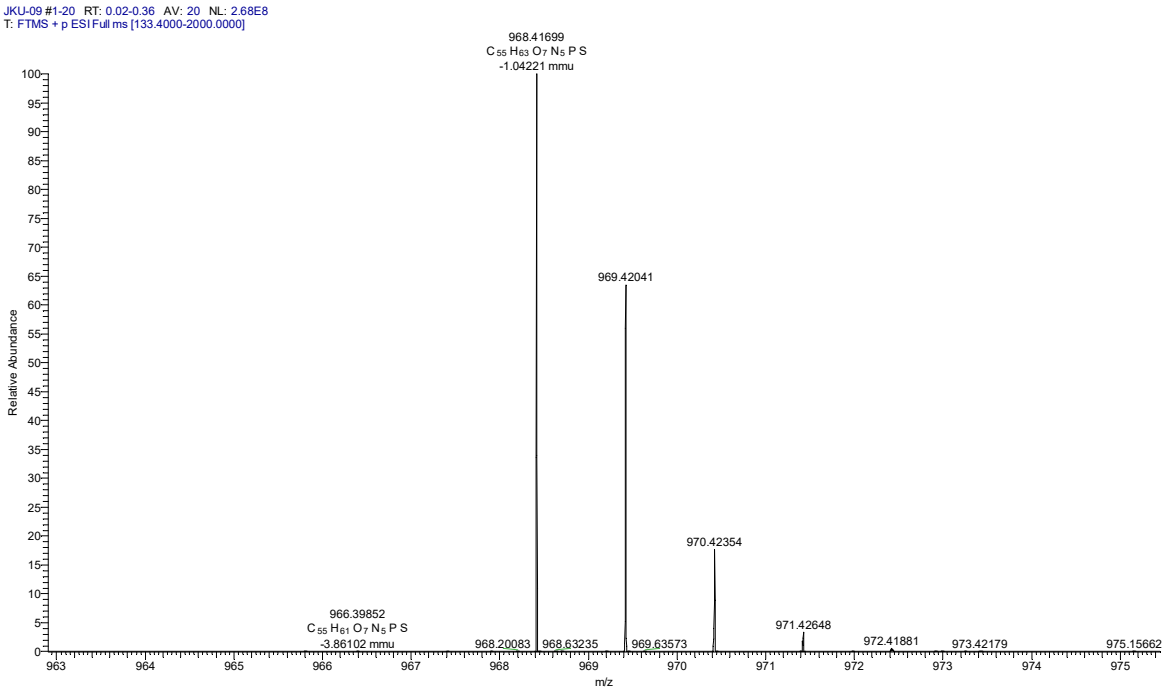


*Abbildung 111: ESI-Masse-Spektrum von **16.***

8. Anlagen

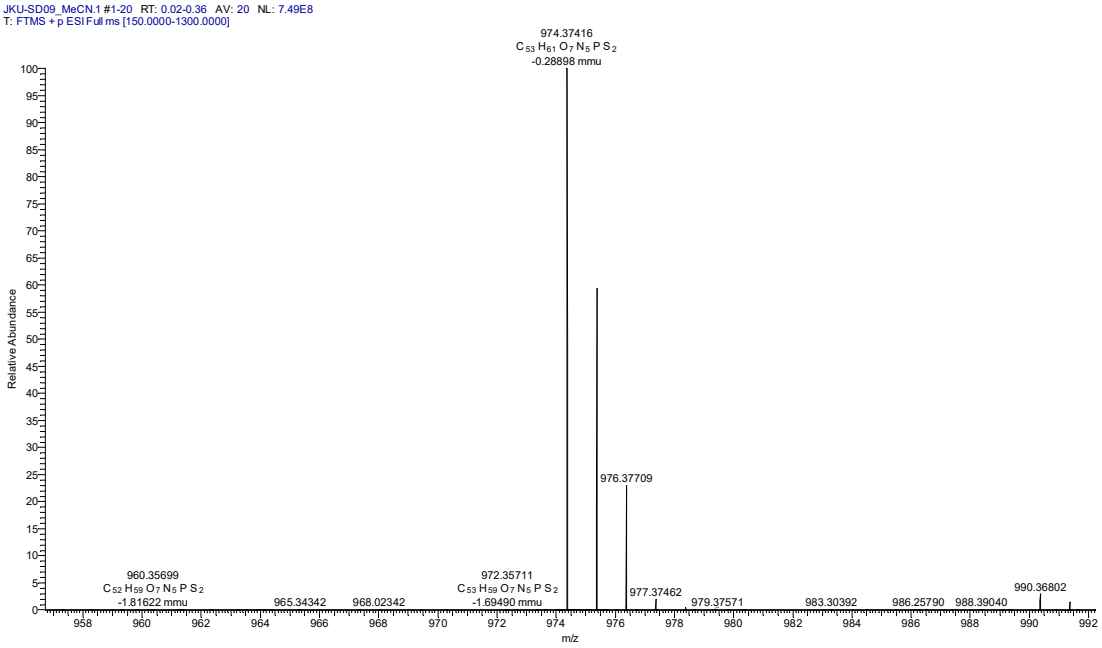


*Abbildung 112: ESI-Masse-Spektrum von **17.***

8.3 HPLC-Chromatogramme der DNA-Stränge

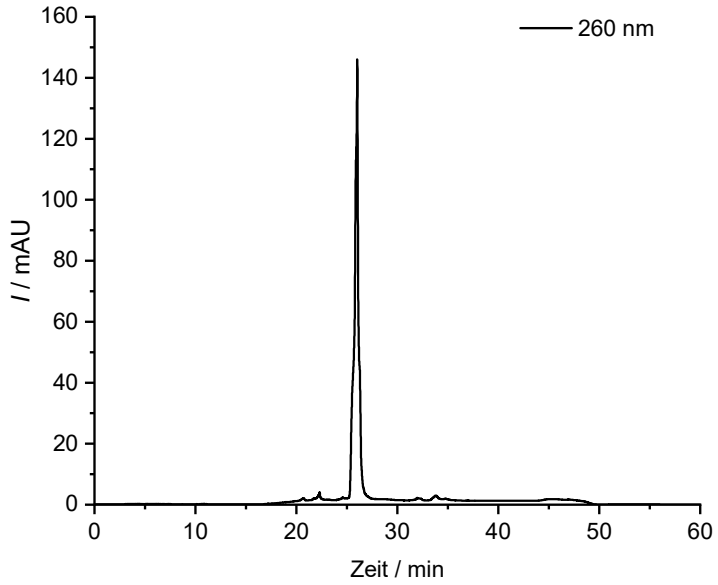


*Abbildung 113: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA1ss.***

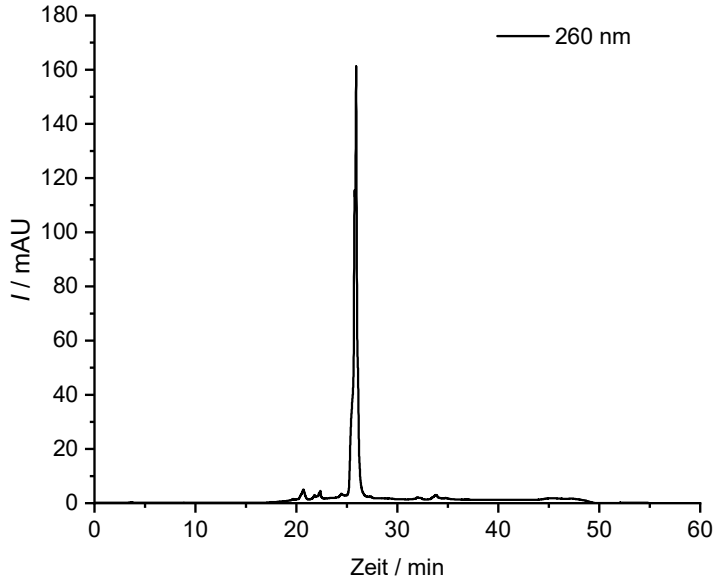


*Abbildung 114: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA1cs.***

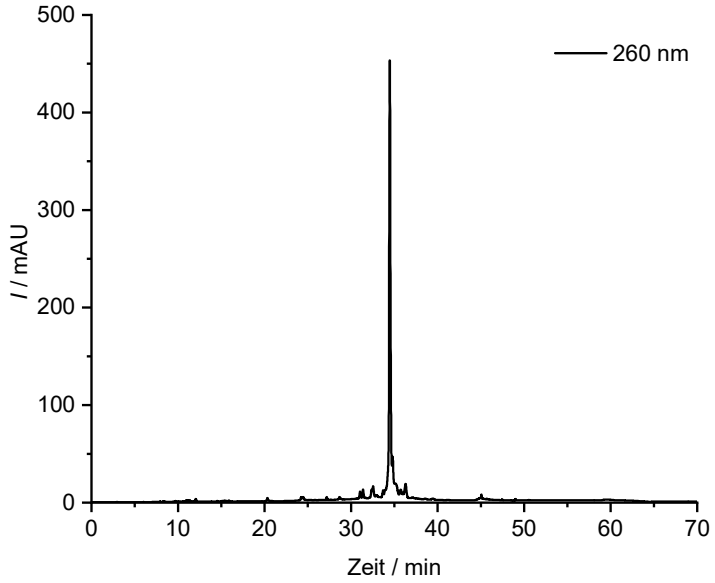


*Abbildung 115: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA3ss.***

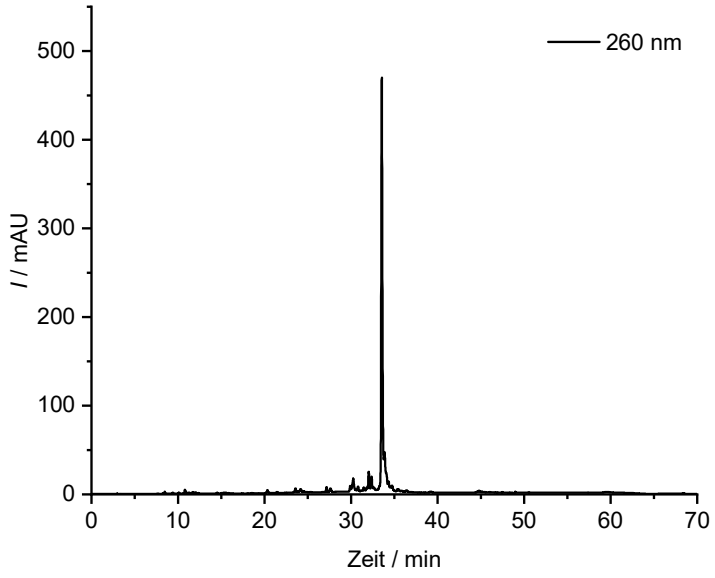


*Abbildung 116: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA4ss.***

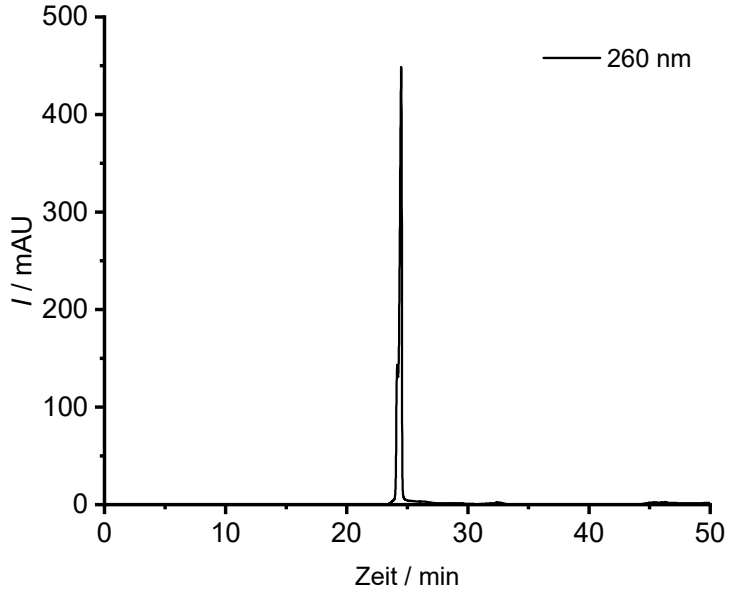


*Abbildung 117: HPLC-Chromatogramm von **CV2-DNA1ss.***

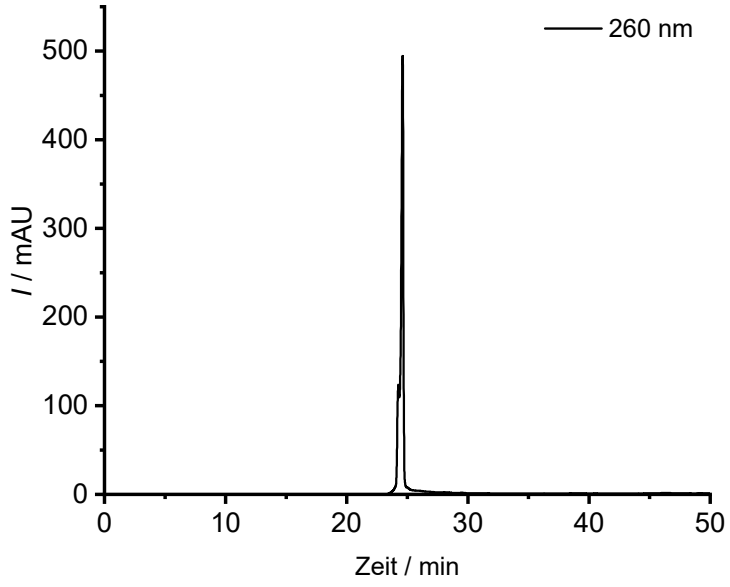


*Abbildung 118: HPLC-Chromatogramm von **CV2-DNA1cs.***

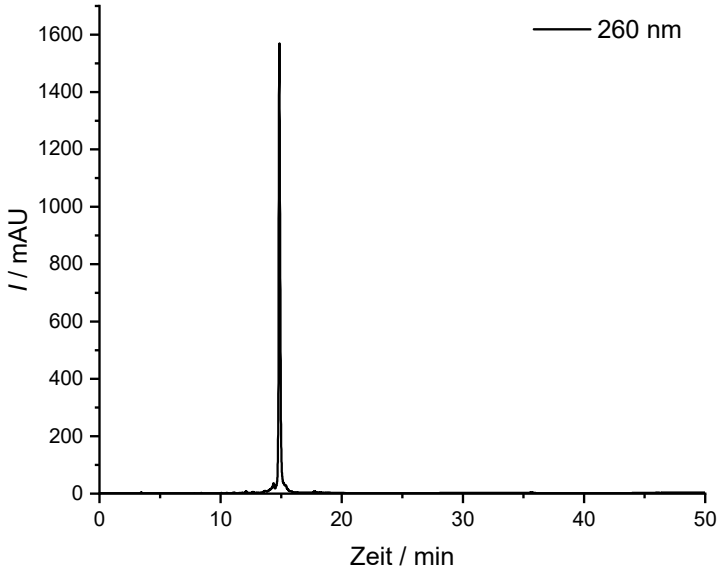


*Abbildung 119: HPLC-Chromatogramm von **DB-DNA1ss.***

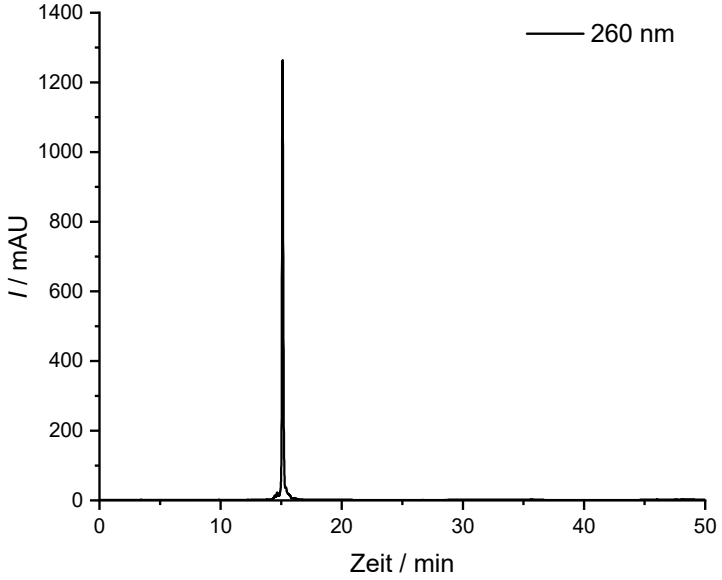


*Abbildung 120: HPLC-Chromatogramm von **DB-DNA1cs.***

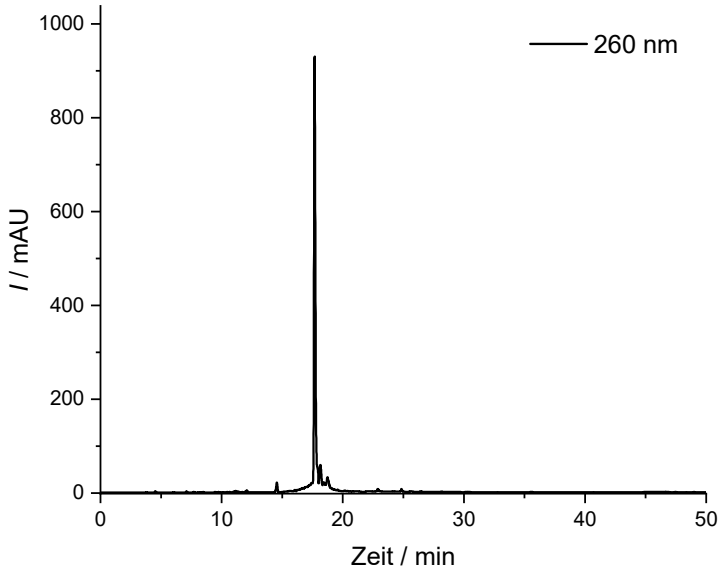


*Abbildung 121: HPLC-Chromatogramm von **DB-DNA3ss.***

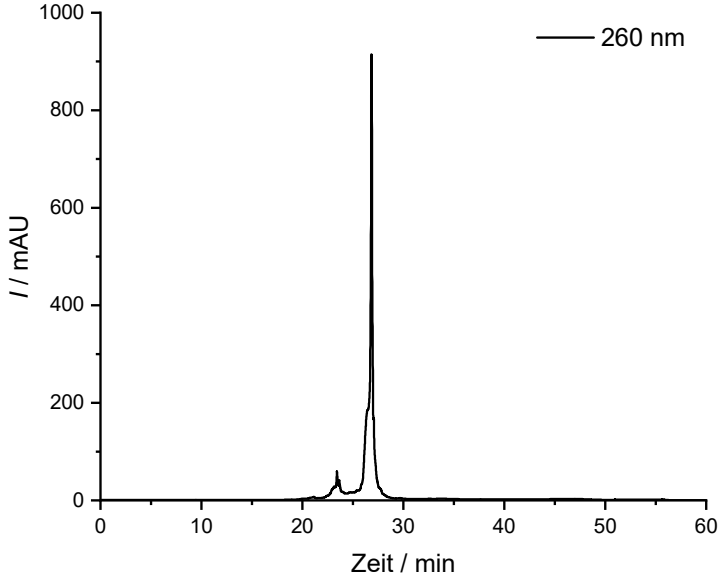


*Abbildung 122: HPLC-Chromatogramm von **CV2-N1ss.***

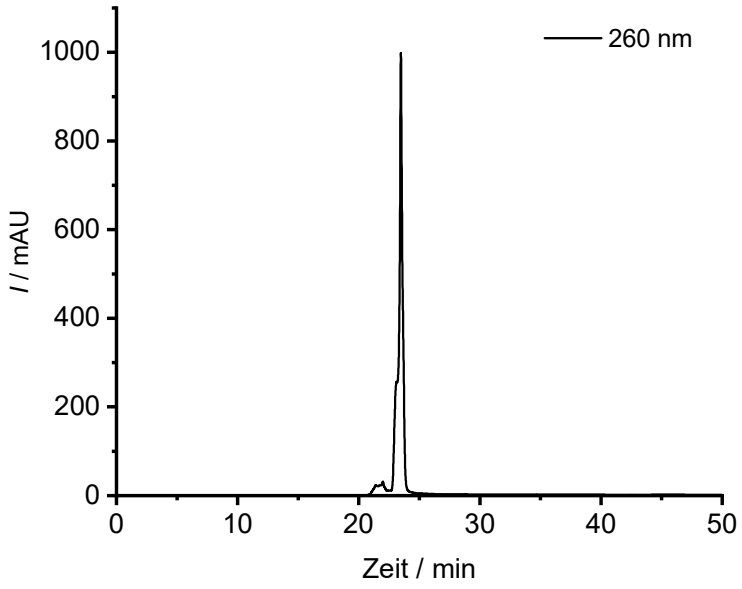


*Abbildung 123: HPLC-Chromatogramm von **CV2-N2ss.***

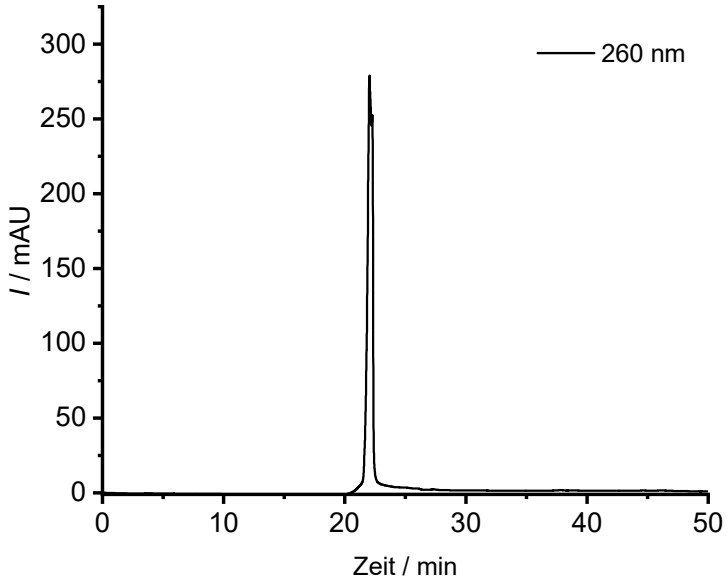


*Abbildung 124: HPLC-Chromatogramm von **DB-N1ss.***

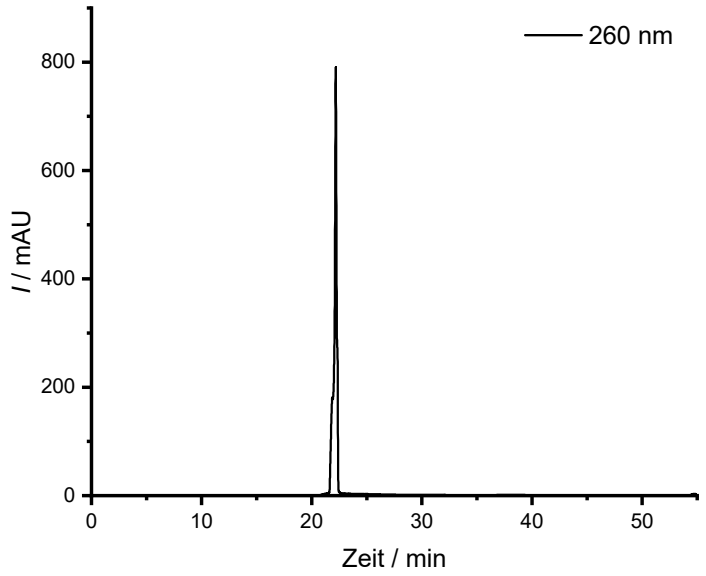


*Abbildung 125: HPLC-Chromatogramm von **DB-N2ss.***

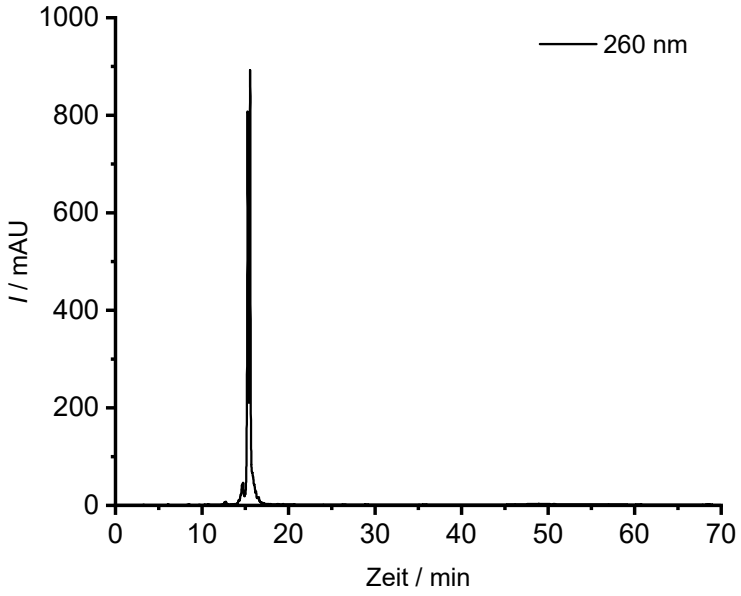


*Abbildung 126: HPLC-Chromatogramm von **TO-DNA1ss.***

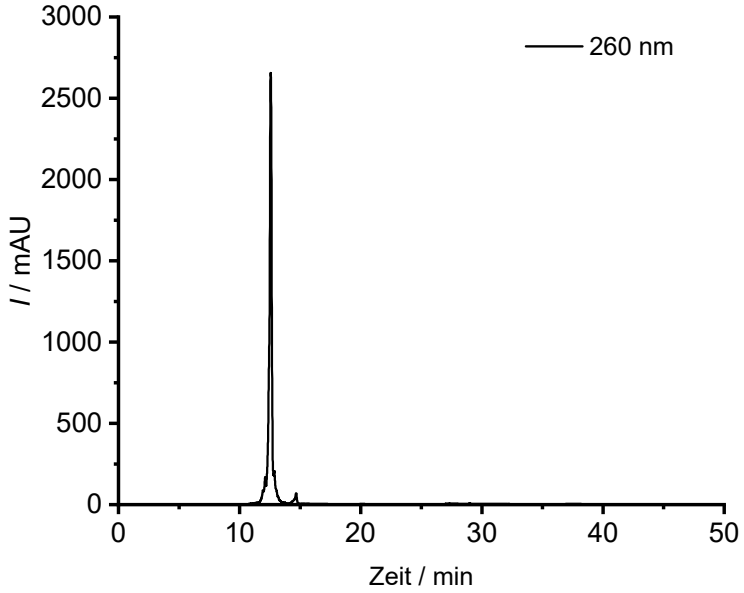


*Abbildung 127: HPLC-Chromatogramm von **G-DNA1ss.***

8.4 MALDI-TOF-Massenspektren der DNA-Stränge

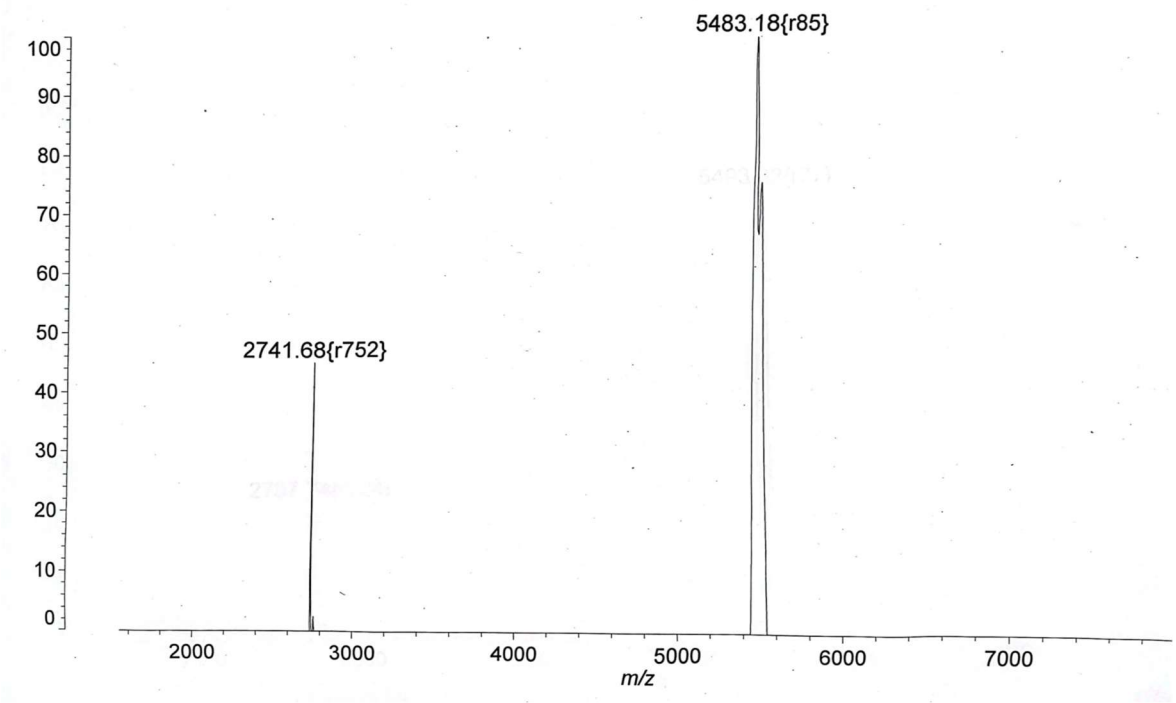


*Abbildung 128: Masse von **CV1-DNA1ss.***

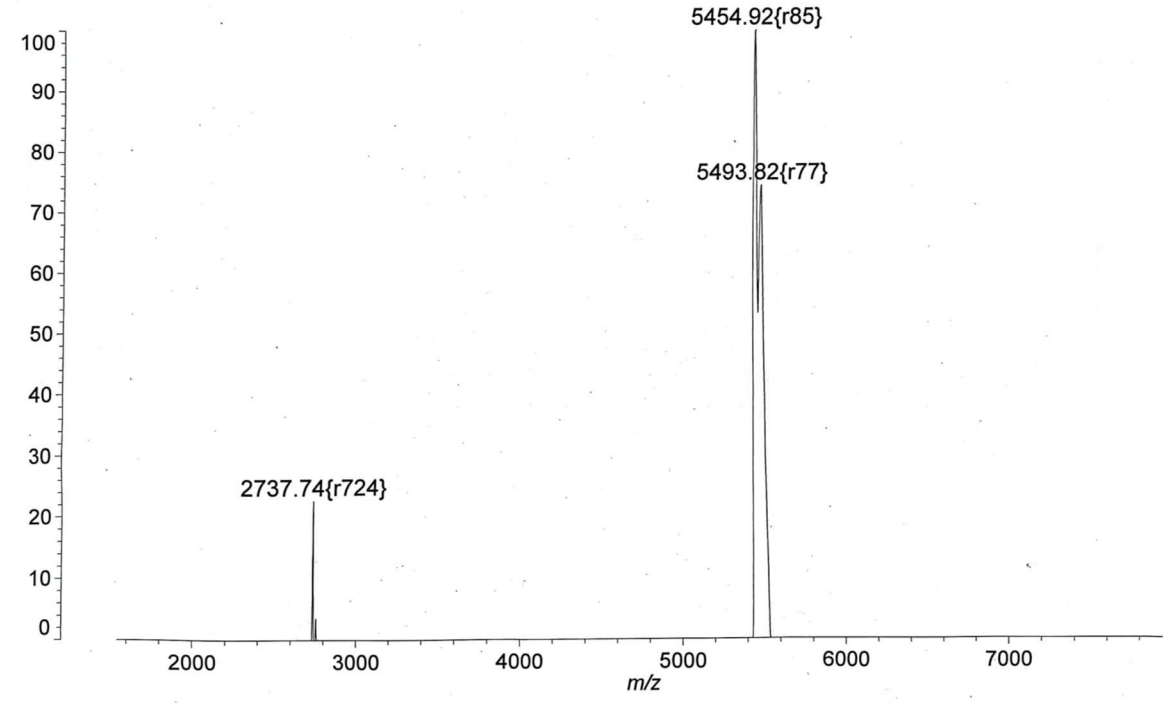


*Abbildung 129: Masse von **CV1-DNA1cs.***

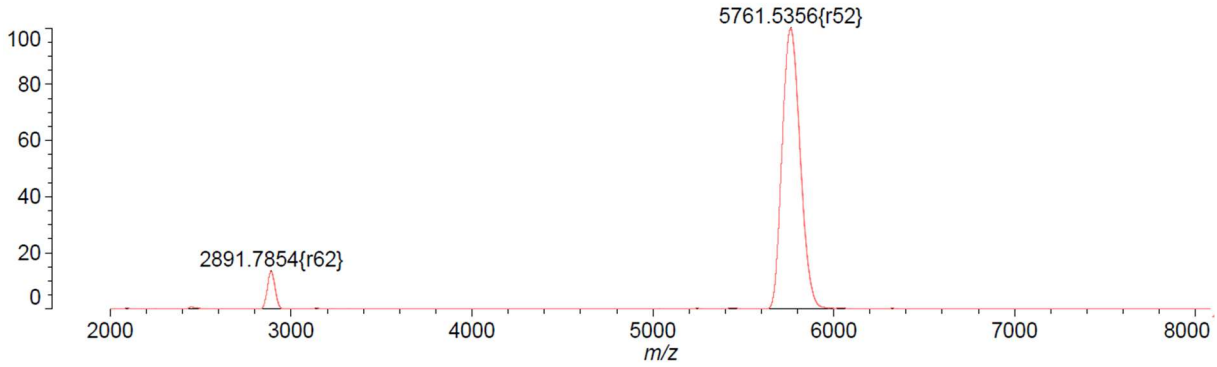


*Abbildung 130: Masse von **CV1-DNA3ss.***

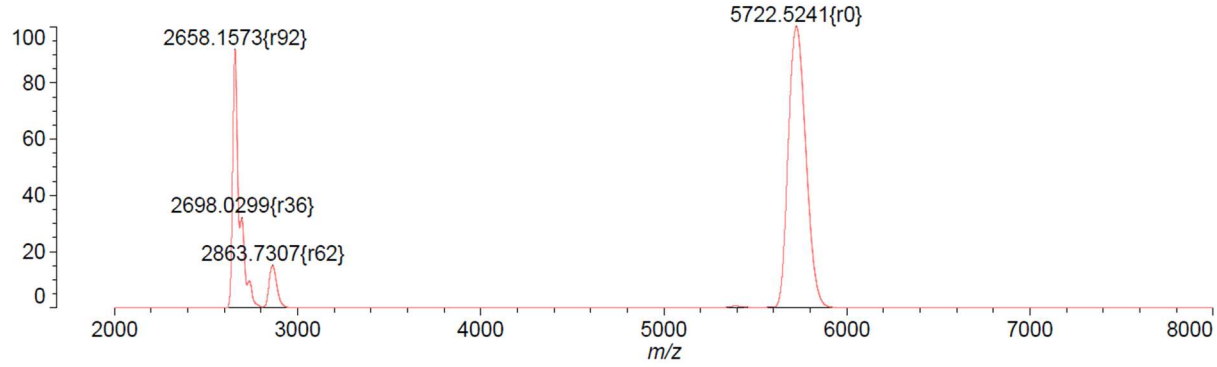


*Abbildung 131: Masse von **CV1-DNA4ss.***

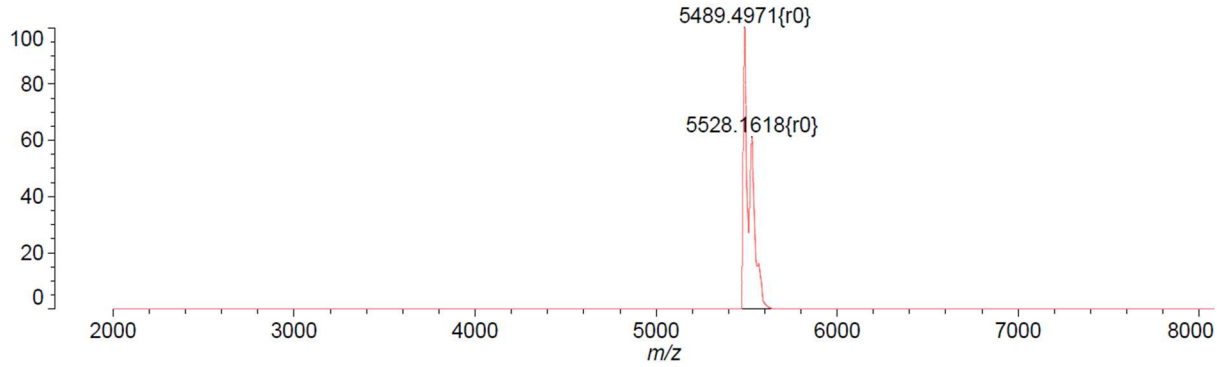


*Abbildung 132: Masse von **CV2-DNA1ss.***

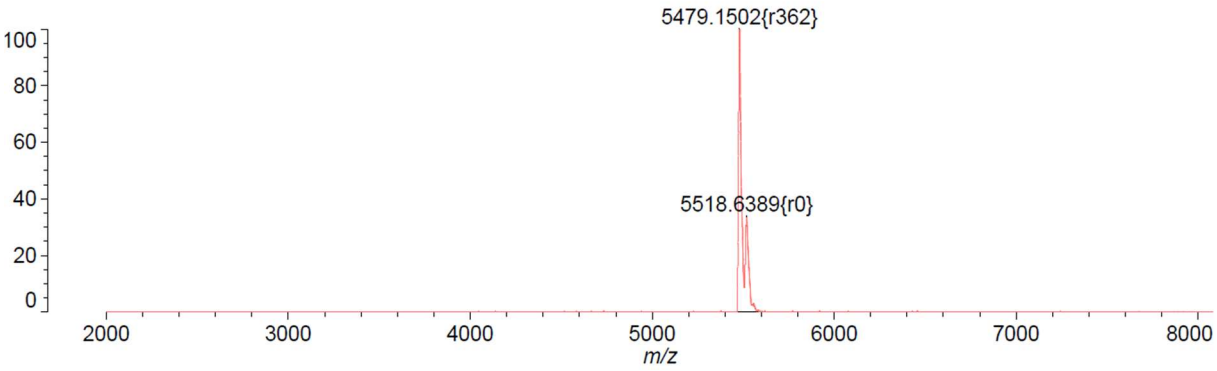


*Abbildung 133: Masse von **CV2-DNA1cs.***

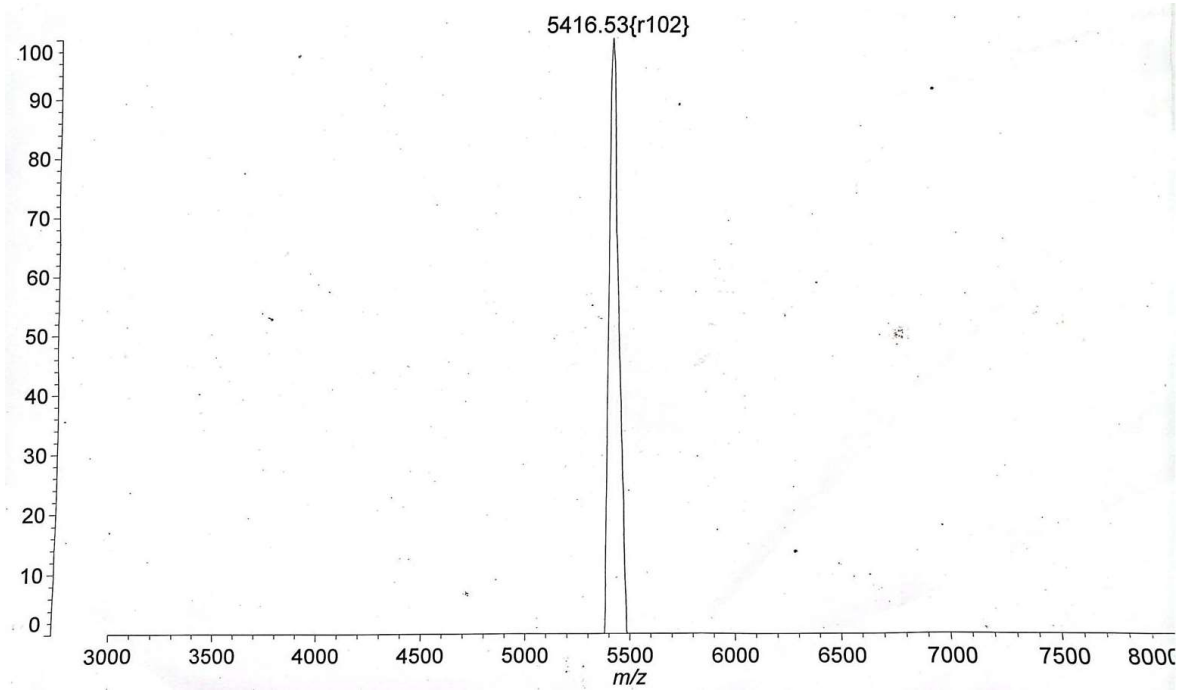


*Abbildung 134: Masse von **DB-DNA1ss.***

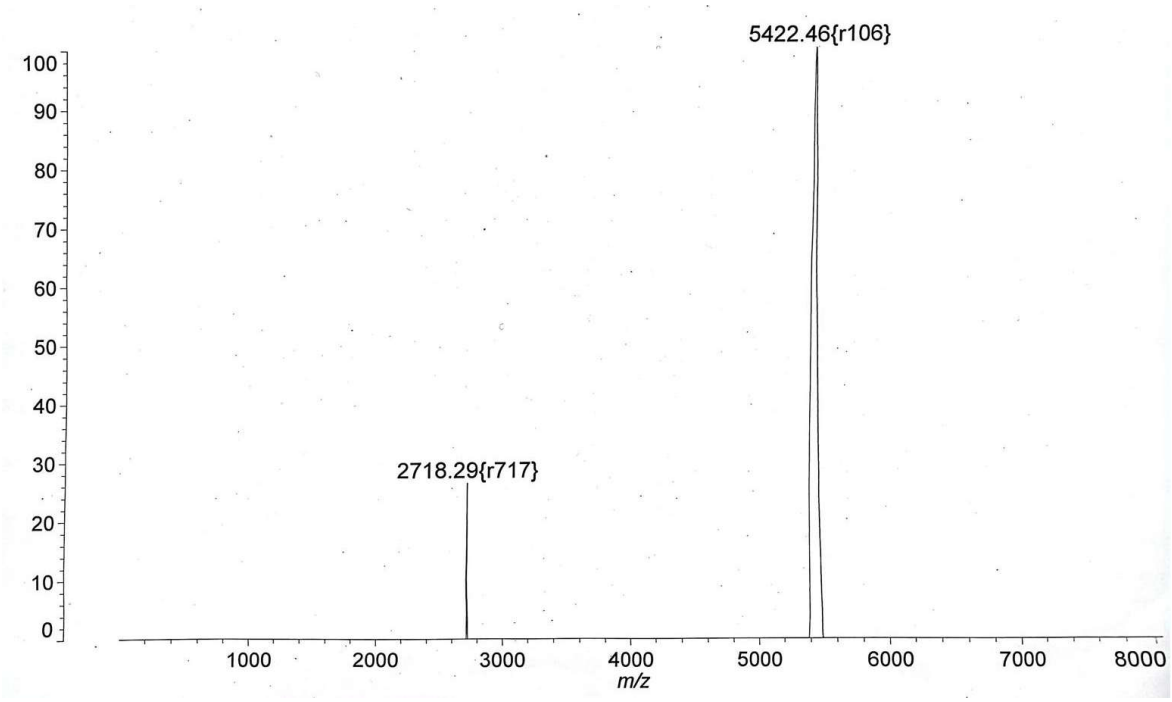


*Abbildung 135: Masse von **DB-DNA1cs.***

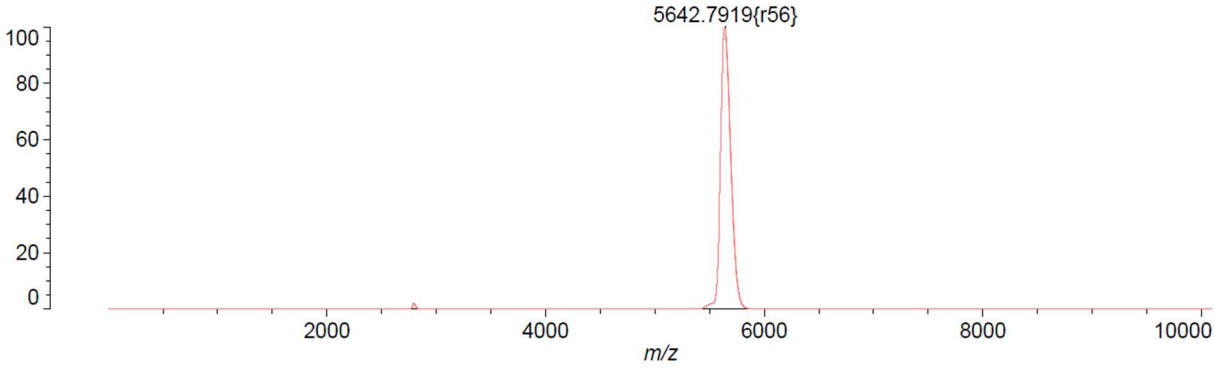


*Abbildung 136: Masse von **DB-DNA3ss.***

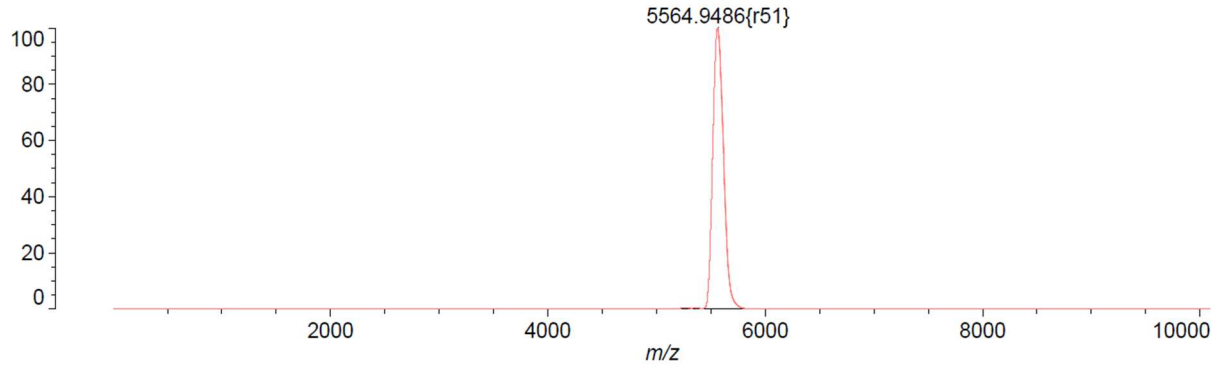


*Abbildung 137: Masse von **CV2-N1ss.***

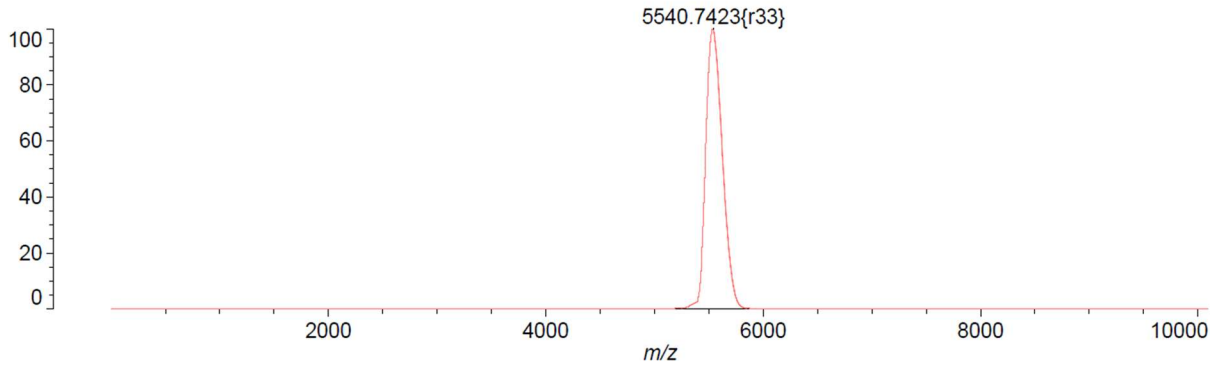


*Abbildung 138: Masse von **CV2-N2ss.***

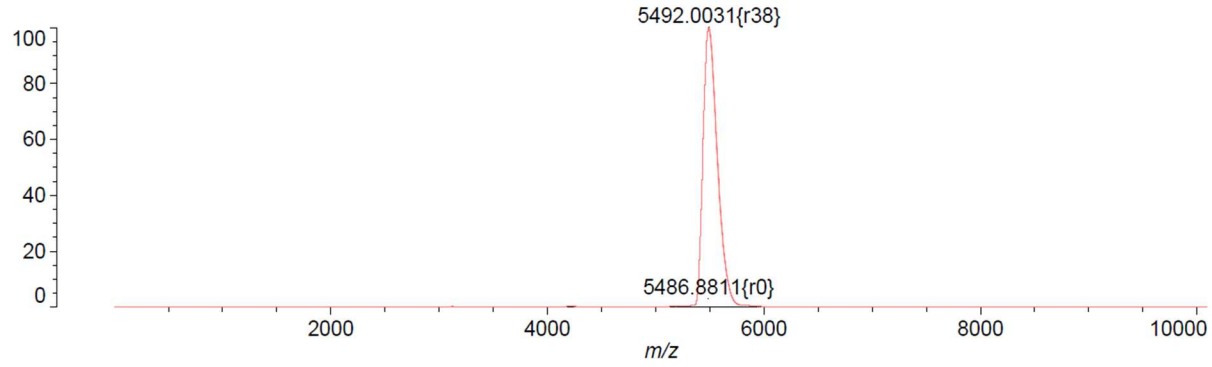


*Abbildung 139: Masse von **DB-N1ss.***

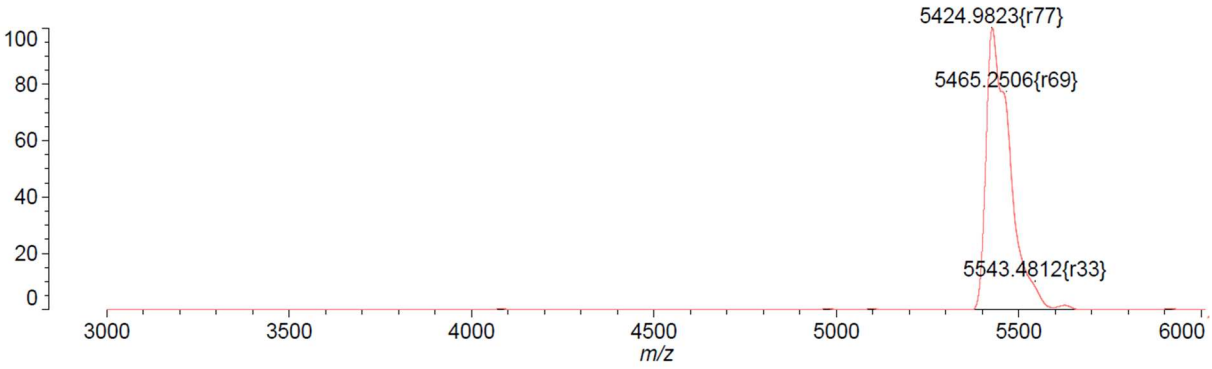


*Abbildung 140: Masse von **DB-N2ss.***

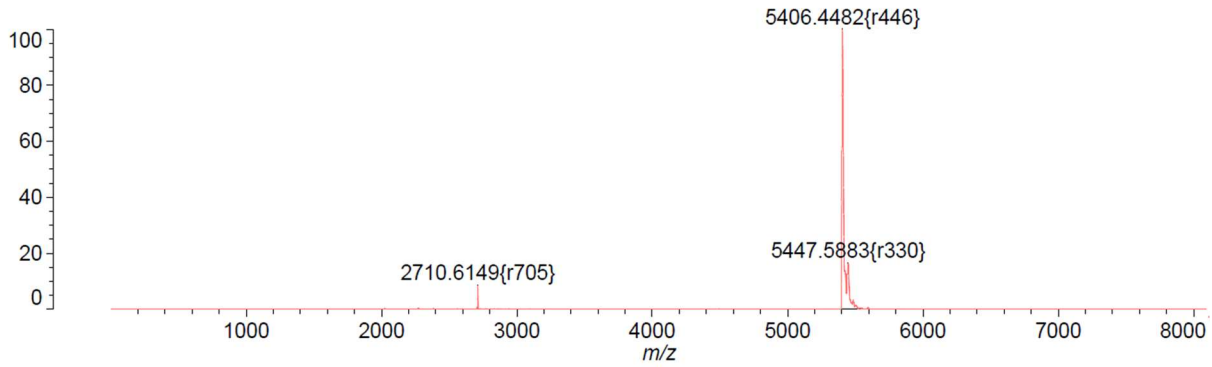


*Abbildung 141: Masse von **TO-DNA1ss.***

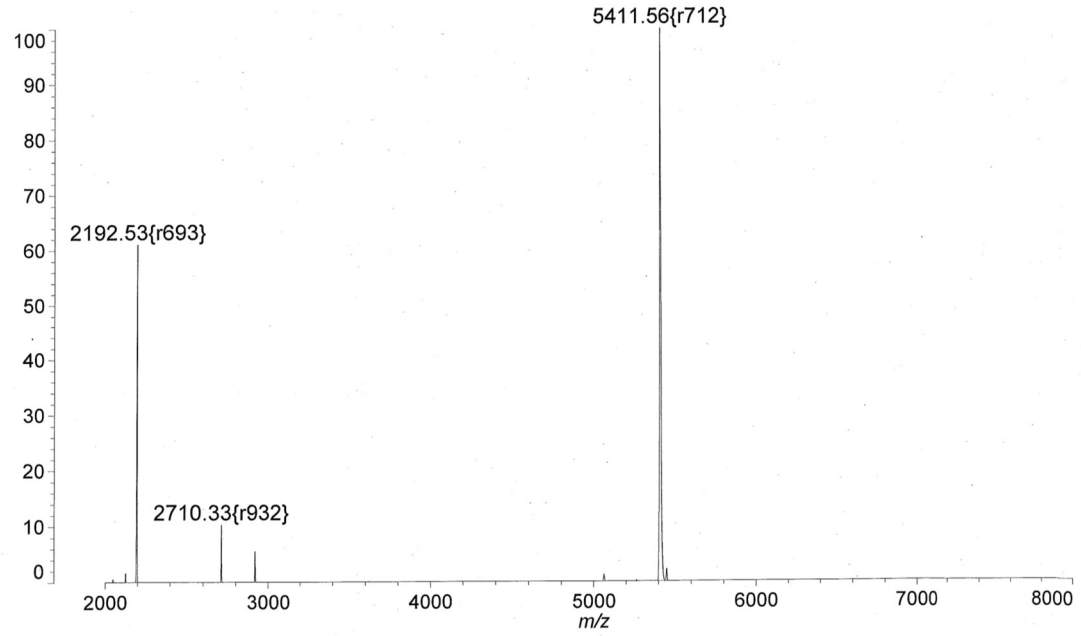


*Abbildung 142: Masse von **G-DNA1ss.***

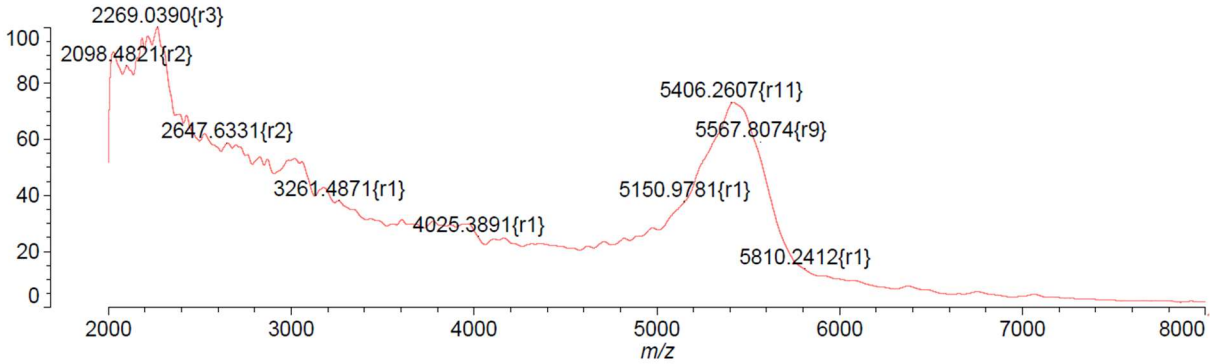


*Abbildung 143: Masse von **TO-DNA1ss** extrahiert aus **TO-IOH-NP.***

8.5 Ergänzende Spektren

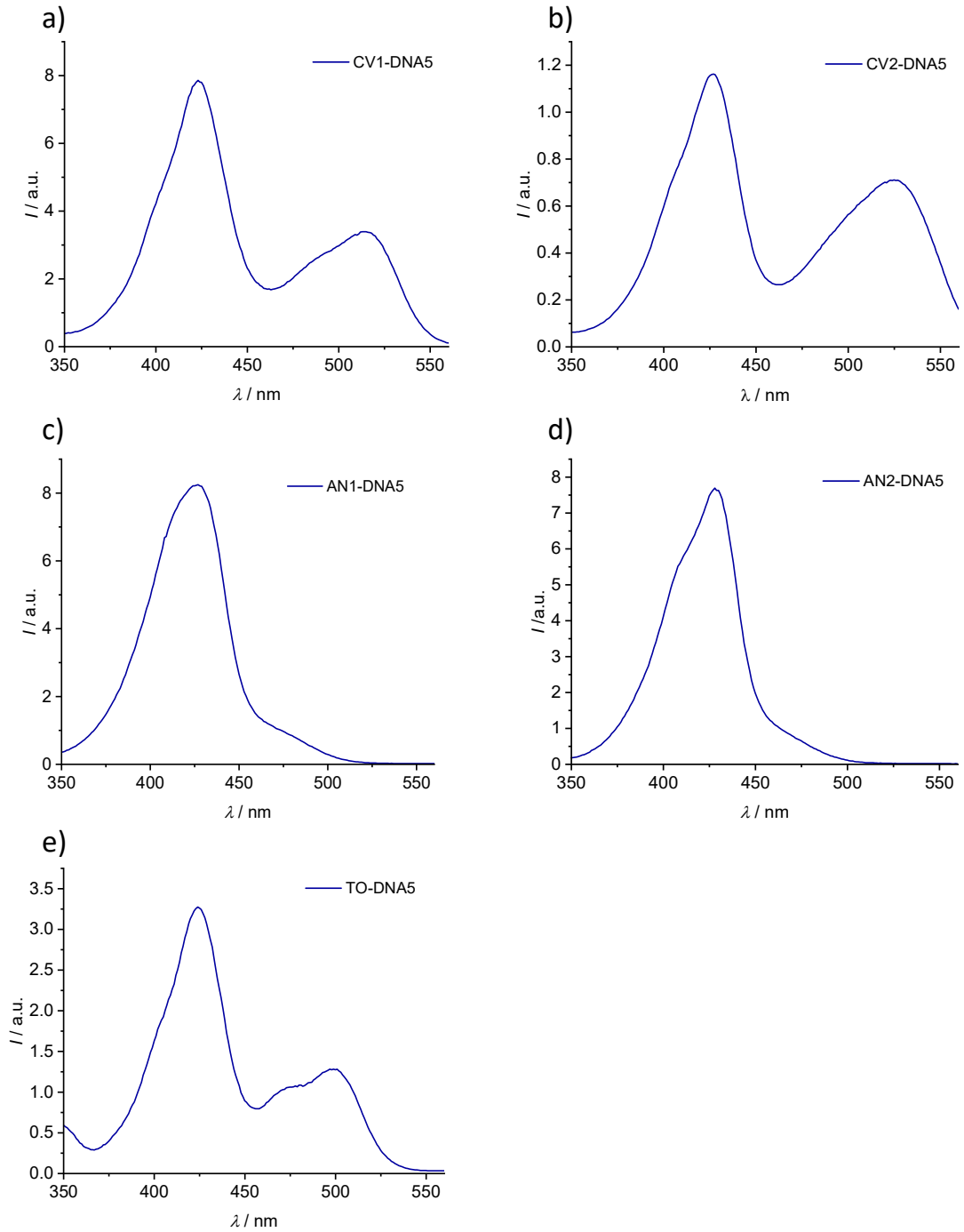


*Abbildung 144: Anregungsspektren des **DB**-induzierten Energietransfers bei einer Emissionswellenlänge von λ_{em}=580 nm. a) **CV1-DNA5**; b) **CV2-DNA5**; c) **AN1-DNA5**; d) **AN2-DNA5**; e) **TO-DNA5**.*

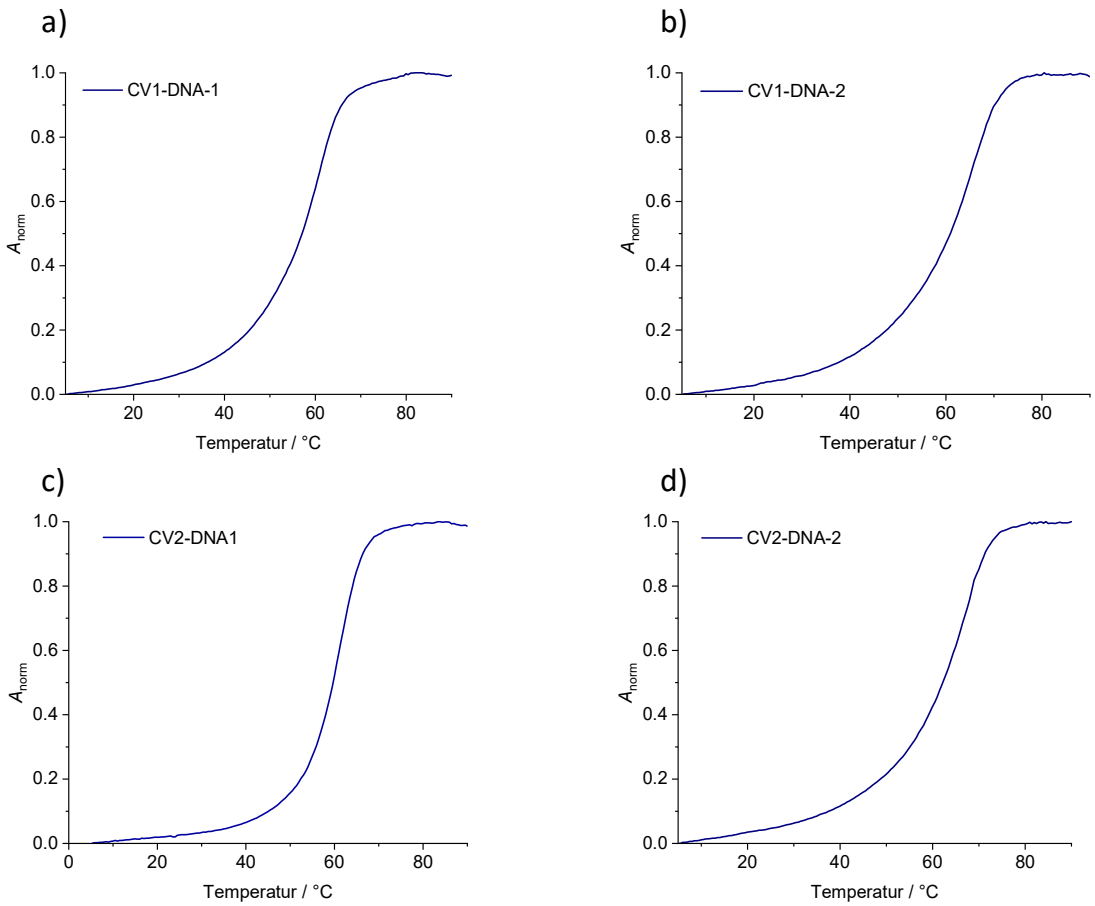


*Abbildung 145: Schmelztemperaturen der Interstrang-Dimere von **CV1** und **CV2**; **CV1-DNA1**, **CV1-DNA2**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2**.*

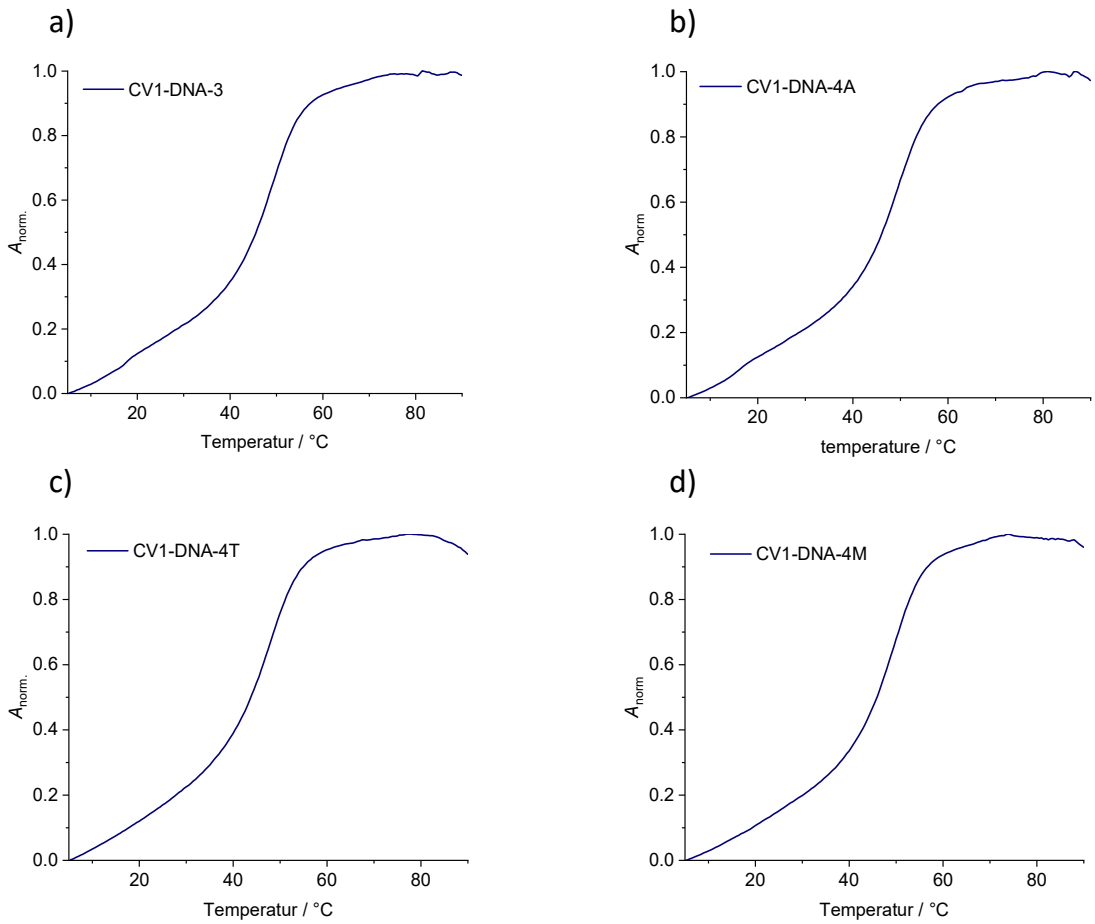


*Abbildung 146: Schmelztemperaturen der mit **CV1** doppelmodifizierten Duplexe; **CV1-DNA3**, **CV1-DNA4A**, **CV1-DNA4T** und **CV1-DNA4M.***

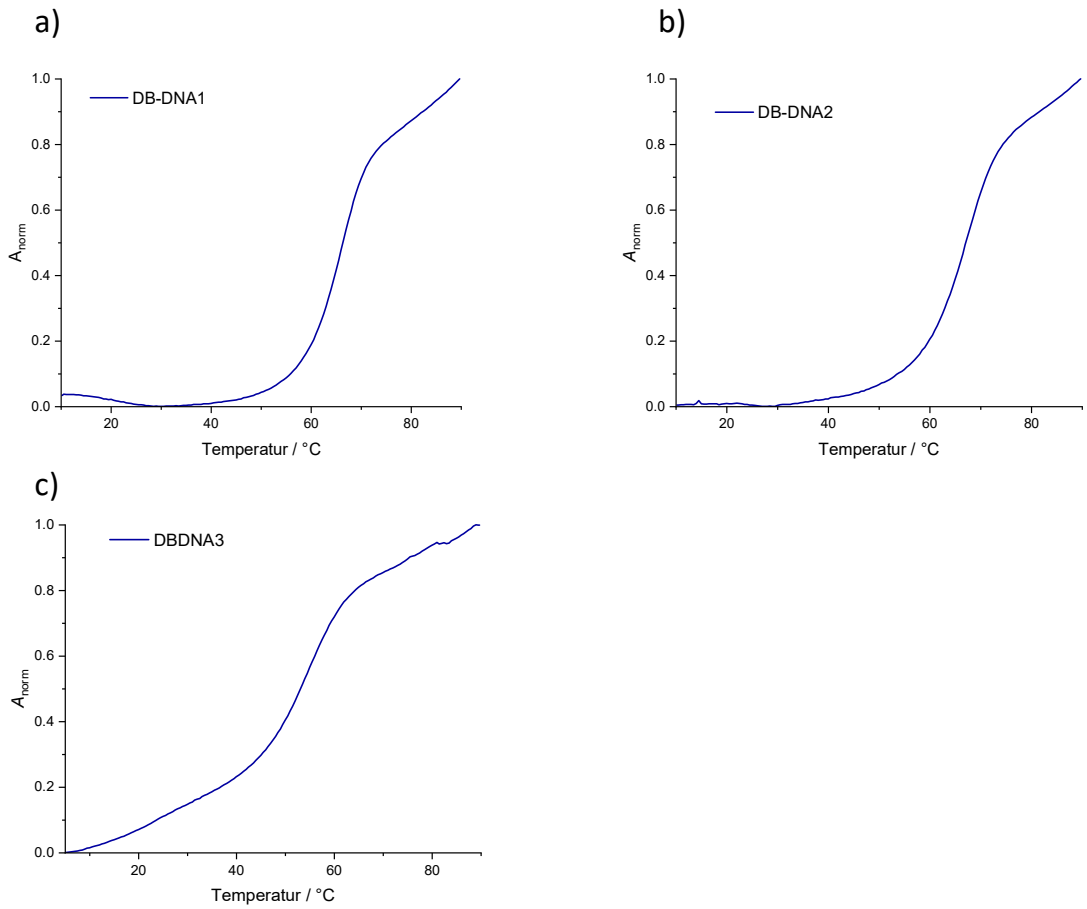


*Abbildung 147: Schmelztemperaturen von **DB-DNA1**, **DB-DNA2** und **DB-DNA3.***

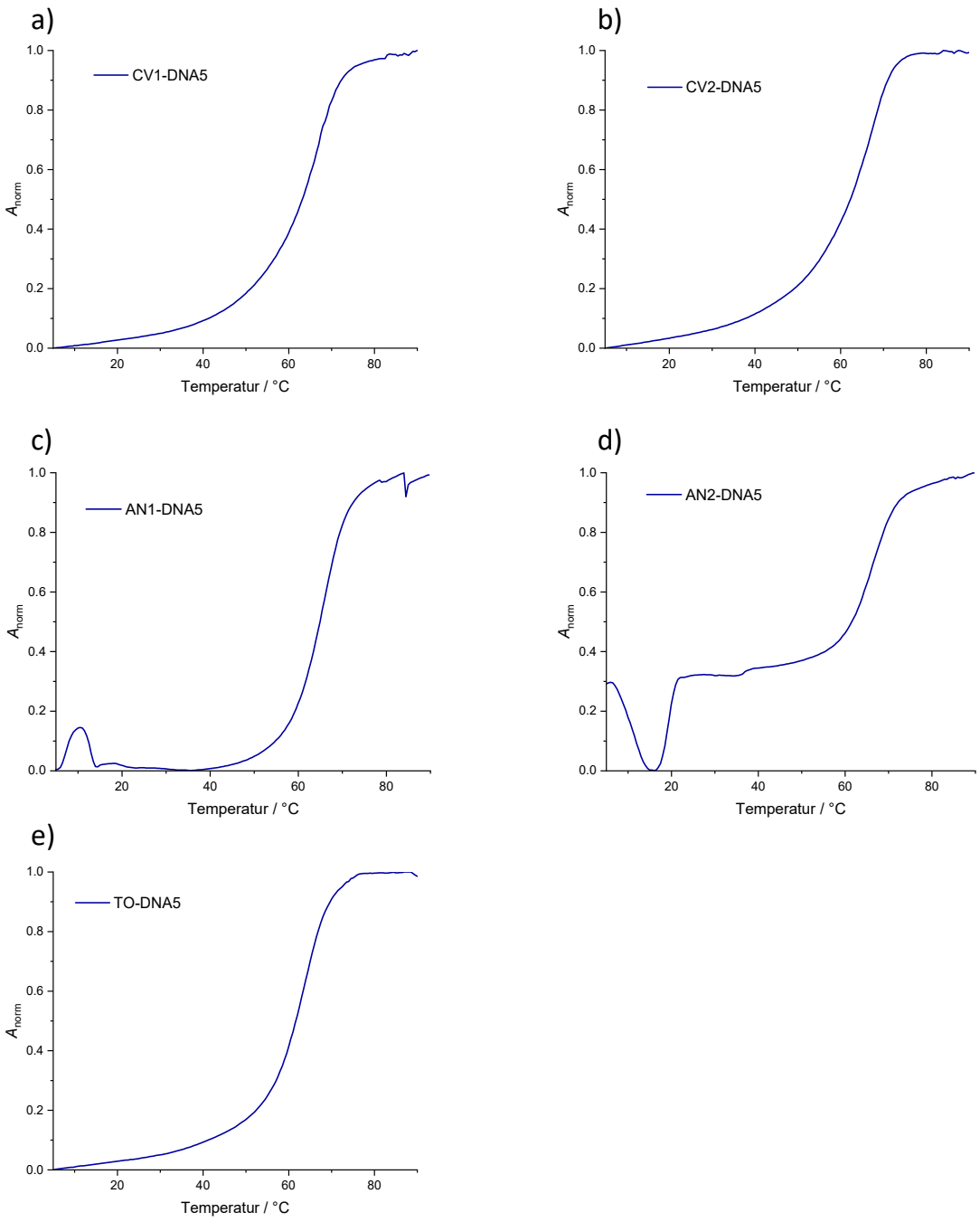


*Abbildung 148: Schmelztemperaturen der Duplexe **X-DNA5**.*

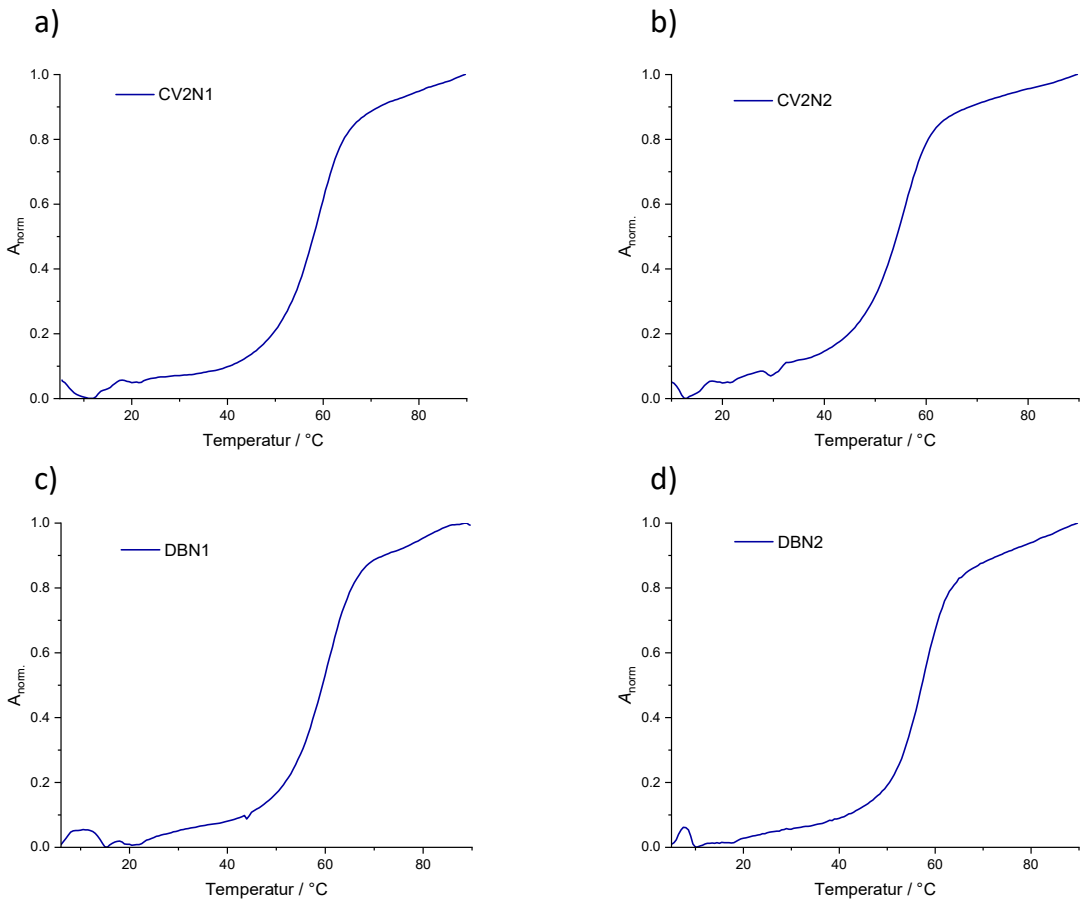


*Abbildung 149: Schmelztemperaturen der Nitroindolsonden **CV2N1**, **CV2N2**, **DBN1** und **DBN2**.*

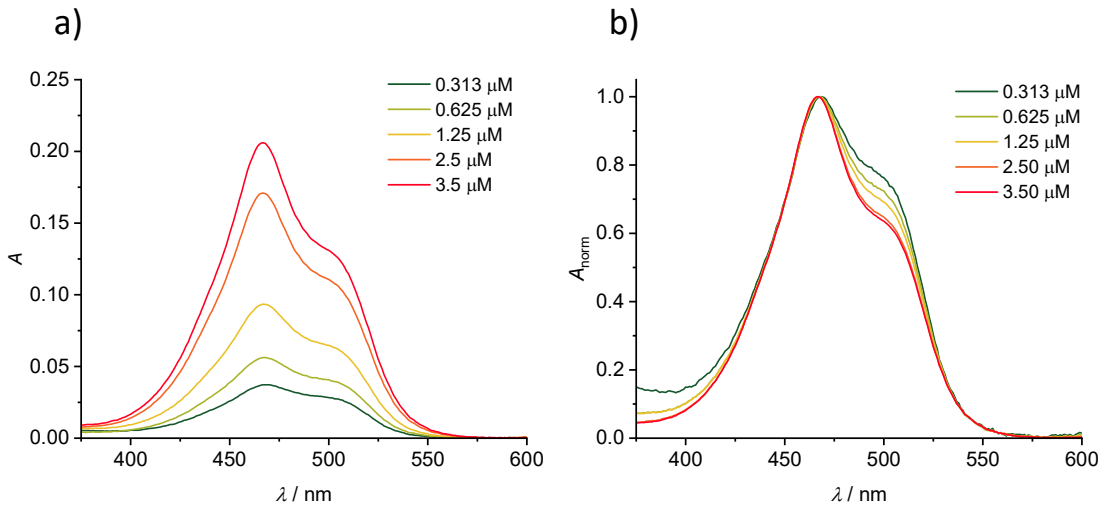
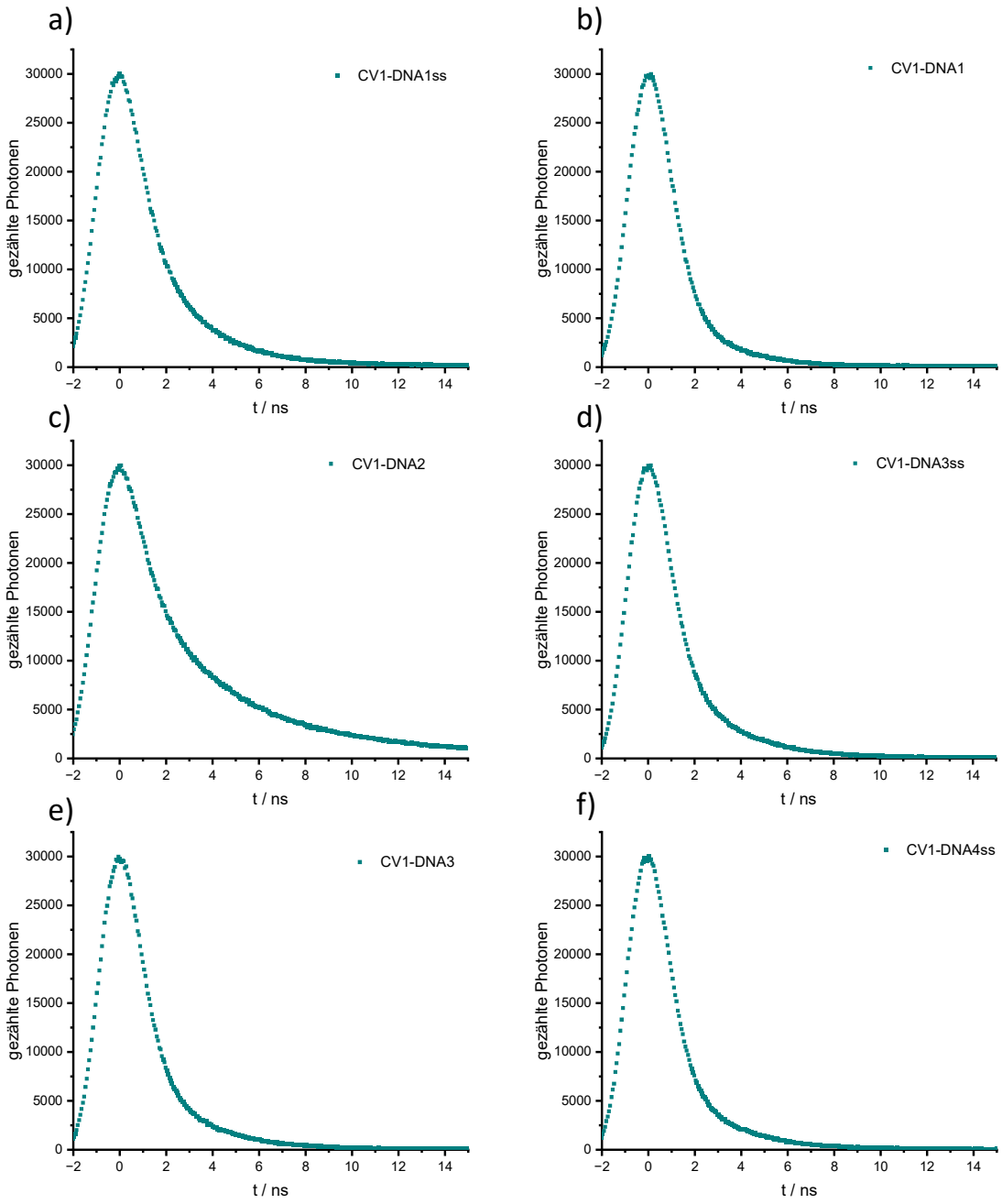


*Abbildung 150: UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA1ss** bei unterschiedlichen Konzentrationen; a) nicht normiert; b) normiert.*

*Tabelle 10: Konzentrationen von **CV1-DNA1ss** und dem Verhältnis von Monomer/Dimer-Absorption (A_{500}/A_{465}) bei den unterschiedlichen Konzentrationen.*

	Konzentration [µm]	A_{500}/A_{465}
CV1-DNA1SS	0,313	0,76
CV1-DNA1SS	0,625	0,72
CV1-DNA1SS	1,25	0,69
CV1-DNA1SS	2,5	0,65
CV1-DNA1SS	3,5	0,63


a)
CV1-DNA1ss
b)
CV1-DNA1
c)
CV1-DNA2
d)
CV1-DNA3ss
e)
CV1-DNA3
f)
CV1-DNA4ss
gezählte Photonen
t / ns

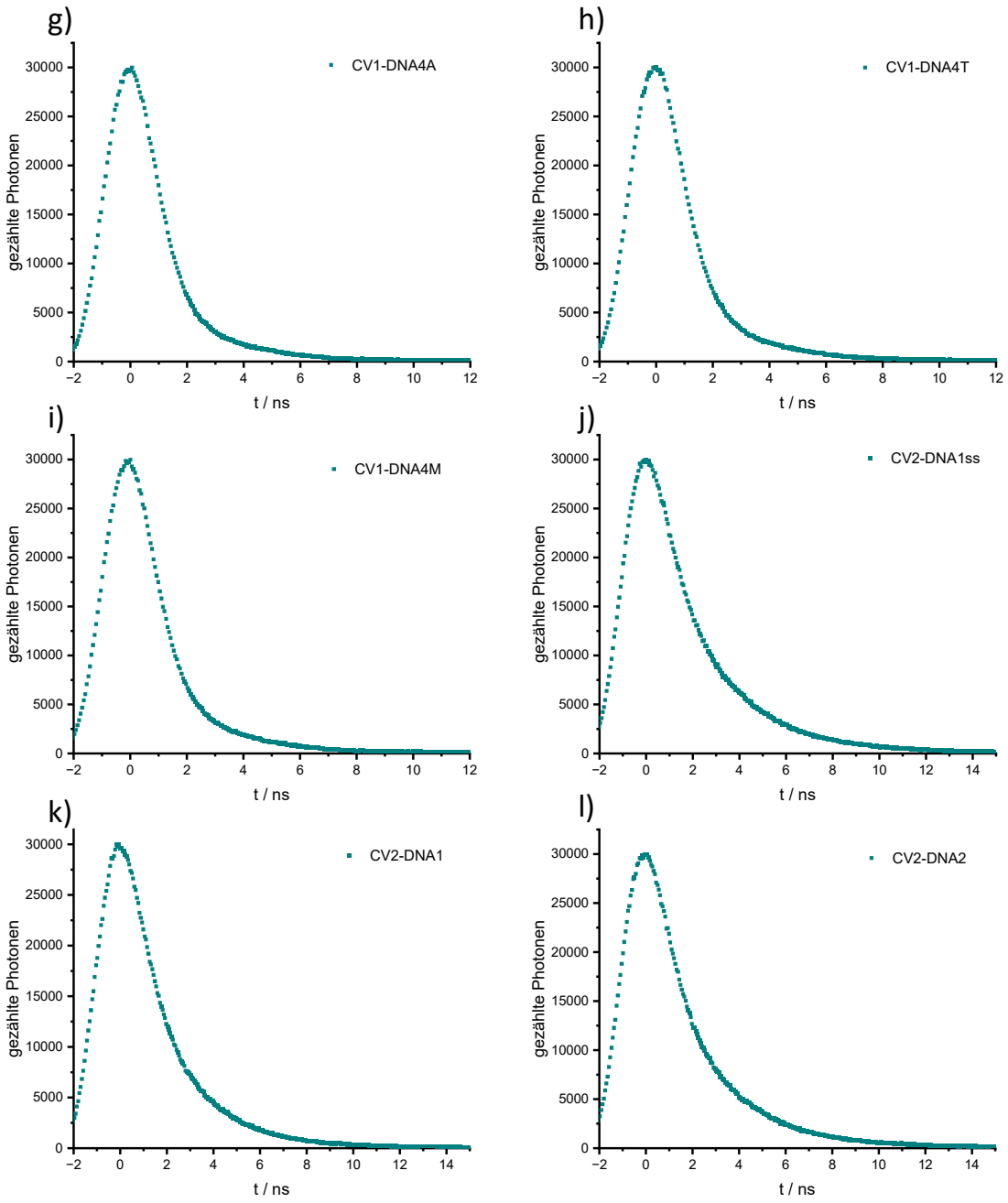


*Abbildung 151: TCSPC-Spektren der **CV1**- und **CV2**-modifizierten Einzel- und Doppelstränge. a) **CV1-DNA1ss**; b) **CV1-DNA1**; c) **CV1-DNA2**; d) **CV1-DNA3ss**; e) **CV1-DNA3**; f) **CV1-DNA4ss**; g) **CV1-DNA4A**; h) **CV1-DNA4T**; i) **CV1-DNA4M**; j) **CV2-DNA1ss**; k) **CV2-DNA1**; l) **CV2-DNA2**.*

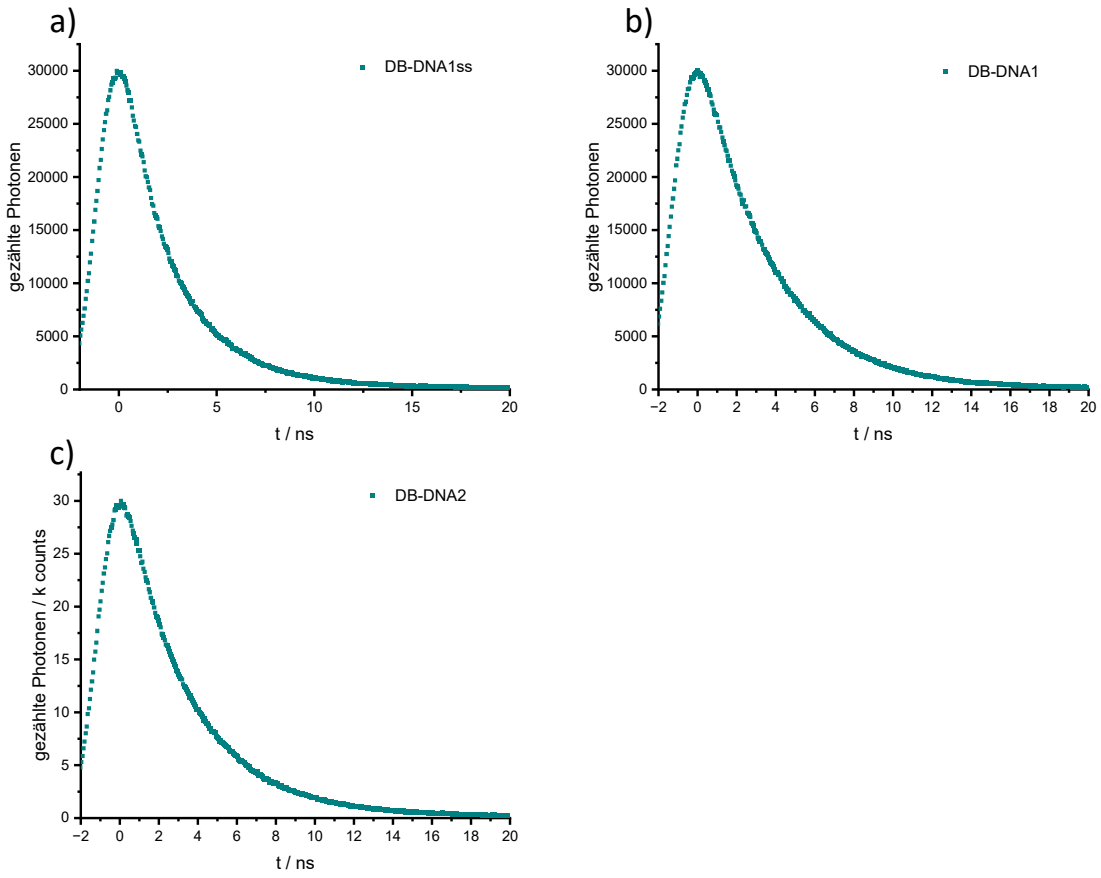


Abbildung 152: TCSPC-Spektren von a) ***DB-DNA1ss****; b)* ***DB-DNA1****; c)* ***DB-DNA2****.*

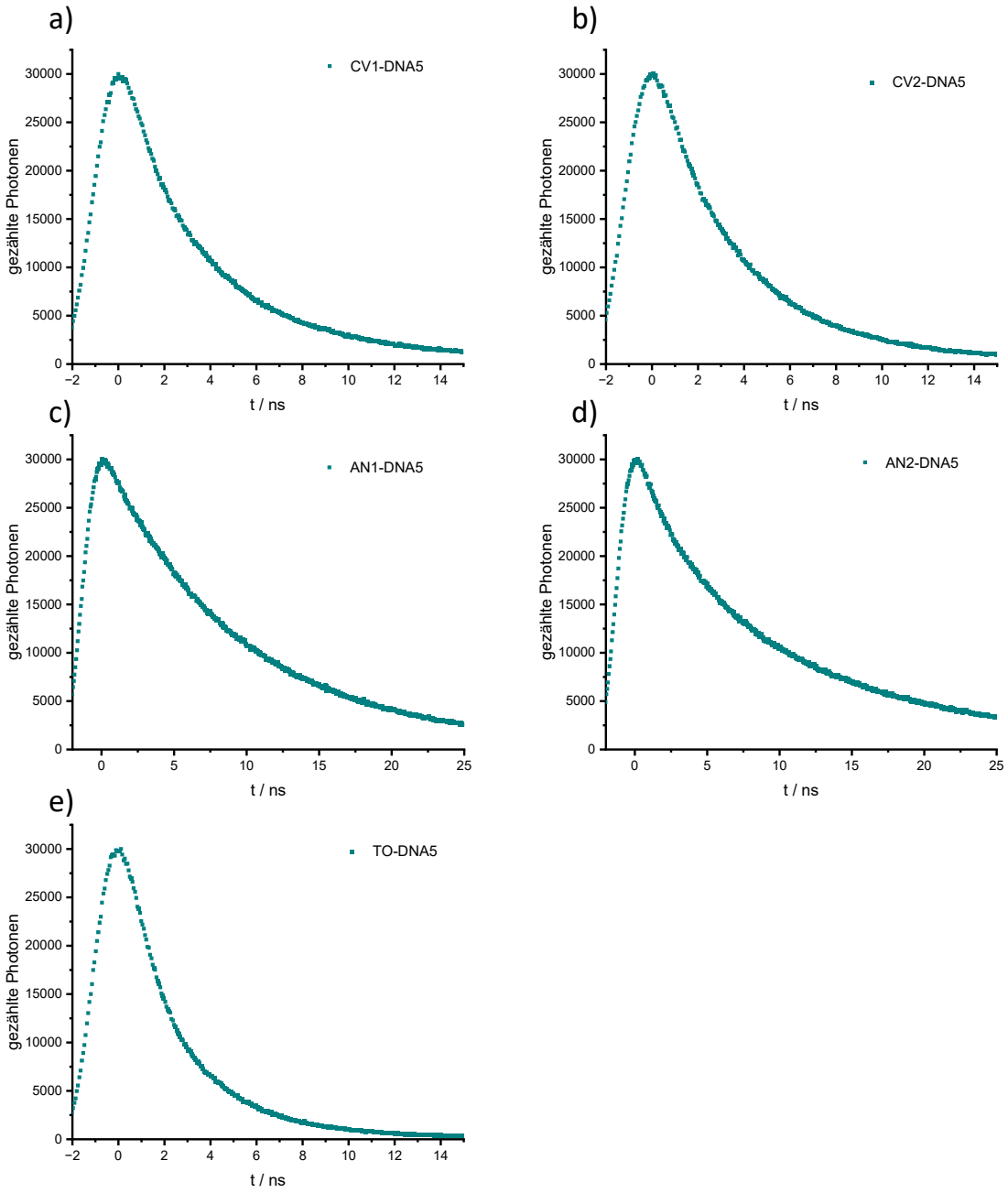


*Abbildung 153: TCSPC-Spektren des **DB**-induzierten Energietransfers. a) **CV1-DNA5**, b) **CV2-DNA5**, c) **AN1-DNA5**, d) **AN2-DNA5**, e) **TO-DNA5**.*

Tabelle 11: Fluoreszenzlebenszeiten τ_n aller Oligonukleotide mit prozentualer Verteilung.

	τ_1[ns] (± 0,1)	α_1[%]	τ_2[ns] (± 0,1)	α_2[%]	τ_3[ns] (± 0,1)	α_3[%]
CV1-DNA1ss	2,41	100			-	-
CV1-DNA1	2,21	100			-	-
CV1-DNA2	2,26	44	6,35	56	-	-
CV2-DNA1ss	2,76	100	-	-	-	-
CV2-DNA1	2,54	100	-	-	-	-
CV2-DNA2	2,74	100	-	-	-	-
CV1-DNA3ss	2,36	100	-	-	-	-
CV1-DNA3	2,49	100	-	-	-	-
CV1-DNA4ss	2,51	100	-	-	-	-
CV1-DNA4A	2,31	100	-	-	-	-
CV1-DNA4T	2,71	100	-	-	-	-
CV1-DNA4M	2,48	100	-	-	-	-
DB-DNA1ss	1,20	41	3,17	59	-	-
DB-DNA1	1,17	7	3,38	93	-	-
DB-DNA2	1,20	16	3,22	71	5,69	13
TO-DNA5	1,05	51	3,58	49	-	-
CV1-DNA5	3,66	73	8,15	27	-	-
CV2-DNA5	2,71	58	5,55	42	-	-
AN1-DNA5	1,48	5	9,97	95	-	-
AN2-DNA5	2,48	16	13,3	84	-	-

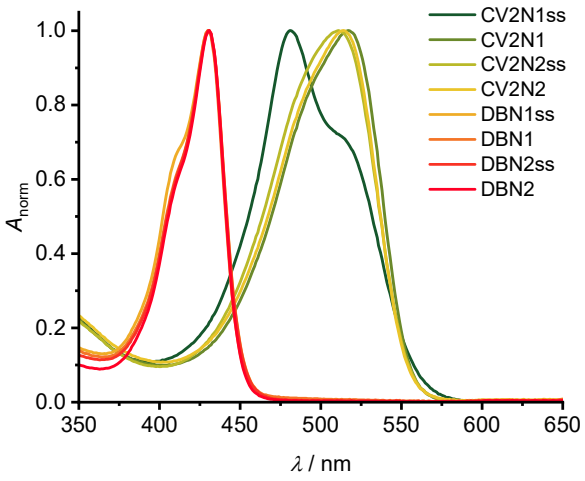


*Abbildung 154: normierte UV-Vis Absorptionsspektren der einzelsträngigen Nitroindolsonden **CV2-N1ss, CV2-N2ss**, **DB-N1ss** und **DB-N2ss** sowie die dazugehörigen Duplexe **CV2-N1**, **CV2-N2**, **DB-N1** und **DB-N2.***

8.6 Analyse der DNA-IOH-NP

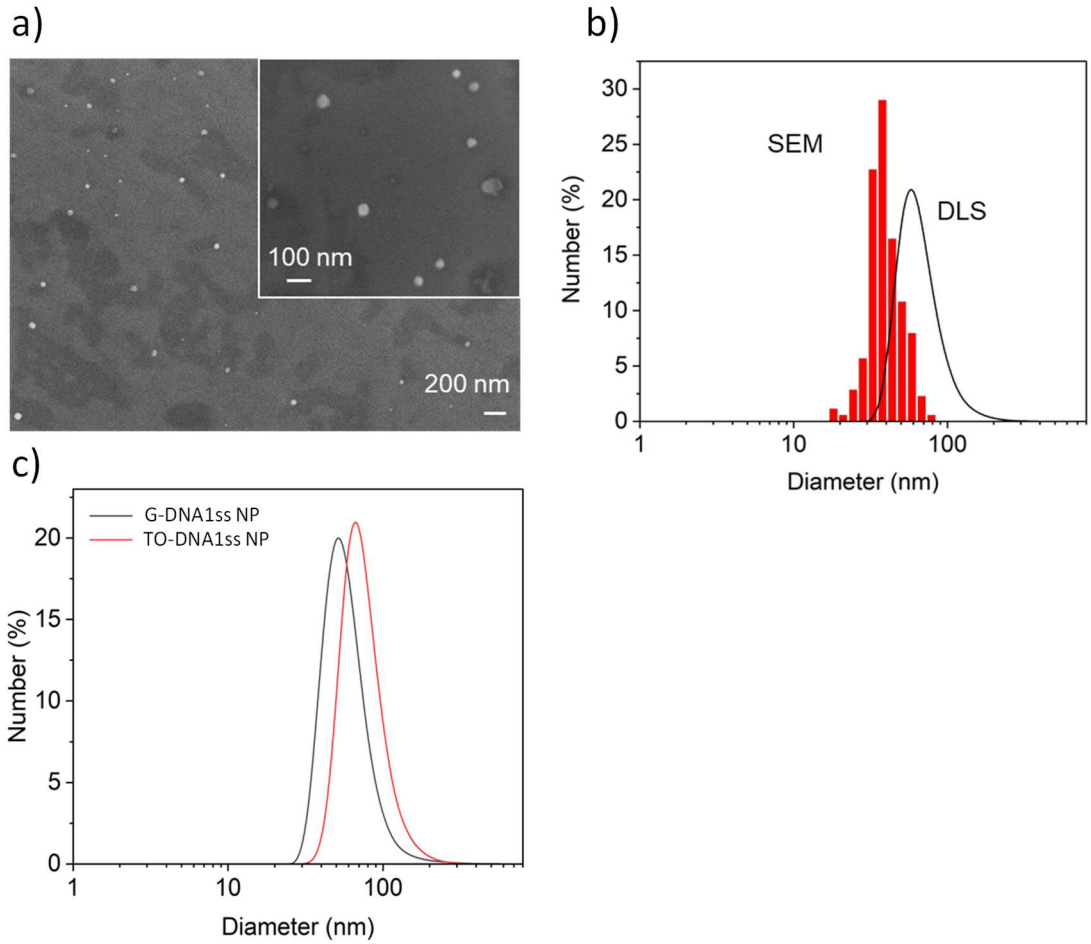


*Abbildung 155: Größenanalyse der DNA-IOH-NP; a) SEM-Aufnahme von **G-DNA1ss**-NP; b) Größenverteilung der NP durch DLS und SEM; c) DLS von **G-DNA1ss**-NP und **TO-DNA1ss**-NP.*

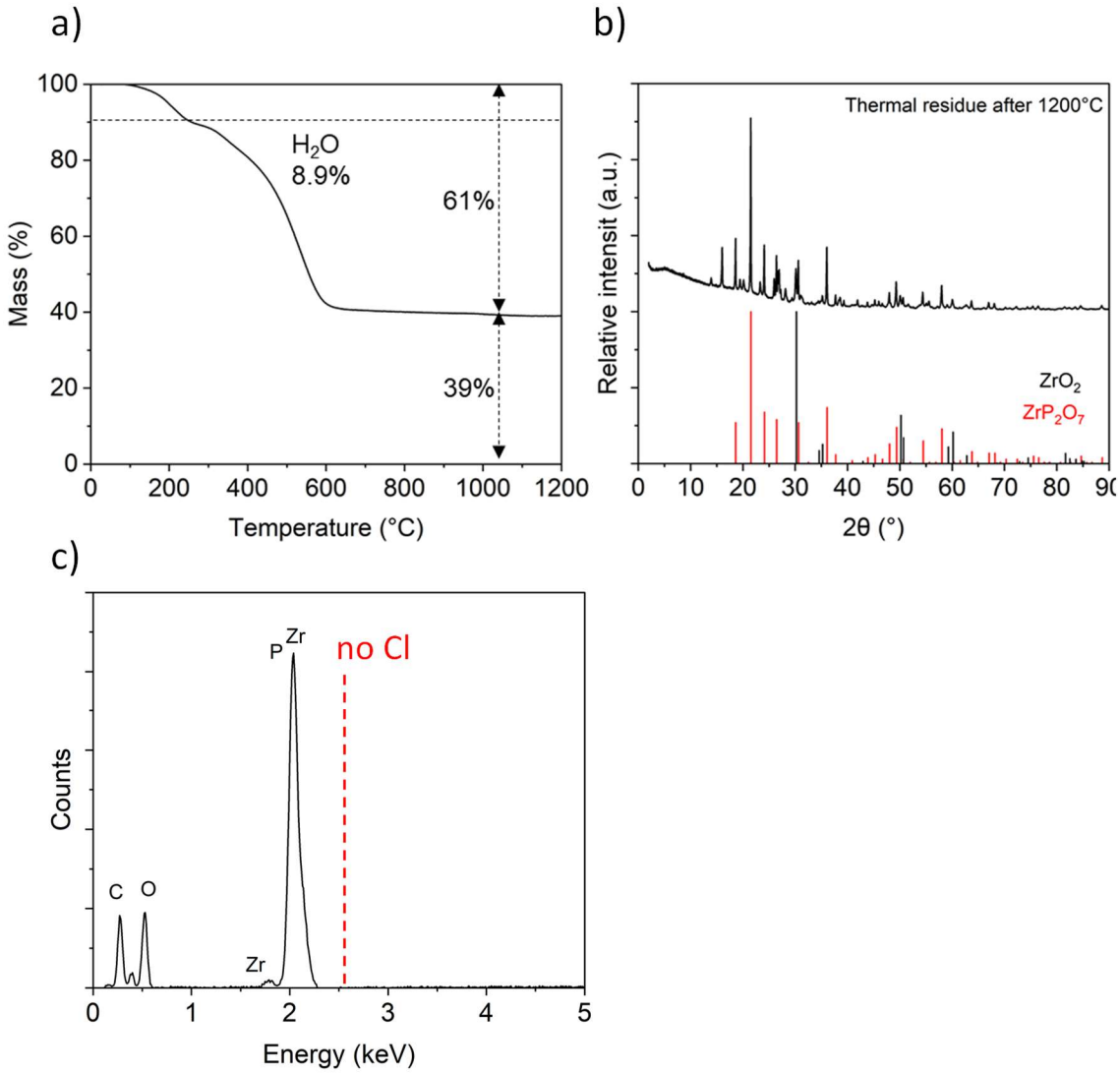


*Abbildung 156: a) Thermogravimetrie, b) XRD, c) EDX von **G-DNA1ss**-NP zur Bestimmung der Zusammensetzung.*

9. Literatur- und Abbildungsverzeichnis

9.1 Literaturverzeichnis

[1] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618-618.

[2] F. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561-563.

[3] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.

[4] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.

[5] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* **2001**, *409*, 363-366.

[6] Z. Sethna, P. Guasp, C. Reiche, M. Milighetti, N. Ceglia, E. Patterson, J. Lihm, G. Payne, O. Lyudovyk, L. A. Rojas, *Nature* **2025**, *639*, 1042-1051.

[7] L. A. Rojas, Z. Sethna, K. C. Soares, C. Olcese, N. Pang, E. Patterson, J. Lihm, N. Ceglia, P. Guasp, A. Chu, *Nature* **2023**, *618*, 144-150.

[8] M. S. K. C. Center*, Vol. 2026*, **2026**.

[9] R. Weinberg, D. Hanahan, *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

[10] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457-463.

[11] P. A. Jones, in *Semin. Hematol., Vol. 42*, Elsevier, **2005**, pp. S3-S8.

[12] J. Gebhard, L. Hirsch, C. Schwechheimer, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjug. Chem.* **2022**, *33*, 1634-1642.

[13] H. Asanuma, M. Akahane, N. Kondo, T. Osawa, T. Kato, H. Kashida, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3165-3169.

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

[15] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237-247.

[16] A. V. Pinheiro, D. Han, W. M. Shih, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 763-772.

[17] S. L. Beaucage, in *Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties*, Springer, **1993**, pp. 33-61.

[18] A. Cuppoletti, Y. Cho, J.-S. Park, C. Strässler, E. T. Kool, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 528-534.

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

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

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

[22] H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2006**, 2768-2770.

[23] C. Holzhauser, H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.

[24] A. Bird, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 6-21.

[25] S. B. Baylin, P. A. Jones, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a019505.

[26] R. Jaenisch, A. Bird, *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 245-254.

[27] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, **2006**.

[28] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14-19.

[29] N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano, *Modern molecular photochemistry of organic molecules, Vol. 188*, University Science Books Sausalito, CA, **2010**.

[30] M. El-Sayed, *J. Chem. Phys.* **1963**, *38*, 2834-2838.

[31] O. Stern, M. Volmer, *Physikalische Zeitschrift* **1919**, *20*, 183.

[32] J. R. Lakowicz, G. Weber, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4161-4170.

[33] T. Förster, *Annalen der physik* **1948**, *437*, 55-75.

[34] G. Barnoin, J. Shaya, L. Richert, H.-N. Le, S. Vincent, V. Guérineau, Y. Mély, B. Y. Michel, A. Burger, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, e72-e72.

[35] M. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, T. M. Lohman, T. Ha, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2530-2537.

[36] S. Blouin, T. D. Craggs, D. A. Lafontaine, J. C. Penedo, in *DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols, Third Edition*, Springer, **2009**, pp. 475-502.

[37] M. Lorenz, A. Hillisch, D. Payet, M. Buttinelli, A. Travers, S. Diekmann, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12150-12158.

[38] D. Singh, S. H. Sternberg, J. Fei, J. A. Doudna, T. Ha, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12778.

[39] M. Hirsch, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 4650-4660.

[40] K. Borjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.

[41] S. S. Skourtis, C. Liu, P. Antoniou, A. M. Virshup, D. N. Beratan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, 8115-8120.

[42] S. Häcker, T. J. Zähringer, H.-A. Wagenknecht, C. Kerzig, *JACS Au* **2025**, *5*, 2770-2778.

[43] S. Bai, P. Zhang, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 18956-18960.

[44] L. Antusch, N. Gaß, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1385-1389.

[45] H. Niu, J. Liu, H. M. O'Connor, T. Gunnlaugsson, T. D. James, H. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 2322-2357.

[46] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1152.

[47] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 159-170.

[48] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4263-4266.

[49] C. Prunkl, S. Berndl, C. Wanninger-Weiß, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 32-43.

[50] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899-4032.

[51] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.

[52] H. A. Wagenknecht, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 122-130.

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

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

[55] W. L. Goh, M. Y. Lee, T. X. Lim, J. S. Chua, S. Brenner, F. J. Ghadessy, Y. N. Teo, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12946.

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

[57] T. Förster, *The Exciplex. Academic, New York* **1975**, *1*.

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

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

[60] N. J. Hestand, F. C. Spano, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 7069-7163.

[61] F. C. Spano, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 429-439.

[62] F. Würthner, T. E. Kaiser, C. R. Saha-Möller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3376-3410.

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

[64] U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7184-7188.

[65] H. Kashida, M. Komiyama, H. Asanuma, *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 934-935.

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

[67] R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227-1230.

[68] G. D. Scholes, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2003**, *54*, 57-87.

[69] Y. Chen, J. W. Lam, R. T. Kwok, B. Liu, B. Z. Tang, *Mater. Horiz.* **2019**, *6*, 428-433.

[70] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 55-62.

[71] X. Qin, X. Yang, L. Du, M. Li, *RSC Med. Chem.* **2021**, *12*, 1826-1838.

[72] D. M. Jameson, *Introduction to fluorescence*, CRC press, **2025**.

[73] C. Wang, W. Chi, Q. Qiao, D. Tan, Z. Xu, X. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12656-12678.

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

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

[76] T. Kimura, K. Kawai, T. Majima, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5829-5832.

[77] A. P. Demchenko, *J. Fluoresc.* **2010**, *20*, 1099-1128.

[78] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440-3450.

[79] X. Ge, L. Tolosa, G. Rao, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1403-1410.

[80] H.-N. Nguyen, L. Zhao, C. W. Gray, D. M. Gray, T. Xia, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8989-9001.

[81] M. K. Kuimova, G. Yahioglu, J. A. Levitt, K. Suhling, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6672-6673.

[82] N. Amdursky, Y. Erez, D. Huppert, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1548-1557.

[83] S. B. Zimmerman, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 395-427.

[84] R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, M. L. Kopka, *Science* **1982**, *216*, 475-485.

[85] H. Zhou, B. J. Hintze, I. J. Kimsey, B. Sathyamoorthy, S. Yang, J. S. Richardson, H. M. Al-Hashimi, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 3420-3433.

[86] J. R. Williamson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 703-730.

[87] G. Varani, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 379-404.

[88] D. Bikard, C. Loot, Z. Baharoglu, D. Mazel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 570-588.

[89] P. W. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297-302.

[90] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414-418.

[91] N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7122-7154.

[92] D. Kondhare, P. Leonard, F. Seela, *Bioconjug. Chem.* **2023**, *34*, 422-432.

[93] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.

[94] P. Klimkowski, S. De Ornellas, D. Singleton, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 5943-5950.

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

[96] R. J. Kaiser, S. L. MacKellar, R. S. Vinayak, J. Z. Sanders, R. A. Saavedra, L. E. Hood, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 6087-6102.

[97] Y. Komatsu, N. Kojima, M. Sugino, A. Mikami, K. Nonaka, Y. Fujinawa, T. Sugimoto, K. Sato, K. Matsubara, E. Ohtsuka, *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 941-949.

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

[99] C. B. Nielsen, M. Petersen, E. B. Pedersen, P. E. Hansen, U. B. Christensen, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 260-269.

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

[101] H. Kashida, T. Takatsu, K. Sekiguchi, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2479-2486.

[102] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4977-4986.

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

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

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

[106] J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12748-12749.

[107] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3923-3933.

[108] N. Dai, Y. N. Teo, E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1221-1223.

[109] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 2371-2380.

[110] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9307.

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

[112] M. Masuko, H. Ohtani, K. Ebata, A. Shimadzu, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5409-5416.

[113] K. Fujimoto, H. Shimizu, M. Inouye, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3271-3275.

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

[115] A. Gbaj, E. Bichenkova, L. Walsh, H. Savage, A. Sardarian, L. Etchells, A. Gulati, S. Hawisa, K. Douglas, *Libyan J. Med.* **2008**, *4*, 152-159.

[116] J. Yguerabide, E. Talavera, J. M. a. Alvarez, M. Afkir, *Anal. Biochem.* **1996**, *241*, 238-247.

[117] A. Okamoto, T. Ichiba, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8364-8365.

[118] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4820-4827.

[119] C. Wanninger-Weiß, L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 100-106.

[120] K. Yamana, T. Iwai, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, H. Nakano, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1266-1273.

[121] J. Gorman, S. R. Orsborne, A. Sridhar, R. Pandya, P. Budden, A. Ohmann, N. A. Panjwani, Y. Liu, J. L. Greenfield, S. Dowland, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *144*, 368-376.

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

[123] 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.

[124] S. A. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e122-e122.

[125] J. Guo, J. Ju, N. J. Turro, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3115-3125.

[126] B. C. Thompson, Y.-G. Kim, T. D. McCarley, J. R. Reynolds, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12714-12725.

[127] C. Wood, G. Summers, E. Gibson, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3915-3918.

[128] S. Sasaki, G. P. Drummen, G.-i. Konishi, *J. Mater. Chem. C.* **2016**, *4*, 2731-2743.

[129] C. Wang, Q. Wang, M. Feng, F. Dai, S. Ma, Q. Miao, L. Wang, G. Chen, *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2026**, 127800.

[130] N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.

[131] L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2439-2448.

[132] G. Han, D. Kim, Y. Park, J. Bouffard, Y. Kim, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 3984-3988.

[133] N. I. Shank, K. J. Zanotti, F. Lanni, P. B. Berget, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12960-12969.

[134] L. D. Lavis, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 825-843.

[135] T.-I. Kim, H. Jin, J. Bae, Y. Kim, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 10565-10569.

[136] A. Pandith, Y. Luo, Y. Jang, J. Bae, Y. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202215049.

[137] S. Dähne, D. Leupold, *Angew. Chem.* **1966**, *78*, 1029-1039.

[138] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H. A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**.

[139] A. Biancardi, T. Biver, A. Marini, B. Mennucci, F. Secco, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 12595-12602.

[140] M. Levitus, S. Ranjit, *Q. Rev. Biophys.* **2011**, *44*, 123-151.

[141] J. Kang, S. Lhee, J. K. Lee, R. N. Zare, H. G. Nam, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16859.

[142] E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Röglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 318-330.

[143] K. C. Hannah, B. A. Armitage, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 845-853.

[144] P. G. Pronkin, A. S. Tatikolov, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13954.

[145] X. Zhou, S. Mandal, S. Jiang, S. Lin, J. Yang, Y. Liu, D. G. Whitten, N. W. Woodbury, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 8473-8481.

[146] B. Chen, Q. Huang, Z. Qu, C. Li, Q. Li, J. Shi, C. Fan, L. Wang, X. Zuo, J. Shen, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 6698-6704.

[147] C. Li, J. Chen, T. Man, B. Chen, J. Li, Q. Li, X. Yang, Y. Wan, C. Fan, J. Shen, *JACS Au* **2024**, *4*, 1125-1133.

[148] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856-870.

[149] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 416-419.

[150] S. Tyagi, S. A. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.

[151] D. M. Kolpashchikov, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4709-4723.

[152] A. Tsuji, H. Koshimoto, Y. Sato, M. Hirano, Y. Sei-Iida, S. Kondo, K. Ishibashi, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 3260-3274.

[153] I. O. Aparin, O. V. Sergeeva, A. S. Mishin, E. V. Khaydukov, V. A. Korshun, T. S. Zatsepin, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 7028-7036.

[154] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H.-A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 890-894.

[155] J. Brzezińska, K. Adrych-Rożek, Z. Jahnz-Wechmann, J. Boryski, W. T. Markiewicz, *Biotechnol.* **2014**, *93*, 391-399.

[156] W. Schmucker, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2012**, *23*, 2435-2448.

[157] J. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 397-416.

[158] R. Narukulla, D. E. Shuker, Y.-Z. Xu, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1767-1778.

[159] T. Chen, J. Fu, M. M. Greenberg, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3691-3694.

[160] S. A. Díaz, G. Pascual, L. K. Patten, S. K. Roy, A. Meares, M. Chiriboga, K. Susumu, W. B. Knowlton, P. D. Cunningham, D. Mathur, *Nanoscale* **2023**, *15*, 3284-3299.

[161] J. S. Huff, D. B. Turner, O. A. Mass, L. K. Patten, C. K. Wilson, S. K. Roy, M. S. Barclay, B. Yurke, W. B. Knowlton, P. H. Davis, *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125*, 10240-10259.

[162] H. v. Berlepsch, C. Böttcher, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 11900-11909.

[163] Y. Kawabe, S. Kato, *Dyes and Pigments* **2012**, *95*, 614-618.

[164] K. M. Sovenyhazy, J. A. Bordelon, J. T. Petty, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2561-2569.

[165] N. R. Reddy, M. Aubin, A. Kushima, J. Fang, *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125*, 7911-7918.

[166] J. Gierschner, L. Lüer, B. Milián-Medina, D. Oelkrug, H.-J. Egelhaaf, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2686-2697.

[167] J. Birks, **1970**.

[168] E. A. Lukhtanov, S. G. Lokhov, V. V. Gorn, M. A. Podyminogin, W. Mahoney, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e30.

[169] S. Berndl, Universität Regensburg **2010**.

[170] D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327-334.

[171] A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396-398.

[172] K. Vasu, V. Nagaraja, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77*, 53-72.

[173] W. Reik, W. Dean, J. Walter, *Science* **2001**, *293*, 1089-1093.

[174] R. J. Klose, A. P. Bird, *Trends in biochemical sciences* **2006**, *31*, 89-97.

[175] A. Sriraman, T. K. Debnath, B. Xhemalce, K. M. Miller, *Essays Biochem.* **2020**, *64*, 687-703.

[176] Y. Fu, G.-Z. Luo, K. Chen, X. Deng, M. Yu, D. Han, Z. Hao, J. Liu, X. Lu, L. C. Doré, *Cell* **2015**, *161*, 879-892.

[177] H. Sternglanz, C. E. Bugg, *Science* **1973**, *182*, 833-834.

[178] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564-574.

[179] B. Liu, H. Shi, A. Rangadurai, F. Nussbaumer, C.-C. Chu, K. A. Erharter, D. A. Case, C. Kreutz, H. M. Al-Hashimi, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5201.

[180] H. Li, N. Zhang, Y. Wang, S. Xia, Y. Zhu, C. Xing, X. Tian, Y. Du, *Front. Genet.* **2022**, *13*, 914404.

[181] C. Shen, K. Wang, X. Deng, J. Chen, *Trends Genet.* **2022**, *38*, 454-467.

[182] T. Biver, A. De Biasi, F. Secco, M. Venturini, S. Yarmoluk, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 374-383.

[183] A. A. Almaqwashi, T. Paramanathan, I. Rouzina, M. C. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 3971-3988.

[184] E. Slyusareva, F. Tomilin, A. Sizykh, E. Y. Tankevich, A. Kuzubov, S. Ovchinnikov, *Opt. Spectrosc.* **2012**, *112*, 671-678.

[185] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular fluorescence: principles and applications*, John Wiley & Sons, **2013**.

[186] R. Pei, J. Rothman, Y. Xie, M. N. Stojanovic, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e59-e59.

[187] T. Umemoto, P. J. Hrdlicka, B. R. Babu, J. Wengel, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2240-2248.

[188] N. Bouquin, V. L. Malinovskii, R. Häner, *Chem. Commun.* **2008**, 1974-1976.

[189] A. H. Marcus, D. Heussman, J. Maurer, C. S. Albrecht, P. Herbert, P. H. von Hippel, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2023**, *74*, 245-265.

[190] R. B. Sekar, A. Periasamy, *J. Cell. Biol.* **2003**, *160*, 629.

[191] J. Steinmeyer, F. Rönicke, U. Schepers, H. A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 514-518.

[192] J. Kalinowski, M. Cocchi, D. Virgili, V. Fattori, J. G. Williams, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 4000-4005.

[193] J. A. Broussard, B. Rappaz, D. J. Webb, C. M. Brown, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 265.

[194] L. Doll, J. Lackner, F. Rönicke, G. U. Nienhaus, H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2561-2567.

[195] M. D. Jepsen, S. M. Sparvath, T. B. Nielsen, A. H. Langvad, G. Grossi, K. V. Gothelf, E. S. Andersen, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 18.

[196] Y. Xue, Y. Liu, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1493.

[197] S. C. Jeng, R. J. Trachman III, F. Weissenboeck, L. Truong, K. A. Link, M. D. Jepsen, J. R. Knutson, E. S. Andersen, A. R. Ferré-D'Amaré, P. J. Unrau, *RNA* **2021**, *27*, 433-444.

[198] X. Wang, Q. Ding, R. R. Groleau, L. Wu, Y. Mao, F. Che, O. Kotova, E. M. Scanlan, S. E. Lewis, P. Li, *Chem. Rev.* **2024**, *124*, 7106-7164.

[199] G. T. Hwang, *Molecules* **2018**, *23*, 124.

[200] B. Daly, J. Ling, A. P. De Silva, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4203-4211.

[201] G. Kokkinidis, A. Kelaidopoulou, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *414*, 197-208.

[202] T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, O. Piestert, M. Sauer, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7957-7964.

[203] Y. A. Berlin, I. V. Kurnikov, D. Beratan, M. A. Ratner, A. L. Burin, *Long-Range Charge Transfer in DNA II* **2004**, 1-36.

[204] R. A. Marcus, in *Protein electron transfer*, Garland Science, **2020**, pp. 249-272.

[205] D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259-271.

[206] A. Rosspeintner, D. e. R. Kattnig, G. Angulo, S. Landgraf, G. Grampp, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6213-6221.

[207] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 31-37.

[208] D. Pan, X. Zuo, Y. Wan, L. Wang, J. Zhang, S. Song, C. Fan, *Sensors* **2007**, *7*, 2671-2680.

[209] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97-102.

[210] S. Farid, J. P. Dinnocenzo, P. B. Merkel, R. H. Young, D. Shukla, G. Guirado, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11580-11587.

[211] M. A. Kay, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 316-328.

[212] J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. B. Thomson, S. Chen, B. R. Leavitt, P. R. Cullis, R. Van Der Meel, *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 630-643.

[213] G. A. R. Gonçalves, R. d. M. A. Paiva, *Einstein (Sao Paulo)* **2017**, *15*, 369-375.

[214] N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 261-279.

[215] U. Sahin, A. Muik, E. Derhovanessian, I. Vogler, L. M. Kranz, M. Vormehr, A. Baum, K. Pascal, J. Quandt, D. Maurus, *Nature* **2020**, *586*, 594-599.

[216] R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6518-6548.

[217] R. G. Ingle, W.-J. Fang, *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1158.

[218] H. Yao, Z. Ou, K. Kimura, *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 1108-1109.

[219] M. Ischyropoulou, K. Sabljo, L. Schneider, C. M. Niemeyer, J. Napp, C. Feldmann, F. Alves, *Adv. Mater.* **2023**, *35*, 2305151.

[220] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847-4854.

[221] T. Sugimoto, *Monodispersed particles*, Elsevier, **2019**.

[222] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409-427.

[223] S. Bhattacharjee, *J. Control. Release.* **2016**, *235*, 337-351.

[224] D. J. Pochapski, C. Carvalho dos Santos, G. W. Leite, S. H. Pulcinelli, C. V. Santilli, *Langmuir* **2021**, *37*, 13379-13389.

[225] J. Anastassopoulou, *J. Mol. Struct.* **2003**, *651*, 19-26.

[226] G. L. Eichhorn, Y. A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7323-7328.

[227] D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W. D. O'Riordan, C.-C. Yang, M. Ueda, A. V. Kristen, I. Tournev, H. H. Schmidt, T. Coelho, J. L. Berk, *N Engl J Med.* **2018**, *379*, 11-21.

[228] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281-297.

[229] B. L. Davidson, P. B. McCray Jr, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 329-340.

[230] M. Balwani, E. Sardh, P. Ventura, P. A. Peiró, D. C. Rees, U. Stölzel, D. M. Bissell, H. L. Bonkovsky, J. Windyga, K. E. Anderson, *N Engl J Med.* **2020**, *382*, 2289-2301.

[231] R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, *Nat. mater.* **2013**, *12*, 967-977.

[232] J. C. Burnett, J. J. Rossi, K. Tiemann, *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 1130-1146.

[233] J. Gilleron, P. Paramasivam, A. Zeigerer, W. Querbes, G. Marsico, C. Andree, S. Seifert, P. Amaya, M. Stöter, V. Koteliansky, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 7984-8001.

[234] W. F. Lima, T. P. Prakash, H. M. Murray, G. A. Kinberger, W. Li, A. E. Chappell, C. S. Li, S. F. Murray, H. Gaus, P. P. Seth, *Cell* **2012**, *150*, 883-894.

[235] B. Hu, L. Zhong, Y. Weng, L. Peng, Y. Huang, Y. Zhao, X.-J. Liang, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 101.

[236] G. Vesnaver, C.-N. Chang, M. Eisenberg, A. P. Grollman, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 3614-3618.

[237] F. Wu, Y. Sun, Y. Shao, S. Xu, G. Liu, J. Peng, L. Liu, *PLoS One* **2012**, *7*, e48251.

[238] B. Ashwood, M. S. Jones, Y. Lee, J. R. Sachleben, A. L. Ferguson, A. Tokmakoff, *Biophys. J.* **2024**, *123*, 118-133.

[239] B. Deng, Y. Lin, C. Wang, F. Li, Z. Wang, H. Zhang, X.-F. Li, X. C. Le, *Anal. Chim. Acta* **2014**, *837*, 1-15.

[240] R. Zheng, B.-W. Park, D.-S. Kim, B. D. Cameron, *Biomed. Opt. Express* **2011**, *2*, 2731-2740.

[241] K. Yang, N. M. Mitchell, S. Banerjee, Z. Cheng, S. Taylor, A. M. Kostic, I. Wong, S. Sajjath, Y. Zhang, J. Stevens, *Science* **2023**, *380*, 942-948.

[242] A. Ruscito, M. C. DeRosa, *Front. Chem.* **2016**, *4*, 14.

[243] C.-C. Huang, H.-T. Chang, *Chem. Commun.* **2008**, 1461-1463.

[244] W. Guo, C. Zhang, T. Ma, X. Liu, Z. Chen, S. Li, Y. Deng, *J. Nanobiotechnology* **2021**, *19*, 166.

[245] A. Raj, P. Van Den Bogaard, S. A. Rifkin, A. Van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 877-879.

[246] J. M. Levsky, R. H. Singer, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2833-2838.

[247] C. Zeng, G. Shen, F. Yang, J. Chen, X. Zhang, C. Gu, Y. Zhou, B. Fan, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6859-6862.

[248] N. I. Shank, H. H. Pham, A. S. Waggoner, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 242-251.

[249] T. Dörk, M. Stuhrmann, *Biol. Unserer Zeit*, **1996**, 26. 282-291.

[250] F.Kehrer, Erblichkeit und Nervenleiden: I. Ursachen und Erblichkeitskreis von Chorea, Myoklonie und Athetose, Vol. 50, *Springer-Verlag*, **2013**.

[251] J. Kunzmann, A. L. Ruopp, H. A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2026**, 29, e70634.

[252] J. Kunzmann, A. L. Ruopp, H. A. Wagenknecht, *ChemPlusChem*, **2026**.

[253] K. Elsharkawi-Welt, J. Hepp, K.Scharffetter-Kochanek, *Hautarzt*, **2008**, 59, 893-903.

[254] A. Kubasch, M. Meurer, *Hautarzt*, **2017**, 68, 867-875.

[255] I. Martincorena, P. J. Campbell, *Science*, **2015**, 349, 1483-1489.

[256] K. Nuytemans, J. Theuns, M. Cruts, C. Van Broeckhoven, *Hum. Mutat.*, **2010,** 31, 763-780.

[257] C. A. Lemere, F. Lopera, K. S. Kosik, C. L. Lendon, J. Ossa, T. C. Saido, H. Yamaguchi, A. Ruiz, A. Martinez, L. Madrigal, *Nat. Med.*, **1996**, 2, 1146-1150.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: a) Strukturen der integrierten Fluorophore **CV1**, **CV2** und **DB**; b) Darstellung der DNA-Architekturen **DNA1**, **DNA2**, **DNA3** und **DNA4** in Bezug einer möglichen Dimerbildung der integrierten Fluorophore in der DNA. Grün bezeichnet ein Monomer, während Orange ein Dimer darstellt. 2

Abbildung 2: a) Energietransfer von **DB** auf einen Akzeptor-Fluorophor in **DNA5**; b) Darstellung des Light-Up durch die Nitroindolsonden in **N1** und **N2**; c) Darstellung der Synthese der DNA-IOH-Nanopartikel sowie deren Transfektion in HeLa-Zellen. 3

Abbildung 3: a) FRET-Energietransfer von tricyclischem Cytosin (tC) auf nitro tricyclisches Cytosin (tC_{nitro}) in DNA nach Wilhemsson et al.; b) Dexter-Energietransfer durch einen Elektronen-Austauschmechanismus von Thioxanthon auf Naphthalin in DNA nach Wagenknecht et al..[40, 42] 6

Abbildung 4: Elektronentransfer ausgelöst durch einen photoinduzierten Elektronentransfer (PET) nach Wagenknecht et al.; links) ein Elektron wird beim reduktiven Quenching vom Akzeptor Ethidium auf den angeregten Donor 7-Deazaguanin in DNA übertragen; rechts) ein Elektron wird vom angeregten Donor Ethidium auf den Akzeptor Nitroindol (NI) in DNA übertragen.[49]. Die Fluoreszenz wird dabei gelöscht. 7

Abbildung 5: Energieschema zur Darstellung des Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) von Acridinorange nach GOH et al.. Eine Verdrehung des emittierenden planaren Zustands zu 90 ° bewirkt eine Absenkung der Energie, welche strahlungsfrei relaxiert. In Lösung wird die Fluoreszenz gelöscht, während interkaliert in DNA ein Light-Up der Fluoreszenz auftritt.[55] 8

Abbildung 6: Darstellung einer Excimerbildung und der dazugehörigen Wellenlängenverschiebung der Emission von zwei Pyrenen (P) in DNA nach Kashida et al. zur Detektion einer Basendeletion.[22]. 9

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Exciton-Aufspaltung mit der Besetzung der optisch erlaubten Niveaus für die Bildung von H-und J-Aggregaten, sowie die Ausrichtung der Übergangsdipolmomente. 10

Abbildung 8: Veranschaulichung der messbaren Fluoreszenzparameter. a) Anstieg oder Löschung der Fluoreszenzintensität; b) Verschiebung der emittierten Wellenlänge; c) Inversion des Verhältnisses der beiden Fluoreszenzbanden; d) Verlängerung oder Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit. 12

Abbildung 9: a) oben; Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Adenin (A) und Thymin (T) sowie Guanin (G) und Cytosin (C), unten; Hoogsteen-Basenpaarung zur Bildung eines G-Quadruplex; b) strukturelle Darstellung einer B-förmigen DNA-Doppelhelix mit kleiner und

großer Furche, dem Winkel und dem Abstand zwischen den Basen sowie dem Helixdurchmesser. 13

Abbildung 10: Strukturen der Anbringungsmöglichkeiten von Fluorophoren über Alkin-/Triazol-, Ribose-,Aminohexyl-, Glycerol-, D-Threoninol- und (S)-Amino-propandiollinker. 15

Abbildung 11: Darstellung der white-light-emitting DNA (WED) von Wagenknecht et al. durch die Integration von Pyren und Nilrot.[110] 17

Abbildung 12: Fluoreszenzmaxima der in DNA integrierten Monomere und Dimere von Pyren von Ebata et al., sowie von TO und PBI von Wagenknecht et al..[19, 21, 111] 19

Abbildung 13: a) Strukturen der beiden Cyanovinylen-Derivate von Kim und Bouffard et al. als Monomer und als Excimer; b) DNA-gestützte Excimerbildung eines mit einem Linker modifizierten Cyanovinylen.[132] 21

Abbildung 14: K21-Monomer interkaliert in DNA und K21-Excimer durch Anlagerung in geöffneter DNA beim DNA-Breathing nach Chen et al..[146] 23

Abbildung 15: links) Molekulare Struktur von 2-Aminopurin (2-AP) von Ward et al.; rechts) Molekulare Struktur von tricyclischen Cytosin (tC) von wilhelmsson et al..; jeweils mit angedeuteten ausgebildeten Wasserstoffbrücken.[74, 95] 24

Abbildung 16: Oben) Wirkungsprinzip eines Molecular Beacons (MB). Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden Fluorophor und Quencher getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophor 5-(2´-Aminoethyl)aminonaphthalen-1-sulfonsäure (EDANS) und dem Quencher 4-(4´-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL) nach Tyagi et al..[14] 25

Abbildung 17: Oben) Wirkungsprinzip einer Nitroindol-Sonde. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden Fluorophor und Quencher getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur der eingesetzten Fluorophore Thiazol Orange und Indolvinyl sowie der Quencher Nitroindol nach Wagenknecht et al..[12, 48] 26

Abbildung 18: Oben) Wirkungsprinzip einer mit mehreren Peryleneinheiten ausgestatteten Sonde. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore räumlich getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur der eingesetzten Perylen-Fluorophore nach Asanuma et al..[13] 27

Abbildung 19: Oben) Wirkungsprinzip der exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotides (ECHO)-Sonden. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore getrennt, wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophor-Baustein nach okamoto et al..[93] 28

Abbildung 20: Oben) Wirkungsprinzip der forced intercalation of thiazol orange (FIT)-Sonden. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz wird die molekulare Flexibilität eingeschränkt,

wodurch ein Light-Up auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophors Thiazol Orange nach Seitz et al..[51, 142] 29

Abbildung 21: Oben) Wirkungsprinzip der Binary Probes. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore in räumliche Nähe gebracht, wodurch ein FRET einsetzt; unten) Struktur des eingesetzten Donor-Pyren-Bausteins und des Akzeptor Sulfo-Cy3-Bausteins nach Aparin et al..[153] 30

Abbildung 22: Oben) Wirkungsprinzip der DNA-Traffic-Lights. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore getrennt, wodurch der FRET aufgehoben wird; unten) Struktur der eingesetzten Fluorophore Thiazol Orange (Donor) und Thiazolrot (Akzeptor) nach Wagenknecht et al..[23] 31

Abbildung 23: Oben) Wirkungsprinzip eines Molecular Beacons (MB) durch excitonische Wechselwirkungen. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophor getrennt, wodurch das Quenching unterbunden wird und die beiden Pyrene ein Excimer bilden; unten) Struktur des eingesetzten Pyren und Perylenbisimid nach Häner et al..[67] 32

Abbildung 24: Oben) Wirkungsprinzip von Thiazol Orange Excitonen in DNA. Durch Hybridisierung mit einer Zielsequenz werden die Fluorophore getrennt, wodurch die Monomer-Emission auftritt; unten) Struktur des eingesetzten Fluorophors Thiazol Orange nach Wagenknecht et al..[19, 122] 32

Abbildung 25: Strukturen der integrierten modifizierten DNA-Bausteine **CV1** und **CV2**. 33

Abbildung 26: Molekülstrukturen von **CV1** und **CV2** mit angedeuteter Rotierbarkeit der tertiären Amingruppe von **CV1** im Vergleich zur starren Cyclisierung von **CV2**. 33

Abbildung 27: Struktur des integrierten modifizierten DNA-Bausteins **DB**. 34

Abbildung 28: Synthese des acyclischen Linker **4**; a) Trifluoressigsäurethylester, 16 h RT, 89 %; b) DMT-Cl, Et_3N, MeOH, THF, 16 h, RT, 92 %; c) konz. NH_4OH, MeOH, THF. 16 h, RT. 92 %.[102] 35

Abbildung 29: Synthese von **7a**/**7b**; a) 3-Brom-1-propanol, NaOH, H_2O, 16 h, 100 °C, a: 45 %, b:34 %; b) Benzothiazolacetonitril, Piperidin, EtOH, 16 h, RT, 65 %. 36

Abbildung 30: Synthese der Phosphoramidite **9a**/**9b**; a) 1: 1,1´-Carbonyldiimidazol (CDI), DMF, 3 h, RT; 2: (S)-3-Amino-1,2-propandiol **4**, DMF, RT, 33 %; b) Diisopropylethylamin (DIPEA), 2- Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DCM, 3 h, RT, quant. 37

Abbildung 31: Synthese von **15**; a) NaI, Aceton, 16 h, RT, 60 %; b) 2-Methylbenzothiazol, MeCN, 72 h, 82 °C, 44 %; c) MeI, DMF, 24 h, 60 °C, 77 %; d) Et_3N, EtOH, 1: 1 h, 80 °C, 2: 16 h, RT, 75 %. 38

Abbildung 32: Synthese des Phosphoramidits **17**; a) 1: 1,1´-Carbonyldiimidazol (CDI), DMF, 3 h, RT, 2: (S)-3-Amino-1,2-propandiol **4**, DMF, RT 32 %; b) Diisopropylethylamin (DIPEA), 2-Cyanoethyl-N,N-Diisopropylchlorophosphoramidit, DCM, 3 h, RT, quant. 38

Abbildung 33: Strukturen der Phosphoramidite **9a**, **9b** und **17**, sowie die dazugehörigen in DNA integrierten Fluorophore **CV1**, **CV2** und **DB**. Zudem die synthetisierten DNA-Sequenzen **DNA1ss**, **DNA1cs** und **DNA3ss** sowie die dazugehörigen Duplexe **DNA1**, **DNA2** und **DNA3**. **DNA1** und **DNA3** enthalten als Gegenstrang ausschließlich natürliche Nukleobasen. 41

Abbildung 34: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA2**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 43

Abbildung 35: Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA2**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=465 nm, 20 °C. 44

Abbildung 36: a) Schematische Darstellung eines Einfacheinbaus von **CV1** in **DNA1** und eines Zweifacheinbaus in **DNA2**; b) Darstellung der Bildung eines fluoreszenten H-Aggregates von **CV1** durch einen Rotationswinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten. 45

Abbildung 37: a) normierte Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA2**; b) Küvetten mit **CV1-DNA1ss** (links mit grün-gelblicher Emissionsfarbe), **CV1-DNA1** (mittig mit grüner Emissionsfarbe), und **CV1-DNA2** (rechts mit orangener Emissionsfarbe) angeregt mit einer handgehaltenen UV-Lampe mit einer Wellenlänge von λ=254 nm; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 46

Abbildung 38: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA3ss** und **CV1-DNA3**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 47

Abbildung 39: Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA3ss** und **CV1-DNA3**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=465 nm, 20 °C. 48

Abbildung 40: Schematische Darstellung eines Intrastrang-Dimers von **CV1** in **DNA3**. 49

Abbildung 41: Basenpaare aus Adenin (A), Thymin (T) und syn- und anti-m^6A. Zudem die schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleobasen. 50

Abbildung 42: Schematische Darstellung von **CV1** in **DNA4A** und **DNAT/M**, sowie die Sequenz der DNA-Sonde **CV1-DNA4ss** und der dazugehörigen Duplexen **CV1-DNA4X**, wobei sich die Gegenstränge in einer Base X unterscheiden. X ist A, T oder M (m^6A). 51

Abbildung 43: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA4ss**, **CV1-DNA4A**, **CV1-DNA4M**, **CV1-DNA4T**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 52

Abbildung 44: a) Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA4ss**, **CV1-DNA4A**, **CV1-DNA4T** und **CV1-DNA4M**; b) Darstellung des Verhältnisses des Fluoreszenzmaximum bei λ=536 nm zur bathochrom verschobenen Schulter bei λ=575 nm; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=465 nm. 53

Abbildung 45: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 55

Abbildung 46: Fluoreszenzspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=480 nm, 20 °C. 56

Abbildung 47: a) Schematische Darstellung eines Einfacheinbaus von **CV2** in **DNA1** und eines Zweifacheinbaus in **DNA2**; b) Darstellung der Bildung eines gelöschten H-Aggregates von **CV2** durch eine parallele Ausrichtung der Übergangsdipolmomente. 57

Abbildung 48: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1** und **DB-DNA2**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 59

Abbildung 49: Fluoreszenzspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1** und **DB-DNA2**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. 60

Abbildung 50: links) Schematische Darstellung eines Einfacheinbaus von **DB** in **DNA1**; rechts) Schematische Darstellung eines Interstrang-Dimers von **DB** in **DNA2**. 61

Abbildung 51: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren von **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 63

Abbildung 52: a) Fluoreszenzspektren von **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3**; b) normierte Emissionsspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1**, **DB-DNA2**, **DB-DNA3ss** und **DB-DNA3**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. c) Küvetten mit **DB-DNA1ss**, **DB1-DNA1**, **DB1-DNA2**, **DB-DNA3ss**, **DB-DNA3** angeregt mit einer handgehaltenen UV-Lampe mit einer Wellenlänge von λ=365 nm; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 64

Abbildung 53: Quantenausbeuten Φ_F der Sequenzen aller untersuchten Sequenzen mit den Fluorophoren **CV1**, **CV2** und **DB**. 67

Abbildung 54: Darstellung der Überlappung der Donor-Emission mit der Akzeptor-Emission eines Donor-Akzeptor-Paares. 68

Abbildung 55: Strukturen der in **DNA1** integrierten Akzeptorfluorophore **TO**, **CV1**, **CV2**, **AN1** und **AN2**. 69

Abbildung 56: Schematische Darstellung eines Energietransfers eines angeregten Donors auf einen emittierenden Akzeptor, sowie die Darstellung des Duplexes **X-DNA5**. X beschreibt dabei die möglichen Akzeptorfluorophore, während **DB** stets als Donor dient. 70

Abbildung 57: normierte UV/Vis-Absorptionsspektren der Donor-Akzeptor-Duplexe **CV1-DNA5**, **CV2-DNA5**, **AN1-DNA5**, **AN2-DNA5** und **TO-DNA5**. Die Akzeptorfluorophore befinden sich dabei in **DNA1ss**, während der Donorfluorophor **DB** im komplementären Gegenstrang **DNA-1cs** integriert ist; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. 71

Abbildung 58: Fluoreszenzspektren von **TO-DNA1ss**, **TO-DNA1** und **TO-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. 72

Abbildung 59: a) Fluoreszenzspektren von **CV1-DNA1ss**, **CV1-DNA1** und **CV1-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; b) Emissionsspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. 73

Abbildung 60: a) Fluoreszenzspektren von **AN1-DNA1ss**, **AN1-DNA1** und **AN1-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; b) Emissionsspektren von **AN2-DNA1ss**, **AN2-DNA1** und **AN2-DNA5** mit angedeuteter Abnahme der Donoremission von **DB-DNA1**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. 74

Abbildung 61: Schematische Darstellung eines PET von einem Fluorophor X auf Nitroindol (NI), sowie die molekulare Struktur des NI-DNA-Bausteins. 76

Abbildung 62: Schematische Darstellung des Quenchings eines Fluorophors ausgehend von Nitroindol (NI) in einem DNA-Einzelstrang und der Light-Up-Effekt durch Hybridisierung, sowie die synthetisierten hybridisierungssensitiven Sequenzen **X-N1ss** und **X-N2ss** mit ihren zugehörigen Duplexen. X steht dabei für die Fluorophore **CV2** oder **DB**. 77

Abbildung 63: Fluoreszenzspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1**, **CV2-N1ss** und **CV2-N1**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=480 nm, 20 °C. 78

Abbildung 64: Fluoreszenzspektren von **CV2-DNA1ss**, **CV2-DNA1**, **CV2-N2ss** und **CV2-N2**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=480 nm, 20 °C. 79

Abbildung 65: Fluoreszenzspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1**, **DB-N1ss** und **DB-N1**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. 80

Abbildung 66: Fluoreszenzspektren von **DB-DNA1ss**, **DB-DNA1**, **DB-N2ss** und **DB-N2**, sowie dem dazugehörigen Turn-On; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{exc}=400 nm, 20 °C. 81

Abbildung 67: Cyclovoltammogramm von **7b** aufgenommen in einer 0,1 M Elektrolytlösung aus $TBAPF_6$ in MeCN gegen Fc^+/Fc in Volt (V). 83

Abbildung 68: Cyclovoltammogramm von **15** aufgenommen in einer 0,1 M Elektrolytlösung aus $TBAPF_6$ in MeCN gegen Fc^+/Fc in Volt (V). 83

Abbildung 69: normierte Absorption und normierte Fluoreszenz von **CV2-DNA1**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, λ_{exc}=480 nm. 84

Abbildung 70: normierte Absorption und normierte Fluoreszenz von **DB-DNA1**; 2,5 μM in ddH_2O, 10 mM NaP_i, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, λ_{exc}=400 nm. 85

Abbildung 71: a) Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F von **CV2-N1ss**, **CV1-N1**, **CV2-N2ss**, **CV2-N2**, **DB-N1ss**, **DB-N1**, **DB-N2ss** und **DB-N2**; b) Turn-On der Duplexe **CV2-DNA1**, **CV2-N1**, **CV2-N2**, **DB-DNA1**, **DB-N1** und **DB-N2** zu ihren jeweiligen Einzelsträngen 87

Abbildung 72: Synthese der DNA-IOH-NP durch die Injektion von $ZrOCl_2$ zur **X-DNA1ss** in ddH_2O. 89

Abbildung 73: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von a) HeLa-Zellen nach 2 h, 6 h und 24 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 μg/mL; λ_{exc}=490 nm) b) zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst 33342 nach 24 h (λ_{exc}=405 nm). 90

Abbildung 74: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den angefärbten Zellkompartimenten von HeLa-Zellen nach 24 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 μg/mL); Zellkern angefärbt mit Hoechst 33342 (λ_{exc}=405 nm), Mitochondrien angefärbt mit MitoTracker red (λ_{exc}=573 nm), Transfektion von TO-DNA-NP (λ_{exc}=490 nm); Overlay der Fluoreszenz der TO-DNA-NP und dem Mitotracker red. 91

Abbildung 75: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den angefärbten Zellkompartimenten von HeLa-Zellen nach 24 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 μg/mL; Zellkern angefärbt mit Hoechst 33342 (λ_{exc}=405 nm), Lysosom angefärbt mit Lysotracker red (λ_{exc}=573 nm), Transfektion von TO-DNA-NP (λ_{exc}=490 nm); Overlay der Fluoreszenz der TO-DNA-NP und dem Lysotracker red. 92

Abbildung 76: a) Zellviabilität in Abhängigkeit zur Konzentration der transfizierten TO-DNA-NP mit linearem Fit; b) Zellviabilität in Abhängigkeit zur Konzentration der transfizierten TO-DNA-NP als Balkendiagramm. 93

Abbildung 77: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von siRNA zur Spaltung von mRNA sowie die Sequenz der eingesetzten Antisense-RNA. 94

Abbildung 78: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen a) von GFP- HeLa-Zellen nach 48 h nach Transfektion mit TO-DNA-NP (50 μg/mL; λ_{exc}=490 nm) mit zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst 33342 und dem Overlay der beiden Kanäle; b) von GFP- HeLa-Zellen nach 48 h ohne Transfektion mit TO-DNA-NP mit zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst 33342 und dem Overlay der beiden Kanäle. 95

Abbildung 79: a) Positionierung von Spacern, um die konformationelle Flexibilität der Fluorophore einer m^6A-Detektionssonde zu erhöhen, sowie die Strukturen der möglichen Tetrahydrofuran- und Propyl-Spacer; b) FRET-markierte siRNA als Nanopartikel zur Transfektion und mRNA-Abbau in Zellen. 100

Abbildung 80: ^{1}H-NMR-Spektrum von **6a**. 137

Abbildung 81: ^{13}C-NMR-Spektrum von **6a**. 138

Abbildung 82: ^{1}H-NMR-Spektrum von **6b**. 138

Abbildung 83: ^{13}C-NMR-Spektrum von **6b**. 139

Abbildung 84: ^{1}H-NMR-Spektrum von **7a.** 139
Abbildung 85: ^{13}C-NMR-Spektrum von **7a.** 140
Abbildung 86: ^{1}H-NMR-Spektrum von **7b.** 140
Abbildung 87: ^{13}C-NMR-Spektrum von **7b.** 141
Abbildung 88: ^{1}H-NMR-Spektrum von **8a.** 141
Abbildung 89: ^{13}C-NMR-Spektrum von **8a.** 142
Abbildung 90: ^{1}H-NMR-Spektrum von **8b.** 142
Abbildung 91: ^{13}C-NMR-Spektrum von **8b.** 143
Abbildung 92: ^{31}P-NMR-Spektrum von **9a**. 143
Abbildung 93: ^{31}P-NMR-Spektrum von **9b**. 144
Abbildung 94: ^{1}H-NMR-Spektrum von **10.** 144
Abbildung 95: ^{1}H-NMR-Spektrum von **12.** 145
Abbildung 96: ^{1}H-NMR-Spektrum von **14.** 145
Abbildung 97: ^{1}H-NMR-Spektrum von **15.** 146
Abbildung 98: ^{13}C-NMR-Spektrum von **15.** 146
Abbildung 99: ^{1}H-NMR-Spektrum von **16.** 147
Abbildung 100: ^{13}C-NMR-Spektrum von **16.** 147
Abbildung 101: ^{31}P-NMR-Spektrum von **17.** 148
Abbildung 102: ESI-Masse-Spektrum von **6a.** 149
Abbildung 103: ESI-Masse-Spektrum von **6b.** 149
Abbildung 104: ESI-Masse-Spektrum von **7a.** 150
Abbildung 105: ESI-Masse-Spektrum von **7b.** 150
Abbildung 106: ESI-Masse-Spektrum von **8a.** 151
Abbildung 107: ESI-Masse-Spektrum von **8b.** 151
Abbildung 108: ESI-Masse-Spektrum von **9a.** 152
Abbildung 109: ESI-Masse-Spektrum von **9b.** 152
Abbildung 110: ESI-Masse-Spektrum von **15.** 153
Abbildung 111: ESI-Masse-Spektrum von **16.** 153
Abbildung 112: ESI-Masse-Spektrum von **17.** 154
*Abbildung 113: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA1ss.*** 155
*Abbildung 114: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA1cs.*** 155
Abbildung 115: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA3ss.** 156
*Abbildung 116: HPLC-Chromatogramm von **CV1-DNA4ss.*** 156
Abbildung 117: HPLC-Chromatogramm von **CV2-DNA1ss.** 157
Abbildung 118: HPLC-Chromatogramm von **CV2-DNA1cs.** 157

Abbildung 119: HPLC-Chromatogramm von **DB-DNA1ss.** 158
Abbildung 120: HPLC-Chromatogramm von **DB-DNA1cs.** 158
Abbildung 121: HPLC-Chromatogramm von **DB-DNA3ss.** 159
Abbildung 122: HPLC-Chromatogramm von **CV2-N1ss.** 159
Abbildung 123: HPLC-Chromatogramm von **CV2-N2ss.** 160
Abbildung 124: HPLC-Chromatogramm von **DB-N1ss.** 160
Abbildung 125: HPLC-Chromatogramm von **DB-N2ss.** 161
Abbildung 126: HPLC-Chromatogramm von **TO-DNA1ss.** 161
Abbildung 127: HPLC-Chromatogramm von **G-DNA1ss.** 162
Abbildung 128: Masse von **CV1-DNA1ss.** 163
Abbildung 129: Masse von **CV1-DNA1cs.** 163
Abbildung 130: Masse von **CV1-DNA3ss.** 164
Abbildung 131: Masse von **CV1-DNA4ss.** 164
Abbildung 132: Masse von **CV2-DNA1ss.** 164
Abbildung 133: Masse von **CV2-DNA1cs.** 165
Abbildung 134: Masse von **DB-DNA1ss.** 165
Abbildung 135: Masse von **DB-DNA1cs.** 166
Abbildung 136: Masse von **DB-DNA3ss.** 166
Abbildung 137: Masse von **CV2-N1ss.** 166
Abbildung 138: Masse von **CV2-N2ss.** 167
Abbildung 139: Masse von **DB-N1ss.** 167
Abbildung 140: Masse von **DB-N2ss.** 167
Abbildung 141: Masse von **TO-DNA1ss.** 168
Abbildung 142: Masse von **G-DNA1ss.** 168
Abbildung 143: Masse von **TO-DNA1ss** extrahiert aus **TO-IOH-NP.** 168
Abbildung 144: Anregungsspektren des **DB**-induzierten Energietransfers bei einer Emissionswellenlänge von λ_{em}=580 nm. a) **CV1-DNA5**; b) **CV2-DNA5**; c) **AN1-DNA5**; d) **AN2-DNA5**; e) **TO-DNA5**. 169
Abbildung 145: Schmelztemperaturen der Interstrang-Dimere von **CV1** und **CV2**; **CV1-DNA1**, **CV1-DNA2**, **CV2-DNA1** und **CV2-DNA2**. 170
Abbildung 146: Schmelztemperaturen der mit **CV1** doppelmodifizierten Duplexe; **CV1-DNA3**, **CV1-DNA4A**, **CV1-DNA4T** und **CV1-DNA4M.** 171
Abbildung 147: Schmelztemperaturen von **DB-DNA1**, **DB-DNA2** und **DB-DNA3.** 172
Abbildung 148: Schmelztemperaturen der Duplexe **X-DNA5**. 173

Abbildung 149: Schmelztemperaturen der Nitroindolsonden **CV2N1**, **CV2N2**, **DBN1** und **DBN2**. 174

Abbildung 150: UV/Vis-Absorptionsspektren von **CV1-DNA1ss** bei unterschiedlichen Konzentrationen; a) nicht normiert; b) normiert. 175

Abbildung 151: TCSPC-Spektren der **CV1**- und **CV2-**modifizierten Einzel- und Doppelstränge. a) **CV1-DNA1ss**; b) **CV1-DNA1**; c) **CV1-DNA2**; d) **CV1-DNA3ss**; e) **CV1-DNA3**; f) **CV1-DNA4ss**; g) **CV1-DNA4A**; h) **CV1-DNA4T**; i) **CV1-DNA4M**; j) **CV2-DNA1ss**; k) **CV2-DNA1**; l) **CV2-DNA2**. 177

Abbildung 152: TCSPC-Spektren von a) **DB-DNA1ss**; b) **DB-DNA1**; c) **DB-DNA2**. 178

Abbildung 153: TCSPC-Spektren des **DB**-induzierten Energietransfers. a) **CV1-DNA5**, b) **CV2-DNA5**, c) **AN1-DNA5**, d) **AN2-DNA5**, e) **TO-DNA5**. 179

Abbildung 154: normierte UV-Vis Absorptionsspektren der einzelsträngigen Nitroindolsonden **CV2-N1ss, CV2-N2ss**, **DB-N1ss** und **DB-N2ss** sowie die dazugehörigen Duplexe **CV2-N1**, **CV2-N2**, **DB-N1** und **DB-N2.** 181

Abbildung 155: Größenanalyse der DNA-IOH-NP; a) SEM-Aufnahme von **G-DNA1ss**-NP; b) Größenverteilung der NP durch DLS und SEM; c) DLS von **G-DNA1ss**-NP und **TO-DNA1ss**-NP. 182

Abbildung 156: a) Thermogravimetrie, b) XRD, c) EDX von **G-DNA1ss**-NP zur Bestimmung der Zusammensetzung. 183

10. Appendix

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 Punkte statt Kommata in Graphen verwendet.

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

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

10.1 Konferenzen und Posterbeiträge

09/2023 XI. Nucleinsäurechemietreffen, Würzburg, **2023**

New thiazole orange dimers in DNA

(Poster)

05/2024 Konjugierte Polymere und Oligomere (KOPO), **2024**

Cyanovinylene dimers in DNA

(Poster)

09/2025 XII. Nucleinsäurechemietreffen, Hamburg, **2025**

New fluorescent dimers in DNA

(Poster)

12/2025 Pacifichem 2025, Honolulu (Hawaii), **2025**

Cyanovinylene Dye-DNA Interactions: Optical Characterization and m^6A Detection

(Poster)

10.2 Lehre

WS2023/24	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-Praktikums (für Studenten der Chemie, Chemische Biologie und M.ed. Chemie) am KIT.
SS2024	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-Praktikums (für Studenten der Chemie, Chemische Biologie und M.ed. Chemie) am KIT.
WS2024/25	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums (für Studenten der Chemie, Chemische Biologie und Lebensmittelchemie) am KIT.
WS2024/25	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-Praktikums (für Studenten der Chemie, Chemische Biologie und M.ed. Chemie) am KIT.
SS2025	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-Praktikums (für Studenten der Chemie, Chemische Biologie und M.ed. Chemie) am KIT.
WS2025/26	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums (für Studenten der Chemie, Chemische Biologie und Lebensmittelchemie) am KIT.
WS2025/26	Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenen-Praktikums (für Studenten der Chemie, Chemische Biologie und M.ed. Chemie) am KIT.
06-08/2024	Betreuung der Bachelorarbeit mit dem Titel *Neue Cyanovinylene DNA-Bausteine*
11/2024-2/2025	Betreuung des Vertiefungspraktikum mit dem Titel *Synthese und Charakterisierung des Farbstoffs Di-Benzothiazol in DNA*

01-03/2026	Betreuung des Vertiefungspraktikum mit dem Titel *Fluoreszenzbasierte DNA-Sonden: Synthese eines Dibenzothiazol-Cyanin-Farbstoffes und spektroskopische Evaluierung eines Nitroindol-Light-Up-Systems*

10.3 Publikationsliste

1. *Synthesis of DNA Building Blocks With Aminophthalimides 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 der Publikation sind in dieser Dissertation eingebunden (Kapitel 3.2, 3.3)

2. *Synthesis of DNA Building Blocks With Thiazole Fluorophores for Fluorescent Readout by Excimers and Energy Transfer*

   J. Kunzmann, A. L. Ruopp, H. A. Wagenknecht, *ChemPlusChem*, **2026**.

   DOI: 10.1002/cplu.70263

   Teile der Publikation sind in dieser Dissertation eingebunden (Kapitel 3.2, 3.3, 3.4)