

**Ladungstransfer in DNA mit Indol,
Ethidium und Pyren als Fluoreszenzsonden:
Synthese, Spektroskopie und Primerverlängerung**

Zur Erlangung des
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV — Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



DISSERTATION

von

Diplom-Chemikerin

Claudia Wanninger-Weiß

aus Plattling

Regensburg, 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-89963-787-8

© Verlag Dr. Hut, München 2008
Sternstr. 18, 80538 München
Tel.: 089/66060798
www.dr.hut-verlag.de

Die Informationen in diesem Buch wurden mit großer Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Verlag, Autoren und ggf. Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für eventuell verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der Vervielfältigung und Verbreitung in besonderen Verfahren wie fotomechanischer Nachdruck, Fotokopie, Mikrokopie, elektronische Datenaufzeichnung einschließlich Speicherung und Übertragung auf weitere Datenträger sowie Übersetzung in andere Sprachen, behält sich der Autor vor.

1. Auflage 2008

Diese Arbeit wurde angeleitet durch Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht.

Promotionsgesuch eingereicht am: 29. April 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2008

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Armin Buschauer (Vorsitzender)

Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Prof. Dr. Burkhard König

Prof. Dr. Jörg Heilmann

Meinen Eltern und Michael

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen,
das Möglichste getan hat.
(Johann Wolfgang von Goethe,
Italienische Reise, 16.03.1787)*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2005 bis April 2008 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg unter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht danke ich sehr herzlich für die hervorragende Betreuung, das sehr gute Arbeitsklima, sowie für das Vertrauen, das er mir jederzeit sowohl wissenschaftlich als auch organisatorisch entgegenbrachte. Besonders bedanken möchte ich mich für den zweiwöchigen Aufenthalt an der Universität Konstanz zur Erlernung der biologischen Arbeitstechniken.

Im Speziellen bedanke ich mich bei:

- meinen Kollegen Janez Barbaric, Daniela Baumstark, Sina Berndl, Christoph Beyer, Ulrike Bruckner, Thomas Ehrenschwender, Nadine Herzig, Daniel Lachmann, Dr. Elke Mayer-Enthart, Florian Menacher, Christa Prunkl, Veronika Rödl, Moritz Rubner, Wolfgang Schmucker, Dr. Linda Valis, Dr. Reji Varghese, Dr. Clemens Wagner, und Michael Weinberger für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit.
- meinen Laborkollegen Clemens, Christa, Tom und Nadine für die kreative und unglaublich fröhliche Laboratmosphäre, in der wir sehr viel Spaß hatten.
- Prof. Dr. Andreas Marx und seinen Mitarbeitern, v. a. Francesca Di Pasquale, an der Universität Konstanz für den zweiwöchigen Aufenthalt in Konstanz, die Einführung in die Arbeitstechniken der Molekularbiologie und die Bereitstellung der DNA-Polymerasen.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der Regensburger NMR-Abteilung für die Messung und Interpretation der NMR-Spektren.
- Josef Kiermaier und Wolfgang Söllner der Zentralen Analytik für die Anfertigung der Massenspektren.
- Dr. Manfred Zabel für die Anfertigung der Röntgenkristallstruktur.
- Dr. Torsten Fiebig am *Boston College* (USA) für die zeitaufgelösten Transientenabsorptions-Messungen und die interessante wissenschaftliche Diskussion.
- Markus Pichlmaier und Michael Linseis aus dem AK Winter für die Unterstützung bei CV- und SEC-Messungen in Wort und Tat.
- Stefan Nagel und Matthias Stich aus dem AK Wolfbeis für die Hilfestellung bei den Fluoreszenzlebenszeiten-Messungen.

- unserer Sekretärin Ulrike Weck, die sich jederzeit meiner Fragen annahm und mich in organisatorischen Belangen immer unterstützte.
- dem harten Kern der morgendlichen Kaffeerrunde Daniel, Tom und Flo für so manch befreiende Ausschweifungen ins Nichtwissenschaftliche.

Falls ich jemanden vergessen habe, so möchte ich mich dafür entschuldigen und betonen, dass es ein Versehen gewesen sein muss!

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Ohne die immerwährende Unterstützung und den Rückhalt durch meine Eltern wären mein Chemiestudium sowie die nachfolgende Promotion nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Michael, der in jeder Situation die richtigen Worte findet und mich immer wieder zum Lachen bringt.

Einige Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Indole as an Artificial DNA Base Incorporated via an Acyclic 2'-Deoxyribose Substitute

C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, *13*, 2051 – 2054.

Pyrene-modified guanosine as fluorescent probe for DNA modulated by charge transfer

C. Wanninger-Weiß, L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem* **2008**, *16*, 100 - 106.

Synthesis of 5-(2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin as a DNA modification for electron transfer studies: The critical role of the position for the chromophore attachment

C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64 – 71.

Nucleotide insertion and bypass synthesis of pyrene- and BODIPY-modified oligonucleotides by DNA polymerases

C. Wanninger-Weiß, F. Di Pasquale, T. Ehrenschwender, A. Marx, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Comm.* **2008**, 1443 – 1445.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation	1
2	Themenstellung.....	3
3	Theoretischer Hintergrund	6
3.1	Ladungstransfer in DNA	6
3.1.1	Untersuchungen zum Ladungstransfer.....	7
3.1.1.1	Oxidativer Ladungstransfer.....	11
3.1.1.2	Reduktiver Elektronentransfer	15
3.1.2	Spektroskopische Methoden: UV/Vis-, Fluoreszenz- und zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie.....	19
3.2	Biologische Relevanz von Ladungstransferreaktionen in DNA	24
3.3	Tryptophan als biologische Sonde in Ladungstransferreaktionen	27
3.4	Ethidium als biochemische Sonde für Ladungstransferreaktionen.....	34
3.5	Pyrenmodifizierte Nucleoside als chemische Sonden für Ladungstransferreaktionen	38
3.6	DNA-Synthese	41
3.7	Detektion von Punktmutationen (SNP) und das DETEQ-Konzept	43
3.7.1	Enzymatische Assays	45
3.7.1.1	Einzelnucleotid-Primerverlängerung	45
3.7.1.2	Invader-Assay [®]	46
3.7.1.3	TaqMan-Assay [®]	47
3.7.2	Nicht-enzymatische Assays.....	48
3.7.2.1	Allelspezifische Hybridisierung.....	48
3.7.2.2	Strang-Austausch-Methode	48
3.7.2.3	Fluoreszenzmarkierte DNA-Basen und Fluoreszenzsonden als artifizielle Basen.....	49
3.7.2.4	DETEQ-Konzept.....	51

4	Indol als Lochakzeptor für Ladungstransferprozesse in Oligonucleotiden	54
4.1	Indol als artifizielle DNA-Base.....	54
4.2	Synthese des acyclischen Indol-DNA-Bausteins 11 und spektroelektrochemische Charakterisierung des Nucleosids 9	55
4.3	Spektroskopische Untersuchung der Eigenschaften von Indol im Duplex.....	57
4.4	Untersuchung eines DETEQ-Systems aus PydG und Indol.....	64
4.4.1	Hintergrundinformation zu PydG.....	64
4.4.2	Studien zum oxidativen Ladungstransfer mit PydG als Lochdonor	66
4.4.3	Anwendung des DETEQ-Konzepts im Donor-Akzeptor-Paar PydG-Indol	71
4.5	Untersuchung eines DETEQ-Systems aus Ethidium und Indol.....	75
4.5.1	Hintergrundinformation zu Ethidium.....	75
4.5.2	Studien zum oxidativen Ladungstransfer mit Ethidium als Lochdonor.....	76
4.5.3	Anwendung des DETEQ-Konzepts im Donor-Akzeptor-Paar Ethidium-Indol.....	84
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	88
5	2PydU als nucleosidischer Elektronendonator	90
5.1	Hintergrund zu pyrenmodifizierten 2'-Desoxyuridinen.....	90
5.2	Synthese von 5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (2PydU, 25).....	92
5.3	Spektroskopische Charakterisierung von 2PydU (25)	95
5.4	Elektrochemische Charakterisierung von 2PydU (25).....	102
5.5	Synthese und Charakterisierung von 2PydU-modifizierter DNA.....	105
5.5.1	Dinucleotide mit 2PydU.....	106
5.5.2	Studien zum Elektronentransfer zwischen 2PydU und T in Oligonucleotiden	108
5.5.3	Untersuchung der Basenpaarungseigenschaften der pyrenmodifizierten Uridine	111
5.5.4	Studien zur Excimerbildung in 2PydU-modifizierter DNA.....	114
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	118

6	Primerverlängerungs-Experimente mit Pyren- und BODIPY-modifizierten Oligonucleotiden.....	119
6.1	Motivation und Hintergrund.....	119
6.2	Primerverlängerungs-Experimente.....	121
6.2.1	Materialien, Methoden und Durchführung der Primerverlängerung	121
6.2.2	„Standing start“-Experimente	124
6.2.3	„Standing start“-Experimente mit verschiedenen Inkubationszeiten.....	126
6.2.4	„Running start“-Experimente	129
6.3	Optische Analytik der Primerverlängerung.....	130
6.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	135
7	Zusammenfassung.....	136
8	Experimenteller Teil	138
8.1	Materialien und Geräte.....	138
8.2	Synthesen	143
8.2.1	Darstellung des acyclischen Aminopropandiol-Linkers 7	143
8.2.2	Darstellung des acyclischen Indolbausteins	146
8.2.3	Darstellung der DNA-Bausteine der Ladungsdonoren PydG und Ethidium .	149
8.2.4	Darstellung der DNA-Bausteine von 2PydU und 1PydU	155
8.3	Synthese und Charakterisierung von Oligonucleotiden	160
8.3.1	Verwendete Oligonucleotidsequenzen.....	160
8.3.2	Kupplungsprotokolle.....	169
8.3.3	Aufarbeitung und Reinigung der Oligonucleotide	174
8.3.4	Charakterisierung und Hybridisierung von Oligonucleotiden	175
8.3.5	Charakterisierung der synthetisierten Oligonucleotide	177
8.4	Durchführung der Primerverlängerungs-Experimente.....	182
8.5	Daten zur Kristallstruktur von 2PydU (25).....	183
9	Literaturverzeichnis.....	191

Abkürzungen

2D	zweidimensional
8-oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
1PydU	5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin
2PydU	5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin
Å	Angström
A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
abs.	absolut
Ak	Akzeptor
Alloc	Allyloxycarbonyl
a. u.	<i>arbitrary units</i>
brs	breites Singulett
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CI	chemische Ionisation
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CT	Ladungstransfer (<i>charge transfer</i>)
CV	Cyclovoltammetrie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett, Tag
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dd	Dublett von Dubletts
DETEQ	<i>Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching</i>
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat

d. h.	das heißt
DIPEA	<i>Diisopropylethylamin</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleotidtriphosphat
Do	Donor
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
dtbpy	4,4'-Di(<i>tert</i> -butyl)-2,2'-bipyridyl
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
dU	2'-Desoxyuridin
E_{00}	Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs
EI	elektrische Ionisation
em	Emission
E_{ox}	Oxidationspotential
E_{ox}^*	Oxidationspotential des angeregten Zustands
eq.	Äquivalent
E_{red}	Reduktionspotential
E_{red}^*	Reduktionspotential des angeregten Zustands
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
Et	Ethidium
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
exc	Anregung (<i>excitation</i>)
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FAD	Flavinadenindinucleotid
FC	<i>Flash</i> -Säulenchromatographie
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin

Gln	Glutamin
GNA	<i>glycol nucleic acid</i>
G ^{ox}	Oxidationsprodukte von G
h	Stunde
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
IC	<i>Internal conversion</i>
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
Lys	Lysin
M	molar, mol/L
m	Multipllett
mbar	Millibar
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mdeg	<i>millidegree</i>
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Flugzeit-Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min.	Minute
mM	millimolar
μM	mikromolar
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
Na-P _i	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NHE	Normalwasserstoff-Elektrode

NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ppm	<i>parts per million</i>
ps	Pikosekunde
Py	Pyren(yl)
PydG	8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin
Pyin	1-Ethynylpyrenyl-
PtzdU	5-(10-Methyl-phenothiazim-3-yl)-2'-desoxyuridin
R _f	Retentionsfaktor
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett, Sekunde
SNP	Einzelbasen-Punktmutation (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
sog.	sogenannt
ss	Einzelstrang
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
t	Triplett
TBAHF	Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190 – 800 nm)
V	Volt
v. a.	vor allem
Z	7-Deazaguanin
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

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

¹ *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

² a) *IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)*, *Biochemistry* **1971**, 10, 3983-4004.

b) *IUPAC-IUB (CBN); Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature*, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477

1 Motivation

„Der ewige Traum vom Fliegen“ beschäftigte die Menschheit 400 Jahre, nachdem *Leonardo da Vinci* (1452 – 1519) damit begonnen hatte, Vögel bei ihrem Flug zu beobachten und mögliche Flugapparatkonstruktionen zu skizzieren. Es folgten viele Fehlversuche und nur wenige mochten vermuten, dass dieser Traum jemals Wirklichkeit werden könne. Erst 1891 schaffte es *Otto Lilienthal* als erster Mensch ein Gleitflugzeug zu entwickeln, das wirklich vom Wind getragen wurde. Nur durch beharrliches Forschen und Experimentieren konnte der Traum vom Fliegen realisiert werden.

Auch in der heutigen Zeit hat die Menschheit unerfüllte Träume. Träume, neue Diagnose- und Therapiemethoden zu entwickeln, um bislang unheilbare Krankheiten heilen zu können. Ein wichtiger Schritt zur Verwirklichung des „Traums vom Heilen“ gelang 1871 dem Schweizer *Friedrich Miescher*, der als erster die Isolation von Desoxynucleinsäure (DNA) aus Zellen beschrieb. Allerdings konnte man zu diesem Zeitpunkt die Tragweite dieser bedeutenden Entdeckung noch nicht abschätzen, da die Funktion der DNA noch nicht bekannt war. Erst *Oswald Avery* konnte 1944 die DNA zweifelsfrei als Träger der Erbinformation identifizieren.^[1] Einen weiteren entscheidenden Meilenstein legten *Watson* und *Crick* mit der Aufklärung der DNA-Struktur im Jahre 1953,^[2] wofür ihnen 1962 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde. Damit begann die Entwicklung der modernen Molekularbiologie, die uns unserem Traum Stück für Stück näher bringen soll.

Als im Jahre 1988 das Human-Genom-Projekt initiiert wurde,^[3] setzte man sich große Ziele: die Kartierung des humanen Genoms, die vollständige Sequenzierung aller Chromosomen sowie die Identifikation aller Gene.^[4] Die Motivation, das menschliche Genom, also die Erbinformation unserer eigenen Spezies, zu sequenzieren, war sehr hoch und so beteiligten sich 20 Forschergruppen aus USA, Großbritannien, Japan, Frankreich, Deutschland und China an diesem Projekt. Bereits 2001, knapp 50 Jahre nach der Strukturaufklärung der DNA, konnte eine erste vollständige Sequenzierung des humanen Genoms vollendet werden.^[5, 6] Während man 2001 ursprünglich von etwa 30 000 – 40 000 Genen ausging,^[5] wurde die Zahl zum Abschluss des Human-Genom-Projekts im Jahr 2003 auf 20 000 – 25 000 Gene nach

unten korrigiert.^[7] Die Erwartungen an das Projekt waren zu hoch angesetzt. Trotz der Kartierung des Genoms, blieben Fragestellungen bzgl. der Epigenetik und der Komplexibilität weiter ungeklärt. Während der Studien im Human-Genom-Projekt wurde allerdings herausgefunden, dass im menschlichen Genom, das ca. 3 Mrd. Basenpaare umfasst, sog. Einzelnucleotid-Punktmutationen (SNP = *single nucleotide polymorphism*) auftreten, die eine große individuelle genetische Variabilität des Genoms verursachen.^[8]

Es ist bekannt, dass sich die beiden Kopien des menschlichen Genoms, die Chromosomen, in ca. 0.1 % der Nucleotide voneinander unterscheiden. Das bedeutet, dass im Durchschnitt eine Punktmutation pro 1000 Basen auftritt.^[9-12] Liegen diese SNPs in codierenden Regionen des Genoms, so beeinflussen sie Translation und Transkription und können zu Krankheiten, wie Krebs, Alzheimer, Parkinson etc., führen. In der Pharmacogenetik beschäftigt man sich intensiv mit der SNP-Detektion, um fallspezifische Wirkungen von Arzneimitteln zu untersuchen und wirksame Therapiemethoden zu entwickeln. Es gibt bisher bereits enzymatische und nicht-enzymatische Methoden der SNP-Detektion. Dennoch ist es wichtig, weiter Grundlagenforschung auf diesem Gebiet zu betreiben. Mit der Erkennung von Punktmutationen kommt man dem Ziel, schwerwiegende Krankheiten zu heilen, wieder ein Stück näher.

Der „Traum vom Fliegen“ wurde nur wahr, weil die Menschen beharrlich an seiner Verwirklichung festhielten. Ebenso müssen wir heute die DNA-Forschung in großen Schritten vorantreiben. Die Grundsteine für die Entwicklung neuer Diagnose- und Therapiemethoden wurde durch die Sequenzierung des humanen Genoms und die Forschung in der Pharmacogenetik bereits gelegt. Nun müssen vor allem auf dem Gebiet der SNP-Detektion neue Erkenntnisse gewonnen werden. Auch in dieser Arbeit wird ein Anteil an dieser Grundlagenforschung geleistet.

2 Themenstellung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, hofft die Medizin auf neue Fortschritte in der Diagnostik und Behandlung verschiedenster systemischer Krankheiten. Ein erster wichtiger Schritt zur Entwicklung von Therapiemethoden ist die Erkennung von Einzelnucleotid-Punktmutationen (SNP), da Substitution oder Deletion eines einzigen Nucleotids gravierende gesundheitliche Folgen haben kann. Daher ist es für die Onkologie, Genetik, Virologie und Pharmacogenetik äußerst interessant, einzelne SNPs innerhalb einer Gensequenz nachweisen zu können.^[13, 14]



Abb. 2-1: Einzelnucleotid-Punktmutationen (SNP) - die Ursache der Individualität.^[15]

Neben den bereits bekannten enzymatischen^[13, 14] und nicht-enzymatischen Verfahren zur SNP-Erkennung,^[13] kann auch Ladungstransfer durch den DNA-Basenstapel zur Detektion von Punktmutationen genutzt werden. In der Arbeitsgruppe Wagenknecht wurde dazu das DETEQ-Konzept (*Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching*) anhand eines Donor-Akzeptor-Paars aus Ethidium und 7-Deazaguanin entwickelt.^[16, 17] Ein generelles Ziel dieser Forschung soll die Abfrage eines ganzen Codons aus drei Basenpaaren auf Fehlpaarungen sein.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, einen neuartigen acyclischen Ladungsakzeptor auf der Basis von Indol zu synthetisieren (Abb. 2-2), kovalent in die DNA einzubauen und spektroskopisch zu charakterisieren. Im menschlichen Körper ist Indol bereits als aromatische Seitenkette der Aminosäure Tryptophan als intrinsische Fluoreszenzsonde in Proteinen vorhanden. Indol ist der kleinstmöglichen Chromophor, mit dem Oligonucleotide kovalent fluoreszenzmarkiert werden können.

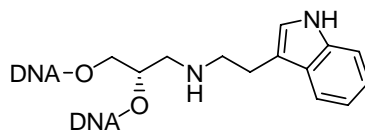


Abb. 2-2: Zielmolekül: Indol als acyclisches Basensurrogat.

Sein Oxidationspotential ist vergleichbar mit 7-Deazaguanin, das bereits erfolgreich als Akzeptor eingesetzt werden konnte.^[18-20] Nach der spektroskopischen Charakterisierung soll das acyclische Indolbasensurrogat als Lochakzeptor in zwei verschiedenen DETEQ-Sonden eingesetzt werden. Als Donoren werden PydG^[19, 21] bzw. Ethidium^[16, 19] verwendet, die bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* untersucht wurden. Ziel ist es, mit den neuen DETEQ-Sonden die Erkennung von Punktmutationen über eine Sequenz von ein bis drei Basenpaaren aufgrund von unterschiedlichem Ladungstransferverhalten zu untersuchen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Synthese eines neuen nucleosidischen Elektronendonors auf der Basis von Pyren und 2'-Desoxyuridin (dU). In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wird bereits ein pyrenmodifiziertes dU (PydU, Abb. 2-3, rechts), bei dem die beiden Chromophore über die 1-Position des Pyrens verknüpft sind, verwendet.^[22] Mit dem Ziel, neue optische und elektrochemische Eigenschaften zu erreichen, soll in dieser Arbeit Pyren über die 2-Position an dU geknüpft werden (Abb. 2-3, links). Die daraus resultierenden Unterschiede sollen im Vergleich zum bekannten PydU herausgearbeitet werden. Nach kovalentem Einbau in Oligonucleotide soll die Eigenschaft als Ladungsdonor untersucht werden.

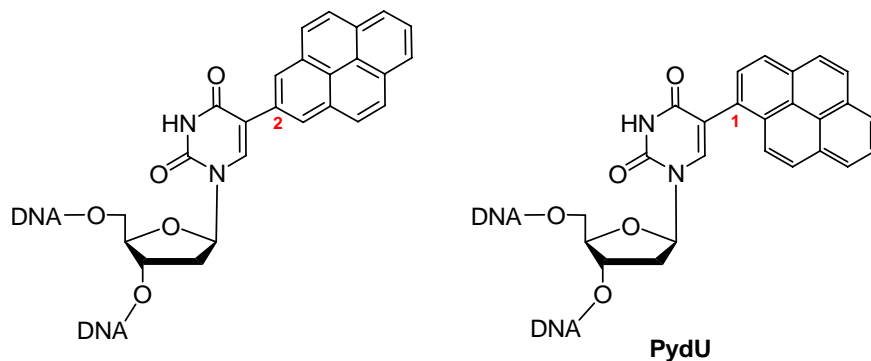


Abb. 2-3: links: Zielmolekül 5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin, rechts: 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (PydU), das bisher in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* verwendet wurde.

Im dritten Teil der Arbeit soll anhand ausgewählter Beispiele die Frage geklärt werden, ob chromophormodifizierte Nucleoside als Fluoreszenzmarker in der chemischen Biologie eingesetzt werden können. Konkret soll herausgefunden werden, wie DNA-Polymerasen auf derartige Modifikationen reagieren. Zu diesem Zweck sollen verschiedene Modifikationen in Templatoligonucleotide integriert werden, die dann in Primerverlängerungs-Experimenten mit DNA-Polymerasen untersucht werden (vgl. Abb. 2-4). Die Ergebnisse dieser molekularbiologischen Experimente sollen anschließend auch spektroskopisch nachvollzogen werden.

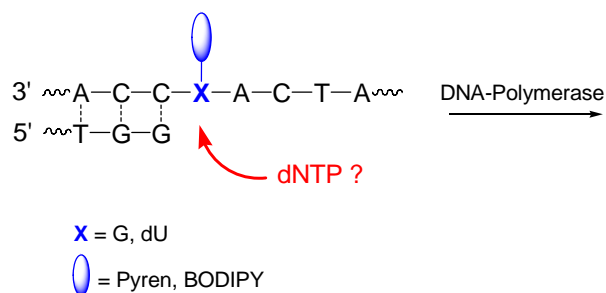


Abb. 2-4: Geplante Primerverlängerungs-Experimente mit chromophormodifizierter DNA.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Ladungstransfer in DNA

Bereits wenige Jahre nach der Aufklärung der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick* ^[2] begann die Diskussion um möglichen Ladungstransfer in DNA. Aufgrund des charakteristischen Aufbaus und der ausgeprägten π, π -Wechselwirkungen der aromatischen Nucleobasen wurde von *Eley et al.* 1962 erstmals der Transport von Ladungen entlang der Helixachse vorgeschlagen. ^[23]

Je nach Art der transportierten Ladung unterscheidet man zwischen oxidativem Loch- und reduktivem Elektronentransfer. Sowohl reduktive als auch oxidative Ladungstransferprozesse beschreiben die Bewegung von Elektronen durch die DNA. Der grundlegende Unterschied zwischen beiden Vorgängen liegt in den beteiligten Orbitalen. Während der oxidative Lochtransfer HOMO-kontrolliert verläuft (Abb. 3-1), läuft der reduktive Elektronentransfer unter LUMO-Kontrolle ab (Abb. 3-2).

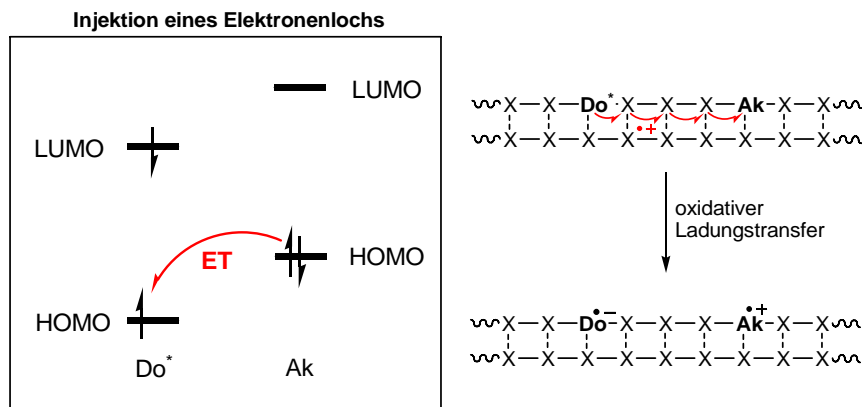


Abb. 3-1: Schema des oxidativen Lochtransfers. Ein Elektron aus dem HOMO des Ladungsakzeptors **Ak** wird in das HOMO des angeregten Ladungsdonors **Do*** übertragen.

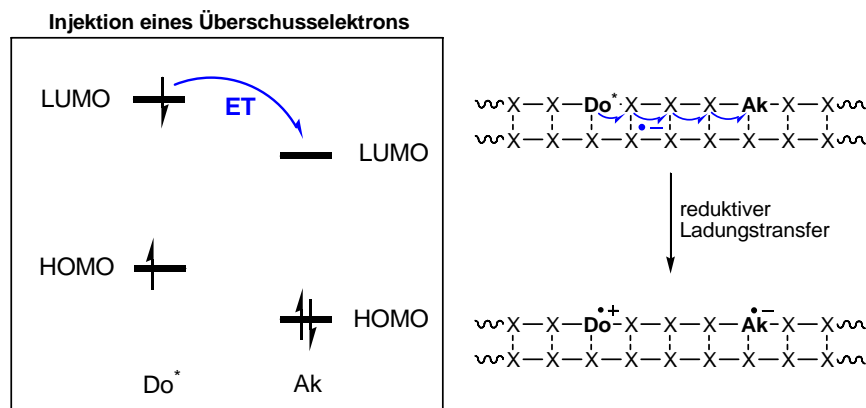


Abb. 3-2: Schema des reduktiven Elektronentransfers. Ein Elektron aus dem LUMO des angeregten Ladungsdonors Do^* wird in das LUMO des Ladungsakzeptors Ak übertragen.

Das Interesse an Ladungstransferprozessen in DNA wuchs mit der Erkenntnis, dass oxidative Schädigungen des Erbgutes eine zentrale Rolle bei Mutagenese, Apoptose und Krebsentstehung spielen.^[24-26] Die biologische Bedeutung des reduktiven Elektronentransfers konnte bisher kaum nachgewiesen werden. *Barton et al.* fanden allerdings heraus, dass reduktiver Ladungstransfer in Basenexzisions-Reparaturprozessen auftritt.^[27-29] Ihre Untersuchungen werden in Kapitel 3.1.1.2 genauer erläutert. Unter natürlichen Bedingungen sind keine Schädigungen der DNA bekannt, die auf reduktiven Ladungstransfer zurückzuführen sind.

Es wurden bereits früh verschiedene Techniken verwendet, um Ladungstransportprozesse in der DNA zu studieren,^[30] aber erst mit Entwicklung der automatisierten Festphasensynthese wurden systematische Untersuchungen an definierten Basensequenzen möglich.^[31-33] Mittlerweile ist die Vorstellung vom Ladungstransport durch DNA allgemein akzeptiert und die Diskussion darüber hat sich auf den Mechanismus und in jüngster Zeit auch auf die biologische Bedeutung und die technische Anwendbarkeit verlagert.

3.1.1 Untersuchungen zum Ladungstransfer

Zur Erforschung des Ladungstransfers muss die DNA mit redoxaktiven Sonden, die zur Erzeugung und auch zum Abfangen der Ladung notwendig sind, modifiziert werden. Die Art der Anknüpfung hängt dabei von der verwendeten aktiven Gruppe, der gewünschten

sterischen Anordnung und der synthetischen Zugänglichkeit des entsprechenden Bausteins ab. Die Einführung der Sonden in die DNA kann nach verschiedenen Methoden geschehen,^[34] die im Folgenden mit Beispielen aus dieser Arbeit erläutert werden:

- Einbau einer redoxaktiven Sonde als artifizielle Nucleobase (Abb. 3-3). Als Donor oder Akzeptor wird synthetisch ein Basensurrogat hergestellt, das über eine acyclische Linkereinheit in das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat integriert wird und in der Basensequenz eine Nucleobase ersetzt. Die redoxaktive Sonde kann mit dem Basenstapel wechselwirken und gibt seine Anregungsenergie direkt in die DNA ab.

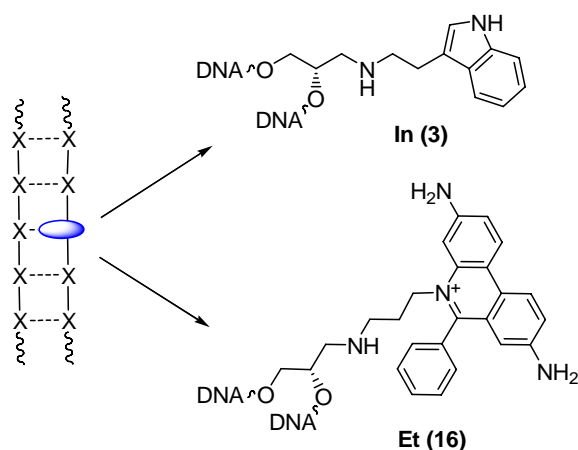


Abb. 3-3: Modifikation der DNA mit artifiziellen Nucleobasen. Beispiele: Indol (In, **3**),^[35, 36] Ethidium (Et, **16**).^[16, 37-39]

- Modifikation eines natürlichen Nucleosids mit einer redoxaktiven Gruppe (Abb. 3-4). Der Einbau modifizierter Nucleoside in den Basenstapel gelingt über Standardsynthesemethoden (z. B. 1PydU (**24**),^[22, 40-43] 2PydU (**25**),^[44] PydG (**12**),^[40] BODIPYdU (**31**)^[45]) oder durch chemische Umsetzung von Vorläufermolekülen an der festen Phase (z. B. *Pyin*-Nucleoside^[46-49]). Die redoxaktive Gruppe ragt im Idealfall in die große Furche und kann außerhalb des Basenstapels angeregt werden. Die Anregungsenergie wird meist nicht unmittelbar in den Basenstapel abgegeben.

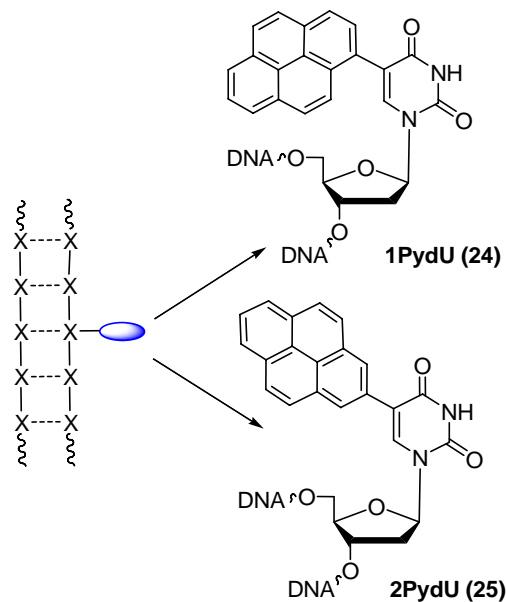


Abb. 3-4: Modifikation eines natürlichen Nucleosids mit Pyren. Beispiele: 1PydU (**24**), 2PydU (**25**).

- Platzierung der Sonde als Kopfgruppe einer DNA-Haarnadel (Abb. 3-5, links). Die Modifikation ist über Linkereinheiten mit zwei komplementären DNA-Sequenzen verknüpft. Bildet sich ein Doppelstrang aus, so kommt die reaktive Gruppe auf dem Basenstapel zu liegen. Eine solche Haarnadel ist sehr stabil und dissoziiert erst bei hoher Temperatur. Diese Variante ist synthetisch sehr einfach durchzuführen.
- Anknüpfung eines Interkalators über eine Linkereinheit (Abb. 3-5, rechts). Der Linker kann entweder am 3'- bzw. 5'-Ende der DNA oder innerhalb der DNA-Sequenz angebunden werden. Die Position der Interkalation kann durch Variation der Linkerlänge beeinflusst, jedoch nicht genau definiert werden.

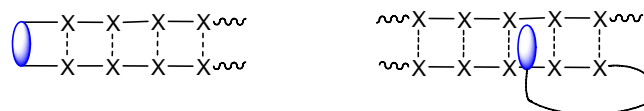


Abb. 3-5: links: Redoxaktive Sonde als Haarnadel-Kopfgruppe; rechts: Interkalator mit Linkereinheit.

Eine Abschätzung der Triebkraft für eine Ladungstransferreaktion kann mit Hilfe der *Rehm-Weller-Gleichung* getroffen werden.^[50, 51]

$$\Delta G_{CT} = e[E_{ox} - E_{red}] - E_{00} + C \quad \text{Gleichung 3-1}$$

mit: ΔG_{CT} : freie Enthalpie des Ladungstransfers (CT: *charge transfer*)

e: Elementarladung

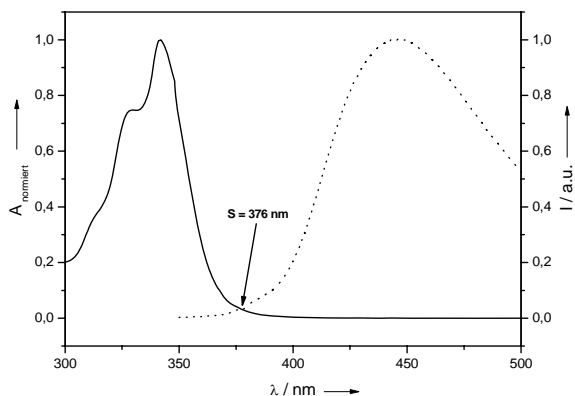
E_{ox} : Oxidationspotential des Grundzustands

E_{red} : Reduktionspotential des Grundzustands

E_{00} : Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs

C: Änderung der *Coulomb*-Energie, hier näherungsweise $C = 0$

E_{00} ist die Energie des HOMO-LUMO-Übergangs, die aus Absorptions- und Fluoreszenzspektren (vgl. dazu Kapitel 3.1.2) entnommen werden kann. In Abb. 3-6 ist die graphische Bestimmung der Singulett-Energie E_{00} von 1PydU (**24**, Struktur vgl. Abb. 3-4) gezeigt. Die Änderung der *Coulomb*-Energie ist meist gering und wird daher $C=0$ gesetzt.



$$E_{00} = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

mit h: Plancksches Wirkungsquantum

c: Lichtgeschwindigkeit

λ : Schnittpunkt aus Absorption und Emission von **24**

Abb. 3-6: Graphische Bestimmung des Schnittpunkts zwischen Absorption und Fluoreszenz von **24**. Spektren sind normiert.

Abhängig vom jeweiligen Ladungstransfer gilt für die Potentiale des angeregten Zustands des Donors (Do):

$$E_{red}^*(Do) = E_{red}(Do) + E_{00} \quad \text{für den oxidativen Lochtransfer (HT: hole transfer)}$$

$$E_{ox}^*(Do) = E_{ox}(Do) - E_{00} \quad \text{für den reduktiven Elektronentransfer (ET: electron transfer)}$$

Unter Verwendung dieser beiden Gleichungen ergeben sich für die *Rehm-Weller*-Abschätzung folgende Gleichungen:

$$\Delta G_{HT} = e[E_{ox}(Ak) - E_{red}^*(Do)] \quad \text{Gleichung 3-3}$$

$$\Delta G_{ET} = e[E_{ox}^*(Do) - E_{red}(Ak)] \quad \text{Gleichung 3-4}$$

3.1.1.1 Oxidativer Ladungstransfer

Wegen der biologischen Relevanz konzentrierte sich das Interesse zu Beginn der Studien 1986 (*Fromherz et al.* ^[52]) auf den oxidativen Lochtransfer. Zunächst wurden die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen gemäß der *Marcus*-Theorie ^[53] gedeutet. Demnach erfolgt der Ladungstransfer in einem Schritt vom Ladungsdonor (Do) zum Akzeptor (Ak), ohne dass die Ladung auf einer dazwischen liegenden DNA-Base lokalisiert ist. Dieser Prozess wird auch als Superaustausch bezeichnet.

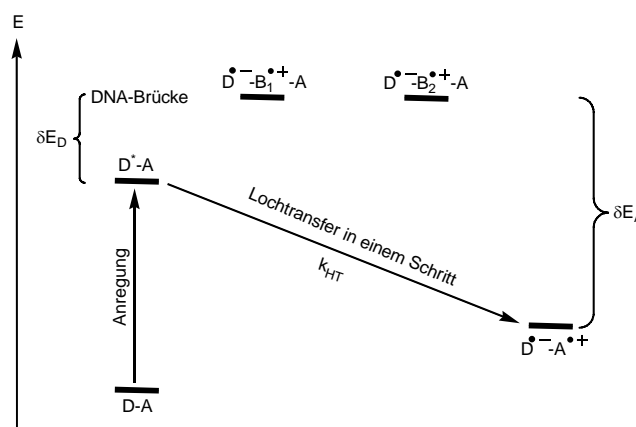


Abb. 3-7: Schematische Darstellung des Superaustausch-Mechanismus beim oxidativen Lochtransfer. Die Ladung wird vom Donor (Do) zum Akzeptor (Ak) in einem Tunnelprozess übertragen. **B** bezeichnet Nucleobasen des dazwischen liegenden Basenstapels.

Die Rate des Lochtransfers nach dem Superaustausch ist exponentiell von der Entfernung R zwischen Donor und Akzeptor abhängig. Sie berechnet sich nach *Marcus-Levich-Jortner* zu:^[53]

$$k_{HT} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{V^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(-\frac{-(\Delta G_{ET} + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad \text{Gleichung 3-5}$$

- mit: k_{HT} Ratenkonstante des Ladungstransfers
 V^2 Matrixelement der elektronischen Kopplung zwischen Donor und Akzeptor
 λ Reorganisationsenergie
 k_B Boltzmann-Konstante
 T absolute Temperatur
 ΔG_{ET} Triebkraft des Elektronentransfers

Das Matrixelement der elektronischen Kopplung verändert sich exponentiell mit dem Abstand R zwischen Donor und Akzeptor:

$$V^2 = V_0^2 \cdot e^{-\beta \cdot R} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

- Mit V_0^2 Maximalwert von V^2
 β Proportionalitätsfaktor
 R Abstand zwischen Donor und Akzeptor

Aus diesen beiden Gleichungen ergibt sich die Abstandsabhängigkeit der Ladungstransferrate:

$$k_{HT} \propto e^{-(\beta \cdot R)} \quad \text{Gleichung 3-7}$$

β ist der kritische Parameter, der die Abstandsabhängigkeit des oxidativen Lochtransfers bestimmt. β ist abhängig von den Eigenschaften der Brücke B und deren Kopplung mit Donor und Akzeptor. Für den Lochtransfer in DNA wurde eine große Spannweite von Werten

zwischen $\beta < 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ und $\beta = 1,5 \text{ \AA}^{-1}$ ermittelt. Eine Zusammenfassung wichtiger spektroskopischer Studien gibt Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1: Übersicht der wichtigsten spektroskopischen Experimente zum oxidativen Ladungstransfer in DNA.

Ladungsdonor/ Ladungsakzeptor	$\beta [\text{s}^{-1}]$	$k_{CT} [\text{s}^{-1}]$	Arbeitsgruppe	Jahr
Et / MV	-	10^5	Fromherz ^[52]	1986
Et / MV, Ac / DAP	1,0	10^8	Harriman ^[54]	1992
Ru(II) / Rh(III) Komplexe	0,2	10^9	Barton ^[55]	1993
Ru(II) / Rh(III) Komplexe	1,0 – 1,5	10^6	Meade ^[56]	1995
St / G	0,64	$10^8 - 10^{12}$	Lewis/Wasielewski ^[57]	1997
Et / Rh(III) Komplex	0	10^{10}	Barton ^[58]	1997
Ac / G	1,4	$10^5 - 10^{10}$	Tanaka ^[59]	1998
Et / Z	-	10^{12}	Barton/Zewail ^[18]	1999
Ap / G	0,1 – 1,0	$10^9 - 10^{10}$	Barton/Zewail ^[60, 61]	1999
Ap / G	0,75	$10^6 - 10^7$	Shafirovich ^[62]	2000
Ap / G	0,6	$10^9 - 10^{11}$	Barton/Zewail ^[61]	2000
Ac / G, Ac / Z	0,8 – 2,0	$10^7 - 10^{12}$	Michel-Beyerle ^[63]	2001
Py / G, Ptz / G	0,2 – 0,3	10^4	Majima/Kawai ^[64]	2002
Ru(II) Komplex / Me-In	-	$\geq 10^7$	Barton ^[65]	2002
St / Sto	0,4	10^8	Lewis/Wasielewski ^[66]	2004
Et / Z	0,4	$10^{10} - 10^{11}$	Fiebig/Wagenknecht ^[20]	2006

Abkürzungen: **Ac** = Acridin, **Ap** = 2-Aminopurin, **DAP** = *N,N'*-Dimethyl-2,7-diazapyren, **Et** = Ethidium, **G** = Guanin, **Me-In** = 4-Methylindol, **MV** = Methylviologen, **Ptz** = Phenothiazin, **Py** = Pyren, **St** = Stilbendicarboxamid, **Sto** = Stilbenether, **Z** = 7-Deazaguanin.

Aufgrund der Ergebnisse aus Experimenten zum weitreichenden Ladungstransfer, die eine deutlich geringere Distanzabhängigkeit ergaben, musste das Modell vom Superaustausch überarbeitet werden. *Giese et al.* und *Jortner et al.* schlugen als Alternative den Hopping-Mechanismus vor (Abb. 3-8).^[67, 68] Der Unterschied zum Superaustausch besteht darin, dass die Ladung vom Donor zum Akzeptor über intermediäre Ladungsträger wandert. Aufgrund der Oxidationspotentiale der DNA-Basen, für die die Reihenfolge $E_{ox}(G/G^{*+}) < E_{ox}(A/A^{*+}) < E_{ox}(C/C^{*+}) \approx E_{ox}(T/T^{*+})$ ermittelt wurde,^[69, 70] ist das Guaninradikalkation G^{*+} der wahrscheinlichste intermediäre Ladungsträger. Der kritische Faktor in diesem Modell ist die Anzahl der dazwischen liegenden Hopping-Schritte. *Lewis et al.* konnten die Rate $k_{HOP(G)}$ für

oxidativen Ladungstransfer von einem G auf GG bestimmen. Sie liegt bei $k_{\text{HOP}(\text{G})} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$.^[71]

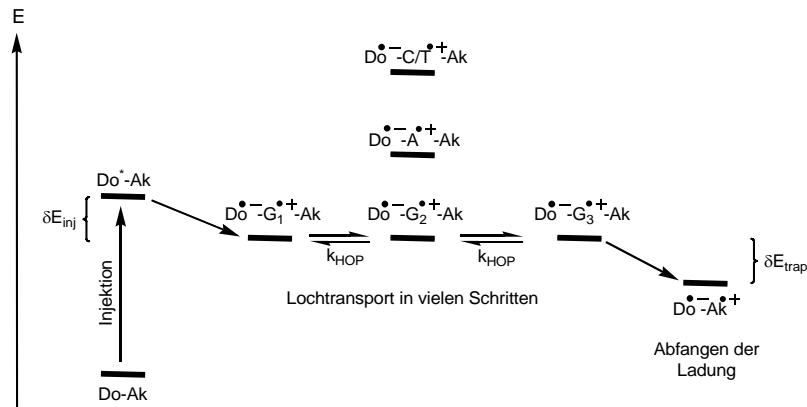


Abb. 3-8: Schematische Darstellung des *G-Hopping*-Mechanismus beim oxidativen Lochtransport. Die Ladung wird vom Donor (Do) zum Akzeptor (Ak) in mehreren Schritten über intermediäre Ladungsträger (G^+) übertragen.

Giese et al. zeigten, dass Ladungstransfer auch über längere AT-Sequenzen ($n = 4, 5$) stattfinden kann, was mit dem *G-Hopping*-Mechanismus nicht erklärt werden.^[72] Sie postulierten daher, dass das *Hopping* auch über Adenine bzw. Adeninradikalkationen A^+ möglich ist.^[73]

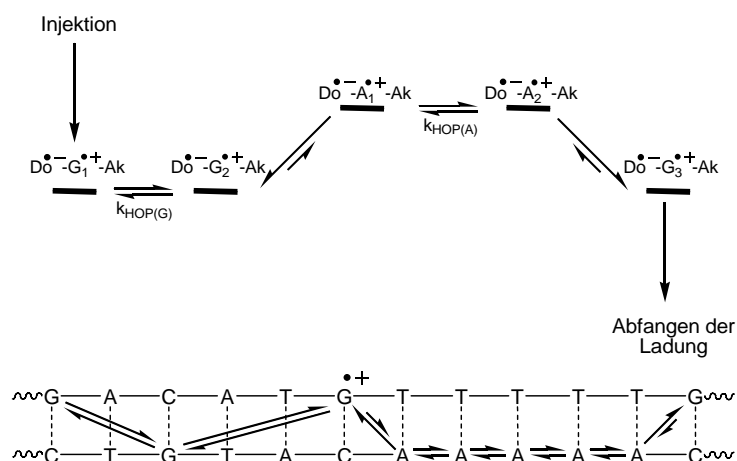


Abb. 3-9: Schematische Darstellung des Lochtransfers nach dem Hopping-Mechanismus über Guanine und Adenine. Die Ladung wird vom Donor (Do) zum Akzeptor (Ak) in mehreren Schritten über intermediäre Ladungsträger G^+ und A^+ übertragen.

Die Rate für einen *A-Hopping*-Schritt konnte zu $k_{\text{HOP(A)}} = 10^{10} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.^[74] Damit verläuft *A-Hopping* schneller und effizienter als *G-Hopping*. Die Rate k_{HOP} des *Hopping*-Mechanismus ist nur wenig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängig.

Die strenge Unterscheidung zwischen Superaustausch- und *Hopping*-Mechanismus kann nicht als eine Eigenschaft des entsprechenden Donor-Akzeptor-Systems angesehen werden. Vielmehr scheint es so zu sein, dass Ladungstransfer über kurze Distanzen in den meisten Systemen nach dem Superaustausch-Prinzip,^[75] weitreichender Ladungstransfer nach dem *Hopping*-Mechanismus verläuft.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Flexibilität und Dynamik der DNA in den Modellen berücksichtigt werden muss, da effizienter Ladungstransfer über längere Distanzen nur auf einer Zeitskala möglich ist, in der sich auch die Bewegung der Nucleobasen im Basenstapel vollzieht.^[18] Der Ladungstransfer scheint nur dann abzulaufen, wenn die Orbitale der dazwischen liegenden DNA-Basen gerade optimal überlappen. Dieser Vorgang wird als „*base gating*“ bezeichnet^[18, 76] und gilt sowohl für den oxidativen als auch reduktiven Ladungstransfer.

3.1.1.2 Reduktiver Elektronentransfer

Beim reduktiven Ladungstransfer injiziert der Ladungsdonor ein Elektron in den Basenstapel, das von entsprechenden Akzeptoren abgefangen wird. Dabei muss der Akzeptor ein geeignetes Reduktionspotential aufweisen. Mittlerweile wurden die Mechanismen des oxidativen Lochtransfers auf die Wanderung des Überschusselektrons im reduktiven Ladungstransfer übertragen. Für den Transfer über weite Distanzen wurde der *Hopping*-Mechanismus vorgeschlagen.^[77] Aufgrund der von *Seidel et al.* publizierten Reduktionspotentiale der Nucleobasen in der Reihenfolge $E_{\text{red}}(\text{T/T}^{\bullet-}) \approx E_{\text{red}}(\text{dU/dU}^{\bullet-}) \approx E_{\text{red}}(\text{C/C}^{\bullet-}) < E_{\text{red}}(\text{A/A}^{\bullet-}) < E_{\text{red}}(\text{G/G}^{\bullet-})$ ^[69] ist anzunehmen, dass die Pyrimidinradikalanionen $\text{T}^{\bullet-}$ und $\text{C}^{\bullet-}$ als intermediäre Elektronenträger fungieren.^[77] Es wird daher angenommen, dass bei diesem Elektronen-*Hopping* alle Basenpaare, also –TA– und –CG–, involviert sind.

Erste Erkenntnisse zum reduktiven Elektronentransfer wurden aus γ -Puls-Radiolyse-Studien durch *Sevilla* und *Anderson* gewonnen.^[78-86] Die Proben wurden γ -Strahlung ausgesetzt, wodurch solvatisierte Elektronen erzeugt wurden, die in der Lage sind, DNA zu reduzieren. Als Elektronenakzeptoren wurden polykondensierte Aromaten, Acridine und Chinoline verwendet, die an zufälligen Stellen in native DNA interkalieren. Die Abnahme der Signalintensität des primär entstehenden Nucleobasenradikalanions und die Zunahme des Signals des durch Ladungstransfer entstehenden Interkalatorradikals können mit ESR-Spektroskopie verfolgt werden. Der Nachteil dieses Experiments besteht darin, dass weder die Elektroneninjektion noch das Abfangen der Ladung an definierten Stellen erfolgen können. Daher sind Aussagen über den Mechanismus des reduktiven Ladungstrfers nur sehr eingeschränkt möglich.

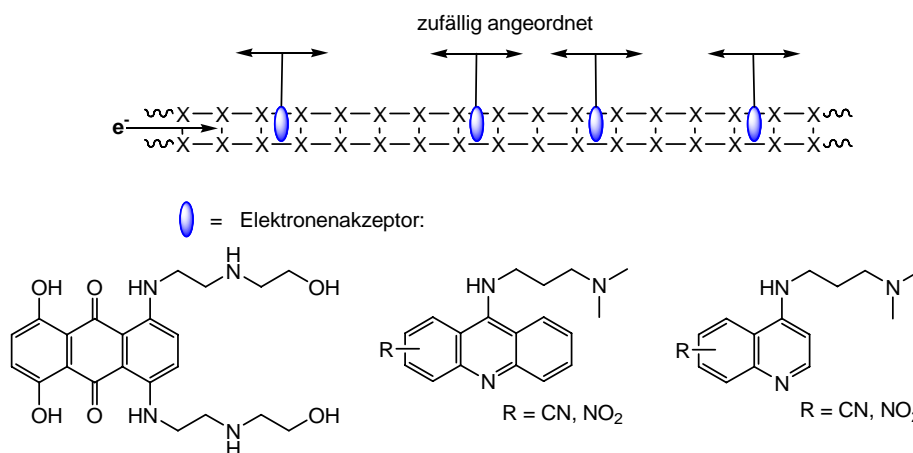


Abb. 3-10: Aufbau eines typischen γ -Puls-Radiolyse-Experiments mit den verwendeten Elektronenakzeptoren.

Ergebnisse aus Tieftemperaturmessungen DNA-haltiger Gläser deuten auf einen Tunnelprozess nach dem Superaustausch-Mechanismus hin.^[78-81] Der β -Wert liegt zwischen $\beta = 0,8$ und $\beta = 1,2 \text{ \AA}^{-1}$. Dies deckt sich mit theoretischen Berechnungen und liegt im Bereich der Leitfähigkeit von Proteinen. In Lösung bzw. bei höherer Temperatur wird aufgrund der gemessenen Transferraten und Reichweiten angenommen, dass der Elektronentransfer nach dem *Hopping*-Mechanismus verläuft.

Zur weiteren Erforschung von Elektroneninjektion und reduktivem Elektronentransfer wurden bereits Flavin (**FI**),^[87, 88] Naphthalendiamin (**Nd**),^[89, 90] Stilbendiether (**SbE**),^[91] das

Thyminderivat **Tx** [92, 93], Phenothiazin-dU (**PtzdU**) [94] und die pyrenmodifizierten Uridine **PydU** [95, 96] und **PedU** [97] als photoanregbare Elektronendonoren kovalent an Oligonucleotide gebunden. Die Redox Eigenschaften der Chromophore unterscheiden sich sehr deutlich. Eine Übersicht gibt Abb. 3-11. Während **Fl** und **Nd** im angeregten Zustand in der Lage sind, alle natürlichen Nucleobasen außer G zu reduzieren, können **Tx**, **PtzdU**, **PydU** und **PedU** nur auf die Pyrimidinbasen C und T Elektronen übertragen.

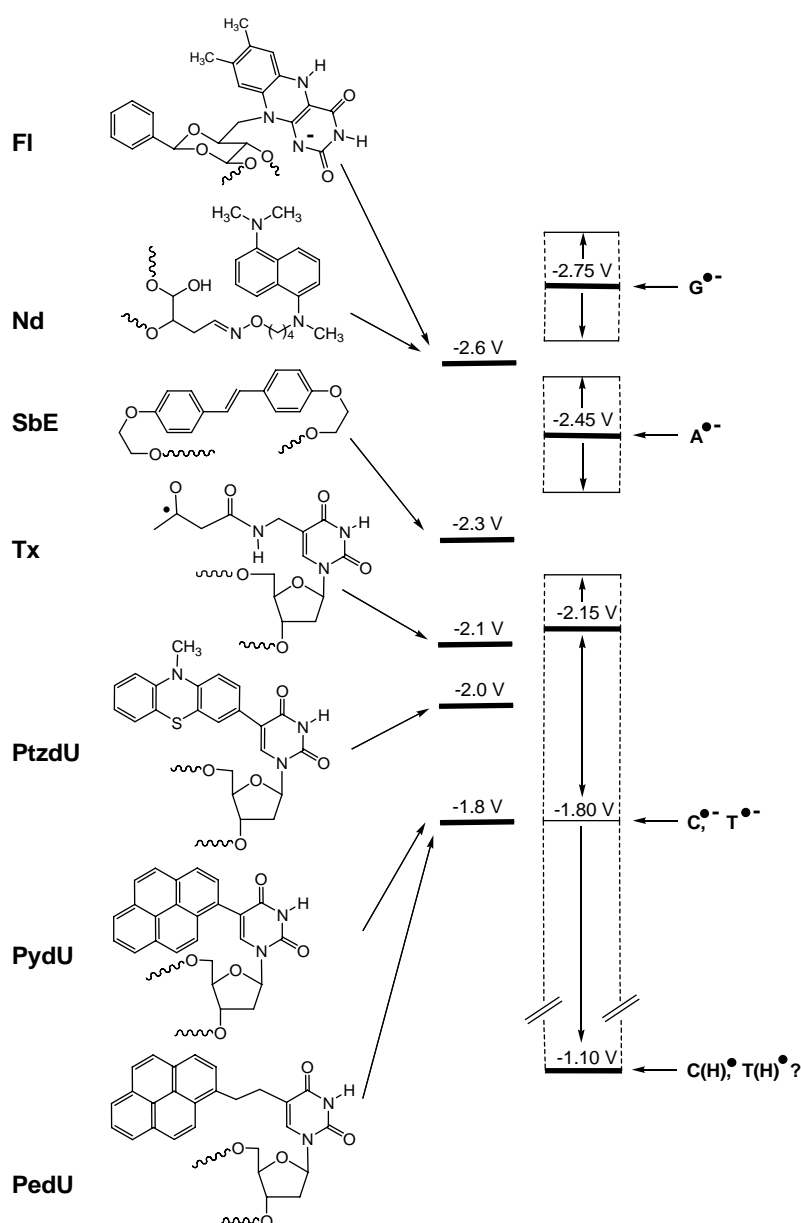


Abb. 3-11: Übersicht über verschiedene Ladungsinjektoren zur Auslösung des reduktiven Elektronentransfers in DNA.

Die biologische Relevanz des reduktiven Elektronentransfers konnte, wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, von *Barton et al.* in Basenexzisions-Reparaturprozessen nachgewiesen werden.^[27-29] Sie untersuchten das Basenexzisions-Reparaturenzym *MutY* aus *E.coli*,^[98] das Fehlpaarungen von Adenin mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-dG, vgl. Abb. 3-18 und Abb. 3-19) oder Guanin korrigiert. *MutY* beinhaltet redoxinaktive $[4Fe4S]^{2+}$ -Cluster, wenn es ungebunden in der Zelle vorliegt. Durch unspezifische Bindung an die DNA ändert sich das Redoxpotential, so dass der Cluster zu $[4Fe4S]^{3+}$ oxidiert werden kann. $[4Fe4S]^{3+}$ gibt ein Elektron in den DNA-Stapel ab und induziert somit reduktiven Elektronentransfer. Aufgrund dieses Ladungstransfers kann ein weiteres gebundenes Enzym reduziert werden, das anschließend aufgrund geringerer Affinität von der DNA abdissoziiert. Im beschädigten DNA-Duplex kann der reduktive Elektronentransfer nicht stattfinden. Dadurch bleibt das Enzym an der DNA gebunden, die Sequenz kann nach fehlerhaften Basenpaarungen abgefragt und Reparaturmechanismen eingeleitet werden.

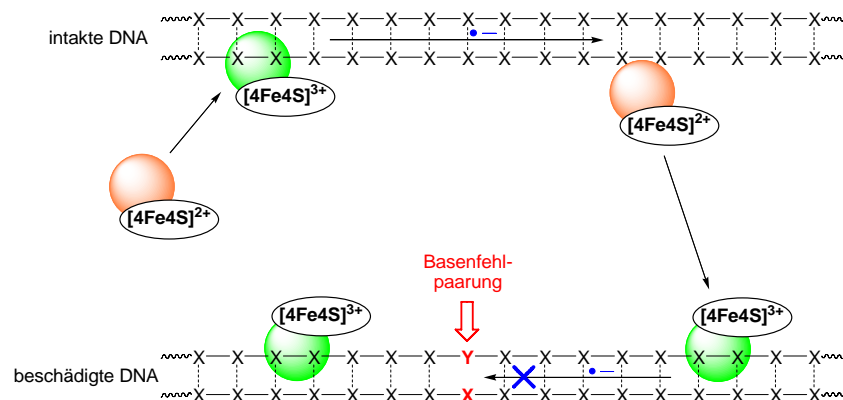


Abb. 3-12: Reduktiver Elektronentransfer in der Basenexzisions-Reparatur mit *MutY*.

Wie bereits erwähnt, sind für den reduktiven Ladungstransfer keine Folgereaktionen in der DNA unter natürlichen Bedingungen bekannt. Die Anwendungsmöglichkeiten dieses Prozesses liegen vor allem in der DNA-Chiptechnologie und Nanotechnologie.^[99-107]

3.1.2 Spektroskopische Methoden: UV/Vis-, Fluoreszenz- und zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie

Mit spektroskopischen Methoden kann man einfach und effizient die elektronischen Eigenschaften eines Systems überprüfen. In dieser Arbeit werden zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen durch Oligonucleotide hauptsächlich die UV/Vis-, Fluoreszenz-, sowie die zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie angewendet. Eine weitere optische Methode stellt die CD-Spektroskopie dar. Sie dient zur schnellen Strukturinformation über DNA-Systeme, liefert aber keine exakte Aussage. Hierzu wären NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie nötig.

Durch Absorption eines Lichtquants der richtigen Frequenz wird ein Molekül in einen energetisch höheren Zustand angeregt, aus dem es durch verschiedene Prozesse wieder in den Grundzustand relaxieren kann. Der Elektronenübergang erfolgt vertikal, d.h. ohne Änderung der Geometrie, nach dem *Franck-Condon-Prinzip*.^[108, 109] Für die UV/Vis-Spektroskopie sind besonders die $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, sowie intramolekulare Ladungstransferübergänge aromatischer Moleküle interessant, da sich diese elektronischen Übergänge zum Teil im sichtbaren Bereich des Spektrums und im nahen UV (200 – 800 nm) anregen lassen.^[108] Während die Absorption mit 10^{-15} s sehr schnell ist, verlaufen die Relaxationsprozesse deutlich langsamer.

Der Übergang in den Grundzustand kann sowohl strahlend als auch strahlungslos erfolgen. Die strahlungslosen Prozesse laufen mit 10^{-14} - 10^{-12} s deutlich schneller als die strahlenden ab. Es handelt sich dabei um thermische Relaxation, bei der vibronische Energie freigesetzt wird. IC (*internal conversion*) verläuft unter Erhalt der Spinmultiplizität, ISC (*intersystem-crossing*, ST: Singulett-Triplett-Übergang) findet zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität statt.

Eine Relaxation unter Aussendung von Licht wird allgemein als Lumineszenz bezeichnet und verläuft auf einer langsameren Zeitskala als die strahlungslosen Prozesse. Dabei wird zwischen Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterschieden. Von Fluoreszenz wird gesprochen, wenn ein Elektronenübergang mit gleicher Spinmultiplizität erfolgt. Sie findet in ca. 10^{-12} s

statt und ist damit wesentlich schneller als die Phosphoreszenz, die einen spin-verbotenen Übergang aus dem Triplett- in den Singulettzustand ($T_1 \rightarrow S_0$) bezeichnet und innerhalb 10^{-4} - 10^{-9} s stattfindet.

Zwei Grundprinzipien der Fluoreszenz, die sich aus der Betrachtung des *Jablonski*-Diagramms (Abb. 3-13) ableiten lassen, sind die empirischen Regeln von *Kasha* ^[110] und *Stokes*.^[111] Nach *Kasha* erfolgt die Emission aus dem niedrigsten Schwingungszustand des niedrigsten angeregten Zustands. Nach der Regel von *Stokes* ist die Energie des emittierten Photons immer kleiner als die Energie des aufgenommenen Photons. Daher ist das Fluoreszenzspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu längeren Wellenlängen verschoben.

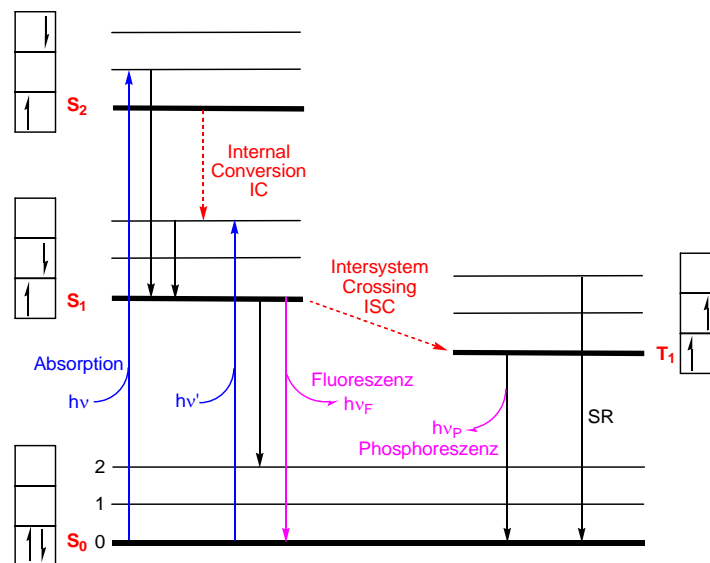


Abb. 3-13: Übersicht über die wichtigsten Anregungs- und Relaxationsprozesse (*Jablonski*-Diagramm):
 IC: *internal conversion*, ISC: intersystem crossing (Singulett-Triplett-Übergang, ST),
 S: elektronischer Singulett-Zustand, T: Triplett-Zustand, SR: Schwingungsrelaxation.

Die Fluoreszenzintensität ist von vielen Faktoren abhängig. Dazu zählen neben Lösungsmittelleffekten, der Temperatur und dem pH-Wert auch Konzentrationseffekte und die Anwesenheit wechselwirkender Fremdmoleküle. Zwei wichtige Charakteristika der Fluoreszenz eines Moleküls sind die Fluoreszenzlebenszeit τ_F und die Quantenausbeute Φ_F .

τ_F gibt die mittlere Fluoreszenzlebenszeit eines Moleküls im angeregten Zustand an und ist indirekt proportional zur Ratenkonstante der Fluoreszenzemission k_F .

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad \text{Gleichung 3-8}$$

Die Quantenausbeute Φ_F ist definiert als der Anteil der strahlenden Übergänge, mit der Ratenkonstante k_r , an der Summe aller strahlenden (*radiative*) und strahlungslosen (*non radiative*) Relaxationsprozessen, mit den Ratenkonstanten k_r und k_{nr} , des angeregten Chromophors. Experimentell wird sie durch die Messung der eingestrahnten und der emittierten Lichtintensität bestimmt.

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{I_{\text{emittiert}}}{I_{\text{eingestrahlt}}} \quad \text{Gleichung 3-9}$$

Üblicherweise wird die integrierte Fluoreszenzintensität eines Chromophors berechnet und ins Verhältnis zu einer Referenzsubstanz mit bekannter Quantenausbeute $\Phi_F(\text{Ref})$ gesetzt. Die Quantenausbeute Φ_F einer Verbindung lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\Phi_F = \Phi_F(\text{Ref}) \cdot \frac{A(\text{Ref}) \cdot n_D^2(\text{P}) \cdot F(\text{P})}{A(\text{P}) \cdot n_D^2(\text{Ref}) \cdot F(\text{Ref})} \quad \text{Gleichung 3-10}$$

- mit: Φ_F : Fluoreszenzquantenausbeute
 A: Absorption
 n_D : Brechungsindex des Lösungsmittels
 F: integrierte Fluoreszenz
 P: Probesubstanz
 Ref: Referenz

Bei einer hohen Fluorophor-Konzentration kommt es zu Aggregatzuständen, die neue Fluoreszenzeigenschaften aufweisen und somit die Lebenszeit τ und die Quantenausbeute Φ_F beeinflussen. Bildet sich eine Wechselwirkung zweier gleichartiger Moleküle im angeregten

Zustand aus, so spricht man von *Excimeren* (*excited dimers*) (Abb. 3-14, links). Ein Excimer zeichnet sich durch sehr starke Orbitalwechselwirkungen aus. Tritt allerdings ein Molekül im angeregten Zustand mit einem Molekül im Grundzustand in Wechselwirkung, so bildet sich ein sog. *Exciplex* (*excited state complex*) (Abb. 3-14, rechts). Innerhalb eines Exciplexes kann es bei ausreichend großer elektronischer Kopplung zu intramolekularen Ladungstransferreaktionen kommen. Es resultieren ladungstrennte Zustände $Do^{+\bullet}Ak^{\bullet-}$, die ihre Energie strahlungslos abgeben (vgl. dazu Kapitel 3.5, 4.4.1 und 5.1)

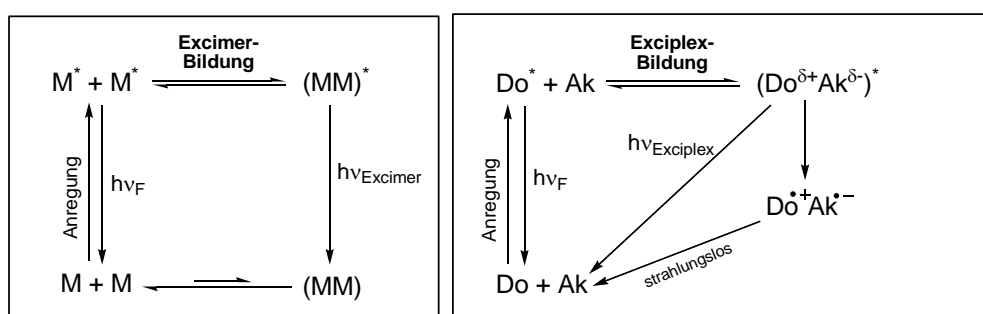


Abb. 3-14: links: Excimer-Bildung zwischen zwei gleichartigen Molekülen (M) im angeregten Zustand; rechts: Exciplex-Bildung zwischen einem Molekül im angeregten Zustand (Do^*) mit einem anderen Molekül im Grundzustand (Ak). Bei vollständigem Ladungstransfer kommt es zu ladungstrennten Zuständen $Do^{+\bullet}Ak^{\bullet-}$, die ihre Energie strahlungslos abgeben.

Ladungstransferreaktionen können sowohl intra- als auch intermolekular stattfinden und verringern die Fluoreszenzlebenszeit τ_F sowie die Quantenausbeute Φ_F des Donor-Fluorophors. Sie werden daher auch als Löschprozesse (*Quenching*) bezeichnet. Die Geschwindigkeitskonstante k_{CT} des Ladungstrfers kann durch zeitaufgelöste Messungen aus der mittleren Fluoreszenzlebenszeit τ_F des angeregten Zustands eines fluoreszenten Donors in Gegenwart eines Akzeptors bestimmt werden. τ_{F0} ist die Fluoreszenzlebenszeit des angeregten Zustands des Donors ohne Akzeptor.

$$k_{CT} = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F0}} \quad \text{Gleichung 3-11}$$

Mittels zeitaufgelöster Transientenabsorptionsspektroskopie ist es möglich, die Absorption von kurzlebigen Chromophorspezies abzufragen. Dabei können Absorptions- und

Relaxationsprozesse verfolgt werden. Durch einen kurzen Laserpuls der entsprechenden Wellenlänge wird der zu untersuchende Chromophor angeregt (*pump*, Abb. 3-15, rot). Absorptionsänderungen werden durch weitere Laserpulse, die in definierten Zeitabständen die Probe durchstrahlen, abgefragt (*probe*, Abb. 3-15, blau). Durch die Abfrage der Absorption des Grundzustands (*reference*, Abb. 3-15, violett) kann die Repopulationsrate dieses Zustands bestimmt werden. Man erhält Aussagen über die Rate des Rückladungstransfers und der Lebenszeit des angeregten Zustands.

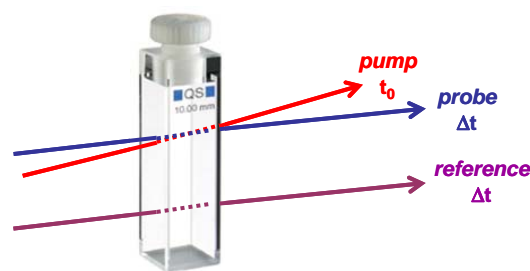


Abb. 3-15: Schematische Darstellung einer zeitaufgelösten Transientenabsorptions-Messung.

Durch den *pump*-Puls entstandene intermediäre Zustände können durch die Absorption des *probe*-Pulses detektiert werden. Prinzipiell kann, je nach Wellenlänge des *probe*-Pulses, die Besetzungswahrscheinlichkeit jedes beliebigen Zustandes abgefragt werden (Abb. 3-16). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Abfrage mit einem Weißlichtkontinuum durchgeführt. So konnten gleichzeitig sämtliche Wellenlängen detektiert werden.

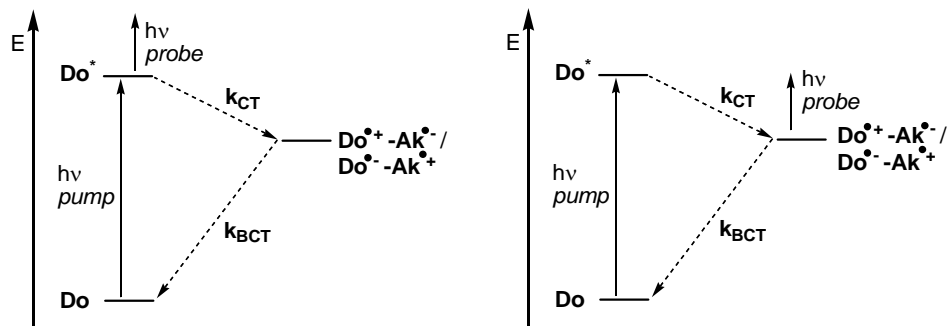


Abb. 3-16: Anregung (*pump*) des Ladungsdonors Do und Abfrage (*probe*) beliebiger Zustände durch zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie. Erläuterungen: k_{CT} : Rate des Ladungstransfers, k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

3.2 Biologische Relevanz von Ladungstransferreaktionen in DNA

Viele Schäden am Erbgut entstehen durch das Auftreten radikalischer Ladung in der DNA. Diese Radikale können durch verschiedene Faktoren, wie Bestrahlung (Röntgen, UV), Sauerstoff- und organische Radikale, erzeugt werden.^[25]

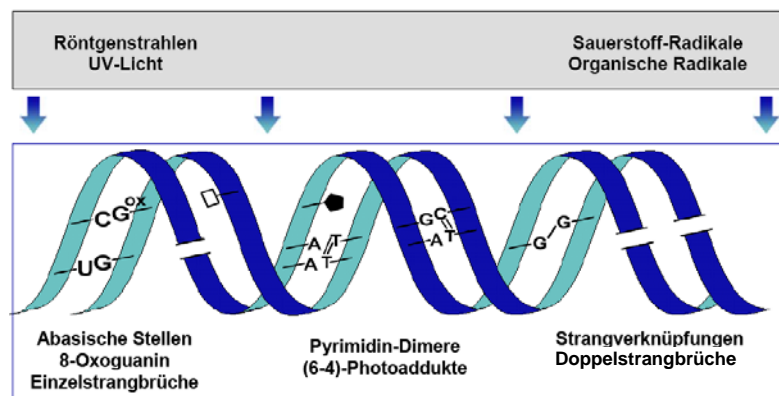


Abb. 3-17: Übersicht über die wichtigsten DNA-Schäden.

Ein wichtiges Intermediat bei radikalischen DNA-Schädigungen ist das Guaninradikalkation $G^{\bullet+}$. Dieses führt durch Reaktionen mit Wasser oder Sauerstoff zur Bildung von oxidativen Guaninschäden (G^{ox}).^[112, 113] Viele Oxidationsprodukte des Guanins konnten identifiziert werden und einige wichtige sind in Abb. 3-18 zusammengefasst.

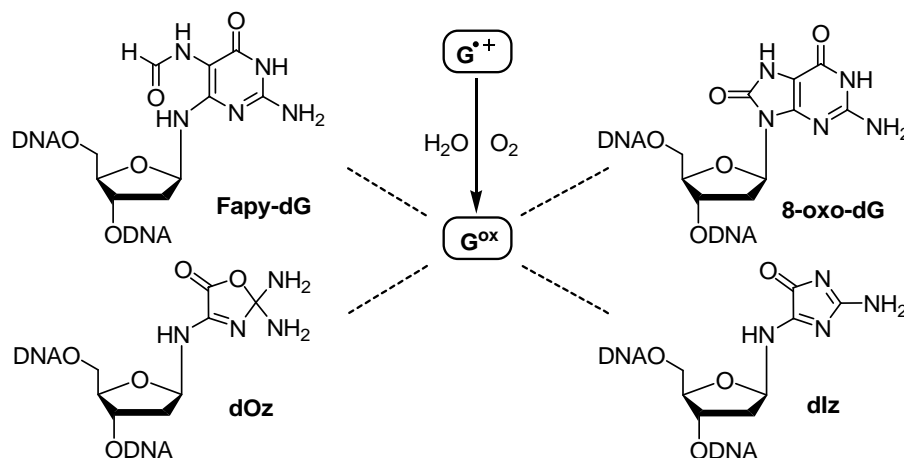


Abb. 3-18: Übersicht über die wichtigsten Oxidationsprodukte des Guanins (G^{ox}). Erläuterungen: Fapy-dG: 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin, 8-oxo-dG: 8-Oxo-7,8-dihydroguanin, dOz: Oxazolone, dlz: Imidazolone.^[112-114]

Als Beispiel soll hier 8-oxo-dG erläutert werden,^[26] durch dessen Bildung sich das Konformerengleichgewicht verschiebt. Es ergibt sich ein Gemisch aus *anti*- und *syn*-ständigem 8-oxo-dG. Liegt 8-oxo-dG in der *anti*-Konformation vor, so paart es wie G mit C. Kommt es allerdings zu einer Konformationsänderung in die *syn*-Form, wird ein *Hoogsteen*-Basenpaar mit A gebildet. Während der folgenden Replikation kommt es zu einer Mutation, da das ursprüngliche GC-Paar durch ein AT-Paar ausgetauscht wird (vgl. Abb. 3-19).

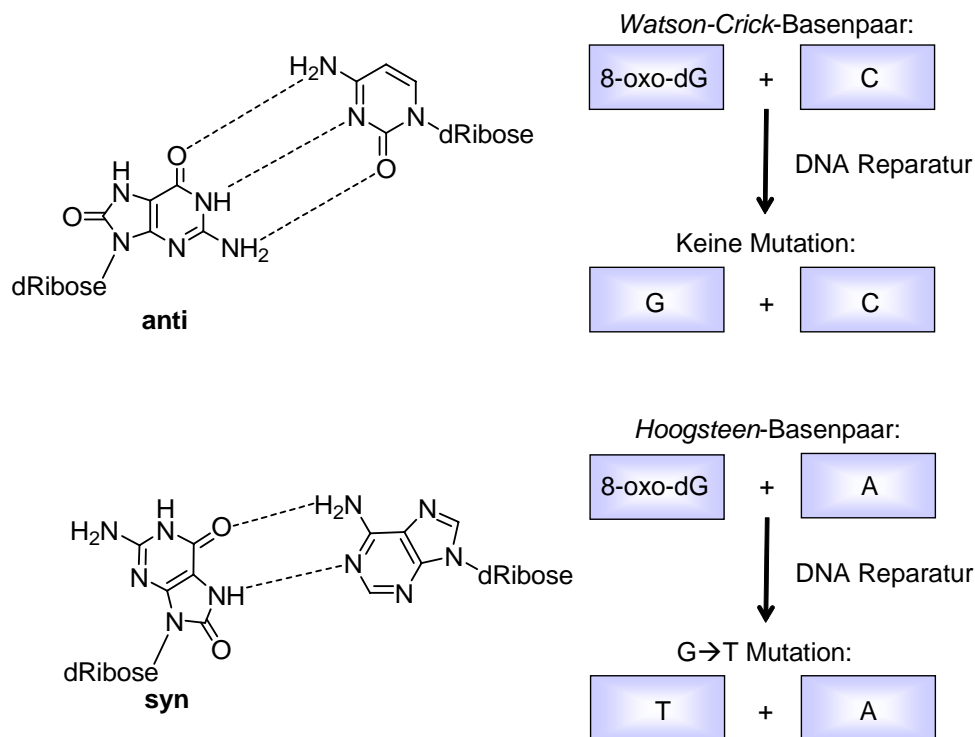


Abb. 3-19: Schematische Darstellung einer durch G-Oxidation ausgelösten Mutation von –GC– nach –TA–.

Carell et al. konnten diese Mutation mittels Kristallstrukturen während der einzelnen Replikationsschritte von oxidativ geschädigter DNA eindeutig nachweisen.^[115] In ihren Untersuchungen zeigte sich, dass das mutagene *Hoogsteen*-Paar aus 8-oxo-dG und A während der Replikation ein intaktes TA-Paar imitieren (vgl. Abb. 3-20).

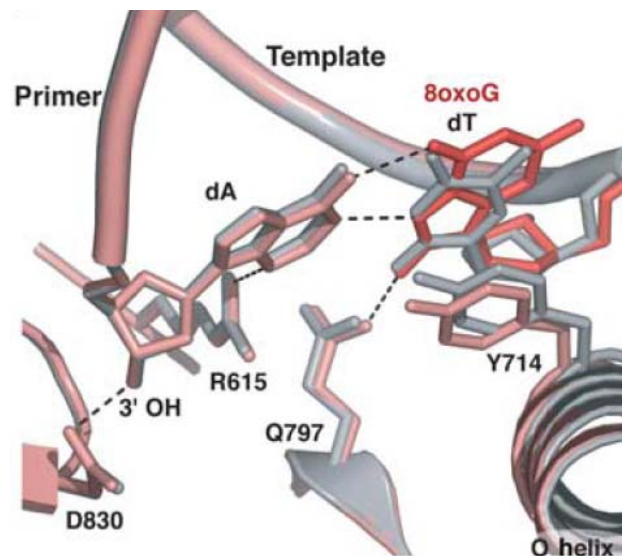


Abb. 3-20: Struktur der mutagenen 8-oxo-dG-Replikation (pink) überlagert mit Strukturen der normalen Replikation (grau) aus Arbeiten von *Carell et al.*^[115] Die „Fehlpaarung“ zwischen 8-oxo-dG und A imitiert ein reguläres AT-Paar.

Ein weiterer wichtiger DNA-Schaden, der vor allem in Folge von Bestrahlung mit UV B-Licht (280 nm bis 320 nm) durch Photoreaktionen entsteht, ist die Bildung von Pyrimidindimeren, die für die Entstehung von Hautkrebs verantwortlich sind. Über eine [2+2]-Cycloaddition werden Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), vor allem das T-T-Dimer, gebildet. Weniger häufig führt diese Reaktion auch zu C-T- und C-C-Dimeren. Des Weiteren kann auch das sog. 4,6-Photoprodukt über eine Paternò-Büchi-Reaktion entstehen. Derartige Photoschäden können durch prokaryontische DNA-Photolyasen bzw. im menschlichen Körper durch Basenexzisions-Reparatur behoben werden.

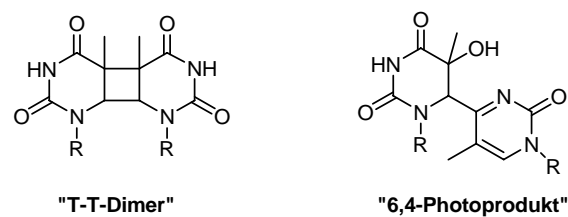


Abb. 3-21: Folgeprodukte aus Photoreaktionen in der DNA: T-T-Dimer (Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer) und das 6,4-Photoprodukt.

3.3 Tryptophan als biologische Sonde in Ladungstransferreaktionen

Proteine können den Ladungstransfer in DNA steuern, da sie fähig sind, Ladungen aus der DNA durch redoxaktive Seitenketten der Aminosäuren abzufangen. Als wichtigstes Beispiel ist hier die Aminosäure Tryptophan mit ihrer aromatischen Indolseitenkette zu nennen, aber auch Tyrosin ist in der Lage, als Ladungsakzeptor zu fungieren. Tryptophan besitzt mit $E_{\text{ox}}(\text{Trp}/\text{Trp}^{\bullet+}) = 1,0 \text{ V}$ ^[70, 116] ein geringeres Oxidationspotential als G ($E_{\text{ox}}(\text{G}/\text{G}^{\bullet+}) = 1,3 \text{ V}$) ^[70] und kann daher als peptidische Falle für den oxidativen Lochtransfer eingesetzt werden.^[117]

Tryptophan wurde bereits in Untersuchungen zum Ladungstransfer zwischen Oligonucleotiden und Peptiden verwendet. In Vorarbeiten der Gruppe *Barton et al.* wurde u. a. das kurze DNA-bindende Tripeptid Lys-Trp-Lys als Lochakzeptor verwendet.^[117, 118] Dieses Peptid lagert seine aromatische Seitenkette bevorzugt in AT-reiche Sequenzen ein.^[119, 120] Ein interkalierender Ru(II)-Komplex wurde *in situ* mittels Flash-Quench-Technik ^[121] zum Ru(III)-Komplex oxidiert, der seinerseits Lochtransfer in die DNA induziert. Sowohl die Bildung von Guanin- als auch von Tryptophanradikalkationen konnte durch transiente Absorptionsspektroskopie nachgewiesen werden. Oxidationsfolgeprodukte der beteiligten Radikalkationen wurden mittels Gelelektrophorese und HPLC analysiert.^[117, 118] Es gelang somit, radikalische Ladung über einen kovalent an ein Oligonucleotid angeknüpften Lochdonor von der DNA auf die aromatische Seitenkette der Peptide zu übertragen.

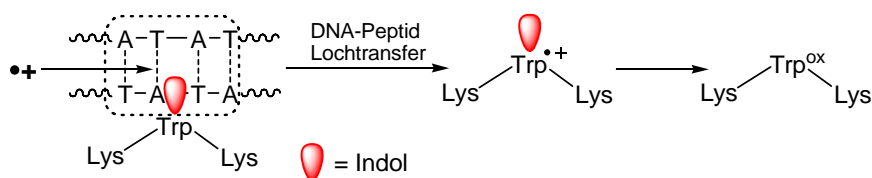


Abb. 3-22: Schematische Darstellung der Versuche von *Wagenknecht et al.* zum oxidativen Lochtransfer in DNA von einem Ru(III)-Komplex zu interkalierendem Tryptophan. Ru(III) injiziert ein Elektronenloch in den DNA-Basenstapel.^[117, 118]

Neben den Experimenten in wässrigen Puffersystemen wurden auch Studien an DNA-Protein-Komplexen durchgeführt. Besonders interessant sind die Untersuchungen mit der Cytosin-Methyltransferase *HhaI*.^[30, 122] *HhaI* ist ein sog. *base-flipping*-Enzym. Bei der Bindung an die DNA erkennt das Protein die Sequenz 5'-GCGC-3'.

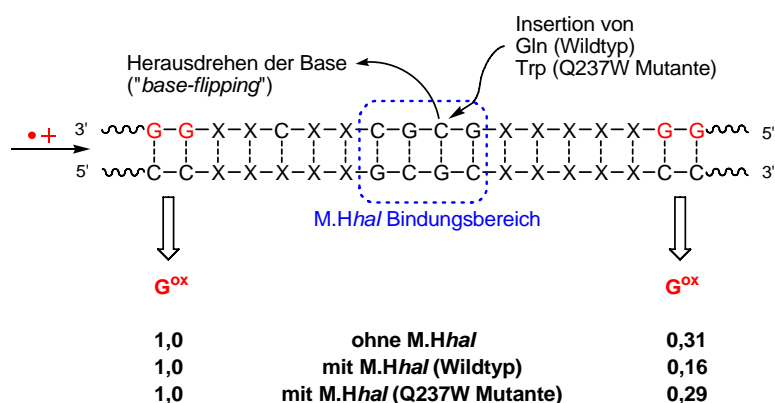


Abb. 3-23: Vergleich der Ladungstransfereffizienz in DNA ohne Zugabe von *HhaI*, unter dem Einfluss von Wildtyp *HhaI* und der Q237W-Mutante. Die Anzahl der Oxidationsereignisse in 5'-Richtung (Werte normiert gegen Anzahl der G^{ox} -Ereignisse in 3'-Richtung) korreliert mit der Ladungstransfereffizienz. G^{ox} : Oxidationsprodukte von G.

Es bildet sich ein DNA-Protein-Komplex, in dem das zu methylierende C aus dem Basenstapel herausgedreht wird. In das daraus resultierende Loch in der DNA insertiert die Seitenkette eines Glutamins (Gln). Durch diese Störung wird der oxidative Lochtransport durch den Basenstapel stark behindert, da die aliphatische Seitenkette des Glutamins keine π, π -Wechselwirkung mit den benachbarten Basen eingeht. Wird der Wildtyp *M.HhaI* allerdings durch die Mutante Q237W, die anstelle des Glutamins ein Tryptophan besitzt und dieses in die DNA schiebt, ersetzt, so findet wieder Ladungstransfer statt (Abb. 3-23). Das bedeutet, dass das planare aromatische Indol in den Basenstapel interkaliert und somit in der Lage ist, das C elektronisch zu ersetzen und sich am Ladungstransport zu beteiligen.

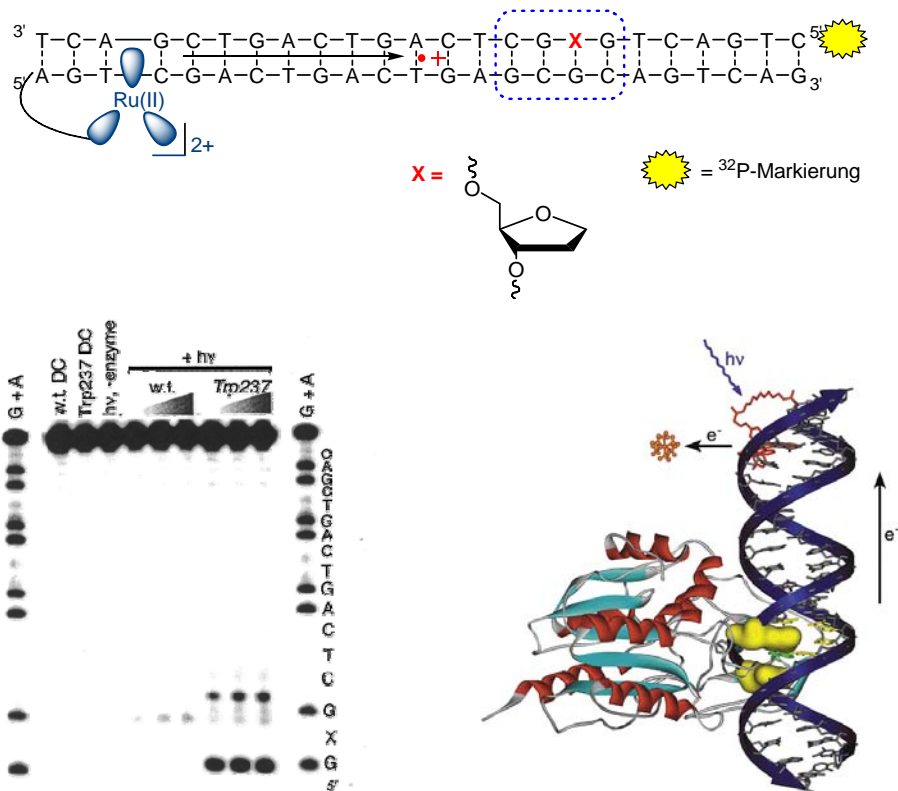


Abb. 3-24: oben: Experimente von *Wagenknecht et al.* zum Vergleich zwischen Wildtyp und Q237W-Mutante von *HhaI*; unten links: Gelelektrophoretische Untersuchung: w.t. = Wildtyp *HhaI*, Trp237 = Q237W-Mutante, DC = Dunkelreaktion; unten rechts: Schematische Darstellung des Protein-DNA-Komplexes.^[123]

Um genauere Aussagen über die Beteiligung des Tryptophans am oxidativen Ladungstransfer treffen zu können, wurden von *Wagenknecht et al.* weitere Experimente mit dem Enzym *M.HhaI* durchgeführt (Abb. 3-24). Gelelektrophoretische Untersuchungen mit der Q237W-Mutante von *HhaI* zeigten einen oxidativen Guaninschaden auf der 5'-Seite der Tryptophan-Interkalationsstelle, der in entsprechenden Experimenten mit dem Wildtyp nicht detektiert wurde.^[123] Vermutlich lokalisiert das interkalierte Tryptophan zusammen mit dem benachbarten G (3'-TrpG-5') die positive radikalische Ladung im DNA-Protein-Bindungsbereich und bildet dadurch eine bevorzugte Lochfalle für den oxidativen Ladungstransfer. In transienten Absorptionsmessungen konnten die resultierenden Guanin- und Tryptophanradikale, G^{\bullet} und Trp^{\bullet} , parallel detektiert werden.^[123]

In Arbeiten von *Mayer-Enthart et al.* wurde Tryptophan als Ladungsfalle in Strangbruchexperimenten mit PydU-modifizierten Oligonucleotiden untersucht (Abb. 3-25).^[124] Hierzu wurden DNA-bindende Peptide, die mit einem 4-Nitrobenzoat-Rest (Nb) modifiziert wurden, eingesetzt. Nb repräsentiert aufgrund seines geringen Reduktionspotential von $E_{\text{Red}}(\text{Nb}/\text{Nb}^{\bullet-}) = -0,46 \text{ V}$ ^[125, 126] eine Elektronen Falle, während Tryptophan wiederum als Lochfalle fungiert. War nur Nb, aber kein Tryptophan im DNA-bindenden Peptid enthalten, so traten unspezifische, oxidative Strangbrüche in Folge von G-Oxidation auf, da nur das Elektron, nicht aber die positive Ladung abgefangen werden konnte. Erst in Anwesenheit von Tryptophan und Nb konnten Strangbrüche vollständig verhindert werden.

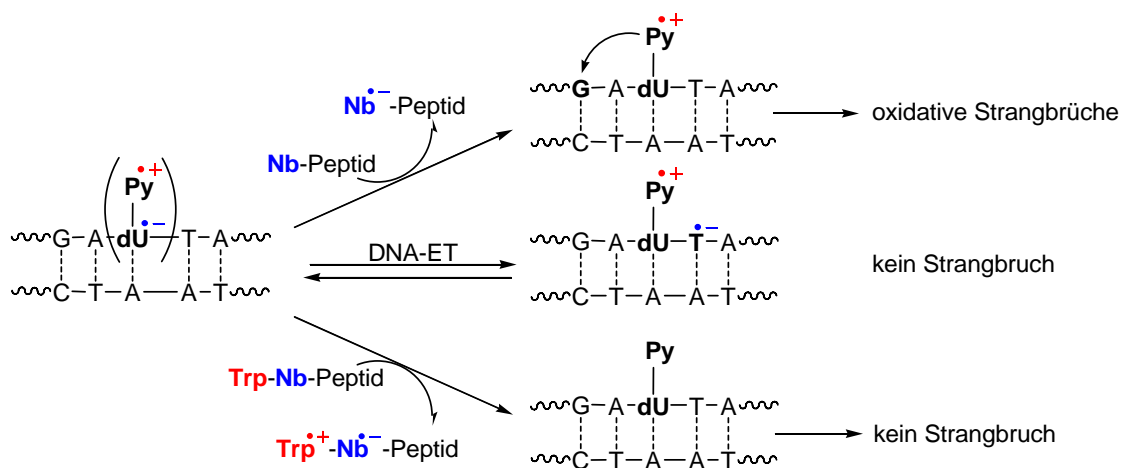


Abb. 3-25: Ladungstransferprozesse, die zwischen PydU-modifizierter DNA und Nb-modifizierten Peptiden auftreten.^[124]

Diese Untersuchungen zeigen, dass Tryptophan sehr gut als Lochfalle für Ladungstransferprozesse in der DNA geeignet ist. Die entscheidende Rolle spielt dabei die aromatische NH-Gruppe der Indolseitenkette, da sie die positive Ladung abfängt und anschließend sofort deprotoniert wird.^[65, 117, 118, 124]

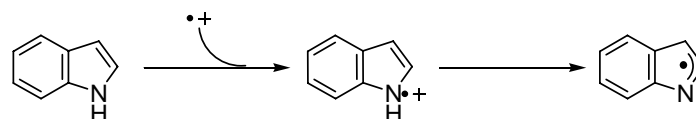


Abb. 3-26: Abfangreaktion des Radikalkations aus Ladungstransferprozessen durch Indol.

Die Gruppe *Kelley et al.* untersuchte in photoinduzierten Strangbruchexperimenten Konjugate aus Thiazolorange (TO) und Peptiden.^[127-130] TO wurde als photophysikalische Sonde gewählt, da es nur dann eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute zeigt, wenn es in DNA interkaliert ist. Unkomplexiert fluoresziert TO nicht.^[131, 132] Enthielten die Konjugate Tryptophan, so wurden nach Bestrahlung mit Licht Strangbrüche detektiert, während TO-Glycin-Konjugate keinen Effekt zeigten.^[127] Dabei war es unerheblich, ob TO und Tryptophan kovalent gebunden vorlagen. Lediglich die Anwesenheit von beiden Komponenten und die Bestrahlung mit Licht waren für die Reaktion notwendig. In Anwesenheit von Tyrosin konnten ebenfalls Strangbrüche detektiert werden, allerdings war die Effizienz der Reaktion deutlich geringer.

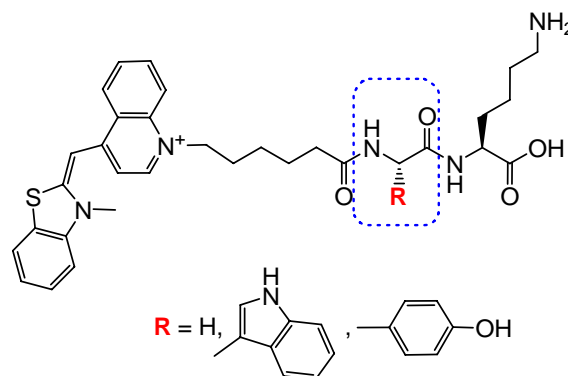


Abb. 3-27: TO-Peptid-Konjugate von *Kelley et al.* zur Untersuchung von photoinduzierten Strangbrüchen.

TO fungiert in diesem System als Photogenerator, der hochreaktiven Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ erzeugt. Aromatische Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin fangen diesen $^1\text{O}_2$ ab, indem sie Peroxide bilden,^[129, 133, 134] die einen sofortigen Strangbruch bewirken (Abb. 3-28).

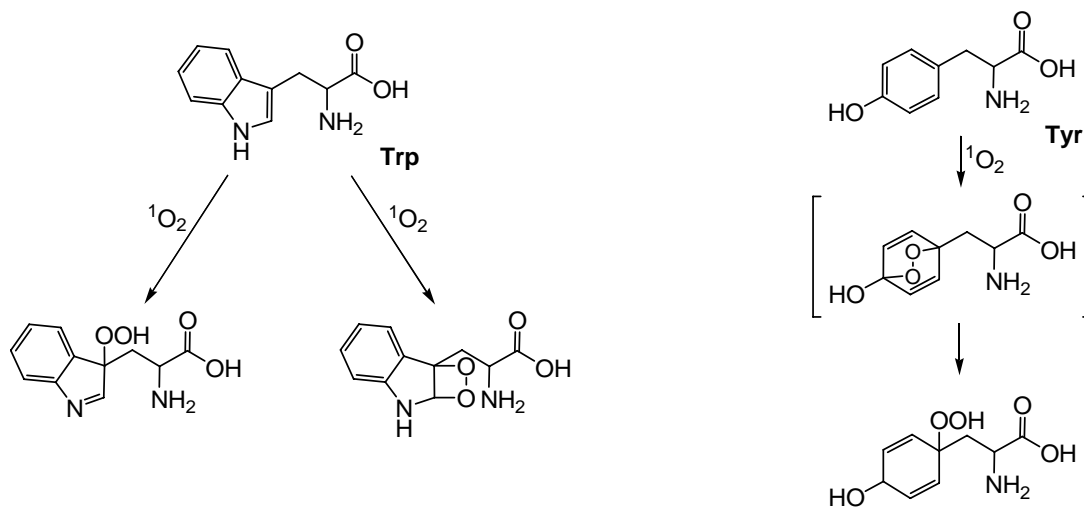


Abb. 3-28: Reaktionen von Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ mit Tryptophan ^[133] und Tyrosin. ^[134]

Tryptophan spielt neben den bereits vorgestellten Reaktionen auch in der Reparatur von DNA-Photoschäden eine wichtige Rolle. Die aus Photoreaktionen resultierenden Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) (Kapitel 3.2) können z. B. durch prokaryontische DNA-Photolyasen repariert werden. Photolyasen besitzen zwei stöchiometrische, nicht kovalent gebundene Cofaktoren. Der katalytisch redoxaktive Cofaktor ist Flavinadeninucleotid (FAD). Als zweiter Cofaktor wird entweder Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF) benötigt.^[135] Durch Bestrahlung wird FAD durch einen internen Elektronendonator in die katalyseaktive reduzierte Form FADH^- überführt. Dabei wurde angenommen, dass MTHF als Elektronendonator fungiert. *Sancar et al.* fanden allerdings heraus, dass das Elektron nicht durch MTHF,^[136, 137] sondern vielmehr durch ein Tryptophan übertragen wird.^[138, 139] Im Katalysezyklus konnte sowohl das Tryptophanradikal,^[140] als auch das -radikalkation ^[141] nachgewiesen werden. Durch Mutationsanalysen wurde Trp306 als Elektronendonator identifiziert.^[138] *Aubert et al.* postulierten aufgrund ihrer Untersuchungen an *E.coli*-DNA-Photolyasen folgenden Mechanismus für die Photoaktivierung (Abb. 3-29, links):^[142] Das photoangeregte Radikal (FADH^-)^{*} oxidiert Tryptophan 306 zum Radikalkation $\text{Trp306}^{+\bullet}$ und wird dabei vollständig zu FADH^- reduziert, welches dann in der Lage ist, Pyrimidin-Dimere zu spalten (Photoreparatur). Das Radikalkation $\text{Trp306}^{+\bullet}$ überträgt ein Proton auf das Lösungsmittel und bildet das stabile Radikal Trp306^\bullet , das anschließend durch externen Donoren (D) wieder reduziert wird.^[143] Das Elektron des Trp360 wird vermutlich in

drei Schritten über die beiden Tryptophane Trp359 und Trp382 zum FADH übertragen (Abb. 3-29, rechts).^[142]

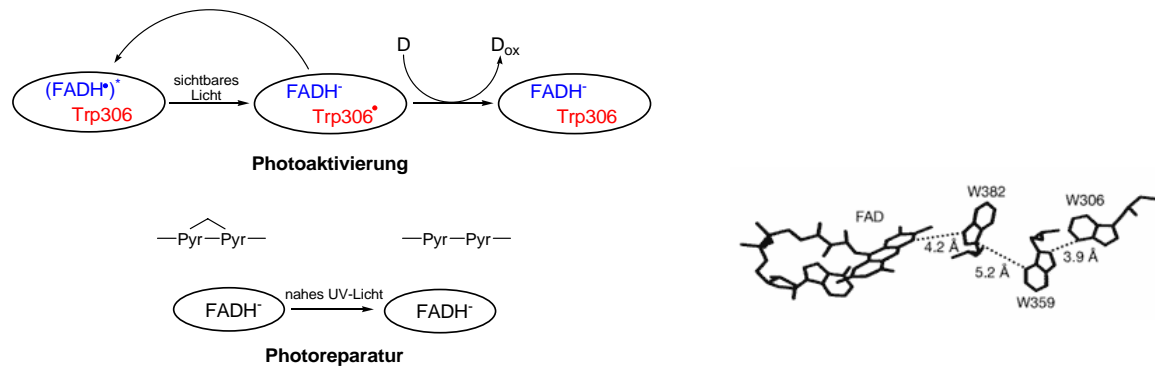


Abb. 3-29: links: Von *Aubert et al.* postulierter Mechanismus der Photoaktivierung von FADH durch Trp306, Erläuterung: D: externer Donor, Pyr: Pyrimidinbase in DNA; rechts: Elektronentransfer von Trp306 auf FADH in drei Schritten über Trp359 und Trp382.^[142]

In neueren Arbeiten von *Song et al.* wurden ebenfalls Photoschäden der Pyrimidinbasen, im speziellen das 6,4-Photoprodukt, untersucht.^[144] Als Modellsysteme wurden Thyminoxetanaddukte mit einer kovalent gebundenen Tryptophaneinheit synthetisiert (Abb. 3-30). Durch Bestrahlung bei $\lambda = 290$ nm wird das Photoprodukt gespalten. Die Reaktion kann mittels HPLC-Analytik beobachtet werden. Es wurde angenommen, dass die photoangeregte aromatische Indolkette in einer intramolekularen Elektronentransferreaktion die Spaltung des Oxetanaddukts induziert. Diese Annahme wurde durch Fluoreszenzdaten bestätigt. Aufgrund des Elektronentransfers ist die Emission der kovalent gebundenen Tryptophaneinheit im Vergleich zu freiem Tryptophan deutlich gelöscht.^[144]

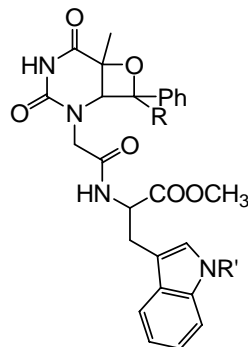


Abb. 3-30: Modellsystem von *Song et al.* zur Untersuchung der Spaltung eines 6,4-Photoprodukts mittels intramolekularem Elektronentransfers ausgehend von Tryptophan.^[144]

3.4 Ethidium als biochemische Sonde für Ladungstransferreaktionen

Die intensiv violett gefärbte Verbindung 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenantridiniumbromid, besser bekannt als Ethidiumbromid (**15**), dient in der Molekularbiologie zum Nachweis von DNA. In den 1950er Jahren begann die Nutzung verschiedener Derivate als Medikament in der Tiermedizin.^[145, 146] 1965 wurde herausgefunden, dass Ethidiumbromid an DNA binden kann.^[147] Dabei bindet es an vorgeschädigte („*bulged*“) DNA deutlich besser als an intakte DNA.^[148] *Schuster et al.* fanden in ihren Studien heraus, dass photoangeregtes Ethidiumbromid in solcher vorgeschädigten DNA irreversible Schäden hervorruft, die von DNA-Reparaturenzymen oft nicht mehr erkannt werden.^[149] Aufgrund seiner Eigenschaft als Interkalator wird Ethidiumbromid seit 1972 als Anfärbereagenz für DNA nach einer Gelelektrophorese in der Biologie und Biochemie angewendet.^[150]

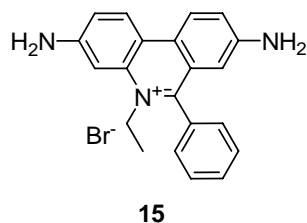


Abb. 3-31: Struktur von Ethidiumbromid (**15**).

Die Fluoreszenzintensität des Ethidiumchromophors steigt bei Interkalation in den Duplex stark an. *Le Pecq* und *Paoletti* begründeten diesen Effekt 1967 damit, dass interkaliertes Ethidium durch die hydrophobe Umgebung der DNA von wässrigem Lösungsmittel, das Fluoreszenzlöschung verursachen würde, abgeschirmt wird.^[151] *Burns* hingegen vermutete, dass die Fluoreszenzsteigerung durch eine Konformationsänderung des Chromophors bei der Interkalation auftritt. Durch solche Änderungen werden verbotene Übergänge teilweise erlaubt, was zu einer Erhöhung der Emission führt.^[152] *Olmsted* und *Kearns* untersuchten Lösungsmiteleinflüsse auf die Fluoreszenz des Ethidiums. Es zeigte sich, dass Fluoreszenz in nicht-wässrigen, unpolaren Lösungsmitteln deutlich schwächer als in polaren Lösungsmitteln gelöscht wird. In deuterierten Lösungsmitteln steigt die Emission an. Aufgrund ihrer Ergebnisse schlugen sie einen Protonen-Transfer-Mechanismus vor (Abb. 3-32).^[153]

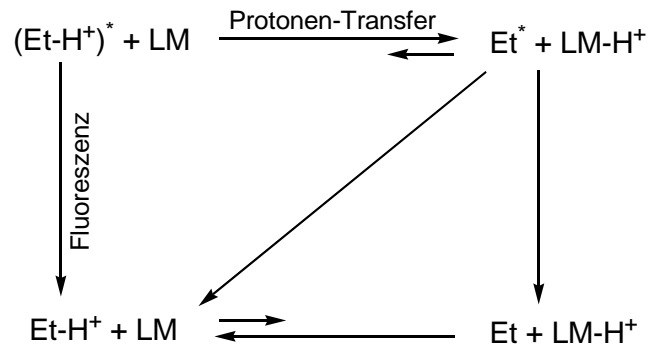


Abb. 3-32: Postulierter Protonen-Transfer-Mechanismus von *Olmsted* und *Kearns*.^[153] Erläuterungen: Et-H⁺/(Et-H⁺)^{*}: Grundzustand/angeregter Zustand des Ethidiumbromids, Et/Et^{*}: Grundzustand/angeregter Zustand des deprotonierten Ethidiumbromids, LM: Lösungsmittel.

Die geringe Emissionsintensität des freien Ethidiumbromids in Wasser führen sie darauf zurück, dass im angeregten Zustand ein Protonen-Transfer auf das Wasser stattfindet. Die hydrophobe DNA-Umgebung nach der Interkalation verringert den Proton-Transfer, was sich in einer steigenden Fluoreszenz widerspiegelt.

In Fluoreszenz-Assays mit Nucleinsäuren wurden Ethidiumbromid oder Derivate davon, die im Folgenden mit Ethidium bezeichnet werden, oft als nicht kovalent gebundene Interkalatoren verwendet.^[154-157] Um allerdings Ladungstransfer in DNA untersuchen zu können, muss der Ethidiumchromophor kovalent in die DNA eingebracht werden, damit er definiert in den Basenstapel interkaliert und somit die Entfernung vom Ladungsakzeptor exakt festgelegt werden kann. Meist wird Ethidium über einen Linker an die DNA gebunden. Dies kann wie bei *Florentiev et al.*^[158, 159] intern oder wie bei *Barton et al.*^[18, 58] am 5'-Ende des Oligonucleotids geschehen. Da von *Florentiev et al.* allerdings keine Untersuchungen zum Ladungstransfer durchgeführt wurden, soll im Folgenden nur das Ethidiumsystem von *Barton et al.* genauer erläutert werden.

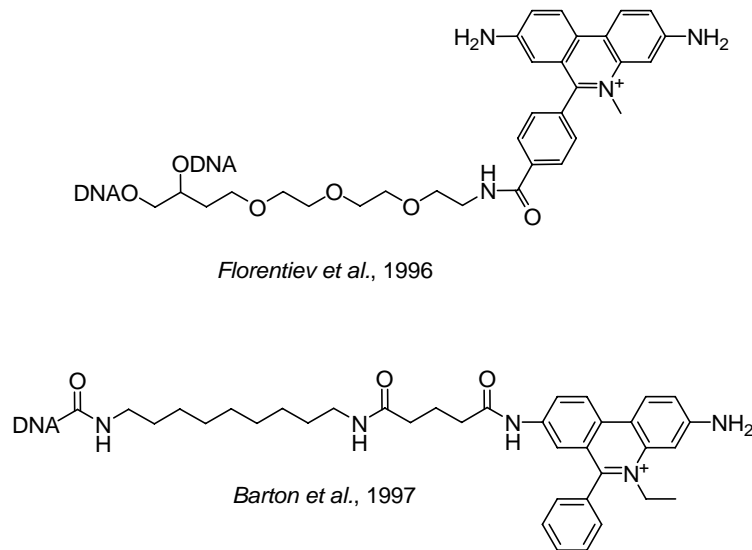


Abb. 3-33: Ethidium-Linker-Systeme, die von *Florentiev et al.* und *Barton et al.* an Oligonucleotide geknüpft wurden.

Für ihre Ladungstransferstudien knüpften *Barton et al.* das in Abb. 3-33 gezeigte Ethidium-Linker-System als Ladungsdonor kovalent an das 5'-Ende eines 14mer-Duplex und kombinierten es in Abständen von zwei bis vier dazwischen liegenden Basenpaaren mit 7-Deazaguanin als Akzeptor (Abb. 3-34).^[18] Durch die flexible Linkeralkylkette bleibt die Beweglichkeit des Ethidiums im Basenstapel erhalten, dennoch ist die Interkalationsstelle ziemlich genau (± 1 Basenpaar) definiert.



Abb. 3-34: Schematische Darstellung der Ladungstransferduplexe von *Barton et al.* mit Ethidium (pink) als Ladungsdonor und 7-Deazaguanin (Z, gelb) als Ladungsakzeptor.^[18]

Die Ladungstransferraten, die aus transienten Absorptionsmessungen erhalten wurden, zeigten keine Abstandsabhängigkeit zwischen Donor und Akzeptor. Die Abklingkurven waren von den beiden Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 5$ ps ($k_{CT} \approx 2 \cdot 10^{11}$ s⁻¹) und $\tau_2 \approx 75$ ps ($k_{CT} \approx 1 \cdot 10^{10}$ s⁻¹) bestimmt. Es ist bekannt, dass die Orientierungsrelaxation von freiem Ethidium in Wasser innerhalb von ca. 70 ps verläuft und dass die Fluoreszenzlöschung von Ethidium in bimolekularen Komplexen mit 7-Deazaguanin im selben Zeitraum erfolgt.^[160] Aufgrund dieser Arbeiten kann davon ausgegangen werden, dass das Ethidium vor der Ladungsübertragung eine Umorientierung erfährt, die ratenlimitierend ist (*base gating*, vgl. Kapitel 3.1.1.1). Trotz Interkalation in den Basenstapel scheint der Chromophor über bestimmte Freiheitsgrade zu verfügen. Die Lebenszeit $\tau_1 \approx 5$ ps wird dabei denjenigen Molekülen zugeschrieben, in denen das Ethidium bereits im Grundzustand optimal mit den Nachbarbasen wechselwirkt und keine Umorientierung für einen effizienten Ladungstransfer nötig ist.^[18] Mit Ethidium und 7-Deazaguanin ist ein Donor-Akzeptor-System gelungen, in dem sehr effizienter Ladungstransfer stattfindet, was sich in den Raten im Bereich von $k_{CT} \approx 10^{10}$ s⁻¹ bis $k_{CT} \approx 10^{11}$ s⁻¹ zeigt. Der Ladungstransfer scheint zudem unabhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor zu sein.

Valis verwendete in ihren Untersuchungen zum Ladungstransfer ein Ethidiumsbasensurrogat, das über einen wesentlich kürzeren Linker in Oligonucleotide eingebaut wurde (Abb. 3-35).^[20] Als Akzeptor wurde ebenfalls 7-Deazaguanin (Z) verwendet. Lag ein Basenpaar zwischen Donor und Akzeptor, so konnte in Einklang mit den Ergebnissen von *Barton et al.* eine Rate von $k_{CT} \approx 1 \cdot 10^{10}$ s⁻¹ ermittelt werden. Allerdings zeigte sich, dass der Ladungstransfer über zwei oder mehr dazwischen liegende Basenpaare drastisch absank ($k_{CT} \approx 1 \cdot 10^7$ s⁻¹ bis $k_{CT} \approx 1 \cdot 10^6$ s⁻¹).^[20] Es wird vermutet, dass die konformelle Flexibilität des Ethidiums durch den Einbau des kurzen, relativ starren Linkersystems so stark eingeschränkt wird, dass die elektronisch notwendige Umorientierung des photoangeregten Ethidiums kaum bzw. nicht mehr möglich ist. Daher zeigt sich in dieser Donor-Akzeptor-Kombination eine deutlich Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers.^[20]

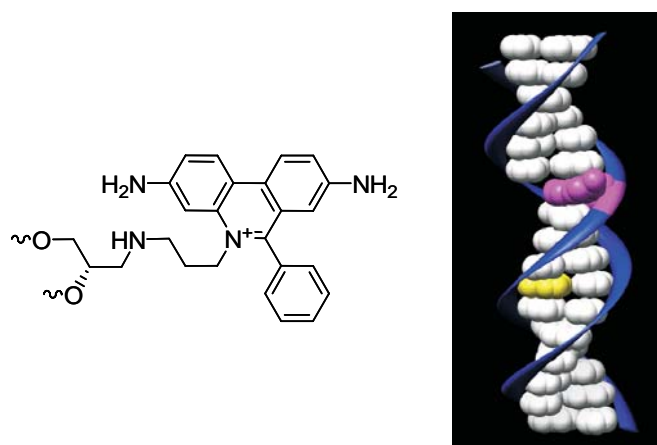


Abb. 3-35: links: Ethidiumbasensurrogat aus den Experimenten von *Valis et al.*; rechts: schematische Darstellung der Ladungstransferduplexe von *Valis et al.* mit Ethidium (pink) als Ladungsdonor und 7-Deazaguanin (Z, gelb) als Ladungsakzeptor.^[20]

Ethidium wird in dieser Arbeit ebenfalls als Lochdonor eingesetzt und deshalb in Kapitel 4.5 nochmals genauer erläutert.

3.5 Pyrenmodifizierte Nucleoside als chemische Sonden für Ladungstransferreaktionen

Pyrene sind spektroskopisch und elektrochemisch sehr gut charakterisiert und können daher ideal als photochemische Sonden zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen eingesetzt werden. In den vergangenen Jahren wurden viele pyrenmodifizierte Nucleoside veröffentlicht. Die ausgewählten Beispiele in Abb. 3-36 zeigen die C-Nucleoside von *Kool et al.*,^[161-164] *Woski et al.*,^[165] *Berlin et al.*^[43] und *Pedersen et al.*,^[166] sowie die pyrenmodifizierten Uridinderivate von *Netzel et al.*^[42, 167].

Netzel et al. untersuchten die Fluoreszenzlebenszeiten des angeregten Pyrenchromophors in Abhängigkeit der benachbarten DNA-Basen.^[168] Sie fanden heraus, dass photoangeregtes Pyren Py^* in C- und T-Umgebung als Elektronendonator und in G-Umgebung als Elektronenakzeptor agiert. Demzufolge kann Py^* je nach Basenumgebung reduktiven bzw. oxidativen Ladungstransfer induzieren.

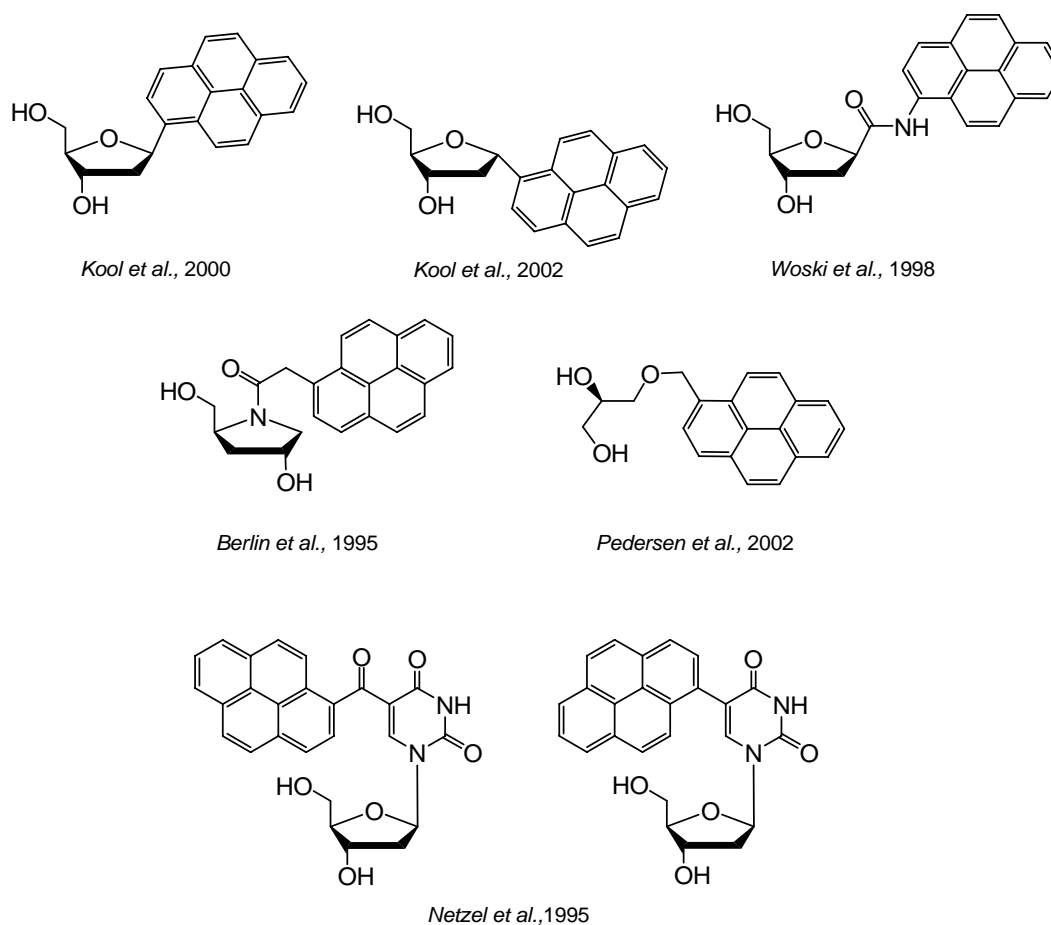


Abb. 3-36: Übersicht über verschiedene pyrenmodifizierte Nucleoside und Pyrenbasensurrogate.

In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurden die vier natürlichen Nucleoside A, G, C und dU mit dem Pyrenchromophor modifiziert und optisch charakterisiert (Abb. 3-37).^[22, 40] Pyren ist dabei im Fall von Pyrimidinen an die 5- bzw. bei Purinen an die 8-Position der Nucleobasen über eine C-C-Einfachbindung geknüpft. Die Synthese dieser Nucleoside verläuft über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung zwischen den halogenierten Nucleosiden und der 1-Pyrenylboronsäure. Die Synthese von 5-substituierten Uridinen, wie das in Abb. 3-36 gezeigte PydU von *Netzel et al.*, wurde zuvor hauptsächlich über die Stille-Kupplung durchgeführt.^[42, 169] Die dazu eingesetzten Organostannane sind aber den Boronsäurederivaten der Suzuki-Kupplung im Hinblick auf Stabilität gegen Luft, Wasser und Hitze deutlich unterlegen. Die Suzuki-Miyaura-Reaktion erfolgt palladiumkatalysiert in einem dreistufigen Katalysezyklus (vgl. Abb. 3-38). Die Transmetallierung (Schritt B) kann nur stattfinden, wenn durch eine Base eine tetravalente anionische Borspezies gebildet wird, die eine stark

erhöhte Nucleophilie aufweist. Die Suzuki-Miyaura-Kupplung toleriert wässrige Bedingungen und ungeschützte Hydroxy- und Aminogruppen, die charakteristisch für Nucleoside sind.^[170]

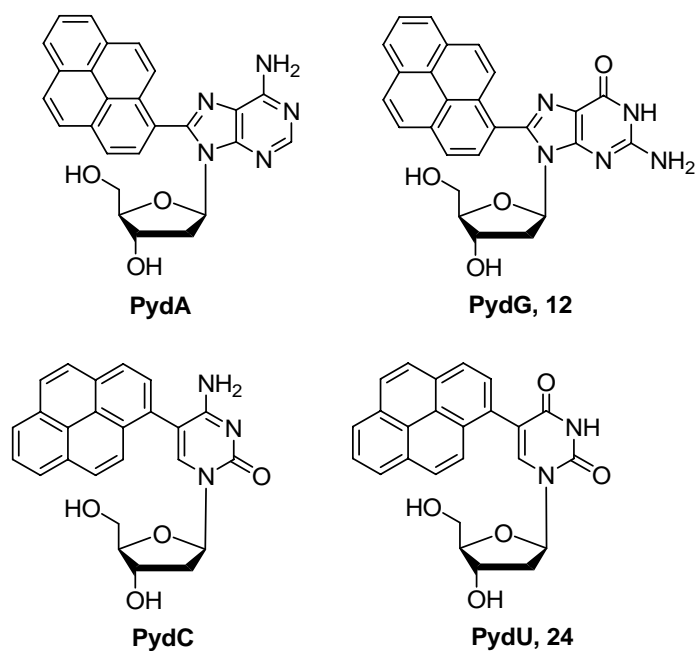


Abb. 3-37: Pyrenmodifizierte Nucleoside der Arbeitsgruppe *Wagenknecht*.^[22, 40]

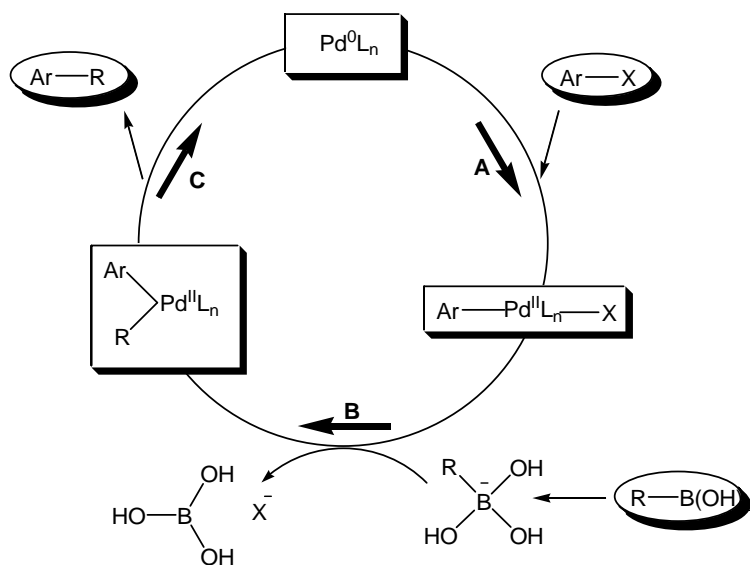


Abb. 3-38: Katalysezyklus der Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen am Beispiel der Suzuki-Miyaura-Kupplung. Erläuterungen: (A) Oxidative Addition, (B) Transmetallierung, (C) Reduktive Eliminierung.

Die Darstellung der benötigten 1-Pyrenylboronsäure wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[171, 172] Die iodierten Derivate der Nucleoside C und dU sind kommerziell erhältlich, G und A müssen hingegen vor der Kreuzkupplung halogeniert werden. Bromierungsreaktionen der Purinbasen sind ebenfalls literaturbekannt.^[173-175]

Die pyrenmodifizierten Nucleoside PydG (**12**) und PydU (**24**) werden in dieser Arbeit verwendet. Daher werden sie in den Kapiteln 4.4 und 5.1 genauer erläutert.

3.6 DNA-Synthese

In den 1980er Jahren übertrug *Letsinger*^[31, 176] das von *Merrifield*^[177] entwickelte Prinzip der Peptid-Festphasensynthese auf die Herstellung von Oligonucleotiden. Diese Art der DNA-Herstellung zählt seither zu den routinemäßig angewendeten Methoden, da mit ihr schnell, effizient und zuverlässig Oligonucleotide synthetisiert werden können.

Als Träger der festen Phase wird ein sog. *Controlled Pore Glass* (CPG) verwendet, dessen Oberfläche mit primären Amingruppen funktionalisiert ist. Über einen Linker, üblicherweise Succinat, ist das erste Nucleosid über seine 3'-OH-Gruppe am CPG verankert. Derartig belegtes CPG ist kommerziell erhältlich. Das Nucleosid ist an der 5'-OH-Gruppe trityliert und gegebenenfalls an der exocyclischen Aminfunktion der Nucleobase geschützt. Die Synthese verläuft entsprechend dem in Abb. 3-39 dargestellten Zyklus nach der Phosphoramiditmethode.^[32, 33]

Im ersten Schritt wird die Tritylschutzgruppe am 5'-OH des ersten Nucleosids mit Dichloressigsäure entfernt. Anschließend erfolgt die Kupplung mit dem Phosphoramidit des nächsten Bausteins mit Tetrazol als Aktivator. Es folgt ein *Capping*-Schritt mit Essigsäureanhydrid und 2,6-Lutidin, der noch vorhandene OH-Gruppen, die bei der Kupplung nicht reagiert haben, durch Acylierung blockiert. Auf diese Weise werden Oligonucleotide, die nicht korrekt verlängert wurden, aus dem Syntheszyklus entfernt. Anschließend erfolgt die

Oxidation des Phosphittriesters zum Phosphotriester mit Iod. 2,6-Lutidin wird als Base zugesetzt, um entstehendes HI abzufangen.

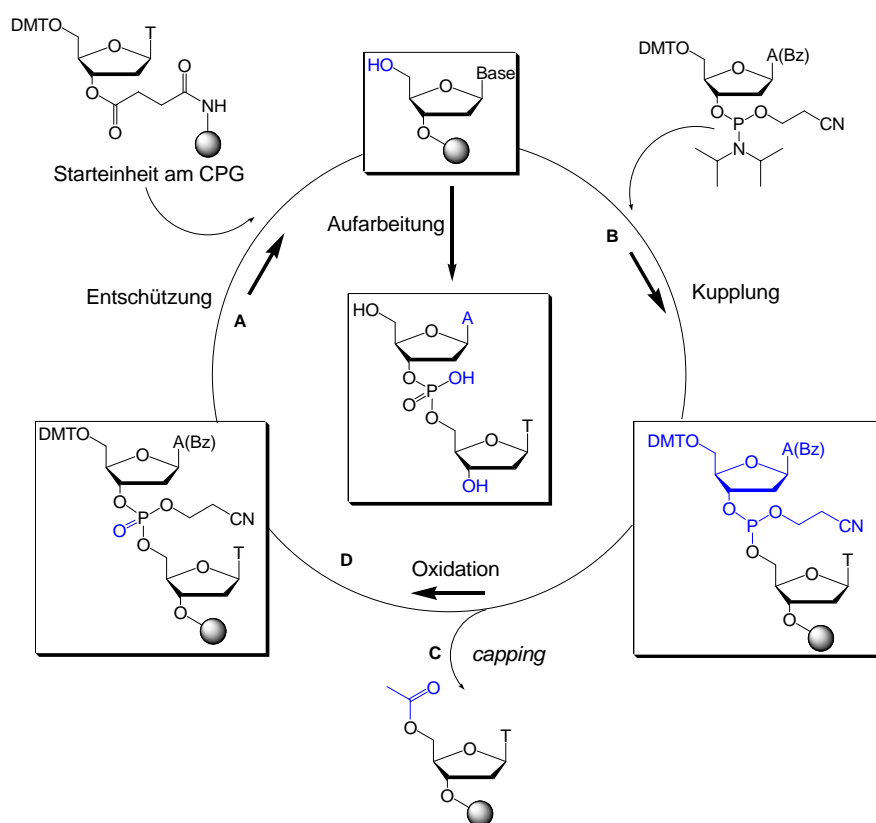


Abb. 3-39: Schema der automatisierten DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode am Beispiel der Sequenz 3'-TA-5'. Verwendete Reagenzien: (A) 2 % Dichloressigsäure in DCM; (B) 0,45 M Tetrazol in MeCN; (C) Essigsäureanhydrid, N-Methylimidazol, 2,6-Lutidin in THF; (D) Iod, 2,6-Lutidin in Wasser.

An die Oxidation schließt sich die erneute Detritylierung der 5'-OH-Gruppe an. Anhand der Orangefärbung durch das entstehende 4,4'-Dimethyltritylkations (DMT^+) sowie der charakteristischen Absorption von DMT^+ bei $\lambda = 470 \text{ nm}$ lässt sich die Kupplungseffizienz abschätzen (vgl. Abb. 3-40).

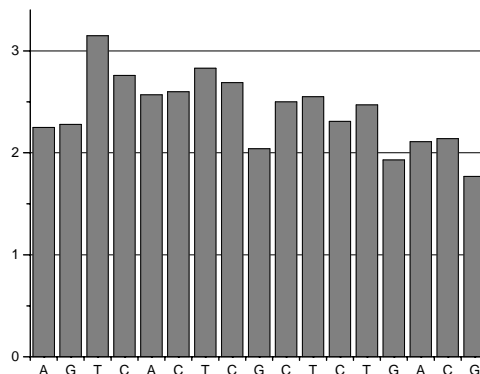


Abb. 3-40: Beispiel eines Tritylmonitors der Oligonucleotidsequenz 3'-AGTCACTCGCTCTGACG-5'.

Nach erfolgter Synthese werden die Oligonucleotide von der festen Phase abgespalten. Im Standardverfahren gelingt dies mit wässriger konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung bei 60 °C innerhalb 10 Stunden. Dabei werden zugleich die Schutzgruppen an den exocyclischen Aminfunktionen der Basen und die Cyanoethoxy-Schutzgruppe an den Phosphaten entfernt. Die Reinigung erfolgt über präparative *reversed-phase* HPLC.

3.7 Detektion von Punktmutationen (SNP) und das DETEQ-Konzept

Als Punktmutationen (SNP = *single nucleotide polymorphism*) bezeichnet man veränderte Genabschnitte, die sich vom Wildtyp nur in einer einzigen Basenpaarung unterscheiden (Abb. 3-41).^[13, 178-181] Liegt diese Punktmutation in einem Bereich, der Proteine codiert, kann es bei der Translation zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz des zu codierenden Proteins kommen. Eine Mutation in einer Promoterregion führt aufgrund veränderter Proteinexpression zur Änderung des Phänotyps. In Keimzellen können Mutationen zu vererbaren Krankheiten führen. Die SNP-Detektion ist daher für die medizinische und pharmazeutische Diagnostik äußerst wichtig.^[13, 14] Besonderes Interesse an der Detektion von Punktmutationen hat v. a. auch die Pharmacogenetik, um fallspezifische Wirkungen von Arzneimitteln untersuchen und wirksame Therapiemethoden entwickeln zu können.

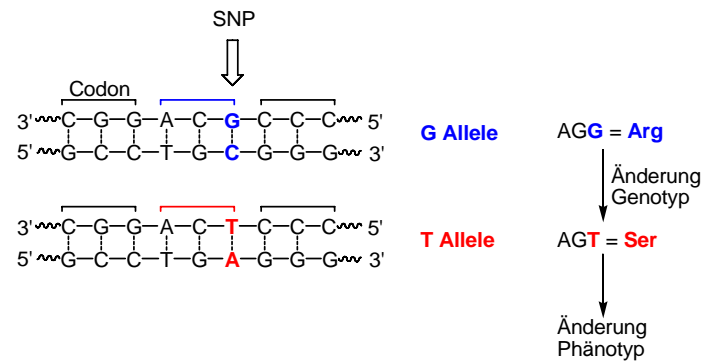


Abb. 3-41: Beispiel für eine Punktmutation: Wildtyp-DNA (oben) und Mutante (unten).

Ein interessantes Beispiel, das die Auswirkungen von SNPs sehr deutlich macht, stellt das p53-Protein dar.^[182] Das p53-Protein fungiert in der Zelle als Tumorsuppressor und sorgt während des Zellzyklus an bestimmten Kontrollpunkten dafür, dass die Proliferation von beschädigten Zellen gestoppt und Reparaturmechanismen oder die Apoptose eingeleitet wird.^[183] Dadurch wird der Organismus vor der Entstehung von Tumoren bewahrt. In ungefähr der Hälfte aller humanen Tumore ist das p53-Protein als Folge einer Mutation im p53-Gen inaktiv.^[183] Abb. 3-42 (unten) zeigt die einzelnen Domänen, die das p53-Protein beinhaltet. Über 95 % der Mutationen liegen in der DNA-Bindungsdomäne (Abb. 3-42, oben), die für die Aktivierung der Transkription von entscheidender Bedeutung ist. Bei ca. 75 % handelt es sich dabei um Einzelbasen-Punktmutationen.^[182] Innerhalb der DNA-Bindungsdomäne gibt es sechs Codons, in denen gehäuft Mutationen auftreten, den sog. *hot spots* (vgl. Abb. 3-42).^[182]

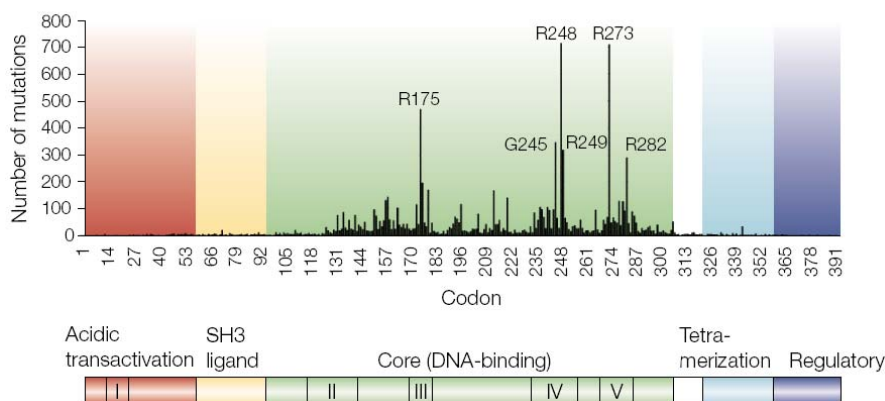


Abb. 3-42: Häufigkeit und Verteilung der cancerogenen Mutationen in den einzelnen Domänen von p53.^[182]

Anhand dieses Beispiels wird die enorme Bedeutung der SNP-Detektion klar. Es gibt bislang schon einige Methoden, die zur Erkennung von Punktmutationen eingesetzt werden. Sie lassen sich in enzymatische und nicht-enzymatische Systeme einteilen.

3.7.1 Enzymatische Assays

3.7.1.1 Einzelnucleotid-Primerverlängerung ^[13, 184]

In diesem Assay wird ein Primer, der zur Wildtyp-DNA und zur Mutante komplementär ist und genau vor der zu untersuchenden Nucleobase endet, an die Ziel-DNA angelagert. Durch die DNA-Polymerase wird der Primer um ein dNTP verlängert. Die einzelnen dNTPs sind mit verschiedenen Fluorophoren markiert. Anhand des resultierenden Fluoreszenzsignals erkennt man, welches dNTP eingebaut wurde und ob es sich um den Wildtyp oder eine Mutante handelt.

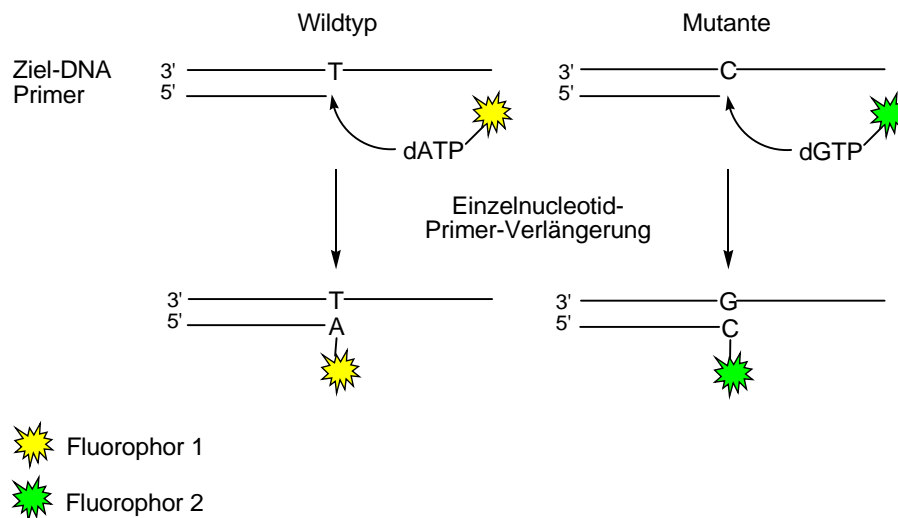


Abb. 3-43: Einzelnucleotid-Primerverlängerung. Die einzelnen dNTPs sind mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert.

3.7.1.2 Invader-Assay[®] [13, 14, 185]

Im Invader-Assay[®] werden gleichzeitig zwei Oligonucleotide, die als „Signalsonde“ und „Invasivsonde“ bezeichnet werden, mit der genomischen Ziel-DNA hybridisiert.

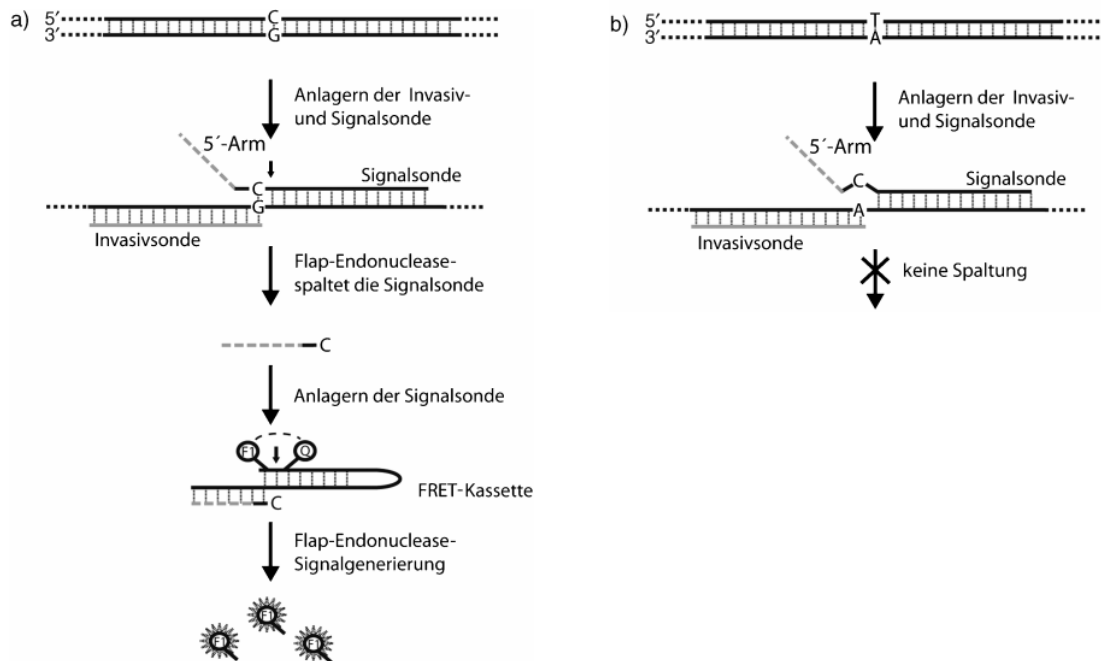


Abb. 3-44: Genotypisierung durch den Invader-Assay[®]. a) kanonischer Triplex, b) nicht perfekt kanonischer Triplex. Erläuterungen: F1: Fluorophor, Q: Quencher.^[14]

Aufgrund der 5'-Arm-Region („flap“) der Signalsonde, die nicht komplementär zur Zielsequenz ist, entsteht bei der Hybridisierung eine Triplexstruktur, die durch 5'-3'-Nucleasen, z. B. *Flap-Endonuclease I*, erkannt werden (Abb. 3-44). Handelt es sich um kanonische Komplexe aus Signalsonde und Zielsequenz, so spaltet das Enzym die Signalsonde und setzt ein Oligonucleotid frei. Dieser geschnittene Strang lagert sich im nächsten Schritt an eine Haarnadelstruktur an, die am 5'-Ende ein Fluorophor-Quencher-Paar trägt, und katalysiert die Spaltung dieser sog. FRET-Kassette. Der Farbstoff wird freigesetzt und liefert ein Fluoreszenzsignal, das den Wildtyp anzeigt.

3.7.1.3 TaqMan-Assay[®] [13, 14, 186]

In diesem enzymatischen Assay bindet eine FRET-DNA-Sonde (TaqMan[®]-Sonde), die am 5'-Ende einen Fluorophor und am 3'-Ende einen Quencher trägt, an die genomische DNA. Gleichzeitig wird an das 3'-Ende der Ziel DNA ein Primer angelagert, der durch eine DNA-Polymerase verlängert wird. Trifft die Polymerase mit ihrer Exonucleasefunktion auf eine korrekt gepaarte TaqMan[®]-Sonde, so wird diese in 5'-3'-Richtung abgebaut, wodurch der Farbstoff freigesetzt wird. Das resultierende Fluoreszenzsignal zeigt den Wildtyp an. Die Bindung der TaqMan[®]-Sonde an eine mutierte Ziel-DNA ist durch die vorhandene Basenfehlpaarung destabilisiert. Durch den zusätzlichen Abbau durch die Polymerase löst sich die FRET-Sonde vorzeitig von der Ziel-DNA. Der Farbstoff wird somit nicht vom Quencher getrennt und es resultiert kein Fluoreszenzsignal.

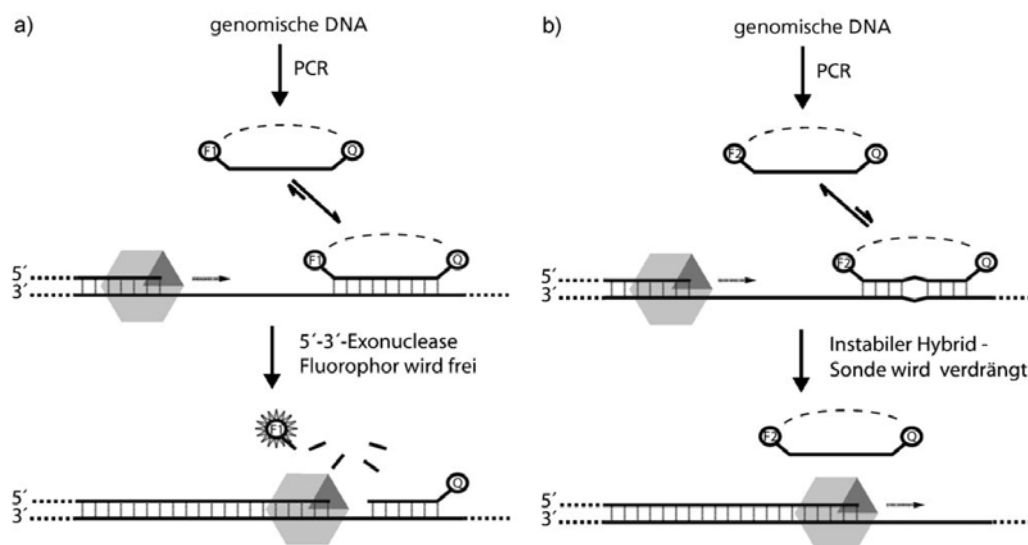


Abb. 3-45: TaqMan-Assay[®]: a) Die vollständig hybridisierte Sonde kann durch die 5'-3'-Exonuclease abgebaut werden. b) Basenfehlpaarung im DNA-Sonden-Hybrid; die Sonde wird ohne Abbau verdrängt. Erläuterungen: F1: Fluorophor, Q: Quencher.^[14]

Der TaqMan-Assay[®] basiert also auf drei charakteristischen Schritten: DNA-Synthese durch Polymerasen, teilweises Verdrängen des Doppelstrangs und Spaltung einer FRET-DNA-Sonde. Der kritische Parameter ist die FRET-Sonde, die zwar genügend lang sein muss, um mit der genomischen DNA bei 70 °C einen stabilen Duplex zu bilden, andererseits aber auch

kurz genug sein muss, um eine Sondenspaltung bei einer Basenfehlpaarung durch vorzeitiges Ablösen zu verhindern.

3.7.2 Nicht-enzymatische Assays

3.7.2.1 Allelspezifische Hybridisierung ^[187]

Eine Standardmethode in der nicht-enzymatischen SNP-Detektion ist die allelspezifische Hybridisierung. Der kritische Parameter dieses Systems ist der Stabilitätsunterschied zwischen korrekt- und fehlgepaarten Doppelsträngen. Als Sonden werden fluoreszenzmarkierte allelspezifische Oligonucleotide (ASO) verwendet, die auf einem festen Träger immobilisiert sind. Nach Hybridisierung mit der Ziel-DNA erhält man im Wildtyp einen vollständig gepaarten Duplex, im Fall einer Mutante einen Duplex mit Basenfehlpaarung. Aufgrund der Basenfehlpaarung ist die Duplexstabilität mit der Mutante herabgesetzt, so dass sie selektiv dehybridisiert und von den korrekt gepaarten Doppelsträngen des Wildtyps abgetrennt werden können. Das auslesbare Fluoreszenzsignal zeigt nur den Wildtyp an. Nachteilig ist zu betrachten, dass die Stabilitätsunterschiede oft sehr klein und sequenzabhängig sind, was sich in einer hohen Fehlerquote der SNP-Detektion auswirkt.

3.7.2.2 Strang-Austausch-Methode ^[13, 188]

Während bei der allelspezifischen Hybridisierung thermodynamische Unterschiede der Duplexstabilität genutzt werden, spielt bei der Strang-Austausch-Methode die Kinetik der Duplexausbildung die entscheidende Rolle. Als Sonde wird ein korrekt gepaarter Duplex verwendet, der an beiden Strängen jeweils einen Chromophor trägt (z. B. TAMRA und FITC). Zwischen den beiden Farbstoffen findet FRET statt. Es wurde herausgefunden, dass kammartig ausgebildete kationische Copolymere (CCTC, *cationic comb-type copolymers*) den Strangaustausch eines richtig gepaarten Duplexes mit einem komplementären

Einzelstrang beschleunigen.^[13] Werden zur FRET-Sonde als Ziel-DNA komplementäre und nicht-komplementäre Sequenzen in Anwesenheit von CCTC gegeben, so wird der komplementäre Einzelstrang sehr schnell eingetauscht, wodurch der FRET unterbrochen wird und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Der nicht-komplementäre Einzelstrang wird deutlich langsamer eingetauscht, der FRET bleibt bestehen.

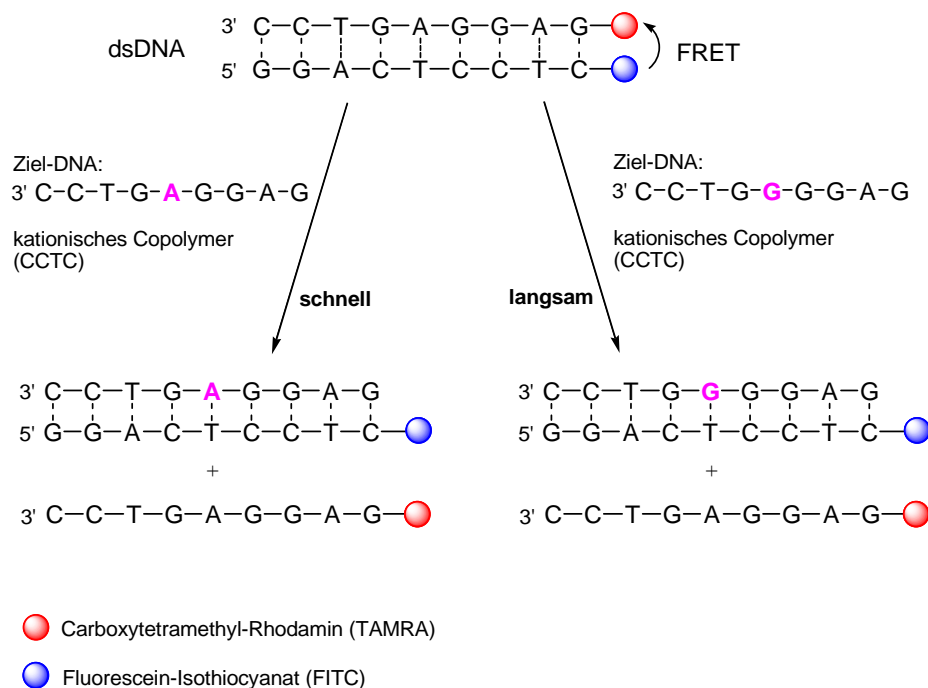


Abb. 3-46: Mechanismus der Strang-Austausch-Methode.^[13]

3.7.2.3 Fluoreszenzmarkierte DNA-Basen und Fluoreszenzsonden als artifizielle Basen

Alternativ zu den beiden oben beschriebenen nicht-enzymatischen Methoden wird versucht, Detektionssysteme zu entwickeln, die auf fluoreszenten DNA-Basen bzw. Basensurrogaten basieren. Dazu sind sog. basendiskriminierende Fluoreszenzsonden (BDF, *base-discriminating fluorescence probes*) nötig, deren Emissionseigenschaften abhängig von der unmittelbaren elektronischen und strukturellen Umgebung sind. Derartige BDFs werden anstelle einer natürlichen DNA-Base in den Sondenstrang eingebaut. Nach Hybridisierung mit der Zielsequenz zeigt sich durch Veränderung der Fluoreszenzintensität, ob der Wildtyp

oder eine Mutante vorliegt. Bei dieser Methode sind zwei Parameter für die zuverlässige und ausreichend sensitive Detektion entscheidend:

F/F_0 : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der dsDNA (F) zur ssDNA (F_0)

F/F' : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen korrekt- (F) und fehlgepaartem (F')
Doppelstrang

Saito et al. ^[189-193] entwickelten fluoreszenzmarkierte DNA-Basen, die in der Lage sind, Basenfehlpaarungen zu diskriminieren und durch verminderte Fluoreszenz anzuzeigen. Sie modifizierten beispielsweise dU mit Pyren und hybridisierten verschiedene Zielsequenzen mit der BDF-Sonde (vgl. Abb. 3-47).

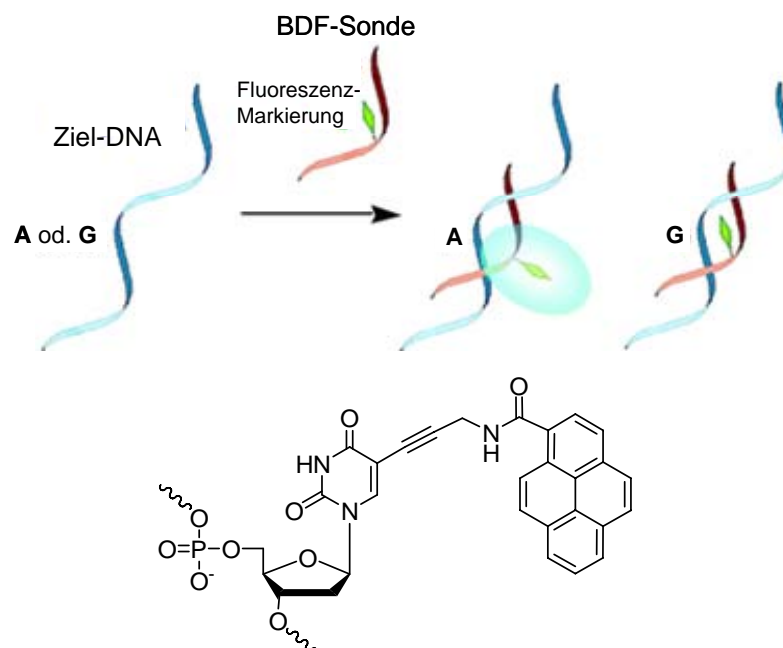


Abb. 3-47: Prinzip der BDFs nach *Saito et al.* ^[193] am Beispiel von pyrenmodifiziertem Uridin. Nur für A als Gegenbase zu dU zeigt sich ein starkes Fluoreszenzsignal.

Aus korrekt gepaarten Duplexen resultierte ein starkes Fluoreszenzsignal ($F/F_0 = 4 - 5$), während es bei falsch gepaarten Doppelsträngen auf einen Bruchteil absank ($F/F' = 6$). Wie in Abb. 3-47 zu sehen ist, nehmen *Saito et al.* an, dass der Pyrenchromophor im intakten Duplex nach außen in die große Furche zeigt. Die Abnahme der Fluoreszenz nach Hybridisierung mit

einer Mutante wird durch die Interkalation des Chromophors in den Duplex erklärt. Durch elektronische Wechselwirkungen mit den Basen wird die Emission gelöscht.

Der Vorteil dieses Systems ist die leichte Handhabung aufgrund der guten Toleranz gegenüber pH-Wert, Salzkonzentration und Lösungsmittel. Nachteilig ist allerdings, dass die Fluoreszenz teilweise auch durch die Nachbarbasen C und G gelöscht wird.

Seitz *et al.* verwendeten Thiazolorange (TO) als artifizielle Base in PNA (*peptid nucleic acid*) (Abb. 3-48).^[194-199] Wird ein TO-modifizierter PNA-Strang mit DNA hybridisiert, steigt die Fluoreszenz von TO erheblich an ($F/F_0 \approx 20$). Bei Basenfehlpaarungen in unmittelbarer Nachbarschaft sinkt die Emissionsintensität ab ($F/F' = 5$). Die Abnahme kann durch Variation der Temperatur verändert werden ($F/F' (60\text{ °C}) = 10$).

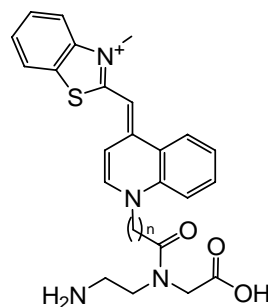


Abb. 3-48: TO-PNA-Baustein von Seitz *et al.*.^[194]

3.7.2.4 DETEQ-Konzept

In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurde das DETEQ-Konzept (*Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching*) zur SNP-Detektion auf der Basis von Ladungstransfer entwickelt (Abb. 3-49).^[17]

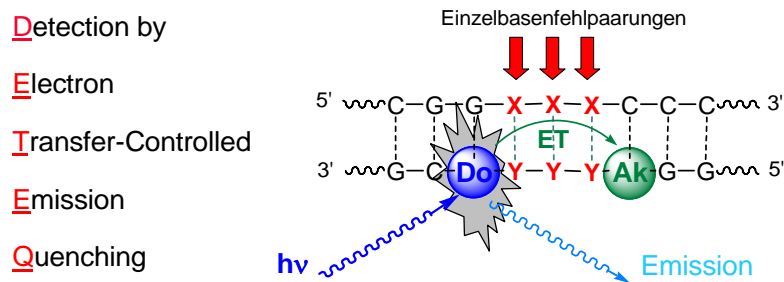


Abb. 3-49: DETEQ-Konzept der Arbeitsgruppe *Wagenknecht*.

Für die Anwendung dieses Konzepts ist es nötig, dass redoxaktive Fluorophore in Oligonucleotidsonden eingebaut werden. Wird zusätzlich ein geeigneter Ladungsakzeptor eingebaut, so kann es nach Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz zu Elektronenübertragungen durch die DNA-Brücke kommen. Da der Ladungstransfer von der elektronischen Kopplung abhängt, die von der Basenstapelung vermittelt wird, ändert sich die Ladungstransferrate k_{CT} beim Auftreten einer Basenfehlpaarung in der DNA-Brücke zwischen Fluorophor und Ladungsakzeptor. Es tritt folglich eine veränderte Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp auf, die zur Detektion von SNPs genutzt werden kann.

Der entscheidende Vorteil dieses DETEQ-Konzepts zur SNP-Detektion ist, dass die Fluoreszenzänderungen nicht nur bei direkt benachbarten Basenfehlpaarungen auftreten. Mit einer DETEQ-Sonde sollte es möglich sein, eine Sequenz von zwei oder sogar ein komplettes Codon aus drei Basenpaaren auf Fehlpaarungen abzufragen.

Bei diesem Konzept ist der F_q -Wert als Maß für die Fluoreszenzlöschung der entscheidende Parameter für die zuverlässige Detektion:

$$F_q = 1 - \frac{F_{\text{int}}}{F_{\text{int}}^0} \quad \text{Gleichung 3-12}$$

mit:	F_q	Fluoreszenzlöschung (in %)
	F_{int}	integrierte Fluoreszenz des fehlgepaarten Duplex
	F_{int}^0	integrierte Fluoreszenz des korrekt gepaarten Referenzduplex

Das bisher erfolgreichste DETEQ-System besteht aus Ethidium als Ladungsdonor und 7-Deazaguanin als Ladungsakzeptor, die beide kovalent in DNA gebunden sind (Abb. 3-50). Wenn eine Basenfehlpaarung in der DNA-Brücke zwischen Donor und Akzeptor vorhanden ist, wird eine beachtliche Fluoreszenzlöschung von bis zu 90 % erreicht.^[16]

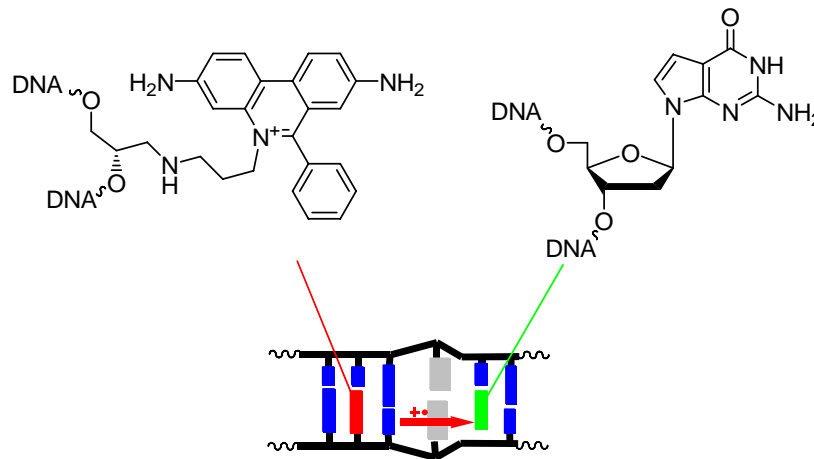


Abb. 3-50: Ethidium (links, rot) und 7-Deazaguanin (rechts, grün) detektieren Basenfehlpaarungen durch Fluoreszenzlöschung aufgrund eines veränderten Ladungstransfers.^[16]

Die SNP-Detektion nach dem DETEQ-Konzept wird in dieser Arbeit anhand zweier Donor-Akzeptor-Systeme untersucht (Kapitel 4.4 und 4.5).

4 Indol als Lochakzeptor für Ladungstransferprozesse in Oligonucleotiden

4.1 Indol als artifizielle DNA-Base

Wie bereits für Tryptophan in Kapitel 3.3 beschrieben wurde, besitzt Indol ein geringes Oxidationspotential und repräsentiert dadurch einen vielversprechenden Ladungsakzeptor. Das entstehende Radikal kann mittels seiner charakteristischen Absorption bei $\lambda \approx 510$ nm leicht detektiert werden.^[200] Elektrochemisch ähnelt Indol 7-Deazaguanin (**Z**), das in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* bereits als Akzeptor in PydG-^[36] und ethidiummodifizierten^[19, 20] Oligonucleotiden eingesetzt wurde. 7-Deazaguanin hat den Nachteil, dass es selektiv nur mit C paart, während Indol aufgrund fehlender Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren keine Präferenz gegenüber einer bestimmten Gegenbase zeigen sollte.

Indol kann aufgrund seiner Struktur als isosterischer Ersatz für Purine angesehen werden und stellt die kleinstmögliche Fluoreszenzsonde dar, die für Ladungstransfer-Untersuchungen in DNA eingesetzt werden kann. Intensiv untersucht wurden bereits Indolnucleoside, bei denen der aromatische Rest β -glycosidisch über das N-Atom in Position 1 an das anomere Zentrum der 2'-Desoxyribose verknüpft ist (Abb. 4-1, **1**).^[201, 202] Indol ist ein elektronenreicher Aromat. Daher haben diese Nucleoside den großen Nachteil, dass das Glycosylamin trotz Mesomeriestabilisierung im aromatischen Indolsystem sehr anfällig gegen wässrige Hydrolyse ist und somit nur schwierig in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt werden kann. Auch biochemische und biophysikalische Experimente, die in Puffer-Lösungen durchgeführt werden, gestalten sich problematisch.^[39, 203] Eine denkbare Möglichkeit, die Labilität gegen Hydrolyse zu verringern, ist die Verwendung eines C-Nucleosids, bei dem der Indolrest über das C-Atom in Position 3 an die 2'-Desoxyribose verknüpft wird (Abb. 4-1, **2**).^[204-206] Die Synthese des β -verknüpften Indolnucleosids **2** gestaltet sich jedoch als sehr kompliziert. Hauptursache dafür ist die schwierige Trennung der beiden Anomere.^[207]

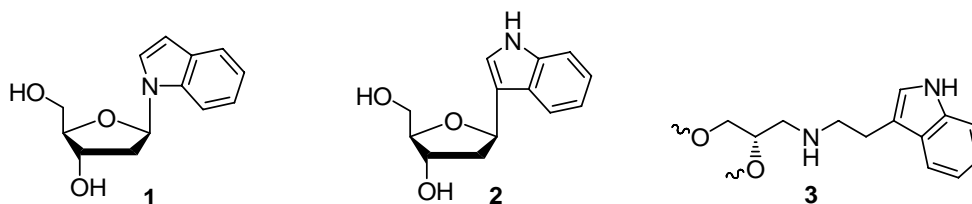


Abb. 4-1: Mögliche Indolnucleoside als artifizielle DNA-Basen in Oligonucleotiden.

Daher sollte in dieser Arbeit eine acyclische Variante einer artifiziellen DNA-Base synthetisiert und charakterisiert werden (Abb. 4-1, **3**). Als 2'-Desoxyribose-Ersatz dient ein acyclischer Linker auf der Basis von (*S*)-(-)-3-Amino-1,2-propandiol **4**. Das *S*-Stereoisomer wurde gewählt, um die Konfiguration am C-3' der 2'-Desoxyribose nachzuahmen (vgl. dazu Abb. 4-6). Diese offenkettige Variante wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zur Synthese von Ethidium-,^[37, 38] Perylen-,^[208] Phenothiazin-^[209] und Thiazolorangeenthaltenden DNA-Bausteinen^[210] angewandt. Durch Vermeidung einer glycosidischen Bindung sollte das Indolnucleosid **9** die nötige chemische Stabilität für die Phosphoramiditchemie und bioanalytischen Anwendungen in wässrigen Pufferlösungen aufweisen.

4.2 Synthese des acyclischen Indol-DNA-Bausteins **11** und spektroelektrochemische Charakterisierung des Nucleosids **9**

Der in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte Linker **7** wurde ausgehend von (*S*)-(-)-3-Amino-1,2-propandiol (**4**) nach Vorschriften aus der Literatur hergestellt.^[37, 38, 211] Als Edukt für den Indolbaustein wurde das kommerziell erhältliche 3-(2-Bromoethyl)indol (**8**) gewählt. Es folgt eine nucleophile Substitutionsreaktion an **8** mit dem DMT-geschützten (*S*)-(-)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker **7**, die das tritylierte, offenkettige Indolnucleosid-Surrogat **9** liefert. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die sekundäre Aminfunktion in **9** mit einer Trifluoracetyl-Schutzgruppe versehen werden muss, um später im automatisierten DNA-Syntheszyklus eine irreversible Acetylierung während des *Capping*-Schrittes zu vermeiden. Der DNA-Baustein **11** wurde unter Standardbedingungen synthetisiert.^[37, 38]

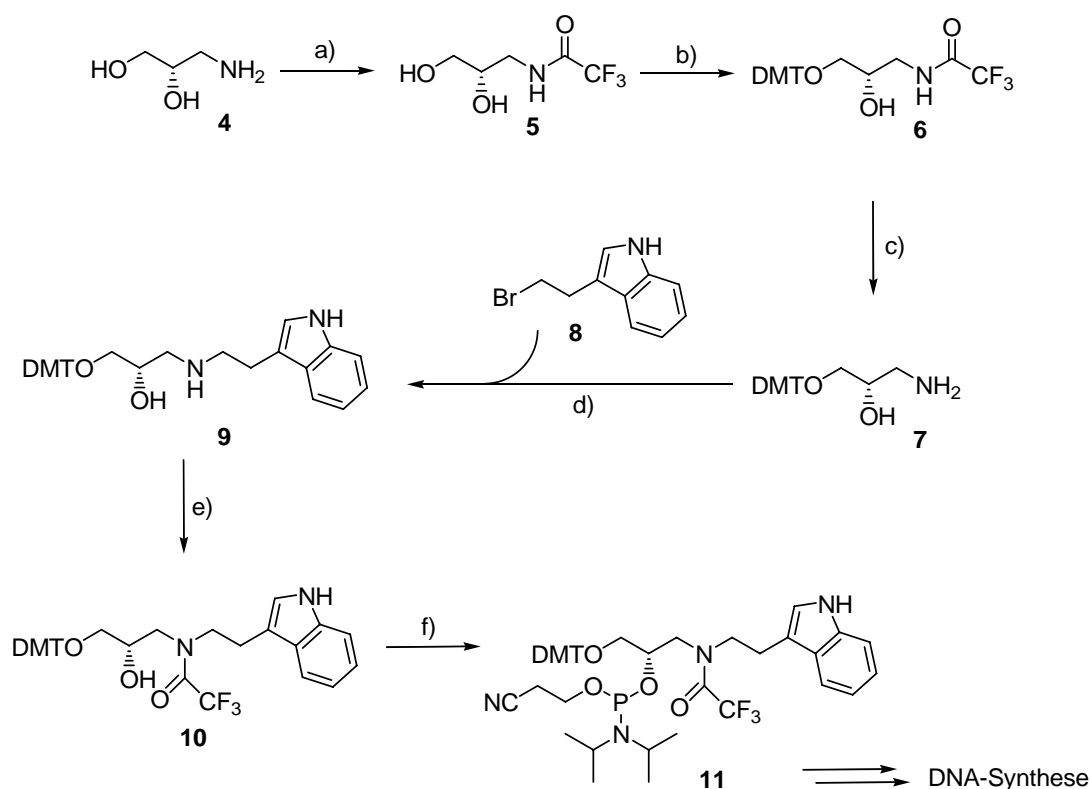


Abb. 4-2: Synthese des Indolderivats **9** und des entsprechenden DNA-Bausteins **11**:
 a) Trifluoressigsäuremethylester (10 eq.), RT, 12 h, 99%; b) DMT-Cl (1 eq.), abs. Pyridin, RT, 12 h, 83%; c) NH₃, MeOH/THF, RT, 12 h, 90%; d) **8** (1 eq.), DIPEA (4 eq.), DMF, RT, 7d (55%); e) Trifluoressigsäureanhydrid (4.5 eq.), Pyridin, DCM, 0 °C, 30 min., RT, 30 Min (84%); f) Et₃N (2.5 eq.), Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.5 eq.), DCM, 45 min., RT (95 %).

Das während der Oxidation entstehende Indolradikal in **9** wurde mittels spektroelektrochemischen UV/Vis-Absorptionsmessungen analysiert. Mit steigendem Potential nimmt die Indol-Absorption bei $\lambda = 290$ nm ab, während eine neue Bande bei $\lambda = 495$ nm entsteht, die dem Indolradikal zugeordnet werden kann. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen von Prütz *et al.*, die das Tryptophanradikal bei $\lambda = 510$ nm detektieren konnten.^[200] Die entstehende Nebenbande bei $\lambda = 405$ nm ist nach Prütz *et al.* ebenfalls dem Indolradikal zuzuordnen.^[200]

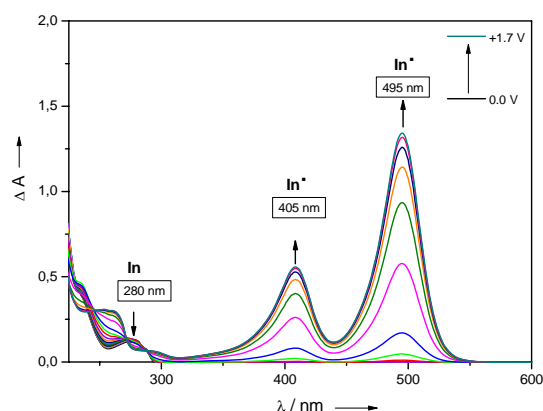


Abb. 4-3: Spektroelektrochemische Absorptionsmessung von **9**, Oxidation, $c(\mathbf{9}) = 2.25 \text{ mM}$ in MeCN, Leitsalz: 150 mM TBAHFP.

4.3 Spektroskopische Untersuchung der Eigenschaften von Indol im Duplex

Das Phosphoramidit **11** (vgl. Abb. 4-2) wurde in MeCN gelöst und in den Syntheseautomaten eingebracht. Zum Einbau von **11** in Oligonucleotide wurde ein verändertes Kupplungsprotokoll mit einer verlängerten Kupplungsdauer von 30 min. (vgl. Kapitel 8.3.2) verwendet, um eine ausreichend gute Kupplungseffizienz zu erhalten.

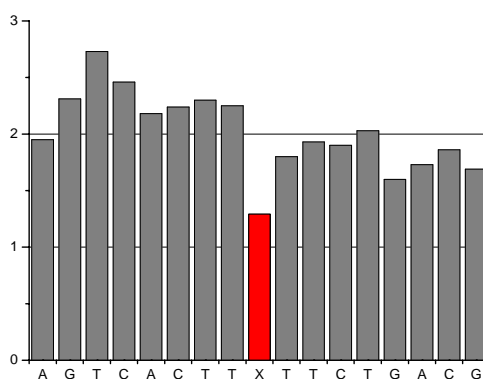


Abb. 4-4: Tritylmonitor der Synthese von indolmodifizierter ssDNA3.

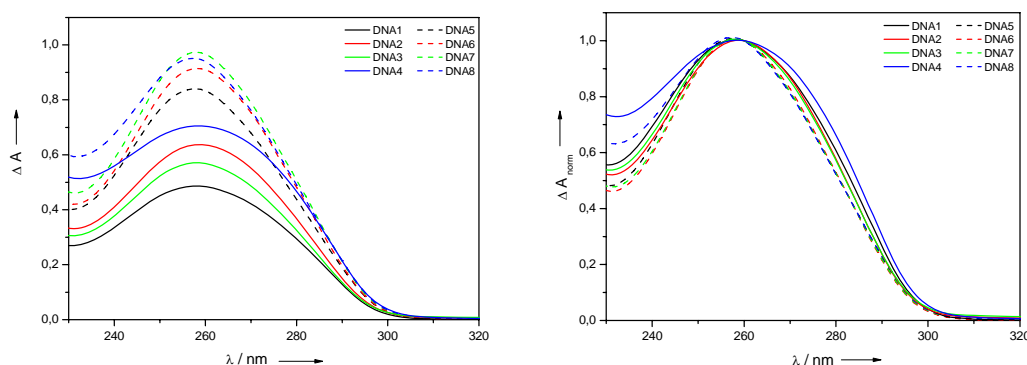


Abb. 4-5: Absorptionsspektren der indolmodifizierten Duplexe **DNA1-4** im Vergleich mit den unmodifizierten Duplexen **DNA5-8**: 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 25 °C. links: absolute optische Dichte, rechts: normierte optische Dichte.

Um den Einfluss der Indolmodifikation auf die Stabilität der Duplexe zu untersuchen, wurden die Schmelztemperaturen von **DNA1-4** bei $\lambda = 260$ nm bestimmt und mit denen von **DNA5-8** verglichen. Wie Tabelle 4-1 zu entnehmen ist, destabilisiert Indol die Duplexe. Dies kann zum einen durch die fehlenden Wasserstoffbrückendonoren und- akzeptoren des Indols erklärt werden. Zum anderen zeigt die Erniedrigung der Schmelztemperaturen um 11 °C bis 15 °C deutlich den Einfluss des acyclischen Linkers als Teil des Nucleosid-Surrogats **9** anstelle der 2'-Desoxyribose in natürlichen Nucleosiden. Durch den um ein C-Atom verkürzten Abstand zwischen der 3'- und 5'-OH-Funktion ist der Linker wesentlich starrer in das DNA-Gerüst eingebaut (Abb. 4-6). Dadurch wird die Struktur der DNA gestört, was die Destabilisierung an dieser Stelle zur Folge hat.



R = natürliche DNA-Basen (A, T, C, G)

Abb. 4-6: Vergleich des acyclischen Linkers zum Einbau von Indol mit der 2'-Desoxyribose der natürlichen DNA-Basen.

Die Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von *Meggers et al.*, die Glycolnucleotide in DNA-Stränge einbauten. Enthielt ein DNA-Duplex nur vereinzelt GNA-Bausteine (GNA =

glycol nucleic acid), so destabilisierten diese den Doppelstrang ($\Delta T_m = -13\text{ °C}$ bis -20 °C).^[212] Ein vollständig aus GNA-Bausteinen aufgebauter Doppelstrang hingegen war im Vergleich zum entsprechenden DNA-Duplex deutlich stabiler ($\Delta T_m = +20\text{ °C}$ bis $+25\text{ °C}$).^[212, 213]

Mittels Schmelztemperaturmessungen wurde auch die Universalität von Indol als Basenersatz untersucht. Dazu wurde exemplarisch in **DNA2** und **DNA3** die Gegenbase zu Indol variiert (**DNA2a-c**, **DNA3a-c**). Die Schmelztemperaturen verhalten sich in beiden Duplex-Sets sehr ähnlich. Die vernachlässigbar geringen Schwankungen von max. 2 °C zeigen, dass die Gegenbase aufgrund fehlender Wasserstoffbrückenbindungen keinen Einfluss auf die Stapelungseigenschaften von Indol hat. Indol weist wenig Präferenz gegenüber einer bestimmten Gegenbase auf und kann als universeller Basenersatz eingesetzt werden.

Tabelle 4-1: Schmelztemperaturbestimmung von **DNA1-8**. $2.5\ \mu\text{M}$ Duplex in $10\ \text{mM Na-P}_i$, pH 7.0, $250\ \text{mM NaCl}$, $260\ \text{nm}$, $10 - 90\text{ °C}$, Heizrate 0.7 °C/min .

Duplex	Smp. [°C]	Duplex	Smp. [°C]	Δ Smp. [°C]
DNA1	59.7	DNA5	70.7	-11.0
DNA2	52.0	DNA6	65.0	-13.0
DNA2a	54.3			
DNA2b	54.2			
DNA2c	53.8			
DNA3	52.9	DNA7	65.8	-12.9
DNA3a	51.8			
DNA3b	53.5			
DNA3c	54.0			
DNA4	56.5	DNA8	71.4	-14.9

Wie bereits erwähnt, kommt es durch den Einbau von Indol über den acyclischen Linker zu einer strukturellen Störung der DNA. Um den Einfluss dieses Linkers noch genauer zu untersuchen, wurden CD-Messungen durchgeführt. Die Spektren zeigen allerdings, dass es sich bei den Doppelsträngen um die typische Konformation einer B-DNA handelt. Die strukturelle Störung durch den Linker scheint daher sehr lokal aufzutreten und der Einfluss auf die gesamte B-DNA ist gering.

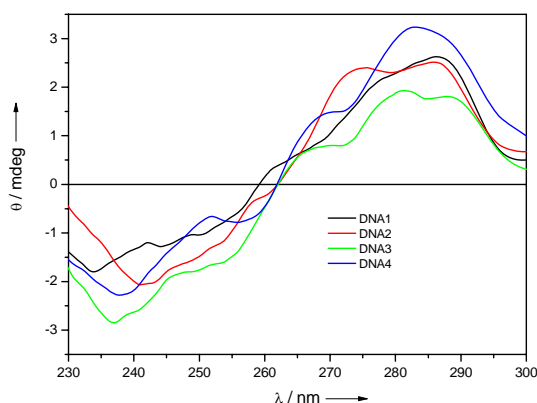


Abb. 4-7: CD-Spektrum der indolmodifizierten Duplexe **DNA1-4**. 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 25 °C.

Zuletzt wurde die Fluoreszenz der indolmodifizierten Duplexe **DNA1-4** gemessen. Dazu wurden sowohl die Einzel- als auch die Doppelstränge im Absorptionsbereich des Indols bei $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm angeregt. Indole, wie das käufliche Derivat **8**, zeigen typischerweise ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 350$ nm (vgl. Abb. 4-8).

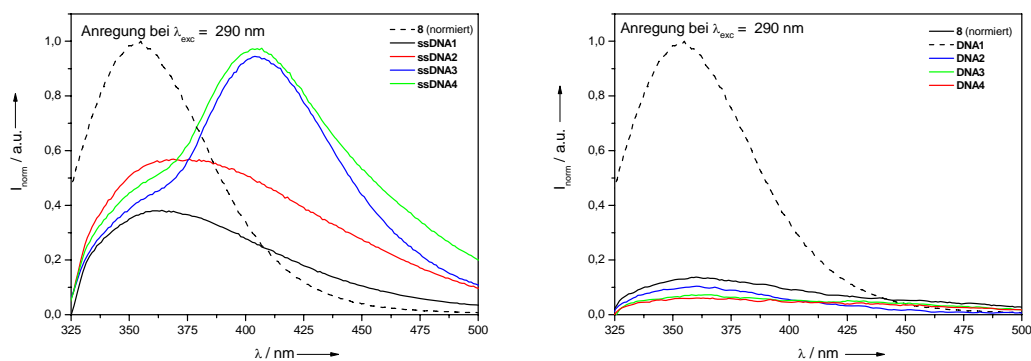


Abb. 4-8: Fluoreszenzspektren von **ssDNA1-4** (links), **DNA1-4** (rechts) im Vergleich zu **8**; $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 25 °C. Die Fluoreszenzspektren sind normiert. Die relative Intensität von **8** ist willkürlich auf 1 normiert und kann nicht mit denen der Oligonucleotide verglichen werden.

Interessant ist daher, dass die Emissionsmaxima der Einzelstränge, bei denen Indol von Pyrimidinbasen umgeben ist (**ssDNA3**, **ssDNA4**), deutlich bathochrom nach $\lambda = 405$ nm verschoben sind (Abb. 4-8, links). Die Fluoreszenzbande deutet auf Exciplexe hin, die im

angeregten Zustand aus der π,π -Wechselwirkung zwischen Indol und den Pyrimidinen entstehen. Die Schulter, die bei $\lambda = 350$ nm zu erkennen ist, zeigt die Anwesenheit des lokal angeregten Zustands von Indol (In^*). Ist Indol von Purinbasen umgeben (**ssDNA1**, **ssDNA2**), tritt die Exciplex-Bildung in wesentlich geringerem Ausmaß auf. Die Emissionsmaxima sind nur leicht nach $\lambda = 370$ nm (**ssDNA1**) und $\lambda = 360$ nm (**ssDNA2**) verschoben. Im hybridisierten Zustand weisen alle Duplexe **DNA1-4** ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 360$ nm auf (Abb. 4-8, rechts). Die Fluoreszenzintensität im Duplex ist auch deutlich geringer gegenüber dem Einzelstrang.

Des Weiteren muss herausgestellt werden, dass die Fluoreszenz des käuflichen Indolderivats **8** durch den Einbau in die DNA mindestens zu 90 % gelöscht wird. In Abb. 4-9 ist exemplarisch der Vergleich der Fluoreszenzspektren der Duplexe **DNA1-4** mit **8** zu sehen.

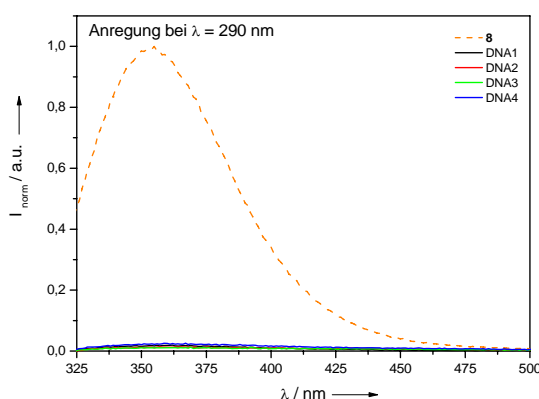


Abb. 4-9: Fluoreszenzspektren von **DNA1-4** im Vergleich mit **8**; $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, 2,5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7,0; 2,5 μM **8** in MeOH, 25 °C.

Um dieses Phänomen zu erklären, muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass Indol im DNA-Strang keine charakteristische Absorptionsbande aufweist. Indol kann also mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm nicht selektiv angeregt werden, da die natürlichen DNA-Basen einen Teil des einstrahlenden Lichts absorbieren. Daher ist es interessant zu klären, ob der Teil des einstrahlenden Lichts, der das Indol anregt, auch wieder über Fluoreszenz abgegeben wird. Dazu wurden die Fluoreszenz-Quantenausbeuten der Oligonucleotide **DNA1-4** sowie des käuflichen Indols **8** bei $\lambda = 290$ nm bestimmt. Außerdem wurde der

Extinktionskoeffizient der Oligonucleotide bei $\lambda = 290$ nm aus den Absorptionsspektren bestimmt. Dies konnte allerdings nur für die Einzelstränge **ssDNA1-4** durchgeführt werden, da im Duplex der Einfluss der molekularen Wechselwirkungen der gegenüberliegenden Basen auf den Extinktionskoeffizienten unbekannt ist. Unter Berücksichtigung etwaiger Pipettierungenauigkeiten wurden für die Einzelstränge **ssDNA1-4** ϵ_{290} -Werte im Bereich zwischen $38.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $50.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt. Für 3-(2-Bromoethyl)indol (**8**) wurde $\epsilon_{290} = 5.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet. Der Anteil von ϵ_{290} (Indol) an ϵ_{290} (DNA) beträgt demnach zwischen 10 % und 13 %. Wenn also nur ca. 10 % des einstrahlenden Lichts vom Indolbaustein absorbiert werden, so erwartet man aufgrund von $\Phi_F(\mathbf{8}) = 0,045$ eine Indolquantenausbeute im Einzelstrang von ca. 0,0045.

Tabelle 4-2: Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F von **ssDNA1-4** und **DNA1-4** im Vergleich zu **8** bei $\lambda = 290$ nm.

	Φ_F (290 nm)		Φ_F (290 nm)
8	0,0447	8	0,0447
ssDNA1	0,0018	DNA1	0,0007
ssDNA2	0,0029	DNA2	0,0007
ssDNA3	0,0044	DNA3	0,0006
ssDNA4	0,0035	DNA4	0,0008

Nur in Umgebung von Pyrimidinen (**ssDNA3**, **ssDNA4**) erreicht Indol diese Quantenausbeute annähernd. Da die Quantenausbeuten insgesamt jedoch sehr gering sind, sollte kritisch angezweifelt werden, ob die vermeintlich stärkere Fluoreszenzlöschung in den Oligonucleotiden mit Purinumgebung (**ssDNA1**, **ssDNA2**) noch im Rahmen der Messgenauigkeit liegt.

Außerdem muss darauf hingewiesen werden, dass eine derartig starke Fluoreszenzlöschung auch durch Ladungstransfer zwischen dem angeregten Indol und den natürlichen DNA-Basen auftreten kann. Für Indol wurde eine Singulett-Energie von $E_{00}(\text{In}^*) = 4.07 \text{ eV}$ ermittelt (vgl. Kapitel 3.1.1). Nach *Rehm-Weller* (vgl. Kapitel 3.1.1) errechnet sich aus dem Oxidationspotential von $E_{\text{ox}}(\text{In}/\text{In}^{*+}) = 1.0 \text{ V}$ ^[70, 116] das Potential des angeregten Indols zu

$E_{\text{ox}}^* (\text{In}^*/\text{In}^{*\cdot+}) = -3.1 \text{ V}$. Photoangeregtes Indol ist also fähig, alle natürlichen DNA-Basen zu reduzieren.

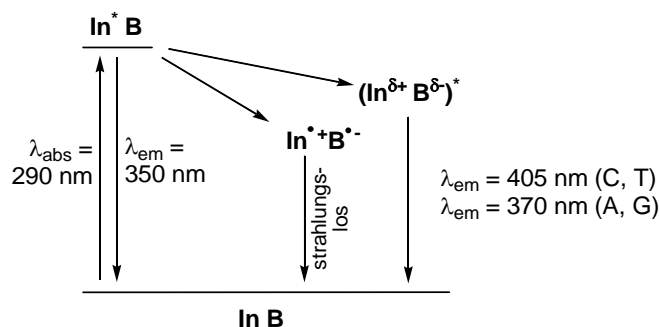


Abb. 4-10: Photochemisch induzierte Ladungstransferprozesse, die zwischen Indol (In) und den DNA-Basen (B) stattfinden können.

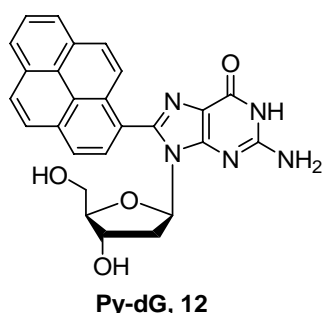
Zur vollständigen Klärung, ob die geringe einstrahlende Lichtmenge oder Ladungstransferprozesse zur Löschung der Indol-Fluoreszenz führen, müssten die Indoldinucleotide InG, InA, InC und InT synthetisiert und zeitaufgelöst optisch untersucht werden.

Aufgrund der äußerst geringen Fluoreszenzquantenausbeute und der Tatsache, dass für Indol keine charakteristische Anregungswellenlänge gewählt werden kann, kann Indol nicht als Fluoreszenzsonde in DNA eingesetzt werden. Im Folgenden soll Indol in seiner Eigenschaft als Lochakzeptor mit den photoinduzierbaren Lochdonoren PydG und Ethidium kombiniert werden.

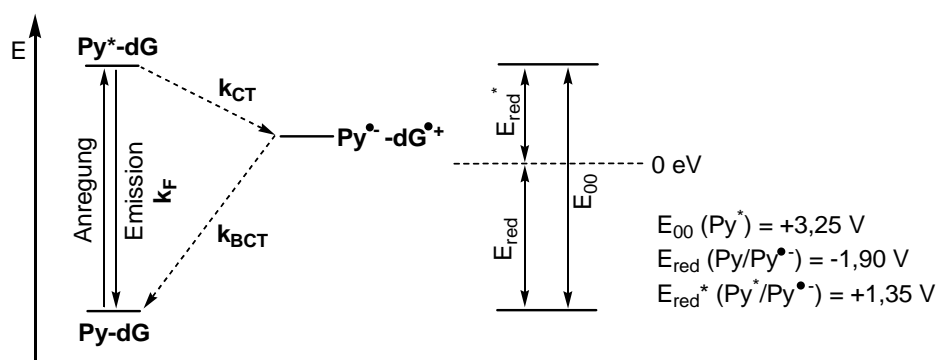
4.4 Untersuchung eines DETEQ-Systems aus PydG und Indol

4.4.1 Hintergrundinformation zu PydG

Wie bereits in Kapitel 3.5 erwähnt, wurden in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* die vier natürlichen Nucleoside A, G, C und dU mit dem Pyrenchromophor modifiziert und optisch charakterisiert (vgl. Abb. 3-37).^[22, 40] In diesem Kapitel soll das Hauptaugenmerk auf das pyrenmodifizierte G **12** gelegt werden.

Abb. 4-11: Strukturformel von PydG (**12**).

Guanin besitzt mit $E_{\text{ox}}(\text{G}/\text{G}^{++}) = +1,30 \text{ V}$ das geringste Oxidationspotential der natürlichen DNA-Basen.^[70] Das Reduktionspotential des photoangeregten Pyrens (Py^*), welches sich aus dem Potential von Pyren $E_{\text{red}}(\text{Py}/\text{Py}^{\bullet-}) = -1,9 \text{ V}$ ^[214] und der Singulett-Energie $E_{00}(\text{Py}^*) = 3,25 \text{ eV}$ ^[42] zu $E_{\text{red}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{\bullet-}) = +1,35 \text{ V}$ berechnet, reicht aus, um Guanin zu oxidieren. Nach *Rehm-Weller* (vgl. Kapitel 3.1.1) kann demnach ein intramolekularer oxidativer Lochtransfer mit einer Triebkraft von ca. $\Delta G = -0,05 \text{ V}$ vorausgesagt werden.

Abb. 4-12: Intramolekularer oxidativer Lochtransfer in PydG (**12**). Erläuterungen: k_{CT} : Rate des Ladungstransfers, k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

Durch frühere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass in PydG (**12**) ein intramolekularer Lochtransfer unter Bildung der ladungsgetrennten Spezies $\text{Py}^{\bullet-}\text{-dG}^{++}$ erfolgt und dieser Lochtransfer abhängig vom pH-Wert ist.^[215] Aufgrund von optisch-spektroskopischen Vorexperimenten mit PydG ist zu erwarten, dass PydG als photochemische Sonde zur Untersuchung des oxidativen Ladungstransfers geeignet ist.^[19, 22, 40, 215]

In Titrationsexperimenten wurde untersucht, ob Ladungstransfer von PydG auf kleine Peptide möglich ist.^[21] In Anlehnung an die Experimente mit PydU-modifizierter DNA (vgl. Abb. 3-25, Kapitel 3.3) wurden Versuche mit PydG-modifizierter DNA und den Tripeptiden Lys-Lys-Lys und Lys-Trp-Lys durchgeführt. Während der Titration mit Lys-Trp-Lys wurde eine Fluoreszenzlöschung von ca. 30 % erreicht, während die Zugabe von Lys-Lys-Lys zu keiner Veränderung der Emission führte. Diese Beobachtung spricht für einen Ladungstransfer von PydG auf die aromatische Indolseitenkette des Tryptophans und bekräftigt die Annahme, dass Indol als Lochfalle eingesetzt werden kann. In weiteren Experimenten wurden die Tripeptide mit einem 4-Nitrobenzoat-Rest (Nb) als Elektronenakzeptor modifiziert. Hier konnte in beiden Fällen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz aufgrund des Abfangens der negativen Ladung des Pyrenradikalanions $\text{Py}^{\cdot-}$ durch Nb verzeichnet werden. Allerdings wurde der Ladungstransfer durch die Anwesenheit des zusätzlichen Lochakzeptors auf das Tripeptid Nb-Lys-Trp-Lys noch effizienter.^[21]

Neben den bereits aufgeführten Eigenschaften konnten *Valis et al.* interessanterweise zeigen, dass PydG auch als Hybridisierungslabel verwendet werden kann. Der Pyrenchromophor verändert aufgrund der unterschiedlich starken π -Wechselwirkung mit den benachbarten DNA-Basen im Einzel- bzw. Doppelstrang seine optischen Eigenschaften. So kann die Hybridisierung zum Duplex sowohl in der Absorption als auch in der Fluoreszenz erkannt werden.^[21]

4.4.2 Studien zum oxidativen Ladungstransfer mit PydG als Lochdonor

In Anlehnung an die Titrationsexperimente mit kleinen Peptiden aus Kapitel 4.4.1 sollen die Ladungstransferprozesse in DNA, die durch Lochinjektion von PydG (**12**) ausgelöst werden, genauer untersucht werden. Dazu wird **12** als Lochdonor zusammen mit Indol (**3**) als Lochakzeptor kovalent in Oligonucleotide eingebaut. Das pyrenmodifizierte Nucleosid **12** ist über eine Pd-katalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung gut zugänglich.^[40] Um PydG in der automatisierten DNA-Festphasensynthese einsetzen zu können, wurde die exocyclische Aminfunktion in der 2-Position des Guanins als Amidin und die 5'-OH-Gruppe mit der

4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe geschützt. Der geschützte Baustein **13** wurde von *L. Valis* zur weiteren Synthese zur Verfügung gestellt.

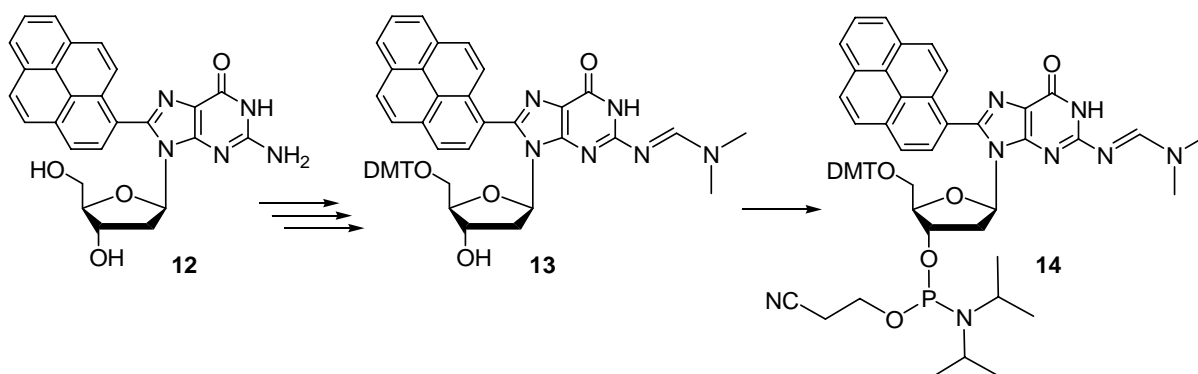


Abb. 4-13: Synthese des DNA-Bausteins **14** aus **13**: DIPEA (3.6 eq.), Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.8 eq.), DCM, 45 min., RT (95 %).^[21]

Das Phosphoramidit **14** wurde unter den bereits publizierten Reaktionsbedingungen synthetisiert und in DCM gelöst in den DNA-Syntheseautomaten eingebracht.^[21] Um eine gute Kupplungseffizienz zu erreichen, wurde ein Protokoll mit einer verlängerten Kupplungsdauer von 15 min. verwendet.^[21] Indol wurde als Baustein **11** (Abb. 4-2) wie oben beschrieben in das Oligonucleotid eingebaut.

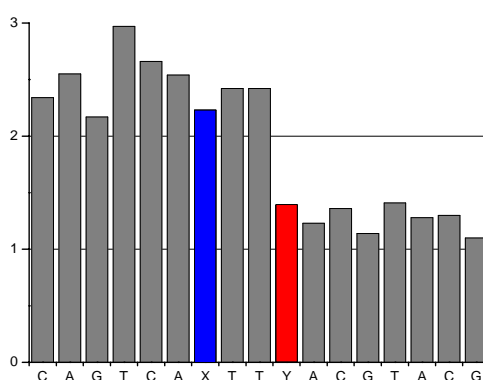
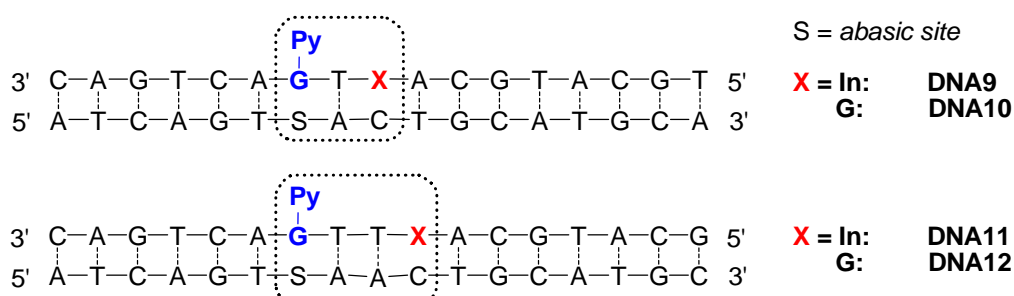


Abb. 4-14: Tritylmonitor der Synthese von PydG- und indolmodifizierter **ssDNA11**, X = PydG, Y = Indol.

Die Abspaltung und Aufarbeitung der Oligonucleotide erfolgte nach Standardprotokoll. Die Reinigung wurde mittels RP-HPLC durchgeführt. Als Detektion wurde die Pyren-Absorption

bei $\lambda = 340$ nm verwendet. Die gereinigten DNA-Stränge wurden mittels ESI-MS charakterisiert.

Es wurden die PydG-modifizierte Oligonucleotidsequenzen **ssDNA9** und **ssDNA11** synthetisiert, bei denen sich Indol ein oder zwei Basenpaare entfernt vom Lochdonor PydG befindet.



Obwohl bekannt ist, dass die Gegenbase von **12** keinen signifikanten Einfluss auf die optischen Eigenschaften von PydG hat,^[21] wurde hier eine abasische Stelle (S) gegenüber PydG eingebaut, um in allen Duplexen eine optimale Hybridisierung zu erreichen. Als Referenzduplexe dienen **DNA10** und **DNA12**, in denen Indol durch G ersetzt wurde.

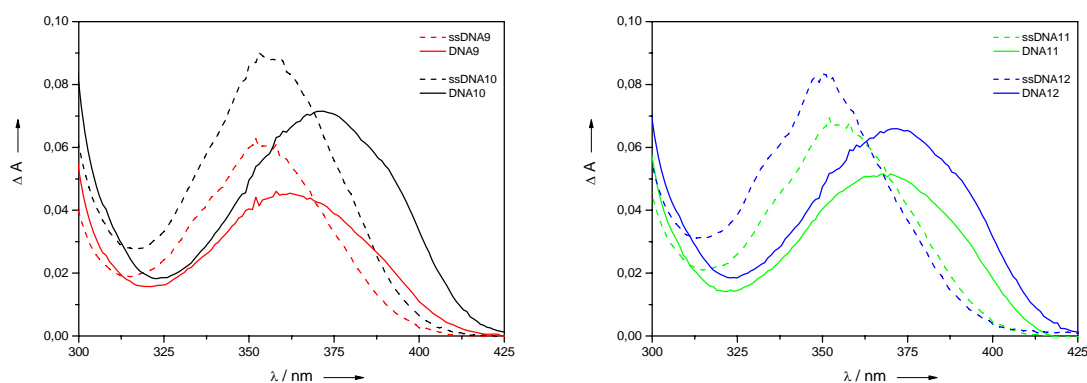


Abb. 4-15: Absorptionsspektren von **DNA9-12**; 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 25 °C.

Die Absorptionsspektren der PydG-modifizierten Einzelstränge **ssDNA9-12** weisen ein charakteristisches Maximum bei $\lambda = 350$ nm auf. Durch Hybridisierung mit dem

entsprechenden Gegenstrang kann der Pyrenchromophor besser mit seinen Nachbarbasen innerhalb des Basenstapels wechselwirken, was im Absorptionsspektrum zu einer bathochromen Verschiebung des Maximums führt. Im Fall von **DNA10** und **DNA12** beträgt die Verschiebung ca. 20 nm.

Ist zusätzlich Indol im Doppelstrang vorhanden (**DNA9**, **DNA11**), so verringert sich die Verschiebung auf 10 nm bis 15 nm. Die Interkalation des Pyrens in den Basenstapel wird vermutlich durch den acyclischen Linker des Indolbausteins verschlechtert, was zu einer geringeren Verschiebung in der Pyren-Absorption führt. Der Abstand zwischen PydG und Indol beeinflusst dabei deutlich die mögliche π -Wechselwirkung zwischen Pyren und den benachbarten Basen. Daher weist **DNA9** die geringste bathochrome Verschiebung auf.

Um die Hybridisierung der Duplexe auch optisch nachvollziehen zu können, wurde exemplarisch das Absorptionsspektrum von **DNA11** in Abhängigkeit von der Temperatur aufgenommen. Bei niedrigen Temperaturen liegt der Duplex **DNA11** vollständig hybridisiert vor und weist ein Absorptionsmaximum von ca. 365 nm auf, was auf eine starke Wechselwirkung zwischen Pyren und den benachbarten Basen zurückzuführen ist.

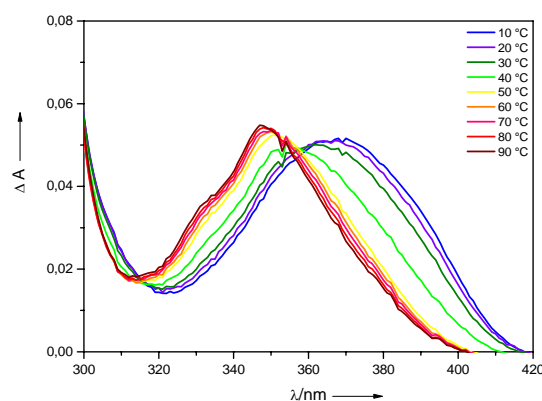


Abb. 4-16: Temperaturabhängig Absorptionsmessung von **DNA11**. 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl.

Bei Erwärmung der Probe auf 40 °C dehybridisiert der Duplex allmählich und die π,π -Wechselwirkung des Pyrens im Basenstapel verändert sich. Ab 50 °C verschiebt sich das Absorptionsmaximum nach 350 nm. Der isobestische Punkt bei 360 nm zeigt den einfachen

Übergang zwischen Pyren im Doppelstrang und dem dehybridisierten Chromophor im Einzelstrang an.

Der Verlauf der Dehybridisierung, die mit steigender Temperatur stattfindet, deckt sich auch mit den Ergebnissen aus Schmelztemperaturmessungen. So ergab sich für **DNA11** eine Schmelztemperatur von 42.3 °C. Eine Zusammenfassung der Schmelztemperaturen gibt Tabelle 4-3. Die Daten zeigen wiederum, dass der acyclische Linker in **3** zu einer Herabsetzung der Duplexstabilität um ca. 13 °C führt.

Tabelle 4-3: Schmelztemperaturen von **DNA9-12** bei 260 nm; 2.5 µM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 260 nm, 10 – 90 °C, Heizrate 0.7 °C/min.

Duplex	Smp. [°C]	Duplex	Smp. [°C]	Δ Smp. [°C]
DNA9	46.4	DNA10	58.5	- 12.1
DNA11	42.3	DNA12	55.0	- 12.7

Für die Fluoreszenzmessungen wurde eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm (isosbestischer Punkt, vgl. Abb. 4-16) gewählt. Wie erwartet, bildet PydG Exciplexe und zeigt daher eine strukturlose, intensive Fluoreszenzbande (Abb. 4-17). In Anwesenheit von Indol als Ladungsakzeptor (**DNA9**, **DNA11**) wird die Fluoreszenz aufgrund von Ladungstransfer durch die DNA deutlich gelöscht. Es zeigt sich allerdings, dass der Ladungstransfer über die kurze Distanz von einem Basenpaar ($F_q = 51$ %) deutlich effizienter funktioniert als über zwei Basenpaare ($F_q = 32$ %) (F_q -Berechnung vgl. Kapitel 3.7.2.4).

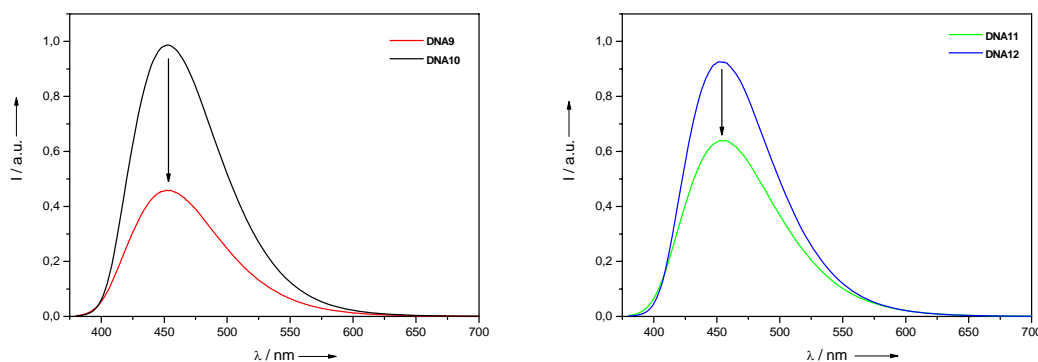


Abb. 4-17: Emissionsspektren von **DNA9-12**; $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm; 2.5 µM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 25 °C.

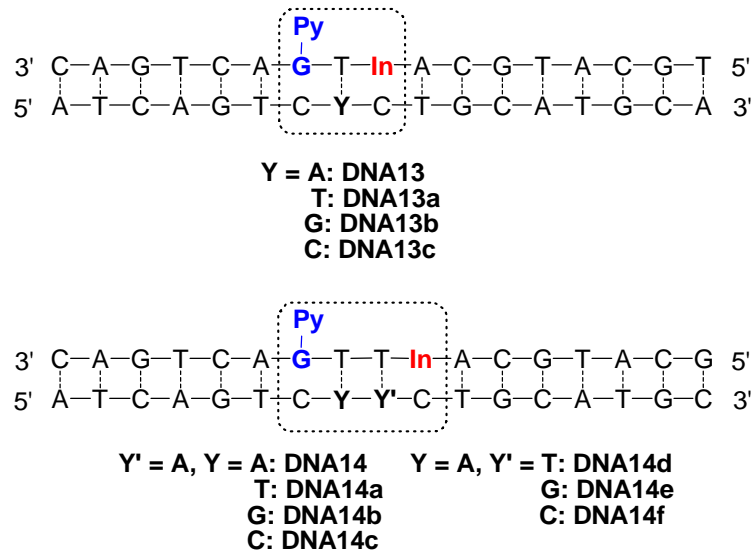
Valis hatte in ihren Arbeiten PydG mit 7-Deazaguanin (Z) als Lochakzeptor kombiniert. Sie erhielt über eine kurze Distanz von einem dazwischen liegenden Basenpaar eine Fluoreszenzlöschung von 10 – 20 %. Überraschenderweise konnte sie über einen längeren Abstand zwischen Donor und Akzeptor keinen Ladungstransfer beobachten.^[19]

Da die elektronische Kopplung zwischen PydG und Indol offensichtlich ausreicht, um Ladungstransfer über ein oder zwei dazwischen liegende Basenpaare zu beobachten, wird im folgenden Kapitel das DETEQ-Konzept zum Nachweis von Basenfehlpaarungen überprüft.

4.4.3 Anwendung des DETEQ-Konzepts im Donor-Akzeptor-Paar PydG-Indol

Im Hinblick auf einen potentiellen DNA-Assay soll der PydG- und indolmodifizierte Strang eine fluoreszente Oligonucleotidsonde darstellen, mit der eine natürliche DNA-Sequenz auf die Anwesenheit einer Einzelbasenmutation getestet wird.

Zur Überprüfung der DETEQ-Fähigkeit des PydG-Indol-Systems wurden aus den Einzelsträngen **ssDNA9** und **ssDNA11** die Duplex-Sätze **DNA13/DNA13a-c** und **DNA14/DNA14a-f** hergestellt und ihre Fluoreszenzen gemessen. Um dabei möglichst nah an natürlichen Oligonucleotiden zu bleiben, wurde in den Gegensträngen die abasische Stelle (S) durch Cytidin ersetzt.



Es wurden verschiedene Anregungswellenlängen untersucht. Zunächst wurde $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$, der isosbestische Punkt der temperaturabhängigen Absorptionsmessung (siehe Abb. 4-16) verwendet. Außerdem wurde im duplexsensitiven Pyren-Absorptionsbereich bei $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ und im spezifischen Bereich des Pyrens im Einzelstrang bei $\lambda_{\text{exc}} = 335 \text{ nm}$ angeregt.

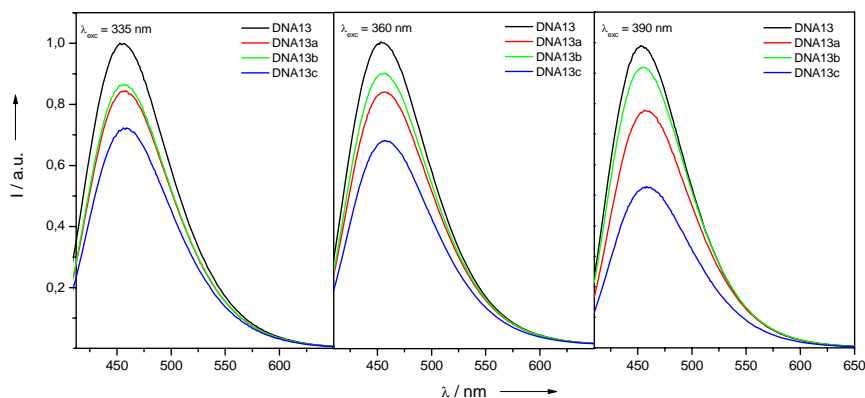


Abb. 4-18: Emissionsspektren von **DNA13/DNA13a-c**. $\lambda_{\text{exc}} = 335 \text{ nm}$ (links), $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ (Mitte) und $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ (rechts). $2.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , pH 7.0, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Liegt ein Basenpaar zwischen PydG und Indol, so kann bei $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ mit 30 %iger Fluoreszenzlöschung bezogen auf den korrekt gepaarten Duplex **DNA13** nur die Fehlpaarung

–TC– (**DNA13c**) eindeutig detektiert werden (Abb. 4-18, Mitte). Die Abnahme der Emissionsintensität kann auf 45 % erhöht werden, wenn bei $\lambda_{\text{exc}} = 390$ nm angeregt wird (Abb. 4-18, rechts). Eine Anregung im charakteristischen Einzelstrangabsorptionsbereich bringt keine Verbesserung für die Detektion der einzelnen Basenfehlpaarungen (Abb. 4-18, links).

Über zwei dazwischen liegende Basenpaare verläuft der Ladungstransfer zwischen PydG und Indol zwar nicht mehr so effizient wie über ein Basenpaar, dennoch variiert die Fluoreszenzintensität aufgrund von Basenfehlpaarungen zwischen Donor und Akzeptor.

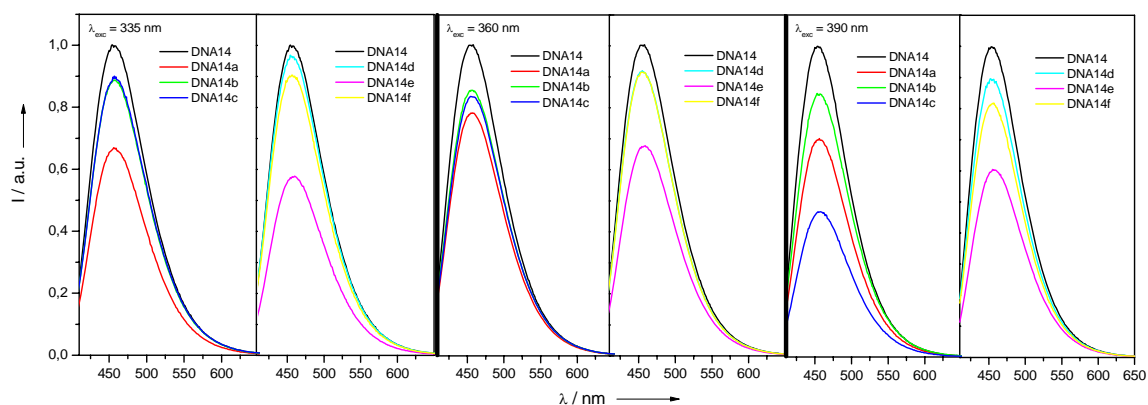


Abb. 4-19: Emissionsspektren von **DNA14/DNA14a-f**: $\lambda_{\text{exc}} = 335$ nm (links), $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm (Mitte) und $\lambda_{\text{exc}} = 390$ nm (rechts), 5.0 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 25 °C.

Die Basenfehlpaarungen benachbart zu PydG (Y) liefern bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm Intensitätsabnahmen zwischen 10 % und 20 % (**DNA14a-c**) bezogen auf den korrekt gepaarten Duplex **DNA14**. Eine Fluoreszenzlöschung bis zu 30 % wird durch ein TG-Basenpaar neben Indol (Y') (**DNA14e**) erreicht (Abb. 4-19, Mitte). Durch eine Verschiebung der Anregungswellenlänge in den einzelstrangsensitiven Bereich der Pyren-Absorption ($\lambda_{\text{exc}} = 335$ nm) kann die Detektion von –TT– neben PydG (**DNA14a**) und –TG– neben Indol (**DNA14e**) um jeweils 10% verbessert werden (Abb. 4-19, links). Interessanterweise wird die Fluoreszenzlöschung bei einem TC-Paar neben PydG (**DNA14c**) um das 3,5 fache erhöht, wenn die Anregung im duplexsensitiven Wellenlängenbereich der Pyren-Absorption bei $\lambda_{\text{exc}} = 390$ nm erfolgt (Abb. 4-19, rechts).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Basenfehlpaarungen zwischen PydG und Indol den Ladungstransfer effizienter machen, was die stärkere Löschung der Fluoreszenz zeigt. Ähnliches Verhalten zeigte sich auch in den SNP-Detektions-Experimenten von *Valis et al.*, die als Donor Ethidium über einen acyclischen Linker in Oligonucleotide inkorporiert und mit 7-Deazaguanin kombiniert hatte (vgl. dazu Kapitel 3.7.2.4).^[16] Vermutlich wird das starre Linker-Indol-System durch benachbarte Basenfehlpaarungen flexibler und kann so besser als Ladungsakzeptor mit dem PydG als Ladungsdonor elektronisch koppeln. Durch Variation der Anregungswellenlänge konnte die Diskriminierung einzelner Fehlpaarungen verbessert werden. Obwohl der Ladungstransfer über zwei Basen Abstand nicht mehr so effizient abläuft, variieren die Emissionsintensitäten dennoch je nach Basenfehlpaarung. Unabhängig von der Anregungswellenlänge kann eine TG-Fehlpaarung, die neben Indol liegt (**DNA14e**), mit mindestens 30 % Fluoreszenzlöschung detektiert werden.

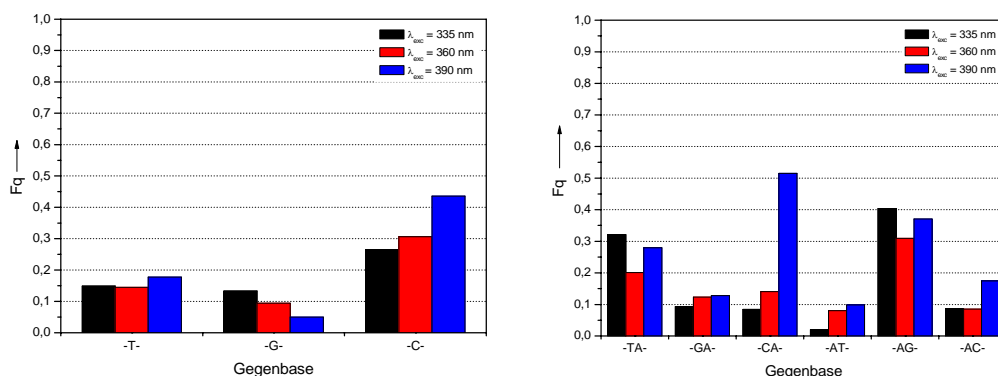


Abb. 4-20: Berechnete Fq-Werte der Fluoreszenzlöschung für **DNA13a-c** (links) und **DNA14a-f** (rechts).

Grundsätzlich erfüllt die Kombination aus PydG als Lochdonor und Indol als Lochakzeptor die Anforderungen des DETEQ-Konzepts. Fast alle berechneten Fq-Werte liegen jedoch unter 50 %. Ein DNA-Assay zur SNP-Detektion kann aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse nicht entwickelt werden, da eine erfolgreiche und vor allem spezifisch genaue Detektion von einzelnen Basenfehlpaarungen nicht möglich ist.

4.5 Untersuchung eines DETEQ-Systems aus Ethidium und Indol

4.5.1 Hintergrundinformation zu Ethidium

Im Folgenden werden Untersuchungen mit ethidiummodifizierten Oligonucleotiden vorgestellt. Formell handelt es sich dabei um ein Phenanthridinchromophor **16**, dass aufgrund seiner engen Verwandtschaft mit dem 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium-bromid (Ethidiumbromid, **15**, vgl. Kapitel 3.4) hier als Ethidium (Et) bezeichnet wird.

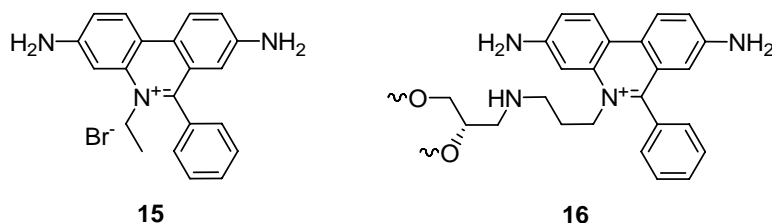


Abb. 4-21: Ethidiumbromid **15** und das als Ethidium bezeichnete Phenanthridinchromophor **16**.

Aus zahlreichen Veröffentlichungen und aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* ist bekannt, dass Ethidium als artifizielles Nucleosid Ladungstransferprozesse in DNA induzieren kann.^[18, 19, 38, 52, 54, 58, 149, 216-221] Mit einem Potential von $E_{\text{red}}^* (\text{Et}^{*+}/\text{Et}^{\bullet}) = 1,2 \text{ V}^{[222]}$ und einer Singulett-Energie für die Photoanregung des Ethidiums mit $E_{00} (\text{Et}^{*+}) = 2,2 \text{ eV}^{[222]}$ ergibt sich nach *Rehm-Weller* (vgl. Kapitel 3.1.1), dass es nicht möglich ist, Guanin mit $E_{\text{ox}} (\text{G}/\text{G}^{+\bullet}) = 1,3 \text{ V}^{[70, 222]}$ durch angeregtes Ethidium zu oxidieren. Ebenso können Cytosin und Thymin mit $E_{\text{red}} (\text{T}/\text{T}^{\bullet-}) = E_{\text{red}} (\text{C}/\text{C}^{\bullet-}) = -1,8 \text{ V}^{[223]}$ nicht durch photoangeregtes Ethidium ($E_{\text{ox}}^* (\text{Et}^{*+}/\text{Et}^{2+}) = -0,5 \text{ V}^{[220]}$) reduziert werden. Ladungstransfer kann demzufolge nur dann von Ethidium ausgehen, wenn geeignete Akzeptoren zu Verfügung gestellt werden.^[19, 52, 219-222] 7-Deazaguanin (Z) wurde bereits als Ladungsakzeptor verwendet. Aufgrund seines Oxidationspotentials von $E_{\text{ox}} (\text{Z}/\text{Z}^{+\bullet}) = 1,0 \text{ V}^{[222]}$ gelang ein oxidativer Lochtransfer, der durch Löschung der Fluoreszenz von photoangeregtem Ethidium beobachtet werden konnte.^[16, 18, 19, 52, 54, 58, 149, 216-221] Ein Beispiel wurde bereits in Kapitel 3.4 vorgestellt.

Im Folgenden soll der Ladungstransfer zwischen Ethidium (**16**) als Donor und Indol (**3**) als Akzeptor genauer untersucht werden. Dazu werden beide Chromophore kovalent über den bereits vorgestellten Aminopropandiol-Linker **7** in die DNA eingebaut.

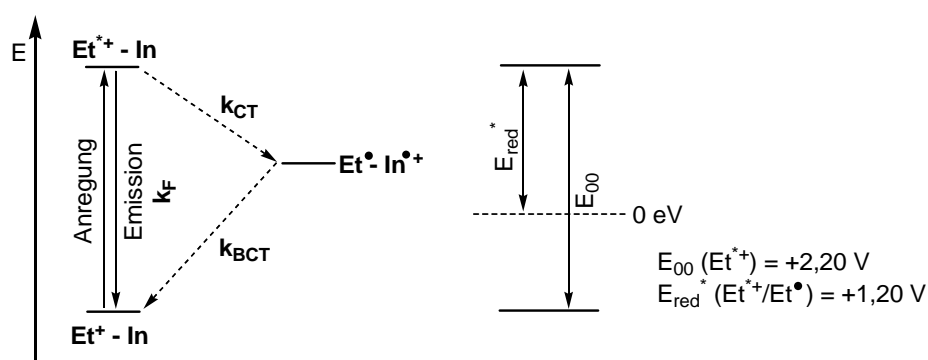


Abb. 4-22: Photoangeregtes Ethidium als Oxidationsmittel im System Ethidium-Indol, Erläuterungen: k_{CT} : Rate des Ladungstransfers, k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

4.5.2 Studien zum oxidativen Ladungstransfer mit Ethidium als Lochdonor

Die Synthese des acyclischen Ethidiumsbasensurrogats **21** erfolgt ausgehend von kommerziell erhältlichem 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin (**17**) und wurde nach Literaturangaben durchgeführt.^[37, 38] In Abb. 4-23 sind die einzelnen Syntheseschritte aufgezeigt. Sie sollen hier nur kurz zusammengefasst werden.

Die beiden exocyclischen Aminfunktionen in **17** müssen zunächst mit Chlorameisensäureallylester geschützt werden. Anschließend erfolgt die Alkylierung mit 1,3-Diodpropan am Stickstoff in der 5-Position im Phenanthridingerüst. Durch Umsetzung des Iodids **19** mit dem Aminopropandiol-Linker **7** wird das Ethidiumnucleosid **20** erhalten. Im nächsten Schritt werden die Alloc-Schutzgruppen von **20** durch Trifluoracetylgruppen ersetzt. Dies geschieht in zwei Schritten und es wird Verbindung **22** erhalten. Werden die Alloc-Schutzgruppen erst nach der DNA-Festphasensynthese Pd-katalysiert abgespalten, erfolgt eine Allylübertragung auf eine der exocyclischen Aminfunktionen des Ethidiumchromophors, die selbst durch Überschuss verschiedener Allylakzeptoren nicht verhindert werden kann.^[221] Durch Freisetzung der exocyclischen Aminfunktionen erfolgt ein

Farbumschlag von gelb auf pink, daher ist diese Reaktion optisch gut zu verfolgen. Im Anschluss daran kann die Phosphoramidit-Synthese von **22** nach **23** durchgeführt werden.

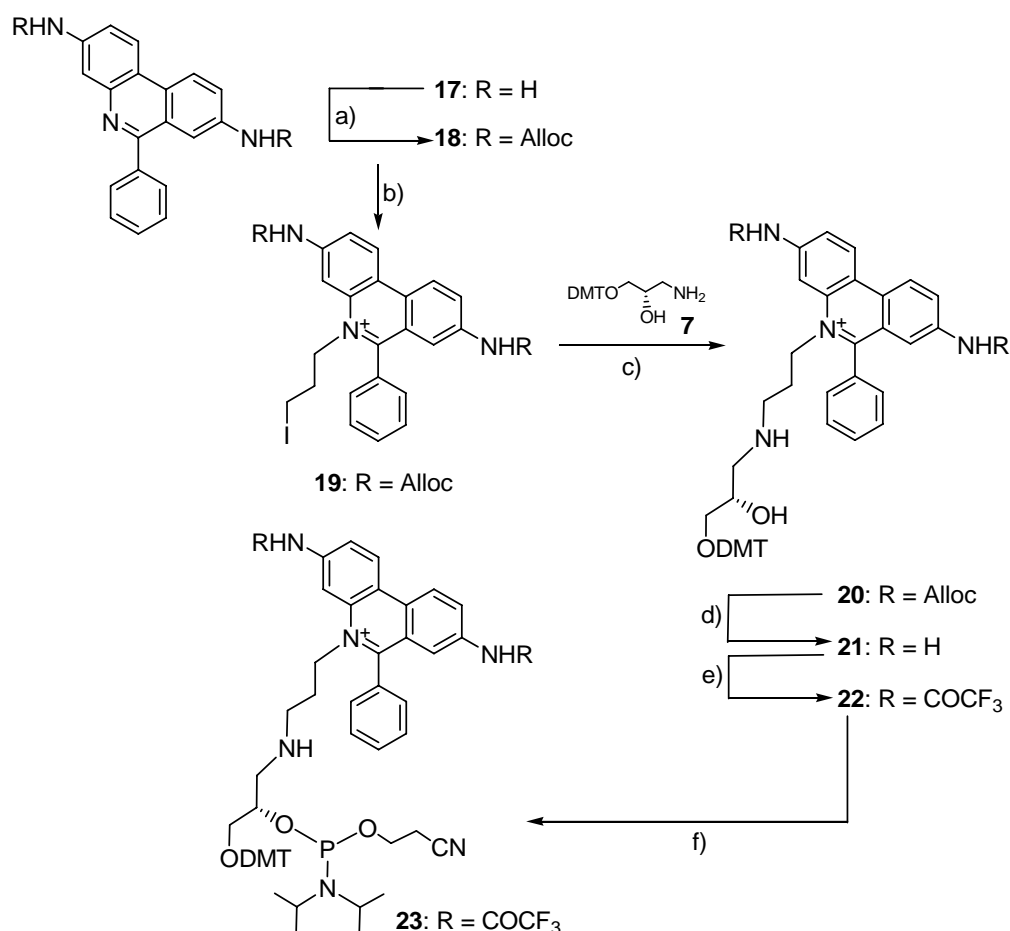


Abb. 4-23: Syntheschema zur Darstellung des Ethidium-Nucleosidsurrogats **21** sowie des entsprechenden DNA-Bausteins **23**.^[37, 38] a) ClCOOCH₂CH=CH₂ (17 eq.), DCM, 48h, RT (94%); b) I-(CH₂)₃-I (10 eq.), THF, 9 d, 70 °C (95 %); c) **7** (1.5 eq.), DIPEA (2 eq.), DMF, 40 h, RT (88 %); d) Bu₃SnH (3 eq.), Pd(PPh₃)₄ (2 mol%), PPh₃ (20 mol%), DCM/H₂O 300/1, 90 min., RT (64 %); e) (CF₃CO)₂O (6 eq.), Pyridin (12 eq.), DCM, 10 min., 0 °C, 10 min., RT, 79 %; f) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2 eq.), DIPEA (4 eq.), DCM, 45 min., RT (95%).

Phosphoramidit **23** wurde in MeCN gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Eine gute Kupplungseffizienz wird mit Hilfe eines modifizierten Protokolls mit einer verlängerten Kupplungsdauer von 1 h innerhalb zwei Zyklen erreicht. Indol wurde als Baustein **11** wie oben beschrieben in das Oligonucleotid eingebaut.

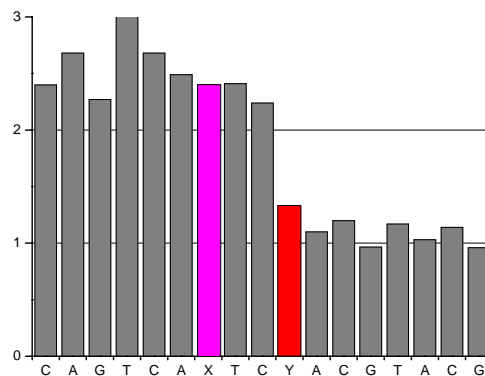
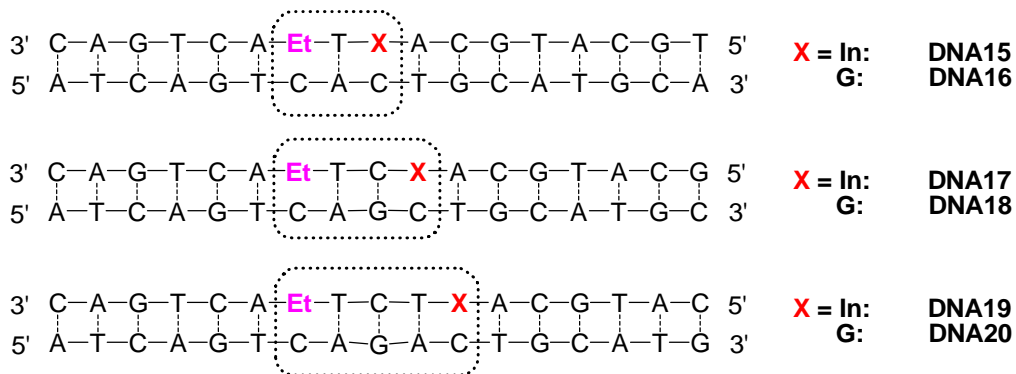


Abb. 4-24: Tritylmonitor der Synthese von ethidium- und indolmodifizierter **ssDNA17**, X = Ethidium, Y = Indol.

Abspaltung und Aufarbeitung der ethidiummodifizierten Oligonucleotide erfolgten nach Vorschriften aus der Literatur.^[37, 38] Die Reinigung wurde mittels RP-HPLC durchgeführt. Als Detektion wurde die Ethidium-Absorption bei $\lambda = 530$ nm sowie die Emission ($\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm) verwendet. Die gereinigten DNA-Stränge wurden mittels ESI-MS charakterisiert.



Analog zur Kombination aus PydG und Indol wurden die ethidiummodifizierten Oligonucleotide **ssDNA15**, **ssDNA17** und **ssDNA19** synthetisiert, bei denen Donor (Ethidium) und Akzeptor (Indol) im Abstand von einem, zwei und drei Basenpaaren kovalent in die Oligonucleotidsequenz eingebaut wurden. In früheren Arbeiten wurde herausgefunden, dass die Gegenbase nur geringfügig Einfluss auf die Interkalation von Ethidium hat,^[37] daher wurde als Gegenbase willkürlich C gewählt. Als Referenzduplexe dienen **DNA16**, **DNA18**

und **DNA20**, bei denen Indol durch G ausgetauscht wurde und somit kein Ladungsakzeptor zu beobachten sein sollte.

Die Absorptionsspektren der Oligonucleotide zeigen ein Maximum bei $\lambda = 520$ nm, was typisch für interkaliertes Ethidium ist.^[151, 153, 224, 225] Dabei ist es unerheblich, ob Ethidium im Einzel- oder im Doppelstrang vorliegt. Das entspricht den Ergebnissen von Cosa *et al.*^[225] Aus den Messungen kann geschlossen werden, dass Ethidium bereits im Einzelstrang mit den Nachbarbasen wechselwirkt, da „freies“ Ethidium ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 480$ nm zeigt.^[225] Es gibt keinen nennenswerten Unterschied zwischen den Duplexen mit Ladungsakzeptor (**DNA15**, **DNA17**, **DNA19**) und denen ohne Akzeptor (**DNA16**, **DNA18**, **DNA20**). Abb. 4-25 zeigt stellvertretend für die einzelnen ethidiummodifizierten Duplexe die Absorptionsspektren von **DNA15** und **DNA16**.

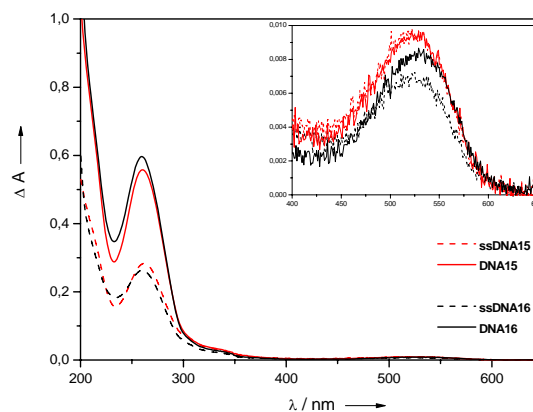


Abb. 4-25: UV/Vis-Absorptionsspektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne Ladungsakzeptor (**DNA15**, **DNA16**); 5.0 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 20 °C.

Um zu überprüfen, ob Ladungstransfer zwischen Ethidium und Indol stattfindet, wurde die Fluoreszenz der Duplexe **DNA15-20** gemessen. Es wurde eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 530$ nm gewählt. Die Emissionsmaxima liegen im Bereich zwischen $\lambda = 610$ nm und $\lambda = 620$ nm, was wiederum typisch für interkaliertes Ethidium ist.^[151, 153, 224, 225] „Freies“ Ethidium in Wasser emittiert mit einem Maximum bei $\lambda = 635$ nm.^[225] Es wird angenommen, dass in Wasser die Fluoreszenz durch Protonierung des angeregten Zustands gelöscht wird, während dies bei interkaliertem Ethidium nicht der Fall ist, da die beiden Aminfunktionen

durch die DNA vor einer Protonierung geschützt werden.^[153, 224, 226] Daher steigt die Fluoreszenzintensität in den Referenzsystemen ohne Ladungsakzeptor (**DNA16**, **DNA18**, **DNA20**) vom Einzelstrang zum Duplex an. In den Ladungstransfersystemen –Et-(X)_n-In– (**DNA15**, **DNA17**, **DNA19**) wird diese Intensitätszunahme nur in **DNA17** sehr deutlich beobachtet. In **DNA15** und **DNA19** hingegen sinkt die Emission im Duplex.

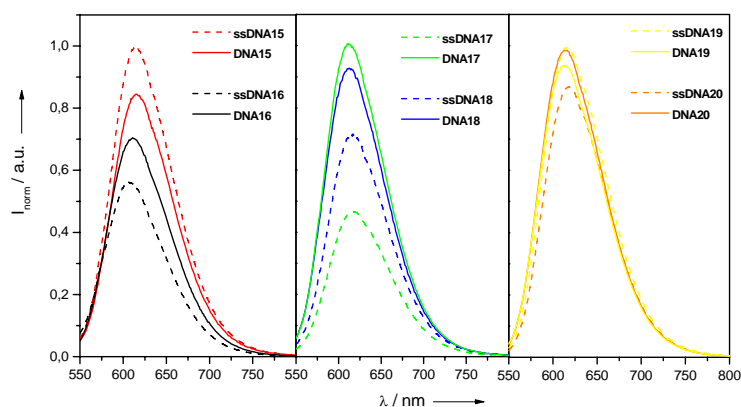


Abb. 4-26: Fluoreszenzspektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne Ladungsakzeptor (**DNA15-20**); 5.0 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 20 °C.

Das unterschiedliche Emissionsverhalten in **DNA15**, **DNA17** und **DNA19** kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass Donor und Akzeptor jeweils über einen acyclischen Linker in die Oligonucleotide eingebaut wurden. Die lokale Störung durch die beiden Linker ist vermutlich so stark, dass Ethidium je nach Abstand zwischen Donor und Akzeptor besser oder schlechter in den Basenstapel interkalieren kann. Demzufolge lassen die Ergebnisse aus den Fluoreszenzmessungen keinen eindeutigen Rückschluss auf mögliche Ladungstransfer-Reaktionen zwischen Ethidium und Indol zu.

Um den Einfluss dieser beiden acyclischen Linker zu überprüfen, wurden **DNA15-20** mittels CD-Spektroskopie auf ihre Konformation untersucht. Die Spektren zeigen allerdings, dass es sich bei den Doppelsträngen um die typische Konformation einer B-DNA handelt. Vermutlich tritt die strukturelle Störung nur lokal auf, so dass sie durch CD-Spektroskopie nicht detektiert werden kann. Abb. 4-27 zeigt die CD-Spektren von **DNA15** und **DNA16** stellvertretend für die restlichen Duplexe.

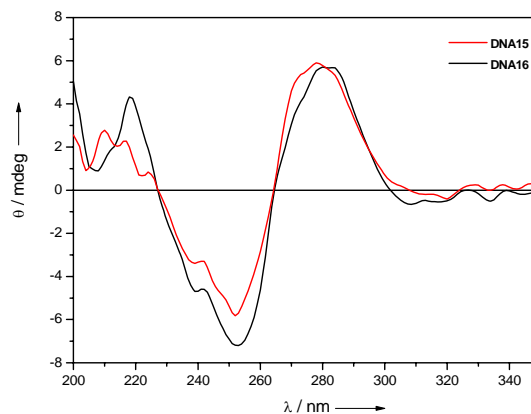
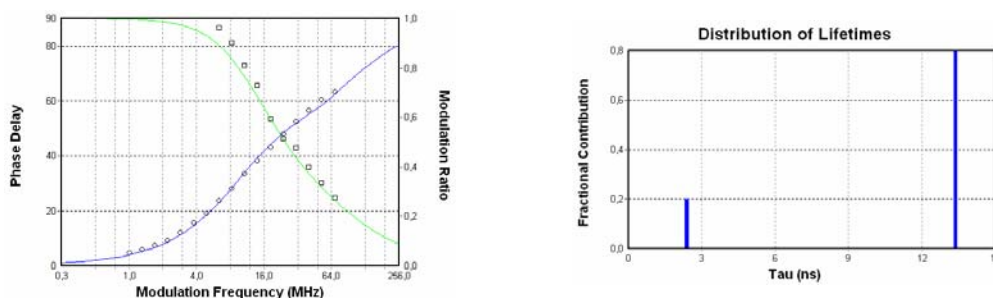


Abb. 4-27: CD-Spektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne Ladungsakzeptor (**DNA15**, **DNA16**); 5.0 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 25 °C.

Um dennoch überprüfen zu können, ob bzw. wie effizient Ladungstransfer zwischen Ethidium und Indol stattfindet, wurden die Fluoreszenzlebenszeiten τ der Duplexe **DNA15-20** mittels Phasenmodulation bestimmt. Dazu wurden die Proben mit einem Laser bei 488 nm angeregt. Die Emission wird bezüglich des Anregungssignals verzögert, was dazu führt, dass die Lebenszeit anhand der Phasenverschiebung ermittelt werden kann. Abb. 4-28 zeigt die Messdaten der Lebenszeitbestimmung exemplarisch am Beispiel von **DNA15** und **DNA16**.

Die Messung ergab ein biexponentielles Zerfallsverhalten des angeregten Ethidiums (Et^{*}). Es wurden pro Duplex jeweils eine kurzlebige und eine langlebige Ethidium-Spezies ermittelt. Die Lebenszeiten des angeregten Ethidiums (Et^{*}) in **DNA15-20** sowie deren Verteilung sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.



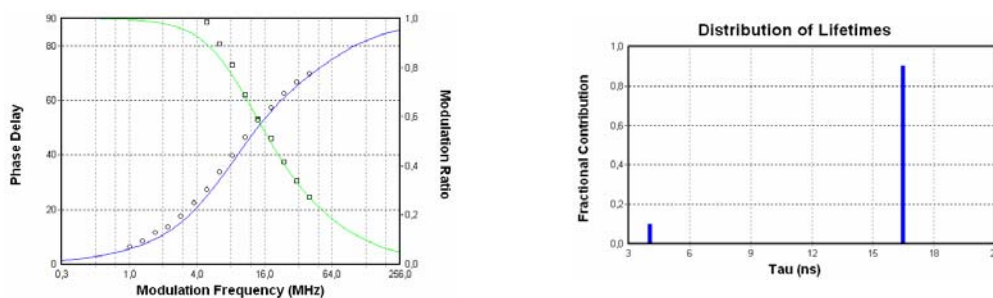


Abb. 4-28: Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten von **DNA15** (oben) und **DNA16** (unten) mittels Phasenmodulation, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $5.0 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , $\text{pH } 7.0$, 250 mM NaCl , $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabelle 4-4: Ermittelte Fluoreszenzlebenszeiten τ_F von Ethidium in **DNA15-20**. Vergleich zwischen Oligonucleotidsystemen mit und ohne Ladungsakzeptor.

	τ_1 [ns]	Verteilung	τ_2 [ns]	Verteilung	τ_{Mittel} [ns]
DNA15	2.38 ± 0.01	0.203 ± 0.0005	13.4 ± 0.008	0.797	11.2
DNA16	4.05 ± 0.04	0.097 ± 0.0008	16.5 ± 0.01	0.903	15.3
DNA17	2.63 ± 2.4	$1.07 \cdot 10^{-7} \pm 0.0009$	10.2 ± 0.01	1.000	10.2
DNA18	2.10 ± 0.1	0.0538 ± 0.002	14.2 ± 0.03	0.946	13.5
DNA19	1.81 ± 0.01	0.0845 ± 0.0006	12.8 ± 0.01	0.915	11.8
DNA20	9.73 ± 1.4	$1.74 \cdot 10^{-7} \pm 0.0004$	16.1 ± 0.006	1.000	16.1

Laut *Olmsted et al.* ergeben sich für gebundenes Ethidium Lebenszeiten von $\tau_1 = 5.7 \text{ ns}$ (41%) und $\tau_2 = 24.5 \text{ ns}$ (59 %).^[153] Daraus ergibt sich eine mittlere Lebenszeit von $\tau = 16.8 \text{ ns}$. In dieser Größenordnung liegen auch die erhaltenen mittleren Lebenszeiten der Referenzduplexe **DNA16**, **DNA18** und **DNA20**. Ist Indol als Ladungsakzeptor (**DNA15**, **DNA17**, **DNA19**) vorhanden, so sinkt τ_{Mittel} um 3 - 4 ns. Diese kürzeren Lebenszeiten des photoangeregten Ethidiums (Et^*) belegen Ladungstransferprozesse innerhalb der Duplexe. Die Rate für den Ladungstransfer zwischen Ethidium und Indol lässt sich aus den ermittelten Lebenszeiten (vgl. Kapitel 3.1.2) berechnen.

Tabelle 4-5: Berechnete Raten k_{CT} für den Ladungstransfer zwischen Ethidium und Indol über eine Distanz von ein bis drei Basenpaaren.

Duplex	k_{CT} [s^{-1}]
DNA15 (-Et T In-)	$2.39 \cdot 10^7$
DNA17 (-Et TC In-)	$2.40 \cdot 10^7$
DNA19 (-Et TCT In-)	$2.26 \cdot 10^7$

Erstaunlicherweise liegen die Raten für den Ladungstransfer zwischen Ethidium und Indol über ein dazwischen liegendes Basenpaar –EtXIn– deutlich unter den Raten, die in den Arbeitsgruppen *Fiebig* und *Wagenknecht* für ein Ethidium-Z-System ermittelt wurden. Sie bestimmten Werte im Bereich $k_{CT} = 10^{10} - 10^{11} \text{ s}^{-1}$.^[20]

Interessant ist außerdem, dass der Ladungstransfer im Ethidium-Indol-System zwar langsam, jedoch unabhängig von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor abzulaufen scheint. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Resultaten von *Barton et al.*,^[18] steht aber im Widerspruch zu den Arbeiten von *Valis*, die in Oligonucleotiden mit Ethidium und Z durchaus distanzabhängigen Ladungstransfer beobachtete.^[19, 20] Über einen Abstand von einer Base konnte *Valis* mittels zeitaufgelöster transientser Absorptionsmessung eine Zeitkomponente von 150 ps abschätzen, während über größere Distanzen nur Werte im ns-Bereich ermittelt werden konnten.^[19] Abb. 4-29 zeigt einen Vergleich der Ladungstransferraten k_{CT} zwischen Ethidium und Indol mit denen des Ethidium-Z-Systems von *Valis*.

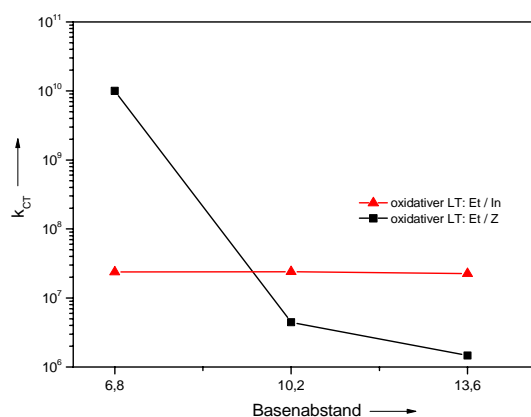


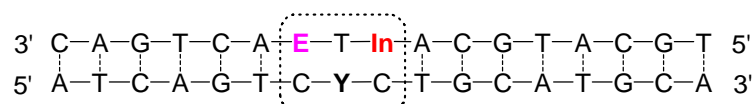
Abb. 4-29: Ladungstransferraten k_{CT} zwischen Ethidium und Indol in den DNA-Duplexen **DNA15**, **DNA17** und **DNA19** (rot), berechnet aus den ermittelten Fluoreszenzlebenszeiten; 5.0 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0. Im Vergleich dazu die Raten des Ladungstransfers zwischen Ethidium und Z (schwarz) aus den Arbeiten von *Valis*.^[19, 20]

Die Unterschiede in den beiden Systemen können wohl darauf zurückgeführt werden, dass die konformelle Störung der DNA im Ethidium-Indol-System wegen der beiden acyclischen Linker bedeutend stärker ist als in der Kombination Ethidium/Z. Dadurch wird die

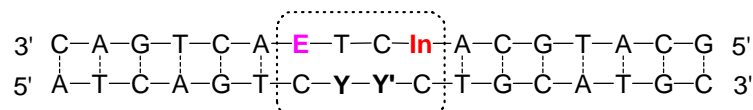
elektronische Kopplung des Ethidiumchromophors mit dem Basenstapel geschwächt, was zur Verschlechterung des Ladungstransfers zwischen Ethidium und Indol führt.

4.5.3 Anwendung des DETEQ-Konzepts im Donor-Akzeptor-Paar Ethidium-Indol

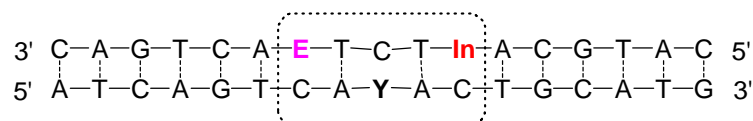
Obwohl der Ladungstransfer zwischen Ethidium und Indol ziemlich langsam verläuft, soll im Folgenden untersucht werden, ob einzelne Basenfehlpaarungen über Fluoreszenzlöschung detektiert werden können.



Y = A: DNA15
T: DNA15a
G: DNA15b
C: DNA15c



Y' = G, Y = A: DNA17 Y = A, Y' = C: DNA17d
T: DNA17a A: DNA17e
G: DNA17b T: DNA17f
C: DNA17c



Y = G: DNA19
C: DNA19a
A: DNA19b
T: DNA19c

Zur Überprüfung des DETEQ-Konzepts im Ethidium-Indol-System wurden die Duplex-Sätze DNA15/DNA15a-c, DNA17/DNA17a-f und DNA19/DNA19a-c hergestellt und ihre Fluoreszenzen gemessen.

Liegt ein Basenpaar zwischen Ethidium und Indol (**DNA15/DNA15a-c**), kann aus den Fluoreszenz-Daten keine Aussage über eine möglich Fehlpaarungsdiskriminierung getroffen werden, da die Emissionsintensitäten der einzelnen Duplexe sehr ähnlich zueinander sind (Abb. 4-30, rechts). Dies ist auch verständlich, wenn man berücksichtigt, dass die Chromophore Ethidium und Indol durch fehlende Wasserstoffbrückenbindungen zu den Gegenbasen den Duplex bereits deutlich stören. Der Einfluss einer weiteren Störung durch eine Basenfehlpaarung wird demnach gering eingeschätzt.

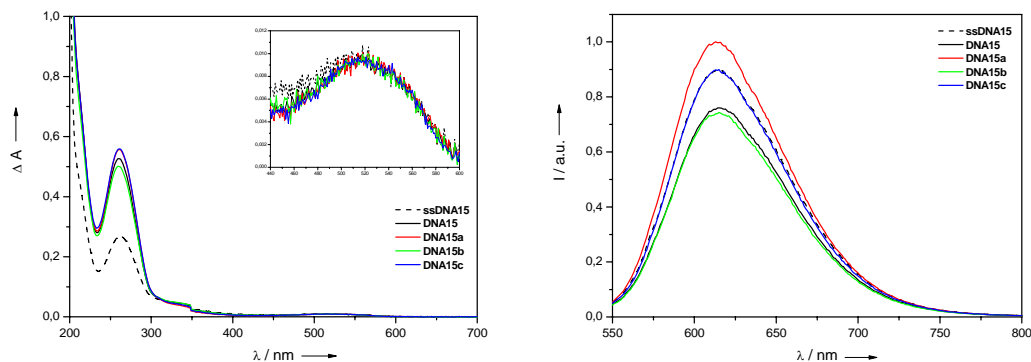


Abb. 4-30: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von **DNA15/DNA15a-c**; $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$. $5.0 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , $\text{pH } 7.0$, 250 mM NaCl , $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

In den Duplex-Sets **DNA17/DNA17a-f**, die zwei Basenpaare zwischen Ethidium und Indol beinhalten, ist der Anstieg der Fluoreszenz vom Einzel- zum Doppelstrang sehr deutlich zu erkennen (Abb. 4-31, rechts). Das deutet darauf hin, dass Ethidium hier trotz der Störung durch den Linker des Indols optimal in den Basenstapel interkalieren kann. Basenfehlpaarungen beeinflussen die Fluoreszenzeigenschaft von **DNA17**. So löscht der Ladungstransfer über ein TT-Basenpaar neben Ethidium (**DNA17a**) die Fluoreszenz der korrekt gepaarten **DNA17** um knapp 40 %. Ähnlich wird die Emissionsintensität in **DNA17e** mit einem CA-Paar neben Indol verringert ($F_q = 35 \%$). Die restlichen Fehlpaarungen in **DNA17b/c/d/f** führen zu F_q -Werten zwischen 5 % und 25 % (F_q -Berechnung vgl. Kapitel 3.7.2.4).

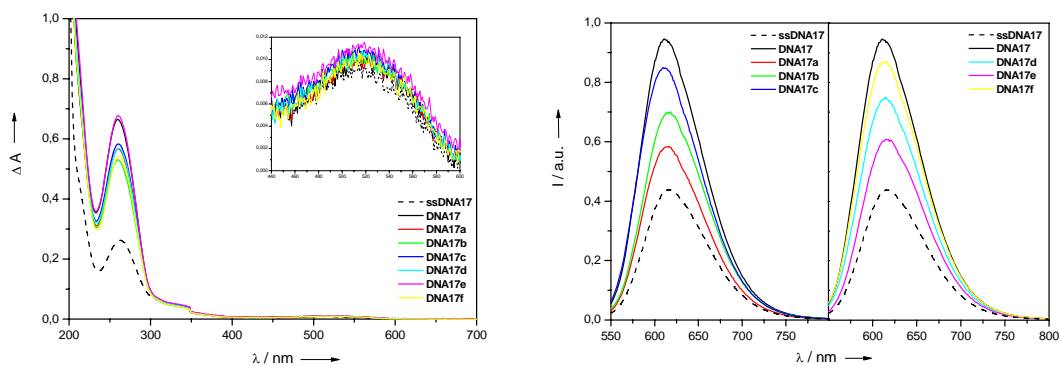


Abb. 4-31: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von **DNA17/DNA17a-f**; $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$. $5.0 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , $\text{pH } 7.0$, 250 mM NaCl , $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

In **DNA19** ist eine geringe Emissionsabnahme vom Einzel- zum Doppelstrang zu beobachten, die vermutlich sowohl aufgrund schlechterer Interkalation des Ethidium in den Basenstapel als auch durch Ladungstransfer zustande kommt. Die einzelnen Fehlpaarungen können durch weitere Löschung der Fluoreszenz erkannt werden. Mit 45 % wird die Emission am stärksten durch Ladungstransfer über ein CA-Paar (**DNA19b**) gelöscht. Mit -CC- (**DNA19a**) wird eine Abnahme der Intensität um 35 %, mit -CT- (**DNA19c**) um von 25 % erreicht.

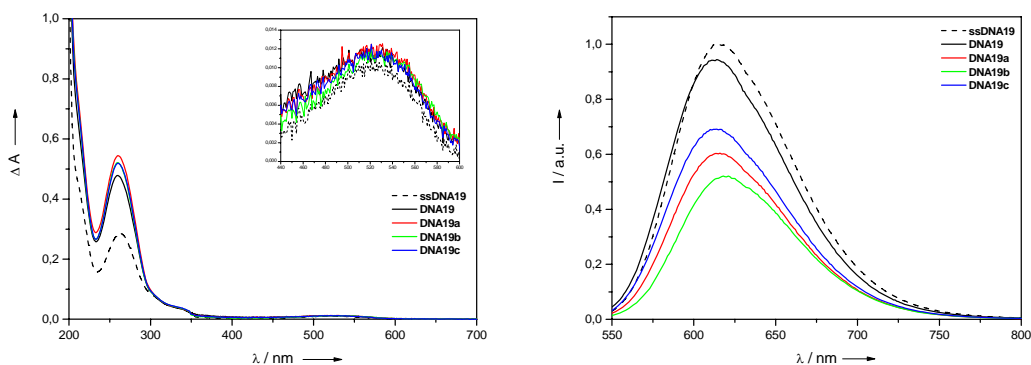


Abb. 4-32: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von **DNA19/DNA19a-c**; $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$. $5.0 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , $\text{pH } 7.0$, 250 mM NaCl , $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Einführung von zwei Linker-Bausteinen den Duplex stark stört. Zwar zeigt sich in den CD-Messungen keine Veränderung der B-DNA-Struktur, allerdings deuten die Unregelmäßigkeiten in den Fluoreszenzspektren

eindeutig darauf hin. Aufgrund der in Kapitel 4.5.2 bestimmten Ladungstransfer-Raten k_{CT} sollten sich die korrekt gepaarten Duplexe **DNA15**, **DNA17** und **DNA19** in ihrer Fluoreszenz nahezu identisch verhalten. Das unterschiedliche Emissionsverhalten kann also nur strukturelle Ursachen haben.

Die strukturelle Beeinträchtigung in **DNA15** ist aufgrund des geringen Abstands zwischen den beiden Linker-Bausteinen so groß, dass die Detektion von Fehlpaarungen in **DNA15a-c** unmöglich wird, da diese weitere Störung keine zusätzliche Auswirkung auf das Emissionsverhalten hat. Mit zwei dazwischen liegenden Basenpaaren wird im Ethidium-Indol-System **DNA17** anscheinend ein Abstand erreicht, der die Interkalation von Ethidium in den Basenstapel begünstigt. Demzufolge ist hier eine Detektion nach dem DETEQ-Konzept möglich. Allerdings wird bestenfalls mit **DNA17a** (-TT- neben Ethidium) und **DNA17e** (-CA- neben Indol) eine Fluoreszenz-Löschung zwischen 30 % und 38 % erreicht. In **DNA19** konnten Basenfehlpaarungen ebenfalls nach dem DETEQ-Konzept erkannt werden, da die Fehlpaarung von zwei natürlichen TA-Paaren benachbart ist, die Wasserstoffbrücken zueinander ausbilden und dadurch die Beeinträchtigung durch die beiden Linker von der Störung durch die Basenfehlpaarung separieren. Es werden hier F_q -Werte bis zu 45 % durch **DNA19b** (-CA-) erreicht.

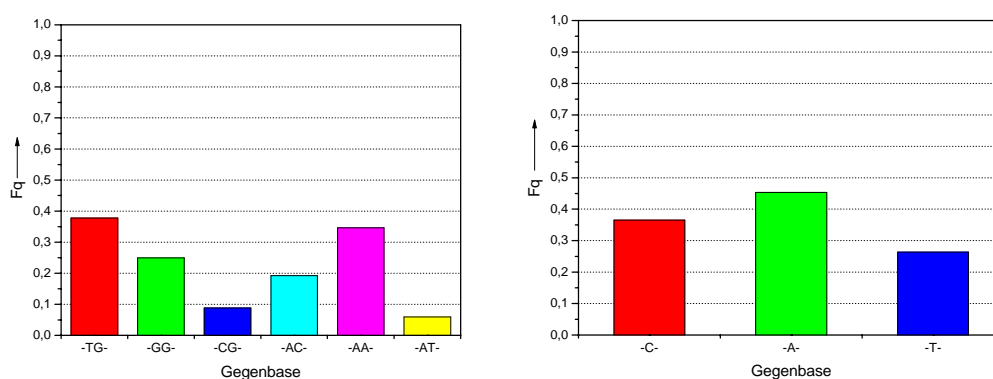


Abb. 4-33: Berechnete F_q -Werte der Fluoreszenzlöschung für **DNA17a-f** (links) und **DNA19a-c** (rechts).

Grundsätzlich ist auch im System Ethidium-Indol zu sagen, dass die Anforderungen des DETEQ-Konzepts erfüllt werden. Es kann allerdings aufgrund der strukturellen Störung des Systems nicht angewendet werden. Der Ladungstransfer von Ethidium auf Indol kann unter

Umständen verbessert werden, wenn anstelle des acyclischen Linker-Indol-Systems **3** das Indolnucleosid **2** (siehe Kapitel 4.1) verwendet wird. Dadurch würden sich vergleichbare strukturelle Bedingungen wie im System Ethidium-Z von *Valis* ergeben.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Indol (**3**) konnte erfolgreich als acyclische Variante einer DNA-Base synthetisiert und über den bereits etablierten Aminopropandiol-Linker **7** in die DNA eingebaut werden. Die optische Charakterisierung der indolmodifizierten DNA zeigte, dass die Anwesenheit von Indol lediglich in einer leichten Verbreiterung der DNA-Absorptionsbande zwischen $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 290$ nm erkennbar ist. Unterschiedliche Nachbarbasen beeinflussen die Stapelungseigenschaften des Indols nicht. Aufgrund von fehlenden Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren kann Indol als universeller Basenersatz angesehen werden. Diese Annahme konnte mittels Schmelztemperaturmessungen bestätigt werden. Fehlende Wasserstoffbrücken, sowie der im Vergleich zu 2'-Desoxyribose um ein Kohlenstoffatom verkürzte Aminopropandiol-Linker destabilisieren den DNA-Duplex deutlich. Allerdings stört der acyclische Baustein die B-Struktur der DNA nur lokal. Da es nicht möglich ist, Indol selektiv anzuregen, liegen die Fluoreszenzquantenausbeuten unter 0.5 %. Indol kann somit nicht als Fluoreszenzsonde eingesetzt werden.

Indol konnte allerdings in seiner Eigenschaft als Lochakzeptor mit verschiedenen Lochdonoren kombiniert werden. Indol bildet dabei ein Radikalkation $\text{In}^{*\cdot}$, das durch sofortige Deprotonierung in das stabile Indolradikal In^{\cdot} übergeht. Das Radikal In^{\cdot} konnte in spektroelektrochemischen Messungen eindeutig nachgewiesen werden. Das Donor-Akzeptor-System PydG-Indol zeigte effizienten Ladungstransfer über ein dazwischen liegendes Basenpaar und konnte aufgrund von Fluoreszenzlöschung ($F_q = 50$ %) optisch verfolgt werden. Über einen längeren Abstand von zwei Basenpaaren verschlechterte sich der Transfer. Dennoch war es grundsätzlich möglich, selbst über zwei dazwischen liegende Basen Fehlpaarungen im Duplex nach dem DETEQ-Konzept zu erkennen. Allerdings konnte eine spezifische Diskriminierung einzelner fehlgepaarter Basen nicht vorgenommen werden, da die Intensitätsunterschiede nicht stark genug waren.

In der Kombination aus Ethidium als Donor und Indol als Akzeptor konnte Ladungstransfer über Sequenzen von ein bis drei Basenpaaren nachgewiesen werden. Wie die Raten, die aus Fluoreszenzlebenszeitenmessungen berechnet werden konnten, zeigen, scheint dieser distanzunabhängig zu verlaufen. Im Vergleich mit Systemen aus Ethidium und 7-Deazaguanin (Z) ^[18, 20] ergibt das hier verwendete Donor-Akzeptor-Paar deutlich langsamere Transferraten über einen Abstand von einer dazwischen liegenden Base. Dies kann unter anderem daran liegen, dass die konformelle Störung durch zwei sehr nah benachbarte acyclische artifizielle DNA-Basen für einen effizienten Ladungstransfer zu groß wird. Die Diskriminierung von Basenfehlpaarungen nach dem DETEQ-Konzept gelang erst ab einem Donor-Akzeptor-Abstand von zwei dazwischen liegenden Basen. Diese Distanz scheint für die beiden Sonderbausteine am günstigsten zu sein, da hier auch eine optimale Interkalation des Ethidiums in den Duplex aufgrund des Fluoreszenzanstiegs vom Einzel- zum Doppelstrang angenommen werden kann. Die spezifische Unterscheidung einzelner Basenfehlpaarungen war leider auch in diesem DETEQ-Paar nicht möglich.

5 2PydU als nucleosidischer Elektronendonator

5.1 Hintergrund zu pyrenmodifizierten 2'-Desoxyuridinen

Wie bereits in Kapitel 3.5 aufgezeigt, wurden in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* die Syntheseprotokolle der Pyrenmodifikationen aller vier natürlichen Nucleoside (PydU, PydC, PydG (**12**) und PydU (**24**)) entwickelt (vgl. dazu Abb. 3-37, Kapitel 3.5).^[22, 40] Nun soll das Hauptaugenmerk auf pyrenmodifizierte 2'-Desoxyuridine gelegt werden. Im bislang bekannten PydU (**24**) sind Pyren und Uridin über eine C-C-Einfachbindung miteinander verknüpft. Pyren wird dabei über die 1-Position mit der 5-Position des Uridins verbunden. Die Position 1 stellt die reaktivste Stelle im Pyren dar und ist dadurch chemisch leicht zu modifizieren.

Im angeregten Zustand ist Pyren ein guter Elektronendonator, der inter- und intramolekularen Elektronentransfer induzieren kann. Das Oxidationspotential von Pyren beträgt $E_{\text{ox}}(\text{Py}/\text{Py}^+) = 1.5 \text{ V}$ (vs. NHE).^[214] Daraus kann unter Berücksichtigung der Singulett-Energie von Pyren $E_{00}(\text{Py}^*) = 3.25 \text{ eV}$ ^[214] das Potential des angeregten Zustands $E_{\text{ox}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^+) = -1.75 \text{ V}$ berechnet werden. Für das Reduktionspotential von dU bzw. dem vergleichbaren dT findet man in der Literatur unterschiedliche Werte. *Steenken et al.* nennen für Uracil bzw. Thymin einen Wert von $E_{\text{red}} = -1.1 \text{ V}$ (vs. NHE).^[227] Nach *Rehm-Weller* errechnet sich eine maximale Triebkraft für den intramolekularen Elektronentransfer in **24** von $\Delta G = -0.65 \text{ V}$. Dieser Wert erscheint allerdings zu hoch im Hinblick auf eine von *Fiebig et al.* publizierte Femtosekunden-zeitaufgelöste Studie über die Reduktion von T durch photoangeregtes 2-Aminopurin. Dort wird ein Reduktionspotential von $E_{\text{red}}(\text{T}/\text{T}^{\bullet-}) = -1.8 \text{ V}$ ermittelt.^[223] Unter Berücksichtigung dieses Potentials kann eine Triebkraft von $\Delta G = -0.05 \text{ V}$ für einen intramolekularen Elektronentransfer zwischen Pyren und Uridin berechnet werden. Aufgrund der Irreversibilität im Oxidations- und Reduktionsverhalten der natürlichen Nucleoside entstehen bei der Potentialbestimmung große Ungenauigkeiten.^[69] Außerdem wird das Potential durch Stapelungswechselwirkungen der Basen untereinander beeinflusst.^[228] Die hier angegebenen Werte können daher nur als grobe Abschätzung herangezogen werden.

Für **24** lässt sich aufgrund der Redoxpotentiale ein intramolekularer reduktiver Elektronentransfer voraussagen. In Folge der starken elektronischen Kopplung bilden sich intramolekulare Ladungstransferzustände, die eine strukturlose, lösungsmittelabhängige Fluoreszenz aufweisen^[42] und daher als intramolekulare Exciplexe betrachtet werden können. Diese Exciplexe enthalten sowohl Beiträge des lokal angeregten Zustandes $\text{Py}^*\text{-dU}$ als auch des ladungstrennten Zustandes $(\text{Py}^{\bullet+}\text{-dU}^{\bullet-})$.^[40] Um diese elektronische Kopplung zu verringern oder sogar ganz zu vermeiden, soll Uridin in diesem Projekt an die weniger reaktive Position 2 des Pyrenchromophors gebunden werden. Da sich die Struktur von **24** und **25** lediglich am verknüpfenden Pyrenkohlenstoff unterscheidet, wird **24** fortan mit 1PydU und **25** mit 2PydU bezeichnet.

Zum besseren Verständnis der elektronischen Unterschiede zwischen 1PydU (**24**) und 2PydU (**25**), wurde die Topologie der relevanten Molekülorbitale, die am intramolekularen Elektronentransfer beteiligt sind, studiert. Die LUMOs von 1PydU (**24**) und 2PydU (**25**) wurden nach geometrischer Optimierung nach der semiempirischen AM1 Methode berechnet (Abb. 5-1).

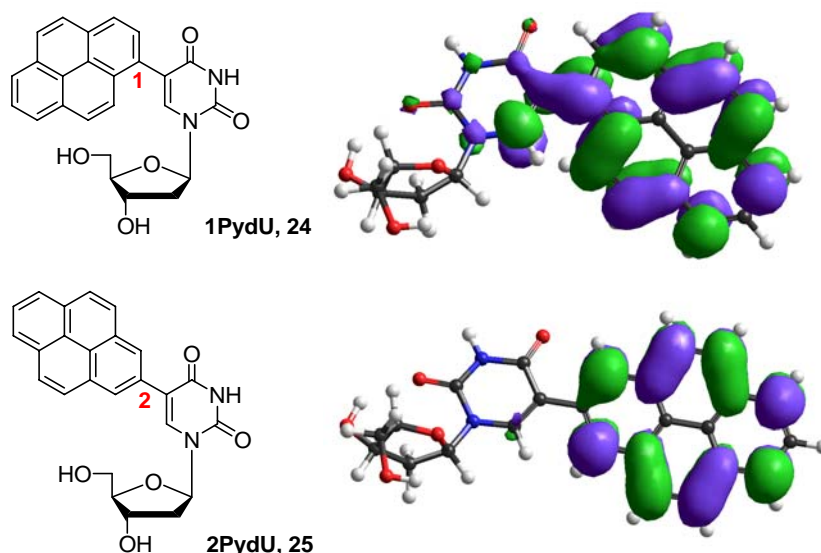


Abb. 5-1: Berechnete LUMOs von 1PydU (**24**) und 2PydU (**25**).

Das LUMO von **24** weist eine hohe Elektronendichte am Pyrenkohlenstoff in Position 1 auf, weshalb es durch die kovalente Anbindung an den Uridinchromophor zu einer starken

Delokalisierung der Elektronen über die verknüpfende Einfachbindung kommt. Zwischen beiden Chromophoren herrscht eine starke elektronische Kopplung vor. Im Gegensatz zu **24** zeigt das LUMO von **25** ein deutlich lokalisierteres aromatisches System des Pyrenchromophors. Das verknüpfte Pyren-Kohlenstoffatom in Position 2 weist eine sehr geringe Elektronendichte auf. Aus diesem Grund kann die Orbitalüberlappung zwischen Pyren- und Uridineinheit als klein angesehen werden.

5.2 Synthese von 5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (2PydU, **25**)

Pyrenmodifizierte Nucleoside wie **24** wurden bisher über palladiumkatalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung aus der Pyrenylboronsäure bzw. aus dem Pyrenylboronsäureester und dem entsprechenden halogenierten Nucleosid synthetisiert.^[169] Diese Art der Kupplung ist speziell für Nucleosid-Synthesen geeignet, da sie sogar in wässrigen Lösungen durchführbar sind und ungeschützte Hydroxy- und Aminfunktionen tolerieren.^[170] Würde man diese Synthesestrategie für 2PydU (**25**) anwenden wollen, wäre eine Bromierung von Pyren (**26**) in der 2-Position unumgänglich, um zur entsprechenden Boronsäure bzw. zum Boronsäureester zu gelangen. Allerdings führen elektrophile Substitutionen an Pyren grundsätzlich zur Derivatisierung in Position 1 und anschließend zu 1,3-, 1,6- und 1,8-disubstituierten Produkten.^[229] 2-Substituierte Pyrene sind nur schwierig zugänglich. Eine verbreitete Möglichkeit zur Einführung funktioneller Gruppen in die 2-Position besteht in der Umsetzung von Pyren (**26**) zu 4,5,9,10-Tetrahydropyren mittels katalytischer Hydrierung.^[230] Diese Verbindung kann in der 2-Position bromiert und anschließend reoxidiert werden.^[231, 232]

In dieser Arbeit wurde ein Syntheseweg gewählt, der direkt aus Pyren (**26**) zum entsprechenden 2-Pyrenylboronsäureester (**27**) führt und somit das Edukt für die folgende Suzuki-Miyaura-Kupplung liefert (Abb. 5-2). *Hartwig* und *Miyaura* haben gezeigt, dass vor allem Iridium-Verbindungen die direkte Borylierung von Aromaten katalysieren.^[233, 234] Gemäß einer Veröffentlichung von *Coventry et al.*^[235] beginnt die Synthese mit der Umsetzung von **26** zu 2-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,2,3]dioxoborolan-2-yl)-pyren (**27**) (Abb. 5-2). Der benötigte Iridium-Katalysator wird *in situ* aus kommerziell erhältlichem $[\text{IrCl}(\text{COD})]_2$ mit einem dreifachen Überschuss NaOMe gebildet. Ausgehend von 5 mol-%

der Katalysatorvorstufe werden 37 % des symmetrisch an der 2-Position substituierten Pyrens **27** erhalten.

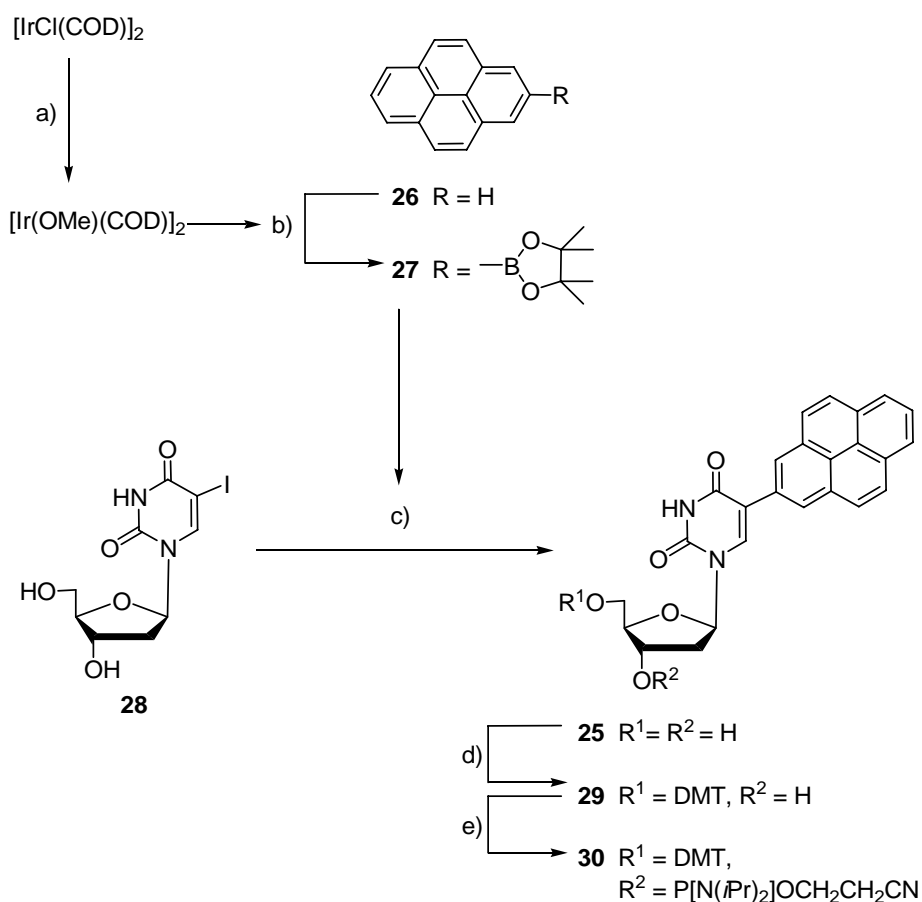


Abb. 5-2: Synthese von des pyrenmodifizierten Nucleosids 2PydU (**25**) und des entsprechenden DNA-Bausteins **30**.^[44] a) NaOMe (3.0 eq.), Cyclohexan, 60 min., RT; b) **26** (1.0 eq.), Bispinacolboran (1.1 eq.), dtbpy (0.1 eq.), $[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{COD})]_2$ (0.05 eq.), Cyclohexan, 48 h, 80 °C (37 %); c) **28** (1.0 eq.), **27** (1.2 eq.), $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ (0.11 eq.), THF/ H_2O / $\text{MeOH} = 2/1/1$, NaOH (19.5 eq.), 60 h, 65 °C (62 %); d) DMT-Cl (1.0 eq.), Pyridin, 48 h, RT (78 %); e) Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.0 eq.), DIPEA (3.6 eq.), CH_2Cl_2 , 60 min., RT (95 %).

Den Beweis für die Substitution in Position 2 des Pyrens liefert bereits ein ^1H -NMR-Spektrum, das ein Singulett für H-1 und H-3 zeigt. Zur vollständigen Zuordnung aller Protonen wurden 2D-NMR-Spektren aufgenommen. Mit einem NOESY-Spektrum wurde das Ergebnis des Protonenspektrums mit einem charakteristischen NOE-Muster für ein 2-substituiertes Pyren bestätigt (Abb. 5-3). Dementsprechend zeigen die Protonen H-1 und H-3

einen starken NOE zueinander und nur eine leichte Kopplung zu H-4 und H-10. Andererseits weist H-7 einen NOE zu H-6 und H-8 auf.

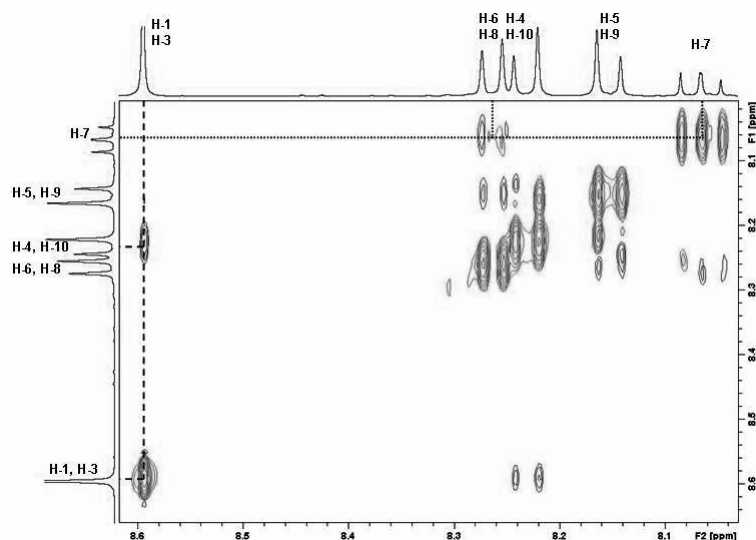


Abb. 5-3: NOESY-Spektrum von **27** mit den wichtigen NOE-Kopplungen (abgebildet ist nur der Aromatenbereich zwischen 8.6 und 8.0 ppm).

Die anschließende Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung von **27** mit 5-Iod-2'-desoxyuridin (**28**) wurde nach der bereits veröffentlichten Vorschrift durchgeführt.^[22] 1,1'-bis[(diphenylphosphino)ferrocen]dichloro-palladium(II) ($\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$) wird als Katalysator in einem Lösungsmittelgemisch aus THF/ H_2O /MeOH verwendet. Nach 60 h bei 65 °C wurden 62 % des Nucleosids **25** erhalten.

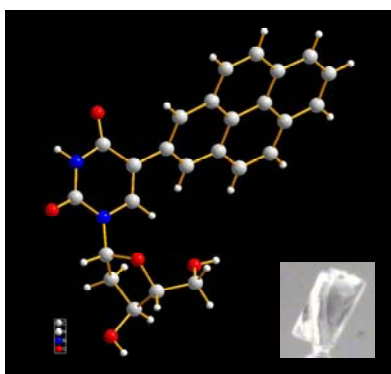


Abb. 5-4: Kristallstruktur des Nucleosids **25**.

Abb. 5-4 zeigt die Kristallstruktur des Nucleosids **25**. Sowohl die Verknüpfung über das C2-Atom des Pyrens, als auch die *anti*-Konformation sind sehr deutlich zu erkennen. Der Pyrenchromophor ist in einem Torsionswinkel von $38,8^\circ$ gegen dU verdreht.

5.3 Spektroskopische Charakterisierung von 2PydU (**25**)

Das synthetisierte Nucleosid (**25**) wurde spektroskopisch untersucht und dabei mit 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (1PydU, **24**) verglichen. Zur genaueren Überprüfung der elektronischen Kopplung zwischen Pyren und dU in 2PydU (**25**) wurden transiente Absorptionsmessungen mit beiden Bausteinen durchgeführt. 1PydU (**24**) wurde bereits 2005 von *Trifonov et al.* zeitaufgelöst spektroskopiert.^[236] Die Zuordnung der Signale basiert auf diesen Ergebnissen. Wie in Abb. 5-5 zu erkennen ist, bildet sich in **24** aus dem lokal angeregten Zustand von Pyren (Py^*), aufgrund der starken Kopplung der beiden Chromophore, der ladungstrennte Zustand $\text{Py}^{*+}\text{-dU}^-$ ($\lambda \approx 625$ nm). Interessanterweise kann bei $\lambda \approx 625$ nm auch in **25** eine schwache Bande detektiert werden. Daher wird angenommen, dass **25** trotz des deutlich lokalisierten aromatischen Pyrensystems (vgl. LUMO-Berechnung, Abb. 5-1) kein vollständig entkoppeltes System darstellt. Allerdings muss betont werden, dass die elektronische Kopplung in 2PydU (**25**) sehr schwach ist im Vergleich zu **24**.

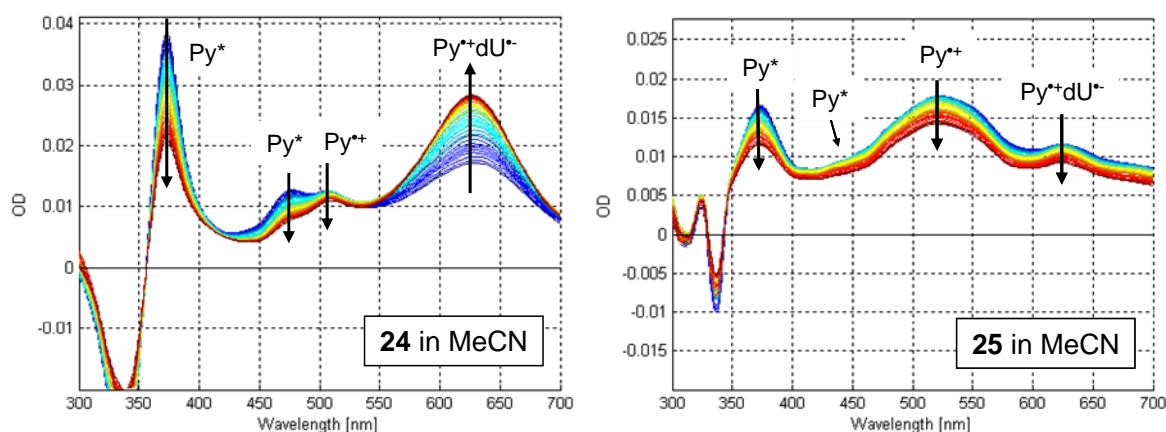


Abb. 5-5: Zeitaufgelöste Absorptionsmessung von **24** und **25**, 3.3 ps (blau) bis 150 ps (rot) nach der Anregung; $c(\mathbf{24}, \mathbf{25}) = 0.3$ mM in MeCN. Die Kopplung zwischen Pyren und dU ist nur in **24** stark ausgeprägt ($\lambda \approx 625$ nm). Die Zuordnung der Signale basiert auf einer Veröffentlichung von *Trifonov et al.*^[236]

Zur Charakterisierung der optischen Eigenschaften wurden spektroskopische Messungen in MeCN und MeOH als gängige organische Lösungsmittel hoher Polarität durchgeführt, wobei nur in MeOH Wasserstoffbrückenbindungen mit den Nucleosiden ausgebildet werden können (Abb. 5-6). Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass sich die Dynamik des intramolekularen Elektronentransfers in 1PydU (**24**) in protischen (MeOH) und nicht-protischen (MeCN) Lösungsmitteln signifikant unterschiedlich verhält, obwohl beide Lösungsmittel ähnliche dielektrische Eigenschaften aufweisen.^[40, 236] Im UV/Vis-Spektrum zeigen beide pyrenmodifizierten Nucleoside **24** und **25** das typische Absorptionsmuster von Pyrenderivaten (Abb. 5-6). Dabei ist es unerheblich, welches Lösungsmittel verwendet wird.

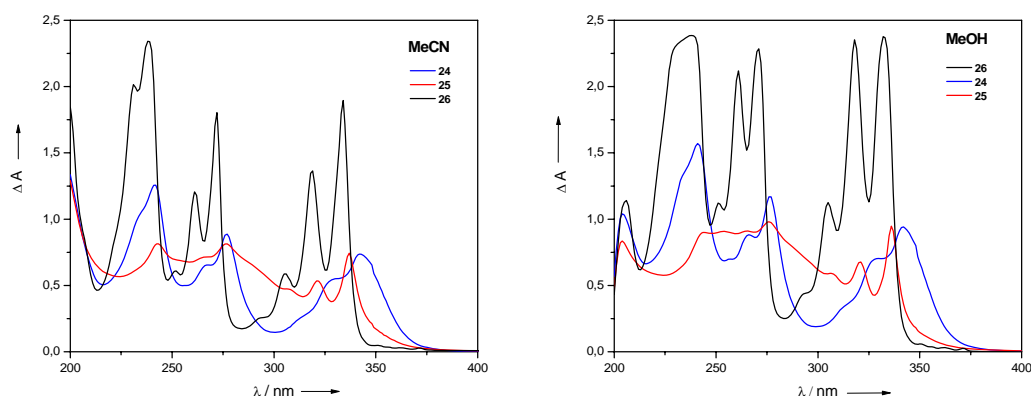


Abb. 5-6: UV/Vis-Absorptionsspektren von 2PydU (**25**) im Vergleich mit 1PydU (**24**) und Pyren (**26**) gemessen in MeCN (links) und MeOH (rechts). Die Konzentration der Proben wurde im jeweiligen Lösungsmittel auf identische optische Dichten bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{exc}} = 338 \text{ nm}$ eingestellt (Konzentrationen: **24** in MeCN: $30 \mu\text{M}$, **25** in MeCN: $35 \mu\text{M}$, **26** in MeCN: $55 \mu\text{M}$, **24** in MeOH: $40 \mu\text{M}$, **25** in MeOH: $45 \mu\text{M}$, **26** in MeOH: $100 \mu\text{M}$).

Grundsätzlich fällt auf, dass das Absorptionsspektrum von 1PydU (**24**) im Vergleich mit Pyren (**26**) erkennbar rotverschoben ist, während 2PydU (**25**) vergleichbar mit **26** bleibt. Diese Tatsache ist bereits ein erstes Indiz dafür, dass in **24** die beiden aromatischen Teile stärker elektronisch gekoppelt sind als in **25**. Im Bereich $\lambda = 300 \text{ nm} - 350 \text{ nm}$ erscheint die Absorptionsbande des Übergangs von S_0 nach S_2 . Interessanterweise ist diese Bande im Fall des stark elektronisch gekoppelten Nucleosids **24** erheblich verbreitert und bathochrom verschoben. Dies deutet darauf hin, dass der Übergang von S_0 nach S_1 , der bei Pyren eigentlich stark verboten ist,^[42] in Verbindung **24** aufgrund elektronischer Wechselwirkungen

zwischen Pyren und dU schwach erlaubt und somit im Spektrum sichtbar wird. Zwischen $\lambda = 250$ nm und $\lambda = 280$ nm erscheint die Absorptionsbande des S_0 - S_3 -Übergangs. Der Übergang von S_0 nach S_4 ist in der Bande zwischen $\lambda = 200$ nm und $\lambda = 250$ nm zu erkennen.

Basierend auf den UV/Vis-Spektren wurde $\lambda_{\text{exc}} = 338$ nm als Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzmessung gewählt. Hervorzuheben ist hierbei, dass die Proben für die Emissionsmessungen auf eine identische optische Dichte bei der Anregungswellenlänge eingestellt wurden, um ausschließlich den Einfluss der Wasserstoffbrückenbindung auf das Emissionsverhalten zu ermitteln. Die entsprechenden Fluoreszenzspektren von **24** - **26** zeigen erhebliche Unterschiede. Auf die Emission von Pyren (**26**) hat das Lösungsmittel keinen Einfluss, sie ist in beiden Fällen gleich. 2PydU (**25**) weist in der Fluoreszenz die Feinaufspaltung von **26** auf, dennoch ist die Emission deutlich rotverschoben (ca. 30 nm). Die Emissionsmaxima bleiben in MeCN und MeOH nahezu gleich (Doppelbande bei $\lambda = 399$ nm und $\lambda = 421$ nm). Im Gegensatz dazu zeigt 1PydU (**24**) unstrukturierte Fluoreszenzbanden mit den Maxima bei $\lambda = 425$ nm (MeCN) und $\lambda = 447$ nm (MeOH). Wie bereits erwähnt wurde, ist das ein typisches Phänomen für stark gekoppelte Exciplexzustände.

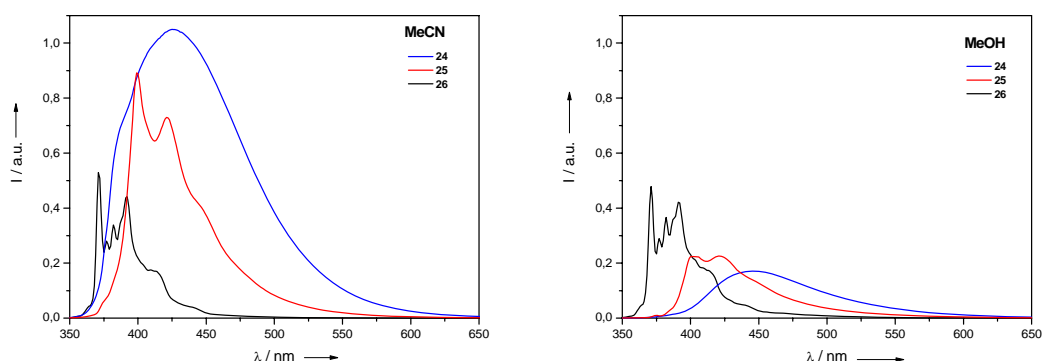


Abb. 5-7: Fluoreszenzspektren von 2PydU (**25**) in Vergleich mit 1PydU (**24**) und Pyren (**26**) gemessen in MeCN und MeOH. Die Emissionen sind korrigiert gegen die Konzentration. (Konzentrationen: **24** in MeCN: 30 μ M, **25** in MeCN: 35 μ M, **26** in MeCN: 55 μ M, **24** in MeOH: 40 μ M, **25** in MeCN: 45 μ M, **26** in MeOH: 100 μ M).

Die deutliche Rotverschiebung des Emissionsmaximums kann durch die Stabilisierung des ladungstrennten Zustands durch mögliche Wasserstoffbrückenbindungen mit MeOH erklärt

werden. In MeCN tritt bei **24** eine Schulter bei $\lambda = 388$ nm auf, was darauf hinweist, dass hier auch ein Anteil an lokal angeregtem Pyren (Py^*) vorliegt. Die relative Fluoreszenzintensität ist in MeOH deutlich verringert im Vergleich zu MeCN. Die Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeuten belegt diese Beobachtung.

Tabelle 5-1: Fluoreszenz-Quantenausbeuten von 2PydU (**25**) im Vergleich mit 1PydU (**24**) und Pyren (**26**), gemessen bei $\lambda_{\text{exc}} = 338$ nm.

Verbindung	Φ (MeCN)	Φ (MeOH)
24	0.24	0.03
25	0.07	0.03
26	0.02	0.02

Die Quantenausbeute von **24** verringert sich von 24 % in MeCN drastisch auf 3 % in MeOH. Dies entspricht den Ergebnissen von *Netzel*, der ebenfalls eine starke Fluoreszenzlöschung von 1PydU in MeOH beobachten konnte.^[42] Diese Abnahme ist in geringerem Ausmaß auch bei **25** zu sehen. In früheren zeitaufgelösten Messungen wurde erkannt, dass der Elektronentransfer in **24** in MeOH deutlich verbessert wird, da der Exciplexzustand durch Wasserstoffbrückenbindungen zu MeOH stabilisiert wird (vgl. Abb. 5-8).^[40, 236] Wasserstoffbrücken spielen daher in Elektronentransferprozessen eine kritische Rolle. Offensichtlich ist dieser Einfluss in **25** weniger stark, weil in diesem Nucleosid eine schwächere elektronische Kopplung vorherrscht und damit weniger intramolekularer Elektronentransfer stattfindet. Demnach verhält sich **25** wie ein Pyren, das zwar kovalent an das Uridin gebunden ist, jedoch nur wenig elektronische Wechselwirkungen mit ihm eingeht.

Zum direkten Vergleich der beiden Bausteine wurden zeitaufgelöste Absorptionmessungen von **24** und **25** in MeOH durchgeführt. Das Ergebnis der Messungen von *Trifonov et al.* konnte für 1PydU (**24**) bestätigt werden.^[236] Aufgrund der Stabilisierung des Exciplex-Zustands $\text{Py}^{*+}\text{-dU}^{-}$ durch MeOH, verschiebt sich die Absorptionsbande hypsochrom von $\lambda = 625$ nm nach $\lambda = 600$ nm. Eine Stabilisierung des sehr schwach ausgeprägten ladungstrennten Zustands in 2PydU (**25**) wird durch MeOH nur wenig beeinflusst.

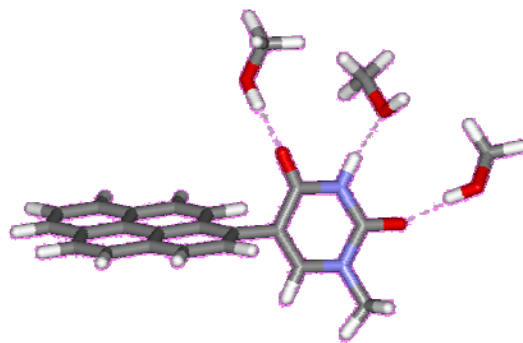
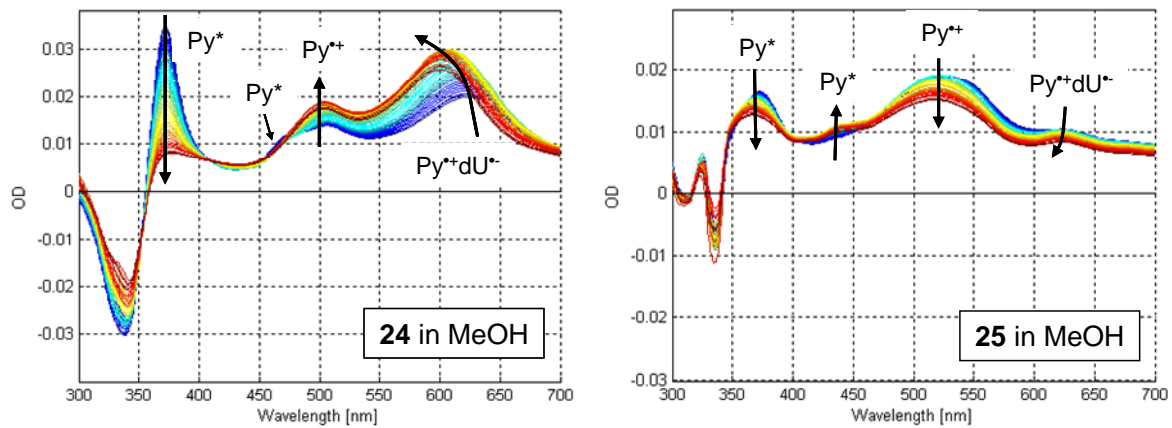


Abb. 5-8: oben: Zeitaufgelöste Absorptionsmessung von **24** und **25**, 3.3 ps (blau) bis 150 ps (rot) nach der Anregung; c (**24**, **25**) = 0.3 mM in MeOH. Die hypsochrome Verschiebung der Bande des ladungstrennten Zustands $\text{Py}^{+}\text{-dU}^{-}$ resultiert aus der Stabilisierung des Exciplex-Zustands durch MeOH und ist nur in 1PydU (**24**) deutlich ausgeprägt. Die Zuordnung der Signale basiert auf einer Veröffentlichung von *Trifonov et al.*;^[236] unten: schematische Darstellung der MeOH-Stabilisierung des Exciplex-Zustands $\text{Py}^{+}\text{-dU}^{-}$ (für **24**).

Nach dem Einbau der pyrenmodifizierten Nucleoside **24** und **25** in DNA werden die spektroskopischen Untersuchungen in gepufferten wässrigen Lösungen durchgeführt. Daher ist es wichtig, die spektroskopischen Eigenschaften der Nucleoside auch in wässriger Lösung zu untersuchen.

Die UV/Vis-Absorptionsspektren von 1PydU (**24**) und 2PydU (**25**) zeigen in Wasser auch die typischen Pyren-Banden im Bereich zwischen $\lambda = 300$ nm und $\lambda = 375$ nm (Abb. 5-9). Die Emissionsspektren der beiden Nucleoside unterscheiden sich wiederum sehr deutlich

voneinander. Die Fluoreszenz der beiden Nucleoside **24** und **25** wird deutlich gelöscht (vgl. Tabelle 5-2), wobei die Abnahme der Quantenausbeute von **24** größer ist.

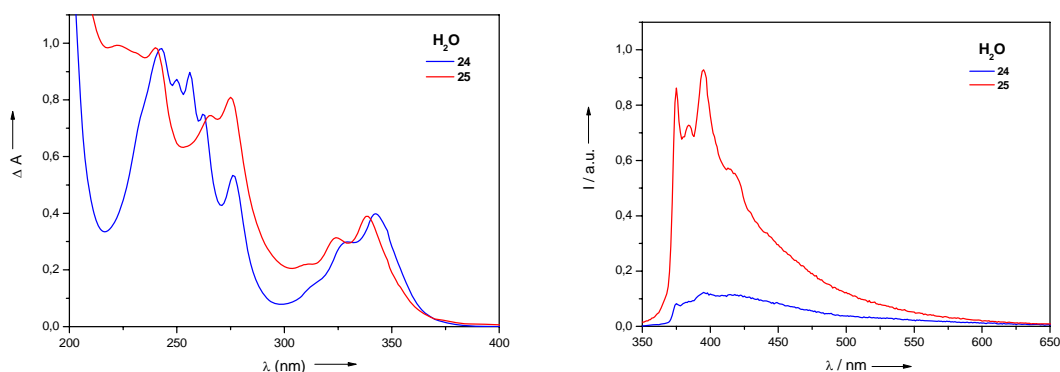


Abb. 5-9: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Nucleoside **24** und **25** in H_2O ($\text{pH} \approx 5.5$). Als Anregungswellenlänge wurde $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm gewählt. Die Fluoreszenzspektren wurden normiert, die relativen Intensitäten können nicht mit denen in Abb. 5-7 verglichen werden. $c(\mathbf{24}) = 43 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{25}) = 36 \mu\text{M}$.

Tabelle 5-2: Fluoreszenz-Quantenausbeuten von 2PydU (**25**) und 1PydU (**24**) in H_2O , gemessen bei $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm.

Verbindung	$\Phi(\text{H}_2\text{O})$
24	0,0023
25	0,0078

Dieses Ergebnis deutet sehr auf protonengekoppelte Elektronentransferprozesse hin. In früheren Arbeiten von *Amann* und *Huber* wurde die Emissionsintensität von 1PydU (**24**) in Abhängigkeit des pH-Werts bestimmt.^[41, 215] Die pH-Abhängigkeit zeigte eine typische sigmoidale Kurve, die für das protonierte Biradikal $\text{Py}^{+\bullet}\text{-dU(H)}^\bullet$ einen pK_s -Wert von ca. 5 liefert. Dieser Wert ist kleiner als der von *Steenken* für dU(H)^\bullet veröffentlichte pK_s -Wert von 6.9.^[237] Der Einfluss des kovalent gebundenen Pyrens zeigt sich deutlich. Da die elektronische Kopplung zwischen dem Pyren- und dem Uridinchromophor in **25** geringer ist,

wird der lokal angeregte Zustand des Pyrens (Py^*) vermutlich weniger stark durch protonengekoppelte Ladungstrennung gelöscht.

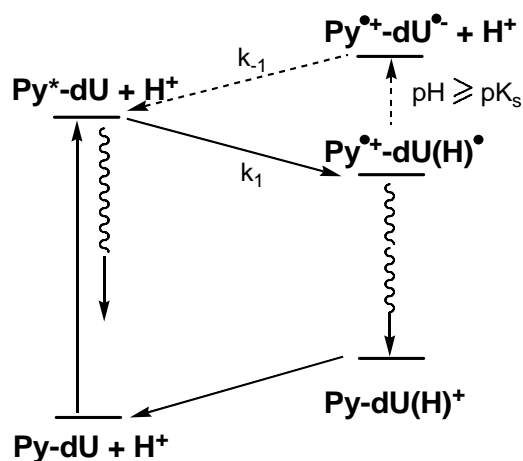


Abb. 5-10: Protonengekoppelte Elektronentransferprozesse in 1PydU (**24**).^[238]

Aufgrund der protonengekoppelten Elektronentransferprozesse (Abb. 5-10) ergibt sich möglicherweise eine Erklärung für die große Abweichung der Literaturdaten für das Reduktionspotential von dU bzw. T (Kapitel 5.1). *Steenken* berichtet bezugnehmend auf *Deeble et al.*,^[239] dass das entstehende Uridinradikalanion $\text{dU}^{\bullet-}$ sofort zum Hydrouridinylradikal dU(H)^{\bullet} protoniert wird.^[227] D.h. das angegebene Reduktionspotential $E_{\text{red}} = -1.1 \text{ V}$ (vs. NHE)^[227] bezieht sich möglicherweise auf die Bildung des neutralen Radikals dU(H)^{\bullet} , während das von *Fiebig* ermittelte Potential $E_{\text{red}} = -1.8 \text{ V}$ (vs. NHE)^[223] dem nichtprotonierten Zustand $\text{dU}^{\bullet-}$ zuzuordnen ist. Diese Überlegung ist zumindest plausibel, aber unbewiesen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die optischen Eigenschaften von 2PydU (**25**) klar die elektronischen Eigenschaften widerspiegeln, die auch schon durch die Berechnung der Molekülorbitale vermutet wurden. Im Wesentlichen gründet diese Interpretation auf drei Beobachtungen:

- (1) Im UV/Vis-Spektrum ist nahezu keine Rotverschiebung der Absorption von 2PydU (**25**) im Vergleich zu Pyren (**26**) bemerkbar.

- (2) Das Fluoreszenzspektrum von **25** zeigt die Struktur des lokal angeregten Pyrenchromophors (Py*).
- (3) Das Emissionsmaximum von **25** ist lösungsmittelunabhängig, lediglich die Intensität zeigt einen schwachen Lösungsmittelleffekt.

Im Gegensatz zu 1PydU (**24**) sind die beiden aromatischen Reste in 2PydU (**25**) nur schwach elektronisch gekoppelt. Dadurch zeigt das optische Verhalten von **25** auch die Ähnlichkeit mit Pyren (**26**) sehr deutlich.

5.4 Elektrochemische Charakterisierung von 2PydU (25)

Wie bereits erwähnt wurde, kann der Pyrenchromophor je nach Ladungsakzeptor als Oxidations- bzw. als Reduktionsmittel dienen. Um herauszufinden, ob es möglich ist, mit pyrenmodifizierten Uridinderivaten Guanin zu oxidieren bzw. Thymin zu reduzieren, wurden die Redoxpotentiale von **24** und **25** bestimmt und mit den Literaturwerten für Pyren (**26**) verglichen. Die cyclovoltammetrischen Messungen wurden in trockenem DMF durchgeführt. Als Leitsalz wurde Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat verwendet.

Für die Reduktion des Pyrens erhält man in beiden Verbindungen ein reversibles CV-Signal. Die Oxidation hingegen scheint irreversibel zu verlaufen. Die Potentiale wurden zunächst gegen Ferrocen (Fc/Fc^{*+}) als internen Standard gemessen und dann mit einer Umrechnungskonstante von + 0,63 V in Potentiale gegen NHE umgerechnet.^[240] E_{00} wurde rechnerisch aus dem Schnittpunkt der auf 1 normierten Absorptions- und Emissionsspektren der jeweiligen Verbindung ermittelt (vgl. dazu Abb. 3-6, Kapitel 3.1.1).

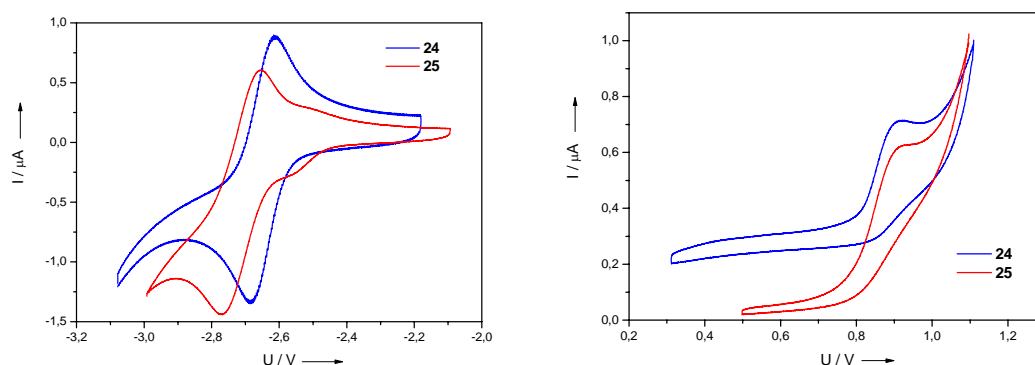


Abb. 5-11: Cyclovoltogramme der Verbindungen **24** und **25** korrigiert gegen (Fc/Fc^{+}) : links: Reduktion, rechts: Oxidation, $c(\mathbf{24}, \mathbf{25}) = 1 \text{ mM}$ in DMF, Leitsalz: 50mM TBAHFP, $v = 200 \text{ mV/s}$.

Tabelle 5-3: Übersicht über die Redoxpotentiale der Verbindungen **24** und **25** aus den CV-Messungen im Vergleich zu den Redoxpotentialen von G und T; Potentiale sind gegen NHE angegeben.

	$E_{00}(\text{Py}^*)$ [eV]	$E_{\text{red}}(\text{Py}/\text{Py}^{\cdot-})$ [V]	$E_{\text{red}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{\cdot-})$ [V]	$E_{\text{ox}}(\text{G}/\text{G}^{+})$ [V] ^[70]
24	+ 3,30	- 2,02	+ 1,28	
25	+ 3,33	- 2,08	+ 1,25	ca. + 1,30
26	+ 3,25 ^[214]	- 1,90 ^[214]	+ 1,35	
	$E_{00}(\text{Py}^*)$ [eV]	$E_{\text{ox}}(\text{Py}/\text{Py}^{+})$ [V]	$E_{\text{ox}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{+})$ [V]	$E_{\text{red}}(\text{T}/\text{T}^{\cdot-})$ [V] ^[223, 241]
24	+ 3,30	+ 1,55	- 1,75	
25	+ 3,33	+ 1,53	- 1,80	ca. - 1,80
26	+ 3,25 ^[214]	+ 1,52 ^[214]	- 1,73	

Auffällig ist, dass die Reduktionspotentiale $E_{\text{red}}(\text{Py}/\text{Py}^{\cdot-})$ der Verbindungen **24** und **25** von den Literaturwerten von Pyren um 120 mV (**24**) bzw. 180 mV (**25**) abweichen, während die Oxidationspotentiale $E_{\text{ox}}(\text{Py}/\text{Py}^{+})$ sehr genau in den Bereich der Pyrenoxidation passen. Die ermittelten Reduktionspotentiale würden theoretisch auch in den Bereich der Uridinreduktion passen. Allerdings zeigen die Cyclovoltogramme der Nucleobasen nur irreversible Reduktionen.^[69] Die Tatsache, dass für **24** und **25** eine reversible CV-Welle erhalten wurde, bestätigt, dass hier wirklich der Pyrenchromophor reduziert wird. Die Abweichung der Potentiale vom Reduktionspotential des reinen Pyrens kann auf den Einfluss des kovalent gebundenen Uridins zurückgeführt werden.

Berechnet man die Potentiale des angeregten Pyrenchromophors für die einzelnen Verbindungen, so liegen sie sowohl für **24** als auch für **25** in einem Grenzbereich, in dem die Oxidation von G bzw. die Reduktion von T vielleicht möglich wäre, da die Abweichungen der Potentiale der natürlichen DNA-Basen, wie bereits erwähnt, ziemlich groß sind und die angegebenen Werte nur eine grobe Abschätzung darstellen (vgl. dazu Kapitel 5.1).^[69, 227]

Die Pyrenradikale in **24** und **25** wurden mittels spektroelektrochemischen UV/Vis-Absorptionsmessungen untersucht. Interessanterweise war es nur möglich, das Pyrenradikalanion zu detektieren und somit die Reduktion optisch nachzuvollziehen. In beiden Nucleosiden kann das $\text{Py}^{\cdot-}$ in Form einer neuentstehenden Absorptionsbande bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ (**25**) und bei $\lambda = 503 \text{ nm}$ (**24**) detektiert werden. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von *Schomburg et al.* und *Borsarelli et al.*, die das Pyrenradikalanion mittels transientser Absorption bei $\lambda = 492 \text{ nm}$ ^[242] bzw. $\lambda = 495 \text{ nm}$ ^[243] gemessen haben. Eine schwächere Bande erscheint bei $\lambda = 390 \text{ nm}$ (**24**) bzw. $\lambda = 400 \text{ nm}$ (**25**), die nach Publikationen von *Borsarelli*^[243] und *Okada*^[244] dem Hydropyrenylradikal PyH^{\cdot} zugeordnet werden kann.

Auch hier muss berücksichtigt werden, dass sich die angelegten Potentiale in einem Bereich bewegen, der auch die Reduktion des Uridins ermöglichen kann. Die Vermutung, dass es sich bei den Banden bei $\lambda = 467 \text{ nm}$ (**24**) und $\lambda = 320 \text{ nm}$ (**25**) um die Absorptionsbande des $\text{U}^{\cdot-}$ handelt, kann durch Literaturdaten widerlegt werden. Transiente Absorptionsmessungen in der Literatur zeigen, dass das entsprechende $\text{U}^{\cdot-}$ und das vergleichbare $\text{T}^{\cdot-}$ in einem Wellenlängenbereich um $\lambda = 320 \text{ nm}$ ($\text{U}^{\cdot-}$)^[245-247] bzw. $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($\text{T}^{\cdot-}$)^[246, 248] absorbieren. Dies entspricht dem Absorptionsbereich der Pyrenchromophore in den Verbindungen **24** und **25**. Die Pyrenbande überlagert daher, falls existent, das Signal des Uridinradikalanions. Die Banden bei $\lambda = 467 \text{ nm}$ (**24**) und $\lambda = 320 \text{ nm}$ (**25**) sind vermutlich auch der Absorption von $\text{Py}^{\cdot-}$ zuzuordnen.

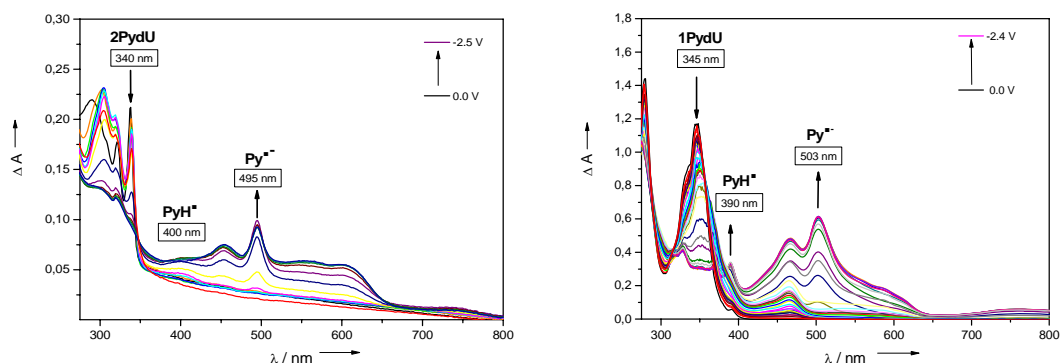


Abb. 5-12: Spektroelektrochemische Absorptionsmessung von **25** (links) und **24** (rechts), Reduktion, $c(\mathbf{24}) = 48 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{25}) = 18 \mu\text{M}$ in DMF, Leitsalz: 150 mM TBAHFP.

5.5 Synthese und Charakterisierung von 2PydU-modifizierter DNA

Der DNA-Baustein **30** wird ausgehend vom Nucleosid **25** nach Standardbedingungen synthetisiert.^[44]

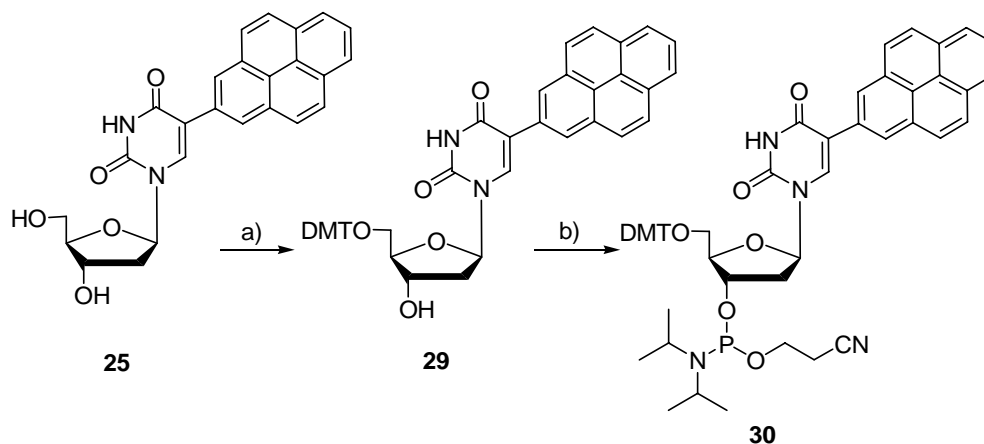


Abb. 5-13: Synthese des DNA-Bausteins **30** ausgehend vom Nucleosid **25**: a) DMT-Cl (1.0 eq.), Pyridin, 48 h, RT (78 %); b) Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.0 eq.), DIPEA (3.6 eq.), CH_2Cl_2 , 60 min., RT (95 %).

30 kann ebenso wie der entsprechende DNA-Baustein von 1PydU unter den Standard-Kupplungsbedingungen (1.6 min.) problemlos in Oligonucleotide eingebaut werden. Exemplarisch sind die Trityliden der Synthese von **ssDNA24** und **ssDNA25** abgebildet (Abb. 5-14).

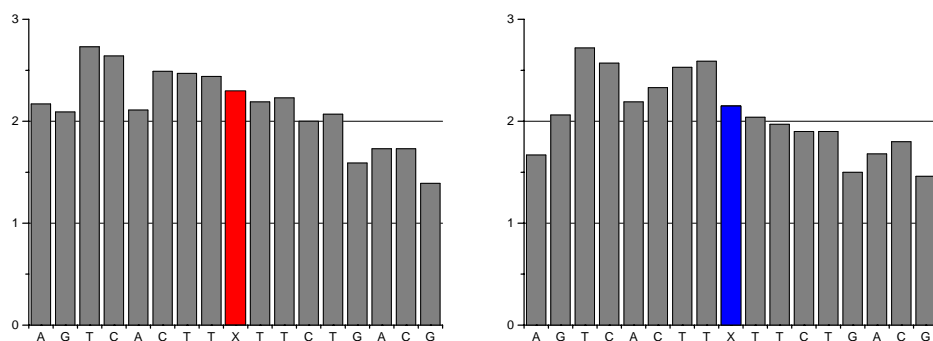


Abb. 5-14: Tritylmonitor der Synthese von 2PydU- und 1PydU-modifizierter DNA (links: 2PydU, **ssDNA25**; rechts: 1PydU, **ssDNA24**).

Im Anschluss an die DNA-Synthese können die pyrenmodifizierten Oligonucleotide unter den üblichen Bedingungen von der festen Phase abgespalten werden. Der erfolgreiche Einbau von **30** in die DNA-Sequenz wird bei allen Synthesen nach der chromatographischen Reinigung durch ESI-MS nachgewiesen.

5.5.1 Dinucleotide mit 2PydU

Nachdem die Redoxpotentiale, die in Kapitel 5.4 bestimmt wurden, keine eindeutige Aussage über mögliche Oxidation von G bzw. Reduktion von T zuließen, wurden vier Dinucleotide aus den natürlichen DNA-Basen und 2PydU (**25**) synthetisiert (**dn1-4**), um den Einfluss der Nachbarbase auf die Absorption und Fluoreszenz von **25** zu untersuchen und mögliche Elektronentransferreaktionen abzuschätzen.



Die Absorptionsspektren von **dn1-4** sind im Vergleich zum 2PydU-Baustein **25** leicht rotverschoben. Erwartungsgemäß ist die bathochrome Verschiebung in den Dinucleotiden mit

den Purinbasen größer als mit den Pyrimidinbasen, was durch eine günstigere π -Wechselwirkung des Pyrenchromophors mit dem größeren aromatischen System der Purine erklärt werden kann. *Kool et al.* erhielten in Dinucleotiden mit α -Pyren-desoxyfuranosiden ähnliche Ergebnisse.^[249]

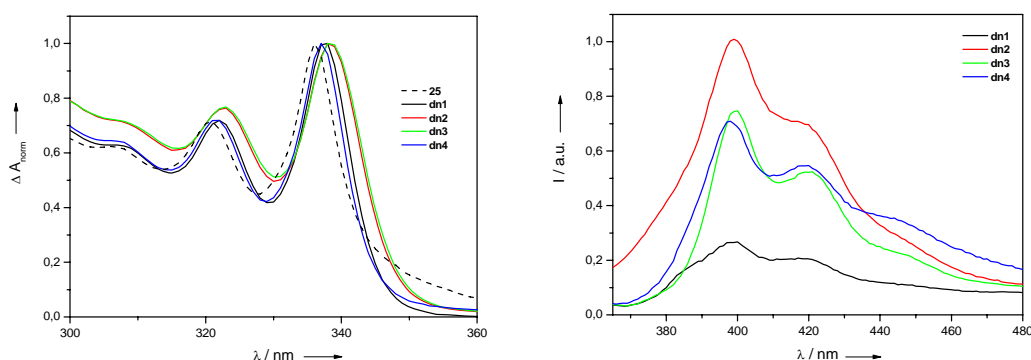


Abb. 5-15: Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Dinucleotide **dn1-4**, 12.5 μ M Dinucleotid in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 20 °C.

Die Fluoreszenzmessungen und die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F liefern erstaunliche Ergebnisse. In Abb. 5-15 (rechts) sind die Fluoreszenzspektren der Dinucleotide abgebildet. Die Dinucleotide wurden in relativ hoher Konzentration gemessen, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Bereits hier ist ersichtlich, dass die Pyrenemission, wie auch von *Kool et al.* beschrieben,^[249] durch T als Nachbarbase stark gelöscht wird.

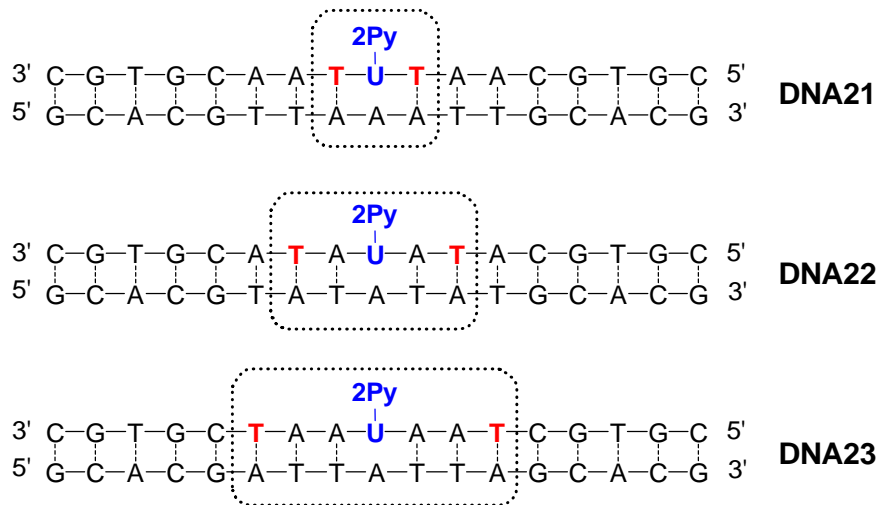
Tabelle 5-4: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F der 2PydU-Dinucleotide **dn1-4** im Vergleich zu den von *Kool* veröffentlichten Daten^[249]; 2.5 μ M Dinucleotid in 10 mM NaPi, $\lambda_{exc} = 340$ nm.

	Φ_F :	Φ_F : ^[249]
	X = 2PydU	X = α-Pyren-desoxyfuranosid
dn1: T-X	0,0004	0,003
dn2: G-X	0,0012	0,024
dn3: A-X	0,0006	0,370
dn4: C-X	0,0007	0,006

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F wurde nur mit einer Dinucleotid-Konzentration von 2.5 μM durchgeführt, um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten. Es zeigt sich, dass die Quantenausbeuten von **dn1-4** deutlich niedriger sind als die Quantenausbeute des Mononucleosids **25** in Wasser (vgl. Tabelle 5-2, Kapitel 5.3). Diese Fluoreszenzlöschung ist auf photoinduzierten Ladungstransfer zwischen 2PydU und den Nachbarbasen zurückzuführen. In Übereinstimmung mit *Kool et al.* wird durch T die Fluoreszenz am stärksten gelöscht.^[249] Überraschend ist allerdings, dass **dn2** mit G als Nachbarbase die höchste Quantenausbeute liefert, denn mit den in Kap. 5.4 bestimmten Redoxpotentialen von 2PydU käme auch die Oxidation von G durchaus in Frage. Dieses Phänomen stellt auch den Hauptunterschied zu den Ergebnissen von *Kool et al.* dar, denn sie erhielten in ihren Arbeiten mit A als Nachbarbase zum α -Pyren-desoxyfuranosyl die höchste Fluoreszenzintensität, während durch G die Emission ebenfalls sehr stark gelöscht wird.^[249] Dies steht in Einklang mit den Arbeiten von *Manoharan et al.*, die die Reaktivität der Nachbarbasen bezüglich der Fluoreszenzlöschung von Pyren untersucht haben. Sie stellten fest, dass G durch Py^* oxidiert und T, U und C reduziert werden können. Mit A als Nachbarbase tritt keine Löschung der Emission auf.^[168] Interessant ist auch, dass in den Dinucleotiden von *Kool* wesentlich höhere Φ_F -Werte erhalten werden.

5.5.2 Studien zum Elektronentransfer zwischen 2PydU und T in Oligonucleotiden

Nachdem herausgefunden wurde, dass 2PydU (**25**) in der Lage ist, benachbarte Thyminine zu reduzieren, wurden die DNA-Sequenzen **ssDNA21-23** synthetisiert, in denen der Abstand zwischen **25** und T variiert wurde. Anhand dieser Oligonucleotide sollte der Elektronentransfer von 2PydU auf T, sowie dessen Distanzabhängigkeit untersucht werden. Als Gegenbase zu **25** wurde A gewählt.



Die Einzelstränge **ssDNA21-23** zeigen das pyrentypische Absorptionsmaximum bei $\lambda = 345 \text{ nm}$ (Abb. 5-16, links). Interessanterweise wird die Absorptionsbande durch Hybridisierung zu **DNA21** um 5 nm hypsochrom verschoben, während in **DNA22** und **DNA23** keine Veränderung zum Einzelstrang zu erkennen ist. Eine Blauverschiebung der Pyren-Absorption deutet auf eine Verschlechterung der π, π -Wechselwirkung des Chromophors mit den Nachbarbasen hin. Möglicherweise spannen die Methylgruppen des Thymins den Pyrenrest in **DNA21** so starr zwischen sich ein, dass keine Stapelungswechselwirkungen mehr möglich sind. Anders als bei PydG (**12**), das als Hybridisierungssonde verwendet werden kann (vgl. Kapitel 4.4.2), tritt bei Hybridisierung zum Duplex in **DNA22** und **DNA23** keine bathochrome Verschiebung der Absorptionsbande gegenüber den Einzelstrangabsorptionen auf. Pyren wird in diesen Doppelsträngen jeweils von zwei (**DNA22**) bzw. vier (**DNA23**) Purinbasen umgeben, die aufgrund ihrer Größe bereits im Einzelstrang Stapelungswechselwirkungen mit dem Pyrenchromophor eingehen können.

Für die Fluoreszenzmessungen wurde als Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$ gewählt. **DNA21** zeigt die höchste Fluoreszenz, während die Intensität in den Duplexen **DNA22** und **DNA23** um ca. 60 % abnimmt (Abb. 5-16, rechts).

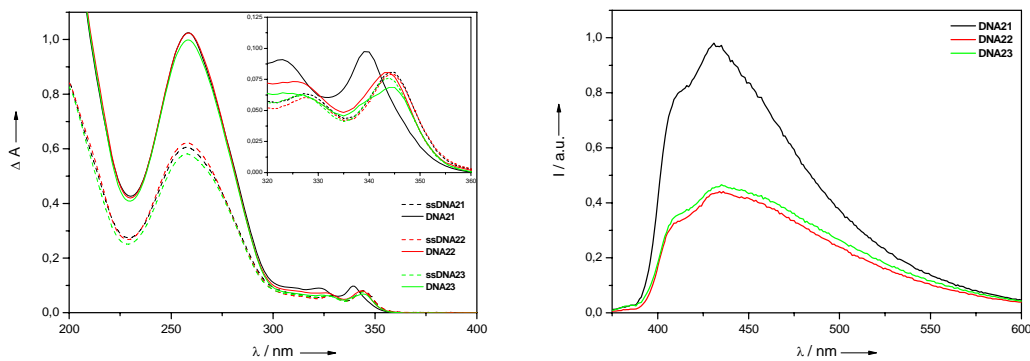


Abb. 5-16: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **DNA21-23**; 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 20 °C, Anregung: 345 nm, die Fluoreszenzspektren wurden gegen die Absorption korrigiert.

Verglichen mit den Ergebnissen der Dinucleotid-Untersuchung (Kapitel 5.5.1) erstaunt diese Tatsache, da erwartet wurde, dass in **DNA21** Ladungstransfer von 2PydU auf die direkt benachbarten Thyminе stattfindet und damit die Fluoreszenz am stärksten gelöscht wird. Wie bereits bei der Diskussion der UV/Vis-Spektren angesprochen wurde, spielen vermutlich die Methylgruppen der benachbarten Thyminе eine wichtige Rolle. Aufgrund der Fixierung des Pyrenchromophors ändert sich wahrscheinlich der Torsionswinkel zwischen Uridin und Pyren, was dazu führt, dass sich die elektronische Kopplung zwischen den beiden aromatischen Systemen erhöht. Dies hat zur Folge, dass sich in 2PydU neben dem lokal angeregten Py^{*}-dU vermehrt Exciplexe bilden, die eine höhere Fluoreszenz aufweisen. Leider kann aufgrund dieser sterischen Hinderung des Pyrens in **DNA21** keine Aussage über den möglichen Ladungstransfer sowie dessen Distanzabhängigkeit getroffen werden.

Mittels zeitaufgelösten Messungen könnten die möglichen Ladungstransferprozesse besser untersucht werden. Diese konnten jedoch aus Zeitgründen durch unsere Kooperationspartner leider nicht mehr durchgeführt werden.

Oligonucleotide, die mit 2PydU modifiziert wurden. Vermutlich ist 1PydU (**24**) sterisch anspruchsvoller als 2PydU (**25**), was den Duplex destabilisiert. Der Unterschied zwischen dem korrekt mit der Gegenbase A gepaarten Duplex **DNA25** bzw. **DNA24** und den falsch gepaarten Doppelsträngen **DNA25a-c** und **DNA24a-c** ist vernachlässigbar gering. Daher kann aus diesen Ergebnissen keine klare Präferenz gegenüber einer bestimmten Gegenbase vorhergesagt werden.

Tabelle 5-5: Vergleich der Schmelztemperaturen von 2PydU- und 1PydU-modifizierter DNA (**DNA25/DNA25a-c** vs. **DNA24/DNA24a-c**), 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 260 nm, 10 – 90 °C, Heizrate 0.7 °C/min.

Gegenbase Y	Duplex	T _m [°C]	Duplex	T _m [°C]	ΔT_m [°C]
A	DNA25	55.2	DNA24	52.5	+ 2.7
C	DNA25a	58.2	DNA24a	55.8	+ 2.4
T	DNA25b	56.0	DNA24b	54.0	+ 2.0
G	DNA25c	54.3	DNA24c	53.1	+ 1.2

Interessanterweise liegen die Schmelztemperaturen der Duplexe mit Pyrimidinen als Gegenbase zu den modifizierten Uridinen (**DNA25a**, **DNA25b** und **DNA24a**, **DNA24b**) etwas über den korrekt gepaarten Duplexen **DNA25** und **DNA24**. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass der Pyrenchromophor hier teilweise in den Duplex interkalieren kann und dadurch eine hydrophobe Stabilisierung erreicht wird.

Erstaunlicherweise lässt sich die Basenpaarung von **25** mit A im Gegensatz zu den Ergebnissen der Schmelztemperaturmessungen anhand von Absorption und Emission deutlich erkennen. Die UV/Vis-Absorptionsspektrum des 2PydU-modifizierten Einzelstrangs **ssDNA25** zeigt die Absorptionsbande des Pyrenchromophors im Bereich von 310 – 380 nm mit einem Maximum bei $\lambda = 345$ nm. Ist als Gegenbase zu 2PydU ein A vorhanden (**DNA25**), verschiebt sich das Maximum hypsochrom nach $\lambda = 340$ nm, während die Duplexe **DNA25a-c** kaum von der Einzelstrangabsorption abweichen (Abb. 5-18, links). Anders verhält es sich in den Doppelsträngen **DNA24/DNA24a-c** mit 1PydU als Modifikation. Die

Absorptionsbande des Pyrens weist im Einzelstrang **ssDNA24** ein Maximum von $\lambda = 350$ nm auf. Durch Hybridisierung zum Doppelstrang ist, unabhängig von der Gegenbase, eine bathochrome Verschiebung um 10 nm zu erkennen (Abb. 5-18, rechts).

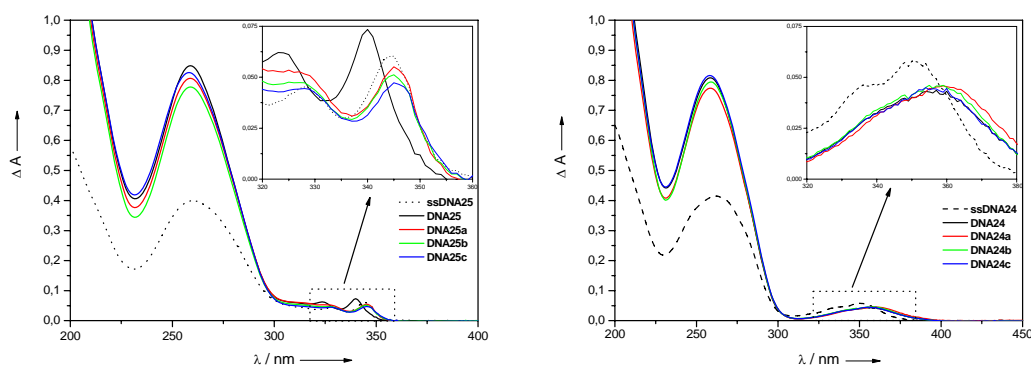


Abb. 5-18: UV/Vis-Absorptionsspektren von **DNA25/DNA25a-c** (links) und **DNA24/DNA24a-c** (rechts); 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 20 °C.

Eine Blauverschiebung der Pyren-Absorption, wie sie in **DNA25** auftritt, wurde auch schon bei den Elektronentransferstudien in **DNA21** (Kapitel 5.5.2) beobachtet. Da diese Verschiebung nur im korrekt mit A gepaarten Duplex **DNA25** auftritt, können die Methylgruppen der umgebenden Thyminen, die den Chromophor starr zwischen sich einlagern, nicht der einzige Grund sein. Aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen U und A wird das Pyren, das ohnehin aufgrund der *anti*-Konformation von **25** (vgl. Abb. 5-4, Kapitel 5.2) in die große Furche der DNA-Helix ragt, weiter aus dem DNA-Stapel gedrängt. Die hybridisierungsbedingte Rotverschiebung im Duplex-Set **DNA24/DNA24a-c** erinnert an PydG (**12**, Kapitel 4.4.2). Der Pyrenchromophor in **24** wird durch die Methylgruppen der benachbarten Thyminen weniger starr eingespannt und interkaliert somit im Doppelstrang besser in den Basenstapel.

Die Fluoreszenzspektren unterstützen die Ergebnisse der Absorptionsmessungen. Bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm ist mit den 2PydU-modifizierten Duplexen **DNA25/DNA25a-c** die Diskriminierung zwischen richtig und falsch gepaarten Doppelsträngen möglich. Die Emissionsintensität von Duplex **DNA25**, in dem **25** mit A gepaart ist, liegt um mindestens 40 % über den Duplexen **DNA25a-c**. Die 1PydU-modifizierten Duplexe **DNA24/DNA24a-c**

wurden bei $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm angeregt. Der Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Doppelstränge ist viel zu gering, um zwischen einzelnen Gegenbasen zu **24** differenzieren zu können.

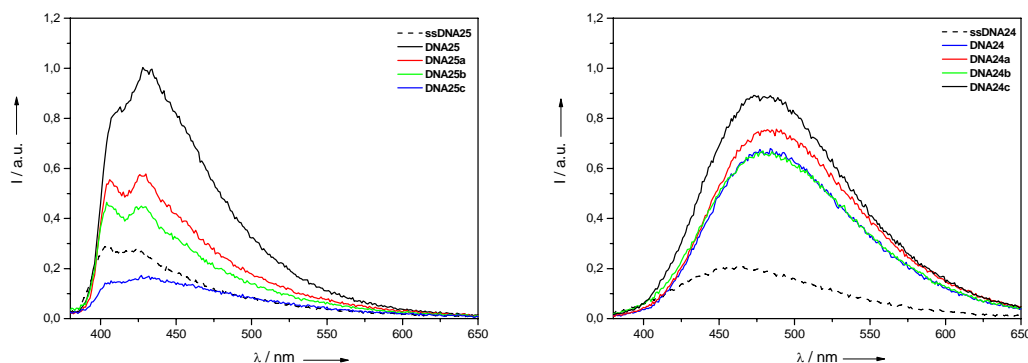


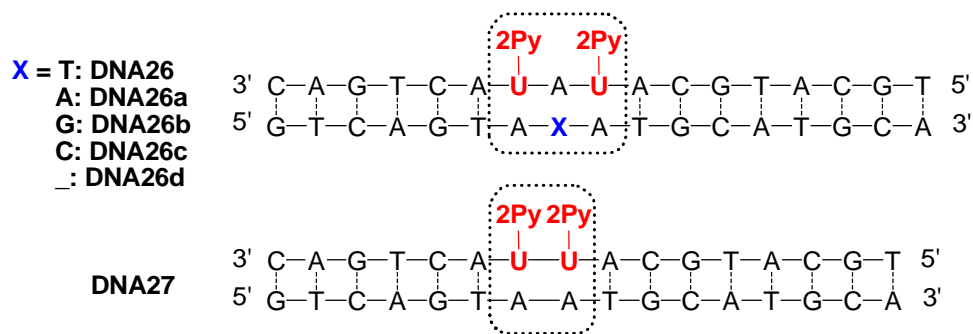
Abb. 5-19: Fluoreszenzspektren (normiert), links: **DNA25/DNA25a-c**: $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm, rechts: **DNA24/DNA24a-c**: $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm; 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 20 °C.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Diskriminierung der Gegenbase von 2PydU (**25**) über Absorptions- und Emissionsmessungen möglich ist, während 1PydU-modifizierte Duplexe (**DNA24/DNA24a-c**) unabhängig von der Gegenbase zu **24** sehr ähnliche optische Eigenschaften aufweisen. Aus den Schmelztemperaturbestimmungen konnte weder für 2PydU (**25**) noch für 2PydU (**24**) eine Präferenz gegenüber einer bestimmten Gegenbase erkannt werden.

5.5.4 Studien zur Excimerbildung in 2PydU-modifizierter DNA

Kürzlich konnten in unserer Arbeitsgruppe Basenfehlpaarungen und Deletionen aufgrund von Excimerfluoreszenz detektiert werden. Die untersuchten Duplexe enthielten ein Intrastrang-Perylenbisimid-Paar, das durch ein dazwischen liegendes Basenpaar separiert ist.^[250] Die starke Wechselwirkung der beiden Chromophore als Klammer um ein fragliches Basenpaar ermöglichte es nicht nur, den richtigen Gegenstrang von den falschen Gegensträngen zu unterscheiden, sondern auch zu quantifizieren, wie viel des richtigen Gegenstranges in einer Mischung vorhanden ist.^[250]

Es ist bekannt, dass Pyrene im angeregten Zustand ebenfalls Excimere bilden, die sehr intensiv zwischen 450 nm und 550 nm fluoreszieren.^[251, 252] Daher wurde im Vergleich zum oben genannten Experiment mit Perylenbisimidin die Basenfehlpaarungs-Detektion auch mit 2PydU (**25**) untersucht. Zunächst wurde das Oligonucleotid **ssDNA26** synthetisiert. Da dieser Einzelstrang zwei Modifikationen **25** enthalten sollten, wurde die Kupplungsdauer im Protokoll von 1.6 min. auf 15 min. erhöht, um eine möglichst gute Kupplungseffizienz zu erreichen. Als Gegenbase zu den 2PydU-Modifikation wurde aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 5.5.3 A gewählt, die Gegenbase zum dazwischen liegenden A wurde variiert (**DNA26/DNA26a-c**). Außerdem wurde neben Basenfehlpaarungen auch Deletion (**DNA26d**) untersucht.



Als Anregungswellenlänge wurde $\lambda_{\text{exc}} = 343$ nm gewählt. Wie bereits erwähnt, emittieren Pyrenexcimer sehr intensiv zwischen $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm. Da das Maximum der Pyrenfluoreszenz von **25** durch den Uridinrest deutlich bathochrom zur Fluoreszenz von freiem Pyren verschoben ist, überlagert die Emission von $\text{Py}^*\text{-dU}$ die Emissionsbande des Excimers zum Teil. Aus diesem Grund tritt in den Experimenten keine separate Fluoreszenzbande auf.

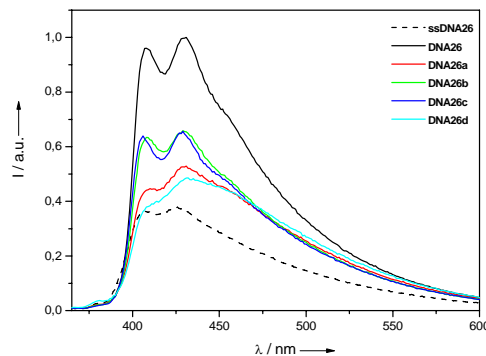


Abb. 5-20: Fluoreszenzmessung von **DNA26/DNA26a-d** zur Untersuchung der Intrastrang-Excimerbildung zwischen zwei 2PydU-Modifikationen; $\lambda_{\text{exc}} = 343 \text{ nm}$, $2.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , $\text{pH } 7.0$, 250 mM NaCl , $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Allerdings ist zwischen $\lambda = 450 \text{ nm}$ und $\lambda = 480 \text{ nm}$ bei allen Duplexen **DNA26/DNA26a-d** eine Schulter erkennbar, die auf Excimerbildung der beiden Pyrenchromophore zurückzuführen ist. Diese Schulter ist am stärksten in **DNA26a** mit einem AA-Paar zwischen den beiden Modifikationen bzw. in der Deletionsmutante **DNA26d** ausgeprägt. In allen Duplexen **DNA26/DNA26a-d** bleibt dennoch die Emissionsbande des lokal angeregten Pyrens bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ weiter bestehen, d.h. die Excimerbildung verläuft in keinem Fall quantitativ. Eine eindeutige Detektion von Basenfehlpaarungen konnte in diesem System nicht erreicht werden.

Da die Excimerbildung am stärksten in der Deletionsmutante **DNA26d** zu beobachten war, wurde zum Vergleich **DNA27** synthetisiert, in der die beiden 2PydU-Modifikationen direkt benachbart zueinander eingebaut wurden. Als Anregungswellenlänge wurde wiederum $\lambda_{\text{exc}} = 343 \text{ nm}$ gewählt. Die Verbreiterung der Emissionsbande aufgrund des gebildeten Pyrenexcimers zwischen $\lambda_{\text{em}} = 450$ und $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$ ist erkennbar. Auffällig ist, dass die Fluoreszenz vom Einzel- zum Doppelstrang nicht ansteigt. Diese Tatsache kann nicht eindeutig erklärt werden. Es wird vermutet, dass sich der Torsionswinkel und damit die elektronische Kopplung zwischen Pyren und dU durch die Excimerbildung verändert und dementsprechend andere optische Eigenschaften resultieren.

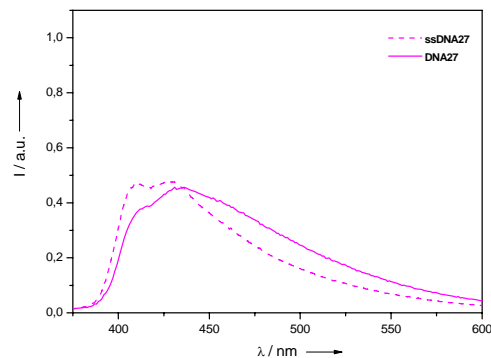


Abb. 5-21: Fluoreszenzmessung von **DNA27** zur Untersuchung der Intrastrang-Excimerbildung zwischen zwei 2PydU-Modifikationen; $\lambda_{\text{exc}} = 343 \text{ nm}$, $2.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , $\text{pH } 7.0$, 250 mM NaCl , $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Es lässt sich festhalten, dass zwei benachbarte 2PydU-Modifikationen zwar Excimere bilden, diese jedoch nicht anhand einer separaten Emissionsbande detektiert werden können. Zum besseren Verständnis wurde das Verhältnis der Emissionsintensitäten bei $\lambda = 460 \text{ nm}$ (Excimer-Emission) und $\lambda = 410 \text{ nm}$ (Monomer-Emission) berechnet und in einem Balkendiagramm aufgetragen. Je größer der Wert ist, desto stärker ist die Excimer-Fluoreszenzbande ausgeprägt.

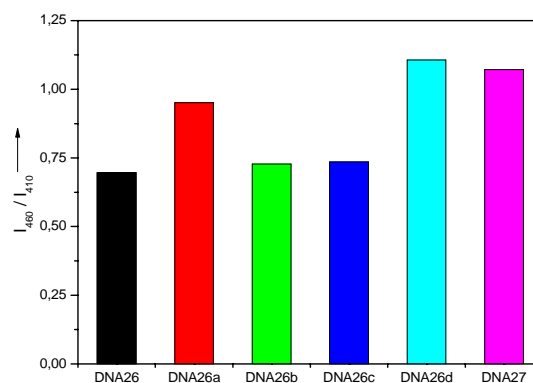


Abb. 5-22: Verhältnis der Emissionsintensitäten bei $\lambda = 460 \text{ nm}$ (2PydU-Excimer) und $\lambda = 410 \text{ nm}$ (2PydU-Monomer).

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der nucleosidische Elektronendonator 2PydU (**25**) konnte in einer zweistufigen Synthese synthetisiert werden. Der erste Schritt bestand in einer Iridium-katalysierten Borylierung eines nicht-aktivierten Pyrens (**26**) in 2-Position. Die nachfolgende Suzuki-Kupplung lieferte Nucleosid **25**. Die eindeutige Charakterisierung der Verknüpfung zwischen den beiden Chromophoren gelang mit NOESY-NMR-Messungen. Die anti-Konformation von **25** konnte mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt werden. Der Torsionswinkel zwischen Pyren und dU beträgt 38,8 °.

Aufgrund theoretischer LUMO-Berechnungen wurde angenommen, dass Pyren und dU in **25** nur schwach elektronisch wechselwirken. Die Annahme wurde in Absorptions-, Emissionsmessungen und zeitaufgelösten Transientenabsorptionsmessungen von **25** bekräftigt. Im Vergleich zu Pyren (**26**) ist im Absorptionsspektrum nahezu keine Rotverschiebung erkennbar. Ebenso zeigt **25** die Feinstruktur des lokal angeregten Pyrenchromophors (Py^*) in der Fluoreszenz. Die elektrochemische Untersuchung erbrachte für **25** Redoxpotentiale, die in einem Grenzbereich liegen, in dem sowohl die Oxidation von G als auch die Reduktion von T möglich wären. Allerdings zeigte sich in Experimenten mit 2PydU-Dinucleotiden, dass vermutlich nur T durch photoangeregtes 2PydU effizient reduziert werden kann. Im DNA-Strang verhält sich **25** wie ein kovalent gebundenes Pyren, das nur wenig elektronisch mit dU und der DNA wechselwirkt. So konnte A als Gegenbase zum pyrenmodifizierten dU **25** in Absorptions- und Fluoreszenzmessungen diskriminiert werden.

6 Primerverlängerungs-Experimente mit Pyren- und BODIPY-modifizierten Oligonucleotiden

6.1 Motivation und Hintergrund

Beim enzymatischen Einbau fluoreszenzmarkierter DNA-Basen werden Fluorophore oft über Alkylketten-Linker angeknüpft, um die Replikation durch DNA-Polymerasen zu ermöglichen.^[253] In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* werden die Fluorophore direkt kovalent mit den DNA-Basen verbunden, um neue optische Eigenschaften zu erzeugen. In diesem Kapitel soll die Frage geklärt werden, ob solche direkt an DNA-Basen geknüpfte Modifikationen von DNA-Polymerasen erkannt werden, um herauszufinden, ob sie als Fluoreszenzmarker in der DNA-Analytik eingesetzt werden könnten. Dazu werden modifizierte DNA-Basen in Primerverlängerungs-Experimenten untersucht. Es soll dabei herausgefunden werden, welche Gegenbasen die DNA-Polymerasen zur jeweiligen Modifikation inseriert.

Die Primerverlängerung ist eine molekularbiologische Methode, die im Allgemeinen zur Bestimmung der Basensequenz des 5'-Endes von Oligonucleotiden dient. Dazu wird eine kurze, synthetisch hergestellte DNA-Sequenz (*Primer*), die am 5'-Ende radioaktiv mit ^{32}P markiert wurde, an einen Templatstrang angelagert und dann enzymatisch entsprechend dem Templat mit Nucleotiden aufgefüllt (Abb. 6-1).

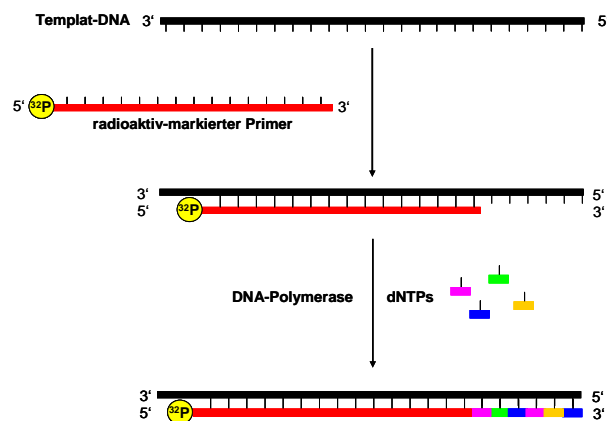


Abb. 6-1: Schematische Darstellung einer Primerverlängerung mit ^{32}P -markiertem Primer.

In Oligonucleotiden liegen die natürlichen DNA-Basen in *anti*-Konformation vor, d.h. die *Watson-Crick*-Seite der Basen kann Wasserstoffbrücken zur entsprechenden Gegenbase ausbilden. Eine Modifikation der 5-Position von Pyrimidinbasen durch einen Fluorophor verändert diese Konformation in der Regel nicht. Dies wurde für **24** mittels NMR-Spektroskopie^[40], für **25** durch Röntgenkristallstrukturanalyse (Abb. 5-4, Kapitel 5.2) nachgewiesen. Durch Modifikation der 8-Position von Purinbasen, wie im Beispiel von PydG (**12**), geht die modifizierte Purinbase in die *syn*-Konformation über. Diese Konformationsänderung konnte durch NOESY-Messungen des Nucleosids **12** nachgewiesen werden.^[40] Für *anti*-ständige modifizierte Pyrimidinbasen ist daher anzunehmen, dass der Chromophor in die große Furche der DNA ragt, während die *syn*-Konformation dazu führt, dass der Fluorophor partiell in den Basenstapel interkaliert und die *Watson-Crick*-Seite der Base aus der Helix zeigt. Die DNA-Modelle in Abb. 6-2 zeigen schematisch, wie *syn*- bzw. *anti*-ständige Fluorophore in der DNA angeordnet sein können.

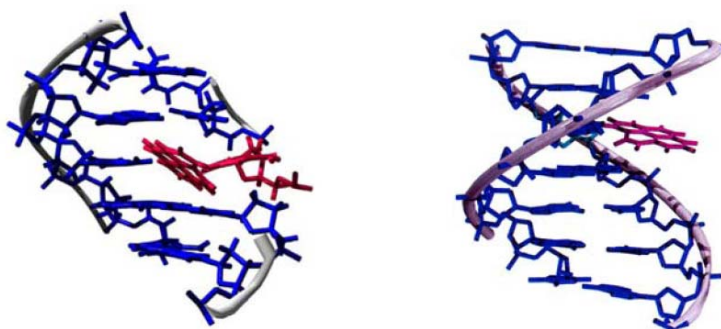


Abb. 6-2: Schematische Modell-Darstellung der Strukturen von PydG (**12**) (*links*) und 1PydU (**24**) (*rechts*) in DNA. Die Pyrengruppe von **12** interkaliert partiell durch die *syn*-Konformation des Nucleotids, während sie durch die *anti*-Konformation von **24** in die große Furche ragt.

Je nach Konformation sollten die modifizierten Basen in Primerverlängerungs-Experimenten über die *Watson-Crick*- (*anti*-Konformation) bzw. *Hoogsteen-Seite* (*syn*-Konformation) von DNA-Polymerasen erkannt werden. In Analogie zu 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-dG), das durch oxidative Schädigung eines Guanins entstehen kann (vgl. Kapitel 3.2, Abb. 3-19), können die beiden möglichen Basenpaarungen mit PydG (**12**) erklärt werden. Liegt das modifizierte Guanin in *anti*-Konformation vor, so paart es wie G mit C über die *Watson-Crick*-Seite. In der *syn*-Form wird ein *Hoogsteen*-Basenpaar mit A ausgebildet (Abb. 6-3). Während der Replikation wird das ursprüngliche GC-Paar durch ein AT-Paar ausgetauscht.

Somit manifestiert sich eine Mutation, die zu Veränderungen in Transkription und Translation führt.

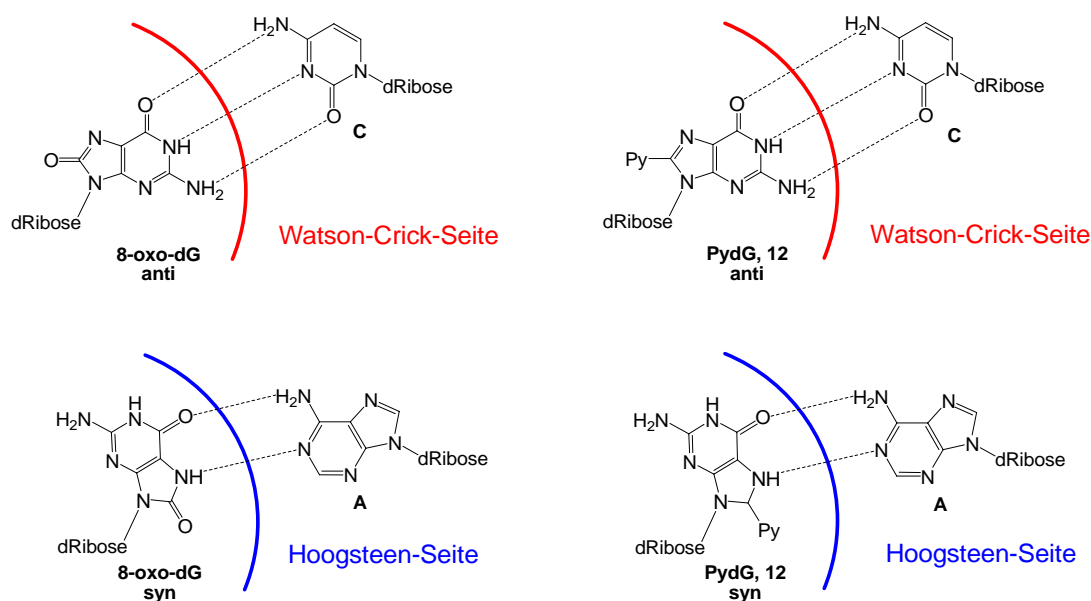


Abb. 6-3: Analogie zu 8-oxo-dG: Möglichkeiten der Basenpaarung von **12** über *Watson-Crick* oder *Hoogsteen* in Abhängigkeit der Konformation.

6.2 Primerverlängerungs-Experimente

6.2.1 Materialien, Methoden und Durchführung der Primerverlängerung

Als Template wurden vier Oligonucleotidsequenzen synthetisiert, die jeweils eine modifizierte Base enthalten. Als Modifikation wurden 2PydU (**25**), 1PydU (**24**), PydG (**12**) sowie BODIPY-dU (**31**) in die DNA-Sequenzen eingebaut. Die Synthese von **25** wurde bereits oben beschrieben (Kapitel 5.2). **24**, **12** wurden nach Literaturangaben hergestellt.^[22, 40, 45] **31** wurde von *T. Ehrenschwender* synthetisiert und zur Verfügung gestellt.^[45] Die modifizierten Uridine **24**, **25** und **31** wurden nach dem Standard-Kupplungsprotokoll mit einer Kupplungsdauer von 1.6 min,^[44, 45] **12** wurde gemäß Literatur mit einer verlängerten Kupplungsdauer von 15 min in die DNA eingebaut.^[36]

Die Primer wurden vor den Experimenten am 5'-Ende radioaktiv markiert. Dies gelang mit Hilfe der T4 Polynucleotidkinase (T4 PNK), die den Transfer einer radioaktiv markierten (γ - ^{32}P)ATP-Phosphatgruppe an die 5'-Hydroxygruppe des Primers katalysiert. Nach 60-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37 °C wurde zur Denaturierung der T4 PNK 2 min. auf 95 °C erhitzt. Der radioaktiv markierte ^{32}P -Primer wurde über Sephadex von überschüssigem ATP gereinigt.

Um zu gewährleisten, dass sich der ^{32}P -Primer optimal an den DNA-Templatstrang anlagert, wurden Primer, Templat, Puffer und Wasser zunächst 5 min. auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Dann wurden zu dieser Mischung das zu testende Enzym und, sofern nötig, Bovin Serum Albumin (BSA) gegeben. In Lochplatten wurden die Nucleotidtriphosphate je nach Experiment einzeln (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) bzw. vereint (dNTP) vorgelegt. Durch Zugabe der vorbereiteten Lösung aus Primer, Templat und Enzym wurden die einzelnen Reaktionen gestartet. Die Primerverlängerung wurde in 20 μL Ansätzen bei 37 °C durchgeführt. Nach einer vorher festgelegten Inkubationszeit wurden die Reaktionen durch Zugabe von 45 μL STOP-Lösung abgebrochen. Im Anschluss daran wurde das Enzym durch 5 minütiges Erhitzen auf 95 °C vollständig denaturiert. Dadurch konnte eine Weiterreaktion ausgeschlossen werden.

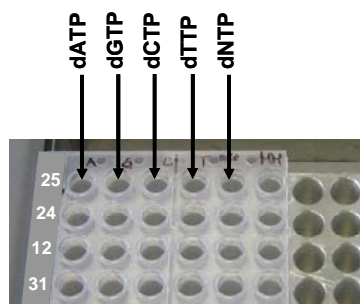


Abb. 6-4: Lochplatte zur Durchführung der Primerverlängerung. Die Nucleotidtriphosphate werden einzeln (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und auch vereint (dNTP) vorgelegt.

Die Sequenzierung erfolgte anschließend mittels Gelelektrophorese. Als Sequenzier-Gel wurde ein 12% iges denaturierendes PAGE-Gel verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurde der entsprechende Gelbereich ausgeschnitten. Als Markierung dienten dazu die beiden Farbstoffe, die in der STOP-Lösung enthalten sind. Bromphenol-Blau entspricht dabei im

Laufverhalten einem 12mer DNA-Fragment und Xylol-Cyanol verhält sich wie ein 55mer. Zwischen den beiden sichtbaren Farbstoff-Banden befinden sich die sequenzierten, radioaktiv-markierten Primer. Das Gel wurde anschließend ca. 1.5 h getrocknet. Von den getrockneten Gelen wurden Phosphor-Screens angefertigt.

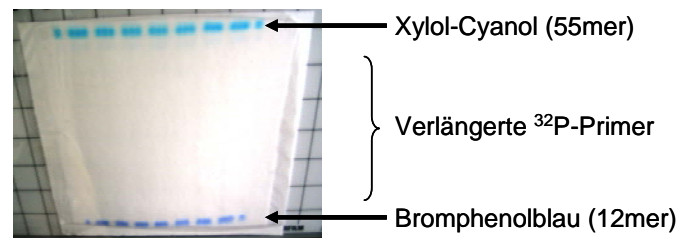


Abb. 6-5: Getrocknetes PAGE-Gel mit den beiden Farbstoffbanden von Xylol-Cyanol und Bromphenolblau.

Die Primerverlängerungs-Experimente wurden mit drei verschiedenen DNA-Polymerasen durchgeführt, die im Folgenden kurz vorgestellt werden. Als erste wurde die humane Polymerase **Pol β** verwendet. Pol β ist die kleinste eukaryontische Polymerase und reagiert relativ langsam. Sie gehört der Familie X an und ist hauptsächlich in DNA-Reparaturmechanismen, vor allem in Basenexzisions-Reparatur (BER), involviert.^[254]

Des Weiteren wurde **Dpo4** verwendet. Es handelt sich dabei um eine Polymerase, die der Y-Familie zugeordnet wird. Die Proteine, die dieser Klasse angehören, wurden zunächst als UmuC/DinB/Rev1/Rad30 Superfamilie bezeichnet, da sie zwar untereinander vergleichbar sind, allerdings zu den bislang identifizierten Polymerase-Familien keinerlei Ähnlichkeit aufweisen. Der Begriff „Y-Familie“ wurde erst 2001 eingeführt und wird seitdem verwendet.^[255] Dpo4 ist eine thermostabile Polymerase und kann über verschiedene DNA-Schäden wie abasische Stellen, Thymin-Thymin-Dimere und sogar *cis*-platinierte Guaninreste hinweg synthetisieren.^[256] Daher wird sie auch als *low-fidelity*-Polymerase bezeichnet.

Als letzte Polymerase wurde das Klenow Fragment (exo-) (**KF(exo-)**) verwendet. Dabei handelt es sich um das große Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I, welches weder die 3'-5'-, noch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase I (Pol I) besitzt. KF(exo-) wird der Polymerase-Familie A zugeordnet. Pol I zählt zu den *high-fidelity*-Polymerasen und ist in enzymatischen Vorgängen der DNA-Replikation involviert.^[257]

6.2.2 „Standing start“-Experimente

Die Primerverlängerung wurde zunächst in sog. „*Standing-start*“-Experimenten untersucht. „*Standing start*“ bedeutet dabei, dass ein Primer verwendet wird, der direkt vor der Modifikation endet. Mit diesen Experimenten kann herausgefunden werden, ob eine Modifikation durch die Polymerase erkannt wird und welche Gegenbase dazu insertiert wird.

Mit jedem Templatstrang werden fünf Reaktionen pro Enzym durchgeführt. Vier Reaktionsansätze enthalten jeweils nur ein dNTP, um herauszufinden, welche Gegenbase zur entsprechenden Modifikation insertiert wird. Ein Ansatz wird mit allen vier Nucleotidtriphosphaten durchgeführt, um die *Bypass*-Verlängerung des Primers durch die Polymerase zu studieren.

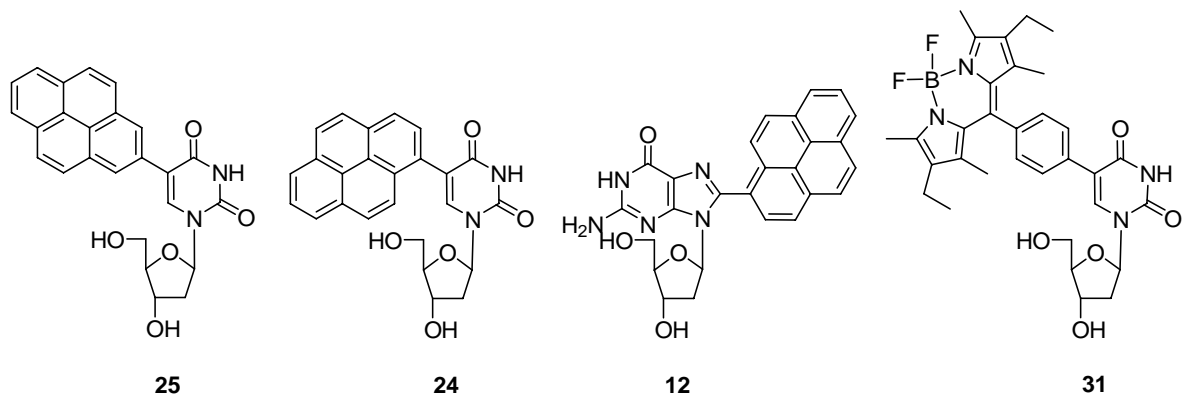
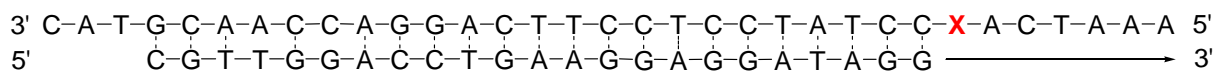


Abb. 6-6: Templat-Oligonucleotid und Primer Sequenz (X = **25**, **24**, **12** und **31**) für „*Standing start*“-Primerverlängerungs-Experimente.^[45]

Für die erste Versuchsreihe wurde Pol β in einer Konzentration von $c = 50$ nM eingesetzt. Die Inkubationszeit wurde auf 30 Minuten festgelegt. Wie in Abb. 6-7 zu sehen ist, erkennt die humane Pol β die modifizierten 2'-Desoxyuridine **25**, **24** und **31**, denn als Gegenbase wird in allen drei Fällen ein dATP eingebaut. PydG **12** kann von Pol β nicht als modifiziertes G identifiziert werden, daher gibt es hier keine Primerverlängerung. Es scheint, als wäre *Bypass*-Verlängerung über die Modifikation **25** und **31** hinweg möglich, denn hier werden durchaus

weitere dNTPs an den Primer geknüpft, allerdings wird er nicht vollständig verlängert. Das Problem könnte sein, dass die Inkubationszeit zu kurz bzw. die Konzentration zu gering war, denn wie bereits erwähnt, ist Pol β eine relativ langsam arbeitende Polymerase.

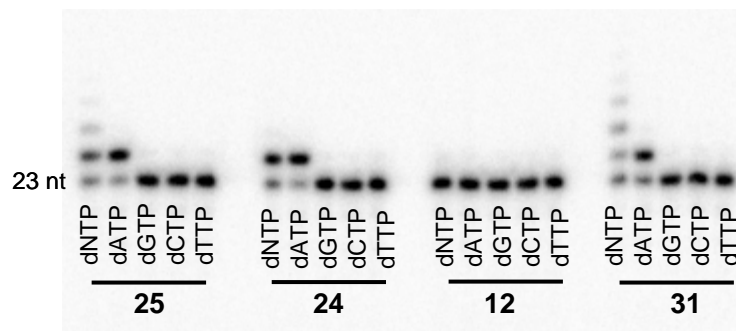


Abb. 6-7: PAGE-Sequenzierung der Primerverlängerung mit Pol β . $c(\text{Pol } \beta) = 50 \text{ nM}$, $c(\text{dNTP}) = 200 \mu\text{M}$, Inkubationszeit: 30 min, 37°C .

Trotz identischer Versuchsparmeter sieht das Ergebnis mit Dpo4 anders aus. Interessant ist, dass Dpo4 in der Lage ist, **12** als modifiziertes G zu erkennen (Abb. 6-8). Der Primer wird mit der richtigen Gegenbase C verlängert. Allerdings kann Dpo4 den Primer über die Modifikation hinweg nicht weiter verlängern. Die Reaktion bricht nach Insertion eines dCTPs ab. Die 2'-Desoxyuridin-Modifikationen **25**, **24** und **31** werden alle richtig erkannt. Es gibt nahezu keine Fehleinbauten. Die Versuche weisen darauf hin, dass der Primer über die veränderten 2'-Desoxyuridine hinweg verlängert werden kann. Allerdings konnte es unter diesen Bedingungen nicht eindeutig bewiesen werden.

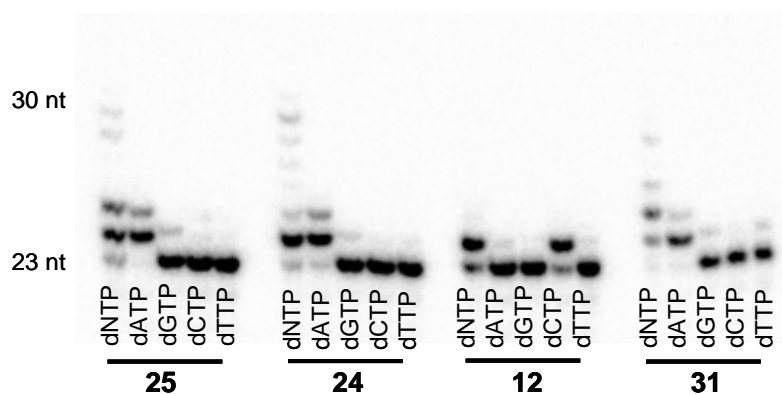


Abb. 6-8: PAGE-Sequenzierung der Primerverlängerung mit Dpo4. $c(\text{Dpo4}) = 50 \text{ nM}$, $c(\text{dNTP}) = 200 \mu\text{M}$, Inkubationszeit: 30 min, 37°C .

Die aktivste Polymerase war das Klenow Fragment (exo-). Mit einer sehr geringen Enzymkonzentration ($c = 2 \text{ nM}$) wurden bei 30 minütiger Inkubationszeit interessante Ergebnisse erhalten (Abb. 6-9). Ähnlich wie Dpo4 erkennt KF(exo-) **12** als modifiziertes G und inseriert dementsprechend ein dCTP in den Primer. Auch hier ist keine *Bypass*-Verlängerung des Primers möglich, so dass die Reaktion nach der ersten Insertion abbricht. Im Gegensatz zu den beiden anderen Polymerasen ist KF(exo-) sogar in dieser geringen Konzentration fähig, den Primer über die modifizierten 2'-Desoxyuridine **25**, **24** und **31** hinweg vollständig zu verlängern. Die Zahl der Fehleinbauten ist bei **24** und **31** vernachlässigbar gering, lediglich bei **25** wird neben dATP auch ein wenig dGTP als Gegenbase inseriert.

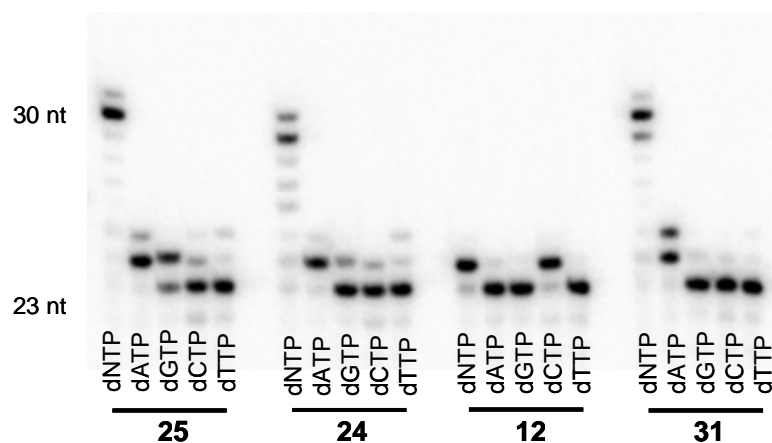


Abb. 6-9: PAGE-Sequenzierung der Primerverlängerung mit KF(exo-). c (KF(exo-)) = 2 nM, c (dNTP) = 200 μM , Inkubationszeit: 30 min, 37 °C.

6.2.3 „Standing start“-Experimente mit verschiedenen Inkubationszeiten

Um genauer zu untersuchen, ob Pol β und Dpo4 wirklich in der Lage sind, über die modifizierten 2'-Desoxyuridine **25**, **24** und **31** hinweg den Primer zu verlängern, wurden die „*Standing-start*“-Versuchsreihen mit den entsprechenden drei Templatsträngen nochmals wiederholt. Dieses Mal wurden die beiden Enzyme in doppelter Konzentration, also mit $c = 100 \text{ nM}$, eingesetzt. Nach 15, 30 und 60 Minuten wurden die Reaktionen jeweils durch Zugabe der STOP-Lösung abgebrochen und mittels PAGE sequenziert. Im Vergleich dazu

wurde dieselbe Versuchsreihe auch mit KF(exo-) durchgeführt. Hier wurde ebenfalls die Konzentration auf $c = 4 \text{ nM}$ verdoppelt.

Wie vermutet, kann die humane Pol β den Primer über **25** und **31** hinweg vollständig verlängern, wenn die Konzentration des Enzyms entsprechend hoch ist und die Inkubationszeit verlängert wird (Abb. 6-10). Dies zeigt sich deutlich bei Modifikation **31**, bei der der Primer erst nach 60 Minuten vollständig verlängert vorliegt. Bei 2PydU (**25**) scheint die verdoppelte Konzentration der Polymerase bereits zur kompletten Primerverlängerung auszureichen. Ist der Pyrenchromophor unsymmetrisch über Position 1 an den Uridinrest (**24**) geknüpft, so stellt dies für Pol β anscheinend ein sterisches Problem dar, denn hier ist auch nach 60 Minuten keine *Bypass*-Verlängerung des Primers möglich.

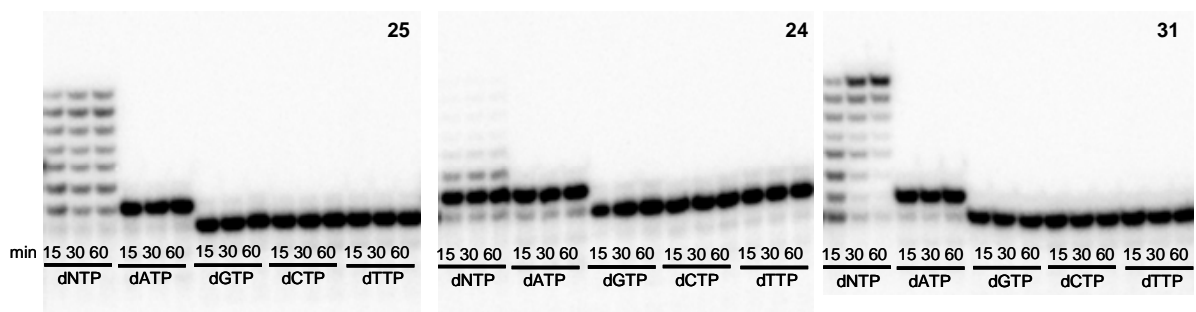


Abb. 6-10: PAGE-Sequenzierung der Primerverlängerung mit Pol β mit unterschiedlichen Inkubationszeiten: 15, 30 und 60 min. $c(\text{Pol } \beta) = 100 \text{ nM}$, $c(\text{dNTP}) = 200 \text{ } \mu\text{M}$, $37 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Auch die *low-fidelity*-Polymerase Dpo4 ist zur vollständigen Verlängerung des Primers in der Lage, sobald die Konzentration erhöht und die Inkubationszeit verlängert wird. Allerdings treten unter diesen Bedingungen auch einige Fehleinbauten auf (Abb. 6-11). So wird als Gegenbase zu **31** durchaus auch dGTP und sogar dTTP inseriert, was die geringere Genauigkeit (*low-fidelity*) der Polymerase bestätigt. Relativ selektiv arbeitet die Polymerase bei Modifikation **24**. Die Fehleinbauten bleiben vernachlässigbar gering. Interessant zu sehen ist, dass die Verlängerung des Primers im Fall von **25** wirklich erst nach 60 Minuten vollständig ist.

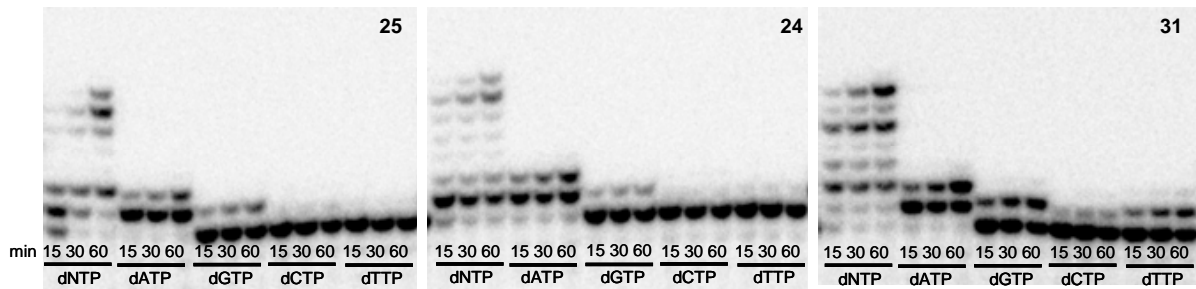


Abb. 6-11: PAGE-Sequenzierung der Primerverlängerung mit Dpo4 mit unterschiedlichen Inkubationszeiten: 15, 30 und 60 min. $c(\text{Dpo4}) = 100 \text{ nM}$, $c(\text{dNTP}) = 200 \text{ }\mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nachdem KF(exo-) bereits bei geringer Enzymkonzentration die Primer über **25**, **24** und **31** hinweg vollständig verlängern konnte, war in dieser Versuchsreihe hauptsächlich interessant, wie selektiv die Polymerase in höherer Konzentration und verlängerter Inkubationszeit arbeitet. Im Wesentlichen bestätigt sich das Ergebnis aus der ersten Versuchsreihe (Kapitel 6.2.2). Fehleinbauten treten hauptsächlich bei Modifikation **25** auf. Hier wird neben dATP auch dGTP und dCTP eingebaut. Die Fehler treten auch bei **24** auf, jedoch in geringerem Ausmaß. Sehr selektiv verlängert die Polymerase den Primer aber mit **31** als Modifikation. Diese Tatsache ist sehr erstaunlich, da der BODIPY-Chromophor eigentlich den größten sterischen Anspruch der drei Modifikation haben sollte und vermutet wurde, dass dieser die Polymerase am deutlichsten stören würde. Allerdings muss beachtet werden, dass in **31** ein Phenylring zwischen dU und dem BODIPY-Chromophor eingebaut ist, der den Farbstoff weit in die große Furche ragen lässt. Dieser Abstandshalter trägt anscheinend dazu bei, dass die Bindestelle der Polymerase nicht durch den Chromophor gestört wird.

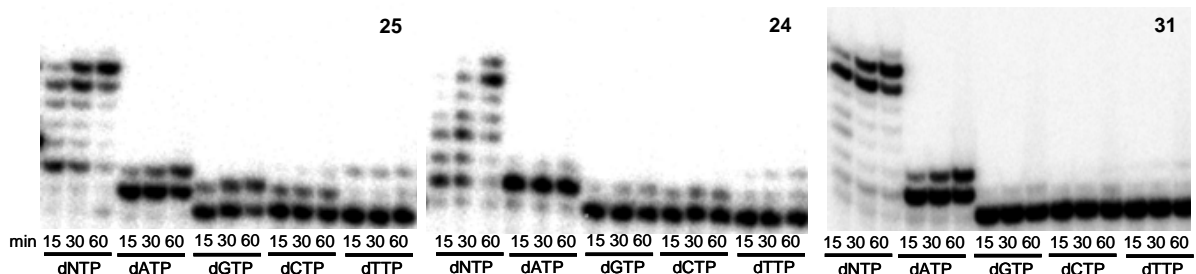


Abb. 6-12: PAGE-Sequenzierung der Primerverlängerung mit KF(exo-) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten: 15, 30 und 60 min. $c(\text{KF(exo-)}) = 4 \text{ nM}$, $c(\text{dNTP}) = 200 \text{ }\mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.2.4 „Running start“-Experimente

Neben den „*Standing-start*“ Primerverlängerungen wurde auch eine Versuchsreihe mit einem verkürzten Primer durchgeführt. Der Primer endete drei Positionen vor der modifizierten DNA-Base im Templat.

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die Polymerasen die Modifikationen leichter überlesen können, wenn sie zu Beginn der Reaktion nur mit natürlichen DNA-Basen konfrontiert werden. Diese „Anlaufphase“ der Polymerasen soll mit „*Running start*“ ausgedrückt werden. Für diese Versuchsreihe wurden alle dNTPs gemeinsam in der Lochplatte vorgelegt. Pol β und Dpo4 wurden mit $c = 50 \text{ nM}$, KF(exo-) mit $c = 2 \text{ nM}$ eingesetzt. Die Inkubationszeit wurde wiederum auf 30 Minuten festgelegt.

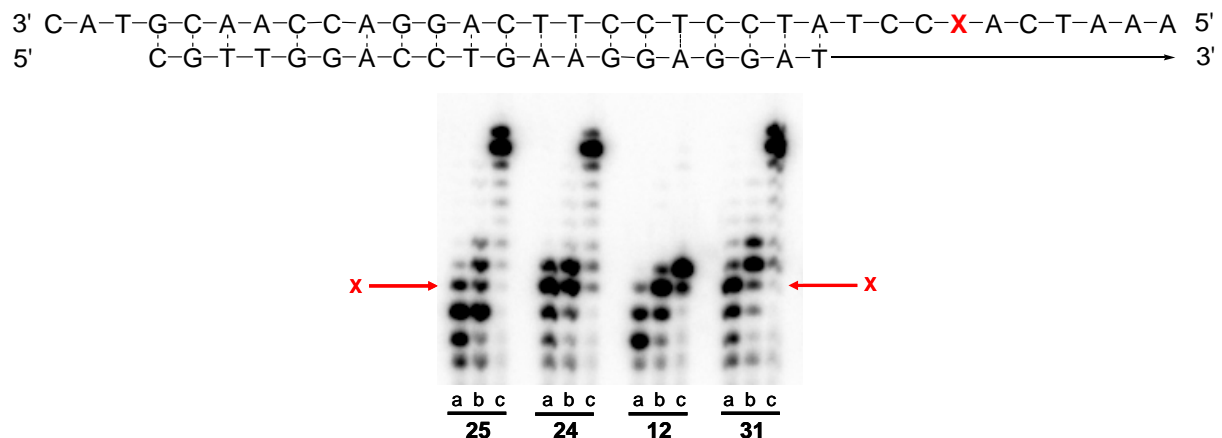


Abb. 6-13: Templat-Oligonucleotid und Primer-Sequenz (X = 25, 24, 12 und 31) für „*Running-start*“ Primerverlängerungs-Experimente mit PAGE-Sequenzierung. c (Pol β , Dpo4) = 50 nM, c (KF(exo-)) = 2 nM, c (dNTP) = 200 μM , Inkubationszeit: 30 Minuten, 37 °C; a: Pol β , b: Dpo4, c: KF(exo-).

In Abb. 6-13 spiegeln sich die Ergebnisse aus den vorhergehenden Versuchreihen wider. Pol β (a) ist nicht in der Lage, 12 zu erkennen. Die Reaktion bricht bereits vor der Modifikation ab. Die modifizierten 2'-Desoxyuridine 25, 24 und 31 werden erkannt, allerdings ist eine vollständige Primerverlängerung unter den oben genannten Bedingungen nicht möglich. Ähnlich verhält es sich mit Dpo4 (b). PydG (12) kann gelesen werden und es

wird eine Gegenbase dazu inseriert. Danach bricht die Reaktion allerdings ab. Die Polymerase baut bei **25**, **24** und **31** noch ein bis zwei dNTPs nach der Modifikation ein, bevor die Reaktion hier ebenfalls abbricht. KF(exo-) (c) zeigt erwartungsgemäß die *Bypass*-Fähigkeit und verlängert den Primer über die modifizierten 2'-Desoxyuridine hinweg vollständig. **12** wird zwar erkannt, aber wie auch schon bei Dpo4 bricht die Reaktion nach Insertion der Gegenbase dazu ab.

6.3 Optische Analytik der Primerverlängerung

Um die Primerverlängerung über die Modifikationen 2PydU (**25**) und 1PydU (**24**) optisch analysieren zu können, wurden die Oligonucleotide **ssDNA28** und **ssDNA29** synthetisiert. Durch Hybridisierung mit unterschiedlichen Gegensträngen soll die Primerverlängerung durch die DNA-Polymerasen simuliert werden. Die Anlagerung des Primers (**ssDNA+P**), die Verlängerung um ein dATP (**ssDNA+P+A**) sowie die vollständige Verlängerung des Primers mit den verschiedenen Gegenbasen zur Modifikation (**DNA/DNAa-c**) wurden spektroskopisch untersucht (Abb. 6-14).

Abb. 6-15 zeigt die UV/Vis-Absorptionsspektren der simulierten Primerverlängerung. Die Einzelstränge **ssDNA28** (links) und **ssDNA29** (rechts) zeigen die typische Pyren-Absorption. Durch Anlagerung des Primers (**ssDNA+P**) ändert sich bei beiden Modifikationen **24** und **25** die Absorptionseigenschaft des Pyrenchromophors nicht. Auch nach Insertion eines dATPs als Gegenbase zu den pyrenmodifizierten Uridinen **25** und **24** verschiebt sich die Absorptionsbande nicht. Erst bei vollständiger Verlängerung des Primers sind Veränderungen im Absorptionsspektrum zu beobachten. Mit A als Gegenbase verschiebt sich die Bande von 2PydU leicht hypsochrom, während bei 1PydU eine bathochrome Verschiebung des Maximums zu erkennen ist. Die 2PydU-modifizierten Duplexe mit den Gegenbase T, C, G (**DNA28a-c**) zeigen im Vergleich zum Einzelstrang **ssDNA28** ein rotverschobenes Absorptionsspektrum im Pyrenbereich. Die Gegenbase zu 1PydU zeigt keinen Effekt auf das Absorptionsverhalten. Die bathochrome Verschiebung ist in allen vier Duplexen **DNA29/DNA29a-c** gleich.

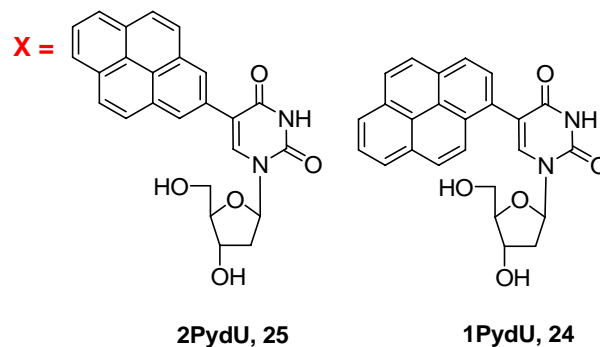
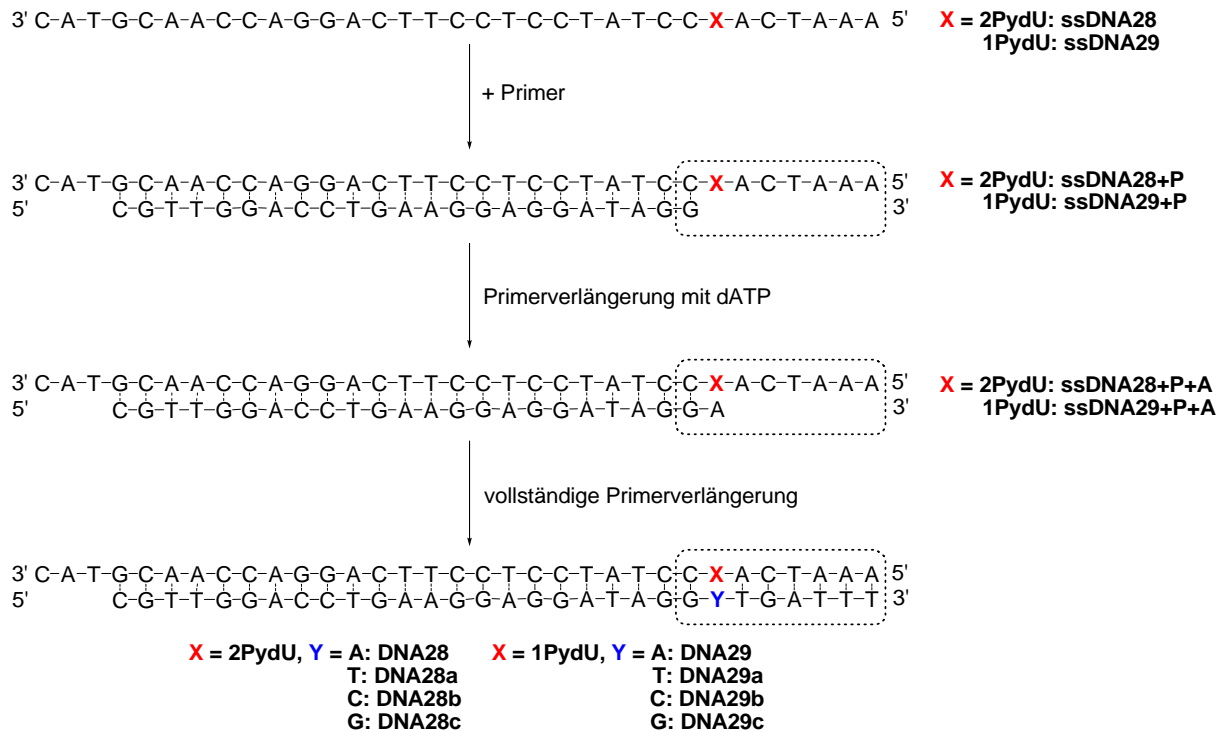


Abb. 6-14: Templat-Oligonucleotid mit entsprechenden Gegensträngen zur spektroskopischen Analyse der Primerverlängerung (X = **25** und **24**).

Der Hauptunterschied zwischen den Modifikation **25** und **24** ist die Blauverschiebung der Absorptionsbande von **25** in Gegenwart von A als Gegenbase. Als Erklärung wird, wie auch bereits in Kapitel 5.5.3 beschrieben wurde, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen U und A angenommen. Dadurch wird das *anti*-ständige Pyren (vgl. Kristallstruktur von **25**, Abb. 5-4), das in die große Furche der DNA-Helix ragt, weiter aus dem DNA-Stapel gedrängt. Der Chromophor kann weniger mit dem Basenstapel wechselwirken.

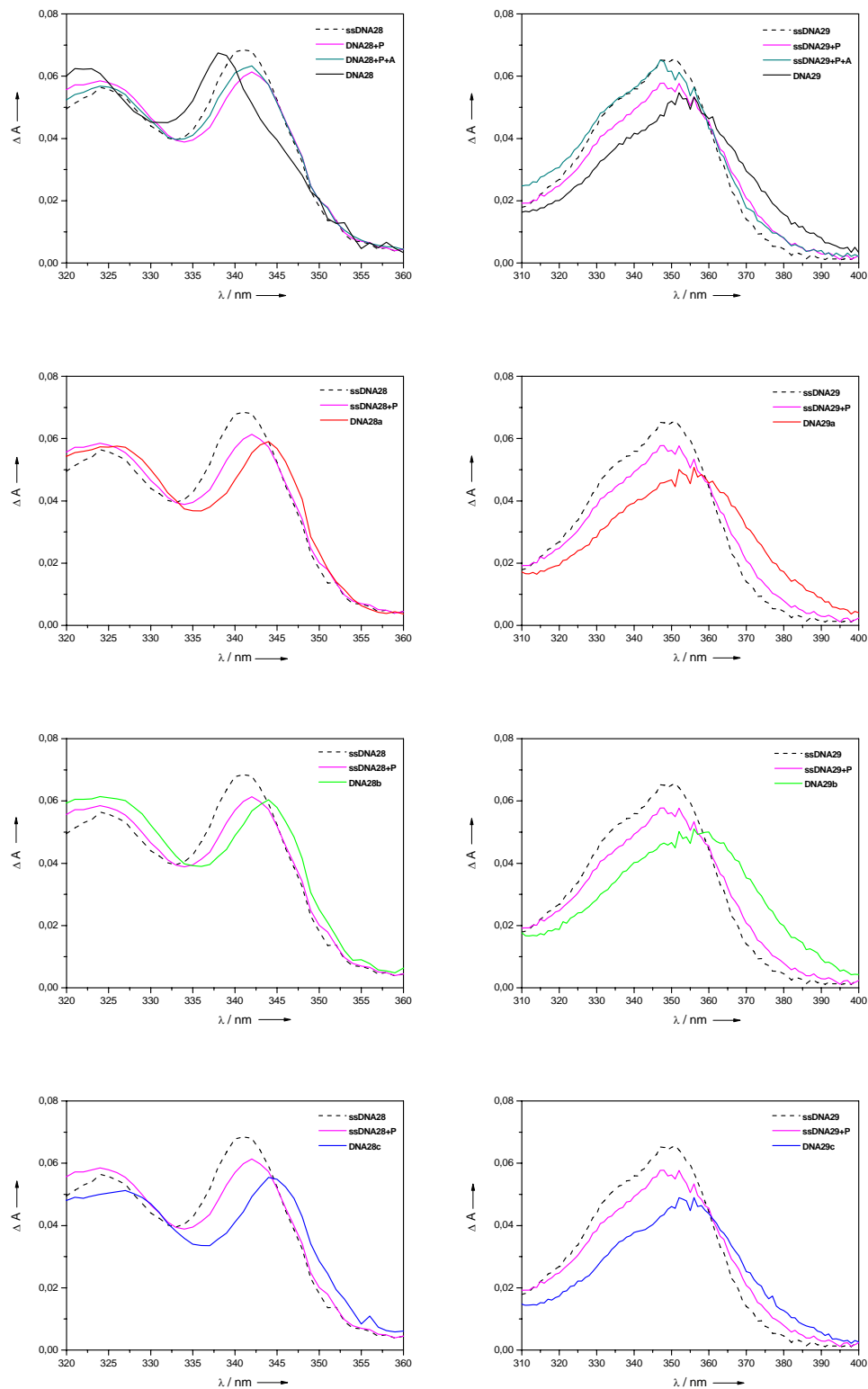


Abb. 6-15: UV/Vis-Absorptionsspektren der simulierten Primerverlängerung; links: Templat **ssDNA28** mit 2PydU als Modifikation, rechts: Templat **ssDNA29** mit 1PydU als Modifikation; 2.5 μM Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 20 °C.

Für die Fluoreszenzmessungen der 2PydU-modifizierten Oligonucleotide wurde als Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, für die Duplexe mit 1PydU wurde $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ gewählt. **ssDNA29** (Abb. 6-16, rechts) zeigt die erwartete strukturlose Emissionsbande von 1PydU (vgl. in Kapitel 5.3). Wird der Primer angelagert, so steigt die Fluoreszenzintensität an. Die Insertion eines dATPs als Gegenbase zu **24** verändert die Emission nicht weiter. Bei vollständiger Primerverlängerung ist mit Ausnahme von **DNA29c** ein starker Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Ist der Templatstrang mit 2PydU modifiziert (**ssDNA28**), so zeigt der Einzelstrang die typische Fluoreszenzbande mit Feinstruktur des lokal angeregten Pyrens, allerdings sinkt die Emission nach Anlagerung des Primers und Insertion des ersten dATPs (Abb. 6-16, links). Nach Verlängerung des Primers erreicht die Fluoreszenz nur mit Gegenbase A (**DNA28**) die Intensität des Einzelstrangs wieder. Durch die Gegenbasen T (**DNA28a**) und G (**DNA29c**) kommt es zu einer weiteren Fluoreszenzlöschung.

Besonders auffällig ist, dass die Fluoreszenz der 2PydU-modifizierten Oligonucleotide nach Anlagerung des Primers (**ssDNA28+P**) zunächst absinkt und auch in den vollständigen Duplexen **DNA28/DNA28a-c** nicht so sehr ansteigt, wie es aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 5.5.3 eigentlich zu erwarten wäre. Im Unterschied zu den Experimenten aus Kapitel 5.5.3 enthält der Primer am 3'-Ende und somit in der Umgebung zur Modifikation zwei benachbarte Guanine. Wie bereits durch *Voityuk et al.* gezeigt werden konnte, verändern Stapelungswechselwirkungen die Redoxpotentiale der natürlichen DNA-Basen.^[228] So verringert sich das Oxidationspotential in der Reihe $E_{\text{ox}}(\text{G}) > E_{\text{ox}}(\text{GG}) > E_{\text{ox}}(\text{GGG})$. Es ist denkbar, dass das Oxidationspotential durch die beiden benachbarten Guanine gerade soweit verringert ist, dass es zu Ladungstransfer zwischen 2PydU und GG kommt, was sich in der geringen Emissionsintensität widerspiegelt. Für einen Ladungstransfer zwischen 1PydU und GG (**DNA29/DNA29a,b**) ist die Triebkraft anscheinend noch zu gering. In **DNA28c** verläuft der Ladungstransfer noch effizienter, da hier drei benachbarte Guanine als Ladungsfalle vorhanden sind. Die Fluoreszenz wird fast vollständig gelöscht. Denselben Effekt sieht man auch im 1PydU-modifizierten Duplex **DNA29c**. Die geringe Fluoreszenzquantenausbeute von **DNA28a** lässt sich ebenfalls mit Ladungstransfer erklären. Wie durch die Experimente mit den 2PydU-Dinucleotiden (Kapitel 5.5.1) gezeigt werden konnte, findet reduktiver Ladungstransfer zwischen 2PydU und T statt. Dieser Prozess ist in **DNA28a** die Ursache für die deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität.

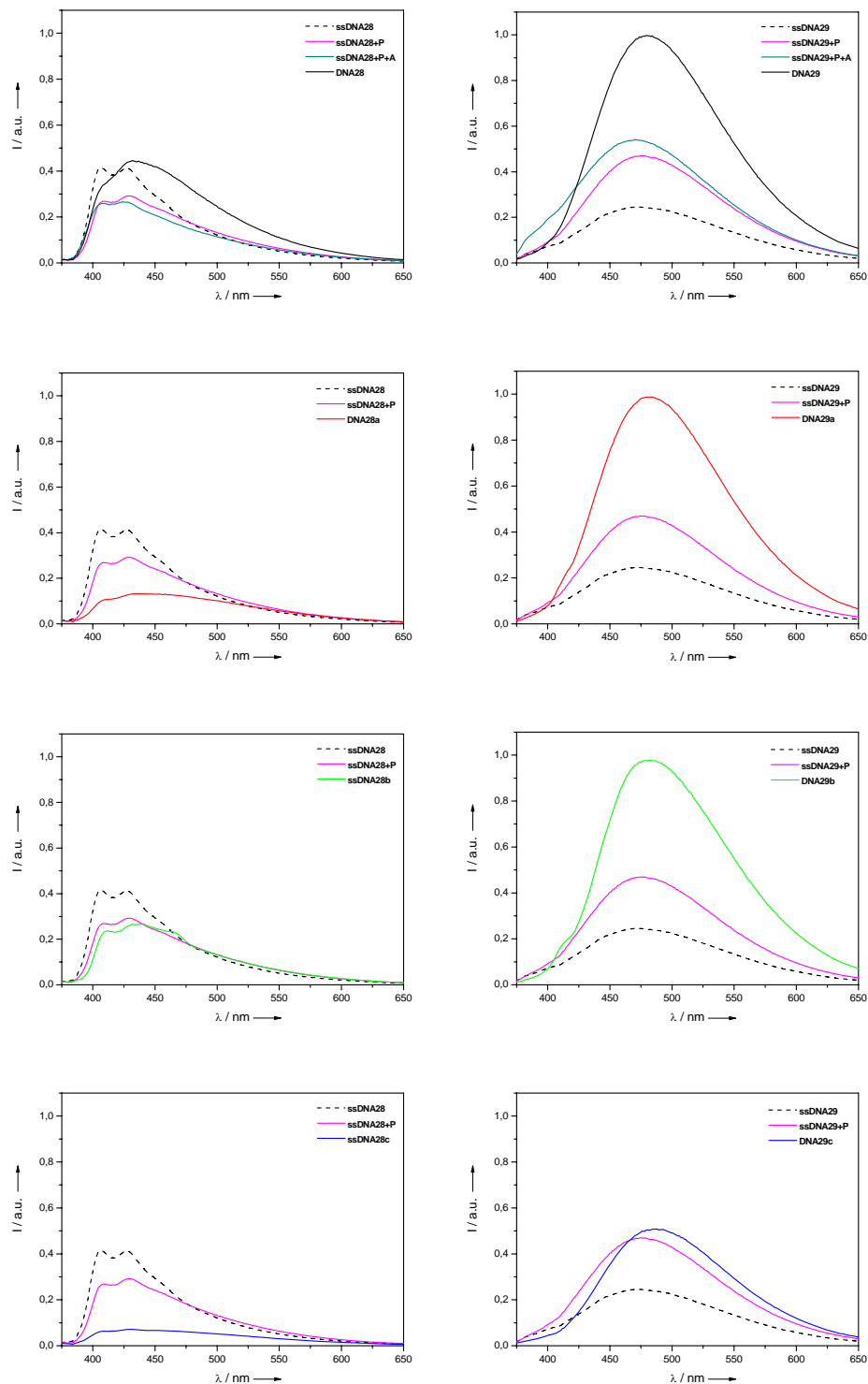


Abb. 6-16: Fluoreszenzspektren der simulierten Primerverlängerung; links: Templat **ssDNA28** mit 2PydU als Modifikation, rechts: Templat **ssDNA29** mit 1PydU als Modifikation; Anregungswellenlängen: **DNA28**: $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, **DNA29**: $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$; $2.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , $\text{pH } 7.0$, 250 mM NaCl , $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Polymerasen Pol β , Dpo4 und KF(exo-) wurden in Primerverlängerungs-Experimenten mit modifizierten Templatsträngen untersucht. Als Modifikationen wurden 2PydU (**25**), 1PydU (**24**), PydG (**12**) und BODIPY-dU (**31**) in die Oligonucleotide eingebaut. Pol β erwies sich als langsam arbeitende Polymerase, die nur die modifizierten 2'-Desoxyuridine **25**, **24** und **31** erkannte und als Gegenbase A insertierte. Eine Vervollständigung des Primers war nur über die Modifikationen **25** und **31** möglich. Allerdings waren hierfür eine verlängerte Reaktionszeit sowie eine hohe Enzymkonzentration nötig. PydG (**12**) wurde nicht erkannt. Ähnliches Verhalten zeigte Dpo4. Neben den 2'-Desoxyuridinderivaten **25**, **24** und **31** erkannte diese Polymerase allerdings auch PydG (**12**) und insertierte C als Gegenbase zu **12**. Die vollständige Primerverlängerung gelang nur für die Templatstränge mit den modifizierten 2'-Desoxyuridinen **25**, **24** und **31**. Einige Fehleinbauten konnten detektiert werden. Am schnellsten arbeitete die Polymerase KF(exo-), die ebenfalls alle vier Modifikation erkannte und die jeweils entsprechende Gegenbase insertierte. Fehleinbauten wurden jedoch detektiert. Allerdings konnten auch hier nur die Primer verlängert werden, deren Templatstränge die modifizierten 2'-Desoxyuridine **25**, **24** und **31** enthielten.

7 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit ist es gelungen, einen acyclischen DNA-Baustein auf der Basis von Indol (**11**) zu synthetisieren und anschließend kovalent in Oligonucleotide einzubauen. Die Annahme, dass Indol als Basensurrogat aufgrund fehlender Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren als universeller Nucleobasenersatz eingesetzt werden kann, konnte eindeutig mittels Schmelztemperaturmessungen bewiesen werden. Die Indol-Fluoreszenz wird in DNA um mindestens 90 % gelöscht. Dies hat zwei Gründe: (a) Indol kann nicht selektiv angeregt werden, (b) photoangeregtes Indol In^* ist in der Lage, alle natürlichen Nucleobasen zu reduzieren und damit Ladungstransfer zu induzieren.

Um den oxidativen Ladungstransfer zu untersuchen, wurde Indol (**3**) als Lochakzeptor mit den photoinduzierbaren Lochdonoren PydG (**12**) und Ethidium (**21**) kombiniert. Mit PydG wurde über eine Distanz von einem bis zwei dazwischen liegenden Basenpaaren ein effizienter Ladungstransfer erreicht, der zur Löschung der Pyrenfluoreszenz führte. Es zeigte sich, dass dieser Lochtransfer abhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist. Das System von *Valis* aus PydG und 7-Deazaguanin konnte somit deutlich verbessert werden.^[36] Der Ladungstransfer zwischen Ethidium und Indol wurde in Oligonucleotiden untersucht, die Donor und Akzeptor im Abstand von bis zu drei dazwischen liegenden Basen enthielten. Über alle Distanzen konnte der Ladungstransfer nur durch die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten τ_F des photoangeregten Zustands von Ethidium Et^* nachgewiesen werden. Mit Transferraten von $k_{CT} \approx 10^7 \text{ s}^{-1}$ scheint der Ladungstransfer zwar relativ langsam, jedoch unabhängig von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor zu verlaufen.

Die Erkennung von Einzelbasen-Punktmutationen nach dem DETEQ-Konzept ist mit beiden Donor-Akzeptor-Paaren grundsätzlich möglich. Im System PydG-Indol kann die Fluoreszenzdiskriminierung von vollständig richtig gepaartem Duplex gegen falsch gepaarte durch Variation der Anregungswellenlänge verbessert werden. Durch die lokale konformelle Störung der beiden acyclischen Basensurrogate im System Ethidium/Indol war die Detektion von Fehlpaarungen erst ab einer Distanz von zwei dazwischen liegenden Basenpaaren

möglich. Eine spezifische Unterscheidung einzelner Punktmutationen, wie sie für eine Anwendung in einem Assay nötig wäre, konnte mit beiden Systemen leider nicht erreicht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde 5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (2PydU, **25**) synthetisiert und mit dem bereits bekannten 1PydU (**24**) verglichen. Anhand spektroskopischer Untersuchungen des Nucleosids **25** konnte die sehr geringe elektronische Kopplung zwischen den beiden Chromophoren und die daraus resultierenden neuen optischen Eigenschaften bestätigt werden. Die Eigenschaft als Elektronendonator wurde in Experimenten mit 2PydU-Dinucleotiden erforscht. Es zeigte sich, dass T vermutlich durch photoangeregtes 2PydU reduziert wird. Die spektroskopische Analytik von 2PydU-modifizierten Oligonucleotiden erlaubten die Diskriminierung der Gegenbase A. Mit der Synthese von 2PydU ist es gelungen, einen effizienten Elektronendonator zu entwickeln, der sich in DNA aufgrund der geringen elektronischen Kopplung zwischen Pyren und dU wie ein kovalent gebundenes Pyren verhält, das aber über selektive Basenpaarungseigenschaften zum A verfügt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden Primerverlängerungs-Experimente mit Templatsträngen, die mit 2PydU (**25**), 1PydU (**24**), BODIPY-dU sowie PydG (**12**) modifiziert wurden, durchgeführt. Als DNA-Polymerasen wurden Pol β , Dpo4 und KF(exo-) verwendet. Alle Polymerasen erkannten die modifizierten 2'-Desoxyuridine und insertierten als Gegenbase A in die Primer. Die Primer wurden meist über die Modifikation hinweg weiter verlängert. Dpo4 und KF(exo-) konnten PydG (**12**) als modifiziertes Guanin erkennen und C als Gegenbase insertieren. Eine weitere Primerverlängerung über PydG hinweg war nicht möglich. Die aktivste DNA-Polymerase war KF(exo-).

8 Experimenteller Teil

8.1 Materialien und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Lancaster*, *Merck* und *Sigma-Aldrich* bezogen. Die verwendete Qualität war mindestens „zur Synthese“. Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, trockene Lösungsmittel wurden von *Alfa Aesar* und *Fluka* bezogen und unter Stickstoff aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Reaktionsführung

Die Reaktionen wurden gegebenenfalls unter Lichtausschluss und unter Stickstoff- (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) oder Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,996% rein) zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Die benötigten Glasgeräte werden in diesem Fall vorher im Hochvakuum ausgeheizt.

Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden DC-Alufolien der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0.25 mm verwendet, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtet sind. Die Auswertung der Platten erfolgte optisch über die Fluoreszenz-Löschung bei 254 nm bzw. Fluoreszenzanregung bei 366 nm, sowie chemisch mittels verschiedener Anfärbereagenzien. Routinemäßig wurde MeOH/H₂SO₄-Reagenz (2 Vol.-% H₂SO₄) verwendet. Für Amine wurde Ninhydrin-Reagenz nach *Stahl* verwendet. Zum Erhitzen dient ein Heißluftfön.

- *Flash*-Säulenchromatographie (FC): Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40 – 63 μm verwendet. Es wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still* ^[258] bei ca. 0.4 bar Überdruck chromatographiert. Die Auftragung der zu reinigenden Substanz erfolgte als Lösung im Laufmittel oder gegebenenfalls auf Kieselgel aufgezogen.

NMR

Kernresonanzspektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln an einem *Bruker Avance 300*, *Avance 400* oder *Avance 600* durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, NMR-Spektroskopie der Universität Regensburg gemessen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalten ca. 10 mg Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel.

Chemische Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz dient das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels (DMSO- d_6 : ^1H -NMR: $\delta = 2.49$ ppm; ^{13}C -NMR: $\delta = 39.4$ ppm). Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben.

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren wurden durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg gemessen. Die Spektrometer werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

- ESI-MS: *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000*
- CI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*
- EI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*, *Finnigan MAT 95*
- FAB-MS: *Finnigan MAT 95*
- MALDI-TOF: *HP G2025 A*

Die Angabe der Peaks erfolgt in m/z mit Angabe der Intensität des Basispeaks in %.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese wurde an einem *Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Als Träger dienten CPGs mit 1 μmol Belegung (500 Å). Phosphoramidite und CPG-Säulen stammten von *ABI*, *Glen Research* und *Proligo*, Synthesizer-Chemikalien und Reagenzien von *ABI*.

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Reversed-Phase HPLC wurde mit einem *Shimadzu* HPLC-System durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL). Für die Analytik unmodifizierter, indol-, PydG- und PydU-enthaltender Oligonucleotide wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (25 cm x 4.6 mm, *Supelco*) verwendet, für die präparative Trennung eine *Supelcosil* LC-318 (25 cm x 10.0 mm ID, 5 μm , *Supelco*). Für DNA-Stränge, die Ethidium enthielten, wurde als Analytiksäule eine *Discovery*[®] *Bio Wide Pore C5* (25 cm x 4.6 mm, 5 μm , *Supelco*) verwendet, für die präparative Trennung eine *Discovery*[®] *Bio Wide Pore C5* (25 cm x 10 mm, 5 μm , *Supelco*).

Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5, Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min (analytisch) bzw. 2.5 mL/min (präparativ). Die Detektion der DNA-Stränge erfolgte bei 260 nm und 290 nm im Fall unmodifizierter und indolenthaltender Oligonucleotide, bei 260 nm und 340 nm für PydG- und PydU-enthaltende DNA, sowie bei 260 nm und 530 nm für ethidiummodifizierte DNA (Spaltbreite 8 nm). Ethidiumenthaltende DNA wurde zusätzlich über die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm detektiert. Eine Zusammenfassung der verwendeten Methoden gibt Tabelle 8-7 (Kapitel 8.3.3).

Lyophilisation

Wässrige Lösungen wurden an einer *Christ Alpha 1-2 LD* Lyophilisierungsanlage nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff getrocknet.

Optische Spektroskopie

Alle spektroskopischen Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 20 °C durchgeführt.

- Absorption

UV/Vis-Spektren werden an einem *Varian Cary 100 Bio* mit temperierbarem Küvettenhalter 6 x 6 aufgenommen und sind gegen das Lösungsmittelsignal korrigiert. Einstellungen: SBW 1.0 nm, Average Time 2 s, Light source changeover: 350 nm. Schmelzpunktmessungen werden im Programm „Thermal“ mit den identischen Einstellungen durchgeführt. Die Heiz- bzw. Kühlrate beträgt 0.7 °C/min.

- Fluoreszenz

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgt an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter (Jobin-Yvon)* mit Peltier-Element zur Temperatursteuerung (*LFI-3751*). Folgende Software-Einstellungen werden verwendet: Integration time 0.2 s, Increment 1.0 nm. Die Spektren werden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert.

- Zirculardichroismus (CD)

CD-Messungen wurden an einem *Jasco J-715 Spektropolarimeter* mit PTC-150J Thermostat durchgeführt. Die Basislinienkorrektur erfolgt gegen das Lösungsmittel. Folgende Messparameter wurden verwendet: Sensitivity: 100 mdeg, Data Pitch: 1 nm, Scanning Mode: continuous, Scanning Speed: 200 nm/min, Response: 1 s, Band Width: 1 nm, Accumulation: 5

- Cyclovoltammetrie (CV)

CV-Messungen wurden mit einer Drei-Elektroden-Anordnung aus Gegenelektrode, Pseudo-Referenzelektrode und Arbeitselektrode durchgeführt. Die Elektroden bestanden aus Platin. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (*Cubepot*) erzeugt, der mit der Software *Mastercontrol* angesteuert werden konnte. Vor der Messung wurde die Zelle mit Argon gespült. Messungen wurden in trockenen

Lösungsmitteln und mit TBAHFP als Leitsalz durchgeführt. Als Referenzstandard wurde Ferrocen, dessen Potential $E(\text{Fc}/\text{Fc}^{+})$ bekannt ist, verwendet. Die erhaltenen Potentiale wurden mit einem Umrechnungsfaktor von + 0.63 V auf Potentiale gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) umgerechnet.^[240]

- **Spektroelektrochemie, Radikalspektroskopie (SEC)**
Für die SEC-Messungen wurde eine spezielle Zelle aus Calciumfluorid-Platten mit einer Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Als Arbeitselektrode diente ein Platinnetz. Die entsprechende Gegen- bzw. Referenzelektrode bestand aus Platin bzw. Silber. Die Messungen wurden in einem *Varian Cary 50* mit speziellem Probenhalter in trockenen Lösungsmitteln und mit TBAHFP als Leitsalz durchgeführt. Es wurden die Absorptionsänderungen bei steigendem Potential aufgezeichnet. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (*Cubepot*) erzeugt, der mit der Software *Mastercontrol* angesteuert werden konnte. Die Potentiale wurden nicht gegen einen internen Standard kalibriert und sind daher keine Absolutwerte.
- **Fluoreszenzlebenszeiten**
Fluoreszenzlebenszeiten wurden an einem *ISS K2 Fluorometer* gemessen. Die Bestimmung erfolgte über die Phasenmodulationsmethode. Diese Methode verwendet zur Anregung der Fluorophore eine kontinuierlich strahlende Lichtquelle mit sinusförmig moduliertem Licht. Aus Phasenunterschied und Amplitudenveränderung kann die Lebenszeit bestimmt werden.
- **Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsmessung**
Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen wurden von der Arbeitsgruppe *Dr. T. Fiebig (Boston College, USA)* durchgeführt.

Fluoreszenzquantenausbeute

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute erfolgte gemäß der Literatur mit schwefelsaurer Chininsulfatlösung. Die Fluoreszenzquantenausbeute von Chininsulfatlösungen mit Konzentrationen von $c < 10^{-4}$ M beträgt 0.546.^[259]

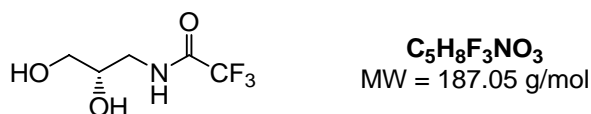
Kristallstrukturuntersuchung

Die Röntgenstrukturanalyse der Verbindung 2PydU (**25**) wurde von der Kristallographischen Abteilung der Universität Regensburg angefertigt. Die Messungen wurden an einem *OXFORD Diffraction Gemini R Ultra CCD-Diffraktometer* bei einer Temperatur von $T = 123$ K durchgeführt. Als Strahlungsquelle diente eine Röntgenröhre mit Cu-Anode und nachgeschaltetem Graphit-Monochromator ($\text{Cu-K}\alpha = 1,54184 \text{ \AA}$).

8.2 Synthesen

8.2.1 Darstellung des acyclischen Aminopropandiol-Linkers **7**

8.2.1.1 Synthese von N-((S)-2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoroacetamid (**5**)

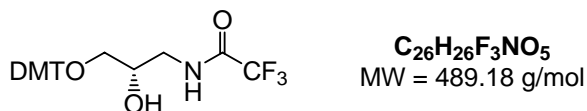


1.0 g (10.9 mmol) (*S*)-(-)-3-Amino-propan-1,2-diol (**4**) wird in 11 mL (110 mmol, 10 eq.) Trifluoressigsäuremethylester suspendiert und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingeeengt und dreimal mit 20 mL Toluol koevaporiert. Es werden 2.02 g (99 % d. Th.) einer gelblichen, stark viskosen Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , 294.7 K): δ (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 4.75 (bs, 2H, OH), 3.58 (m, 1H, CHOH), 3.30 (m, 1H, CH_2NH), 3.26 (m, 2H, CH_2OH), 3.09 (m, 1H, CH_2NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6 , 294.7 K): δ (ppm) = 156.4 (q, $^2J_{\text{CF}} = 36$ Hz, CO), 116.2 (q, $^1J_{\text{CF}} = 288$ Hz, CF_3), 69.6 (CHOH), 64.1 (CH_2OH), 43.2 (CH_2NH).

8.2.1.2 Synthese von N-{(S)-3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoroacetamid (6)



3.72 g (11 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid werden zu einer Lösung von 2.02 g (11 mmol, 1 eq.) *N*-((*S*)-2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoroacetamid (**5**) in 33 mL absolutem Pyridin gegeben und unter Argonatmosphäre 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird mit 1 mL MeOH abgebrochen, 1 h bei RT gerührt und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird in 100 mL Ethylacetat gelöst und dreimal mit je 50 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie zweimal mit je 50 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über FC gereinigt: beginnend mit DCM wird in Gegenwart von 0,1 % Pyridin der MeOH-Gehalt schrittweise auf 2 % erhöht. Das gereinigte Produkt wird im HV getrocknet. Es werden 4.45 g (83 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit erhalten.

DC (DCM/MeOH 100:2) $R_f = 0.33$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 294,7 K): δ (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.18 (m, 7H, arom.), 6.86 (m, 4H, arom.), 5.11 (s, 1H, OH), 3.82 (m, 1H, CH_2OH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.37 (m, 1H, CH_2NH), 3.15 (m, 1H, CH_2NH), 2.96 (m, 1H, CH_2O), 2.87 (m, 1H, CH_2O).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 158.2 (arom.), 156.4 (q, $^2J_{\text{CF}} = 36$ Hz, CO), 145.2, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8 (arom.), 116.2 (q, $^1J_{\text{CF}} = 288$ Hz, CF₃), 113.3 (arom.), 85.5 (OCPh₃), 69.6 (CHOH), 64.1 (CH₂OH), 55.2 (OCH₃), 43.2 (CH₂NH).

ESI-MS m/z (%): 488.3 (100) [M-H⁺]

8.2.1.3 Synthese von (*S*)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**7**)



1.64 g (3.35 mmol) *N*-{(*S*)-3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoroacetamid (**6**) werden in einer Mischung aus MeOH (20 mL), 25 %iger wässriger NH₃-Lösung (20 mL) und THF (9 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Nachdem THF und MeOH im Vakuum entfernt worden sind, wird dreimal mit je 50 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wird mit 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 1.19 g (90 % d. Th.) eines weißen, erstarrten Schaums erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.17 (m, 7H, arom.), 6.87 (m, 4H, arom.), 4.67 (bs, 1H, OH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.56 (m, 1H, CHOH) 3.30 (bs, 2H, NH₂), 2.93 (m, 1H, CH₂O), 2.83 (m, 1H, CH₂O), 2.66 (m, 1H, CH₂NH), 2.45 (m, 1H, CH₂NH).

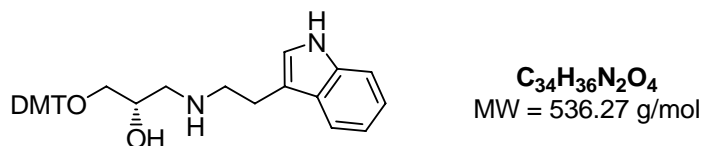
¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 158.2, 145.4, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8, 113.3 (arom.), 85.3 (OCPh₃), 71.5 (CHOH), 65.9 (CH₂O), 55.2 (OCH₃), 43.2 (CH₂NH).

ESI-MS m/z (%): 303.0 (100) [DMT⁺], 787.5 (10) [2MH⁺]

CI-MS m/z (%): 92.0 (10) [M-DMT⁺], 303.0 (100) [DMT⁺], 393.0 (1) [M]

8.2.2 Darstellung des acyclischen Indolbausteins

8.2.2.1 Synthese von (*S*)-1-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-[2-(indol-3-yl)-ethylamino]-propan-2-ol (**9**)



224 mg (1.0 mmol) 3-(2-Bromo-ethyl)indol (**8**) werden in 40 mL abs. DMF gelöst und mit 0,3 mL (2.0 mmol, 2 eq.) DIPEA versetzt. Nach Zugabe von 432 mg (1.1 mmol, 1.1 eq.) (*S*)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**7**) wird der Ansatz 4 Tage bei RT gerührt. Es werden weitere 0.14 mL (1.0 mmol, 1 eq.) DIPEA und 157 mg (0.4 mmol, 0.4 eq.) **7** zugegeben und weitere 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC mit einem Eluenten aus DCM/MeOH (100:3) mit 0.1 % Pyridin. Es werden 295 mg (55 % d. Th.) eines gelben erstarrten Schaums erhalten.

DC (DCM/MeOH 10:3) $R_f = 0.65$

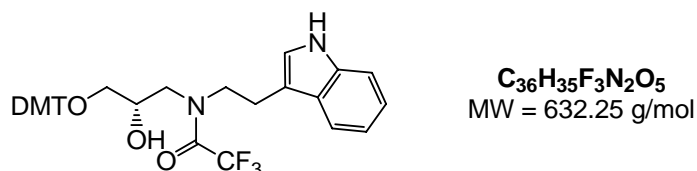
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 10.95 (bs, 1H, NH (Indol)), 7.53 (m, 1H, arom. (Indol)), 7.39 (m, 2H, arom. (DMT)), 2H arom. (Indol)), 7.24 (m, 7H, arom. (DMT)), 7.08 (m, 1H, arom. (Indol)), 6.99 (m, 1H, arom. (Indol)), 6.87 (d, 4H, arom. (DMT)), 3.73 (m, 8H, OCH₃, OCH₃, NH-CH₂-CH₂ (Indol)), 3.34 (m, 2H, CH₂ (Indol)), 2.99 (m, 6H, OCH₂, CHOH, CH₂NH).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 158.3, 149.8, 145.1, 136.4, 135.8, 135.8, 129.9, 128.0, 127.9, 127.1, 124.1, 123.2, 121.3, 118.6, 118.4, 113.4, 111.7, 73.5 (CHOH), 66.1 (CH₂O), 55.3 (OCH₃), 45.0 (CH₂NH).

ESI-MS m/z (%): 303.3 (100) [DMT⁺], 537.3 (46) [MH⁺]

HR-FAB-MS m/z (ber.) = 537.2753 [MH⁺]; m/z (gef.) = 537,2761 [MH⁺]

8.2.2.2 Synthese von *N*-{(S)-3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoro-*N*-[2-(indol-3-yl)-ethyl]-acetamid (**10**)

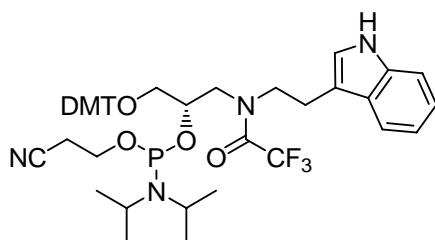


100 mg (0.186 mmol) **9** werden in 25 mL abs. DCM gelöst, mit 2.6 mL trockenem Pyridin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus 118 µL (0.837 mmol, 4.5 eq.) Trifluoressigsäureanhydrid in 1.5 mL abs. DCM wird innerhalb 5 Minuten zugetropft. Der Ansatz wird zunächst 30 min. bei 0 °C, anschließend 30 min. bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL DCM aufgenommen und kurz mit 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknung am HV werden 94.1 mg (80 % d. Th.) einer braunen, stark viskosen Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 10.91 (bs, 0,5H, NH (Indol), Isomer 1), 10.86 (bs, 0,5H, NH (Indol), Isomer 2), 7.55 (d, 1H, arom. (Indol)), 7.45 (m, 3H, arom.), 7.22 (m, 7H, arom. (DMT)), 6.93-7.17 (m, 2H, arom. (Indol)), 6.85 (m, 4H, arom. (DMT)), 4.01 (m, 2H, N-CH₂-CH₂ (Indol)), 3.71 (m, 6H, OCH₃), 3.64 (m, 2H, N-CH₂-CH₂ (Indol)), 3.35 (m, 2H, N-CH₂ (Linker)), 2.90 (m, 3H, OCH₂,CHOH).

ESI-MS m/z (%): 631.4 (7) [M-H⁺]⁻, 745.4 [M+TFA]⁻

8.2.2.3 Synthese von *N*-{(S)-3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoro-*N*-[2-(indol-3-yl)-ethyl]-acetamid-*O*-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl]-phosphoramidit (**11**)



C₄₅H₅₂F₃N₄O₆P
MW = 832.36 g/mol

120 mg (0.190 mmol) **10** werden in 10 mL abs. DCM gelöst und mit 66.2 μ L (0.475 mmol, 2.5 eq.) über KOH getrocknetem Triethylamin versetzt. 84.7 μ L (0.380 mmol, 2 eq.) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit werden zugegeben. Nach 60 min. Rühren bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 100 μ L abs. EtOH abgebrochen und rasch mit frisch hergestellter, gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 166 mg (95 % d. Th.) eines gelb-braunen Öls erhalten.

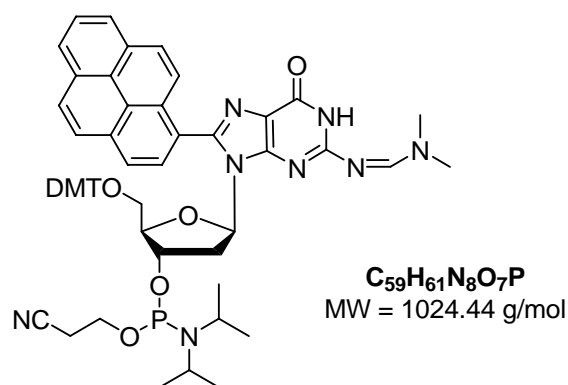
DC (DCM) R_f = 0.40

³¹P-NMR (121.5 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 139.4, 139.2.

8.2.3 Darstellung der DNA-Bausteine der Ladungsdonoren PydG und Ethidium

Die NMR-spektroskopischen Daten der Phenanthridinderivate **18** – **21** waren in Einklang mit den Daten in der Literatur^[37, 221] und werden hier nicht mehr explizit angegeben.

8.2.3.1 Synthese von 5'-*O*-Dimethoxytrityl-2-*N*-(Dimethylamino)-methylen-8-(Pyren-1-yl)-2'-Desoxyguanosin-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit] (**14**)^[21]

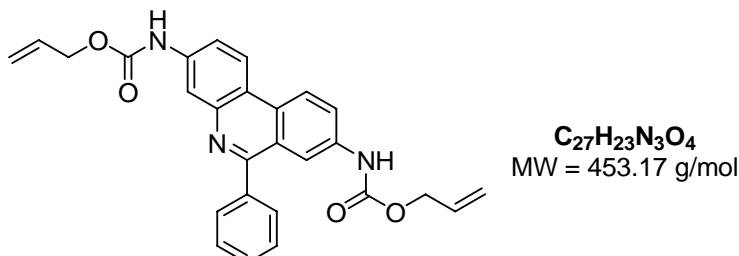


82 mg (0.099 mmol) **13**^[21] werden in 3.3 mL abs. DCM gelöst und mit 50 µL (0.356 mmol, 3.6 eq.) über Molsieb getrocknetem DIPEA versetzt. 39.2 µL (0.178 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit werden zugegeben. Nach 60 min. Rühren bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µL abs. EtOH abgebrochen und rasch mit frisch hergestellter, gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 96 mg (95 % d. Th.) einer gelben, sehr zähflüssigen Flüssigkeit erhalten.

DC (DCM/Aceton 6:1) R_f = 0.52 (Doppelfleck mit Hydrolyseprodukt)

³¹P-NMR (121.5 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 149.6, 149.2

8.2.3.2 Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (18) ^[37]

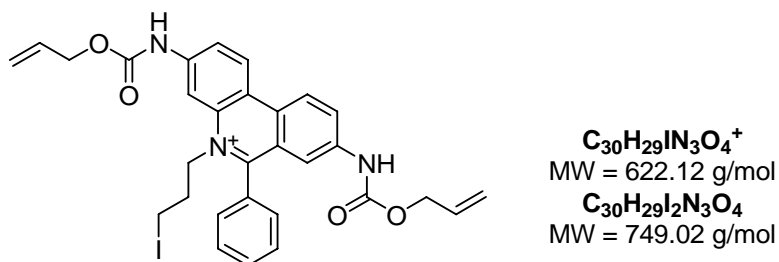


5.0 g (17.5 mmol) 3,8-Diamino-6-phenylphenanthridin (**17**) werden in 150 mL abs. DCM suspendiert und vorsichtig 31.6 mL (298 mmol, 17 eq.) Chlorameisensäureallylester zugegeben. Nach 48 h Rühren wird das Reaktionsgemisch auf 1/4 des Volumens im Vakuum eingedunstet und anschließend mit 200 mL wässriger NH_3 -Lösung (6 N) versetzt. Der braune Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig H_2O gewaschen und im HV getrocknet. Es werden 7.47 g (94 % d. Th.) eines braunen Feststoffs erhalten.

DC (EE/MeOH/ H_2O 6:2:1) $R_f = 0.94$

ESI-MS m/z (%): 454.1 (100) [MH^+]

8.2.3.3 Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodpropyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (19) ^[37]

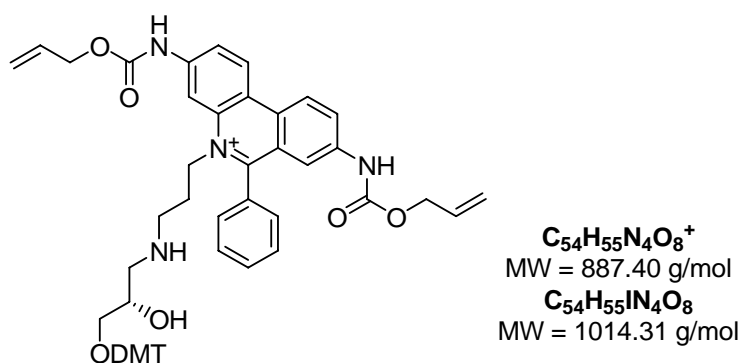


5.0 g (11 mmol) 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenantridin (**18**) werden in 40 mL abs. THF gelöst. Nach Zugabe von 13 mL (110 mmol, 10 eq.) 1,3-Diodpropan wird 9 Tage unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene, gelb-orange Niederschlag wird abfiltriert, mit sehr wenig kaltem THF gewaschen und im HV getrocknet. Es werden 7.8 g (95 % d. Th.) eines gelben Feststoffs erhalten.

DC (DCM/MeOH 20:3) $R_f = 0.34$

ESI-MS m/z (%): 622.1 (100) $[M^+]$

8.2.3.4 Synthese von (S)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenylphenanthridinium Iodid (**20**)^[37]

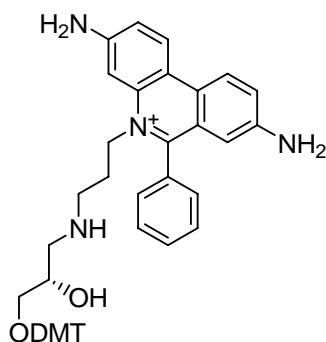


Zu einer Lösung von 1.12 g (1.5 mmol) (**19**) und 0.45 mL (3 mmol, 2 eq.) DIPEA in 60 mL DMF werden 649 mg (1.65 mmol, 1.5 eq.) des Aminopropandiol-Linkers **7** gegeben und 40 h bei RT gerührt. Anschließend werden weitere 236 mg (0.6 mmol, 0.4 eq.) **7** und 0.22 mL (1.5 mmol, 1 eq.) DIPEA zugegeben und für 15 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC (DCM/MeOH 100:3 + 0.1 % Pyridin → DCM/MeOH 10:3 + 0.1 % Pyridin). Es werden 1.33 g (88 % d. Th.) eines gelb-braunen Feststoffs erhalten.

DC (DCM/MeOH 10:3) $R_f = 0.80$

ESI-MS m/z (%): 303.1 (6) [DMT⁺], 585.2 (8) [M+H⁺-DMT⁺], 887.5 (100) [M⁺]

8.2.3.5 Synthese von (S)-3,8-Bis-amino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenylmethoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (21) ^[37]



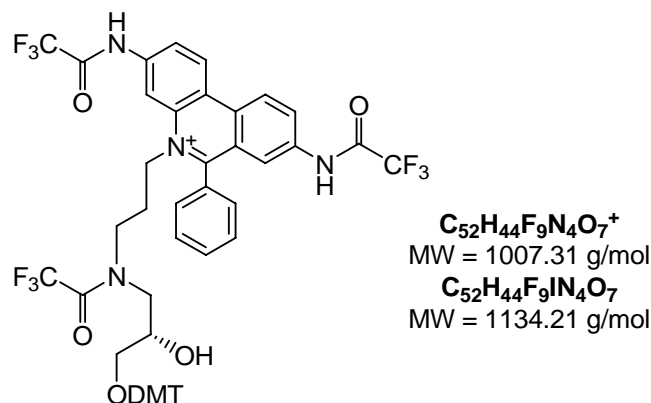
$C_{46}H_{47}N_4O_4^+$
MW = 719.36 g/mol
 $C_{46}H_{47}IN_4O_4$
MW = 846.26 g/mol

794 mg (0.844 mmol) von **20** werden in 27 mL abs. DCM und 0.09 mL H₂O gelöst. Zu dieser Lösung werden 20.8 (0.018 mmol) Pd(PPh₃)₄, 47.2 mg (0.18 mmol) PPh₃ und 782.9 mg (2.69 mmol) Bu₃SnH gegeben. Der Ansatz wird 90 min. bei RT gerührt. Durch Zugabe von 20 mL H₂O wird die Reaktion abgebrochen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC (DCM/MeOH 100:5 + 0.1 % Pyridin → EE/MeOH/H₂O 6:2:2 + 0.1 % Pyridin). Es werden 547 mg (64 % d. Th.) eines violetten Feststoffs erhalten.

DC (EE/MeOH/H₂O 6:2:2) $R_f = 0.62$

ESI-MS m/z (%): 303.1 (7) [DMT⁺], 719.4 [M⁺]

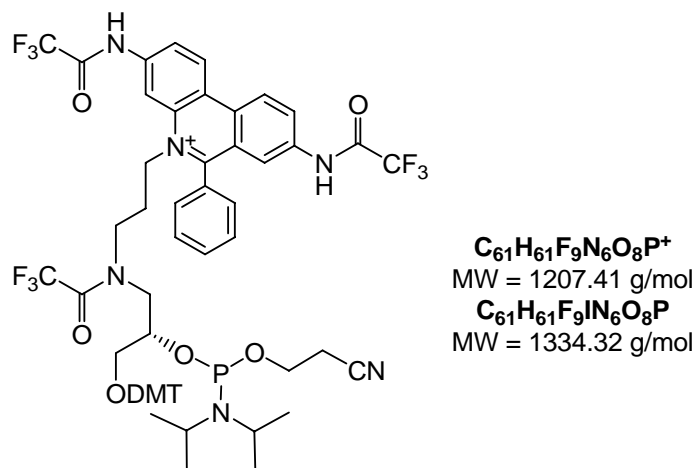
8.2.3.6 Synthese von (*S*)-3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-*N*-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (**22**)^[37]



513 mg (0.61 mmol) von **21** werden in 3 mL abs. DCM gelöst, mit 0.61 mL (7.3 mmol, 12 eq.) trockenem Pyridin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 0.52 mL (3.6 mmol, 6 eq.) Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft. Zunächst wird der Ansatz 10 min. bei 0 °C, dann weitere 10 min. bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird kurz mit 6 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknung am HV werden 550 mg (79 % d. Th.) eines braunen erstarrten Schaums erhalten.

MALDI-MS m/z (%): 1007.4 (100) [M⁺]

8.2.3.7 Synthese von (S)-3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{3-[(3-(bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy)-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropylaminophosphanyloxy]-propyl)-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenylphenanthridinium Iodid (23) ^[37]

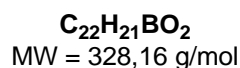
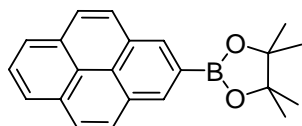


550 mg (0.486 mmol) **22** werden in 23 mL abs. DCM gelöst und mit 388 μL (1.944 mmol, 4 eq.) trockenem DIPEA versetzt. 216.5 μL (0.972 mmol, 2 eq.) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit werden zugegeben. Nach 30 min. Rühren bei RT wird die Reaktionsmischung rasch mit frisch hergestellter, gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 630 mg (97 % d. Th.) eines gelb-braunen Öls erhalten.

MALDI-MS m/z (%): 1206.9 (100) [M^+]

8.2.4 Darstellung der DNA-Bausteine von 2PydU und 1PydU

8.2.4.1 Synthese von 2-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan)-2-yl-pyren (27) ^[235]



132 mg (0.197 mmol, 5 mol-%) Bis(1,5-cyclooctadiene)diiridium(I) dichloride werden in 10 mL abs. Cyclohexan gelöst. Nach Zugabe von 33 mg (0.6 mmol, ca. 3 eq.) Natriummethanolat wird 60 min. bei RT unter Schutzgas-Atmosphäre gerührt. 797 mg (3.94 mmol, 100 mol-%) Pyren werden zusammen mit 1.1 g (4.33 mmol, 1.1 eq.) Bis(pinakolato)diboron und 105.7 mg (0.394 mmol, 10 mol-%) dtbpy in 35 mL abs. Cyclohexan gelöst und mit der vorbereiteten Lösung des Iridium-Katalysators versetzt. Der Ansatz wird 48 h bei 80 °C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC mit einem Eluenten aus PE/DCM (1:1). Es werden 486 mg (37 % d. Th.) eines hellgelben Feststoffs erhalten.

DC (PE/DCM 1:1) $R_f = 0.60$

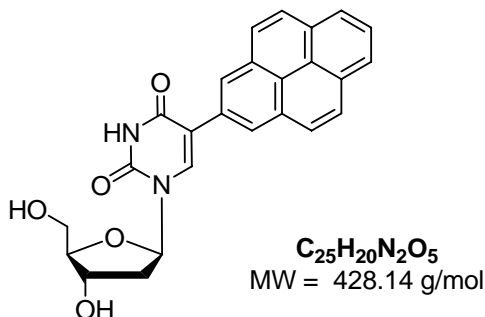
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 8.59 (s, 2H, H-1, H-3), 8.31 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, H-6, H-8), 8.27 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 9$ Hz, H-4, H-10), 8.20 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 9$ Hz, H-5, H-9), 8.11 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, H-7), 1.40 (s, 12H, CH₃).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 131.0, 130.9 (C-1, C-3), 129.9, 127.6 (C-4, C-10), 127.3 (C-5, C-9), 126.7 (C-7), 125.4, 125.0 (C-6, C-8), 123.6, 84.0 (CO), 24.8 (CH₃).

EI-MS m/z (%): 328.1(100) [M⁺]

HR-EI-MS m/z (ber.) = 328.1635 [M⁺]; m/z (gef.) = 328.1629 [M⁺]

8.2.4.2 Synthese von 5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (**25**)



117 mg (0.330 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin (**28**), 130 mg (0.396 mmol, 1.2 eq.) **27** sowie 29.4 mg (0.036 mmol, 0.11 eq.) 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichloro-palladium(II) werden in einer THF/H₂O-Mischung (2:1), die zuvor 30 min. mit Stickstoff entgast wurde, gelöst. Nach Zugabe von 10 mL MeOH und 257 mg (6.435 mmol, 19.5 eq.) NaOH wird 60 h bei 65 °C gerührt. Der Ansatz wird mit 2 N HCl neutralisiert und mit 150 mL EE extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC (DCM/Aceton 4:1 → EE/MeOH 10:3). Es werden 89 mg (62 % d. Th.) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

DC (EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5) $R_f = 0.56$

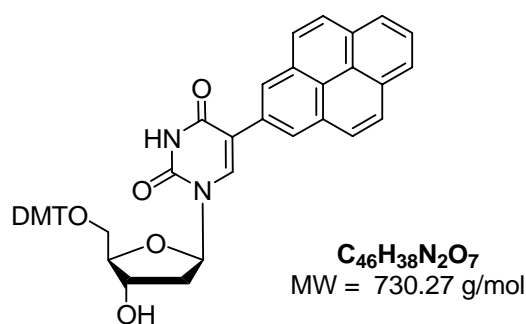
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 11.67 (brs, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, H-6 (dU)), 8.48 [s, 2H, H-1, H-3 (Pyren)], 8.29 (d, 2H, $^3J_{HH} = 7.7$ Hz, H-6, H-8 (Pyren)), 8.20 (s, 4H, H-4, H-5, H-9, H-10 (Pyren)), 8.06 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7.1$ Hz, $^3J_{HH} = 7.9$ Hz, H-7 (Pyren)), 6.30 (t, 1H, $^3J_{HH} = 6.6$ Hz, H-1'), 5.30 (m, 1H, 3'-OH), 5.24 (m, 1H, 5'-OH), 4.36 (m, 1H, H-4'), 3.86 (m, 1H, H-3'), 3.66 (m, 2H, H-5'), 2.25 (m, 2H, H-2').

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 162.3, 150.0, 139.2 (C-5, (dU)), 131.2, 130.6, 130.4, 127.5 (C-4, C-5, C-9, C-10 (Pyren)), 126.2 (C-7 (Pyren)), 125.1 (C-6, C-8 (Pyren)), 124.5 (C-1, C-3 (Pyren)), 123.6, 122.8, 113.5, 87.5 (C-3'), 84.7 (C-1'), 70.0 (C-4'), 60.8 (C-5'), 40.2 (C-2').

ESI-MS m/z (%): 427.2 (100) [M-H⁺]⁻, 463.2 [M+Cl⁻], 487.2 [M+CH₃COO⁻]

HR-ESI-FT-ICR-MS m/z (ber.) = 427.1294 [M-H⁺]⁻, m/z (gef.) = 327.1334 [M-H⁺]⁻

8.2.4.3 Synthese von 5'-O-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-5-(2-pyrenyl)-2'-desoxyuridin (**29**)



60 mg (0.140 mmol) 5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (**25**) werden in 5 mL trockenem Pyridin gelöst. 47.4 mg (0.140 mmol, 1 eq.) 4,4'-Dimethoxytriphenyl-methylchlorid werden zugegeben und der Ansatz 48 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 mL MeOH und eine weitere Stunde Rühren bei RT abgebrochen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC (DCM/Aceton 4:1 + 0.1 % Pyridin → EE/MeOH 10:1 + 0.1 % Pyridin). Es werden 80 mg (78 % d. Th.) eines braunen Feststoffs erhalten.

DC (EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5) R_f = 0.68

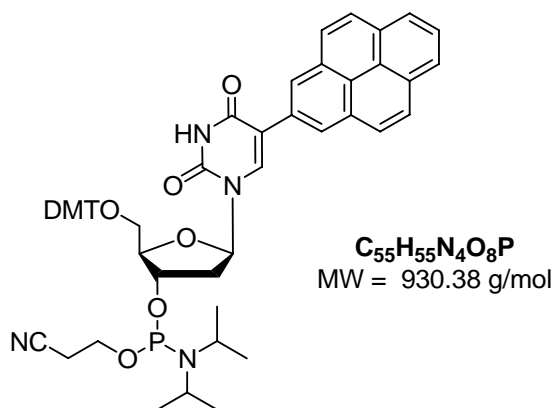
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 11.67 (brs, 1H, NH), 8.25 (d, ³J_{HH} = 7.7 Hz 2H, H-6, H-8 (Pyren)), 8.19 (s, 2H, H-1, H-3 (Pyren)), 8.08 (d, ³J_{HH} = 9.3 Hz, 2H, H-4, H-10 (Pyren)), 8.04 (dd, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 1H, H-7(Pyren)), 7.98 (s, 1H, H-6 (dU)), 7.80 (d, ³J_{HH} = 9.1 Hz, 2H, H-5, H-9 (Pyren)), 7.29 – 7.07 (m, 9 H, arom. (DMT)), 6.53 (m, 4H, arom. (DMT)), 6.30 (t, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.33 (m, 1H, 3'-OH), 4.28 (m,

1H, H-4'), 3.95 (m, 1H, H-3'), 3.44 (s, 3H, OCH₃), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (m, 2H, H-5'), 2.41 (m, 1H, H-2'), 2.27 (m, 1H, H-2').

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆, 294.7 K): δ (ppm) = 162.3, 157.8, 157.7, 150.0, 144.5, 138.2 (C-6, dU), 135.3, 135.2, 130.7, 130.5, 130.2, 129.5, 149.4, 127.6 (arom., DMT), 127.5 (arom, DMT), 127.2 (C-5, C-9, Pyren), 126.4 (DMT), 126.1 (C-7, Pyren), 125.0 (C-6, C-8, Pyren), 124.9 (C-1, C-3, Pyren), 123.5, 122.9, 114.4, 112.9 (arom, DMT), 85.9, 85.6 (C-3'), 85.0 (C-1'), 70.6 (C-4'), 63.7 (C-5'), 54.6 (OCH₃), 45.7, 40.0 (C-2'), 30.6.

ESI-MS m/z (%):(%) : 729.4 (100) [M-H⁺], 765.4 [M+Cl⁻], 789.4 [M+CH₃COO⁻].

8.2.4.4 Synthese von 5'-O-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-5-(2-pyrenyl)-2'-desoxyuridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl]-phosphoramidit (30)

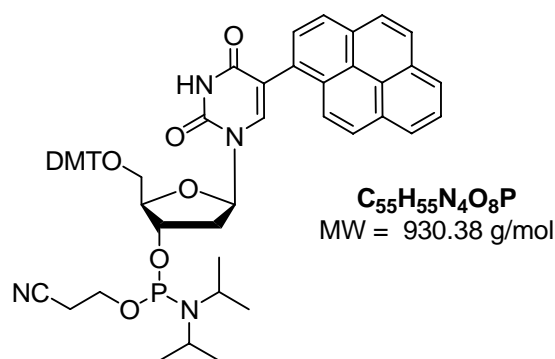


80 mg (0.109 mmol) **29** werden in 3.3 mL abs. DCM gelöst und mit 55 µL (0.394 mmol, 3.6 eq.) über Molsieb getrocknetem DIPEA versetzt. 24 µL (0.109 mmol, 1 eq.) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit werden zugegeben. Nach 60 min. Rühren bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µL abs. EtOH abgebrochen und rasch mit frisch hergestellter, gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 96 mg (95 % d. Th.) einer braunen, sehr zähflüssigen Flüssigkeit erhalten.

DC (DCM/Aceton 6:1) $R_f = 0.56$ (Doppelfleck mit Hydrolyseprodukt)

$^{31}\text{P-NMR}$ (121.5 MHz, DMSO- d_6 , 294.7 K): δ (ppm) = 148.7, 148.3.

8.2.4.5 Synthese von 5'-O-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl]-phosphoramidit] ^[40]



70 mg (0.096 mmol) des DMT-geschützten 1PydUs (5'-O-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin) ^[40] werden in 3 mL abs. DCM gelöst und mit 48 μL (0.346 mmol, 3.6 eq.) über Molsieb getrocknetem DIPEA versetzt. 21.5 μL (0.096 mmol, 1 eq.) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit werden zugegeben. Nach 60 min. Rühren bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 100 μL abs. EtOH abgebrochen und rasch mit frisch hergestellter, gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 85 mg (95 % d. Th.) einer braunen, sehr zähflüssigen Flüssigkeit erhalten.

DC (DCM/Aceton 6:1) $R_f = 0.76$ (Doppelfleck mit Hydrolyseprodukt)

$^{31}\text{P-NMR}$ (121.5 MHz, DMSO- d_6 , 294.7 K): δ (ppm) = 148.6, 148.4.

8.3 *Synthese und Charakterisierung von Oligonucleotiden*

8.3.1 **Verwendete Oligonucleotidsequenzen**

Indolmodifizierte Duplexe

DNA1	3' AGT – CAC – TG In – GTC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – ACC – CAG – ACT – GC 3'	In = Indol
DNA2	3' AGT – CAC – TA In – ATC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – ATC – TAG – ACT – GC 3'	
DNA2a	3' AGT – CAC – TA In – ATC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – ATT – TAG – ACT – GC 3'	
DNA2b	3' AGT – CAC – TA In – ATC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – ATA – TAG – ACT – GC 3'	
DNA2c	3' AGT – CAC – TA In – ATC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – ATG – TAG – ACT – GC 3'	
DNA3	3' AGT – CAC – TT In – TTC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – AAC – AAG – ACT – GC 3'	
DNA3a	3' AGT – CAC – TT In – TTC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – AAT – AAG – ACT – GC 3'	
DNA3b	3' AGT – CAC – TT In – TTC – TGA – CG 5' 5' TCA – GTG – AAA – AAG – ACT – GC 3'	

DNA3c 3' AGT – CAC – TT**In** – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAG – AAG – ACT – GC 3'

DNA4 3' AGT – CAC – TC**In** – CTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AGC – GAG – ACT – GC 3'

Unmodifizierte Referenzduplexe

DNA5 3' AGT – CAC – TGG – GTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – ACC – CAG – ACT – GC 3'

DNA6 3' AGT – CAC – TAG – ATC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – ATC – TAG – ACT – GC 3'

DNA7 3' AGT – CAC – TTG – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAC – AAG – ACT – GC 3'

DNA8 3' AGT – CAC – TCG – CTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AGC – GAG – ACT – GC 3'

Ladungstransferduplexe mit PydG, Indol und Referenzduplexe

DNA9 3' CAG – TCA – **X**T**In** – ACG – TAC – GT 5' **X** = PydG, **In** = Indol
 5' GTC – AGT – **S**AC – TGC – ATG – CA 3' **S** = abasische Stelle

DNA10 3' CAG – TCA – **X**TG – ACG – TAC – GT 5'
 5' GTC – AGT – **S**AC – TGC – ATG – CA 3'

DNA11 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – **S**AA – CTG – CAT – GC 3'

DNA12 3' CAG – TCA – **X**TT – GAC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – **S**AA – CTG – CAT – GC 3'

DETEQ-Duplexe mit PydG, Indol (ssDNA9 = ssDNA13, ssDNA11 = ssDNA14)

DNA13 3' CAG – TCA – **X**T**In** – ACG – TAC – GT 5' **X** = PydG
 5' GTC – AGT – CA C – TGC – ATG – CA 3' **In** = Indol

DNA13a 3' CAG – TCA – **X**T**In** – ACG – TAC – GT 5'
 5' GTC – AGT – CT C – TGC – ATG – CA 3'

DNA13b 3' CAG – TCA – **X**T**In** – ACG – TAC – GT 5'
 5' GTC – AGT – CG C – TGC – ATG – CA 3'

DNA13c 3' CAG – TCA – **X**T**In** – ACG – TAC – GT 5'
 5' GTC – AGT – CC C – TGC – ATG – CA 3'

DNA14 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – CAA – C TG – CAT – GC 3'

DNA14a 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – CTA – C TG – CAT – GC 3'

DNA14b 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – CGA – C TG – CAT – GC 3'

DNA14c 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – CCA – C TG – CAT – GC 3'

DNA14d 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – CAT – C TG – CAT – GC 3'

DNA14e 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
5' GTC – AGT – CAG – C TG – CAT – GC 3'

DNA14f 3' CAG – TCA – **X**TT – **In**AC – GTA – CG 5'
5' GTC – AGT – CAC – C TG – CAT – GC 3'

Ladungstransferduplexe mit Ethidium, Indol und Referenzduplexe

DNA15 3' CAG – TCA – **Et****In** – ACG – TAC – GT 5' **Et** = Ethidium
5' GTC – AGT – CA C – TGC – ATG – CA 3' **In** = Indol

DNA16 3' CAG – TCA – **Et**TG – ACG – TAC – GT 5'
5' GTC – AGT – CAC – TGC – ATG – CA 3'

DNA17 3' CAG – TCA – **Et**TC – **In**AC – GTA – CG 5'
5' GTC – AGT – CAG – CTG – CAT – GC 3'

DNA18 3' CAG – TCA – **Et**TC – **G**AC – GTA – CG 5'
5' GTC – AGT – CAG – CTG – CAT – GC 3'

DNA19 3' CAG – TCA – **Et**TC – **T****In**A – CGT – AC 5'
5' GTC – AGT – CAG – AC T – GCA – TG 3'

DNA20 3' CAG – TCA – **Et**TC – **T**GA – CGT – AC 5'
5' GTC – AGT – CAG – AC T – GCA – TG 3'

DETEQ-Duplexe mit Ethidium, Indol

DNA15 3' CAG – TCA – **Et****T****In** – ACG – TAC – GT 5' **Et** = Ethidium
5' GTC – AGT – C AC – TGC – ATG – CA 3' **In** = Indol

DNA15a	3' CAG – TCA – EtTIn – ACG – TAC – GT 5' 5' GTC – AGT – C TC – TGC – ATG – CA 3'
DNA15b	3' CAG – TCA – EtTIn – ACG – TAC – GT 5' 5' GTC – AGT – C GC – TGC – ATG – CA 3'
DNA15c	3' CAG – TCA – EtTIn – ACG – TAC – GT 5' 5' GTC – AGT – C CC – TGC – ATG – CA 3'
DNA17	3' CAG – TCA – EtTC – InAC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – CAG – C TG – CAT – GC 3'
DNA17a	3' CAG – TCA – EtTC – InAC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C TG – C TG – CAT – GC 3'
DNA17b	3' CAG – TCA – EtTC – InAC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C GG – CTG – CAT – GC 3'
DNA17c	3' CAG – TCA – EtTC – InAC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C CG – C TG – CAT – GC 3'
DNA17d	3' CAG – TCA – EtTC – InAC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C AC – C TG – CAT – GC 3'
DNA17e	3' CAG – TCA – EtTC – InAC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C AA – C TG – CAT – GC 3'
DNA17f	3' CAG – TCA – EtTC – InAC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C AT – C TG – CAT – GC 3'
DNA19	3' CAG – TCA – EtTC – TInA – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – C AG – ACT – GCA – TG 3'

DNA19a 3' CAG – TCA – EtTC – TInA – CGT – AC 5'
 5' GTC – AGT – C AC – ACT – GCA – TG 3'

DNA19b 3' CAG – TCA – EtTC – TInA – CGT – AC 5'
 5' GTC – AGT – C AA – ACT – GCA – TG 3'

DNA19c 3' CAG – TCA – EtTC – TInA – CGT – AC 5'
 5' GTC – AGT – C AT – ACT – GCA – TG 3'

Dinucleotide mit 2PydU

dn1 3' TY₁ 5' Y₁ = 2PydU

dn2 3' GY₁ 5'

dn3 3' AY₁ 5'

dn4 3' CY₁ 5'

Ladungstransferduplexe mit 2PydU als Elektronendonator

DNA21 3' CGT – GCA – ATY₁ – TAA – CGT – GC 5' Y₁ = 2PydU
 5' GCA – CGT – TA A – ATT – GCA – CG 3'

DNA22 3' CGT – GCA – TAY₁ – ATA – CGT – GC 5'
 5' GCA – CGT – AT A – TAT – GCA – CG 3'

DNA23 3' CGT – GCT – AAY₁ – AAT – CGT – GC 5'
 5' GCA – CGA – TT A – TTA – GCA – CG 3'

Duplexe mit 1PydU und 2PydU zum Vergleich der Eigenschaften

DNA24 3' AGT – CAC – TTY₂ – TTC – TGA – CG 5' Y₂ = 1PydU
 5' TCA – GTG – AAA – AAG – ACT – GC 3'

DNA24a 3' AGT – CAC – TTY₂ – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAC – AAG – ACT – GC 3'

DNA24b 3' AGT – CAC – TTY₂ – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAT – AAG – ACT – GC 3'

DNA24c 3' AGT – CAC – TTY₂ – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAG – AAG – ACT – GC 3'

DNA25 3' AGT – CAC – TTY₁ – TTC – TGA – CG 5' Y₁ = 2PydU
 5' TCA – GTG – AAA – AAG – ACT – GC 3'

DNA25a 3' AGT – CAC – TTY₁ – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAC – AAG – ACT – GC 3'

DNA25b 3' AGT – CAC – TTY₁ – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAT – AAG – ACT – GC 3'

DNA25c 3' AGT – CAC – TTY₁ – TTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AAG – AAG – ACT – GC 3'

Duplexe mit 2PydU zur Untersuchung der Excimerbildung

DNA26 3' CAG – TCA – Y₁ A Y₁ – ACG – TAC – GT 5' Y₁ = 2PydU
 5' GTC – AGT – A T A – TGC – ATG – CA 3'

DNA28	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₁ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGA TGA TTT 3'
DNA28a	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₁ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT TGA TTT 3'
DNA28b	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₁ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGC TGA TTT 3'
DNA28c	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₁ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGG TGA TTT 3'
ssDNA29+P	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₂ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GG 3'
ssDNA29+P+A	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₂ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGA 3'
DNA29	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₂ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGA TGA TTT 3'
DNA29a	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₂ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT TGA TTT 3'
DNA29b	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₂ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGC TGA TTT 3'
DNA29c	3' CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCX ₂ ACT AAA 5' 5' CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGG TGA TTT 3'

8.3.2 Kupplungsprotokolle

Der Syntheseautomat fördert die Reagenzien aus ihren Reservoirs in Pulsen zu je 16 μL durch die Reaktionsgefäße. Die Kupplungsprotokolle bestehen aus Einzelschritten, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 s bedeutet, dass der Einzelschritt schnellstmöglich Durchlaufen wird. Zur Synthese unmodifizierter Oligonucleotide wird das Standardprotokoll verwendet (Tabelle 8-1). Dieses Standardverfahren wird für die einzelnen Sonderbausteine nur im Bereich „\$ Coupling“ verändert.

Tabelle 8-1: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Phosphoramidite von A, G, C, T. Erläuterungen: Dblk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan, Wsh: Acetonitril, Act: 0,45 M Tetrazol in Acetonitril, Caps: Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B), Ox: Iod in Wasser/THF/Pyridin.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dblk	PULSE	10	0
16	Dblk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15

12	Wsh A	PULSE	14	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Zur Synthese der indolmodifizierten DNA-Stränge **ssDNA1-4**, **ssDNA9** und **ssDNA11** wurde der Indolbaustein **11** (vgl. Kapitel 4.2, Abb. 4-2) als 0.15 M Lösung in MeCN in den Syntheseautomaten eingebracht. Die Kupplungsdauer wurde von 1.6 min. auf 30.8 Min verlängert. Ebenso wurde die Zahl der Pulse von sieben auf 12 erhöht. Tabelle 8-2 zeigt das veränderte Kupplungsprotokoll. (Sonderbaustein an Position 8 im Syntheseautomaten).

In Kombination mit dem Ethidiumbaustein (**ssDNA15**, **ssDNA17** und **ssDNA19**) wurde eine weitere Veränderung des Protokolls vorgenommen, um eine ausreichende Kupplungseffizienz des Indolbausteins **11** zu erreichen. (Tabelle 8-3, Sonderbaustein an Position 8 im Syntheseautomaten).

Tabelle 8-2: Verändertes Protokoll zur Kupplung des acyclischen Indolbausteins **11** in den Oligonucleotiden **ssDNA1-4**, **ssDNA9** und **ssDNA11**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	7	0
25	8 + Act	PULSE	6	0
25	8 + Act	PULSE	2	500
2	Act	PULSE	3	300
25	8 + Act	PULSE	3	50
25	8 + Act	PULSE	1	500
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	30	0

Tabelle 8-3 Verändertes Protokoll zur Kupplung des acyclischen Indolbausteins **11** in den Oligonucleotiden **ssDNA15**, **ssDNA17** und **ssDNA19**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	7	0
25	8 + Act	PULSE	6	0
25	8 + Act	PULSE	5	500
2	Act	PULSE	3	300
25	8 + Act	PULSE	3	50
25	8 + Act	PULSE	4	500
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	30	0

Der Einbau des PydG-Phosphoramidits **14** (vgl. Kapitel 4.4.2, Abb. 4-13) in die Oligonucleotide **ssDNA9** und **ssDNA11** erfolgte nach einem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten modifizierten Kupplungsprotokoll mit verlängerter Kupplungszeit (15 min.).

Tabelle 8-4 Verändertes Protokoll zur Kupplung des PydG-Phosphoramidits **14** in den Oligonucleotiden **ssDNA9** und **ssDNA11**.^[19, 21]

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	6	0
23	6 + Act	PULSE	7	0
23	6 + Act	PULSE	2	75
2	Act	PULSE	4	300
1	Wsh	PULSE	7	525
1	Wsh	PULSE	8	0
7	9	PULSE	25	0
1	Wsh	PULSE	40	0

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von **14** in MeCN wurde es in DCM aufgenommen und als 0.1 M Lösung in den Syntheseautomaten eingebracht. Um ein Ausfallen des Phosphoramidits in MeCN zu vermeiden, wurde die feste Phase unmittelbar nach der Kupplung mit DCM gespült. Das Kupplungsprotokoll ist in Tabelle 8-4 zusammengefasst. (Sonderbaustein an Position 6, DCM an Position 9 im Syntheseautomaten).^[19, 21]

Tabelle 8-5 Verändertes Protokoll zur Kupplung des Ethidiumbausteins **23** in den Oligonucleotiden **ssDNA15**, **ssDNA17** und **ssDNA19**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	7	0
22	5 + Act	PULSE	6	0
22	5 + Act	PULSE	2	500
2	Act	PULSE	3	300
22	5 + Act	PULSE	3	50
22	5 + Act	PULSE	1	500
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	30	0
2	Act	PULSE	7	0
22	5 + Act	PULSE	6	0
22	5 + Act	PULSE	2	500
2	Act	PULSE	3	300
22	5 + Act	PULSE	3	50
22	5 + Act	PULSE	1	500
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	15	0

Das Kupplungsprotokoll des Ethidiumbausteins **23** (vgl. Kapitel 4.5.2, Abb. 4-23) für die Synthese der Oligonucleotide **ssDNA15**, **ssDNA17** und **ssDNA19** wurde ebenfalls in früheren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe entwickelt.^[38, 221] Allerdings wurde es hier von anfänglich drei hintereinander geschalteten Kupplungszyklen auf zwei verkürzt, wobei die Kupplungszeit unverändert bei 61.6 min. belassen wurde. Das Phosphoramidit **23** wurde als

0.17 M Lösung in MeCN in den Syntheseautomaten eingebracht. (Sonderbaustein an Position 5 im Syntheseautomaten).

Die DNA-Bausteine von 1PydU (**24**) und 2PydU (**25**) wurden nach Standardprotokoll (Tabelle 8-1) in die Oligonucleotide **ssDNA24**, **ssDNA29** (1PydU)^[95, 96] sowie **ssDNA21-23**, **ssDNA25** und **ssDNA28** (2PydU) eingebaut. In den DNA-Strängen **ssDNA26** und **ssDNA27**, in denen zwei 2PydU-Sonderbausteine hintereinander eingebaut werden sollten, wurde die Kupplungszeit auf 15 min. verlängert (Tabelle 8-6). (Sonderbaustein an Position 5 im Syntheseautomaten).

Tabelle 8-6: Verändertes Protokoll zur Kupplung des 2PydU-Phosphoramidits **30** in den Oligonucleotiden **ssDNA26** und **ssDNA27**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
22	5 + Act	PULSE	6	0
22	5 + Act	PULSE	1	75
2	Act	PULSE	4	300
1	Wsh	PULSE	7	525
1	Wsh	PULSE	8	0

8.3.3 Aufarbeitung und Reinigung der Oligonucleotide

Nach erfolgter DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (>25 %, *trace select, Fluka*) versetzt. Alle modifizierten Oligonucleotide, mit Ausnahme der ethidiummodifizierten DNA-Stränge, wurden bei 60 °C innerhalb 10 Stunden abgespalten. Bei den Strängen **ssDNA15**, **ssDNA17** und **ssDNA19** mit Ethidium als Modifikation wird die Abspaltungsdauer auf 5 Stunden verkürzt.^[37, 38] Nachdem Abtrennung des CPGs wurde dieses mit 300 µL Wasser gewaschen. Aus den vereinigten Filtraten wurde der Ammoniak in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (35 min., Heizung: 30 min., 35 °C, 100 mbar) entfernt. Die wässrigen Lösungen wurden in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

Zur Reinigung mittels *reversed-phase* HPLC wurden die gefriergetrockneten Proben in 300 µL Wasser aufgenommen. Zur Analytik und präparativen Trennung der Oligonucleotide wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 8-7: Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten und –Säulen zur Oligonucleotidreinigung.
Erläuterungen: A = 50 mM NH₄OAc-Puffer (pH 6,5), B = MeCN.

Sequenzen	Mod.	Säule	Gradient	Detektion
Unmod. ON	---	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 15 % B (45 min.)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}$
ssDNA1-4	Indol	<i>Supelcosil</i> LC-318	5 – 15 % B (60 min.)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}$
ssDNA9	PydG/Indol	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 30 % B (50 min.)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 340 \text{ nm}$
ssDNA11	PydG/Indol			Fluoreszenz-Detektion: $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$
ssDNA15	Et/Indol	<i>Discovery</i> [®] <i>Bio</i>	0 – 15 % B (45 min.)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 530 \text{ nm}$
ssDNA17	Et/Indol	<i>Wide Pore</i> C5		Fluoreszenz-Detektion:
ssDNA19	Et/Indol			$\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$
ssDNA21-29	1PydU/ 2PydU	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 30 % B (50 min.)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 340 \text{ nm}$ Fluoreszenz-Detektion: $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$

Die eluierten Produkte der Chromatographie wurden in sterilen Kunststoffröhrchen (*Falcon-Tubes*, 15 mL) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Die verbleibende DNA wurde in 100 μL entionisierten Wasser aufgenommen. Diese Stammlösung wurde zur Herstellung weiterer DNA-Lösungen verwendet.

8.3.4 Charakterisierung und Hybridisierung von Oligonucleotiden

Charakterisierung der Oligonucleotide durch ESI-MS

ESI-Massenspektren von Oligonucleotiden wurden von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg an einem *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000* im negativen Ionisierungsmodus aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde aus dem *Lambert-Beerschen Gesetz* über die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ bestimmt.^[260] Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten DNA-Strangs in Wasser kann über folgende Formel berechnet werden:

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

Dabei steht A, C, G und T für die Anzahl der entsprechenden Nucleobase, ϵ beschreibt die Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. Der Faktor 0,9 berücksichtigt die Hypochromizität. Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonucleotide muss der entsprechenden Extinktionskoeffizient der Modifikationen addiert werden.

Tabelle 8-8: Molare Extinktionskoeffizienten der natürlichen und modifizierten Nucleoside.

natürliche Nucleoside	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	modifizierte Nucleoside	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
A	15.4	Indol	4.0 *
C	7.3	PydG	17.9 ^[21]
G	11.7	Ethidium	45.2 ^[226]
T	8.8	1PydU	17.0 *
		2PydU	18.6 *

* experimentell bestimmt in MeOH

Hybridisierung

Der modifizierte Einzelstrang wurde zusammen mit 1.2 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (Na-P_i) für 10 min. auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

Schmelztemperaturmessung

Für die Schmelztemperaturmessung wurden Duplexlösungen in 10 mM Na-P_i unter Zugabe von 250 mM NaCl frisch hybridisiert. In einem Cary 100 UV/Vis-Spektrometer wurden die Proben im Bereich zwischen 10 °C und 90 °C mit einer Rate von 0.7 °C/min. erhitzt bzw. abgekühlt und dabei die Absorptionsänderung bei $\lambda = 260$ nm optisch verfolgt.

8.3.5 Charakterisierung der synthetisierten Oligonucleotide

8.3.5.1 Indolmodifizierte Oligonucleotide

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik und der molaren Extinktionskoeffizienten der Oligonucleotide, sowie der Schmelztemperaturen der Duplexe, die nur mit Indol modifiziert wurden.

Tabelle 8-9: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der indolmodifizierten Oligonucleotide.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM⁻¹ cm⁻¹]
ssDNA1 (Indol)	5191.0	1730.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1297.3 [M-4H ⁺] ⁴⁻	156.2
ssDNA2 (Indol)	5159.0	1719.6 [M-3H ⁺] ³⁻ 1289.4 [M-4H ⁺] ⁴⁻	162.9
ssDNA3 (Indol)	5140.9	1713.6 [M-3H ⁺] ³⁻ 1284.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻	151.0
ssDNA4 (Indol)	5110.9	1703.7 [M-3H ⁺] ³⁻ 1277.5 [M-4H ⁺] ⁴⁻	148.3

Tabelle 8-10: Schmelzpunkte von 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 260 nm.

DNA-Duplex	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	T_m [°C]
	10 °C → 90 °C	90 °C → 10 °C	
DNA1	59.9	59.5	59.7
DNA2	52.5	51.5	52.0
DNA2a	55.0	53.5	54.3
DNA2b	55.0	53.4	54.2
DNA2c	54.7	52.8	53.8
DNA3	53.0	52.8	52.9
DNA3a	52.0	51.5	51.8
DNA3b	54.1	52.9	53.5
DNA3c	54.9	53.1	54.0
DNA4	57.0	55.9	56.5

8.3.5.2 Ladungstransfer-Oligonucleotide mit den Modifikationen PydG und Indol

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik und der molaren Extinktionskoeffizienten der Ladungstransfer-Oligonucleotide, sowie der Schmelztemperaturen der Duplexe, die als Donor PydG und als Akzeptor Indol enthalten.

Tabelle 8-11: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der Ladungstransfer-Oligonucleotide mit PydG und Indol.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
ssDNA9 (PydG, Indol)	5375.0	1791.8 [M-3H ⁺] ³⁻	166.9
		1343.5 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
ssDNA11 (PydG, Indol)	5375.0	1791.8 [M-3H ⁺] ³⁻	166.9
		1343.6 [M-4H ⁺] ⁴⁻	

Tabelle 8-12: Schmelzpunkte von 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-Pi, pH 7.0, 250 mM NaCl, 260 nm.

DNA-Duplex	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]	T _m [°C]
	10 °C → 90 °C	90 °C → 10 °C	
DNA13	47.1	45.9	46.5
DNA13a	47.9	46.5	47.2
DNA13b	47.9	47.2	47.6
DNA13c	49.4	48.6	49.0
DNA14	44.5	44.0	44.3
DNA14a	45.1	44.0	44.5
DNA14b	38.6 (54.6) *	38.0 (52.8) *	38.3 (53.7) *
DNA14c	42.2	41.1	41.6
DNA14d	43.0	41.5	42.3
DNA14e	46.1	44.4	45.2
DNA14f	41.7	41.4	41.5

* die Schmelzkurve zeigte zwei Übergänge

8.3.5.3 Ladungstransfer-Oligonucleotide mit den Modifikationen Ethidium und Indol

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik und der molaren Extinktionskoeffizienten der Ladungstransfer-Oligonucleotide, sowie der Fluoreszenzlebenszeiten der Duplexe, die als Donor Ethidium und als Akzeptor Indol enthalten.

Tabelle 8-13: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der Ladungstransfer-Oligonucleotide mit Ethidium und Indol.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM⁻¹ cm⁻¹]
ssDNA15 (Ethidium, Indol)	5325.1	1775.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1331.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	194.2
ssDNA17 (Ethidium, Indol)	5310.1	1769.7 [M-3H ⁺] ³⁻ 1327.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	192.8
ssDNA19 (Ethidium, Indol)	5285.1	1761.8 [M-3H ⁺] ³⁻ 1320.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	190.2

Tabelle 8-14: Fluoreszenzlebenszeiten ($\lambda_{exc} = 488$ nm) von 5.0 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl.

DNA-Duplex	τ_1 [ns]	Verteilung	τ_2 [ns]	Verteilung	τ [°C]
DNA15	2.4	0.203	13.4	0.797	11.2
DNA17	2.6	$1.07 \cdot 10^{-7}$	10.2	1	10.2
DNA19	1.8	0.085	12.8	0.915	11.8

8.3.5.4 Oligonucleotide mit den Modifikationen 1PydU und 2PydU

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik und der molaren Extinktionskoeffizienten der synthetisierten Oligonucleotide, sowie der Schmelztemperaturen der Duplexe **DNA24** und **DNA25**, die nur mit 1PydU und 2PydU modifiziert wurden.

Tabelle 8-15: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der Oligonucleotide, die mit 1PydU und 2PydU modifiziert wurden.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM⁻¹ cm⁻¹]
ssDNA21 (2PydU)	5369.3	1789.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1342.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	174.2
ssDNA22 (2PydU)	5369.3	1789.4 [M-3H ⁺] ³⁻ 1341.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻	174.2
ssDNA23 (2PydU)	5369.3	1789.7 [M-3H ⁺] ³⁻ 1341.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	174.2
ssDNA24 (1PydU)	5333.9	1778.4 [M-3H ⁺] ³⁻ 1333.5 [M-4H ⁺] ⁴⁻	164.0
ssDNA25 (2PydU)	5333.9	1778.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1333.6 [M-4H ⁺] ⁴⁻	165.6
ssDNA26 (2PydU)	5539.6	1846.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1384.4 [M-4H ⁺] ⁴⁻	188.3
ssDNA27 (2PydU)	5226.6	1742.1 [M-3H ⁺] ³⁻ 1306.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	174.4

Tabelle 8-16: Schmelzpunkte von 2.5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7.0, 250 mM NaCl, 260 nm.

DNA-Duplex	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	T_m [°C]
	10 °C → 90 °C	90 °C → 10 °C	
DNA24	53.1	51.9	52.5
DNA24a	56.7	54.9	55.8
DNA24b	54.7	53.3	54.0
DNA24c	53.3	52.8	53.1
DNA25	55.5	54.9	55.2
DNA25a	58.6	57.8	58.2
DNA25b	56.7	55.3	56.0
DNA25c	54.8	53.7	54.3

8.3.5.5 Dinucleotide mit 2PydU und Templatstränge für die Primer-Verlängerungs-Experimente

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik und der molaren Extinktionskoeffizienten der Dinucleotide mit 2PydU sowie der synthetisierten Templatstränge für die Primerverlängerungs-Experimente.

Tabelle 8-17: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der Dinucleotide mit 2PydU.

Dinucleotid	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
dn1	731.2	731.2 [M-H ⁺] ⁻	26.6
dn2	756.2	756.3 [M-H ⁺] ⁻	29.2
dn3	740.2	740.3 [M-H ⁺] ⁻	32.5
dn4	716.2	716.3 [M-H ⁺] ⁻	25.2

Tabelle 8-18: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der Oligonucleotide, die als Template für die Primerverlängerungs-Experimente verwendet wurden.

DNA-Strang	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
ssDNA28	10141.8	2536.3 [M-4H ⁺] ⁴⁻⁻	323.1
Templat mit 2PydU		2028.7 [M-5H ⁺] ⁵⁻	
ssDNA29	10141.8	2536.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻⁻	321.5
Templat mit 1PydU		2028.6 [M-5H ⁺] ⁵⁻	
Templat mit PydG	10180.8	2545.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻⁻	322.4
		2036.4 [M-5H ⁺] ⁵⁻	
Templat mit BODIPYdU *	10320.9	2580.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻⁻	316.4
		2064.2 [M-5H ⁺] ⁵⁻	

* Molarer Extinktionskoeffizient von BODIPYdU: $\epsilon_{260} = 11.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45]

8.4 Durchführung der Primerverlängerungs-Experimente

Kinasierung

Die radioaktive Markierung am 5'-OH des Primers mit einer (γ - ^{32}P)ATP-Phosphatgruppe wurde enzymatisch mit Hilfe die T4-Polynucleotidkinase (T4 PNK) durchgeführt. Ein 50 μL Reaktionsansatz enthielt folgende Substanzen:

39 μL H_2O
5 μL Kinase Puffer (10x)
2 μL Primer (10 μM)
2 μL (γ - ^{32}P)ATP
2 μL T4 PNK

Nach 60-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37 °C wurde das Enzym durch zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Der radioaktiv markierte ^{32}P -Primer wurde über Sephadex von überschüssigem ATP gereinigt.

Primerverlängerungs-Experimente

Die Reaktionsmischungen (20 μL) enthielten die entsprechende Polymerase, dNTPs (c = 200 μM), radioaktiv markierten Primer (c = 150 nM, 5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GG-3') und den Templatstrang (c = 225 nM, 3'-CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT AAX ACT AAA-5', X = modifiziertes Nucleotid) im entsprechenden Reaktionspuffer. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von STOP-Lösung (45 μL , 80% [v/v] Formamid, 20 mM EDTA, 0.025% [w/v] Bromphenolblau, 0.025% [w/v] Xylol-Cyanol) abgebrochen. Die Sequenzierung erfolgte mittels Gelelektrophorese über 12% iges denaturierendes PAGE.

Enzymkonzentrationen und Reaktionspuffer

Die Standard-Reaktionen mit Pol β und Dpo4 enthielten: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 2mM DTT, 20mM NaCl, 20mM KCl, 1% Glycerol, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA and 50 nM

Enzym. Die Standard-Reaktionen mit KF(exo-) enthielten: 50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 2 nM Enzym.

8.5 Daten zur Kristallstruktur von 2PydU (25)

2PydU kristallisierte aus MeOH bei Raumtemperatur in Form farbloser Plättchen (vgl. Abb. 5-4, Kapitel 5.2).

Tabelle 8-19: Kristalldaten und Strukturverfeinerungen für Verbindung **25**.

Summenformel	C ₂₅ H ₂₀ N ₂ O ₅	
Molekulargewicht	428.43 g/mol	
Kristalldimensionen	0.360 x 0.180 x 0.040 mm	
Kristallsystem	orthorhombisch	
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Zelldimensionen	a = 4.8280(2) Å	α = 90 °
	b = 15.2950(6) Å	β = 90 °
	c = 25.6363(11) Å	γ = 90 °
Volumen	1893.09(14) Å ³	
Zahl der Formeleinheiten pro Elementarzelle	4	
Röntgenographische Dichte	1.503 mg/m ³	
Absorptionskoeffizient	0.872 mm ⁻¹	
F(000)	896	
Temperatur	123 K	
Wellenlänge	1.54184 Å	
Monochromator	Graphit	
Messbereich 2 θ	3.36 - 62.50 °	
Gemessene Reflexe	5245	
Unabhängige Reflexe	2825 [R _{int} = 0.0525]	
Unabhängige Reflexe mit I > 2σ(I)	1946	
GOF on F ²	0.956	
R ₁ / wR ₂ (beobachtete Reflexe)	0.0486 / 0.1030	
R ₁ / wR ₂ (alle Reflexe)	0.0806 / 0.1184	
min./max. Restelektronendichte	-0.311/0.239 e ⁻ Å ⁻³	

Tabelle 8-20: Atomkoordinaten und äquivalente isotropische Temperaturfaktoren für Verbindung **25**.

Atom	x [$\times 10^4$]	y [$\times 10^4$]	z [$\times 10^4$]	U(eq) [$\text{\AA}^2 \times 10^3$]
O(1)	5958(7)	6775(2)	2634(1)	30(1)
O(2)	11294(7)	5890(2)	3979(1)	38(1)
O(3)	10945(5)	3575(2)	3639(1)	24(1)
O(4)	10014(6)	2676(2)	4743(1)	30(1)
O(5)	6559(6)	2478(2)	3236(1)	28(1)
N(1)	8517(8)	6292(2)	3304(1)	28(1)
N(2)	8415(7)	4874(2)	3608(1)	21(1)
C(1)	6750(8)	4658(3)	3187(2)	23(1)
C(2)	5904(8)	5244(3)	2823(2)	22(1)
C(3)	6707(9)	6139(3)	2892(2)	23(1)
C(4)	9568(9)	5698(3)	3660(2)	27(1)
C(5)	4337(8)	4970(3)	2354(2)	21(1)
C(6)	2315(8)	4319(3)	2384(2)	22(1)
C(7)	943(9)	4023(3)	1937(1)	19(1)
C(8)	1657(8)	4376(3)	1446(2)	19(1)
C(9)	3720(8)	5034(3)	1413(2)	22(1)
C(10)	5051(8)	5305(3)	1867(2)	22(1)
C(11)	-1184(8)	3364(3)	1960(2)	24(1)
C(12)	-2469(8)	3087(3)	1521(2)	25(1)
C(13)	-1784(9)	3411(3)	1019(2)	23(1)
C(14)	280(8)	4087(3)	982(2)	21(1)
C(15)	1001(9)	4435(3)	491(2)	25(1)
C(16)	3085(9)	5107(3)	475(2)	27(1)
C(17)	4412(9)	5377(3)	908(2)	24(1)
C(18)	-3120(9)	3140(3)	562(2)	29(2)
C(19)	-2419(9)	3497(3)	87(2)	28(1)
C(20)	-408(9)	4132(3)	47(2)	28(2)
C(21)	9411(9)	4174(3)	3951(2)	24(1)
C(22)	7144(9)	3644(3)	4213(2)	25(1)
C(23)	8434(9)	2739(3)	4265(2)	25(1)
C(24)	10419(9)	2684(3)	3800(1)	21(1)
C(25)	9275(9)	2174(3)	3346(2)	26(1)

Tabelle 8-21: Bindungslängen in Verbindung **25**.

Bindung	Bindungslänge [Å]	Bindung	Bindungslänge [Å]
O(1)-C(3)	1.231(5)	C(13)-C(14)	1.439(6)
O(2)-C(4)	1.205(5)	C(14)-C(15)	1.409(6)
O(3)-C(21)	1.424(5)	C(15)-C(16)	1.439(6)
O(3)-C(24)	1.446(5)	C(15)-C(20)	1.406(6)
O(4)-C(23)	1.446(5)	C(16)-C(17)	1.346(6)
O(5)-C(25)	1.420(5)	C(18)-C(19)	1.377(6)
O(4)-H(40)	0.8400	C(19)-C(20)	1.377(6)
O(5)-H(50)	0.8400	C(21)-C(22)	1.519(6)
N(1)-C(4)	1.383(6)	C(22)-C(23)	1.524(6)
N(1)-C(3)	1.391(5)	C(23)-C(24)	1.531(6)
N(2)-C(21)	1.466(5)	C(24)-C(25)	1.507(6)
N(2)-C(4)	1.384(6)	C(1)-H(1)	0.9500
N(2)-C(1)	1.386(5)	C(6)-H(6)	0.9500
N(1)-H(1N)	0.8800	C(10)-H(10)	0.9500
C(1)-C(2)	1.358(6)	C(11)-H(11)	0.9500
C(2)-C(3)	1.434(6)	C(12)-H(12)	0.9500
C(2)-C(5)	1.481(6)	C(16)-H(16)	0.9500
C(5)-C(6)	1.397(6)	C(17)-H(17)	0.9500
C(5)-C(10)	1.393(6)	C(18)-H(18)	0.9500
C(6)-C(7)	1.398(6)	C(19)-H(19)	0.9500
C(7)-C(11)	1.440(6)	C(20)-H(20)	0.9500
C(7)-C(8)	1.414(5)	C(21)-H(21)	1.0000
C(8)-C(9)	1.418(6)	C(22)-H(22A)	0.9900
C(8)-C(14)	1.432(6)	C(22)-H(22B)	0.9900
C(9)-C(10)	1.393(6)	C(23)-H(23)	1.0000
C(9)-C(17)	1.436(6)	C(24)-H(24)	1.0000
C(11)-C(12)	1.352(6)	C(25)-H(25A)	0.9900
C(12)-C(13)	1.418(6)	C(25)-H(25B)	0.9900
C(13)-C(18)	1.402(6)		

Tabelle 8-22: Bindungswinkel in Verbindung 25.

Bindung	Winkel [°]	Bindung	Winkel [°]
C(21)-O(3)-C(24)	110.8(3)	O(3)-C(21)-C(22)	106.2(3)
C(23)-O(4)-H(4O)	109.00	N(2)-C(21)-C(22)	114.8(4)
C(25)-O(5)-H(5O)	109.00	O(3)-C(21)-N(2)	107.8(3)
C(3)-N(1)-C(4)	128.3(4)	C(21)-C(22)-C(23)	103.2(3)
C(1)-N(2)-C(4)	121.6(3)	O(4)-C(23)-C(22)	110.5(3)
C(4)-N(2)-C(21)	118.5(3)	O(4)-C(23)-C(24)	109.0(3)
C(1)-N(2)-C(21)	118.9(3)	C(22)-C(23)-C(24)	103.8(3)
C(4)-N(1)-H(1N)	116.00	O(3)-C(24)-C(25)	109.3(3)
C(3)-N(1)-H(1N)	116.00	C(23)-C(24)-C(25)	113.6(4)
N(2)-C(1)-C(2)	123.6(4)	O(3)-C(24)-C(23)	106.3(3)
C(1)-C(2)-C(5)	121.7(4)	O(5)-C(25)-C(24)	108.8(4)
C(3)-C(2)-C(5)	120.6(4)	N(2)-C(1)-H(1)	118.00
C(1)-C(2)-C(3)	117.6(4)	C(2)-C(1)-H(1)	118.00
O(1)-C(3)-N(1)	117.4(4)	C(5)-C(6)-H(6)	119.00
O(1)-C(3)-C(2)	127.5(4)	C(7)-C(6)-H(6)	119.00
N(1)-C(3)-C(2)	115.1(4)	C(5)-C(10)-H(10)	119.00
N(1)-C(4)-N(2)	112.8(4)	C(9)-C(10)-H(10)	119.00
O(2)-C(4)-N(1)	122.8(4)	C(7)-C(11)-H(11)	120.00
O(2)-C(4)-N(2)	124.4(4)	C(12)-C(11)-H(11)	120.00
C(2)-C(5)-C(10)	119.8(4)	C(11)-C(12)-H(12)	119.00
C(6)-C(5)-C(10)	119.0(4)	C(13)-C(12)-H(12)	119.00
C(2)-C(5)-C(6)	121.0(4)	C(15)-C(16)-H(16)	119.00
C(5)-C(6)-C(7)	121.2(4)	C(17)-C(16)-H(16)	119.00
C(6)-C(7)-C(8)	119.4(4)	C(9)-C(17)-H(17)	119.00
C(6)-C(7)-C(11)	122.1(4)	C(16)-C(17)-H(17)	119.00
C(8)-C(7)-C(11)	118.5(4)	C(13)-C(18)-H(18)	120.00
C(7)-C(8)-C(14)	120.6(4)	C(19)-C(18)-H(18)	120.00
C(9)-C(8)-C(14)	119.7(4)	C(18)-C(19)-H(19)	119.00
C(7)-C(8)-C(9)	119.7(4)	C(20)-C(19)-H(19)	119.00
C(10)-C(9)-C(17)	122.5(4)	C(15)-C(20)-H(20)	120.00
C(8)-C(9)-C(10)	119.1(4)	C(19)-C(20)-H(20)	120.00
C(8)-C(9)-C(17)	118.4(4)	O(3)-C(21)-H(21)	109.00
C(5)-C(10)-C(9)	121.7(4)	N(2)-C(21)-H(21)	109.00
C(7)-C(11)-C(12)	120.9(4)	C(22)-C(21)-H(21)	109.00
C(11)-C(12)-C(13)	122.5(4)	C(21)-C(22)-H(22A)	111.00
C(12)-C(13)-C(18)	123.3(4)	C(21)-C(22)-H(22B)	111.00
C(14)-C(13)-C(18)	118.4(4)	C(23)-C(22)-H(22A)	111.00
C(12)-C(13)-C(14)	118.3(4)	C(23)-C(22)-H(22B)	111.00
C(8)-C(14)-C(13)	119.2(4)	H(22A)-C(22)-H(22B)	109.00
C(8)-C(14)-C(15)	120.6(4)	O(4)-C(23)-H(23)	111.00
C(13)-C(14)-C(15)	120.1(4)	C(22)-C(23)-H(23)	111.00

C(14)-C(15)-C(20)	118.7(4)	C(24)-C(23)-H(23)	111.00
C(16)-C(15)-C(20)	123.4(4)	O(3)-C(24)-H(24)	109.00
C(14)-C(15)-C(16)	117.9(4)	C(23)-C(24)-H(24)	109.00
C(15)-C(16)-C(17)	121.9(4)	C(25)-C(24)-H(24)	109.00
C(9)-C(17)-C(16)	121.4(4)	O(5)-C(25)-H(25A)	110.00
C(13)-C(18)-C(19)	120.7(4)	O(5)-C(25)-H(25B)	110.00
C(18)-C(19)-C(20)	121.3(4)	C(24)-C(25)-H(25A)	110.00
C(15)-C(20)-C(19)	120.9(4)	H(25A)-C(25)-H(25B)	108.00

Tabelle 8-23: Anisotropische Temperaturfaktoren für Verbindung 25.

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
	[Å ² x 10 ³]	[Å ² x 10 ³]	[Å ² x 10 ³]	[Å ² x 10 ³]	[Å ² x 10 ³]	[Å ² x 10 ³]
O(1)	42(2)	23(2)	26(2)	2(1)	-4(2)	1(2)
O(2)	51(2)	25(2)	37(2)	2(2)	-18(2)	-7(2)
O(3)	26(1)	19(2)	27(1)	2(1)	3(1)	2(1)
O(4)	31(2)	32(2)	27(2)	8(1)	-7(1)	4(1)
O(5)	26(1)	30(2)	28(2)	-6(1)	-5(1)	0(1)
N(1)	42(2)	14(2)	28(2)	-2(2)	-5(2)	-7(2)
N(2)	27(2)	14(2)	20(2)	0(2)	-4(2)	2(2)
C(1)	24(2)	17(2)	27(2)	-4(2)	2(2)	-4(2)
C(2)	27(2)	21(2)	18(2)	2(2)	4(2)	0(2)
C(3)	27(2)	25(3)	18(2)	1(2)	-1(2)	-1(2)
C(4)	34(2)	24(3)	23(2)	0(2)	-2(2)	3(2)
C(5)	21(2)	20(2)	21(2)	-2(2)	-2(2)	3(2)
C(6)	23(2)	22(2)	20(2)	3(2)	7(2)	10(2)
C(7)	24(2)	18(2)	16(2)	2(2)	0(2)	7(2)
C(8)	19(2)	20(2)	19(2)	-5(2)	-1(2)	5(2)
C(9)	25(2)	17(2)	23(2)	-4(2)	0(2)	6(2)
C(10)	23(2)	19(2)	24(2)	-2(2)	1(2)	2(2)
C(11)	25(2)	19(2)	27(2)	3(2)	3(2)	-1(2)
C(12)	25(2)	21(2)	30(3)	1(2)	1(2)	-3(2)
C(13)	24(2)	21(2)	25(2)	-1(2)	-1(2)	6(2)
C(14)	21(2)	22(2)	21(2)	-1(2)	0(2)	8(2)
C(15)	27(2)	29(3)	20(2)	-4(2)	2(2)	9(2)
C(16)	33(2)	27(3)	21(2)	-1(2)	3(2)	4(2)
C(17)	27(2)	21(2)	24(2)	2(2)	5(2)	4(2)
C(18)	29(2)	30(3)	29(3)	-8(2)	-4(2)	2(2)
C(19)	29(2)	29(3)	26(2)	-9(2)	-8(2)	5(2)
C(20)	33(3)	34(3)	17(2)	-2(2)	-3(2)	8(2)
C(21)	30(2)	25(2)	16(2)	2(2)	0(2)	-6(2)

C(22)	29(2)	27(2)	20(2)	0(2)	0(2)	-3(2)
C(23)	27(2)	28(2)	20(2)	5(2)	-5(2)	-1(2)
C(24)	25(2)	18(2)	20(2)	3(2)	3(2)	2(2)
C(25)	25(2)	24(2)	30(2)	2(2)	3(2)	-1(2)

Tabelle 8-24: Wasserstoffkoordinaten und isotropische Temperaturfaktoren für Verbindung **25**.

Atom	x [$\times 10^4$]	y [$\times 10^4$]	Z [$\times 10^4$]	U(eq) [$\text{\AA}^2 \times 10^3$]
H(1)	6171	4067	3152	27
H(1N)	9065	6836	3344	34
H(4O)	10702	2173	4767	45
H(5O)	5907	2199	2982	42
H(6)	1864	4072	2713	26
H(10)	6482	5730	1844	26
H(11)	-1690	3120	2287	28
H(12)	-3885	2659	1550	30
H(16)	3537	5368	150	32
H(17)	5834	5804	879	29
H(18)	-4523	2705	580	35
H(19)	-3340	3301	-219	33
H(20)	32	4369	-286	34
H(21)	10654	4428	4223	29
H(22A)	5451	3625	3995	30
H(22B)	6672	3889	4559	30
H(23)	6990	2272	4246	30
H(24)	12196	2410	3916	25
H(25A)	10475	2255	3036	32
H(25B)	9225	1543	3432	32

Tabelle 8-25: Torsionswinkel in Verbindung 25.

	Torsionswinkel [°]		Torsionswinkel [°]
C(21)-O(3)-C(24)-C(23)	-1.7(4)	C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	1.5(6)
C(24)-O(3)-C(21)-N(2)	-141.2(3)	C(7)-C(8)-C(9)-C(17)	179.7(4)
C(24)-O(3)-C(21)-C(22)	-17.7(4)	C(14)-C(8)-C(9)-C(10)	-179.7(4)
C(21)-O(3)-C(24)-C(25)	121.3(3)	C(14)-C(8)-C(9)-C(17)	-1.5(6)
C(3)-N(1)-C(4)-O(2)	174.3(4)	C(7)-C(8)-C(14)-C(13)	-2.0(6)
C(4)-N(1)-C(3)-O(1)	177.5(4)	C(7)-C(8)-C(14)-C(15)	-179.7(4)
C(3)-N(1)-C(4)-N(2)	-6.1(6)	C(9)-C(8)-C(14)-C(13)	179.2(4)
C(4)-N(1)-C(3)-C(2)	-1.9(6)	C(17)-C(9)-C(10)-C(5)	179.5(4)
C(4)-N(2)-C(21)-O(3)	-109.9(4)	C(8)-C(9)-C(17)-C(16)	2.2(6)
C(4)-N(2)-C(1)-C(2)	-6.4(6)	C(10)-C(9)-C(17)-C(16)	-179.7(4)
C(1)-N(2)-C(21)-O(3)	58.5(4)	C(8)-C(9)-C(10)-C(5)	-2.4(6)
C(1)-N(2)-C(4)-N(1)	10.0(5)	C(7)-C(11)-C(12)-C(13)	1.1(7)
C(1)-N(2)-C(21)-C(22)	-59.6(5)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-2.7(7)
C(4)-N(2)-C(21)-C(22)	132.0(4)	C(11)-C(12)-C(13)-C(18)	-179.1(4)
C(1)-N(2)-C(4)-O(2)	-170.4(4)	C(18)-C(13)-C(14)-C(15)	-2.7(6)
C(21)-N(2)-C(4)-O(2)	-2.3(6)	C(12)-C(13)-C(14)-C(8)	3.1(6)
C(21)-N(2)-C(4)-N(1)	178.1(3)	C(18)-C(13)-C(14)-C(8)	179.7(4)
C(21)-N(2)-C(1)-C(2)	-174.5(4)	C(12)-C(13)-C(18)-C(19)	178.1(4)
N(2)-C(1)-C(2)-C(5)	174.4(4)	C(14)-C(13)-C(18)-C(19)	1.7(7)
N(2)-C(1)-C(2)-C(3)	-2.4(6)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-179.3(4)
C(5)-C(2)-C(3)-N(1)	-170.7(4)	C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	-179.7(4)
C(1)-C(2)-C(5)-C(6)	38.8(6)	C(8)-C(14)-C(15)-C(16)	-2.1(6)
C(1)-C(2)-C(5)-C(10)	-135.2(4)	C(13)-C(14)-C(15)-C(20)	2.4(6)
C(3)-C(2)-C(5)-C(6)	-144.5(4)	C(8)-C(14)-C(15)-C(20)	-180.0(4)
C(1)-C(2)-C(3)-O(1)	-173.2(4)	C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	2.8(7)
C(1)-C(2)-C(3)-N(1)	6.1(6)	C(14)-C(15)-C(20)-C(19)	-1.1(7)
C(5)-C(2)-C(3)-O(1)	10.1(7)	C(16)-C(15)-C(20)-C(19)	-178.9(4)
C(3)-C(2)-C(5)-C(10)	41.4(6)	C(20)-C(15)-C(16)-C(17)	-179.4(4)
C(6)-C(5)-C(10)-C(9)	2.8(6)	C(15)-C(16)-C(17)-C(9)	-2.9(7)
C(10)-C(5)-C(6)-C(7)	-2.2(6)	C(13)-C(18)-C(19)-C(20)	-0.4(7)
C(2)-C(5)-C(10)-C(9)	176.9(4)	C(18)-C(19)-C(20)-C(15)	0.1(7)
C(2)-C(5)-C(6)-C(7)	-176.3(4)	O(3)-C(21)-C(22)-C(23)	29.6(4)
C(5)-C(6)-C(7)-C(11)	-178.8(4)	N(2)-C(21)-C(22)-C(23)	148.5(3)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	1.4(7)	C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	-29.8(4)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-1.0(6)	C(21)-C(22)-C(23)-O(4)	86.9(4)
C(11)-C(7)-C(8)-C(9)	179.2(4)	O(4)-C(23)-C(24)-O(3)	-97.7(4)
C(11)-C(7)-C(8)-C(14)	0.4(6)	C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-100.2(4)
C(6)-C(7)-C(11)-C(12)	-179.7(4)	O(4)-C(23)-C(24)-C(25)	142.1(4)
C(8)-C(7)-C(11)-C(12)	0.1(6)	C(22)-C(23)-C(24)-O(3)	20.1(4)
C(6)-C(7)-C(8)-C(14)	-179.8(4)	O(3)-C(24)-C(25)-O(5)	-69.7(4)
C(9)-C(8)-C(14)-C(15)	1.5(6)	C(23)-C(24)-C(25)-O(5)	48.8(5)

9 Literaturverzeichnis

- [1] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [3] National Report Council, Mapping and Sequencing the Human Genome. In *National Academy Press*, Washington DC, 1988.
- [4] F. S. Collins, M. Morgan, A. Patrinos, *Science* **2003**, *300*, 286-290.
- [5] *International Human Genome Sequencing Consortium*, *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [6] *J. C. Venter et al.*, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [7] *International Human Genome Sequencing Consortium*, *Nature* **2005**, *431*, 931-945.
- [8] *The International HapMap Consortium*, *Nature* **2003**, *426*, 789-796.
- [9] W. H. Li, L. A. Sadler, *Genetics* **1991**, *129*, 513-523.
- [10] *D. G. Wang et al.*, *Science* **1998**, *280*, 1077-1082.
- [11] *M. Cargill et al.*, *Nature Genet.* **1999**, *22*, 231-238.
- [12] *M. K. Halushka et al.*, *Nature Genet.* **1999**, *22*, 239-247.
- [13] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1623-1633.
- [14] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7842-7849.
- [15] A. Chakravarti, *Nature* **2001**, *409*, 822-823.
- [16] L. Valis, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 36-38.
- [17] H.-A. Wagenknecht, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, accepted.
- [18] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014-6019.
- [19] L. Valis, Ladungstransfer in synthetischer DNA mit Ethidium als Basensurrogat oder pyrenmodifizierten Guanin. Dissertation, TU München, 2007
- [20] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10192-10195.
- [21] L. Valis, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3184-3187.
- [22] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691.
- [23] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411-415.
- [24] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, *17*, 53-120.

-
- [25] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, *411*, 366-374.
- [26] D. Wang, D. A. Kreutzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, *400*, 99-115.
- [27] E. M. Boon, A. L. Livingston, N. H. Chmiel, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12543-12547.
- [28] A. K. Boal, E. Yavin, O. A. Lukianova, V. L. O'Shea, S. S. David, J. K. Barton, *Biochemistry* **2005**, *44*, 8397-8407.
- [29] E. Yavin, A. K. Boal, E. D. A. Stemp, E. M. Boon, A. L. Livingston, V. L. O'Shea, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3546-3551.
- [30] S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5556-5564.
- [31] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.
- [32] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [33] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J.-Y. Tang, *Meth. Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.
- [34] H.-A. Wagenknecht, *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 251-266.
- [35] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051-1054.
- [36] C. Wanninger-Weiß, L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 100 - 106.
- [37] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.
- [38] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1845-1847.
- [39] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1685-1690.
- [40] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.
- [41] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2978-2980.
- [42] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119-9128.
- [43] I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, A. A. Petrov, S. V. Gontarev, Y. A. Berlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2081-2084.

-
- [44] C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64-71[45] C. Wanninger-Weiß, F. Di Pasquale, T. Ehrenschwender, A. Marx, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2008**, 1443-1445.
- [46] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 865-868.
- [47] M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2498-2504.
- [48] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062-2063.
- [49] S. I. Khan, M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4704-4705.
- [50] A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93-98.
- [51] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5529-5541.
- [52] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5361-5362.
- [53] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322.
- [54] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656-3660.
- [55] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025-1029.
- [56] T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 352-354.
- [57] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673-676.
- [58] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861-9870.
- [59] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 158-161.
- [60] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, *283*, 375-381.
- [61] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14052-14055.
- [62] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4399-4408.
- [63] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10046-10055.
- [64] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 89-91.
- [65] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9083-909

-
- [66] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8206-8215.
- [67] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950-12955.
- [68] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759-12765.
- [69] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.
- [70] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.
- [71] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51-53.
- [72] B. Giese, M. Spichty, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 195-198.
- [73] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318-320.
- [74] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1125-1129.
- [75] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 791-800.
- [76] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5896-5900.
- [77] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51-70.
- [78] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10406-10411.
- [79] Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6942-6949.
- [80] A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128-1136.
- [81] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2755-2762.
- [82] Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460-1467.
- [83] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6031-6041.
- [84] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 4827-4831.
- [85] M. G. Debije, M. T. Milano, W. A. Bernhard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2752-2756.
- [86] Z. Cai, M. D. Sevilla, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *237*, 103-127.

-
- [87] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 1763-1766.
- [88] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1842-1844.
- [89] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480-11481.
- [90] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1839-1842.
- [91] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280-11281.
- [92] O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 270-274.
- [93] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1848-1851.
- [94] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871-1876.
- [95] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877-4883.
- [96] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 1637-1639.
- [97] S. T. Gaballah, J. D. Vaught, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 5927-5934.
- [98] Y. Guan, R. C. Manuel, A. S. Arvai, S. S. Parikh, C. D. Mol, J. H. Miller, R. S. Lloyd, J. A. Tainer, *Nature Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1058-1064.
- [99] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 4128-4158.
- [100] A. R. Pike, L. H. Lie, R. A. Eagling, L. C. Ryder, S. N. Patole, B. A. Connolly, B. R. Horrocks, A. Houlton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 615-617.
- [101] E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2002**, *20*, 282-286.
- [102] N. M. Jackson, M. G. Hill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 209-215.
- [103] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 770-772.
- [104] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. d. Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10803-10812.
- [105] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144-146.
- [106] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407-410.
- [107] D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635-638.

-
- [108] A. Sharma, R. G. Shulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1999.
- [109] B. Valeur, *Molecular Fluorescence* Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- [110] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14-19.
- [111] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463.
- [112] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.
- [113] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520.
- [114] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 293-301.
- [115] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, *431*, 217-221.
- [116] M. R. DeFelippis, D. P. Murthy, F. Broitman, D. Weinraub, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3416-3419.
- [117] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1-7.
- [118] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5483-5491.
- [119] M. R. Rajeswari, T. Montenay-Garestier, C. Hélène, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6825-6831.
- [120] M. R. Rajeswari, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, *14*, 25-30.
- [121] E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2921-2925.
- [122] S. R. Rajski, S. Kumar, R. J. Roberts, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5615-5616.
- [123] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4400-4407.
- [124] E. Mayer-Enthart, P. Kaden, H.-A. Wagenknecht, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11749-11757.
- [125] A. Harriman, G. R. Millward, P. Neta, M. C. Richoux, J. M. Thomas, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 1286-1290.
- [126] I. Guilford Jones, V. Malba, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5776-5782.
- [127] K. P. Mahon, R. F. Ortiz-Meoz, E. G. Prestwich, S. O. Kelley, *Chem. Commun.* **2003**, 1956-1957.
- [128] J. R. Carreon, K. P. Mahon, S. O. Kelley, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 517-519.
- [129] L. M. Wittenhagen, J. R. Carreon, E. G. Prestwich, S. O. Kelley, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2542-2546.

-
- [130] K. P. Mahon, M. D. Roy, J. R. Carreon, E. G. Prestwich, J. L. Rouge, S. Shin, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 766-773.
- [131] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, *46*, 39-51.
- [132] T. L. Netzel, K. Nafisi, M. Zhao, J. R. Lenhard, I. Johnson, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17936-17947.
- [133] I. Saito, T. Matsuura, M. Nakagawa, T. Hino, *Acc. Chem. Res.* **1977**, *10*, 346-352.
- [134] A. Wright, W. A. Bubb, C. L. Hawkins, M. J. Davies, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 35-46.
- [135] G. Payne, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7715-7727.
- [136] P. F. Heelis, A. Sancar, *Biochemistry* **1986**, *25*, 8163-8166.
- [137] P. F. Heelis, G. Payne, A. Sancar, *Biochemistry* **1987**, *26*, 4634-4640.
- [138] Y. F. Li, P. F. Heelis, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6322-6329.
- [139] S.-T. Kim, Y. F. Li, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 900-904.
- [140] P. F. Heelis, T. Okamura, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5694-5698.
- [141] S.-T. Kim, A. Sancar, C. Essenmacher, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8023-8027.
- [142] C. Aubert, M. H. Vos, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586-590.
- [143] C. Essenmacher, S.-T. Kim, M. Atamian, G. T. Babcock, A. Sancar, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1602-1603.
- [144] Q.-H. Song, H.-B. Wang, W.-J. Tang, Q.-X. Guo, S.-Q. Yu, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 291-298.
- [145] J. N. A. Tetley, G. G. Skellern, J. M. Midgley, M. H. Grant, A. R. Pitt, *Chem. Biol. Interact.* **1999**, *123*, 105-115.
- [146] J. N. A. Tetley, G. G. Skellern, M. H. Grant, J. M. Midgley, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 1-7.
- [147] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269-282.
- [148] J. W. Nelson, I. Tinoco, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6416-6421.
- [149] P. T. Henderson, E. Boone, G. B. Schuster, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 135-151.
- [150] C. Aaij, P. Borst, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *269*, 192-200.
- [151] J.-B. LePecq, C. Paleotti, *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87-106.
- [152] V. W. F. Burns, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *133*, 420-424.
- [153] J. Olmsted, D. R. Kearns, *Biochemistry* **1977**, *16*, 3647-3654.

-
- [154] A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucl. Acids Res.* **1979**, *7*, 547-569.
- [155] A. R. Morgan, D. H. Evans, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, *Nucl. Acids Res.* **1979**, *7*, 571-594.
- [156] P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215-2235.
- [157] W. C. Tse, D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 61-69.
- [158] E. N. Timofeev, I. P. Smirnov, L. A. Haff, E. I. Tishchenko, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8467-8470.
- [159] S. V. Kochetkova, E. I. Tishchenko, E. N. Timofeev, I. L. Shchaveleva, V. L. Florentiev, *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1495-1496.
- [160] T. Fiebig, C. Wan, S. O. Kelley, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1187-1192.
- [161] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 936-943.
- [162] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590-11591.
- [163] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 990-1009.
- [164] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2213-2222.
- [165] J. Frazer, S. M. Horner, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1279-1282.
- [166] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucl. Acid Res.* **2002**, *30*, 4918-4925.
- [167] T. L. Netzel, K. Nafisi, J. Headrick, B. E. Eaton, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17948-17955.
- [168] M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461-17472.
- [169] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875-1916.
- [170] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- [171] H. Suenaga, K. Nakashima, T. Mizuno, M. Takeuchi, I. Hamachi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1263-1267.
- [172] M. Beinhoff, W. Weigel, M. Jurczok, W. Rettig, C. Modrakowski, I. Brüdgam, H. Hartl, A. D. Schlüter, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3819-3829.
- [173] P. M. Gannett, T. P. Sura, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1611-1615.

-
- [174] M. Ikehara, S. Uesugi, M. Kaneko, 8-Bromoadenosine and its 5'-phosphate. In *Nucleic Acid Chemistry*, Hrsg. L. B. Townsend, R. S. Tipson, John Wiley & Sons: New York, 1978; Vol. 2, pp 837-841.
- [175] M. Ikehara, S. Uesugi, M. Kaneko, *Chem. Commun.* **1967**, 17-18.
- [176] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045-3046.
- [177] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [178] D. G. Wang, J.-B. Fan, C.-J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E. S. Lander, *Science* **1998**, *280*, 1077-1082.
- [179] A. J. Schafer, J. R. Hawkins, *Nature Biotechnol.* **1998**, *16*, 33-39.
- [180] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, *234*, 177-186.
- [181] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 505-508.
- [182] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nature Rev. Cancer* **2001**, *1*, 68-76.
- [183] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, *408*, 307-310.
- [184] A. C. Syvänen, *Human Mut.* **1999**, *13*, 1-10.
- [185] R. W. Kwiatkowski, V. Lyamichev, M. deArruda, B. Neri, *Mol. Diagn.* **1999**, *4*, 353-364.
- [186] K. J. Livak, *PCR Methods Appl.* **1995**, *4*, 357.
- [187] R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Ehrlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6230-6234.
- [188] W. J. Kim, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 815.
- [189] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4820-4827.
- [190] A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 958-963.
- [191] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Chem. Commun.* **2004**, 1704-1705.
- [192] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7827-7831.
- [193] A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatami, I. Saito, *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 122-127.
- [194] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2203-2206.
- [195] O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938-2939.
- [196] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2004**, 2674-2675.

-
- [197] D. V. Jarikote, O. Köhler, E. Socher, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187-3195.
- [198] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.
- [199] V. Karunakaran, J. L. P. Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954-2962.
- [200] W. A. Prütz, E. J. Land, *Int. J. Radiat. Biol.* **1979**, *36*, 513-520.
- [201] J. S. Lai, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3040-3041.
- [202] N. S. Girgis, H. B. Cottam, R. K. Robins, *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, *25*, 361-366.
- [203] A. Schwögler, V. Gramlich, T. Carell, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2452-2463.
- [204] M. Cornia, G. Casiraghi, L. Zetta, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5466-5468.
- [205] M. Yokoyama, M. Nomura, H. Togo, H. Seki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 2145-2149.
- [206] M. Yokoyama, M. Nomura, T. Tanabe, H. Togo, *Heteroatom Chem.* **1995**, *6*, 189-193.
- [207] J. Barbaric, unpublished results.
- [208] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [209] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 48-50.
- [210] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, in preparation.
- [211] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4977-4986.
- [212] M. K. Schlegel, A. E. Peritz, K. Kittigowittana, L. Zhang, E. Meggers, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 927-932.
- [213] L. Zhang, A. E. Peritz, P. J. Carroll, E. Meggers, *Synthesis* **2006**, 645-653.
- [214] T. Kubota, K. Kano, B. Uno, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865-3877.
- [215] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878-1879.
- [216] S. J. Atherton, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 12025-12029.
- [217] D. B. Hall, S. O. Kelley, J. K. Barton, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15933-15940.
- [218] A. I. Kononov, E. B. Moroshkina, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyninen, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 535-541.
- [219] S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3993-3997.
- [220] D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11620-11625.
- [221] N. Amann, Synthese von Ethidium- und Pyren-modifizierten Oligonukleotiden und deren Einsatz bei der Untersuchung des Ladungstransfers durch die DNA. Dissertation, TU München, 2004.
- [222] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 413-425.

-
- [223] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781-788.
- [224] R. L. Letsinger, M. E. Schott, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7394-7396.
- [225] G. Cosa, K.-S. Focsaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 585-599.
- [226] J. Pauluhn, A. Naujok, H. W. Zimmermann, *Z. Naturforsch.* **1980**, *35*, 585-598.
- [227] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701-4709.
- [228] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 231-238.
- [229] M. Minabe, S. Takeshige, Y. Soeda, T. Kimura, M. Tsubota, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 172-179.
- [230] P. P. Fu, H. M. Lee, R. G. Harvey, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2797-2803.
- [231] H. Lee, R. G. Harvey, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2847-2848.
- [232] A. Musa, B. Sridharan, J. Lee, D. L. Mattern, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5481-5484.
- [233] T. Ishiyama, Y. Nobuta, J. F. Hartwig, N. Miyaura, *Chem. Commun.* **2003**, 2924-2925.
- [234] T. Ishiyama, J. Takagi, J. F. Hartwig, N. Miyaura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3056-3058.
- [235] D. N. Coventry, A. S. Batsanov, A. E. Goeta, J. A. K. Howard, T. B. Marder, R. N. Perutz, *Chem. Commun.* **2005**, 2172-2174.
- [236] A. Trifonov, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *409*, 277-280.
- [237] S. Steenken, *Free Rad. Res. Comms.* **1992**, *16*, 349-379.
- [238] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 706-712.
- [239] D. J. Deeble, S. Das, C. v. Sonntag, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5784-5788.
- [240] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97-102.
- [241] H.-A. Wagenknecht, *Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Application*. Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
- [242] H. Schomburg, H. Staerk, A. Weller, *Chem. Phys. Lett.* **1973**, *22*, 1-4.
- [243] C. D. Borsarelli, H. A. Montejano, J. J. Cosa, C. M. Previtali, *J. Photochem. Photobiol. A* **1995**, *91*, 13-19.

-
- [244] T. Okada, I. Karaki, N. Mataga, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7191-7195.
- [245] M. E. Langmuir, A. Hayon, *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 4893-4899.
- [246] E. Hayon, *J. Chem. Phys.* **1969**, *81*, 4881-4892.
- [247] P. Manoj, H. Mohan, J. P. Mittal, V. M. Manoj, A. T. Aravindakumar, *Chem. Phys.* **2007**, *331*, 351-358.
- [248] W. Li, R. Zheng, Z. Jia, Z. Zou, N. Lin, *Biophys. Chem.* **1997**, *67*, 281-286.
- [249] J. N. Wilson, Y. Cho, S. Tan, A. Cuppoletti, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 279-285.
- [250] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2612-2614.
- [251] F. M. Winnik, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 587-614.
- [252] J. B. Birks, *Rep. Prog. Phys.* **1975**, *38*, 903-974.
- [253] R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 5487-5502.
- [254] U. Hübscher, G. Maga, S. Spadari, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 133-163.
- [255] H. Ohmori, E. C. Friedberg, R. P. P. Fuchs, M. F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. A. Kunkel, C. W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G. C. Walker, z. Wang, R. Woodgate, *Mol. Cell.* **2001**, *8*, 7-8.
- [256] F. Boudsocq, S. Iwai, F. Hanaoka, R. Woodgate, *Nucl. Acid Res.* **2001**, *29*, 4607-4616.
- [257] C. M. Joyce, N. D. F. Grindley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 1830-1834.
- [258] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [259] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-1024.
- [260] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.