

**Perylenbisimidderivate als artifizielle Nukleoside
Darstellung, Untersuchung und Aufbau von DNA
Netzwerken**

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



DISSERTATION

von

Diplom-Chemiker

Florian Menacher

aus Regensburg

Regensburg, 2011

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

Prüfungsgesuch eingereicht am: 01. März 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 2011

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Georg Schmeer (Vorsitzender)

Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Prof. Dr. Burkhard König

Prof. Dr. Joachim Wegener

Meiner Familie

One can certainly plan research, but not the results.

Dieter Seebach

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis Februar 2011 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg unter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie für die umfangreiche wissenschaftliche Freiheit und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

Meinen Kollegen Dr. Janez Barbaric, Sebastian Barrois, Effi Bätzner, Daniela Baumstark, Dr. Sina Berndl, Dr. Christoph Beyer, Thomas Ehrenschwender, Nadine Herzig, Carolin Holzhauser, Daniel Lachmann, Michaela Lutz, Alexander Penner, Dr. Christa Prunkl, Moritz Rubner, Wolfgang Schmucker, Sabrina Sezi, Claudia Stubinitzky, Dr. Linda Valis, Dr. Reji Varghese, Dr. Clemens Wagner, Dr. Claudia Wanninger-Weiß, Michael Weinberger, Christian Wellner und Ulrike Wenge für die wunderschönen vier Jahre im AK Wagenknecht.

Meinen langjährigen Laborkollegen.

Sina, die mich immer anspornte, eigene Ideen zu entwickeln und in die Tat umzusetzen und mit der ich längst vergessen geglaubte Lieder wiederbelebte.

Daniel, der mich überzeugt hat, dass es wirklich notwendig ist, immer mindestens 3 Elektrogeräte am Gürtel zu tragen und stets dafür sorgte, dass unser Labor bestens ausgestattet war.

Gaudi Claudi, die neuen Schwung und ein Stückchen Glamour der großen Modellwelt ins Labor brachte.

Und natürlich unseren Azubinen Sabine Hofmeister, Viktoria Meßmann und Sara Samiei-Khabiri, mit denen immer ein guter Ratsch möglich war und die fleißig für uns eingekauft und synthetisiert haben.

Euch Allen möchte ich ganz besonders für die immer herzliche Laboratmosphäre danken.

Den ständigen Mitgliedern der täglichen Kaffeerunde(n), die mit aktuellen Klatsch und Tratsch und auch einigen fachlichen Tipps das wissenschaftliche Arbeiten und den Alltag deutlich erleichtert haben.

Frau Weck für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen.

Dr. Andreas Wenge, für die Dichtefunktionaltheorieberechnungen der Amino-
perylenbisimidvorstufe.

Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung der Universität Regensburg für die zuverlässige Messung und Interpretation meiner Proben.

Josef Kiermeier und Wolfgang Söllner aus der Zentralen Analytik der Universität Regensburg für die Anfertigung der Massenspektren meiner Proben.

Dr. Vladimir Stephanenko aus dem Arbeitskreis Würthner an der Universität Würzburg für die AFM-Aufnahmen.

Meinen Eltern für jegliche Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

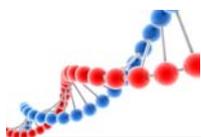
Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Manuela, die mir während meines gesamten Studiums und der Promotionszeit eine extrem große Stütze war und mich durch ihre stets positive und liebevolle Art und Weise immer wieder aus tiefen Motivationslöchern geholt hat.

Natürlich danke ich auch allen Anderen, die hier nicht persönlich erwähnt worden sind, mir aber bei der Durchführung meiner Arbeit geholfen haben.



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Themenstellung	1
2. Theoretischer Hintergrund	6
2.1. Spektroskopische Methoden.....	6
2.1.1. UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie.....	6
2.1.2. Cyclische Voltammetrie.....	8
2.2. Ladungstransfer in DNA	9
2.2.1. Oxidativer Ladungstransfer	11
2.2.2. Biologische Relevanz des oxidativen Ladungstransfers.....	15
2.3. Excitonische Wechselwirkungen zwischen Chromophoren	16
2.4. Molekülwechselwirkungen im angeregten Zustand	22
2.5. Detektion von Punktmutationen (SNP).....	27
2.5.1. Allelspezifische Hybridisierung.....	28
2.5.2. Strang-Austausch-Methode.....	29
2.5.3. Base-discriminating Fluorescent Probes	30
2.6. Molecular Beacons.....	32
2.6.1. Thermodynamische Betrachtung von Molecular Beacons	34
2.6.2. Kinetische Betrachtung von Molecular Beacons	35
2.6.3. Molecular Beacons basierend auf FRET-Wechselwirkungen.....	36
2.7. DNA-Sonden basierend auf der Ausbildung von Excimeren und Exciplexen.....	40
3. Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base	46
3.1. Perylenbisimid in der Oligonukleotidchemie.....	50
3.2. Synthese des azyklischen Linkers 4 und des Perylenbisimid- phosphoramidit-Bausteins 8	55
3.3. Abstandsabhängige Untersuchung der Photooxidation von Guanin...58	58
3.4. Synthese perylenbisimidmodifizierter DNA zur möglichen Detektion von SNPs.....	63
3.5. Synthese perylenbisimidmodifizierter Molecular Beacons	70
3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse	90
4. Pyrrolidinmodifiziertes Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base	93

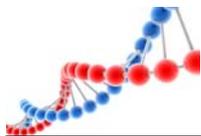


4.1.	Buchtregionmodifizierte Perylenbisimide in biologischen Systemen..	96
4.2.	Synthese des pyrrolidinmodifizierten Perylenbisimidbausteins	101
4.3.	Spektroskopische und elektrochemische Charakterisierung des pyrrolidinmodifizierten Perylenbisimidbausteins 11.....	107
4.4.	Spektroskopische Untersuchung amino-perylenbisimidmodifizierter Oligonukleotide	112
4.5.	pH-Wert abhängige spektroskopische Untersuchung amino- perylenbisimidmodifizierter Oligonukleotide.....	124
4.6.	Zusammenfassung.....	137
5.	Untersuchung zwei- und dreidimensionaler DNA Strukturen	140
5.1.	Synthese perylenbisimidmodifizierter DNA zum kontrollierten Aufbau eines DNA-Netzwerks.....	145
5.2.	Spektroskopische Untersuchung der gebildeten DNA-Netzwerke mit perylenbisimidmodifizierten DNA-Strängen	147
5.3.	Spektroskopische Untersuchung der gebildeten DNA-Netzwerke mit perylenbisimidmodifizierten und unmodifizierten DNA-Strängen	161
5.4.	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen.....	170
5.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	173
6.	Materialien und Methoden	175
6.1.	Verbrauchsmaterialien und Geräte	175
6.2.	Synthesevorschriften.....	181
6.2.1.	Darstellung des azyklischen Aminopropandiol-Linkers	181
6.2.2.	Darstellung des unmodifizierten Perylenbisimidbausteins.....	185
6.2.3.	Darstellung des aminomodifizierten Perylenbisimidbausteins.....	188
6.3.	Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden.....	196
6.4.	Anhang zu Kapitel 3 – Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base.....	203
6.5.	Anhang zu Kapitel 4 – Pyrrolidinmodifiziertes Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base	210
6.6.	Anhang zu Kapitel 5 – Untersuchung zwei- und dreidimensionaler DNA Strukturen	213
7.	Literaturverzeichnis	217

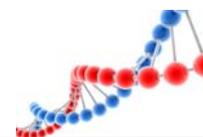


Abkürzungsverzeichnis

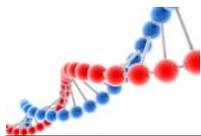
2D	zweidimensional
8-oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
Å	Angström
A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
abs.	absolut
Ak	Akzeptor
AP	Amino-perylenbisimid
APBI	Amino-perylenbisimid
bs	breites Singulett
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CI	chemische Ionisation
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CT	Ladungstransfer (<i>charge transfer</i>)
CV	Cyclovoltammetrie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett, Tag
dd	Dublett von Dublett
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCM	Dichlormethan
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Deoxyribonucleinsäure
Do	Donor
ds	Doppelstrang
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
ET	Elektronentransfer
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
exc	Anregung (<i>excitation</i>)
Φ	Quantenausbeute
FC	<i>Flash</i> -Säulenchromatographie
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
fs	Femtosekunde
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin
h	Stunde
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	<i>high resolution</i>
HV	Hochvakuum
IC	<i>Internal conversion</i>
ISC	<i>Inter-System-Crossing</i>
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
KHz	Kilohertz
λ	Wellenlänge
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	molar, mol/L
m	Multipllett
mbar	Millibar
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mdeg	<i>millidegree</i>
IV	



MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
min.	mindestens
mM	millimolar
mmol	Millimol
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NHE	Normalwasserstoffelektrode
nm	Nanometer
NMR	Kernspinnagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NTA	Nitrioltriessigsäure
P	Perylenbisimid
PBI	Perylenbisimid
pK _s	Säurekonstante
quant.	Quantitative
q	Quartett
ppm	<i>parts per million</i>
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
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



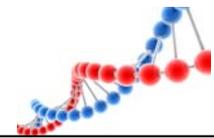
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
THF	Tetrahydrofuran
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190 – 750 nm)
V	Volt
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

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 werden *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. Einleitung und Themenstellung

Wissenschaftlern und Ingenieuren ist es in den letzten Jahrzehnten gelungen, hochgradig komplexe Moleküle wie Palytoxin,^[1, 2] Vitamin B₁₂^[3] oder Taxol,^[4] aber auch kleinste, höchst komplizierte elektronische Bauteile mit unglaublicher Präzision und Geschwindigkeit herzustellen.

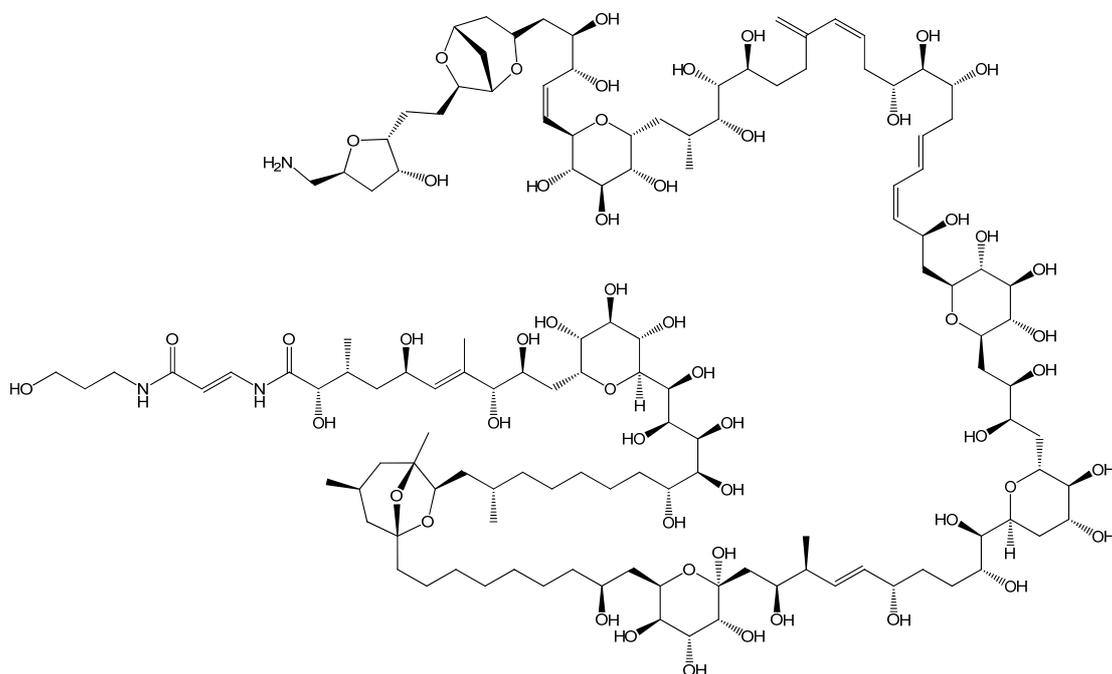
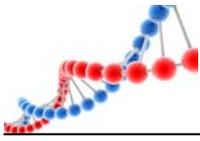


Abb. 1: Das hochkomplexe Palytoxin mit 64 stereozentren!

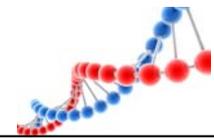
Diese Fortschritte erwecken den Eindruck, dass es der Menschheit bereits gelungen ist, die schwierigsten chemischen und physikalischen Herausforderungen erfolgreich gemeistert zu haben. Wirft man jedoch einen Blick in die Natur, so erkennt man sehr schnell, dass wir noch nicht einmal annähernd die mögliche Grenze von Perfektion und Kontrolle über die Organisation von Molekülen oder Atomen erlangt haben. Es bedarf noch außergewöhnlichen Anstrengungen, um „Nanostrukturen“ oder „Nanomaschinen“, wie sie zum Beispiel in Zellen zu finden sind, mit ihrer ganz spezifischen Funktionalität nachzubauen oder gar zu entwickeln.^[5] Die Natur erreicht diese Komplexität durch Selbstanordnung von verschiedenen einfachen und kleinen Bausteinen zu einer organisierten Struktur über nichtkovalente Wechselwirkungen.



Von diesen Bausteinen ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA) sicherlich einer der herausragendsten. Das Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen, π -Stapelung, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen formt aus komplementären Einzelsträngen eine steife und in ihrer Geometrie äußerst präzise Doppelhelix.^[5] Diese Eigenschaften und die Tatsache, dass mittlerweile eine schier unendliche Anzahl von unterschiedlichen Sequenzen leicht vollautomatisch^[6-9] erzeugt werden kann, rückt dieses Makromolekül stark in den Focus der DNA-Materialwissenschaftler, da es sich hervorragend als Baustoff für den Aufbau von Nanostrukturen eignet. Dieser große Bereich, komplexe Materialien aus DNA zu gestalten, lässt sich unter dem Begriff „strukturelle DNA Nanotechnologie“ zusammenfassen.^[10]

Auf der Grundlage unseres jetzigen Wissens über die helikale Struktur und den Regeln der *Watson-Crick*-Basenpaarung ist es Wissenschaftlern bereits möglich, eine große Anzahl von genau definierten zwei- und dreidimensionalen Körpern aus DNA zu erzeugen. Modifiziert mit funktionellen Gruppen könnten diese DNA-Strukturen als Gerüst für die nanometergenaue Anordnung von weiteren Molekülen dienen.^[11] Dies eröffnet die potentielle Möglichkeit, bewegliche Nanomaschinen mit spezifischen Funktionen zu erzeugen,^[12] was uns der Genialität der Natur wieder ein Stückchen näher bringen würde. Aber trotz all dieser bereits erbrachten Leistungen ist dieses große Ziel noch lange nicht erreicht.

Die Erforschung dieses neuen Baustoffes, DNA, mit all seinen charakteristischen Eigenschaften, begann am Anfang nur zögerlich. Die biologische Bedeutung der von F. Miescher 1871 entdeckten DNA war bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts eher unbekannt. Erst 1944 konnte Avery die eigentliche Aufgabe der DNA als Träger aller Erbinformationen nachweisen,^[13] was das allgemeine Interesse an diesem Makromolekül sprunghaft ansteigen ließ. Durch die Aufklärung der doppelhelikalen Struktur durch Watson und Crick 1953,^[14] die 1962 mit dem Nobelpreis in Medizin gewürdigt worden ist, begann das Zeitalter der modernen Molekularbiologie. Bis heute sind die Prinzipien der DNA über die Speicherung und Weitergabe der in ihr enthaltenen Informationen weitgehend untersucht und verstanden worden. Die

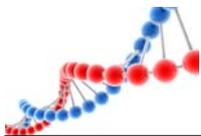


Bedeutung dieser Forschung wurde zuletzt mit dem Nobelpreis der Chemie 2006 an Roger Kronberg für seine Arbeiten zur eukaryontischen Transkription gewürdigt.^[15]

Noch vor der DNA-Materialwissenschaft erkannte die Medizin und Pharmaindustrie das ungeheure Potential dieses neuen, rasch wachsenden Forschungsgebietes. Die Hoffnung der Mediziner liegt hierbei in der Bekämpfung von noch unheilbaren Krankheiten mittels gezielt eingesetzter Gentherapie. Mittlerweile ist es möglich, Infektionskrankheiten über die DNA des Krankheitserregers frühzeitig und einwandfrei zu erkennen und dadurch eine gezielte Behandlung zu ermöglichen.^[16] Auch können zahlreiche, erblich bedingte, Krebsarten und Krankheiten über deren spezifische Genetik entdeckt werden, wodurch es zum Teil möglich ist, die Entstehung eines Tumors bzw. dem Krankheitsausbruch vorzubeugen.^[17, 18] Ein als „*Pharmacogenomic*“ bezeichneter Zweig der Medikamentenindustrie beschäftigt sich mit dem genetischen Einfluss auf die Wirksamkeit von Medikamenten. Aufgrund einer mutationsbedingten Veränderung des Genotyps bzw. Phenotyps besteht die Gefahr, dass durch den veränderten Metabolismus Arzneimittel nur sehr schlecht oder überhaupt nicht resorbiert werden können oder eine notwendige Umsetzung des Wirkstoffs nicht oder mit negativen Auswirkungen erfolgt. Mit Hilfe einer genauen Gentypisierung sollte es somit möglich sein, die benötigte Medikation genau auf die Bedürfnisse des Patienten einzustellen und entsprechende Risiken oder Nebeneffekte auf ein kleinstmögliches Maß zu reduzieren.^[19, 20]

Aufgrund der Schlagwörter, „Nanostrukturen“, „Gentherapie“ oder „*Pharmacogenomic*“ steht die DNA-Doppelhelix in unserer Gesellschaft als ein Symbol für den technischen und wissenschaftlichen Fortschritt unserer Zeit. So wie die Pyramiden Ägyptens, die Tempel Griechenlands oder die monumentalen Kathedralen im mittelalterlichen Europa Sinnbilder der damaligen Epochen waren.^[10]

Was liegt also näher, als auch Teil dieser unglaublich interessanten und herausfordernden Entwicklung werden zu wollen, um so neue, innovative und zukunftsweisende Erkenntnisse für die Medizin, Pharmazie, Biologie und Materialwissenschaft zu erlangen.

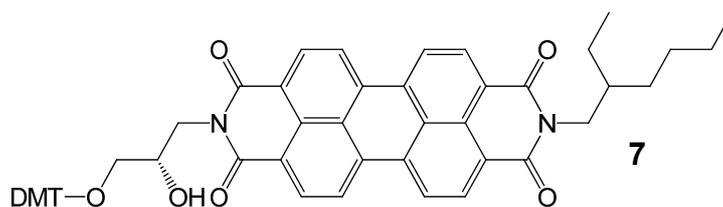


Diese Dissertation gliedert sich in drei große Teile:

1. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* bekannten Perylenbisimidbaustein **7**. In ersten Experimenten soll die chromophorvermittelte Photooxidation von Guanin in Abhängigkeit des Abstandes zwischen den Redoxpartnern untersucht werden.

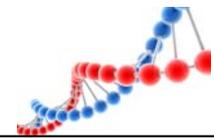
Des Weiteren soll das Aggregationsverhalten des Farbstoffes, zur möglichen Detektion von Punktmutationen in linearen DNA-Sonden überprüft werden.

Auf der Grundlage der erhaltenen Ergebnisse soll die Verwendungsmöglichkeit des Perylenbisimids als neuartige Absorptions- und Fluoreszenzsonde in Form von sog. Molecular Beacons für den Nachweis von Oligonukleotiden untersucht werden. Hierbei soll vor allem die Öffnungskinetik der Haarnadelschleife durch Evaluation der Stammregion und der Pufferlösung genauer betrachtet werden.

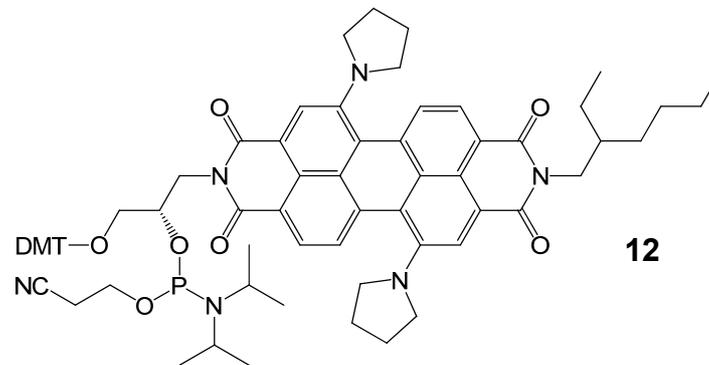


2. Im zweiten Teil soll die Redoxeigenschaften des Perylenbisimidbausteins durch eine Modifikation mit elektronenschiebenden Gruppen an den Positionen 1 und 7 der Buchtregion soweit verändert werden, dass Ladungstransferprozesse zwischen dem angeregten Chromophor und den natürlichen Basen verhindert werden. Als Substituent wurde das elektronenreiche Pyrrolidin ausgewählt. Hierzu soll zunächst die eine Synthesestrategie für die Darstellung des zweifach pyrrolidinsubstituierten Perylenbisimidphosphoramidits **12** ausgearbeitet werden.

Der Chromophor **12** soll anschließend als DNA-Baustein mittels automatisierter DNA-Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut werden. In weiterführenden Experimenten soll das Aggregationsverhalten von Farbstoffmolekülen sowohl in einem Inter-, als auch im Intrastrang-Motiv genauer untersucht werden. Da die freien Elektronenpaare der *N*-Heterozyklen nicht nur



als Ladungsdonor, sondern auch als Lewisäure fungieren können, soll zusätzlich der Einfluss des pH-Wertes der verwendeten Pufferlösung auf das Chromophor-DNA-System anhand der pH-Werte 3, 7 und 13 kontrolliert werden.



3. Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der perylenbisimidvermittelten Ausbildung von verzweigten DNA-Strukturen. Die entscheidende Frage ist, ob sich die Dimerisierung von terminalen Perylenbisimidmolekülen zum Aufbau von DNA-Netzwerken eignet. Hierzu sollen drei teilweise komplementäre, perylenbisimidmodifizierte Oligonukleotide entworfen werden, die eine ypsilonartige Struktur ausbilden. Über stabile π -Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren sollen sich daraus komplex verzweigte DNA-Nanostrukturen entwickeln.

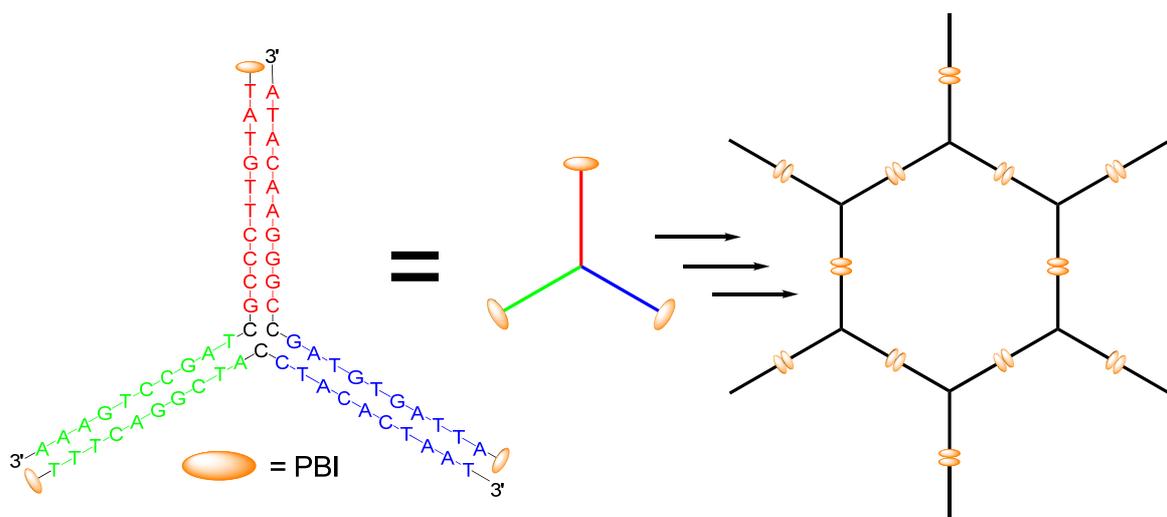
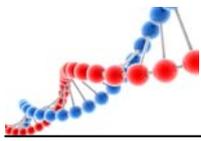


Abb. 2: Schematische Darstellung zum Aufbau eines PBI-vermittelten DNA-Netzwerks.



2. Theoretischer Hintergrund

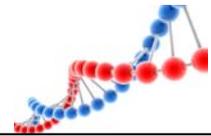
2.1. Spektroskopische Methoden

2.1.1. UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Die Absorption von Licht durch ein Molekül erfolgt in einem für das Molekül charakteristischen Wellenlängenbereich. Hierbei wird das Molekül energetisch aus dem Grundzustand in einen höherliegenden Energiezustand angeregt. Dies geschieht innerhalb von 10^{-15} s, die Bewegung der Kerne findet dagegen mit 10^{-13} s deutlich langsamer statt. Die Anregung erfolgt somit nach dem *Frank-Condon*-Prinzip vertikal, das bedeutet ohne geometrischer Änderung.^[21, 22] Dieser Übergang findet oft nicht nur in einen, sondern in verschiedene Schwingungszustände des höheren Energieniveaus statt. Dies spiegelt sich dann in der individuellen Struktur der Absorptionsspektren wider.

Für die Abgabe der aufgenommenen Energie ergeben sich verschiedene Möglichkeiten. Bei der strahlungslosen Relaxation erfolgt der Übergang in den Grundzustand ohne Aussendung von Lichtenergie. Die aufgenommene Energie wird stattdessen in Form von vibronischer Energie frei. Dieser thermische Übergang kann sowohl unter Erhalt der Spinmultiplizität als „Internal Conversion“ (IC) als auch über einen spinverbotenen Singulett-Triplett-Übergang als „Inter-System-Crossing“ (ISC) erfolgen.

Neben diesen strahlungslosen Relaxationsmechanismen ist auch durch Aussendung von Lichtenergie (Lumineszenz) eine Rückkehr in den Grundzustand möglich. Dieser Emissionsprozess, der deutlich langsamer als die strahlungslosen Prozesse (10^{-14} – 10^{-12} s) ist, lässt sich in zwei Gruppen einteilen. Die Fluoreszenz, bei der der Übergang mit gleicher Spinmultiplizität ($S_1 \rightarrow S_0$) stattfindet und die Phosphoreszenz, bei der ein spinverbotener Übergang aus dem angeregten Triplett ($T_1 \rightarrow S_0$) eintritt. Hierbei stellt die Fluoreszenz mit 10^{-12} s die schnellere Relaxation dar, während die Phosphoreszenz mit 10^{-4} – 10^{-9} s deutlich länger braucht, um in den Grundzustand zurückzukehren. Generell erfolgt die Aussendung von Licht immer nach der Regel



von *Kasha*,^[23] das bedeutet aus dem energieärmsten Schwingungsniveau des elektronisch angeregten Zustands. Da die Anregungsenergie in jeden höheren Schwingungszustand erfolgen kann und bis zum energieärmsten Zustand strahlungslos relaxiert, ist damit die Emissionswellenlänge unabhängig von der Anregungswellenlänge. Der Relaxationsprozess kann analog zur Anregung in mehrere Schwingungsniveaus des Grundzustandes erfolgen. Hierdurch ergibt sich im Emissionsspektrum eine für das Molekül charakteristische Feinstruktur. Die Wellenlänge des ausgestrahlten Lichts ist nach der Regel von *Stokes*^[24] stets länger als die des absorbierten Lichts. Das bedeutet wiederum, die Energie des abgestrahlten Photons ist niedriger als die des absorbierten. Die Fluoreszenzspektren sind daher im Vergleich zu den Absorptionsspektren immer bathochrom verschoben. Sowohl die Regel nach *Kasha*, als auch die von *Stokes* lassen sich im *Jablonski* Diagramm übersichtlich darstellen.

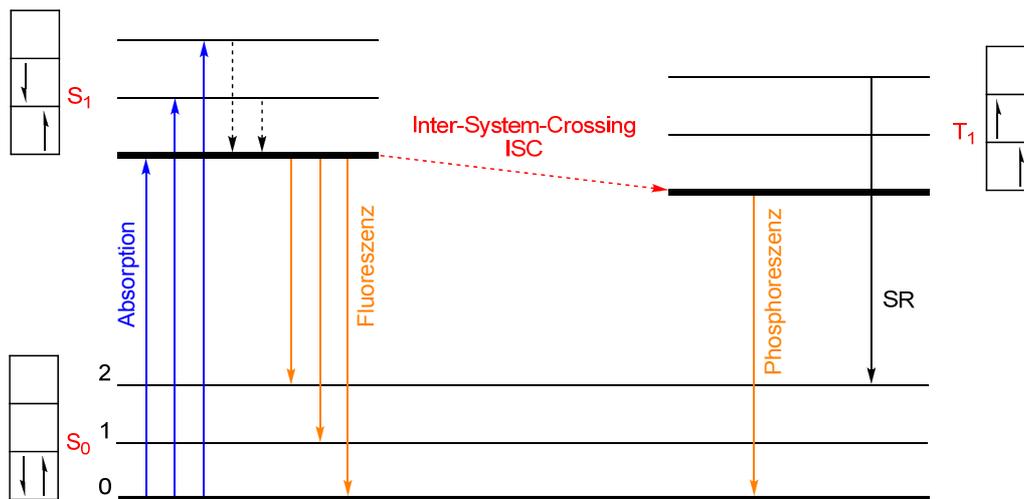
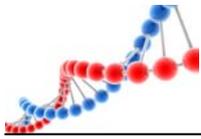


Abb. 3: Jablonski-Diagramm für ein hypothetisches organisches Molekül.

- S: Singulett Zustand
- T Triplet Zustand
- SR: Schwingungsrelaxation

Die Abhängigkeit von Temperatur, Lösungsmittel, pH-Wert, Konzentration oder anderen Chromophoren, macht die Fluoreszenz deutlich störanfälliger als die Absorption. Die Fluoreszenzintensität wird daher nur durch die Quantenausbeute Φ_F vergleichbar. Sie ist definiert als Anteil der strahlenden Relaxation an der Summe



aller Relaxationsprozesse (strahlende und strahlungslose) des angeregten Chromophors.^[25]

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Gleichung 1: Bestimmung der Quantenausbeute

k_r : Ratenkonstante des strahlenden Relaxationsprozesses

k_{nr} : Ratenkonstante der strahlungslosen Relaxationsprozesse.

Da die Erfassung aller emittierten Photonen experimentell sehr aufwendig ist, wird die Quantenausbeute in der Praxis oft mit Hilfe einer Referenzsubstanz mit bekannter Quantenausbeute bestimmt. Hierzu werden die integrierten Emissionen beider Proben ins Verhältnis gesetzt.

$$\Phi_F(P) = \Phi_F(R) \cdot \frac{A(R) \cdot n_D^2(P) \cdot F(P)}{A(P) \cdot n_D^2(R) \cdot F(R)}$$

Gleichung 2: Bestimmung der Quantenausbeute mit Hilfe einer Referenzsubstanz

Φ_F : Fluoreszenzquantenausbeute

A: Absorption

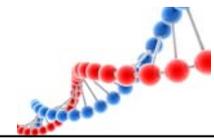
n_D : Brechungsindex des Lösungsmittels

F: integrierte Fluoreszenzintensität

P: Probensubstanz; R: Referenzsubstanz.

2.1.2. Cyclische Voltammetrie

Durch die Cyclovoltammetrie ist es möglich, sowohl die Reduktions- als auch die Oxidationspotentiale einer Verbindung zu bestimmen. Hierzu wird eine Drei-Elektroden-Anordnung, bestehend aus Arbeits-, Gegen-, Vergleichselektrode verwendet. Über die Arbeitselektrode wird ein Startpotential (E_{start}) angelegt, bei dem noch keine elektrochemische Reaktion abläuft. Dieses Potential wird mit konstanter Spannungsvorschubgeschwindigkeit verändert. Nach Erreichen des Umschaltpotentials wird die Richtung der Spannungsänderung umgedreht und mit gleicher Vorschubgeschwindigkeit zu E_{start} zurückgekehrt. Gemessen wird der Strom (I), der während eines Zyklus' durch die Arbeitselektrode fließt. Die Vorgänge an der

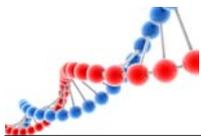


Arbeitselektrode können vereinfacht durch das *Nernstsche* Gesetz und das *Ficksche* Gesetz der Diffusion beschrieben werden. Die so erhaltene I/E-Kurve liefert sowohl anodische (E_P^A) als auch kathodische (E_P^K) Peakpotentiale, deren Mittelwert das Standardpotential (E^0) oder Halbstufenpotential ($E_{1/2}$) des beobachteten elektrochemischen Übergangs ist.^[26]

2.2. Ladungstransfer in DNA

Die doppelhelikale DNA ist ein einzigartiges Polymer mit hochgradig geordneten und elektronisch gekoppelten aromatischen Systemen – den Nukleobasen. Andere bekannte Materialien mit ähnlichen Anordnungen von gestapelten π -Systemen haben die Eigenschaft, entlang dieser Achse elektronisch leitend zu sein.^[27] Aufgrund dieses Wissens wurde 1962, wenige Jahre nach Entdeckung der DNA-Struktur von *Eley et al.*^[28] ein Ladungstransfer über die ausgeprägten π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Nukleobasen entlang der helikalen Achse des DNA-Doppelstrangs vorgeschlagen. Die systematische Erforschung der Ladungstransferprozesse konnte jedoch erst nach synthetischer Zugänglichkeit spezifischer DNA-Sequenzen durch z. B. die Festphasensynthese erfolgen. Es zeigte sich, dass oxidative Schäden an der DNA unter anderem verantwortlich für Mutagenese, Apoptose und Krebserkrankungen sind.^[29-31] Diese Erkenntnisse ließen das Interesse an Ladungstransferprozessen und deren Auswirkung auf die Nukleobasen rasch wachsen. Der Ladungstransfer wird in zwei Kategorien eingeteilt, den oxidativen Lochtransfer und den reduktiven Elektronentransfer. Der Unterschied zwischen diesen beiden Mechanismen liegt in den beteiligten Orbitalen. Der reduktive Elektronentransfer läuft unter LUMO-Kontrolle ab, wogegen der oxidative Lochtransfer HOMO-kontrolliert abläuft.

Vereinfacht betrachtet, beschreiben beide Mechanismen einen Elektronentransport durch die DNA. Beim oxidativen Lochtransfer nimmt ein photoangeregtes Donormolekül ein Elektron aus der DNA in sein HOMO auf. Hierdurch entstehen in der DNA vor allem kationische Radikale des Guanins ($G^{\bullet+}$) und des Adenins ($A^{\bullet+}$). Dies ist begründet in dem sehr niedrigen Oxidationspotential der beiden Basen welches für Guanin +1.3 V (gegen NHE)^[32] und für Adenin +1.4 V (gegen NHE)^[33]



beträgt. Beim reduktiven Ladungstransfer wird aus dem LUMO des photoangeregten Donormoleküls ein Elektron in die DNA abgegeben. Hierbei bilden sich bevorzugt die anionischen Radikale von Cytosin ($C^{\bullet-}$) und Thymin ($T^{\bullet-}$), da deren Reduktionspotentiale mit ca. -1.8 V (gegen NHE)^[32] die stärksten der Nucleobasen sind.

Auch in dieser Arbeit spielt der oxidative Lochtransfer eine bedeutende Rolle. Der oxidative Einfluss des verwendeten Perylenbisimidbausteins auf die natürlichen Basen im DNA Doppelstrang wird in Kapitel 3 genauer untersucht. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wird in Kapitel 4 ein chemisch modifizierter Perylenbisimidbaustein und dessen elektronischer Einfluss auf Oligonukleotide genauer vorgestellt.

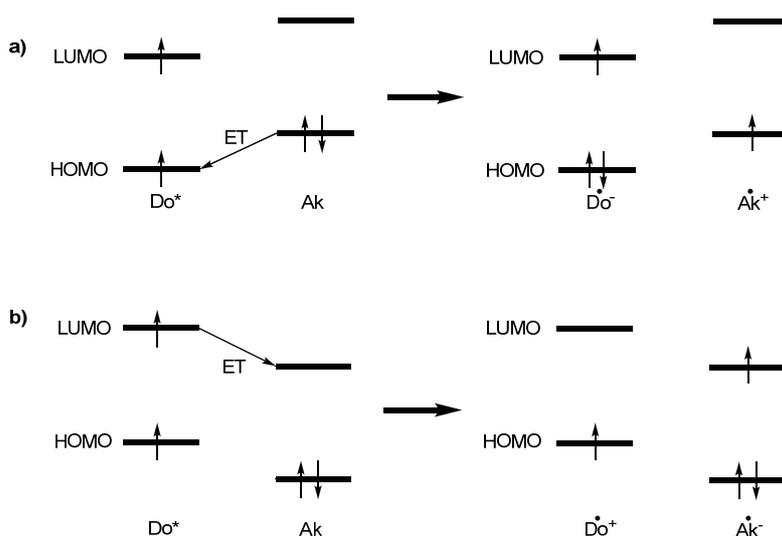


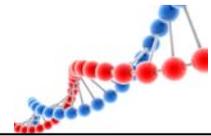
Abb. 4: Schematischer Ablauf des oxidativen Lochtransfers (a) und des reduktiven (b) Elektronentransfers.

Do: Donor

Ak: Akzeptor

ET: Elektronentransfer

Aufgrund der genannten biologischen Relevanz des oxidativen Lochtransfers stand dessen Mechanismus seit den 90er Jahren verstärkt im Focus der Wissenschaft.^[34] Der reduktive Elektronentransfer unter physiologischen Bedingungen ist jedoch für DNA-Schäden nach jetzigen Erkenntnissen von geringer Bedeutung.



2.2.1. Oxidativer Ladungstransfer

Zur Erklärung des oxidativen Ladungstrfers haben sich zwei grundlegende Ablaufmechanismen etabliert, der Superaustausch und der Hoppingmechanismus.^[35] Beim Superaustausch kommt es zu einem Tunnelprozess, bei dem die Ladung in einem Schritt vom Donor- zum Akzeptormolekül wandert. Die Ladung befindet sich bei diesem Mechanismus nie auf einer zwischen Donor und Akzeptor liegenden Nukleobasen.

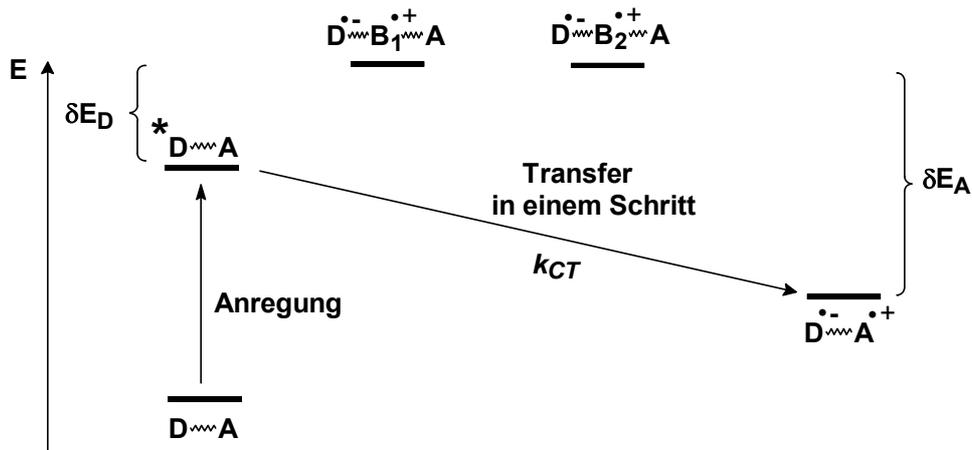


Abb. 5: Schematische Darstellung des Superaustauschmodells.

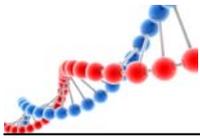
- D: Donor
- A: Akzeptor
- B: Nukleobasen
- k_{CT} : Ladungstransferrate.

Die Rate des Lochtransfers berechnet sich in diesem Modell gemäß der *Marcus*-Theorie und wird durch die *Marcus-Levich-Jortner*-Gleichung beschrieben.^[36]

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

Gleichung 3: *Marcus-Levich-Jortner*-Gleichung.

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



Das Matrixelement der elektronischen Kopplung beträgt hierbei:

$$V^2 = V_0^2 \cdot \exp(-\beta\Delta R)$$

Gleichung 4: Matrixelement der elektronischen Kopplung.

V_0^2 : Maximalwert von V^2

β : Proportionalitätsfaktor

ΔR : Abstand zwischen Donor und Akzeptor.

Dadurch ergibt sich für die Rate des Lochtransfers eine exponentielle Abstandsabhängigkeit zwischen Donor und Akzeptor. Stark vereinfacht lässt sich die Abstandsabhängigkeit über folgende Proportionalität beschreiben.

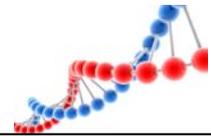
$$k_{ET} \propto \exp(-\beta\Delta R)$$

Gleichung 5: Vereinfachte Darstellung der Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers.

Der hier auftretende Proportionalitätsfaktor β ist eine für die brückenabhängigen Kopplungseigenschaften zwischen Donor und Akzeptor charakteristische Größe. Für den oxidativen Lochtransfer in DNA schwankt er zwischen 0.1 \AA^{-1} und 1.5 \AA^{-1} .^[35]

Aufgrund von empirischen Erkenntnissen, dass bei längeren Ladungstransferdistanzen ($> 200 \text{ \AA}$) nur noch eine geringe Abhängigkeit von Abstand und Ladungstransferrate vorherrscht, wurde das Superaustauschmodell erweitert. Als neues Modell wurde von *Giese* und *Jortner* ein so genannter Hoppingmechanismus vorgeschlagen.^[37]

Der Ladungstransfer findet bei diesem Modell nicht in einem Schritt statt, sondern läuft in mehreren Teilschritten ab. Hierbei springt die Ladung über die einzelnen Zwischenbasen vom Donor- zum Akzeptormolekül. Die Ladung ist somit kurzzeitig auf den einzelnen Zwischenbasen lokalisiert und damit nachweisbar. Jeder Hoppingschritt selbst stellt einen Tunnelprozess durch dazwischen liegende Basenpaare dar. Für die Ladungstransferrate ist somit nicht der Abstand zwischen Donor und Akzeptor entscheidend, sondern die Anzahl der benötigten Hoppingschritte. Physikalisch lässt sich dieser Mechanismus folgendermaßen zusammenfassen.^[38]



$$k_{ET} = P \cdot N^\eta$$

Gleichung 6: Ladungstransferrate in Abhängigkeit zur Gesamtzahl der Hoppingschritte.

k_{ET} : Ladungstransferrate

P: Wahrscheinlichkeit des Hoppingschritts

N: Gesamtzahl der Hoppingschritte; η : empirische Konstante ($1 \leq \eta \leq 2$).

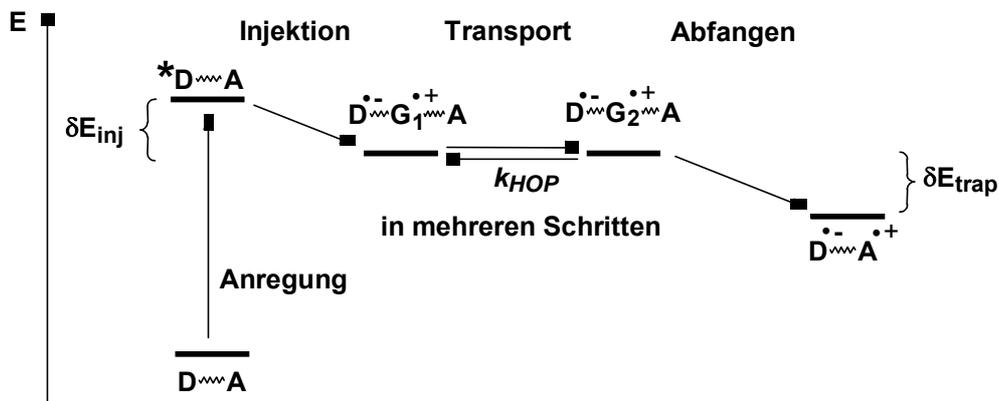


Abb. 6: Schematischer Ablauf des Hoppingmechanismus des oxidativen Lochtransfers

D: Donor

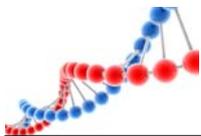
A: Akzeptor

G: Nukleobasen (hier Guanin)

k_{HOP} : Transferrate des Loch-Hopping-Schritts.

Lewis et al. war es möglich, die Rate ($k_{HOP} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$) für einen einzelnen G zu GG-Loch-Hopping-Schritt zu bestimmen.^[39] Die Rate für ein von *Giese et al.* postuliertes Hopping über Adenine^[40] ist mit $k_{HOP} = 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ^[41] schneller sowie effizienter.

Nach neuesten Erkenntnissen muss allerdings auch die Moleküldynamik in die Betrachtung eingeschlossen werden, da ein effizienter Ladungstransfer über längere Distanzen nur innerhalb einer Zeitskala möglich ist, in der die einzelnen Basen des DNA-Strangs ihre räumliche Anordnung ändern können.^[42] Dieses als *Base-Gating* bekannte Konzept betrachtet zusätzlich eine gute Orbitalüberlappung von Donor- und Akzeptormolekül und aller Zwischenbasen als Grundvoraussetzung für einen effektiven Ladungstransfer. Deren Stapelung fluktuiert mit der DNA-Dynamik und beeinflusst dadurch die Geschwindigkeit des Ladungstransfers.



Die für den Ladungstransfer zugrundeliegende Triebkraft lässt sich unter Zuhilfenahme der *Rehm-Weller*-Gleichung abschätzen.^[43, 44]

$$\Delta G = e[E_{\text{Ox}}(D) - E_{\text{Red}}(A)] - E_{00} + C$$

Gleichung 7: Rehm-Weller-Gleichung

ΔG : freie Enthalpie

e : Elementarladung

$E_{\text{Ox}}(D)$: Oxidationspotential des Ladungsdonors

$E_{\text{Red}}(A)$: Reduktionspotential des Ladungsakzeptors

E_{00} : Energie des HOMO-LUMO-Übergang des Donors

C : Coulomb Energie.

Da die Coulomb Energie sehr klein ist, wird diese oft vernachlässigt und gleich null gesetzt. Die Energie des Singulett-Singulett-Übergangs (E_{00}) des betreffenden Moleküls kann aus der graphischen Auftragung seiner UV/Vis-Absorptionskurve und seiner Emissionskurve ermittelt werden. Aus der Wellenlänge, bei der sich beide Kurven schneiden, wird über die *de Brogli*-Gleichung die entsprechende Energie berechnet.

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{\lambda}{c}$$

Gleichung 8: de Brogli-Gleichung

h : Plank'sches Wirkungsquantum

c : Lichtgeschwindigkeit

λ : Wellenlänge des Schnittpunkts.

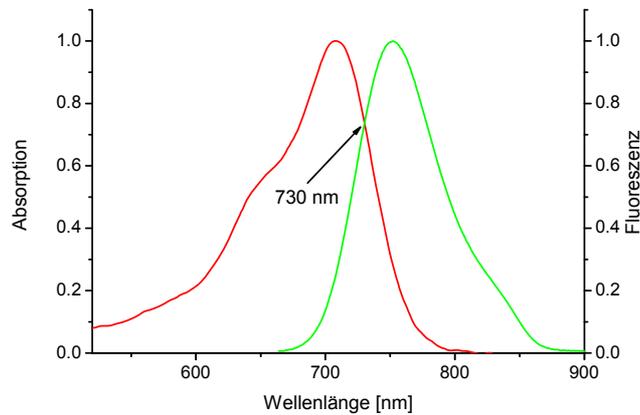
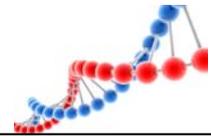


Abb. 7: Graphische Auftragung von UV/Vis-Absorptions- (rot) und Emissionskurve (grün) zur Bestimmung des Schnittpunkts; hier bei 730 nm; $E_{00} = 1.7 \text{ eV}$.

2.2.2. Biologische Relevanz des oxidativen Ladungstransfers

Radikalische Ladungen im Basenstapel, die zum Beispiel durch energiereiche Strahlung, Umwelteinflüsse oder Stoffwechselnebenprodukte verursacht werden, sind unter anderem die Ursache für Mutationen im Erbgut. Besonders häufig tritt, wegen der leichten Oxidierbarkeit von Guanin, bei derartigen Schädigungen ein Guaninradikalkation $G^{\bullet+}$ auf. Aus diesem Kation bilden sich durch Reaktion mit Wasser oder Sauerstoff oxidative Guaninschäden.^[45] Viele dieser Oxidationsprodukte konnten bereits identifiziert werden. Die vier häufigsten sind in Abb. 8 dargestellt.^[45-47]

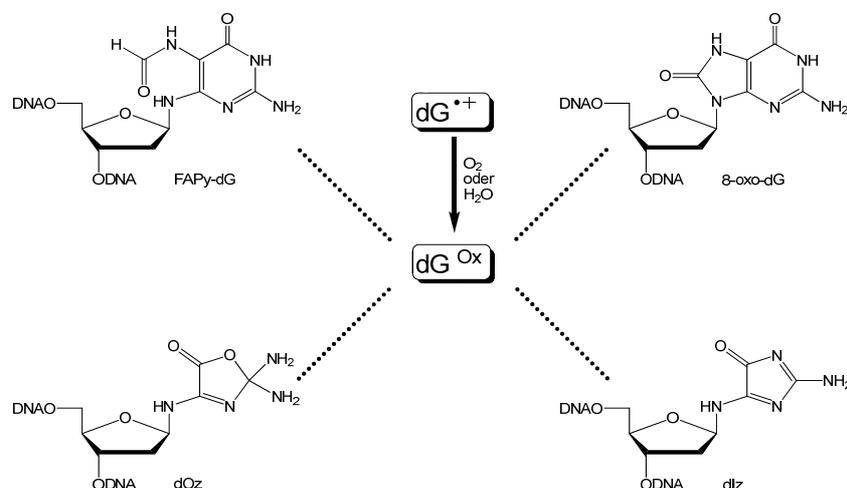
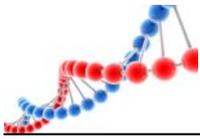


Abb. 8: Mögliche Oxidationsprodukte des Guanins.



Ein sehr gut untersuchter oxidativer Guaninschaden ist das sogenannte 8-oxo-dG (7,8-Dihydro-8-oxo-2'-Desoxyguanosin).^[30, 48] Dieses Nukleosid liegt sowohl in der syn als auch in der anti Konformation vor. Ist das geschädigte Nukleosid während der Replikation in der anti-Form, so wird entsprechend der *Watson-Crick*-Basenpaarung durch die DNA Polymerase ein Cytosin als Gegenbase in das neue Oligonukleotid eingebaut. Nach anschließender Reparatur liegt wieder ein G–C Basenpaar vor. Dreht sich 8-oxo-dG jedoch in die syn Position, bildet sich während der Replikation keine *Watson-Crick*-Basenpaarung, sondern eine *Hoogsteen*-Basenpaarung aus. Hierdurch wird ein Adenin anstelle des richtigen Cytosins gegenüber eingebaut. Durch anschließendes „Proofreading“ wird 8-oxo-dG als falsche Gegenbase zu A erkannt und durch das zu A komplementäre T ersetzt. Somit kommt es letztlich zu einer radikalisch bedingten Punktmutation der DNA.

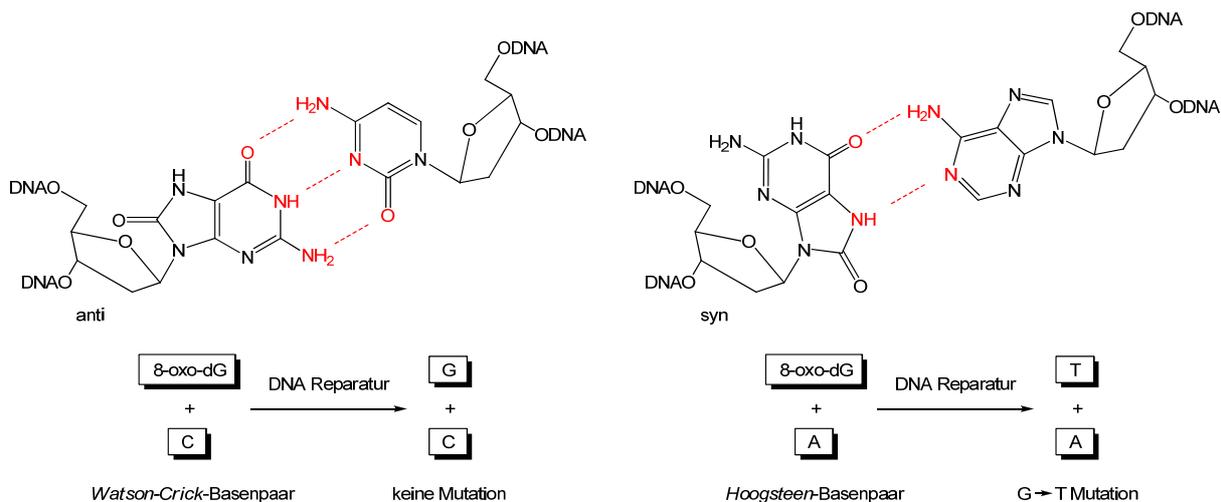
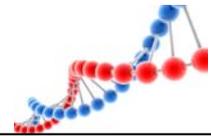


Abb. 9: Schematische Darstellung einer durch 8-oxo-dG verursachten Punktmutation von G–C nach A–T.

2.3. Excitonische Wechselwirkungen zwischen Chromophoren

Wird ein Molekül durch einen äußeren Stimulus angeregt, werden seine Elektronen aus dem Grundzustandsniveau in ein höherliegendes Niveau gebracht. Dies bewirkt ein kurzfristig vorherrschendes elektronisches Übergangsdipolmoment.^[49] Hierdurch ergibt sich eine Polarisierung des Moleküls mit einer entsprechenden Richtung und Stärke. Es ist zusätzlich möglich, dass die elektronischen Übergangsdipolmomente



mehrerer räumlich benachbarter Moleküle mit starken π - π^* Übergängen miteinander wechselwirken und sogenannte Exciton-Kopplungen (Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) ausbilden.^[50] Diese Kopplung ist dann am wirkungsvollsten, wenn es sich bei den Dipol-Übergängen um erlaubte Übergänge handelt. Der angeregte Zustand ist dann delokalisiert (Exciton).^[49] Diese Exciton-Kopplung spaltet hierbei in zwei verschiedene Energieniveaus auf, was als die sogenannte „Davydov Aufspaltung“ bezeichnet wird.^[51, 52]

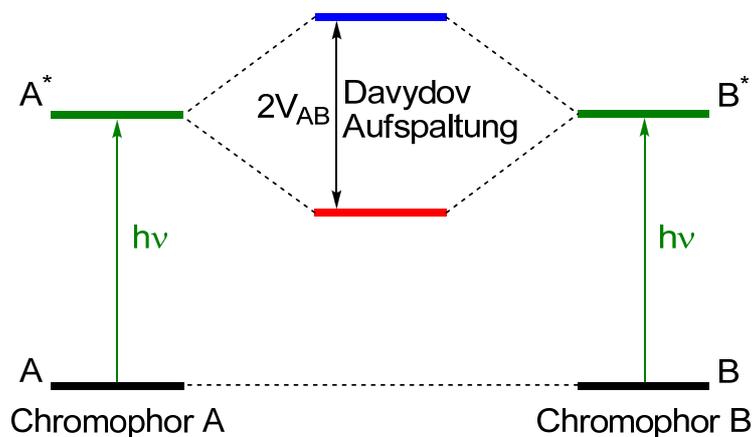


Abb. 10: Energieniveauschema der Chromophore A und B, die ein Exciton-System ausbilden; V_{AB} : Potential der Davydov Aufspaltung.^[50]

Die Exciton-Kopplung zwischen zwei identischen chiralen Farbstoffen bewirkt ein theoretisches CD-Spektrum, in dem beide Molekülsignale unterschiedliche Vorzeichen, aber gleiche Intensität aufweisen. Die Summe dieser beiden Signale ergibt das endgültige CD-Signal, dessen Nulldurchgang dem Absorptionsmaximum des Chromophors entspricht.^[49, 53] Auch sehr schwache Kopplungen können ein typisches CD-Signal mit einem *Cotton-Effekt* hervorrufen.^[54]

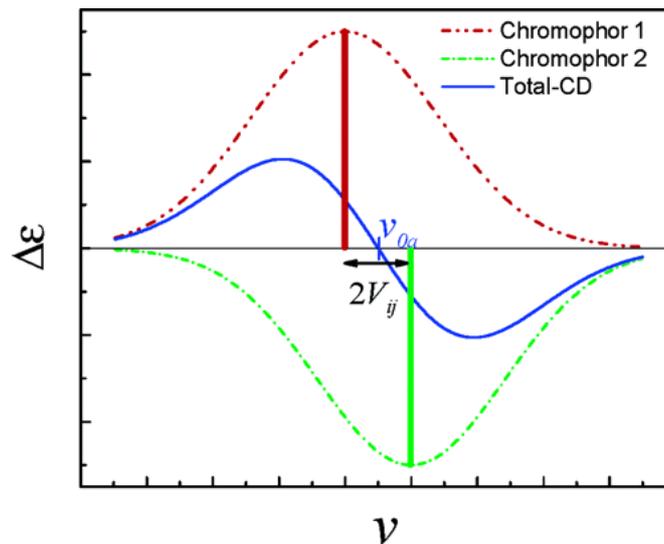
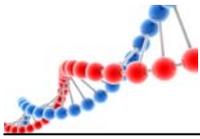


Abb. 11: CD-Spektrum eines Dimers mit identischen Chromophoren. Gestrichelte Linien zeigen die Beiträge der zwei Exciton Niveaus.^[54]

Ist die Davydov Aufspaltung zwischen zwei Chromophoren, deren Übergangsdipolmoment senkrecht zu ihrem Distanzvektor ist, gering, lässt sich die Signalstärke im CD-Spektrum vereinfacht folgendermaßen ausdrücken:^[54]

$$\Delta\epsilon \approx \pm \frac{\pi}{4\lambda} \mu_1^2 \mu_2^2 R_{12}^{-2} \sin(2\theta)$$

Gleichung 9: Vereinfachte Berechnung der CD-Signalstärke in Abhängigkeit des Winkels zwischen den Übergangsmomenten zweier Chromophore.

- μ_1, μ_2 : elektronische Dipolübergangsmomente der Chromophore
- R_{12} : Abstand zwischen den Chromophoren
- θ : Winkel zwischen den Dipolübergangsmomenten

Dies bedeutet, die Signalintensität ist direktproportional zur vierten Potenz der Dipolstärke und indirekt proportional zur zweiten Potenz des Abstands.

Die Intensität und vor allem die Gestalt der CD-Kurve hängen zusätzlich von der Orientierung der Chromophore ab, die über ihre Konfiguration und Konformation bestimmt ist. Dieser geometrische Parameter ist definiert über die Winkel α , β und θ wie in Abb. 12 ersichtlich wird.^[50]

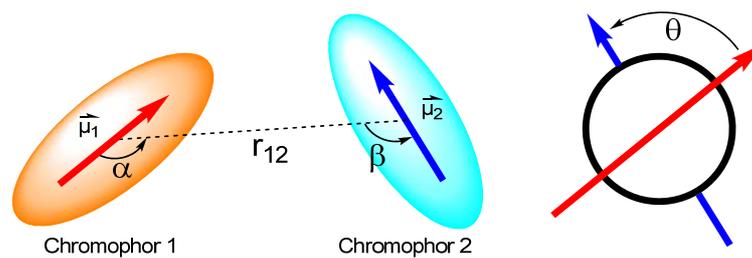
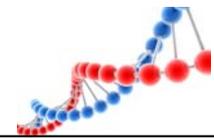


Abb. 12: Schematische Darstellung der räumlichen Orientierung zweier Chromophore mit den jeweiligen Übergangsdipolmomenten (Pfeile) und den Winkeln α , β und θ .

Aus Gleichung 9 geht hervor, dass die Signalintensität gleich null ist, wenn der Winkel zwischen den Dipolübergangsmomenten $\theta = n \cdot 90^\circ$ ($n = 0 - 4$) ist. Am stärksten ist das Signal folglich bei $\theta = 45^\circ$ oder 135° . Somit ist bei einer linearen oder senkrechten Anordnung der Chromophore bzw. ihres Übergangsdipolmoments kein oder maximal nur ein immens schwaches CD-Signal zu erkennen.^[54]

Die Vorzeichenabfolge, die im CD-Signal auftritt (positiver oder negativer *Cotton Effekt*) ist abhängig von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der Chromophore. Somit kann die absolute Orientierung bzw. Helikalität der Farbstoffe durch CD Messungen bestimmt werden. Dies bezeichnet man als die „Exciton-Chiralitäts-Regel“.^[53, 55]

Legt man beide Dipolmomente übereinander und blickt man von oben auf das Zentrum, ergeben sich zwei mögliche Drehrichtungen; im oder gegen den Uhrzeigersinn (siehe Abb. 13). Liegt eine negative Helikalität vor, d. h. eine Drehrichtung gegen den Uhrzeigersinn, so ergibt das einen negativen *Cotton-Effekt* bei der längeren Wellenlänge und einen positiven bei der kürzeren Wellenlänge des CD-Signals. Besteht allerdings eine positive Helikalität, so dreht sich dieses Bild vollständig um.^[50, 56]

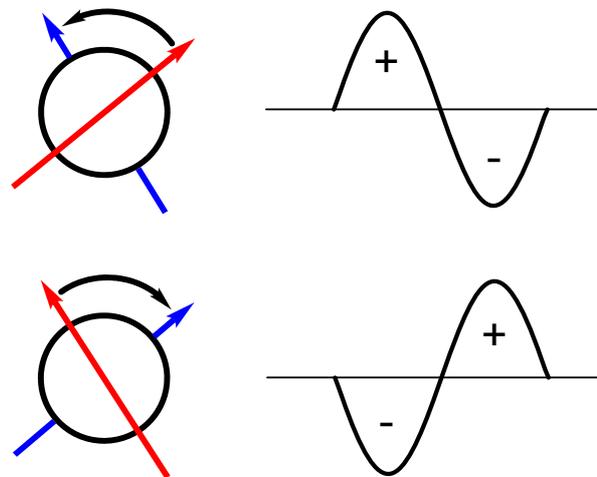
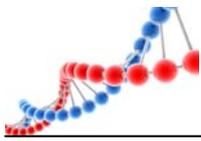


Abb. 13: Schematische Darstellung der Exciton-Chiralitäts-Regel; oben negative Helikalität, unten positive Helikalität mit dazugehörigen CD-Spektrum.

Neben dem gerade erläuterten Effekt von Exciton-Kopplungen auf das CD-Verhalten eines Moleküls hat dieser zusätzlich einen erheblichen Einfluss auf das UV/Vis-Absorptionsspektrum. Je nach der Anzahl der wechselwirkenden Chromophore und der Struktur des entstehenden Aggregats kommt es zu einer Verschiebung des Maximums gegenüber der Monomerabsorption. Entscheidend ist hierbei um welchen Winkel (Verschiebungswinkel α) die einzelnen Dipolmomente der Chromophore gegeneinander verschoben sind. Wenn die Moleküle entlang der vertikalen Achse ihres Dipolmoments gestapelt sind ($\alpha = 90^\circ$), ist nur der Übergang in das energiereichere Niveau erlaubt, der in das energieärmere jedoch verboten. Dadurch kommt es zu einer hypsochromen Verschiebung des UV/Vis-Maximums (H-Bande) und es bilden sich so genannte H-Aggregate aus. Ist die Stapelung dagegen entlang der helikalen Achse ($\alpha = 0^\circ$), ist nur der Übergang in den energieärmeren Zustand erlaubt. Die UV/Vis-Absorption ist dadurch bathochrom verschoben und die entstehenden Aggregate werden als J-Aggregate bezeichnet.^[57] Die Vorsilbe „H“ steht hierbei für hypsochrom, die Vorsilbe „J“ bezieht sich auf den Wissenschaftler, der als erstes bereits 1936 dieses Verhalten entdeckt hat, *Edwin E. Jelley*.^[58-62]

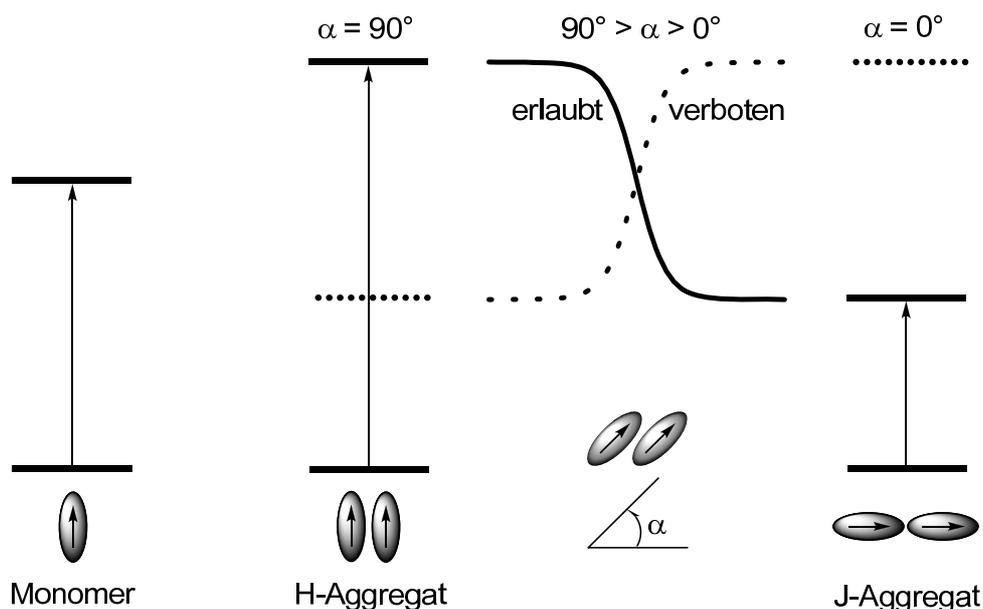
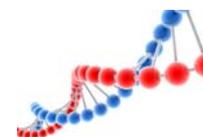
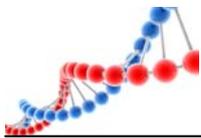


Abb. 14: Energieniveauschema der elektronischen Übergänge bei einem Monomer, H- und J-Aggregat auf der Grundlage von Exciton Wechselwirkungen.^[57]

Viele J-Aggregate fluoreszieren und ihre Quantenausbeuten übertreffen oft sogar die der einzelnen Monomere.^[63-65] Im Gegensatz dazu wird die Emission der H-Aggregate stark gelöscht. Diese Tatsachen sind bereits lange bekannt und treffen für eine große Anzahl von Dimeren aus typischen Fluorophoren wie z. B. Fluorescein, Eosin, Thionin oder Methyleneblau zu. Ebenso wurde der nicht emissive Charakter von H-Aggregaten eine gängige Lehrmeinung.^[66-71] Theoretische Berechnungen von Förster (*Coupled Oscillator Model*) und Kasha (*Exciton Theorie*) könnten diesen nichtfluoreszenten Charakter plausibel erklären.^[61, 72] Sehr schnelles *Internal Conversion* entvölkert hierbei das angeregte energiereichste Exciton-Niveau in einen niedrigeren Zustand, der dann strahlungslos in den Grundzustand zurückkehrt. Bisher wurden nur wenige Ausnahmen zu dieser Regel beobachtet und diese Einzelfälle kamen nur unter extremen Bedingungen wie unter Tieftemperatur in gefrorenen Lösungen^[73-78] oder als Farbstoffaggregate in sogenannten *Langmuir-Blodgett Schichten*^[79] zustande. In aktuelleren Veröffentlichungen wurde zusätzlich von Mero- und Hemicyaninen berichtet, die fluoreszente H-Aggregate ausformen können.^[80, 81]

Wortmann und *Würthner* konnten den Ursprung der Emission von H-Aggregaten an einem Merocyanin-Dimer-Modell erklären. Durch Röntgenkristallographie, NMR und elektrooptischer Absorption und daraus folgenden Berechnungen wurde die



energetisch günstigste Anordnung beider Chromophore im Dimer bestimmt. Hierbei ermittelten sie einen Rotationswinkel zwischen den Dipolmomenten der beiden Moleküle von $\theta = 10^\circ$ und einen Verschiebungswinkel von $\delta = 59.9^\circ$. Dieser Rotationswinkel ermöglicht einen Übergang auf das niedrigere und sonst verbotene Exciton-Niveau, aus welchem dann die Emission stammt. Ohne diese Verdrehung würde der Übergang in den Grundzustand strahlungslos vom höheren Exciton-Niveau erfolgen.^[71]

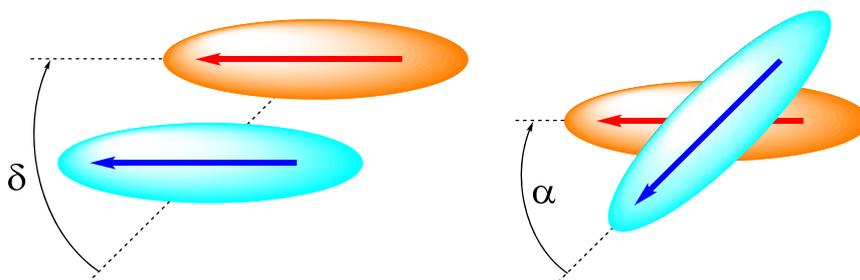
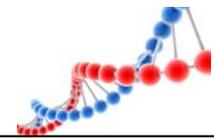


Abb. 15: Schematische Darstellung der Dimere mit dem entsprechenden Verschiebungswinkel δ , Rotationswinkel α und Dipolmomenten (Pfeile); links: Ansicht von der Seite; rechts: Ansicht von oben.^[71]

2.4. Molekülwechselwirkungen im angeregten Zustand

Treten zwei identische Chromophore gegenseitig in Wechselwirkung, bildet sich ein sogenanntes Dimer. Befindet sich bei dieser Dimerbildung eines der Moleküle in einem angeregten Zustand, so bezeichnet man dieses Dimer als „*excited dimer*“ oder einfach kurz als Excimer. Dieses Phänomen der Excimerbildung ist nicht nur auf identische Chromophore beschränkt, sondern kann auch bei unterschiedlichen Farbstoffen auftreten. Jedoch ändert sich hierbei die Namensgebung. Man spricht nicht mehr von einem Excimer, sondern von einem Exciplex, was die Kurzform von „*excited complex*“ darstellt.^[82-85]

Die Excimerbildung wurde 1955 erstmals von *Förster* und *Kaspar* am Beispiel des Pyrens in Lösung beschrieben.^[86] Das Emissionsspektrum zeigte eine violette, strukturierte Bande, die typisch für die Monomeremission des Pyrens ist. Zugleich wurde eine rotverschobene Bande ohne Feinstruktur detektiert, was charakteristisch



für das gebildete Excimer ist. Die Bildung dieses Excimers wird durch nachfolgendes Reaktionsschema wiedergegeben.

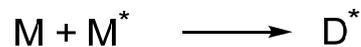


Abb. 16: Schematische Darstellung der Excimerbildung.^[87]

- M: Monomer im Grundzustand
- M^{*}: Monomer im angeregten Zustand
- D^{*}: Gebildetes Excimer im angeregten Zustand

Bei der Rückkehr in den Grundzustand löst sich dieser angeregte Komplex auf. Die Chromophore trennen sich voneinander und es kommt zu einer detektierbaren Emission.



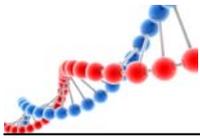
Abb. 17: Schematische Darstellung des Excimerzerfalls.

- M: Monomer im Grundzustand
- D^{*}: Excimer im angeregten Zustand
- hν: Excimeremission

Dieses Verhalten ist nicht nur typisch für Pyren, sondern wurde schon früh auch für viele andere aromatische Systeme wie Benzol,^[88] Naphthalin,^[89] Anthrazen,^[90] Benzpyrene, Benzanthrazene,^[90, 91] Perylene^[90, 92] und für viele derer Derivate^[93] nachgewiesen.

Katho et al. haben das Verhalten des Perylenexcimers näher untersucht. Hierbei wurde entdeckt, dass sich die Stabilität des Excimers auf zwei verschiedene Stabilisierungsenergien bezieht. Zum großen Teil auf Exciton-Wechselwirkungen (70 %) und zum kleinen Teil Ladungstransfer-Wechselwirkungen (30 %).

Abb. 18 zeigt ein schematisches Diagramm der Energieniveaus eines Excimers auf der Basis der theoretischen Betrachtung.^[94-96] Der angeregte M+M^{*} Zustand ist bei geringen Chromophorabständen durch die abstoßende (repulsive) Energie E_R destabilisiert. Zugleich ist bei geringem Abstand der angeregte Zustand über die zwei Moleküle delokalisiert und spaltet sich über Exciton-Wechselwirkungen in zwei Exciton-Niveaus auf (M^{*}M und MM^{*}). Diese Aufspaltung ist doppelt so groß wie die



Excitonstabilisierungsenergie E_S^{exc} . Die Ladungstransferstabilisierungsenergie E_S^{CT} ist nur von Bedeutung, wenn die Energiedifferenz E_0 zwischen Exciton-Niveau und Ionenpaar-Niveau (M^+M^-) gering ist. Wenn die Summe der Stabilisierungsenergie ($E_S^{\text{exc}} + E_S^{\text{CT}}$) größer als E_R ist, kann sich ein Excimer bilden.^[92] Die Bindungsenergie (E_B) ist somit:

$$E_B = E_S^{\text{exc}} + E_S^{\text{CT}} - E_R$$

Gleichung 10: Berechnung der Bindungsenergie zur Ausbildung eines Excimers.

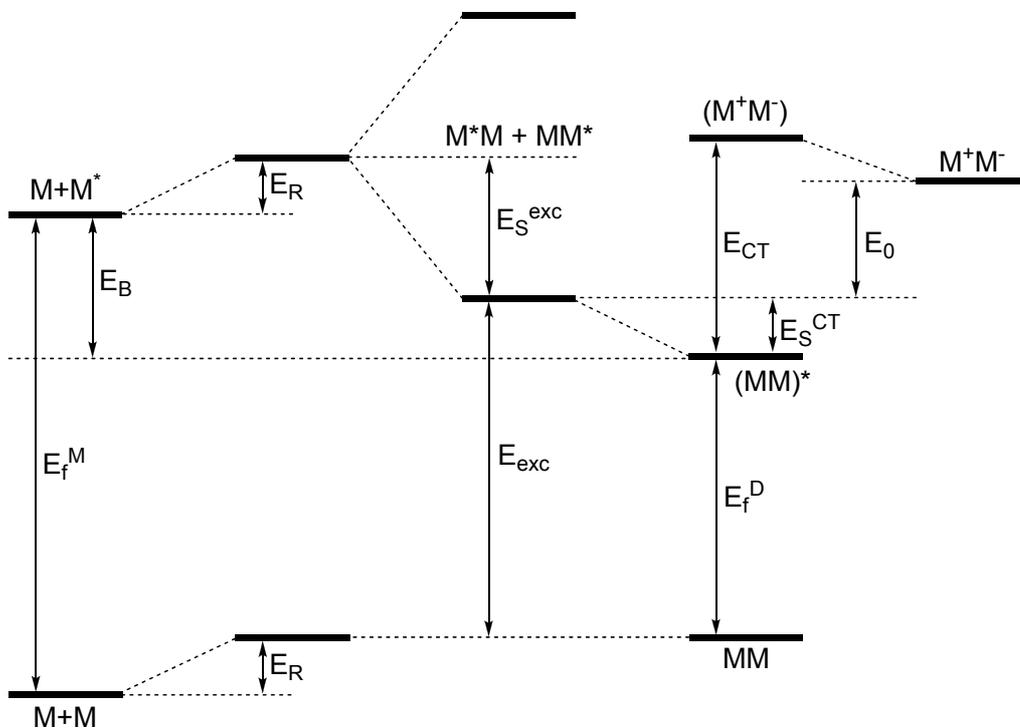
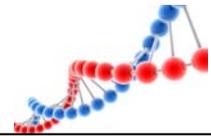


Abb. 18: Energieniveaudiagramm für Excimerwechselwirkungen.^[92]

M:	Monomer im Grundzustand	$M^+M + MM^*$:	Zwei Exciton Niveaus
M^* :	Monomer im angeregten Zustand	M^+M^- :	Ionenpaar Niveau
(M^+M^-) :	Ladungstrennter Zustand im Dimer	$(MM)^*$:	Angeregtes Dimer
E_B :	Bindungsenergie des Excimers	E_R :	Repulsive Energie
E_f^M :	Bildungsenergie von $M+M^*$	E_f^D :	Bildungsenergie von $(MM)^*$
E^{CT} :	Energie des Ladungstrfers	E_{exc} :	Energie des Excitons
E_S^{CT} :	Stabilisierungsenergie des CT	E_S^{exc} :	Stabilisierungsenergie des Excitons
E_0 :	Energiedifferenz von Ionenpaar Niveau und Exciton Niveaus		



Das Konzentrationsverhältnis des sich bildenden Excimers zum angeregten Monomer lässt sich folgendermaßen ausdrücken.

$$\frac{[D^*]}{[M^*]} = \frac{k_{form}^0 \exp\left(-\left(\frac{E_a^{form}}{kT}\right)\right)}{k_f^D + k_{dis}^0 \exp\left(-\left(\frac{E_a^{dis}}{kT}\right)\right)} [M]$$

Gleichung 11: Konzentrationsverhältnis des sich bildenden Excimers zum angeregten Monomer.

- $[D^*]$: Konzentration des angeregten Excimers
- $[M^*]$: Konzentration des angeregten Monomers
- $[M]$: Konzentration des Monomers im Grundzustand
- E_a^{form} : Aktivierungsenergie der Excimerbildung; $M + M^* \rightarrow D^*$
- E_a^{dis} : Aktivierungsenergie der Excimerauflösung; $D^* \rightarrow M + M^*$
- k_{form}^0 : Geschwindigkeitsrate der Excimerbildung
- k_{dis}^0 : Geschwindigkeitsrate der Excimerauflösung
- k_f^D : Abklingrate des Excimers in den Grundzustand; $D^* \rightarrow D$

Die Eigenschaften von Excimeren lassen sich durch Verwendung eines stark vereinfachten Energie-Diagramms erklären.^[97] Nähern sich zwei Chromophore einander an, so steigt mit abnehmender Distanz die Abstoßung und somit die Energie zwischen den beiden Molekülen. Die untere Kurve im oberen Diagramm in Abb. 19 ist charakteristisch für ein solch repulsives System. Die obere Kurve stellt den energetischen Zustand eines angeregten Dimer-Systems ($M + M^*$) dar. Bei einer bestimmten Distanz r bildet sich aus dem Dimer das Excimer (D), wodurch ein neues energetisches Minimum erreicht wird. Dieses ist nun eine neue eigenständige energetische Spezies mit sowohl eigener geometrischer und elektronischer Struktur, charakteristischer Reaktivität als auch eigenen vibronischen und rotatorischen Energiebanden.^[93]

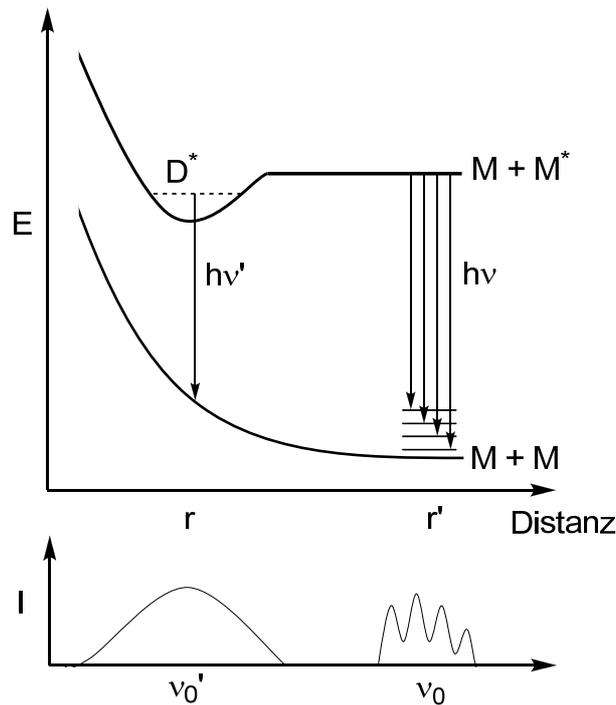
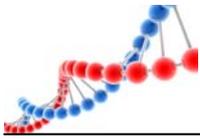
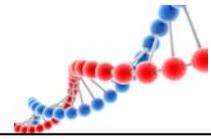


Abb. 19: Energiediagramm (oben) der Excimerbildung und erwartete Emissionsspektren (unten) für die jeweiligen Übergänge in den Grundzustand nach **Stevens** und **Ban**.^[98]

Das Emissionsverhalten von Excimeren unterscheidet sich grundlegend von dem der separierten Chromophore. Zum einen ist die erhaltene Fluoreszenz im Vergleich zu der der Monomere immer energieärmer und somit rotverschoben. Zum anderen verschwindet jegliche charakteristische Feinstruktur vollständig und es bildet sich ein breites Maximum aus. Dieses Verhalten ist kennzeichnend für alle Excimere und Exciplexe.^[87] Die bathochrome Verschiebung resultiert aus der Tatsache, dass die nicht-vibronischen Zustände des Excimers (D^*) auf energetisch niedrigeren Niveau liegen als die der getrennten Farbstoffmoleküle ($M + M^*$).^[97] Somit stammt das emittierte Licht aus dem Übergang des energetisch niedrigsten Energieniveaus des Excimers in ein niedrigeres, repulsives Energieniveau der Monomere. Diese Energie ($h\nu'$) ist somit deutlich kleiner, als die Energie ($h\nu$), die bei der Rückkehr des angeregten Monomers in den Grundzustand frei wird.

Das Verschwinden jeglicher Feinstruktur resultiert aus dem Sachverhalt, dass der Energiezustand, auf den das Excimer zurückfällt, repulsiv ist und daher keine diskreten, gebundenen Zustände existieren. Dadurch beinhaltet die entsprechende Frank-Condon-Einhüllende eine Vielzahl an verschiedenen Energieniveaus. Durch



eine Überlappung dieser unterschiedlichen Niveaus wird es infolgedessen unmöglich, eine vibronische Struktur im Emissionsspektrum zu erkennen.^[97]

Ebenso ist beim Emissionsverhalten von Excimeren der Reabsorptionseffekt bedeutsam. Dieser konzentrationsabhängige Effekt verursacht bei steigender Konzentration eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im höherenergetischen Bereich. Im längerwelligen Bereich verlängert sich allerdings die Fluoreszenzlebenszeit mit höherer Konzentration. Der Grund dafür ist die Absorption der primär emittierten Photonen durch Chromophore im Grundzustand, die dann ihrerseits wieder emittieren. Es gibt mehrere Ansätze, diesen Effekt zu eliminieren, wie z. B. nur die Excimere an der Grenzfläche der Küvette zu detektieren^[99, 100] oder durch theoretische Modelle zu korrigieren.^[101] Diese Methoden sind jedoch nicht hinreichend genug. Einzig der Einsatz von sehr dünnen Küvetten ($d = 10 \mu\text{m}$) scheint die beste Option zu sein, den Reabsorptionseffekt zu kompensieren.^[92]

2.5. Detektion von Punktmutationen (SNP)

Eine Punktmutation oder auch SNP (Single Nucleotide Polymorphism) bezeichnet eine Stelle im Genom, die sich vom Wildtyp um nur ein einzelnes Basenpaar unterscheidet.^[19, 102-105] Durch den Austausch eines einzigen Watson-Crick Basenpaares durch eines der anderen drei Basenpaare, wird aus der ursprünglichen Wildtyp-DNA eine Mutante-DNA.

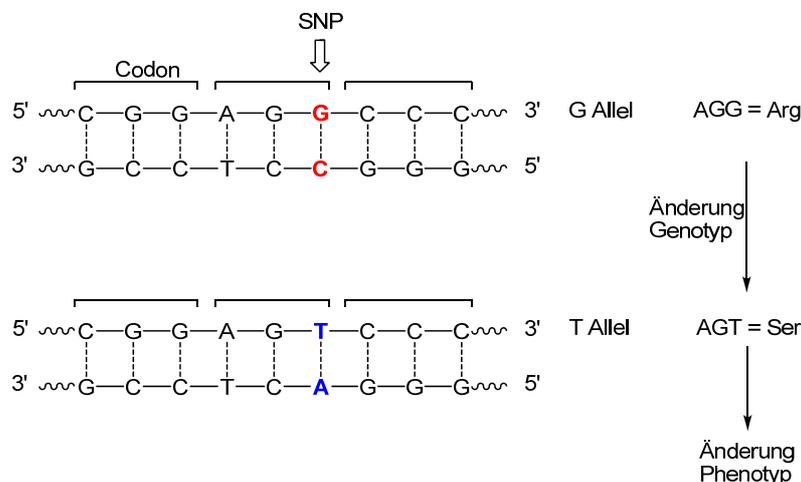
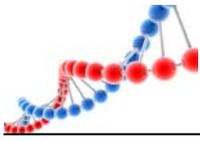


Abb. 20: Beispiel für SNP; Wildtyp-DNA (oben) und Mutante (unten).

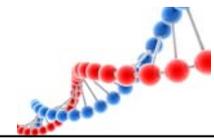


Liegt die Punktmutation in einer proteincodierten Region der DNA und wird sie vom körpereigenen Reparaturmechanismus nicht beseitigt, kann dies zu einer veränderten Aminosäuresequenz des exprimierten Proteins führen. Dieser kleine Unterschied in der Sequenz kann ihrerseits eine große Veränderung des Phänotyps nach sich ziehen, was die Funktionalität des Proteins drastisch (negativ wie positiv) beeinflussen kann. Liegt die Mutation in einer Promotorregion der DNA, kann die Effektivität der Transkription des codierten Proteins verändert werden. Diese gesteigerte oder unterdrückte Genexpression ist oft Auslöser für Krankheiten oder Krebs und kann somit sogar den Tod des Individuums herbeiführen. Deshalb ist die Detektion von SNPs, die für etwa 90 % der Genvariationen verantwortlich sind, für die Medikamentenentwicklung, die biomedizinische Forschung, die medizinische und pharmazeutische Diagnostik und für die Therapie von Krankheiten von großer Bedeutung.^[102, 106-111] Allgemein lassen sich die verwendeten Methoden zur SNP-Detektion in zwei Gruppen einteilen; enzymatische Assays und nicht-enzymatische Assays.

Die meisten SNP-Assays verwenden enzymatische Reaktionen als Schlüsselschritt. Grund hierfür ist die sehr hohe Genauigkeit, mit der Enzyme zwischen Wildtyp und Mutante unterscheiden können.^[102] Dies induziert automatisch, dass nicht-enzymgestützte Assays Punktmutationen mit gleicher Präzision erkennen müssen, um konkurrenzfähig zu sein. Im Folgenden werden 3 bedeutende Beispiele dieser Assay-Klasse näher erläutert.

2.5.1. Allelspezifische Hybridisierung

Diese Methode ist unter den nicht-enzymatischen Assays ein Standardverfahren. Bei der allelspezifischen Hybridisierung werden allelspezifische Oligonukleotide (ASO) mit DNA einer Probenlösung hybridisiert. Wildtyp-DNA bildet hierbei mit den ASO einen stabilen, fehlerfrei gepaarten Duplex aus, während Mutanten Doppelstränge mit Fehlpaarungen ausbilden. Die allelspezifischen Oligonukleotide sind ihrerseits auf einer Trägerschicht immobilisiert und die zu untersuchende Probe mit einer Fluoreszenzsonde markiert. Die Mutante – ASO Duplexe weisen im Vergleich zu den Wildtyp-Duplexen eine geringere thermodynamische Stabilität und somit auch einen



niedrigeren Schmelzpunkt auf. Daher ist es möglich, diese fehlgepaarten Duplexe leicht zu dehybridisieren und durch einen Waschvorgang von den stabileren Duplexen abzutrennen. Die Wildtyp-Duplexe können so durch ihr Fluoreszenzverhalten detektiert werden. Jedoch ist die Diskriminierung zwischen falsch und richtig gepaarten Doppelsträngen aufgrund der nur geringen Stabilitätsunterschiede problematisch.^[102, 112] Außerdem ist es notwendig, die zu untersuchende DNA vor dem eigentlichen Testverfahren mit einer Fluoreszenzsonde zu markieren. Da dies meist über PCR mit speziellen dNTPs oder markierten Primer geschieht, erhöht dies den Arbeitsaufwand und die Gesamtkosten.

2.5.2. Strang-Austausch-Methode

Diese Methode zur SNP-Detektion basiert im Gegensatz zur allelspezifischen Hybridisierung, nicht auf thermodynamische, sondern auf kinetische Unterschiede der Duplexbildung. Die Strang-Austausch-Methode beruht auf der Feststellung, dass kammartig ausgebildete kationische Copolymere (CCTC *cationic comb-type copolymer*) die Hybridisierung von zwei komplementären Strängen beschleunigen, die von fehlgepaarten Strängen jedoch nicht. Als Sonde verwendet man einen Doppelstrang, der am 3'-Ende des einen Oligonukleotids und am 5'-Ende des anderen Oligonukleotids mit Fluorophoren markiert ist. Diese beiden Fluorophore (oft FITC und TAMRA) stellen ein FRET-Paar dar. Werden nun komplementäre und nicht-komplementäre Stränge in Verbindung mit CCTC zugegeben, kommt es zum Austausch der komplementären Stränge. Hierbei wird das FRET-Paar voneinander getrennt, wodurch ein Fluoreszenzsignal generiert wird. Der Austausch des komplementären Gegenstrangs erfolgt hierbei deutlich schneller als der Austausch des „falschen“ Strangs. Hierdurch steigt die Emissionsintensität bei der Wildtyp-Probe schneller an als dies bei der Mutante der Fall ist.^[102]

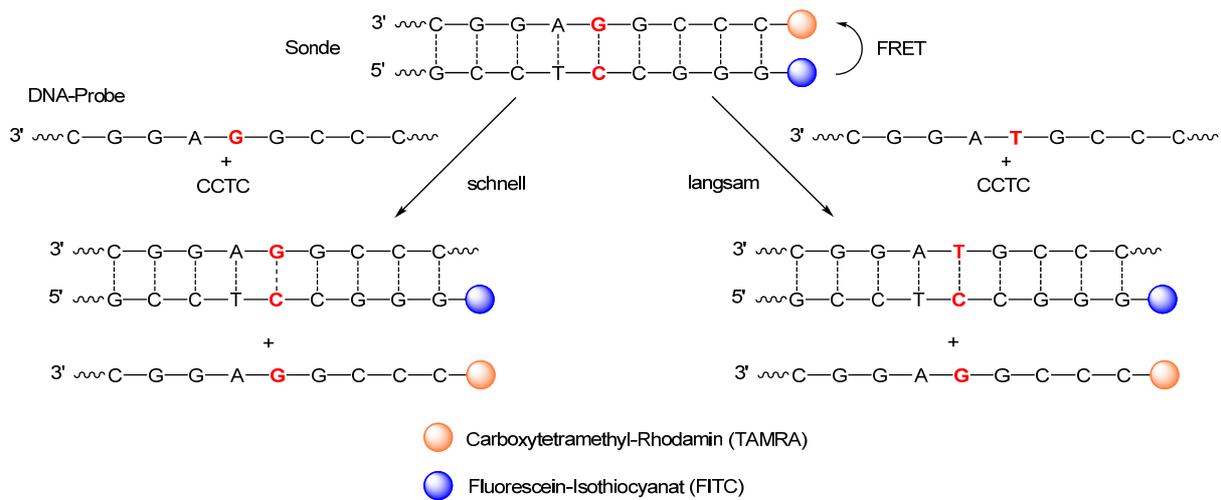
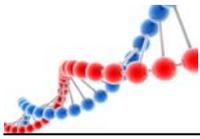


Abb. 21: Schematische Darstellung der Strang-Austausch-Methode.

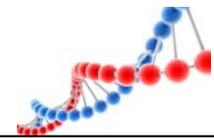
2.5.3. Base-discriminating Fluorescent Probes

Als weitere Alternative zu den bereits genannten Methoden werden fluoreszente Basen entwickelt, deren Emissionsverhalten sich je nach vorhandener Gegenbase verändert. Diese artifiziellen Basenanaloga werden in einem Sondenstrang anstelle eines natürlichen Nukleosids eingebaut. Nach Hybridisierung mit der zu untersuchenden DNA-Probe zeigt sich durch die Veränderung der Fluoreszenzintensität, ob ein Wildtyp oder eine Mutante vorliegt. Zwei Parameter sind für die zuverlässige und ausreichend sensitive Detektion entscheidend:

F / F_0 : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von ds-DNA (F) zu ss-DNA (F_0)

F / F' : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von richtig (F) und fehlgepaarter (F') DNA

Saito et al. modifizierten sowohl Adenin,^[113] Cytidin, als auch Uridin^[114-116] mit Pyren. Diese „Base-Discriminating Fluorescent Probes“ (BDF) weisen richtig gepaart eine hohe Fluoreszenzintensität ($F / F_0 = 4-5$) auf. Bei einer falschen Gegenbase sinkt dagegen die Emission stark ab ($F / F' \approx 6$). Befindet sich die richtige Gegenbase gegenüber dem modifizierten Nukleosids, hält sich der große Pyrenrest vermutlich außerhalb der Helix in der großen Furche auf. Bei einer falschen Gegenbase dreht sich der Pyrenrest in den Doppelstrang und interkaliert mit den benachbarten Basen. Durch diese Wechselwirkungen wird die Fluoreszenz des Pyrens gelöscht. Der Vorteil an diesem Assay ist die enorm große Toleranz gegenüber pH-Wert,



Salzkonzentration und Lösungsmittel, solange diese Parameter die Bildung der Helix nicht verhindern. Der Nachteil ist jedoch die teilweise Löschung der Emission durch C und G als Nachbarbasen.

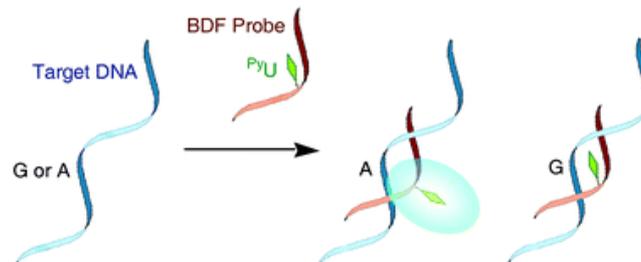
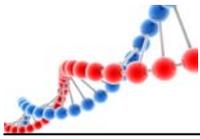


Abb. 22: Schematische Darstellung eines BDF-Assays.^[114]

Da die von ^{PyU} emittierte Wellenlänge zu kurzweilig für die gängige DNA-Chip Auslesetechnik ist, entwickelten *Saito et al.* ihr System weiter. Hierzu wurde Fluorescein als FRET-Akzeptor in einer Entfernung von fünf Basenpaaren zu einem Naphthodeazaadenin in die DNA-Sequenz eingebaut.^[117] Die hohe Fluoreszenzintensität des NDA wurde von Fluorescein gelöscht, das seinerseits bei einer Wellenlänge von etwa 520 nm emittiert. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von NDA von seinen Gegenbasen konnte auch hier klar bestätigt werden. Bei der richtigen Basenpaarung steigt die Intensität der Fluoresceinemission deutlich an, während sie bei Fehlpaarungen stark zurückgeht.

Hudson et al. verwenden 5-Alkynyl-Uridin-Derivate als gegenbasendiskriminierende Fluoreszenzsonden, die eine Emission bei 400 nm – 450 nm aufweisen.^[118] Diese BDFs besitzen, im DNA-Einzelstrang, nur eine geringe Fluoreszenzintensität. Gepaart mit Adenin als Gegenbase steigt die Fluoreszenz je nach Substituent um das Zwei-, bis Sechsfache an. Tritt an die Stelle des Adenin ein Guanin, befindet sich die Fluoreszenzintensität circa auf dem Niveau der Einzelstrangfluoreszenz. Bei Thymin oder Cytosin als „falsche“ Gegenbase gibt es keinen so klaren Fluoreszenzabfall.

Seitz et al. entwickelten mit dem Chromophor Thiazol Orange die sogenannten „Forced Intercalation of Thiazol Orange Probes“ (FIT). Hierzu wurde Thiazol Orange



als artifizielle Base in einen PNA-Strang (**P**eptide **N**ucleic **A**cid) inkorporiert. Bei Hybridisierungsversuchen mit DNA wurde festgestellt, dass die gemessene Fluoreszenzintensität signifikant ansteigt, wenn ein passender Gegenstrang (T als Gegenbase zu TO) vorliegt ($F / F_0 \approx 20$). Sobald sich eine der drei verbliebenen Gegenbasen gegenüber des Thiazol Oranges befindet, oder eine Basenfehlpaarung in direkter Nachbarschaft zum Fluorophor existiert, sinkt die Emissionsintensität dagegen stark ab ($F / F' \approx 5$). In einer Fehlgepaarten Umgebung steht dem TO größere konformationelle Freiheit zu Verfügung und es gibt die Anregungsenergie über die Rotation der Methinbrücke ab. Liegt der Farbstoff dagegen interkaliert vor ist eine Energieabgabe nur durch einen strahlenden Relaxationsprozess möglich.^[119-125]

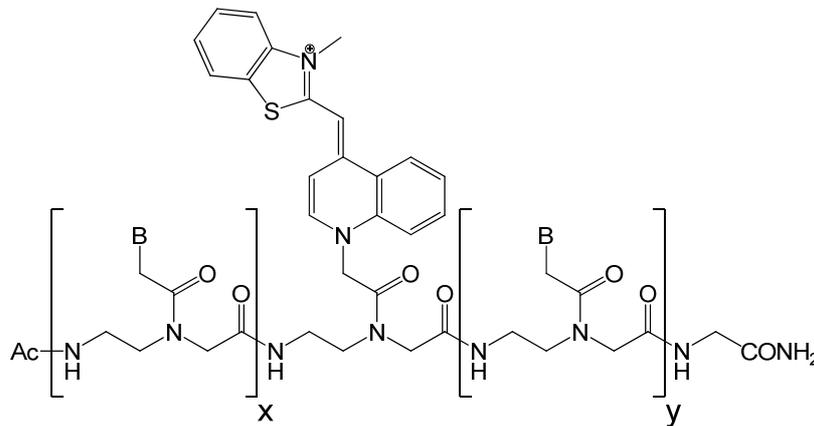
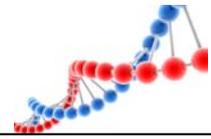


Abb. 23: Von Seitz *et al.* entwickelte FIT Sonde.

2.6. Molecular Beacons

Ein Molecular Beacon wurde zum ersten Mal 1996 von *Tyagi* und *Kramer* entworfen. Es handelte sich hierbei um einen DNA-Einzelstrang, der sich aus drei Teilen zusammensetzt: Zwei selbstkomplementäre Enden (5 – 7 Basen), die eine Stammregion ausbilden können, einem ungepaarten Mittelteil – der Haarnadelschleife (15 – 30 Basen) und einem Fluorophor-Quencher-Paar (siehe Abb. 24).^[126]

Das Funktionsprinzip des ersten Molecular Beacons ist denkbar einfach, aber dennoch hervorragend durchdacht. Zwei kurze komplementäre Stammregionen, die an den Enden der Hybridisierungssonde sind, formen in Abwesenheit eines



passenden Gegenstrangs eine stabile „Stamm-Schleife-Formation“. Diese Struktur bringt einen Fluorophor (EDANS) und einen Quencher (Dabcyl), die an dem 3'- bzw. 5'-Ende des Beacons sind, in räumliche Nähe. Hierdurch wird die Emission des Fluorophors gelöscht. Durch Zugabe der Ziel-DNA oder -RNA hybridisiert diese an die als Hybridisierungssonde dienende Schleifenregion. Diese energetisch starke, intermolekulare Hybridisierung öffnet die energetisch schwächere Stammhelix. Die sich daraus ergebende räumliche Trennung des FRET-Paares unterbricht den Energietransfer und die Emission des Fluorophors steigt an. Die thermodynamische Stabilität der Haarnadelstruktur, die hocheffiziente und spezifische Löschung bzw. Wiederherstellung der Fluoreszenz und die zahlreich verwendbaren Chromophore machen Molecular Beacons zu einer exzellenten DNA-Sonde mit einer ausgezeichneten Sensitivität und Selektivität.^[127]

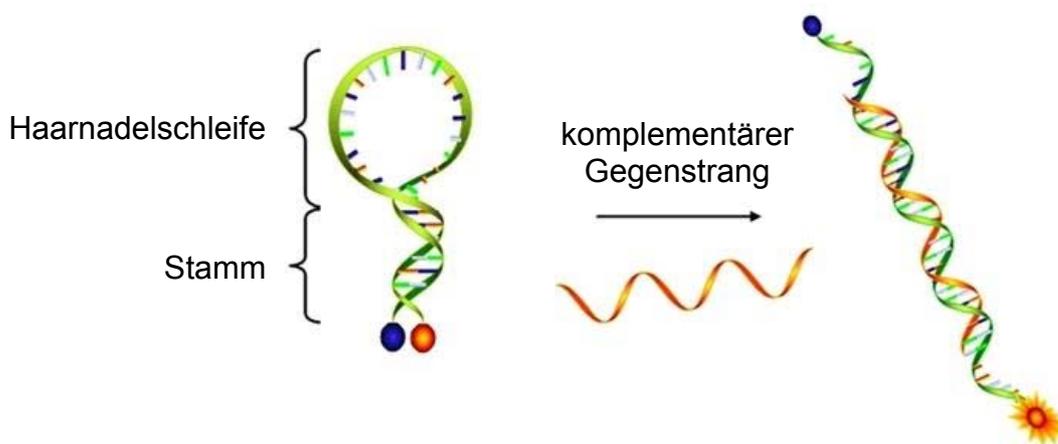
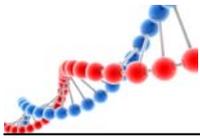


Abb. 24: Aufbau und Funktionsweise eines Molecular Beacons;
Fluorophor: Orange, Quencher: Blau.^[128]

Molecular Beacons kommen mittlerweile in vielen Bereichen zum Einsatz,^[127] wie zum Beispiel die Detektion von SNPs, die Entwicklung von Biosensoren,^[129, 130] der Aufbau von Biochips,^[129, 131, 132] die Untersuchung von Protein-DNA Wechselwirkungen^[133-135] oder die Beobachtung von m-RNA in lebenden Zellen.^[136-138]

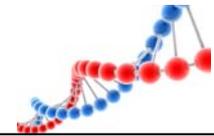


2.6.1. Thermodynamische Betrachtung von Molecular Beacons

Der Hybridisierungsvorgang von Molecular Beacons kann im Allgemeinen über thermodynamische Prozesse erklärt werden. Die Ausbildung der „Stamm-Schleife-Formation“ wird angetrieben durch den Energieunterschied zwischen offener und geschlossener Form des Stamms, ΔG_S . Diese Differenz ist abhängig von der Stammlänge L_S , der Stammsequenz, der Ionenstärke des Mediums und der Temperatur. Eine längere L_S erhöht ΔG_S und führt somit zu einer thermisch stabileren „Stamm-Schleife-Formation“. Die Öffnung des Stammes wird verursacht durch die Hybridisierung einer Ziel-DNA an den Schleifenbereich. Auch hier lässt sich die Triebkraft über den Energieunterschied der freien Schleife (Loop) und des gebildeten Doppelstrangs beschreiben. ΔG_L unterliegt hierbei den gleichen Abhängigkeiten wie ΔG_S . Für einen typischen Molecular Beacon ist ΔG_L größer als ΔG_S , wodurch eine Öffnung des Beacons durch Zugabe der Ziel-DNA ermöglicht wird. Der Unterschied zwischen ΔG_L und ΔG_S ist somit verantwortlich für die Stabilität, Spezifität und die Kinetik der Stammöffnung. Wird die Länge der Stammsequenz vergrößert und der Energieunterschied damit verringert, ändert sich das Verhalten des Beacons drastisch. Aufgrund der nun höheren Energiebarriere verlangsamt sich die Hybridisierungsrate erheblich und die Stabilität des Beacon-Ziel-DNA-Duplexes sinkt. Gleichzeitig erhöht sich jedoch die Fähigkeit, SNPs über einen größeren Temperaturbereich zu erfassen.^[139]

Ausschlaggebend für die effektive Diskriminierung von Fehlpaarungen ist auch die Lage des SNPs. Experimente belegen, dass die höchst mögliche Selektivität für Mutationen in der Mitte des Bindungsbereiches liegt. Je weiter die Fehlpaarung in den Außenbereich wandert, umso schlechter wird die Unterscheidungsfähigkeit zwischen Wildtyp und Mutante. Zusätzlich erhöht sich natürlich die Selektivität mit der Anzahl der vorhandenen SNPs.^[140]

Der Vorteil von Molecular Beacons gegenüber linearer DNA oder RNA Sonden, wie dem bekannten Taqman Assay oder Invader Assay, liegt in ihrer höheren Selektivität. Auch dies lässt sich leicht durch einen Vergleich der thermodynamischen Prozesse erklären.^[127] Lineare Sonden besitzen zwei mögliche Zustände: 1. als Einzelstrang (random coil), oder 2. hybridisiert mit der Ziel-DNA als Doppelstrang. Molecular Beacons besitzen jedoch drei verschiedene Zustände. Neben den eben



genannten, kommt als dritter Zustand noch die „Stamm-Schleife-Formation“ hinzu.^[140] Die Selektivität einer Sonde wird bestimmt durch den Unterschied der Phasenübergangstemperatur eines perfekten Ziel-DNA-Sonde-Duplexes und eines fehlgepaarten Doppelstrangs. Thermodynamische Studien haben gezeigt, dass die freie Energie der „Stamm-Schleife-Formation“ geringer ist, als die des random coil.^[139, 141, 142] Hierdurch lässt sich folgern, dass ein temperaturindizierter Phasenübergang von der Duplex-Struktur in die „Stamm-Schleife-Formation“ stattfindet. Die offene Form, in der die Hybridisierung bevorzugt stattfindet, wird hierbei übergangen. Dieser dreiphasige Zustand erhöht somit die Energiedifferenz bzw. die Differenz der Übergangstemperatur zwischen perfekt gepaarten und fehlgepaarten Strängen und erhöht somit die Selektivität gegenüber linearen Sonden.

2.6.2. Kinetische Betrachtung von Molecular Beacons

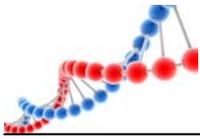
Die Gestaltung eines Molecular Beacons gleicht einer Gradwanderung zwischen gewünschter Selektivität und hoher Hybridisierungsrate. Der einfachste Weg, die Selektivität zu erhöhen, ist eine Verlängerung des Stamms oder die Erhöhung des G-C-Anteils in der Stammregion. Dies steigert jedoch nicht nur die Selektivität, sondern auch die Stabilität des Stammes und senkt somit die Hybridisierungsrate. Die stattfindende Hybridisierung lässt sich als Reaktion zweiter Ordnung beschreiben:



Gleichung 12: Kinetik zweiter Ordnung der Öffnung eines Molecular Beacons.

- [B]: Konzentration des freien Beacons
- [T]: Konzentration der freien Ziel-DNA
- [D]: Konzentration des Beacon-Ziel-DNA-Duplex
- k_1 : Hybridisierungsrate
- k_2 : Dehybridisierungsrate

Für lineare DNA-Sonden mit 17 – 19 Basen ist die Rate in einem Bereich um 10000 bis 14000 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für einen Molecular Beacon beträgt sie bei einer Stammlänge von 4 Basen und einer Schleifenlänge (L_L) von 17 – 19 Basen ca. 6000 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Verlängert



man die Stammregion auf sechs Basen, sinkt hierbei die Konstante auf 40 – 300 M⁻¹s⁻¹.^[139] Verkürzt man die Stammlänge, steigt k₁ an, wogegen die Selektivität stark abnimmt. Als akzeptabler Kompromiss hat sich eine Stammlänge zwischen fünf bis sieben Basen und eine Schleifenlänge von 15 bis 25 Basen ergeben.

2.6.3. Molecular Beacons basierend auf FRET-Wechselwirkungen

Wie Eingangs bereits erwähnt, stützen sich viele Molecular Beacons auf das von T. Förster 1948 erstmals beschriebenen Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).^[143] Hierbei wird die Energie eines angeregten Donormoleküls strahlungslos auf ein Akzeptormolekül über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen.^[144] Für diesen Transfer ist die relative Orientierung des Übergangsdipolmoments des Donor- und Akzeptormoleküls von großer Bedeutung.^[145] Der FRET-Prozess lässt sich somit über zwei Wege detektieren. Erstens über die Emissionsabnahme des Donors und zweitens über die mögliche Zunahme der Fluoreszenzintensität des Akzeptors.^[146] Es müssen jedoch zwei Hauptvoraussetzungen erfüllt sein, damit es zu einem FRET kommen kann:

1. Da die Energietransferrate indirekt proportional zur sechsten Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor ist (siehe Gleichung 13), kann üblicherweise ab einer Distanz von mehr als 10 nm kein FRET mehr stattfinden.

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^{-6}$$

Gleichung 13: Distanzabhängigkeit der Energietransferrate eines FRET-Prozesses.

- k_T: Energietransferrate
- τ_D: Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
- R₀: Försterradius; Abstand mit 50 % Energietransfereffizienz
- r: Distanz zwischen den Chromophoren

2. Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Je größer diese spektrale Überlappung ist, umso effizienter ist der Energietransfer.

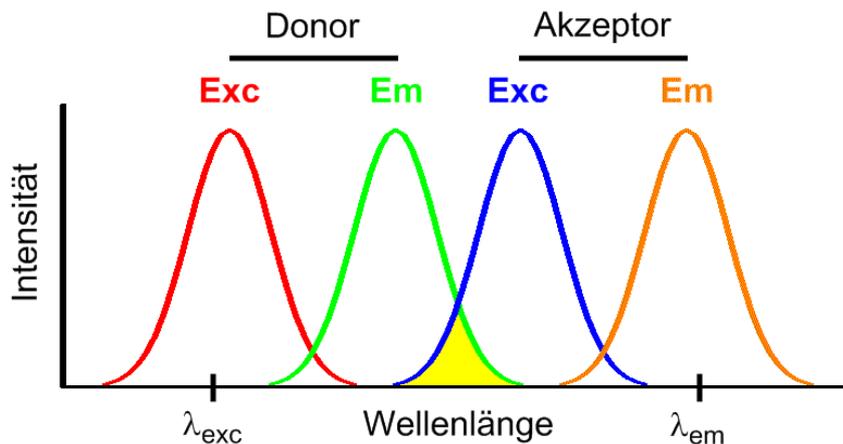
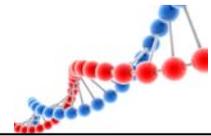


Abb. 25: Schematische Darstellung des Absorptions- und Emissionsspektrums eines FRET-Paars; Der Bereich der spektralen Überlappung ist gelb markiert.

Das von *Tyagi* und *Kramer* entworfene Molecular Beacon Prinzip wurde zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses von *Bao et. al.* weiterentwickelt. Bei diesem neuen Prinzip ist zusätzlich zur Schleifenregion ein Stammteil komplementär zur entsprechenden Ziel-DNA (*shared-stem* Molecular Beacons).^[139, 140] Auf diese Weise wird der Fluorophor fester an die Ziel-DNA gebunden, wodurch seine Bewegungsfreiheit eingeschränkt und ein zufälliger FRET mit dem Quencher unwahrscheinlicher wird.

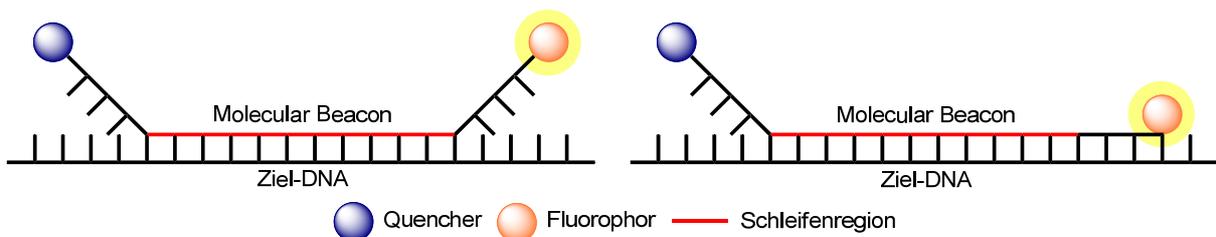


Abb. 26: Schematische Darstellung eines Molecular Beacons erster Generation (links) und eines *shared-stem* Molecular Beacons (rechts).

Eine weitere Möglichkeit, das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, sind die von *Saito et al.* entwickelten *in-stem* Molecular Beacons. Hierbei werden der Fluorophor und der Quencher nicht am 3'- und am 5'-Ende der Stammregion platziert, sondern direkt in der Stammsequenz. Dadurch werden beide Chromophore in direkte räumliche Nähe zueinander gezwungen, wodurch die FRET-Effizienz deutlich steigt und die Hintergrundfluoreszenz stark reduziert wird.^[147, 148]

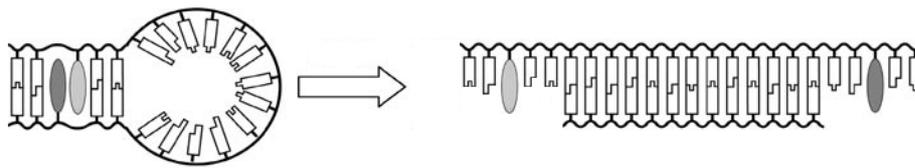
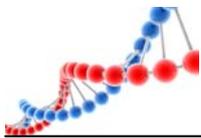


Abb. 27: Schematische Darstellung eines *in-stem* Molecular Beacons.^[148]

Beim Prinzip des *in-stem* Molecular Beacons wird die Emission durch statisches Quenchen gelöscht. Dies steht im Gegensatz zu der dynamischen Fluoreszenzlöschung, wie sie bei Beacons der ersten Generation vorkommt.^[149]

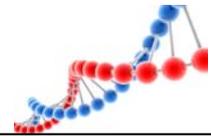
Dynamische Quench-Vorgänge unterteilen sich in Förster- und Dexter-Mechanismus.^[150] Bei diesen Mechanismen ist ein Energietransfer nur möglich, wenn sich der Donor in einem angeregten Zustand befindet.^[151] Der Förster-Mechanismus beruht, wie bereits Eingangs erwähnt, auf einer Energieübertragung über die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor- und Akzeptormolekül.^[144] Beim Dexter-Mechanismus hängt eine effektive Energieübertragung von einer guten Überlappung der Molekülorbitale ab. Die Energietransferrate des Dexter-Mechanismus nimmt exponentiell mit dem Abstand zwischen Donor und Quencher ab

$$k_T \propto J \exp\left(\frac{-2R}{L}\right)$$

Abb. 28: Distanzabhängigkeit der Energietransferrate beim Dexter-Mechanismus.^[152]

- k_T : Energietransferrate
- J : Integral der spektralen Überlappung
- R : Distanz zwischen Donor und Quencher
- L : Eindringtiefe der Wellenfunktion in die Umgebung

Bei der statischen Löschung kommt es zur Ausbildung eines Grundzustandkomplexes zwischen Donor und Quencher. Dieses so gebildete intramolekulare Dimer und somit der Grundzustandskomplex unterscheidet sich wesentlich in seinen Eigenschaften von denen der einzelnen Chromophore. Aufgrund der Aggregation kommt es zu einer nahezu vollständigen Löschung der Emission des Donors.^[153, 154] Da die statische Löschung, im Gegensatz zur dynamischen, nur abhängig von der Überlappung der Absorptionsspektren von



Donor und Quencher ist, vereinfacht dies die Auswahl und Kombination von Chromophoren und somit das Design von Molecular Beacons.^[151]

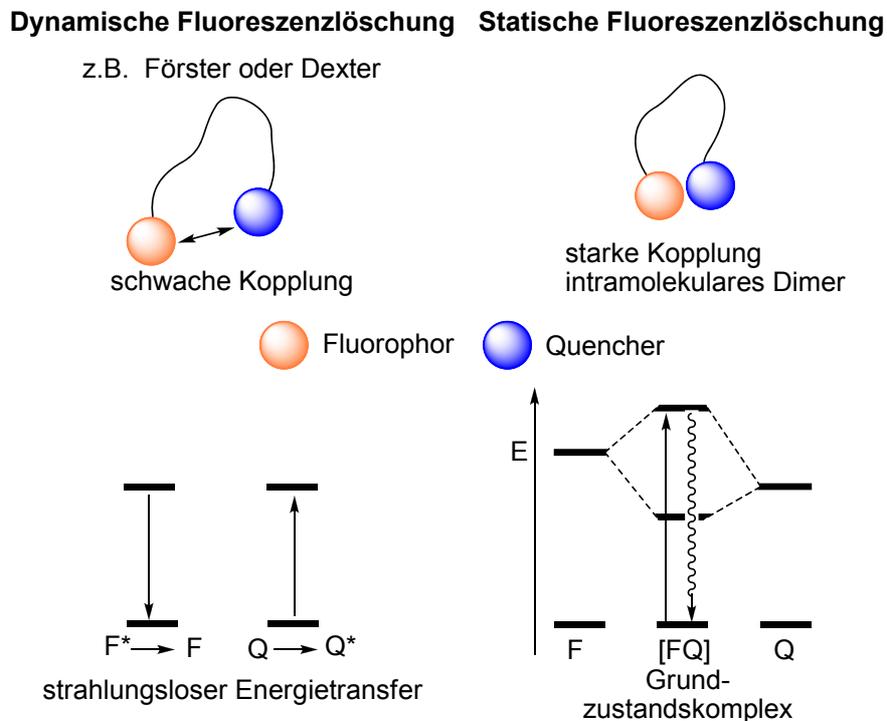
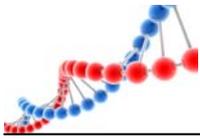


Abb. 29: Schematische Darstellung der dynamischen und der statischen Fluoreszenzlöschung.^[151]

Entgegen den bisher vorgestellten Molecular Beacons, die auf einem Fluorophor- und einem Quencher-molekül aufbauen, entwickelte *Tan et al.* einen Beacon mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren am 3'- und 5'-Ende der Stammregion.^[155] Dieses FRET-Paar, bestehend aus Coumarin und 6-FAM, einem Fluoresceinderivat, befindet sich in geschlossener Form in räumlicher Nähe zueinander. Dadurch wird die Emission des angeregten Coumarin durch 6-FAM gelöscht und das so angeregte 6-FAM fluoresziert. Wird der Beacon durch Zugabe einer Ziel-DNA geöffnet, werden die beiden Fluorophore voneinander getrennt. Hierdurch findet kein FRET mehr statt und die Emission des Coumarins kehrt zurück. Somit ist es nicht nur möglich, das Öffnen der Haarnadelschleife über die Rückkehr der gelöschten Emission des Donors zu beobachten, sondern auch über die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Akzeptors. Auf diese Art und Weise ist es denkbar, deutlich sensitivere Beacons zu entwickeln. Des Weiteren werden die optischen Messungen dieser Anordnung durch eine geringere Abhängigkeit von der optischen Geometrie und durch einen



kleineren Einfluss von Bleicheffekten erleichtert.^[149] Schließt man in die Betrachtung der Emissionen nicht nur deren tatsächlichen Werte, sondern auch deren Verhältnisse mit ein, so erleichtert dies zusätzlich die Handhabung und die Wahrscheinlichkeit von verfälschten Signalen nimmt deutlich ab.

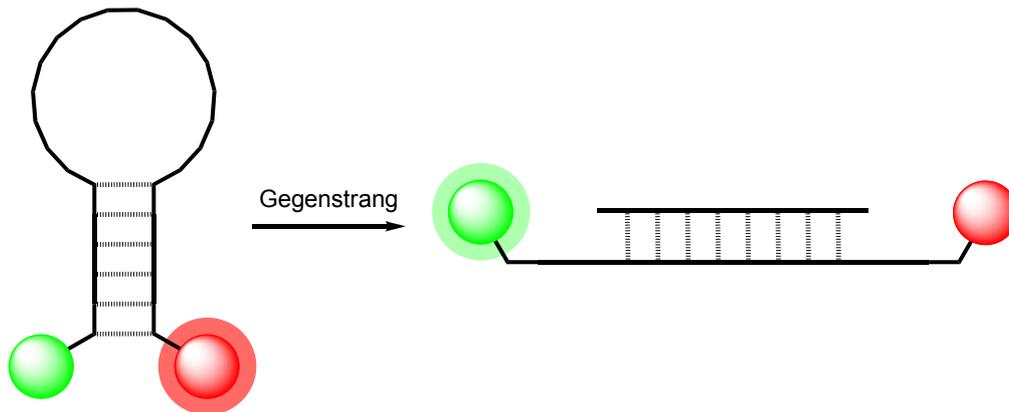
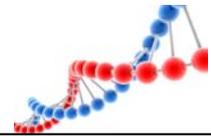


Abb. 30: Schematische Darstellung des von *Tan et al.* entwickelten Molecular Beacons.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es noch zahlreiche weitere Ansätze gibt das Signal-Rausch-Verhältnis und die eventuell störende Hintergrundfluoreszenz durch unvollständiges Löschen zu vermindern, z. B. durch zeitaufgelöste Fluoreszenztechniken,^[156] das Nutzen von Stokes-Verschiebung,^[155, 157, 158] durch super gelöschte Beacons,^[159] durch die Ausbildungen eines Stamms mit einer Tripelhelix^[160, 161] oder durch Stammlose PNA Beacons.^[162]

2.7. DNA-Sonden basierend auf der Ausbildung von Excimeren und Exciplexen

Die in Kapitel 2.4 behandelte Methode der Excimer bzw. Exciplexbildung lässt sich leicht auf die Entwicklung von DNA-Sonden anwenden. Die bekanntesten Chromophore hierbei sind die Pyrene und Perylene und deren Derivate. DNA-Sequenzen mit diesen Molekülen besitzen sowohl mit Interstrang- als auch mit Intrastrangdimeren die erwartete Excimeremission.



Ebata et al. synthetisierte zwei Oligonukleotide mit je einem Pyren am 3'- oder 5'-Ende.^[163, 164] Durch Zugabe eines passenden Gegenstrangs hybridisieren beide „*Split probes*“ an diesen. Infolgedessen werden die beiden Chromophore in räumliche Nähe zueinander gezwungen, wodurch sich ein Excimer formt. Aufgrund des Unterschieds zwischen Monomer und Excimeremission war es möglich, 16S rRNA in sehr niedrigen Konzentrationen von bis zu 10 nM nachzuweisen. *Paris et al.* gelang es, durch strukturelle Optimierung dieses Systems die Sensitivität auf 4 nM zu steigern.^[165] Nach dem gleichen Prinzip entwickelten *Bichenkova et al.* „*Split probes*“ mit einem Pyren- und einem *N,N'*-dialkylnaphthalinmotiv an den terminalen Enden.^[166] Diese beiden Chromophore bilden zusammen einen Exciplex aus, dessen Emission sich deutlich von der Monomeremission unterscheidet. Jedoch erreichten sie nur eine geringe Sensitivität von 400 nM.^[167]

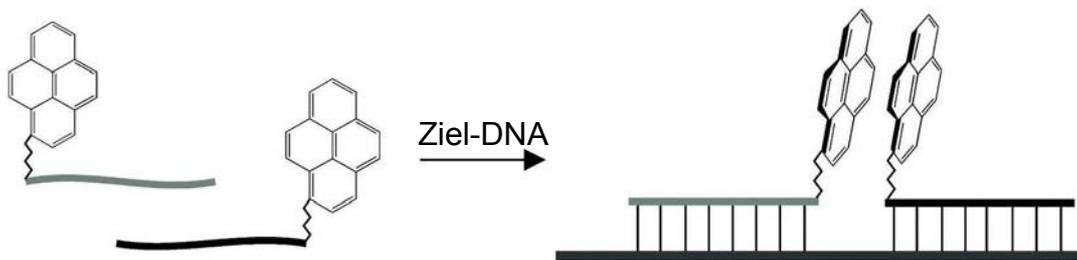
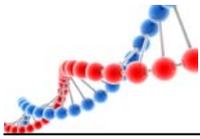


Abb. 31: Schematische Darstellung der DNA-Sonde nach *Ebata et al.*^[168]

In der Gruppe von *Wagenknecht et al.* wurde eine DNA-Sonde mit zwei künstlichen Perylenbisimidbausteinen entworfen. Diese beiden Chromophore befinden sich in der Mitte einer Oligonukleotidsequenz und werden von einem Adenosin als Zwischenbase voneinander getrennt. Dieser räumliche Abstand verhindert in Gegenwart des passenden Gegenstrangs jegliche Wechselwirkung zwischen den Chromophoren und es tritt ausschließlich die Perylenbisimid-Monomeremission auf. Wird anstelle der Wildtyp-DNA eine Mutante-DNA mit einer Fehlpaarung zum Adenosin hinzugegeben, stört diese Basenfehlpaarung den sich bildenden Duplex. Der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen wird verändert und sie treten in Wechselwirkung zueinander. Auf diese Weise ändert sich die Monomeremission zur Excimeremission. Zugleich war es möglich, nicht nur zwischen Wildtyp und Mutante zu unterscheiden, sondern anhand des Verhältnisses beider Emissionen auch noch deren Anteil an der Probenlösung zu ermitteln.^[169]



5'-T-G-C-A-T-G-C-A-P-A-P-A-C-T-G-A-C-3'
 3'-A-C-G-T-A-C-G-T-C-Y-C-T-G-A-C-T-G-5'

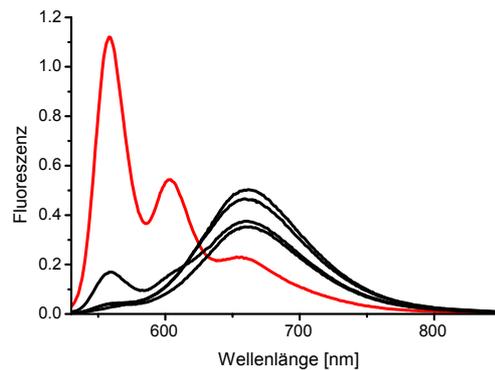
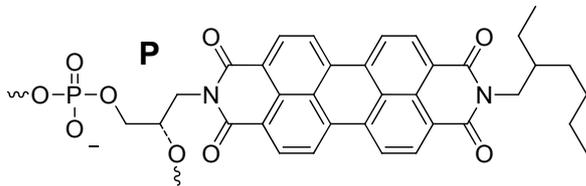


Abb. 32: DNA-Sonde von *Wagenknecht et al.*;^[169] links: Sondensequenz mit Perylenbisimidbaustein; rechts Emissionsspektren mit Wildtyp (rot) und Mutanten (schwarz).

Der erste Excimer – Monomer Molecular Beacon mit Pyrenbausteinen an den terminalen Enden wurde von *Fujimoto et al.* synthetisiert.^[170] Dieser Beacon mit einer Stammlänge von fünf Basenpaaren und einem Loop von 19 Basen wurde bereits durch Zugabe von nur einem Äquivalent an Gegenstrang vollständig geöffnet und hatte eine Sensitivität von 1 nM. Des Weiteren war es möglich, präzise zwischen Wildtyp und SNP-Mutanten zu unterscheiden. Da die beiden Chromophore über einen Succinimid-Ester mit dem bereits fertig synthetisierten Oligonukleotidstrang verknüpft wurden, besteht dieser Beacon zusätzlich mit seiner synthetischen Einfachheit.

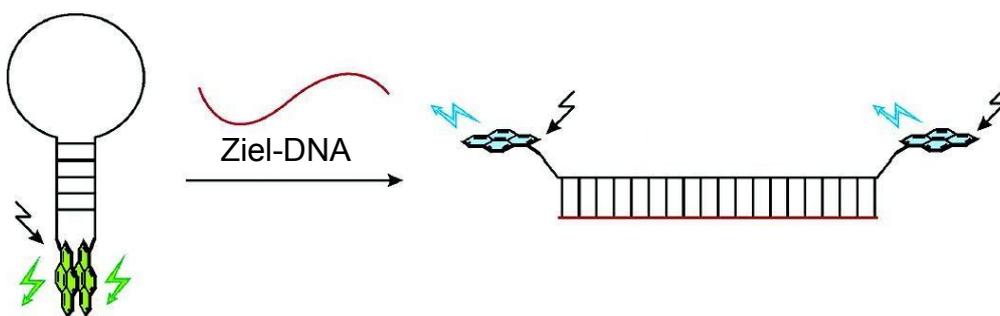
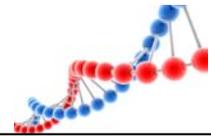


Abb. 33: Schematische Darstellung des Excimer – Monomer Molecular Beacon von *Fujimoto et al.*^[170]

Häner et al. entwickelten diesen Excimer – Monomer Molecular Beacon weiter und synthetisierten einen excimerkontrollierten *in stem* Molecular Beacon mit jeweils zwei artifiziellen Pyren- und Perylenbisimidnucleosiden (PBI) in der Stammregion. In der geschlossenen Form befinden sich die vier Chromophore in räumlicher Nähe



zueinander und es entsteht ein durch π - π -Wechselwirkungen gekoppeltes EYEY Motiv. Da Pyren elektronenreich ist und Perylenbisimide einen elektronenarmen Charakter besitzen, kommt es zu Donor (Pyren) Akzeptor (PBI) Wechselwirkungen und die Emission des Pyrens wird vollständig gelöscht. Hierdurch war es möglich, die Hintergrundfluoreszenz zu eliminieren. Durch Zugabe des entsprechenden Gegenstrangs wird das EYEY-Motiv zerstört und die beiden Chromophorgruppen voneinander getrennt. Die beiden Pyren Einheiten formen nun ein Dimer YY, dessen spezifische Excimeremission detektiert werden kann. Durch die hohe Quantenausbeute und des großen Extinktionskoeffizienten des Pyrens konnte eine Sensitivität von 0.3 nM erreicht werden.^[171]

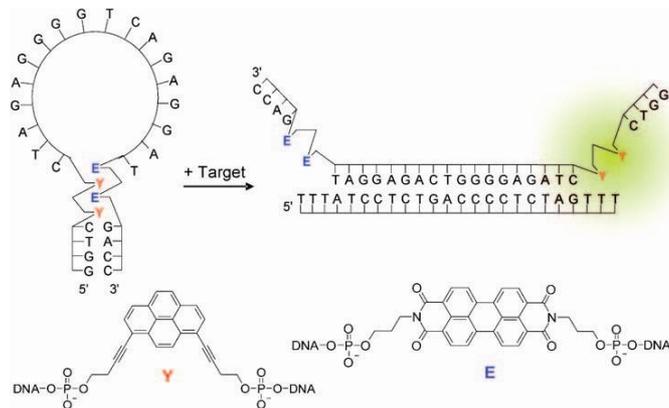
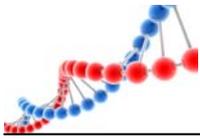


Abb. 34: Schematische Darstellung des Excimer-kontrollierten *in-stem* Molecular Beacon nach Häner et al.^[171]

Der *in-stem* Molecular Beacon von *Asanuma et al.* basiert auf einem ähnlichen Prinzip, wurde jedoch in der Funktionsweise erweitert. Auch dieser Beacon baut in der geschlossenen Form auf einen Löschprozess zwischen zwei Chromophoren auf. *Asanuma* verwendete hierzu zwei durch eine Zwischenbase getrennte Perylenbausteine als Emitter und Anthrachinon als Quencher. Durch Öffnung der Stammregion kommt es zu einer Trennung dieses Donor-Akzeptor-Paares und die Monomeremission des Perylens kehrt zurück. Befindet sich im Gegenstrang in der Region gegenüber der trennenden Zwischenbase eine Deletion, so treten die beiden Chromophore in räumliche Nähe zueinander und emittieren die typische Excimerfluoreszenz. Es ist somit möglich, nicht nur zwischen geschlossener (keine Emission) und offener Form (blaue Emission) mit dem bloßen Auge zu



unterscheiden, sondern auch zwischen offener Form und einem Gegenstrang mit einer entsprechenden Deletion (grüne Emission).^[148]

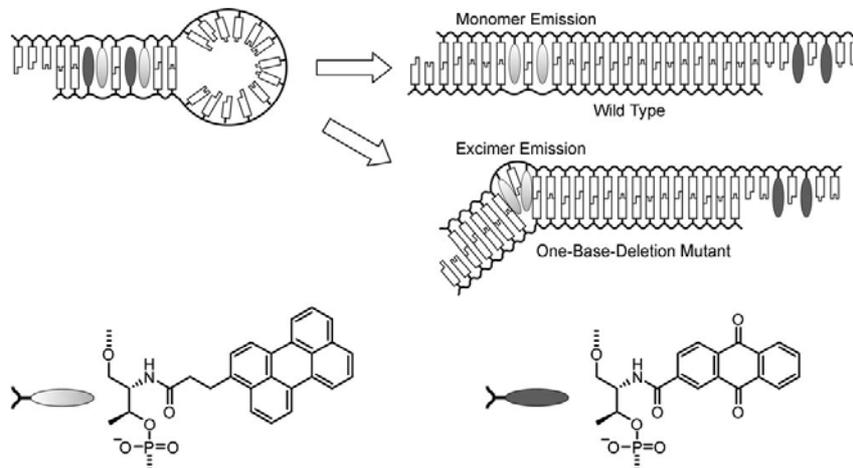


Abb. 35: Schematische Darstellung des *in-stem* Molecular Beacon von *Asanuma et al.*^[148]

Muto et al. entwickelten die Idee eines Kaliumsenors auf der Grundlage der DNA vermittelten Excimerbildung von Pyren. Jedes Sensormonomer besteht aus drei Teilbereichen. Einem Kronenether als Ionendetektor, einer kurzen Oligonukleotidsequenz als strukturgebende Einheit und einem Chromophor (Pyren) der je nach Zustand des Systems ein spezifisches optisches Signal aussendet. Sind keine Kaliumionen im System vorhanden, existieren nur Sensormonomere, da der Oligonukleotidbereich zu kurz ist, um eine stabile Doppelhelix auszubilden. Die Chromophore kommen somit nicht in näheren Kontakt und nur die Pyrenmonomeremission ist detektierbar. Durch Zugabe der passenden Ionen werden diese durch den Kronenether komplexiert. Wegen dieser Vororganisation ist es dem kurzen DNA Bereich nun möglich, einen stabilen Doppelstrang auszubilden, wodurch die terminalen Chromophore in räumliche Nähe zueinander kommen. Dieser Prozess kann anhand der Abnahme der Monomeremission und der Zunahme der Excimeremission verfolgt werden.^[172]

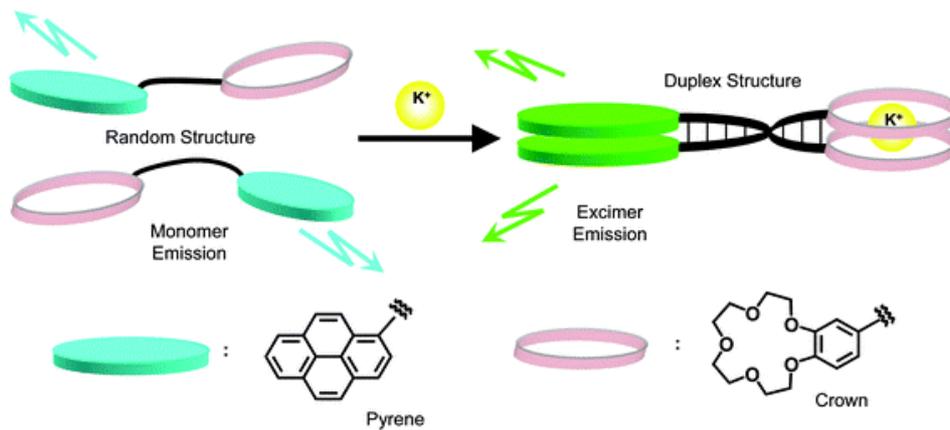
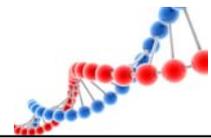
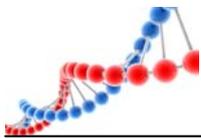


Abb. 36: Schematische Darstellung des excimerbasierten Kaliumionensensors.^[172]

Dies waren einige ausgewählte Beispiele aus einer schier unendlichen Anzahl von DNA-Sonden, die auf der Ausbildung von Excimeren und Exciplexen basieren. Leider ist abschließend noch anzumerken, dass die Zahl der praktikablen Anwendungen mit Pyren und Perylenbisimid als Chromophor in der Oligonukleotidanalytik stark begrenzt ist, da beide Farbstoffe im angeregten Zustand in der Lage sind Guanin zu oxidieren und so ihre Emission gelöscht wird.^[173, 174]



3. Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base

Perylen-3,4:9,10tetracarbonsäurebisimide (PBI) sind die zweitkleinsten Vertreter der Rylenfarbstoffe bzw. deren Bisimide. Diese Farbstoffklasse basiert auf Naphthalingruppen, die als kleinste gemeinsame Einheiten über ihre *peri*-Position miteinander verknüpft sind. Somit können diese Chromophore auch als Poly(*peri*-Naphthaline) bezeichnet werden.^[175]

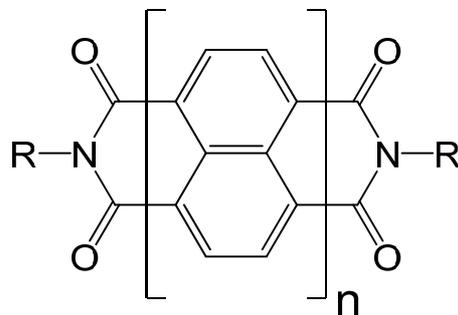
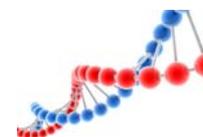


Abb. 37: Kleinste Wiederholungseinheit der Rylen-bisimide; $n = 1$: Naphthalinbisimid; $n = 2$: Perylenbisimid; $n = 3$: Terrylenbisimid; $n = 4$: Quaterrylenbisimid; usw.

Zu den charakteristischen Eigenschaften der Rylenfarbstoff-Familie gehören hohe Extinktionskoeffizienten im sichtbaren Bereich des Spektrums, beachtliche Fluoreszenzquantenausbeuten, exzellente Photostabilität, große thermische Belastbarkeit, chemische Inertheit und eine farbliche Brillanz.^[176, 177] Zugleich lässt sich mit der Familie der Rylenfarbstoffe nahezu das gesamte sichtbare Farbspektrum in verschiedenen Nuancen von rot über gelb nach grün und sogar bis hin zu schwarz abdecken.^[178] Aufgrund dieser Merkmale wurden diese Chromophore bereits für viele materialwissenschaftliche und technische Anwendungen untersucht. Diese umfassen zum Beispiel die Verwendung in photo-^[179-183] und optoelektronischen Bauteilen,^[184-187] Energietransferkaskaden^[188] oder organischen Leuchtdioden^[189, 190], aber auch den Einsatz in der Automobilindustrie als Pigment in Farben und Lacken.^[191] Der große Nachteil dieser Molekülklasse ist die sehr geringe Löslichkeit in sowohl polaren als auch unpolaren Lösungsmitteln. Diese beruht auf starken, intermolekularen π -Wechselwirkungen. Deswegen wurde erst 46 Jahre nach der Entdeckung der Perylenbisimidfarbstoffe durch *M. Kardos* (1913)^[192] deren starke



Fluoreszenz beobachtet.^[193] *Müllen et al.* gelang es durch Modifikation des Grundgerüsts mit aromatischen Resten, das Löslichkeitsverhalten in organischen Lösungsmitteln deutlich zu steigern. *Langhals et al.* erzielte durch lange sekundäre Alkylgruppen am Imid einen ähnlichen Effekt.^[194, 195] Durch Modifikation der Buchtregion mit hydrophilen Gruppen, wie z. B. Sulfonsäuren, war es *Müllen et al.* zusätzlich möglich, die Wasserlöslichkeit dieses hydrophoben Chromophors zu erhöhen.^[196] Dies eröffnete zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten in biologischen Studien, wie das Anfärben von Zellkulturen.^[197]

Ein zweiter Ansatz zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit ist die Anknüpfung der hydrophoben Chromophore an Polyanionen. Hierbei sticht vor allem die strukturell wohl definierte doppelsträngige DNA hervor. Diese Kombination von Perylenbisimidderivaten und Oligonukleotidstrukturen ist Hauptbestandteil dieser Dissertation.

Perylenbisimide können sowohl symmetrisch als auch unsymmetrisch mit Alkyl- oder Arylaminen modifiziert sein. Zahlreiche Perylenbisimidderivate belegen, dass diese Substituenten zwar einen Einfluss auf die Löslichkeit, aber nahezu keine Auswirkung auf die Absorption und Emission haben. Plausibel wird dies bei Betrachtung der Molekülorbitale. Abb. 38 zeigt sehr anschaulich, dass sowohl im HOMO als auch im LUMO eine Knotenebene direkt an der Position des Stickstoffatoms liegt. Dadurch kann das aromatische System des Perylenbisimids als abgeschlossenes Chromophorsystem betrachtet werden, dessen $S_0 - S_1$ Übergang in seiner Intensität und Position von den Aminsubstituenten unbeeinflusst bleibt.^[198]

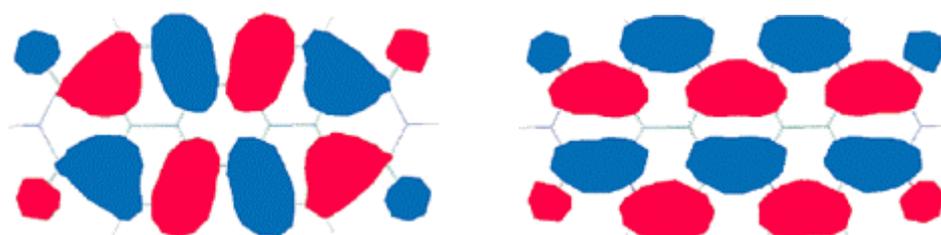
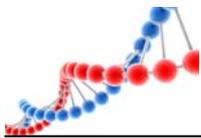


Abb. 38: HOMO- (links) und LUMO- (rechts) Orbitale von Perylenbisimide.^[191]

Eine Ausnahme stellen elektronenreiche Mono-, Di-, und Trimethoxyphenylsubstituenten dar. Auch Diese Substituenten üben aufgrund der



Knotenebene nur sehr geringen Einfluss auf das optische Verhalten des Chromophors aus, Die Quantenausbeute sinkt jedoch auf 1 – 0.1 %. Diese Emissionslöschung ist das Resultat eines HOMO-HOMO Elektronentransfers von der elektronenreichen Methoxyphenylgruppe auf das angeregte PBI, wodurch ein kurzlebige Chromophor-Anionenradikal entsteht.^[199]

Zahlreiche Röntgenstrukturuntersuchungen haben bewiesen, dass das Perylenbisimidgrundgerüst ein planares, aromatisches π -System besitzt.^[200-204] Bei genauerer Betrachtung der Bindungsabstände stellt sich heraus, dass das PBI aus zwei Naphthalin-Halbeinheiten aufgebaut ist, die auf einer Seite mit dem Imid und auf der anderen Seite über zwei $C(sp^2)-C(sp^2)$ -Einfachbindungen mit der anderen Halbeinheit verbunden sind.

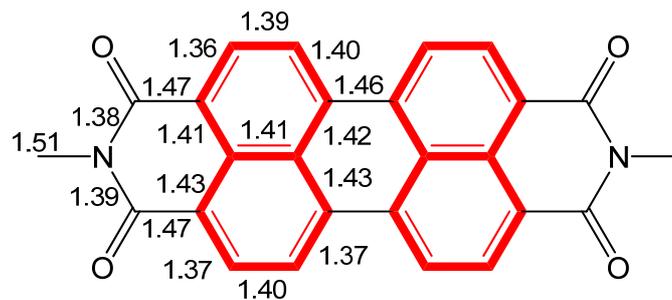


Abb. 39: Bindungslängen im Kristall,^[200-204] Naphthalineinheiten sind rot markiert.

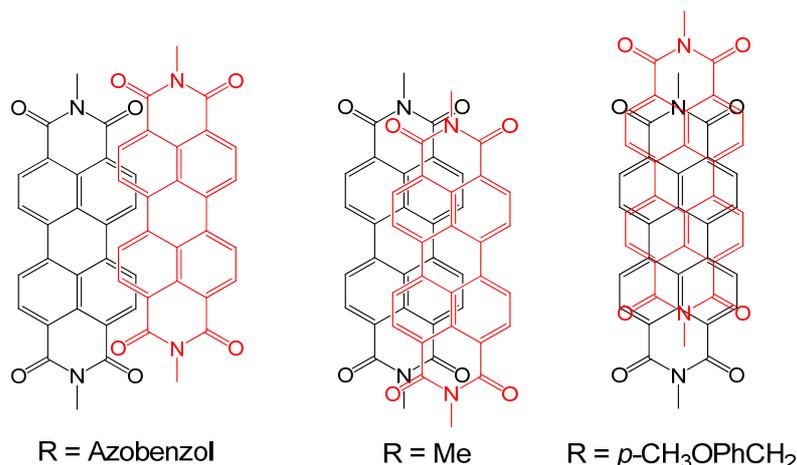


Abb. 40: Transversale und longitudinale Verschiebung der aromatischen π -Systeme; Resultierende Farben: links: Rot; Mitte: Kastanienbraun; rechts schwarz.^[191]

Die Stapel Eigenschaften des Perylenbisimid werden durch den Imidsubstituenten gesteuert. Zwar ist der Abstand (Z-Achse) der planaren Flächen meist 3.34 Å bis



3.55 Å, jedoch variiert die Verschiebung entlang der X- und Y-Achse stark.^[200-204] Diese longitudinale und transversale Verschiebung verursacht eine breite mögliche Farbpalette des Dimers.^[191]

Die stapelnden Eigenschaften des Perylenbisimids wurden nicht nur in Kristallen sondern auch in Lösung untersucht. Um die Löslichkeit des Chromophors in schwach polaren Lösungsmitteln zu erhöhen, wurde das Imid mit 3,4,5-Tridodecyloxyphenyl funktionalisiert.^[205] Konzentrationsabhängige UV/Vis-Absorptionsmessungen haben gezeigt, dass sich mit steigender Farbstoffkonzentration das Absorptionsspektrum deutlich verändert (vgl. Abb. 41 links). Dieser Übergang besitzt dabei wohl definierte isobestische Punkte. Dies bedeutet, dass sich eindimensionale Aggregate mit gleicher Bindungskonstante ausbilden. Berechnungen haben ergeben, dass die Bindungsenergie zwischen den einzelnen Chromophoren vergleichbar mit einer dreifachen Wasserbrückenbindung ist.^[191] Eine erhöhte Farbstoffkonzentration verändert auch die Emission, wie die Fülle von Farbtönen, mit denen unterschiedlich konzentrierte Lösungen emittieren, zeigt (Abb. 41 rechts).

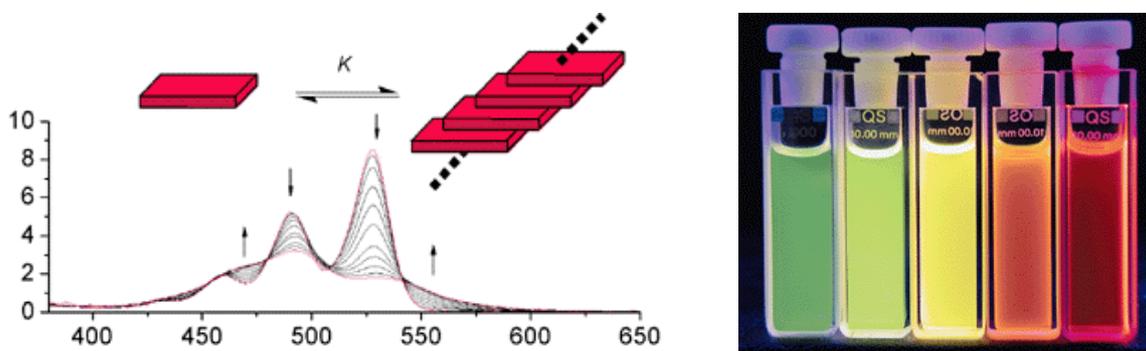
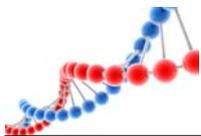


Abb. 41: links: Konzentrationsabhängiges UV/Vis-Absorptionsspektrum; die Pfeile zeigen die Veränderung bei steigender Farbstoffkonzentration; rechts: Konzentrationsabhängige Fluoreszenz; die Farbstoffkonzentration steigt von links nach rechts.^[191]

Die Bindungsstärke der π - π -Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren kann durch Erhöhung der Lösungsmittelpolarität gesteigert werden. In Alkoholen oder Wasser ist es nicht möglich, die aromatische Oberfläche des PBI zu solvatisieren.



3.1. Perylenbisimid in der Oligonukleotidchemie

Für Perylenbisimide findet man in der Literatur zahlreiche Angaben zur Quantenausbeute. Diese beträgt bis zu 100 % in Chloroform.^[206-210] sauerstoffbedingte Löschprozesse haben kaum Einfluss auf die Fluoreszenzlebenszeiten.^[206] Für den in dieser Arbeit verwendeten Perylenbisimidbaustein **8** beträgt die Quantenausbeute 72 %. In DNA kann jedoch die Quantenausbeute für Perylenbisimid-Monomere je nach Basenumgebung aufgrund von redoxbedingten Löschprozessen sehr stark auf unter 0.1 % zurückgehen.^[174] Auch die Fluoreszenzintensität von Dimeren ist im DNA-Doppelstrang stark reduziert. Voraussetzung für die Relaxation des Frank-Condon-Dimers vom angeregten Zustand in den fluoreszenten Excimer-Zustand ist eine geometrische Neuordnung der Chromophore parallel zu ihren Übergangsdipolmomenten.^[211] Diese strukturelle Umlagerung wird jedoch durch die Doppelhelix sehr stark behindert.^[212] Trotz dieses grundsätzlichen Nachteils gibt es eine große Anzahl von Studien, die sich mit Perylenbisimiden in Oligonukleotiden beschäftigen.

Li et al. untersuchten einen Perylenbisimidbaustein, der über einen Tetraethylenglycol-Linker (TEG) dreimal in einen DNA-Strang eingebaut wurde. Dieser Einzelstrang lag bei Raumtemperatur unstrukturiert als *random coil* vor. Durch Erhitzen des Systems kam es zur Faltung durch spezifische Wechselwirkung zwischen den Chromophoren. Mit fünf PBI-Chromophoren bildet sich eine kleeblattähnliche Struktur mit den Perylenbisimiden im Zentrum. Durch Erwärmen würde unmodifizierte DNA dehybridisieren und einen strukturell undefinierten Einzelstrang ergeben. In diesem Foldamer wird jedoch die steigende Hydrophobizität des PBI ausgenutzt, um auch bei hohen Temperaturen die definierte Struktur zu erhalten.^[213]

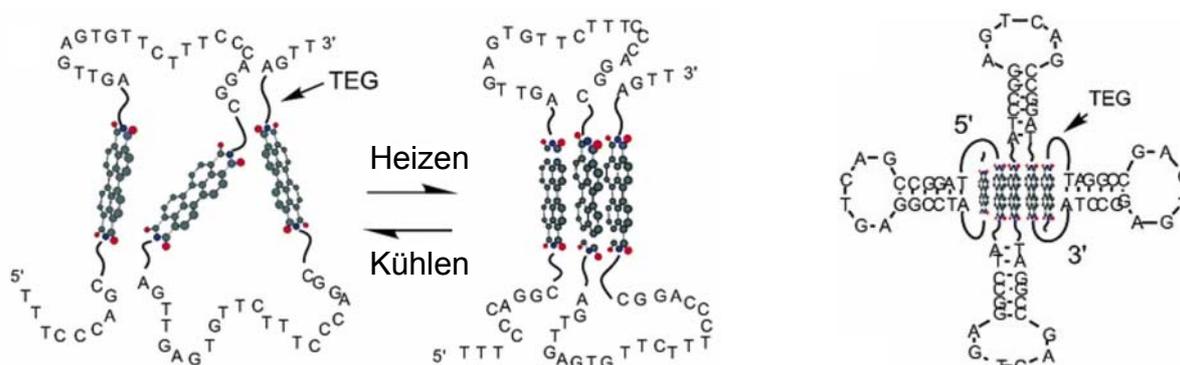
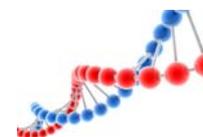


Abb. 42: links: Aggregation von PBI in Oligonukleotiden ohne Duplexbildung; rechts: PBI vermittelte Ausbildung einer DNA-Tertiärstruktur.^[213]

Asanuma *et al.* prüften die abschirmende Eigenschaft von sogenannten „Isolator-Basenpaaren“ auf die ladungstransferbedingte Emissionslöschung des Perylenbisimids. Diese Isolatoren sind nicht aromatisch, wodurch eine elektronische Kopplung unterbrochen wird. Durch Einbau von zwei Isolator-Basenpaaren steigt die Fluoreszenz um das 20fache und mit sechs um das fast 600fache.^[214]

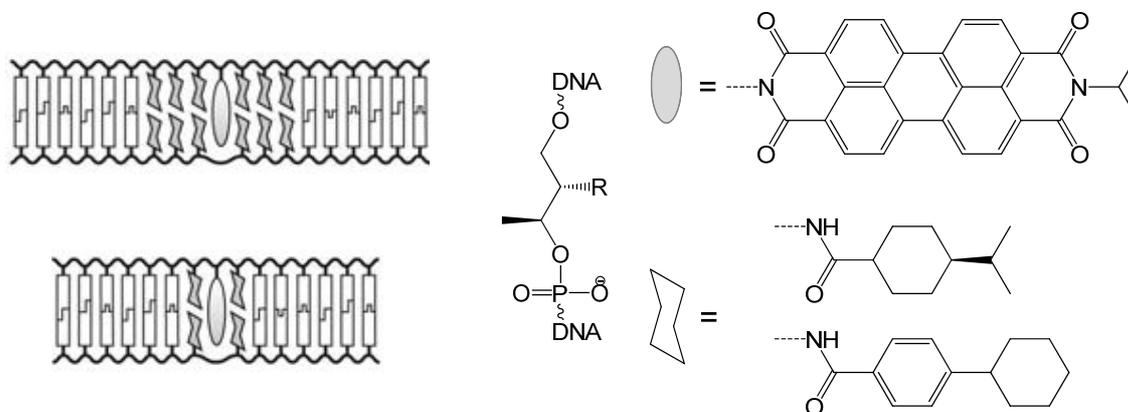


Abb. 43: links: Verwendete Isolatorsequenzen; rechts: PBI und Isolatorbasen.^[214]

Perylenbisimid wurde von *McLaughlin et al.* zur Konstruktion von Tripelhelices verwendet. Hierzu wurde ein palindromer DNA-Strang synthetisiert, der in der Mitte über ein Perylenbisimid verfügt. Die große planare aromatische Fläche des Chromophors, die als Deckel über allen drei Strängen liegt, stabilisiert durch Wechselwirkungen mit den angrenzenden Basen den Dreifachstrang mit über 10 °C.^[215, 216]

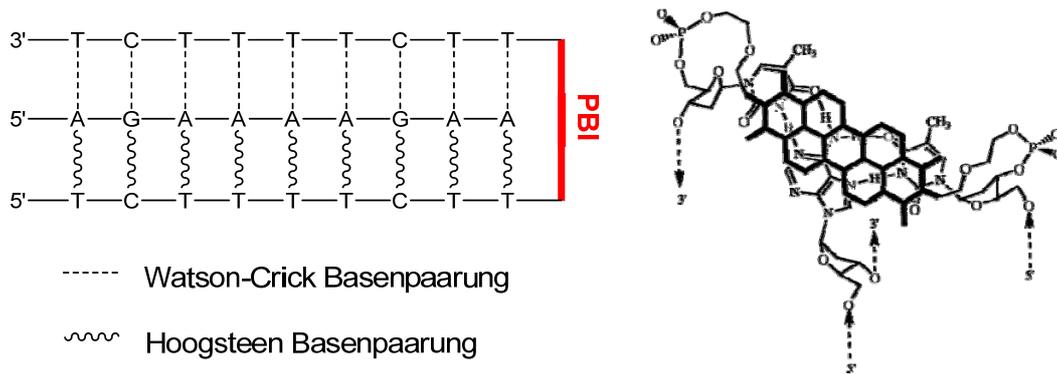
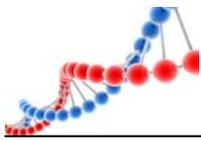


Abb. 44: links: Gebildeter Dreifachstrang mit PBI als Haarnadelschleife; rechts: Blick auf die Haarnadelschleife mit den terminalen Basentriplett (T-dA-T) hinter dem PBI-Baustein (Fett).

Wagenknecht et al. entwickelten einen Perylenbisimidbaustein, der über ein kurzes Linkermolekül als Basenersatz in DNA eingebaut werden kann. Erste Untersuchungen mit intern modifizierter DNA zeigten deutliche Wechselwirkungen zwischen den Basen und dem PBI. Ladungstransferexperimente haben gezeigt, dass diese starke Stapelung vor allem im Doppelstrang existiert, sich aber durch thermisches Dehybridisieren nicht vollständig unterbrechen lässt. Ein 5'-terminal verknüpftes Perylenbisimid baut im Doppelstrang intermolekulare Wechselwirkungen zu einem weiteren Chromophor auf, welche durch thermische Dehybridisierung unterbrochen werden können. Somit gab es erstmals Indizien, dass PBI als 5'-Cap einer Doppelhelix Aggregate bilden kann.^[173]

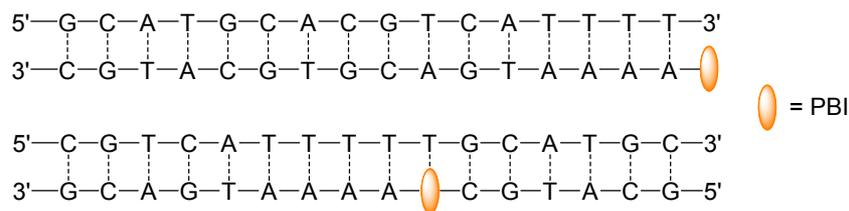
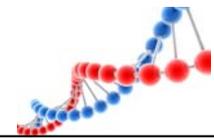


Abb. 45: PBI-modifizierte Oligonukleotide von *Wagenknecht et al.*^[173]

In weiterführenden Experimenten untersuchten *Wagenknecht et al.* Interstrang PBI-Dimere mit zwei bzw. sechs alternierend angeordneten Chromophoren. Die Farbstoffe stabilisieren durch starke excitonische π - π -Wechselwirkungen den modifizierten Doppelstrangs deutlich, was eine Anordnung ähnlich eines Reißverschlusses plausibel macht. Ein Interstrang-PBI-Dimer kann somit als



hydrophob und diagonal wechselwirkendes Basenpaar angesehen werden,^[169, 217] ähnlich denen von *Leumann et al.*^[218, 219]

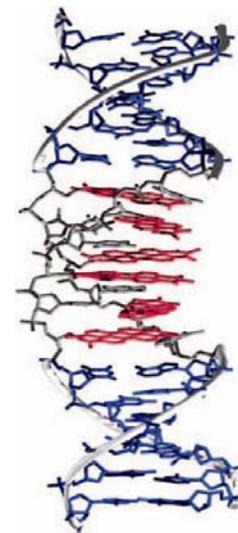
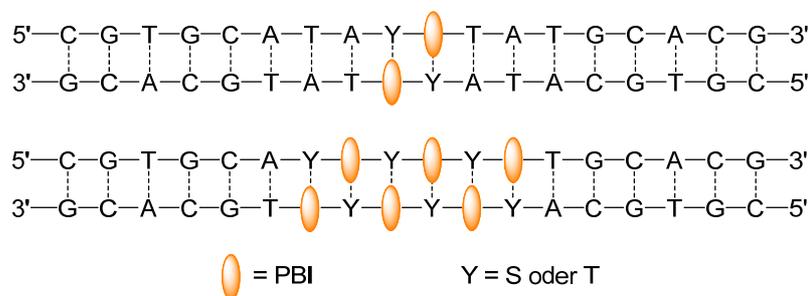


Abb. 46: links: PBI-Basenpaare; rechts: Berechnetes Modell der sechsfach PBI-modifizierten Doppelhelix, der Chromophor ist rot dargestellt.^[217]

Die Arbeitsgruppe von *Frederik Lewis* untersucht ebenfalls seit einigen Jahren sehr intensiv die Eigenschaften von Perylenbisimid in Oligonukleotiden, wobei der PBI-Baustein analog zu den Pyrenbausteinen von *Häner et al.*^[220] über zwei Alkyl linker in die DNA eingebaut wurde. Ist das PBI in der Mitte von zwei komplementären Einzelsträngen angeordnet, werden durch Hybridisierung die beiden Farbstoffe in räumliche Nähe zueinander gezwungen. In Anlehnung an *McLaughlin et al.*^[215, 216] wurden selbstkomplementäre Haarnadelschleifen synthetisiert, die an ihrem Kopfende den Chromophor tragen. In der linearen Anordnung liegen die beiden PBI-Einheiten übereinander und zeigen excitonische Kopplungen. Aufgrund eines sehr ausgeprägten CD-Signals konnte eine gegenseitige Verdrehung der beiden coplanaren Chromophorflächen nachgewiesen werden, die durch theoretische Rechnungen mit $38 \pm 4^\circ$ bestimmt wurden. Somit folgen die beiden Perylenbisimide der induzierten Helikalität doppelsträngiger DNA. Die CD-Spektren der Haarnadeln zeigten jedoch nur eine minimale gegenseitige Verdrehung von $4 \pm 19^\circ$ bzw. $180 \pm 22^\circ$.^[221]

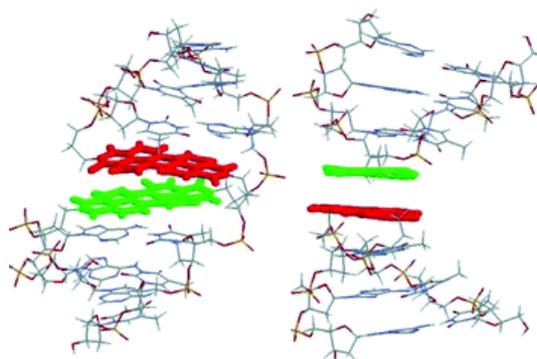
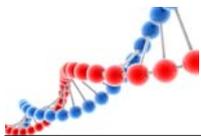


Abb. 47: Berechnete Strukturen des PBI-modifizierten Doppelstrangs (links) und der freien Haarnadelschleifen (rechts).^[221]

Spätere Untersuchungen der modifizierten Haarnadelschleifen haben eine deutliche Abhängigkeit des Aggregationsverhaltens von der Salzkonzentration in der Pufferlösung gezeigt. Bei geringer Konzentration und Raumtemperatur findet keinerlei Stapelung zwischen den Chromophoren statt. Eine erhöhte Salzkonzentration resultiert in stärker werdenden Wechselwirkungen. So zeigt sich, dass bei geringer Konzentration die Stapelung durch eine Temperaturerhöhung schon vor der Dehybridisierung des Doppelstrangs zusammenbricht; bei höherer Konzentration geschieht dies gleichzeitig. Hierdurch wird zusätzlich belegt, dass ohne Doppelhelix eine excitonische Kopplung nicht möglich ist. Für die Ausbildung von Wechselwirkungen ist eine Mindestsalzkonzentration von 10 mM notwendig. Zugleich wurde durch Rechnungen der günstigste Abstand zwischen beiden Chromophoren auf 3.5 Å, und der bevorzugte Torsionswinkel deutlich präziser als früher mit $\pm 20^\circ$ bestimmt.^[222] Neuesten Erkenntnissen zufolge ändert sich jedoch dieser Winkel im angeregten, excimerartigen Zustand auf 0° .^[223] Gleiche Ergebnisse wurden auch mit kopf- und schwanzmodifizierten Haarnadelschleifen, sogenannten Hanteln, erzielt. Zusätzlich konnte die Aggregation durch AFM-Untersuchungen belegt werden.^[224]

Die von *Wagenknecht et al.* entwickelte PBI-Anordnung zur SNP-Detektion^[169] (vgl. Kapitel 2.7) wurde von *Lewis et al.* zur Untersuchung des Basenausklappmechanismus aufgegriffen. Diagonal angeordnete Interstrang-PBI-Basenpaare beeinflussen das Herausklappen der zwischenliegenden Basenpaare entsprechend ihres Abstands. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die freie



Energie aus der π -Stapelung ausreicht, um ein A-T-Basenpaar bei Raumtemperatur, ein G-C- oder zwei A-T-Basenpaare bei leicht erhöhter Temperatur aus dem Doppelstrang zu klappen. Eine größere Anzahl dazwischenliegender Basenpaare oder ein erhöhter G-C-Anteil ergab uneinheitliche Ergebnisse. Erstaunlich ist jedoch der Effekt, dass in einer Intrastranganordnung, wie es bei *Wagenknecht et al.* der Fall ist, eine perfekte Basenpaarung zwischen den Perylenbisimiden die Wechselwirkung stark hemmt, bei einer Interstranganordnung dieses Basenpaar jedoch aus dem Duplex geklappt wird.^[212]

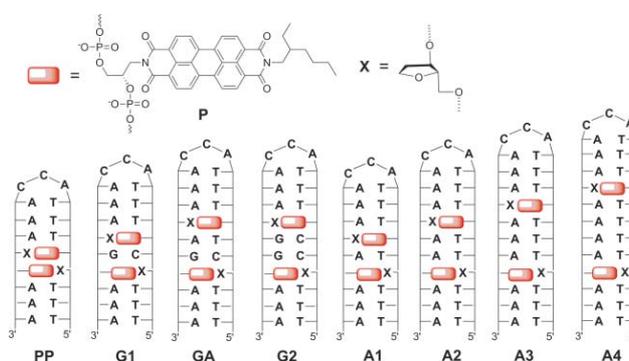


Abb. 48: Synthetisierte Oligonukleotidstränge zur Untersuchung des Basenausklappmechanismus.^[212]

3.2. Synthese des azyklischen Linkers **4** und des Perylenbisimidphosphoramidit-Bausteins **8**

In der Literatur gibt es für Perylenbisimidchromophore als artifizielle Basen in Oligonukleotiden zahlreiche Beispiele in Form von Basensurrogaten. Insgesamt sind bis jetzt drei unterschiedliche Perylenbisimidphosphoramidite bekannt.^[173, 216, 225-228]

Zwei von diesen erlauben es jedoch, den Chromophor nur als Cap oder als Kopfgruppe einer Haarnadelschleife zu verwenden (Abb. 49, a und b). Lediglich ein Phosphoramidit ermöglicht es, Perylenbisimid als internen Basenersatz zu verwenden (Abb. 49, c). Zusätzlich wurden Perylenbisimidbausteine mit aktiven Estern oder Azidgruppen entwickelt (Abb. 49, d und e), die postsynthetisch an den Oligonukleotidstrang geknüpft werden können.^[229-231]

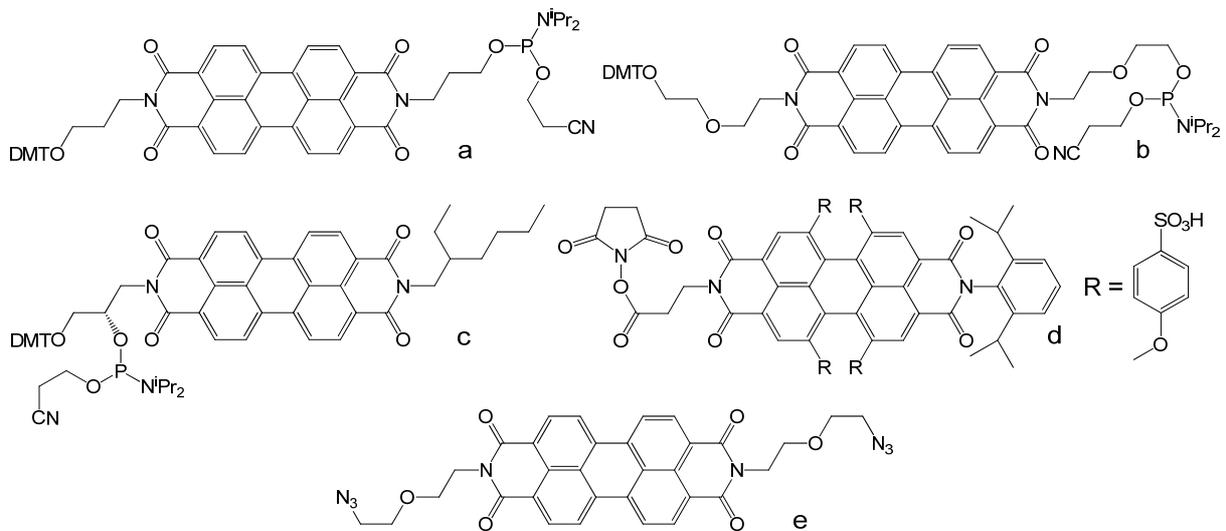
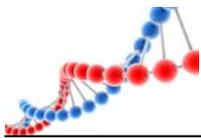


Abb. 49: a-c: drei Perylenbisimidphosphoramidite; d: Perylenbisimid als aktiver Ester; e: Perylenbisimid als Klick-Baustein.

In dieser Arbeit wurde das 2'-Desoxyribosid der natürlichen Basen durch einen azyklischen Linkerbaustein auf der Basis von (S)-1-Amino-propan-2,3-diol ersetzt. Das verwendete Stereoisomer wurde ausgewählt, um die räumliche Konfiguration am C-3'-Atom der 2'-Deoxyribose nachzubilden und so eine strukturelle Störung des DNA-Rückgrats möglicherweise zu verhindern. Dieser Linkerbaustein kam in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* bereits bei zahlreichen Bausteinen wie Ethidium-,^[232-234] Phenothiazin-,^[235] Thiazolorange-,^[217, 236-238] Perylenbisimid-^[169, 173, 217] oder Indolderivaten^[239] zum Einsatz. Er wird zusätzlich seit kurzer Zeit durch minimale Veränderung auch als universeller Klickbaustein^[240, 241] zur postsynthetischen DNA-Modifikation eingesetzt.

Der besprochene und in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* etablierte Linkerbaustein (**4**) wurde leicht abweichend von den bekannten Literaturvorschriften^[232, 233, 242] synthetisiert. Durch eine Modifikation der Syntheseschritte konnte auf eine schwierige und sehr langwierige chromatographische Aufreinigung des Produkts nach der zweiten Stufe vollständig verzichtet werden. Hierdurch wurde nicht nur die gesamte notwendige Arbeitszeit immens verkürzt, sondern auch die Ausbeute an **3** von 49 % auf 87 % gesteigert.

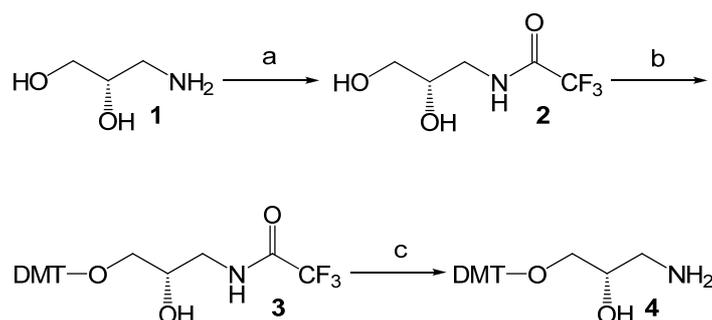


Abb. 50: Syntheschema des azyklischen Linkerbausteins **4**; a) Methyltrifluoroacetat, RT, über Nacht, quant.; b) Dimethoxytriphenylmethylchlorid, THF, NEt_3 , RT, 12 h, 87 %; c) MeOH, NH_3 , THF, RT, über Nacht, 95 %.

Die unsymmetrische Substitution des Perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisanhydrids erfolgte mit geringen Abänderungen gemäß der Literatur.^[173] Hierzu wurde Perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydrid (**5**) in siedendem Pyridin mithilfe von Zinkacetat aktiviert und mit dem Linkerbaustein (**4**) und 2-Ethylhexylamin (**6**) versetzt. Da beide Amine annähernd die gleiche Reaktivität aufweisen, erhält man nach ca. 23 h Reaktionszeit ein Produktgemisch von zwei symmetrisch substituierten Perylenbisimidinen, die verworfen werden, und dem gewünschten unsymmetrisch substituierten Produkt **7**. Verbliebene Reste des Edukts wurden mittels wässriger Extraktion mit stark verdünnter Kalilauge aus dem Rohprodukt entfernt. Dies ist möglich, da die Produkte außerordentlich hydrolysestabil sind,^[243] das Edukt jedoch leicht in das lösliche Tetraalkaliumsalz überführt werden kann. Es hat sich gezeigt, dass dieser Reinigungsschritt für die DNA-Synthese von essentieller Bedeutung ist. Unterlässt man diese Prozedur, kommt es zu leichten Verschiebungen im Hochfeld des $^1\text{H-NMR}$ von **7**, die molekulare Masse des Produkts stimmt trotzdem mit der erwarteten überein. Eine Synthese bis zum fertigen Phosphoramidit scheint zwar problemlos möglich, jedoch lässt sich dieses auch durch veränderte Kopplungsprotokolle keinesfalls für die automatisierte DNA-Festphasensynthese verwenden.

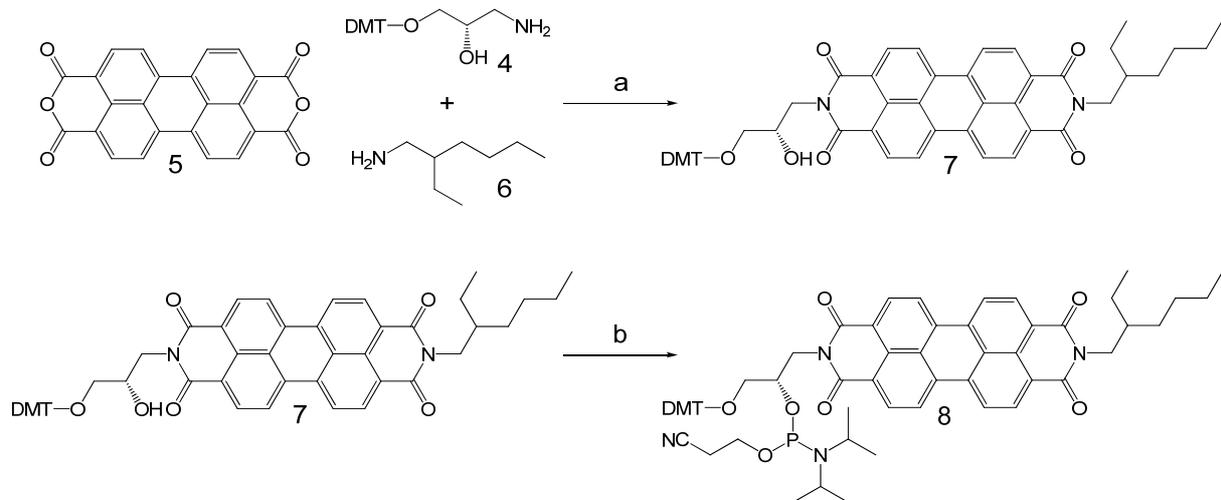
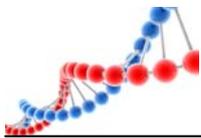
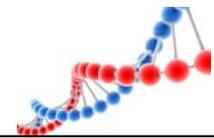


Abb. 51: Syntheschema des Perylenbisimidphosphoramidits **8**; a) $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, Pyridin, 130°C , 23 h, 28 %; b) β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, NEt_3 , abs. DCM, RT, 2 h, 75 %.

3.3. Abstandsabhängige Untersuchung der Photooxidation von Guanin

Perylenbisimid wurde bereits in zahlreichen DNA-Sequenzen eingebaut und dessen optische Eigenschaften, vor allem UV/Vis-Absorption und Fluoreszenz, eingehend untersucht. Eine große Anzahl von Experimenten hat hierbei gezeigt, dass die Emission des PBI in Oligonukleotiden meist stark gelöscht ist, was durch einen photoinduzierten Lochtransfer des angeregten Chromophors in den Basenstapel der DNA begründet wird. Untersuchungen von *Salbeck et al.* mit verschiedenen Perylenbisimidderivaten^[244] belegten, dass PBI sehr elektronenarme Chromophore sind, die somit extrem leicht zu oxidieren, aber verhältnismäßig schwer zu reduzieren sind. Cyclovoltammetrische Messungen in der Gruppe von *Wagenknecht et al.* für den verwendeten Chromophor **7** bestätigen diese Ergebnisse. Die beiden reduktiven Potentiale im Grundzustand betragen: $E_{\text{red}}(\text{PBI}^- / \text{PBI}^{2-}) = -760 \text{ mV}$ und $E_{\text{red}}(\text{PBI} / \text{PBI}^-) = -600 \text{ mV}$ (beide gegen NHE).^[245] Die hohe photochemische Stabilität des PBI-Chromophors ist auf diesen Elektronenmangel zurückzuführen, da hierdurch farbstoffzerstörende Photooxidationsprozesse verhindert werden.^[191] Betrachtet man das Reduktionspotential des angeregten Chromophors, erhält man einen Wert von ca. $E^* \approx 1.7 \text{ V}$ ($E_{00} = 2.3 \text{ V}$; $\lambda = 529 \text{ nm}$).^[245] Schätzt man mit diesen Daten die dem Ladungstransfer zugrundeliegende Triebkraft unter Zuhilfenahme der *Rehm-Weller-*



Gleichung ab,^[43] dann sollte die Oxidation von Guanin deutlich exergonisch, die von Adenin annähernd isoergonisch und die der Basen Thymin und Cytosin endergonisch sein.^[174] Perylenbisimid **7** ist somit prinzipiell in der Lage, durch photochemische Anregung in einer Adenin- oder Guaninumgebung als Lochdonor zu fungieren.

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft von PBI, durch die der Chromophor am terminalen Ende von Doppelsträngen oder an der Kopfgruppe von Haarnadeln in wässriger Umgebung aggregiert,^[173, 216, 221, 222, 224] ist eine Untersuchung des photoinduzierten Elektronentransfers nicht einfach. Einzig der Einbau als artifizielles Nukleosid über den Baustein **7** in die Mitte eines Oligonukleotids, was eine Selbstaggregation durch die Duplexstruktur verhindert, scheint hierfür zweckmäßig zu sein. Somit wurden zur Untersuchung der Ladungstransfereffizienz in Bezug auf den räumlichen Abstand zu Guanin die Stränge DNA1 bis DNA20 synthetisiert. Bei DNA1 befindet sich PBI in einer reinen Adenin-Umgebung, wodurch eine Emissionslöschung annähernd unterbunden sein sollte. Diese Sequenz dient als Referenz, um die Absorption bzw. die Emission ohne möglichen Löschprozess darstellen zu können. Bei DNA2 bis DNA14 steigt der Abstand zwischen dem Chromophor und Guanin in 5'-Richtung an. DNA15 besitzt zwei Guanine vor und hinter dem Perylenbaustein. In DNA17 und DNA19 wird der Lochtransfer zu Guanin im Gegenstrang betrachtet.

DNA1: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**AP**A-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA2: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- TTT-TTC-AGT-ACG-3'

DNA3: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**APG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

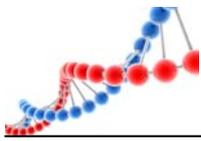
DNA4: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCC**- TTT-TTC-AGT-ACG-3'

DNA5: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**APAG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA6: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- **CTT**-TTC-AGT-ACG-3'

DNA7: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**APAGA**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA8: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- **TCT**-TTC-AGT-ACG-3'



DNA9: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA**-**AG**-AAG-TCA-TGC-5'
DNA10: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- **TTC**-TTC-AGT-ACG-3'

DNA11: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA**-AAA-**GAG**-TCA-TGC-5'
DNA12: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- TTT-**CTC**-AGT-ACG-3'

DNA13: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA**-AAA-**AGG**-TCA-TGC-5'
DNA14: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- TTT-**TCC**-AGT-ACG-3'

DNA15: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**GPG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'
DNA16: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**CCC**- TTT-TTC-AGT-ACG-3'

DNA17: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PC**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'
DNA18: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCG**-TTT- TTC-AGT-ACG-3'

DNA19: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA**-**CAA**-AAG-TCA-TGC-5'
DNA20: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**-**GTT**- TTC-AGT-ACG-3'

Sehr genaue Untersuchungen zur PBI-vermittelten Oxidation von Guanin in Abhängigkeit des Abstands wurden von *Lewis et al.* sowohl mit perylenbisimidmodifizierten Haarnadelschleifen und einem abasischen Nukleosid als Gegenbase,^[174] als auch mit aggregierten Chromophoren an der Spitze von Haarnadelschleifen erzielt.^[223] Diese Resultate lassen sich für die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse hervorragend verwenden.

Wie sich ganz deutlich im UV/Vis-Absorptionsspektrum (Abb. 52 links) erkennen lässt, hat der räumliche Abstand des Chromophors zum oxidierbaren Guanin keinen Einfluss auf das entsprechende Absorptionsverhalten. Es zeigt sich bei allen Doppelsträngen die für Perylenbisimid charakteristische Monomerabsorption mit den vibronischen Übergängen $\nu_0 \rightarrow \nu_1$ bei 505 nm und $\nu_0 \rightarrow \nu_0$ bei 545 nm.

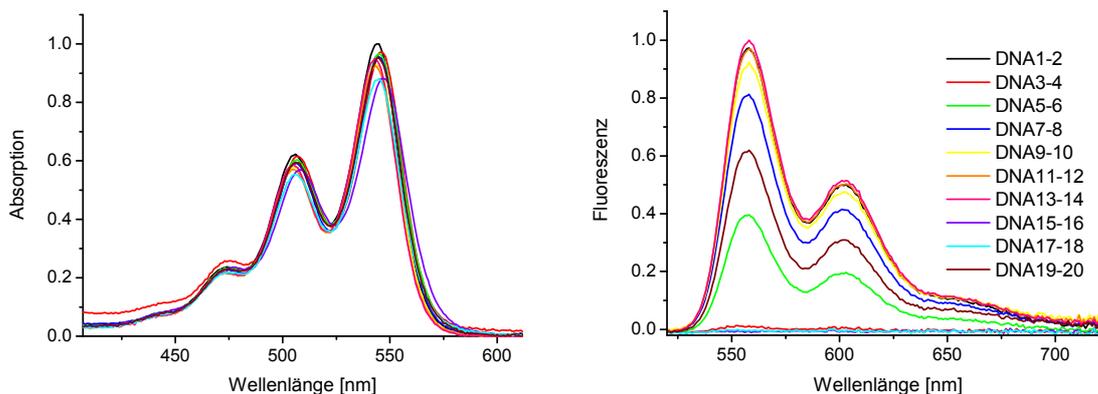
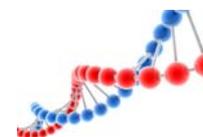
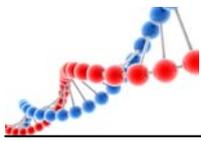


Abb. 52: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von DNA1 – DNA19 mit Gegensträngen.

Die erhaltenen Emissionsspektren zeigen ebenfalls eine Feinstruktur (Abb. 52 rechts), was darauf hindeutet, dass der angeregte Zustand auf dem PBI Chromophor lokalisiert ist.^[174] Die Maxima bei 553 nm und 600 nm sind typisch für die Monomeremission. Die Fluoreszenzintensitäten lassen erwartungsgemäß eine deutliche Abstandsabhängigkeit erkennen. Bei DNA1-2 ist kein Guanin in räumlicher Nähe zu dem angeregten Perylenbisimid. Der Chromophor injiziert zwar nach neuesten Erkenntnissen eine positive Ladung in den Basenstapel und es bildet sich ein Radikationenpaar mit einem benachbarten Adenin, jedoch ist dieser Zustand so instabil und kurzlebig, dass es sofort zu einer Ladungsrekombination kommt.^[174] Somit kann das PBI nur durch eine strahlende Relaxation in den Grundzustand zurückkehren. Liegt ein Guanin in direkter Nachbarschaft zu dem PBI (DNA3-4), kommt es zu einer direkten photoangeregten Ladungsübertragung und es bildet sich das Radikationenpaar $P^{\bullet-} - G^{\bullet+}$. Hierdurch wird der angeregte Zustand des Perylenbisimids entvölkert und die Emission wird effizient gelöscht. Bei einer größeren Entfernung des Guanins zum Perylenbisimid wird zunächst eine positive Ladung in den Adeninstapel injiziert $(A_n) - P^{\bullet-} - (A_n)^{\bullet+} - G$, welche dann aufgrund einer höheren Stabilität ($\Delta E \approx 0.4$ eV) zum Guanin weitergeleitet wird und es bildet sich erneut das Radikationenpaar $(A_n) - P^{\bullet-} - (A_n) - G^{\bullet+}$. Bei einer Vergrößerung des Abstandes müssten zwei Transferraten betrachtet werden. Die Ladungstrennungsrate (k_{CS}), die die Effektivität der Ladungsinjektion vom PBI in den Basenstapel widerspiegelt und die Ladungsrekombinationsrate (K_{CR}), die den



Ladungsrücktransport beschreibt. Mit zunehmendem Abstand zwischen PBI und G sinkt der Wert für k_{CS} und der für k_{CR} steigt an. Hierdurch wird die Ausbildung des Radikationenpaars $P^{\bullet} - G^{\bullet}$ energetisch immer schlechter, was sich in einer Zunahme der Emissionsintensität zeigt. Ab einem Abstand von vier Zwischenbasen (ab DNA11-12) lässt sich kein Abfall der Fluoreszenzintensität mehr feststellen. Das photoangeregte PBI injiziert hier analog zu DNA1 auch eine positive Ladung in den Basenstapel und es bildet sich je nach Injektionsrichtung ein Radikationenpaar, das sich folgendermaßen beschreiben lässt: $(A_3)^{+\bullet} - P^{\bullet} - (A_n)$ oder $(A_n) - P^{\bullet} - (A_3)^{+\bullet}$. Das Guanin ist jedoch räumlich nun so weit entfernt, dass eine Ladungsrekombination schneller ist, als das Abfangen der Positiven Ladung durch das Guanin. Durch diese Ladungsrückführung wird der angeregte Zustand des Perylenbisimids wieder bevölkert, was sich beim Zurückkehren in den Grundzustand in einer starken Emission widerspiegelt. Die Sequenzen DNA17-18 und DNA19-20 verdeutlichen, dass auch ein Lochtransfer in den Gegenstrang möglich ist. Die Emission bei DNA17-18 ist aufgrund des Oxidationsprozesses vollständig gelöscht. DNA19-20 zeigt dagegen nur eine leicht verringerte Emissionsintensität auf. Vergleicht man die Fluoreszenz von DNA5-6 und DNA19-20 sticht sofort ins Auge, dass in DNA19-20 der Löschvorgang weniger effektiv ist. Das deutet darauf hin, dass ein Ladungstransfer in den Gegenstrang energetisch ungünstiger ist.

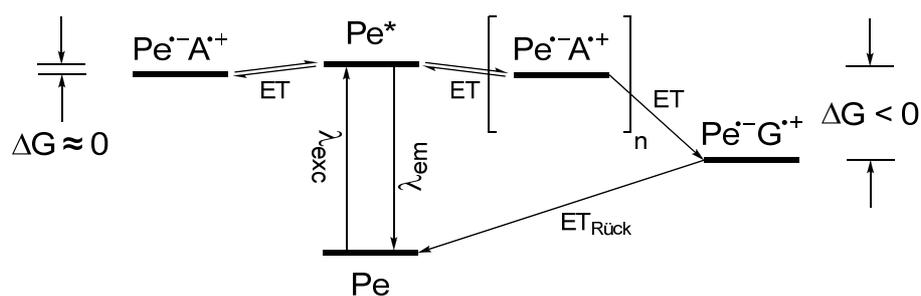
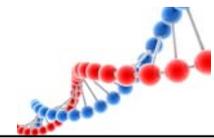


Abb. 53: Schematisches Energieniveaudiagramm der Photooxidation von Guanin; $n = 0 - 4$.



3.4. Synthese perylenbisimidmodifizierter DNA zur möglichen Detektion von SNPs

Wagenknecht et al. entwickelten 2008 eine zweifach perylenbisimidmodifizierte Sonde, mit der es über excimerartige Wechselwirkungen möglich war, sehr spezifisch und sensitiv zwischen Wildtyp-DNA und Mutante-DNA zu unterscheiden (vgl. Kapitel 2.7).^[169] Aufgrund der in Kapitel 3.3 erhaltenen Ergebnisse über das Redoxverhalten des Perylenbisimidbausteins in einem DNA-Strang und der dadurch verursachten Emissionslöschung gilt eine adäquate Übertragung von diesem Modellsystem auf ein reelles System als unwahrscheinlich. Um dies zu testen, wurde auf bekannte Mutationshotspots aus dem sehr gut untersuchten Tumorsuppressor-Gen p53 zurückgegriffen.^[246-248] Es wurde bei DNA21 ganz bewusst die mögliche Punktmutation R282W ausgewählt, da sich dieser Bereich in einer guaninreichen Umgebung befindet und es sich bei der chromophorseparierenden Zwischenbase ebenfalls um ein Guanin handelt.

DNA21: 3'-CCC-TC T-CT **P-GPC**-GCG-TGT-CTC-CTT-5'
 DNA22: 5'-GGG-AGA-GAC-**ACG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'
 DNA23: 5'-GGG-AGA-GAC-**TCG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'
 DNA24: 5'-GGG-AGA-GAC-**GCG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'
 DNA25: 5'-GGG-AGA-GAC-**CCG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'

DNA21 besitzt in allen vier möglichen Doppelsträngen in der UV/Vis-Absorption die typische Monomerabsorption des Perylenbisimidbausteins. Das Verhältnis der beiden Maxima $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ liegt für den richtigen Gegenstrang bei 0.71 und für die Fehlpaarungen im Bereich von 0.81 – 0.85. Trotz des Unterschieds entsprechen aber alle Werte in etwa dem für unaggregierte Perylenbisimidmoleküle in DNA.^[173, 249] In der veröffentlichten Modellsonde wurde dieser Wert nur bei korrekter Basenpaarung erhalten. Für alle anderen Fälle war dieses Verhältnis deutlich größer. Es lässt sich somit allein durch die Betrachtung der UV/Vis-Absorption sagen, dass die Zwischenbase Guanin die PBI-Wechselwirkungen behindert.

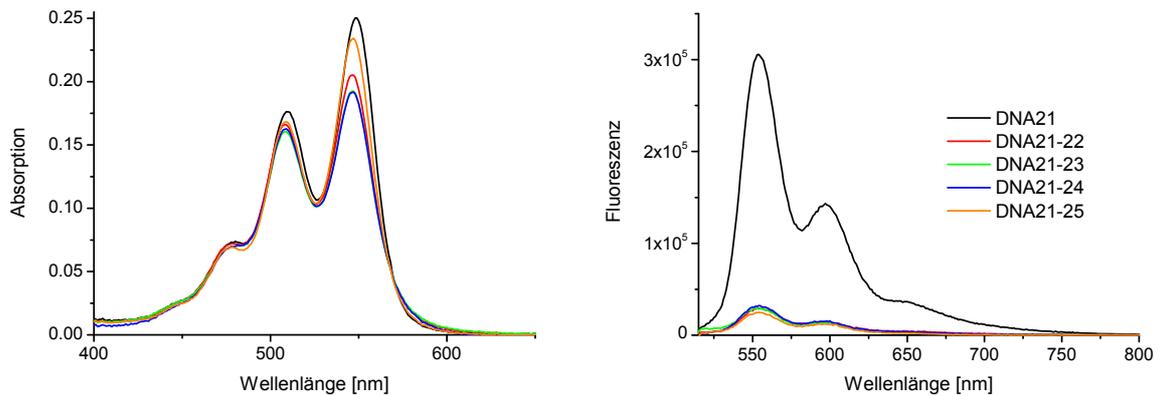
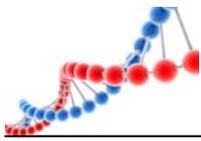
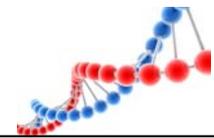


Abb. 54: UV/Vis-Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren von DNA21, DNA21-22, DNA21-23, DNA21-24 und DNA21-25.

Die Emission entspricht der des Perylenbisimid-Monomers mit der charakteristischen Feinstruktur. Die für Farbstoffdimere typische rotverschobene, breite Emissionsbande bei 680 nm fehlt dagegen vollständig. Dies bestätigt eindeutig, dass sich keine excitonische Wechselwirkung zwischen den beiden Chromophoren ausgebildet hat, wie es sich in den UV/Vis-Absorptionsspektren bereits angedeutet hat. Es lässt sich somit kein Fluoreszenzunterschied zwischen richtig- und falschgepaarten Gegenstrang feststellen, was eine allgemeine Anwendbarkeit der Sonde ausschließt. Zusätzlich ist die Emissionsintensität aller Stränge deutlich gesenkt. Dies liegt in Bezugnahme auf Kapitel 3.3 auf einer guaninbedingten Fluoreszenzlöschung.

Tabelle 1: Verhältnisse der UV/Vis-Absorption $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ und der Emission $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA21, DNA21-22, DNA21-23, DNA21-24 und DNA21-25.

DNA	Verhältnisse	
	$A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$	$F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$
DNA21-22	0.81	9.3
DNA21-23	0.85	20.9
DNA21-24	0.84	13.1
DNA21-25	0.72	50.1



In Anbetracht des in Kapitel 3.1 erwähnten Aggregationsverhaltens des Perylenbisimidchromophors an den terminalen Enden eines DNA-Doppelstranges und basierend auf der Erkenntnis, dass bei der Duplexbildung die Formation der ersten drei Basenpaare exergonisch ist, musste eine Kombination beider Eigenschaften als alternativer Ansatz zur potentiellen SNP-Detektion genutzt werden können.

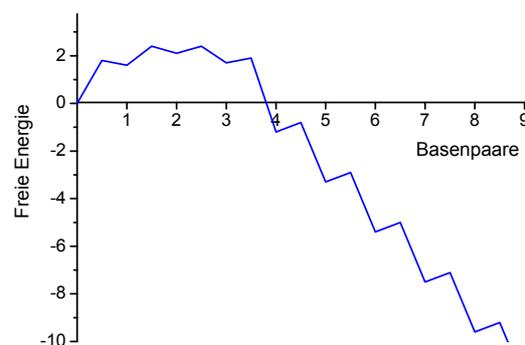


Abb. 55: Schematische Darstellung der, nach dem Nukleationsprozess freiwerdenden Energie.^[250]

Hierzu wurden zwei neuartige Sondensequenzen (DNA26 und DNA32) entworfen, die eine Hybridisierung mit einem passenden Gegenstrang durch ihr UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzverhalten anzeigen sollten.

Beide Oligonukleotide besitzen am 3'- und 5'-Ende eine Perylenbisimideinheit, die als eine Art Deckel den Strang abschließt. Durch Ausbildung eines Doppelstranges sollten die terminalen Chromophore miteinander wechselwirken, wodurch die typischen optischen Eigenschaften der Monomere verschwinden und die der Dimere hervortreten. Die Sondenstränge besitzen eine Länge von neun bzw. elf Basenpaaren. Solange alle Basen korrekt gepaart sind, bildet sich ein stabiler Doppelstrang aus. Durch eine Fehlpaarung in der Mitte der Sequenz würde der Doppelstrang aufgrund seiner Kürze dissoziieren. Die unterbrochene Chromophorwechselwirkung wäre sowohl in der Absorption, als auch in der Emission detektierbar.

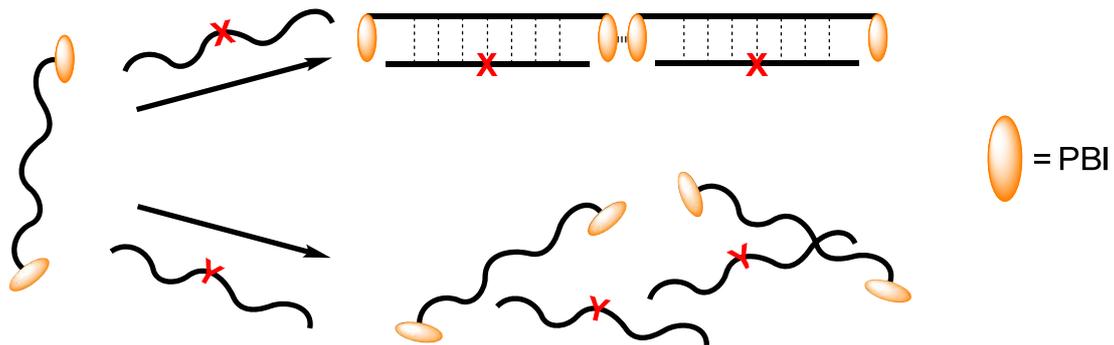
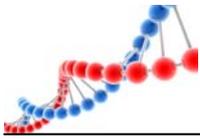


Abb. 56: Funktionsprinzip der neuen Aggregationssonde.

Beide Sondenstränge wurden mit jeweils fünf verschiedenen Gegensträngen untersucht. Neben dem passenden Gegenstrang wiesen drei jeweils eine Einzelbasenvariation in der Sequenzmitte auf, während der fünfte mit zwei falschen Basen ausgestattet war.

- DNA26: 3'-P-ATA-AGA-ATA-P-5'
- DNA27: 5'-TAT-TCT-TAT-3'
- DNA28: 5'-TAT-TGT-TAT-3'
- DNA29: 5'-TAT-TTT-TAT-3'
- DNA30: 5'-TAT-TAT-TAT-3'
- DNA31: 5'-TAT-TGG-TAT-3'
-
- DNA32: 3'-P-ATA-AGC-CGA-ATA-P-5'
- DNA33: 5'-TAT-TCG-GCT-TAT-3'
- DNA34: 5'-TAT-TCT-GCT-TAT-3'
- DNA35: 5'-TAT-TCC-GCT-TAT-3'
- DNA36: 5'-TAT-TCA-GCT-TAT-3'
- DNA37: 5'-TAT-TCA-ACT-TAT-3'

Die beiden Sondenstränge DNA26 und DNA32 sind im Verhältnis zu anderen in dieser Dissertation verwendeten Oligonukleotiden sehr kurz. Es wurde zuerst das Schmelzverhalten aller Doppelstränge untersucht, um die experimentellen Bedingungen gegebenenfalls anpassen zu können.

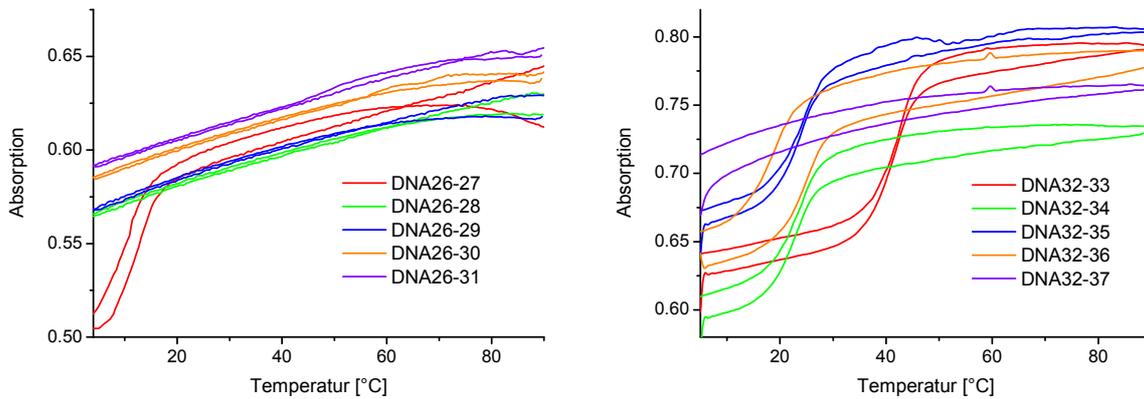
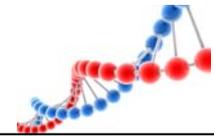
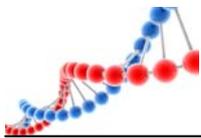


Abb. 57: Schmelztemperaturkurven von DNA26 (links) und DNA32 (rechts) mit entsprechenden Gegensträngen.

Bei der Betrachtung der Schmelztemperaturkurven von DNA26 fällt sofort positiv auf, dass nur der richtig gepaarte Doppelstrang einen ausgeprägten hyperchromen Effekt besitzt. Das bedeutet wiederum, dass bei allen Fehlpaarungen keine Doppelhelix vorliegt. Da dieser Schmelzpunkt jedoch mit 12.3 °C deutlich unterhalb der standardisierten Versuchsbedingung liegt, wurde für die Untersuchung von DNA26 die Umgebungstemperatur auf 7.0 °C gesenkt. Bei DNA32 sehen die Schmelztemperaturkurven weniger drastisch aus. Hier besitzt lediglich die doppelte Mutante keinen definierten Schmelzpunkt, die einfachen Fehlpaarungen weichen mit ca. 23 °C deutlich vom Wildtyp (42.3 °C) ab. Hier ist eine Versuchstemperatur von 20 °C geradezu ideal, weil nur der richtig gepaarte Doppelstrang stabil vorliegen sollte.

Tabelle 2: Schmelztemperaturen von DNA26 und DNA32 mit Gegensträngen.

DNA	T _m [°C]	DNA	T _m [°C]
DNA26-27	12.3	DNA32-33	42.3
DNA26-28	--	DNA32-34	23.1
DNA26-29	--	DNA32-35	24.0
DNA26-30	--	DNA32-36	22.4
DNA26-31	--	DNA32-37	--



Die UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA26 zeigen alle einen Kurvenverlauf, der für ein dimerisiertes Perylenbisimid typisch ist. Der $\nu_0 \rightarrow \nu_1$ Übergang bei 503 nm stellt das Hauptmaximum, wogegen der $\nu_0 \rightarrow \nu_0$ Übergang bei 545nm als Nebenmaximum auftritt. Dieses Bild wäre ausschließlich für DNA26-27 zu erwarten gewesen, da nach den Schmelzpunktmessungen nur dieser als Doppelstrang vorliegt. Für alle anderen „Doppelstränge“ sollte ausschließlich die Monomerabsorption nachweisbar sein. Bei DNA32 stimmen die UV/Vis-Absorptionsspektren in ihrem Aussehen mit denen von DNA26 überein. Auch hier besitzen alle Kurven die für PBI Dimere charakteristische Gestalt. Dies wird zusätzlich durch die Verhältnisse dieser beiden Maxima $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ veranschaulicht.

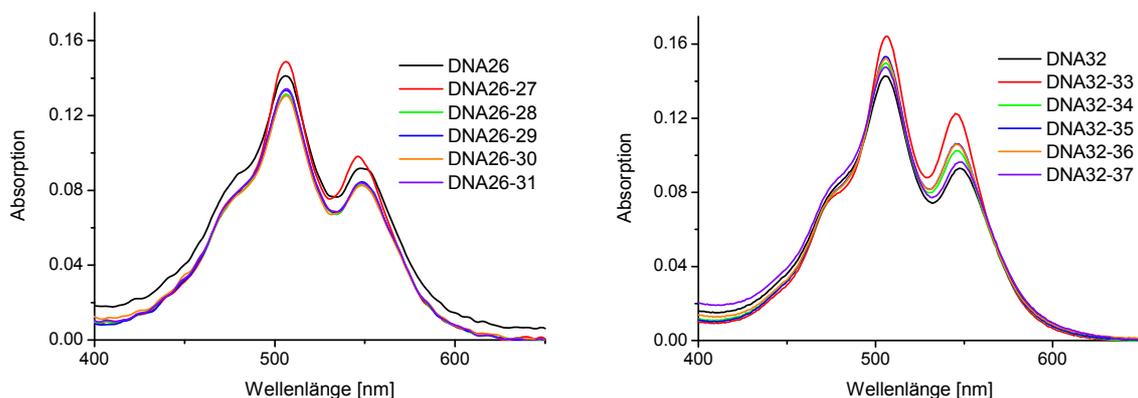


Abb. 58: UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA26 bei T = 7 °C (links) und DNA32 bei T = 20 °C (rechts) mit entsprechenden Gegensträngen.

Da auch die beiden Einzelstränge dieses Absorptionsverhalten zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass der Doppelstrang in diesem System keine Voraussetzung für die Ausbildung von stabilen Aggregaten ist. Eine mögliche Erklärung für dieses ungewohnte Verhalten könnte in der kurzen Sequenz der DNA-Stränge liegen. Perylenbisimid schirmt sich in einem wässrigen Medium von der polaren Umgebung wahrscheinlich durch „Einwickeln“ in den DNA-Strang ab. Durch Ausbildung eines starren Doppelstranges wird diese Art der Abschirmung verhindert. Einzige noch verbleibende Alternative ist die Wechselwirkung mit anderen Chromophoren. DNA26 bzw. DNA32 sind sehr kurz und besitzen zwei terminale PBI-Einheiten wodurch die Farbstoffe auch im Einzelstrang gezwungen werden, miteinander zu wechselwirken.

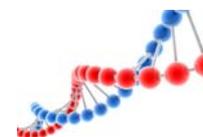


Tabelle 3: Verhältnisse der UV/Vis-Absorption $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ von DNA26 und DNA32 mit Gegensträngen.

DNA	$A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$	DNA	$A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$
DNA26	1.54	DNA32	1.54
DNA26-27	1.52	DNA32-33	1.34
DNA26-28	1.58	DNA32-34	1.46
DNA26-29	1.58	DNA32-35	1.44
DNA26-30	1.58	DNA32-36	1.44
DNA26-31	1.60	DNA32-37	1.53

Die Betrachtung der Emissionsspektren bekräftigt die Ergebnisse der UV/Vis-Messungen. Alle Fluoreszenzen werden durch ein sehr breites, rotverschobenes Maximum bei 680 nm dominiert. Grund für diese starke bathochrome Verschiebung ist die ausgeprägte Exciton Kopplung zwischen den beiden Chromophoren, wodurch die Emission nicht mehr aus dem angeregten Energieniveau des PBI stammt, sondern aus dem energetisch niedrigeren Zustand der Excitonaufspaltung (vgl. Kapitel 2.3). Durch eine zusätzliche Änderung der Molekülgeometrie des PBI-Dimers im angeregten Zustand geht die zuvor deutliche Feinstruktur der Fluoreszenz in ein breites, unstrukturiertes Signal über.^[251] Bei DNA26 hebt sich der richtig gepaarte Strang in seiner Fluoreszenzintensität um das 2.2fache von den restlichen Strängen ab.

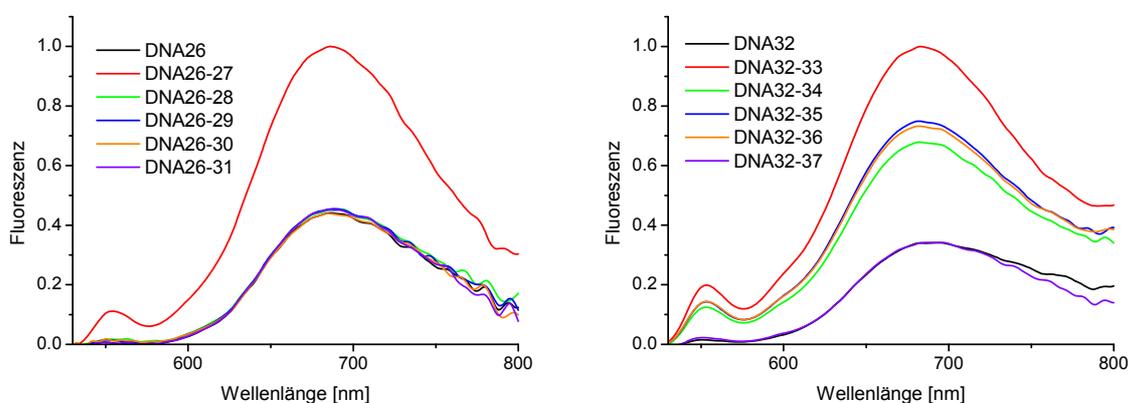
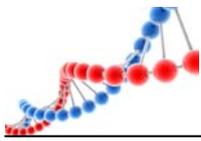


Abb. 59: Emissionsspektren von DNA26 bei T = 7 °C (links) und DNA32 bei T = 20 °C (rechts) mit entsprechenden Gegensträngen.



Dass bei DNA26 alle Fehlpaarungen als Einzelstränge vorliegen, wird durch die Schmelztemperaturuntersuchungen und durch nähere Betrachtung von DNA32 bestätigt. Auch hier besitzt DNA32-33 als perfekter Duplex die höchste Intensität, etwa dreifach größer, als bei DNA32 und DNA32-37. Die Abweichung zu den Doppelsträngen mit Fehlpaarungen fällt jedoch geringer aus. Das Verhältnis der Emissionsmaxima $F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$ zeigt, dass sowohl bei DNA26 als auch bei DNA32 ausschließlich aggregierte Chromophore vorliegen.

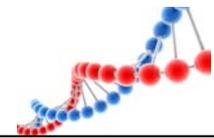
Es lässt sich somit zusammenfassend feststellen, dass eine effektive SNP-Detektion, durch Chromophoraggregation nicht durchführbar ist.

Tabelle 4: Verhältnisse Emission $F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$ von DNA26 und DNA32 mit Gegensträngen.

DNA	$F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$	DNA	$F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$
DNA26	0.02	DNA32	0.04
DNA26-27	0.11	DNA32-33	0.20
DNA26-28	0.04	DNA32-34	0.18
DNA26-29	0.03	DNA32-35	0.19
DNA26-30	0.04	DNA32-36	0.20
DNA26-31	0.01	DNA32-37	0.07

3.5. Synthese perylenbisimidmodifizierter Molecular Beacons

Die Verwendung von Molecular Beacons gehört mittlerweile zu den Standardverfahren der Gen- und m-RNA-Detektion. Zusätzlich werden sie benutzt, um zum Beispiel Basenfehlpaarungen in der Echtzeit-PCR durch Emissionslöschung oder Emissionsänderung anzuzeigen. Der Molecular Beacon bietet den Vorteil, die zu untersuchende Sequenz räumlich von der optischen Readout-Information zu trennen. Diese Tatsache ist für die Verwendung von Perylenbisimid von entscheidender Bedeutung. In zahlreichen Publikationen wurden die optische Unterscheidungsmöglichkeit von monomeren und dimerisierten PBI-Einheiten in Oligonukleotiden sehr ausführlich beschrieben.^[169, 173, 212, 217, 221-224] Aufgrund der niedrigen Quantenausbeute ist eine Ausnutzung der optischen Eigenschaften und somit eine breite Anwendbarkeit des Farbstoffes in der Bio-Analytik jedoch nur in



Ausnahmefällen möglich. Durch Einbau des Chromophors als diagonales Basenpaar in die Stammregion eines Molecular Beacons, die den Farbstoff von Elektronentransferprozessen abschirmt, sollten die charakteristischen optischen Eigenschaften von PBI zum Nachweis von DNA-Sequenzen verwendbar werden.

Um diese Idee zu überprüfen, wurde die Sequenz des Molecular Beacon DNA38 synthetisiert.

DNA38: 3'-APC-TAA-TCT-TAT-AGT-AGA-AAC-CAC-AAA-GTA-ATT-APC-T-5'

Der Stamm von DNA38 enthält den Farbstoff zweimal und weist eine Länge von sechs Basenpaaren auf. Er liegt somit im Mittelfeld der allgemein üblichen Stammlänge, die zwischen fünf und sieben Basenpaaren variiert. Die Schleifenregion entspricht in ihrer Dimension mit 23 Basen ebenfalls den bekannten Standards.^[126] Die Längen der einzelnen Teilbereiche müssen gut aufeinander abgestimmt sein, da ein falsches Verhältnis (zu kurze Schleife, zu lange Stammregion) eine Öffnung des Beacons verhindert. Durch Zugabe eines passenden Gegenstrangs wird die Stammregion geöffnet, wodurch die Chromophore getrennt werden. Die excitonische Kopplung wird somit unterbrochen, was optisch detektiert werden kann.

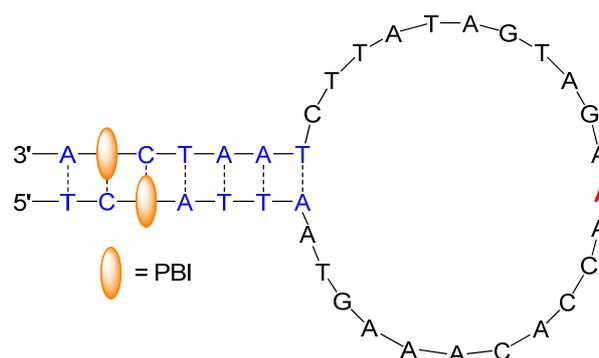
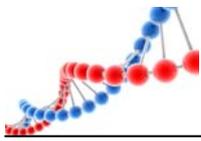


Abb. 60: Geschlossener Beacon aus DNA38.

Als Erstes wurde der Übergang von der geschlossenen Haarnadel des Molecular Beacons in den Vollduplex untersucht. Hierzu wurde DNA38 mit 1.2 eq. des zur Schleifenregion komplementären Gegenstrangs hybridisiert.



DNA38: 3'-APC-TAA-TCT-TAT-AGT-AGA-AAC-CAC-AAA-GTA-ATT-APC-T-5'
DNA39: 5'-GA-ATA-TCA-TCT-T TG-GTG-TTT-CAT-3'

Die UV/Vis-Absorption (Abb. 61) für DNA38 zeigt den charakteristischen Verlauf eines Perylenbisimiddimers und für den Doppelstrang DNA38-39 den des Monomers. Dies bedeutet, dass in der hybridisierten Form die beiden Chromophore räumlich voneinander getrennt sind und keine Exciton-Wechselwirkungen mehr ausbilden können. Das Emissionsspektrum bestätigt dieses Ergebnis. Dieser Vorversuch zeigt zwei Dinge: Erstens, das Verhältnis der Länge von Stamm- und Schleifenregion ermöglicht eine problemlose Öffnung des Molecular Beacons und zweitens, die beiden Spezies (offen und geschlossen) lassen sich spektroskopisch gut voneinander unterscheiden.

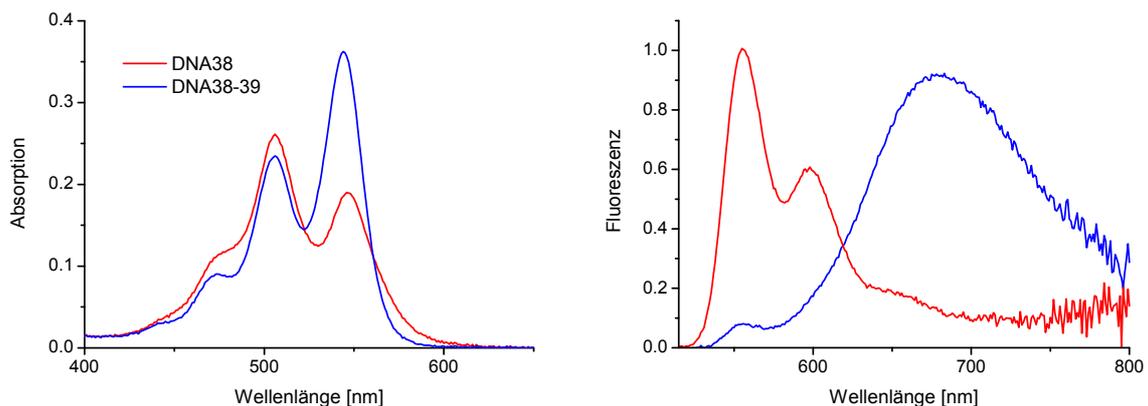


Abb. 61: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von DNA38 und DNA38-39.

Dass die Veränderung im Absorptions- und Emissionsverhalten mit einer Öffnung des Stammes und nicht mit anderen Effekten zusammenhängt, wurde mittels temperaturabhängiger Messungen unterstützt.

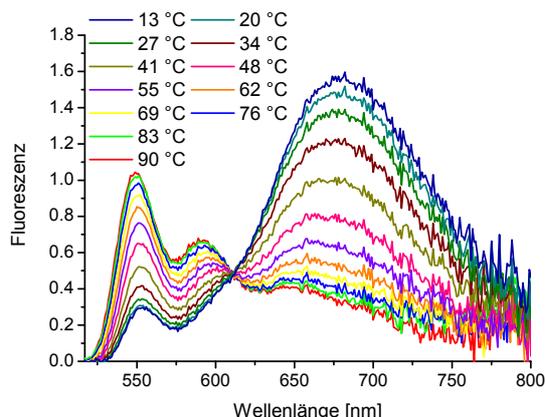
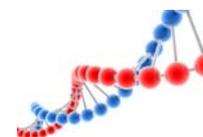


Abb. 62: Temperaturabhängiges Emissionsspektrum von DNA38.

Für die genauere Untersuchung wurde DNA38 langsam mit DNA39 titriert. Die UV/Vis-Absorption (Abb. 63) zeigt, wie durch schrittweise Zugabe an Gegenstrang die excitonischen Wechselwirkungen zwischen den PBI-Einheiten in DNA38 unterbrochen werden; die Banden des Dimers gehen langsam in die des Monomers über.

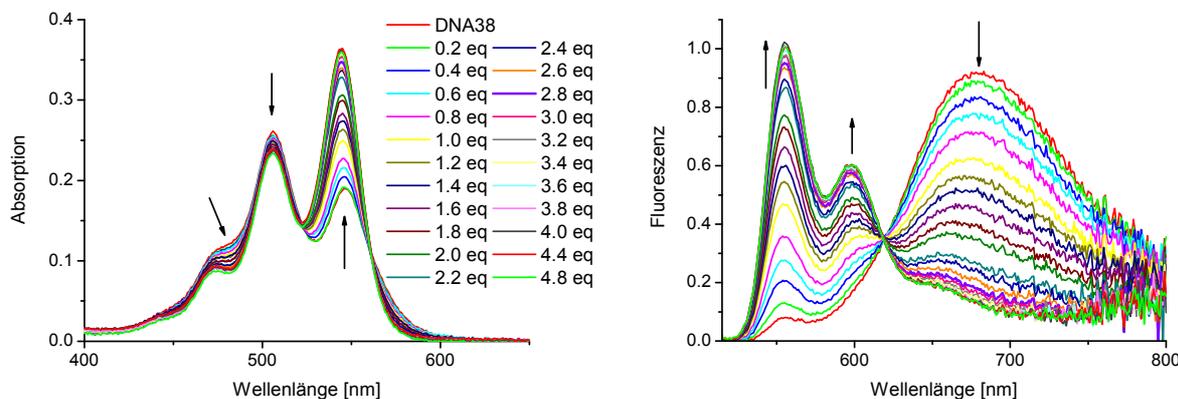
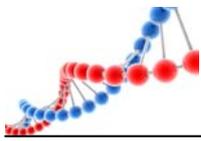


Abb. 63: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der einzelnen Titrationsschritte von DNA38 mit DNA39; die Pfeile zeigen die jeweilige Veränderung mit steigender Gegenstrangkonzentration (siehe Legende).

Im Emissionsspektrum von DNA38 ist dieser schrittweise Übergang ebenfalls zu beobachten. Hervorzuheben ist der deutliche isoemissive Punkt bei 619 nm. Dieser belegt die Anwesenheit von nur zwei strukturell unterschiedlichen fluoreszenten



Spezies während der gesamten Titration; der geschlossenen und der geöffneten Haarnadelschleife.^[93, 170, 172]

DNA38 kann als analytische Sonde verwendet werden, um die Anwesenheit eines vollständig komplementären Gegenstrangs (DNA39) zu detektieren. Interessant wäre jedoch zusätzlich, ob DNA38 auch in der Lage ist, Gegenstränge mit Basenfehlpaarung zu unterscheiden. Für diese Untersuchung wurden DNA40 und DNA41 synthetisiert, die einfache oder doppelte Punktmutationen in der Mitte enthalten. Da die Position der Fehlpaarung genau in der Mitte der Schleifenregion liegt, wird gewährleistet, dass zwei gleichkurze Teilbereiche entstehen. Hierdurch soll der Energieunterschied, der zur Öffnung des Stammes führt, minimiert werden.

DNA38: 3'-APC-TAA-TCT-TAT-AGT-AGA-AAC-CAC-AAA-GTA-ATT-APC-T-5'
 DNA40: 5'-GA-ATA-TCA-TCT-GTG-GTG-TTT- CAT-3'
 DNA41 5'-GA-ATA-TCA-TCG-GTG-GTG-TTT-CAT-3'

Die drei Titrationsexperimente lassen sich am besten durch die Betrachtung der Verhältnisse der Absorptions- oder Emissionsmaxima miteinander vergleichen. Da beide Verhältnisse immer die gleiche Aussage treffen, wird in allen folgenden Experimenten nur das Emissionsverhältnis $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ besprochen.

Abb. 64 gibt die graphische Auftragung der Emissionsverhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA38 gegen die Menge an zugegebenen Gegenstrangäquivalenten wider. Betrachtet man die einzelnen Kurvenverläufe, so gibt es kaum Unterschiede. Die Öffnung der Haarnadelschleife wird durch Basenfehlpaarungen wenig beeinflusst. Bei Zugabe von ca. 1.5 Äquivalenten Gegenstrang ist der Molecular Beacon vollständig geöffnet. Ein Überschuss von lediglich 0.5 Äquivalenten ist daher notwendig, um die Chromophore gänzlich zu trennen. Im Vergleich zu anderen Molecular Beacon Systemen ist dies ein sehr geringer Wert.^[237] Mit DNA38 ist es also möglich, sehr sensitiv Oligonukleotide auch mit Fehlpaarungen nachzuweisen.

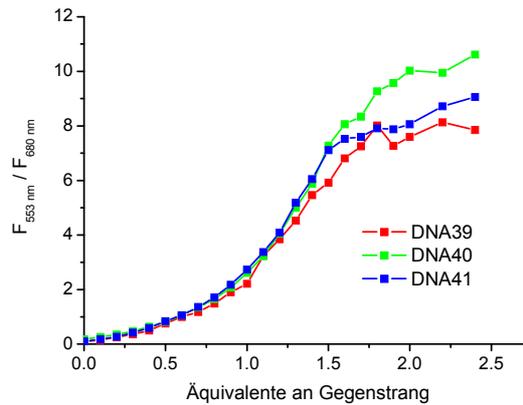
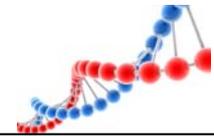


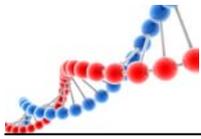
Abb. 64: Auftragung der Emissionsverhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA38 gegen die Menge an zugegebenem Gegenstrang.

Dieses Verhalten ist bei näherer Betrachtung der Schmelztemperaturen von DNA38 und den entsprechenden Doppelsträngen nicht verwunderlich. Die Öffnung wird durch den Temperatur- und somit Stabilitätsunterschied zwischen geschlossener Haarnadel und vollständig hybridisiertem System angetrieben. Da dieser mit ca. 15 °C nicht gering ist, werden nur wenige Äquivalente an Gegenstrang zur vollständigen Öffnung benötigt. Der Unterschied der Schmelztemperaturen zwischen den einzelnen Doppelsträngen beträgt nur wenige Grad. Daher weisen alle Doppelhelices annähernd die gleiche Stabilität auf, wodurch das Diskriminierungspotential des Molecular Beacons sehr niedrig ist.

Tabelle 5: Schmelztemperaturen von DNA38, DNA38-39, DNA38-40 und DNA38-41.

DNA	T_m [°C]
DNA38	46.2
DNA38-39	64.5
DNA38-40	59.3
DNA38-41	58.8

Es hat sich gezeigt, dass die Stammregion von DNA38 in geschlossener Form die Perylenbisimide so in räumliche Nähe zueinander bringt, dass sich starke excitonische Wechselwirkungen ausbilden können. Ebenso werden die Chromophore durch Öffnen der Haarnadelschleife effizient voneinander getrennt,



wodurch eine eindeutige optische Unterscheidung der beiden möglichen Spezies möglich ist. Eine effektive Diskriminierung von DNA-Mutanten war jedoch nicht möglich. Um diese, für die SNP-Detektion essentielle Eigenschaft zu erzielen, wurde die erprobte Stammregion mit einer in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* bekannten und basendiskriminierenden Schleifenregion kombiniert.^[237] Die Schleifenregion verkürzte sich daher von 23 Basen auf nur noch 15 Basen. Hierdurch sollte eine Fehlpaarung bewirken, dass sich die Haarnadelschleife nicht mehr öffnet.

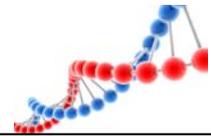
Als erstes wurde untersucht, ob die neue Beaconsequenz DNA42 durch Hybridisierung mit dem zur Schleifenregion komplementären Gegenstrang DNA43 geöffnet wird. Hierzu ergab das gemessene UV/Vis-Absorption keine eindeutige Aussage. Bei darauffolgenden Schmelztemperaturexperimenten zeigte sich, dass der Schmelzpunkt der Stammregion mit 63.3 °C deutlich höher liegt als der der hybridisierten Schleife (58.9 °C). Somit ist nicht einmal der perfekte Gegenstrang in der Lage, die Haarnadel komplett zu öffnen.

DNA42: 3'-APC-TAA-TGT-ACG-TCA-GTT-GAC-TAT-TAP-CT-5'
DNA43: 5'-CA-TGC-AGT-CAA-CTG-A-3'

Dies ist erstaunlich, da Oligonukleotide, die eine glykolartigen Modifikation enthalten, normalerweise stark destabilisiert werden.^[239, 252] Hierdurch wird die stabilisierende Wirkung des diagonalen PBI-Basenpaares aufgrund der stark ausgeprägten excitonischen Wechselwirkungen besonders deutlich.

Um diesen Effekt auszugleichen, wurden neue, längere Gegenstränge synthetisiert. DNA44 bis DNA47 weisen eine Basensequenz auf, die im Duplex in die Stammregion bis zum künstlichen PBI-Basenpaar reicht. DNA44 ist der vollständig komplementäre Gegenstrang, DNA45, DNA46 und DNA47 besitzen jeweils eine unterschiedliche Base in der Mitte, wodurch es zu einer Basenfehlpaarung im entstehenden Duplex kommt.

DNA42: 3'-APC-TAA-TGT-ACG-TCA-GTT-GAC-TAT-TAP-CT-5'
DNA44: 5'-ATT-ACA-TGC-AGT-CAA-CTG-ATA-AT-3'



DNA45: 5'-ATT-ACA-TGC-AG**A**-CAA-CTG-ATA-AT-3'
 DNA46: 5'-ATT-ACA-TGC-AG**C**-CAA-CTG-ATA-AT-3'
 DNA47: 5'-ATT-ACA-TGC-AG**G**-CAA-CTG-ATA-AT-3'

Sowohl die UV/Vis-Absorptions- als auch das Emissionsspektren (Abb. 65) von DNA42 und DNA42-44 zeigen deutlich die Öffnung der Stammregion. Die beiden Spezies können eindeutig voneinander unterschieden werden.

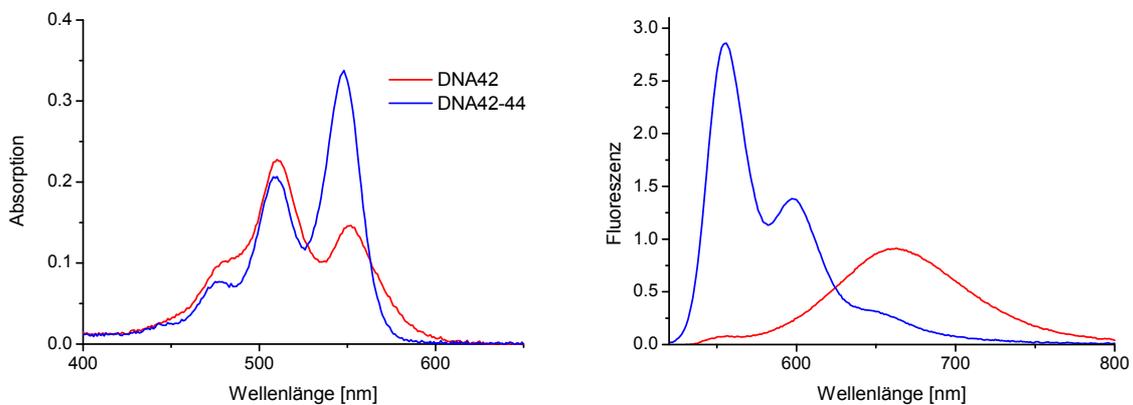


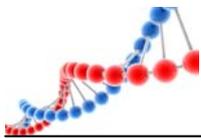
Abb. 65: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von DNA42 und DNA42-44.

Beim Vergleich der Schmelztemperaturen wird klar, dass sich die Haarnadel DNA42 mit DNA44 somit leicht öffnen sollte. Leider trifft das zum Teil auch auf DNA47 zu.

Tabelle 6: Schmelztemperaturen von DNA42, DNA42-44, DNA42-45, DNA42-46 und DNA42-47.

DNA	T_m [°C]
DNA42	63.3
DNA42-44	69.3
DNA42-45	63.8
DNA42-46	63.8
DNA42-47	67.5

Die Hybridisierungsrate eines Molecular Beacons hängt stark von der Länge der Stammregion und der Schleifenregion ab. Bei DNA42 ist im Vergleich zu DNA38 die



Hybridisierungsschleife deutlich verkürzt (23 vs. 15 Basen). Dies sollte einerseits die Selektivität des Beacons erhöhen, andererseits senkt es den Energieunterschied zwischen offener und geschlossener Haarnadel drastisch. Allerdings verlängert sich dadurch auch die Zeit, den ein Beacon nach Zugabe des Gegenstrangs braucht, um das strukturelle Gleichgewicht zu erreichen. Um ein Minimum an benötigten Gegenstrangäquivalenten zu erzielen, sollte sich das Gleichgewicht vor erneuter Zugabe eingestellt haben. Eine kinetische Betrachtung des Systems ist somit wichtig.

Zu DNA42 wurden 0.5 Äquivalente von DNA44 zupipettiert und die Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit betrachtet. Durch Auftragung des Emissionsverhältnisses $F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$ lässt sich die praktikable Zeit der Öffnung der Haarnadelschleife abschätzen. Entsprechend dieses Experiments wird in den folgenden Titrationsexperimenten vor erneuter Zugabe des Gegenstrangs eine Wartezeit von 35 Minuten berücksichtigt.

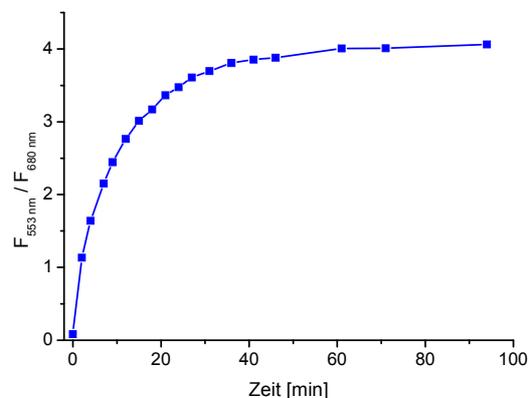


Abb. 66: Auftragung des zeitabhängigen Emissionsverhältnisses $F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$ von DNA42 nach Zugabe von 0.5 eq. DNA44.

Um die Selektivität und Sensitivität von DNA42 zu untersuchen, wurde in vier unterschiedlichen Experimenten DNA44 als komplementärer Gegenstrang und DNA45, DNA46 und DNA47 als Gegenstränge mit falschen Basen zur Haarnadelsequenz DNA42 titriert.

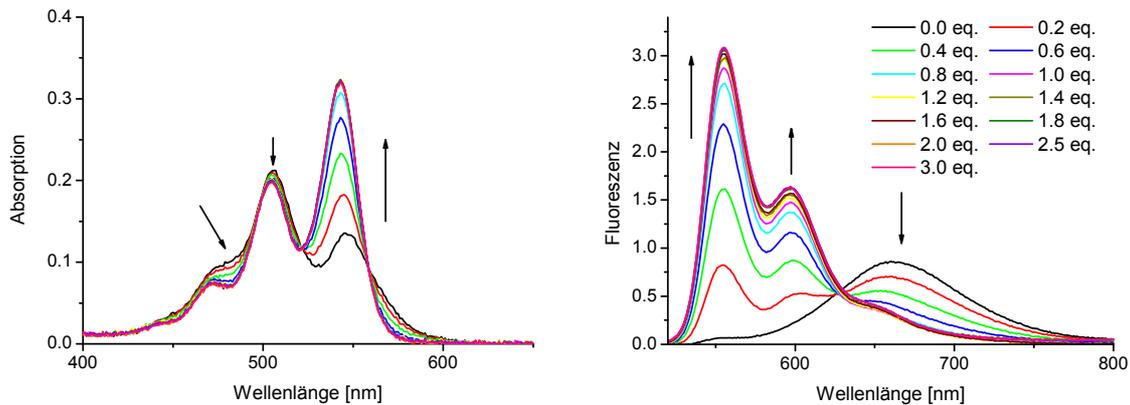
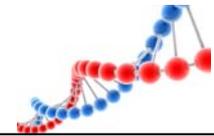


Abb. 67: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der einzelnen Titrationschritte von DNA42 mit DNA44; die Pfeile zeigen die jeweilige Veränderung mit steigender Gegenstrangkonzentration (siehe Legende).

Wie bereits bei DNA38 lässt sich die Einschätzung der Sensitivität und Selektivität durch die Auftragung der Emissionsverhältnisse $F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$ von DNA42 gegen die Menge an zugegebenem Gegenstrang gut nachvollziehen. Bei genauer Betrachtung ändern sich die Intensitäten der Absorptions- und Emissionsbanden ab einer zugegebenen Menge von etwa 1.0 bis 1.2 Äquivalenten an Gegenstrang nicht mehr signifikant. Somit ist auch bei diesem Molecular Beacon nur ein geringer Überschuss an Gegenstrang notwendig, um die Haarnadelschleifen vollständig zu öffnen.

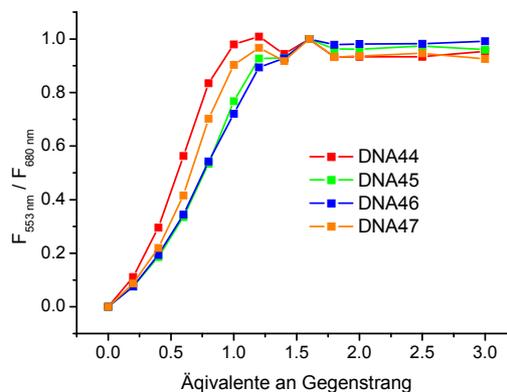
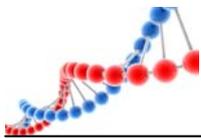


Abb. 68: Auftragung der Emissionsverhältnisse $F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$ von DNA42 gegen die Menge an zugegebenem Gegenstrang.



Das Verhältnis der Emissionsintensitäten bei 553 nm und 680 nm steigt im richtig gepaarten Duplex etwas schneller an als in den fehlgepaarten Doppelsträngen. Der Unterschied zwischen den vier Kurven ist allerdings zu gering (vgl. Tabelle 7), um von einem wirklich basendiskriminierenden Molecular Beacon zu sprechen.

Tabelle 7: Diskriminierung zwischen richtig und fehlgepaarten Duplex von DNA42 bei 1.0 eq. an Gegenstrang.

DNA	Diskriminierung
DNA42-45	1 : 1.28
DNA42-46	1 : 1.36
DNA42-47	1 : 1.08

Die ersten Untersuchungen von DNA42 haben gezeigt, dass die verwendete Schleifenregion im Gegensatz zu DNA38 besser geeignet ist Basenfehlpaarungen nachzuweisen. Der nächste logische Schritt ist nun, die Stammsequenz in ihrer Länge zu verändern, um den Effekt zu verstärken. Hierzu wurde die Stammlänge von sieben auf 13 Basenpaare drastisch verlängert. Dieser Sprung wurde bewusst so groß gewählt, um eine deutliche Änderung zu bewirken.

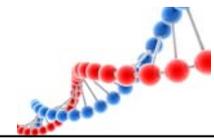
Für die nun verlängerte Beacon Sequenz DNA48 wurden zunächst die Schmelztemperaturen mit drei verschiedenen langen, komplementären Gegensträngen bestimmt. DNA49 deckt hierbei die gesamte Schleifenregion ab und reicht außerdem um noch ein Basenpaar in die Stammregion hinein. DNA50 wurde in 5'-Richtung um vier und in 3'-Richtung um drei weitere Basen verlängert. DNA51 weist im Vergleich zu DNA50 an beiden terminalen Enden noch ein zusätzliches Basenpaar auf.

DNA48: 3'-APC-TAA-TTT-GAC-CGT-ACG-TCAGTT-GAC-TGG-TCA-AAT-TAP-CT-5'

DNA49: 5'-GCA-TGC-AGT-CAA-CTG-AC-3'

DNA50: 5'-A-CTG-GCA-TGC-AGT-CAA-CTG-ACC-AG-3'

DNA51: 5'-AA-CTG-GCA-TGC-AGT-CAA-CTG-ACC-AGT-3'



Wie erwartet zeigen die Schmelztemperaturen (siehe Tabelle 8) eine deutliche Steigerung der Stammstabilität. Erstaunlich ist, dass der Stamm mit 13 Basenpaaren deutlich stabiler als die viel längeren Doppelstränge DNA48-49 (17 Basenpaare), DNA48-50 (24 Basenpaare) und DNA48-51 (26 Basenpaare) ist. Auch hier kommen die starken excitonischen Wechselwirkungen der Chromophore deutlich zum Tragen.

Tabelle 8: Schmelztemperaturen von DNA48, DNA48-49, DNA48-50 und DNA48-51.

DNA	T_m [°C]
DNA48	84.3
DNA48-49	52.0
DNA48-50	78.4
DNA48-51	77.4

Zur Bestimmung der Öffnungskinetik von DNA48 wurde DNA50 gewählt, da dieser Gegenstrang entsprechend der Schmelztemperaturen die stabilste Doppelhelix ausbildet. Die Messung von DNA48 mit 0.5 Äquivalenten DNA50 zeigt, dass auch nach 160 min noch kein Gleichgewicht vorliegt. Eine Verlängerung der Kurve lässt vermuten, dass dieses sich erst nach über 3 Stunden einstellen würde.

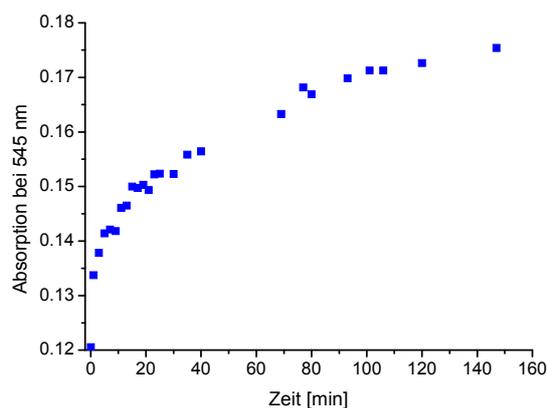
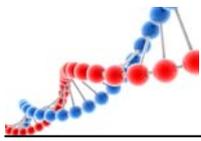


Abb. 69: Auftragung der zeitabhängigen Absorptionsintensität bei 545 nm von DNA48 nach Zugabe von 0.5 eq. DNA50.



Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine weitere Untersuchung von DNA48 unterlassen, da diese sehr langsame Hybridisierungsrate für eine praktische Anwendung vollkommen indiskutabel ist.

Da sich eine Verlängerung der Stammsequenz als ungünstig erwiesen hat, wurde die Evaluation der Stammsequenz in die Gegenrichtung vorgenommen.

DNA52 besitzt mit 5 Basenpaaren und DNA57 mit 4 Basenpaaren eine deutlich verkürzte Stammregion.

DNA52: 3'-APC-AAG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTT-TPC-T-5'

DNA53: 5'-TTC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAA-A-3'

DNA54: 5'-TTC-ATG-CAG-ACA-ACT-GAA-A-3'

DNA55: 5'-TTC-ATG-CAG-CCA-ACT-GAA-A-3'

DNA56: 5'-TTC-ATG-CAG-GCA-ACT-GAA-A-3'

DNA57: 3'-APC-ACG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTT-TPC-T-5'

DNA58: 5'-GC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAA-3'

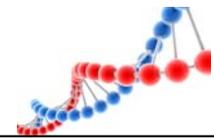
DNA59: 5'-GC-ATG-CAG-ACA-ACT-GAA-3'

DNA60: 5'-GC-ATG-CAG-CCA-ACT-GAA-3'

DNA61: 5'-GC-ATG-CAG-GCA-ACT-GAA-3'

Die Gegenstränge von DNA52 und DNA57 decken die gesamte Schleifenregion ab und reichen bei DNA52 in der Stammregion bis zum künstlichen Basenpaar. Bei DNA57 wurde aufgrund des nun sehr verkürzten Stammes auf diese Verlängerung verzichtet. Alle Gegenstränge weisen zur Überprüfung der Selektivität der Haarnadelschleife ein alternierendes Basenpaar in der Sequenzmitte auf.

Auch für DNA52 und DNA57 konnte eine Öffnung der Haarnadel durch Hybridisierung mit den komplementären Gegensträngen in den UV/Vis-Absorptions- und Emissionsspektren nachgewiesen werden. DNA57 besitzt jedoch im geschlossenen Zustand eine geringere Emissionsintensität bei 680 nm als DNA52. Da die UV/Vis-Absorptionskurven beider Oligonukleotide im geschlossenen Zustand nicht voneinander abweichen und deutliche excitonische Kopplungen zeigen, dürfte



dieser Effekt nicht auf weniger ausgeprägte Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Beide Sequenzen weichen einzig in der Länge der Stammregion voneinander ab, weswegen darin der Grund für dieses Phänomen liegen muss.

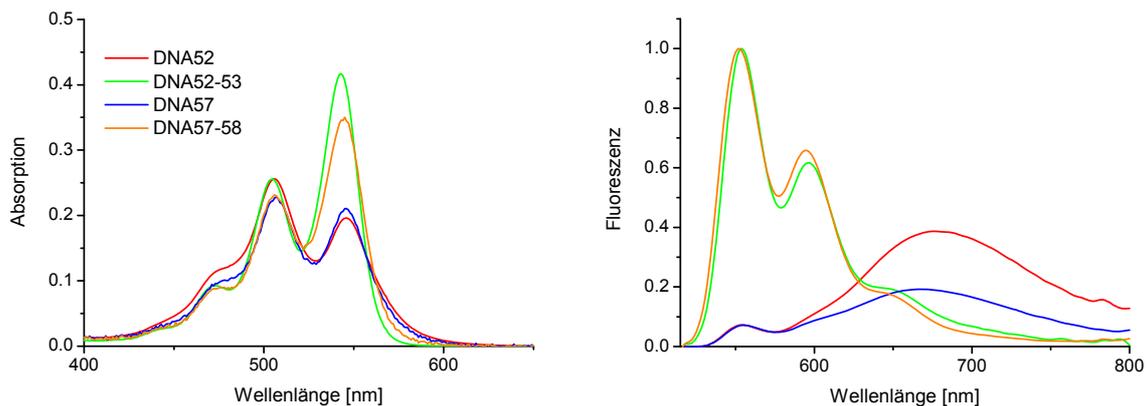
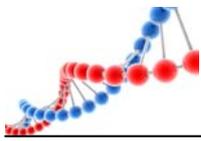


Abb. 70: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von DNA52, DNA52-53, DNA57 und DNA57-58.

Ein Vergleich der Schmelztemperaturen zeigt, dass mit geringerer Stammlänge auch die Stabilität abnimmt. Trotzdem liegt bedingt durch die starken PBI-Wechselwirkungen, die Schmelztemperatur von DNA57 (nur 4 Basenpaare!) noch bei 58.5 °C. Erwartungsgemäß ist der perfekt gepaarte Duplex DNA52-53 bzw. DNA57-58 auch hier thermisch am stabilsten. Die fehlgepaarten Doppelstränge zeigen dagegen eine Schmelztemperatur, die sich im Bereich der geschlossenen Haarnadelschleife bewegt.

Tabelle 9: Schmelztemperaturen von DNA52, DNA52 mit Gegensträngen, DNA57 und DNA57 mit Gegensträngen.

DNA	T_m [°C]	DNA	T_m [°C]
DNA52	62.1	DNA57	58.5
DNA52-53	67.4	DNA57-58	64.8
DNA52-54	60.4	DNA57-59	57.4
DNA52-55	60.6	DNA57-60	57.0
DNA52-56	64.5	DNA57-61	62.7



Die Verkürzung der Stammlänge wirkt sich nicht nur auf die thermische Stabilität, sondern auch auf die Hybridisierungsrate des Molecular Beacons aus. Während sich bei DNA42 nach Zugabe von 0.5 Äquivalenten an komplementären Gegenstrang erst nach ca. 35 min und bei DNA48 nach ca. 3 h erst ein Gleichgewicht einstellt, geschieht dies bei DNA52 bereits nach 5 min und bei DNA57 nach nur 2.5 min. Eine einzuhaltende Wartezeit während den Titrationsexperimenten, wie bei DNA42 berichtet ist nicht notwendig. Durch diese schnell Hybridisierungskinetik wäre ein Einsatz von DNA52 und DNA57 als Echtzeitsonde in der Zellanalytik denkbar. Hierdurch wäre es zum Beispiel möglich, die RNA Expression und den Oligonukleotidtransport in lebenden Zellen detektierbar zu machen.^[136, 139, 253]

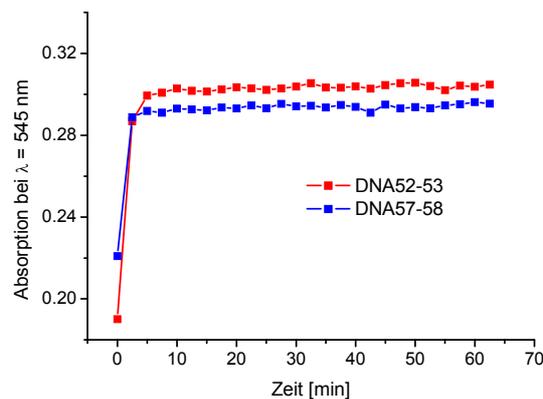
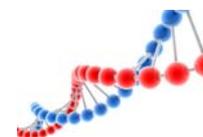


Abb. 71: Auftragung der zeitabhängigen Absorptionsintensität bei 545 nm von DNA52 und DNA57 nach Zugabe von 0.5 eq. des komplementären Gegenstrangs.

Auch bei diesen beiden Sonden wurden, um die individuelle Selektivität und Sensitivität zu zeigen, Titrationsexperimente mit den jeweiligen Gegensträngen durchgeführt.

Der direkte Vergleich der Emissionsraten von 553 nm und 680 nm für DNA52 zeigt, dass sich die verkürzte Haarnadel ab ca. 1.4 Äquivalenten Gegenstrang komplett geöffnet hat. Dies ist eine unerwartet hohe Konzentration, da für DNA42, das eine um 2 Basenpaare längere Stammsequenz besitzt, nur 1.2 Äquivalente notwendig waren. Zusätzlich hat die Selektivität der Beaconsequenz deutlich abgenommen. Die Gegenbasen A, C und T besitzen nahezu das gleiche Hybridisierungsverhalten, lediglich Guanin wird geringfügig diskriminiert. Bei DNA57 sinkt die Selektivität noch



weiter ab. Eine wirkliche Unterscheidung der vier möglichen Gegenbasen ist hier nicht möglich. Zusätzlich hat sich die Kurvenform von einem sigmoidalen Verlauf zu einem linearen geändert. Einzig die Sensitivität konnte in DNA57 im Vergleich zu DNA52 gesteigert werden. Eine vollständige Öffnung des Beacons wird mit 1.0 bis 1.2 Äquivalenten Gegenstrang erreicht, was logischerweise die kleinstmögliche Menge ist.

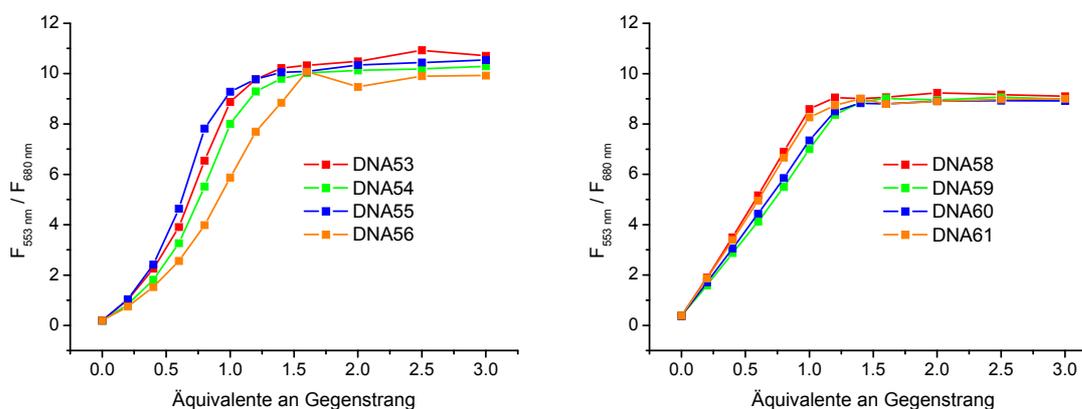
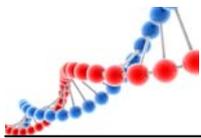


Abb. 72: Auftragung der Emissionsverhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA52 (links) und DNA57 (rechts) gegen die Menge an zugegebenem Gegenstrang.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Verkürzung der Stammregion in DNA52 und DNA57 keine Verbesserung der Selektivität erbracht hat. Jedoch sind beide Sonden immer noch extrem sensitiv und weisen ab einer Gegenstrangkonzentration von 1.4 bzw. 1.0 Äquivalenten keinerlei Dimeremission und -UV/Vis-Absorption mehr auf. Durch die erzielte, sehr schnelle Hybridisierungsrate ist ein potentieller Einsatz dieser Molecular Beacons in der Echtzeitanalytik von Zellen überlegenswert, da bei diesen Experimenten weniger die Diskriminierung von Punktmutationen, sondern eine rasche und sensitive Öffnung der Haarnadelschleife im Vordergrund steht.^[139]

Neben den bereits besprochenen Möglichkeiten, die Hybridisierungskinetik eines Molecular Beacons durch eine Evaluierung der Stamm- und der Schleifenregion zu beeinflussen, wurde von *Liu et al.* die Modulation der Lösungsmittelpolarität vorgeschlagen.^[254] Durch die Anwesenheit von z. B. 56 Vol% Ethanol in der



Probelösung wurde eine um das 70fache gesteigerte Hybridisierungsrate erzielt. Die Erklärung für diesen Effekt liegt vor allem in der gesenkten Aktivierungsenergie der Stammöffnung in Gegenwart des organischen Lösungsmittels. Zugleich wird die Schmelztemperatur der Haarnadelschleife deutlich gesenkt. Diese ermöglichte eine gesteigerte Diskriminierungsfähigkeit der untersuchten Sonde.

Der Einfluss von 50 Vol% Ethanol als Pufferlösungszusatz wurde ebenfalls an zwei ausgewählten Molecular Beacons (DNA38 und DNA42) in dieser Arbeit überprüft. Da DNA die Eigenschaft besitzt, bei höheren Alkoholkonzentrationen zu dehydrieren oder zu aggregieren anstatt *Watson-Crick*-Basenpaarungen auszubilden,^[255] wurde auf eine Betrachtung von höheren Ethanolanteilen, wie sie *Liu et al.* beschreiben, verzichtet. Bereits diese Alkoholkonzentration reichte aus, um die Stammregion von DNA38 bei Raumtemperatur so zu destabilisieren, dass sich keine Haarnadelschleife ausbilden kann. In weiteren Versuchen wurde der Alkoholanteil in der Pufferlösung auf 40 Vol% gesenkt. Dieser Wert destabilisiert die Stammregion immer noch sehr deutlich, ermöglicht aber die Ausbildung von stabilen Basenpaarungen (siehe Tabelle 10).

Wie bei den vorhergehenden Charakterisierungen wurde als erster Schritt die Kinetik der Stammöffnung untersucht. DNA38 befand sich bereits nur 6 Sekunden nach Zugabe von 0.5 eq. DNA39 wieder im Gleichgewicht. Da aufgrund der Probenvorbereitung und der Messapparatur keine schnellere Messung möglich war, könnte die Öffnung theoretisch auch in einem kürzeren Zeitintervall erfolgt sein. DNA42 (+ 0.5 eq. DNA44) öffnet indes deutlich langsamer. Hier stellte sich „erst“ nach 24 Sekunden ein stationäres Gleichgewicht im System ein. Da dies nun ein verlässlicher Wert ist, kann ein Vergleich mit der Kinetik in reiner Pufferlösung gezogen werden. Die Zeitspanne verkürzte sich bei DNA42 von ca. 35 Minuten auf 24 Sekunden. Die Öffnung wurde somit um das über 80fache beschleunigt!

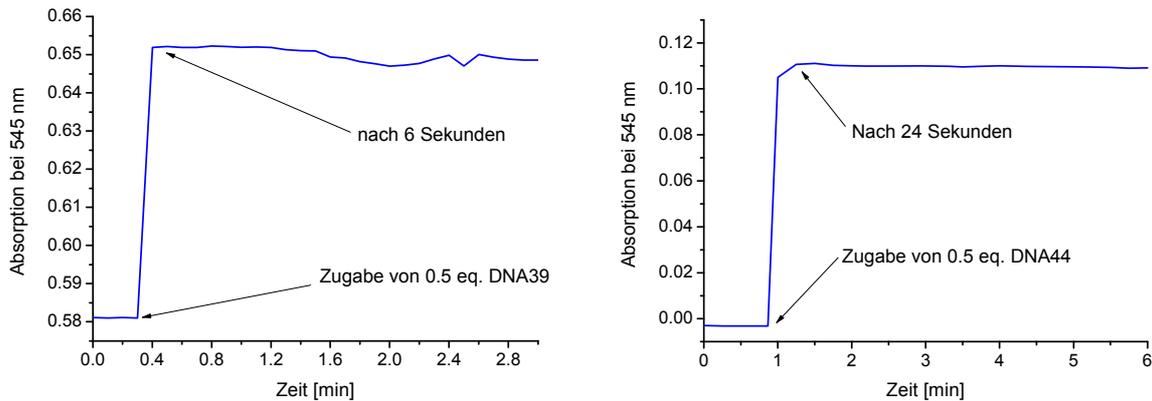
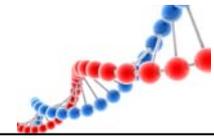


Abb. 73: Auftragung der zeitabhängigen Absorptionsintensität bei 545 nm von DNA38 (links) und DNA42 (rechts) nach Zugabe von 0.5 eq. des komplementären Gegenstrangs in NaP_i -Puffer + 40 Vol% Ethanol.

Um den Mechanismus der Veränderung der Hybridisierungsrate besser zu verstehen, wurden Schmelztemperaturuntersuchungen durchgeführt. Eine schlüssige Erklärung für diese immense Reaktionsbeschleunigung wäre die durch die veränderte Lösungsmittelpolarität herabgesetzte Stabilität der Haarnadelschleife. Die Schmelztemperatur für DNA38 liegt hierbei nur noch knapp über den experimentellen Bedingungen bei 23.7 °C. Für DNA42 (38.3 °C) ist die ermittelte Temperatur höher, weicht aber immer noch stark von der ursprünglichen ab. Die Schmelztemperaturen der gebildeten Doppelstränge sind dagegen deutlich höher. Die Betrachtung der Temperaturverhältnisse zeigt außerdem, dass durch Zugabe von Ethanol das Gleichgewicht der Hybridisierungsreaktion auf die Seite des Doppelstranges verschoben wird. Dass bei dem gewählten Ethanolanteil die Doppelhelix thermodynamisch günstiger als die geschlossene Haarnadelschleife ist, kann durch diese Ergebnisse zweifelsfrei belegt werden.

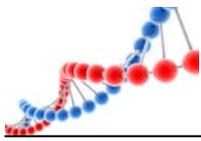


Tabelle 10: Schmelztemperaturen von DNA38, DNA38 ,mit Gegensträngen, DNA42 und DNA42 mit Gegensträngen in NaP_i-Puffer + 40 Vol% Ethanol; Schmelztemperaturen in NaP_i-Puffer sind in den Klammern angegeben.

DNA	T_m [°C]	$\frac{T_m(SS)}{T_m(DS)}$	$T_m(DS) - T_m(SS)$ [°C]
DNA38	23.7 (46.2)	--	--
DNA38-39	42.8 (64.5)	0.55 (0.71)	19.1 (18.3)
DNA38-41	38.5 (58.8)	0.61 (0.79)	14.8 (12.6)
DNA42	38.3 (63.3)	--	--
DNA42-44	45.8 (69.3)	0.84 (0.91)	7.5 (6.0)
DNA42-45	42.3 (63.8)	0.91 (0.99)	4.0 (0.5)
DNA42-46	42.3 (63.8)	0.91 (0.99)	4.0 (0.5)
DNA42-47	45.7 (67.5)	0.84 (0.94)	7.4 (4.2)

Eine Titration beider Molecular Beacons mit allen vier bekannten Gegensträngen war auch in Anwesenheit von 40 Vol% Ethanol problemlos möglich. Die UV/Vis-Absorptions- und Emissionsspektren (Abb. 74) gleichen in ihrer Gestalt denen in normaler Pufferlösung. Einzig die Dimeremission von DNA38 ist etwas geringer ausgeprägt, was wahrscheinlich in der verminderten Stammstabilität in Gegenwart von Ethanol begründet ist.

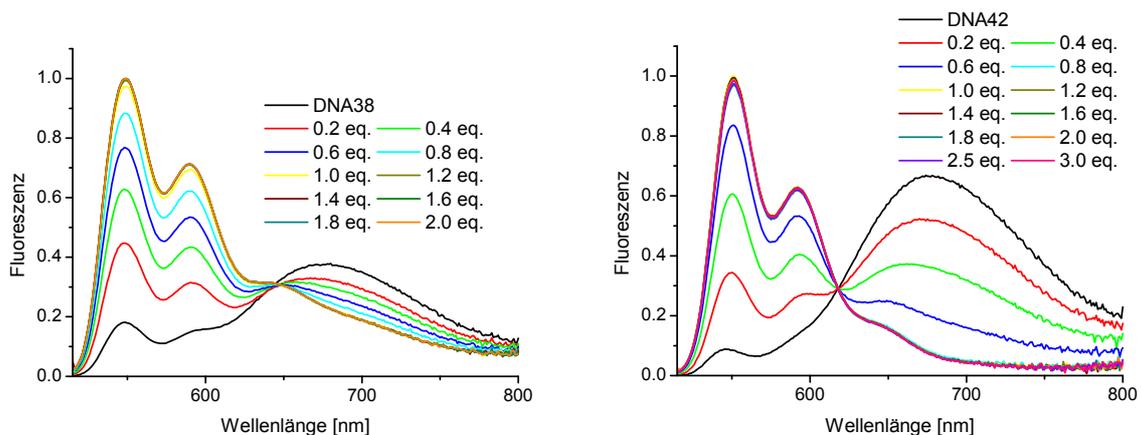
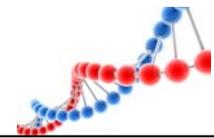


Abb. 74: Emissionsspektren der einzelnen Titrationsschritte von DNA38 mit DNA39 (links) und DNA42 mit DNA44 (rechts) in NaP_i-Pufferlösung + 40 Vol% Ethanol.



Genaueren Aufschluss über die durch die Ethanolzugabe veränderte Sensitivität und Selektivität der beiden Sonden gibt die Betrachtung der Emissionsverhältnisse der beiden Maxima bei 553 nm und 680 nm.

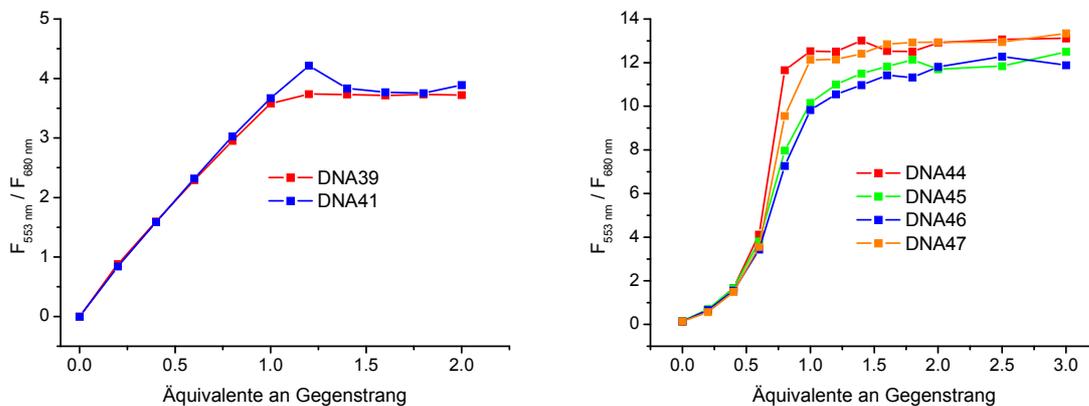


Abb. 75: Auftragung der Emissionsverhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA38 (links) und DNA42 (rechts) gegen die Menge an zugegebenen Gegenstrang in NaP_i -Pufferlösung + 40 Vol% Ethanol.

Die Öffnung von DNA38 in Anwesenheit von 40 Vol% Ethanol gleicht einer linearen Kurve, die sich bei ca. 1,0 Äquivalenten an Gegenstrang rasch asymptotisch einem Maximum annähert. Eine vollständige Beaconöffnung erfolgt somit mit der Mindestmenge an Gegenstrang. Leider lassen sich beide untersuchten Gegenstränge, DNA39 und DNA41 so sich nicht voneinander unterscheiden. DNA42 zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf, der sich ab ca. 1,0 Äquivalent DNA44 und DNA47 schnell einem Maximum annähert. Für DNA45 und DNA46 verläuft die Haarnadelöffnung deutlich langsamer. Das Verhältnis von DNA42-44 ist bei 1,0 Äquivalenten am stärksten ausgeprägt und beträgt 12,5. Den geringsten Wert besitzt DNA42-46 mit 9,8. Dieser beste Fall entspricht einer Diskriminierung zwischen richtig und fehlgepaarten Duplex von 1:1,36. Das Verhältnis ist jedoch zu gering, um von einem wirklich basendiskriminierenden Molecular Beacon zu sprechen. Ein Vergleich mit dem Diskriminierungspotential von DNA42 in reiner Pufferlösung und mit Ethanol zeigt, dass sich durch die Alkoholzugabe keine Steigerung der Selektivität erreichen lies.

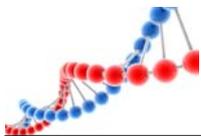


Tabelle 11: Diskriminierungspotential zwischen richtig und fehlgepaarten Duplex von DNA42 bei 1.0 eq. an Gegenstrang in NaP_i-Pufferlösung und NaP_i-Pufferlösung + 40 Vol% Ethanol.

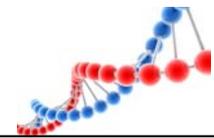
DNA	NaP _i -Puffer	NaP _i -Puffer + 40Vol% EtOH
DNA42-45	1 : 1.28	1 : 1.23
DNA42-46	1 : 1.36	1 : 1.27
DNA42-47	1 : 1.08	1 : 1.03

Zusammenfassend lässt sich eine extreme Steigerung der Hybridisierungsrate der Molecular Beacons durch Ethanolzugabe feststellen. Die für die vollständige Öffnung benötigte Menge an Gegenstrang sinkt bei den untersuchten Proben auf den Minimalwert von nur noch 1.0 Äquivalente. Dies entspricht für DNA38 einer Verbesserung von 0.5 Äquivalenten oder 50 %. Es lässt sich also von einer klar gesteigerten Sensitivität sprechen. Eine Veränderung der Selektivität konnte durch Zugabe von Ethanol in keinem System beobachtet werden.

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der synthetisierte Perylenbisimidbaustein (**7**) konnte über den azyklischen Linkerbaustein (**4**) als Phosphoramidit erfolgreich über die automatisierte DNA-Festphasensynthese in zahlreiche Oligonukleotidstränge eingeführt werden.

Im ersten Teil dieses Kapitels entstanden so 10 verschiedenen DNA-Sequenzen, mit denen das Oxidationspotential des Chromophors gegenüber Guanin in Abhängigkeit des Abstands genauer betrachtet wurde. DNA1 diente als Referenz, wogegen in den Strängen DNA3 bis DNA14 die Entfernung zwischen den beiden Redoxpartnern durch eine steigende Zahl an Zwischenbasen (Adenin) in 5'-Richtung vergrößert wurde. In DNA15 wurde der Chromophor an beiden Seiten mit jeweils einem Guanin flankiert. Mit den Sequenzen DNA17 und DNA19 ist zusätzlich der Lochtransport zu einem Guanin im Gegenstrang untersucht worden. Durch einen Ladungstransfer bildet sich das Radikationenpaar P^{•-} – G^{•+}, wodurch die Emission des Chromophors gelöscht wurde. Mit zunehmender Distanz zwischen dem PBI und dem G nimmt die Lochtransferrate stark ab, ab einem Abstand von vier Zwischenbasen (DNA11) findet

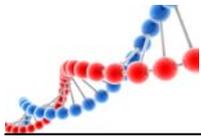


kein Ladungstransfer mehr statt, weil keine Fluoreszenzlöschung mehr detektiert werden konnte. Die Stränge DNA17 und DNA19 verdeutlichten, dass ein Lochtransfer auch in den Gegenstrang möglich, aber weniger effektiv ist.

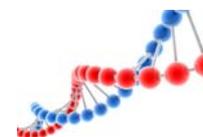
Der zweite Teil beschäftigte sich mit perylenbisimidmodifizierter DNA zur möglichen Detektion von Basenfehlpaarungen. Hierzu wurde zunächst eine von *Wagenknecht et al.* 2008 entwickelte zweifach PBI-modifizierte Modellsonde^[169] an einer realen Sequenz getestet. Die verwendete Sondensequenz DNA21 zur Untersuchung eines Mutationshotspots R282W aus dem Tumorsupressor-Gen p53 besitzt hierzu zwei durch ein Guanin getrennte Chromophore. Es hat sich gezeigt, dass Guanin als Zwischenbase jegliche excitonische Wechselwirkung zwischen den beiden Perylenbisimiden unterbricht und so keine Diskriminierung zulässt. Erschwerend kam hinzu, dass Ladungstransferprozesse zu einer starken Löschung der Emissionsintensität führten.

In weiteren Experimenten wurde versucht, das im Doppelstrang existierende Aggregationsverhalten von PBI zur Detektion von Punktmutationen auszunutzen. Hierzu entstanden zwei unterschiedlich kurze Oligonukleotide mit jeweils einem Chromophor am 3'- und 5'- Ende des Stranges. Im ungepaarten Einzelstrang sollte entsprechend der gängigen Literatur ausschließlich die Monomeremission des Perylenbisimids detektierbar sein. Nur durch Ausbildung der voll gepaarten Doppelhelix sollten die Chromophore aggregieren und die typische Dimeremission aufweisen. Es zeigte sich jedoch, dass sich sowohl im Einzel- als auch im potentiellen Doppelstrang (mit oder ohne Basenfehlpaarung) excitonische Wechselwirkungen ausbildeten. Die Vermutung liegt nahe, dass es den beiden Chromophoren in derart kurzen Oligonukleotiden nicht möglich ist, sich mit genügend Basen zu umgeben, um sich von der polaren Umgebung des Puffers abzuschirmen. Hierdurch bildeten sich auch im Einzelstrang detektierbare Wechselwirkungen zwischen den aromatischen π -Systemen der Perylenbisimide aus.

Im letzten Teil dieses Kapitels wurde die Einsatzmöglichkeit von Perylenbisimiden in Molecular Beacons geprüft. Durch Einbau des Chromophors als diagonales Basenpaar in die Stammregion, die Elektronentransferprozesse aufgrund der gewählten Sequenz ausschließt, sollten die charakteristischen optischen



Eigenschaften von PBI helfen Gegenstränge nachzuweisen. Hierzu wurden zahlreiche Molecular Beacon Sonden mit unterschiedlichen Stamm- und Schleifenregionen untersucht. Es zeigte sich, dass es durch dieses Chromophor-Motiv möglich ist, Oligonukleotide sehr sensitiv zu detektieren, auch wenn diese Basenfehlpaarungen zur Schleifenregion aufweisen. Durch eine zusätzliche Evaluation der Stammlänge wurde die Hybridisierungskinetik gezielt gesteigert, wodurch ein Einsatz dieser Hybridisierungssonden in der Echtzeit-Zellanalytik denkbar wäre.^[136, 139, 253] Der positive Einfluss von Ethanol auf die Hybridisierungsrate wurde zuletzt noch an zwei trägen Molecular Beacon Systemen bestätigt.



4. Pyrrolidinmodifiziertes Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base

Die in Kapitel 3 vorgestellten Perylenbisimide unterscheiden sich ausschließlich durch ihr symmetrisches oder unsymmetrisches Substitutionsmuster an der Imidfunktion. Diese Modifikationen besitzen jedoch keinen oder nur sehr geringen Einfluss auf die optischen und elektrochemischen Eigenschaften der Chromophore. Durch Veränderung des aromatischen Systems des Perylenbisimidfarbstoffkerns kann eine Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima, der HOMO-LUMO Energieniveaus und eine Umgestaltung der räumlichen Eigenschaften der Molekülorbitale erzielt werden.^[175, 187, 256] Entsprechende Funktionalisierungen an den Buchtregionen des Moleküls eröffnen den Zugang zu einer großen Bibliothek an Chromophoren mit maßgeschneiderten Eigenschaften.

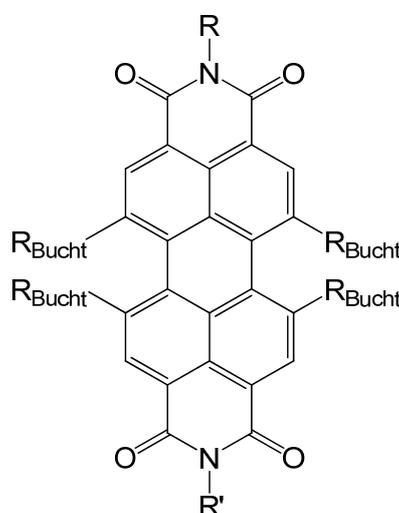
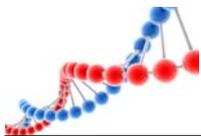


Abb. 76: Chemische Struktur des PBI mit möglichen Substituenten an den Positionen 1, 6, 7 und 12 der Buchtregion.

Eine Modifikation der Buchtregion wurde erstmals 1989 von *Seybold et al.* durchgeführt.^[257] Das aromatische Gerüst wurde hierfür erst mit vier Chlorsubstituenten aktiviert, die im nachfolgenden Schritt durch Phenoxygruppen ersetzt wurden. Entsprechende Chromophore besitzen im Vergleich zu dem bekannten Perylenbisimid eine geringere vibronische Feinstruktur, bathochrom



verschobene Absorptions- und Emissionsspektren und einen vergrößerten $S_0 \rightarrow S_2$ Absorptionsbandenabstand. Diese Veränderungen lassen sich durch den elektronenschiebenden Charakter der Substituenten steuern.^[258] Während die vierfache Chlorierung von Perylenbisimiden seit längerem bekannt ist,^[259] wurde erst viel später entdeckt, dass die Bromierungsreaktion auch zweifach modifizierte Derivate zugänglich macht.^[260] Ein Nachteil hierbei sind jedoch die beiden möglichen 1,6- und 1,7-Dibromo-Regioisomere, die sich bei dieser Reaktion bilden und nicht voneinander getrennt werden können.^[261] Da dieses Halogenatom eine gute Abgangsgruppe darstellt, konnten Kohlenstoff-^[262], Cyano-,^[263] Sauerstoff-,^[260] Schwefel-^[264] oder Stickstoffnucleophile^[265, 266] in das Perylenbisimidgerüst eingeführt werden, was zu einer Vielzahl von Chromophoren mit den unterschiedlichsten Eigenschaften führte.

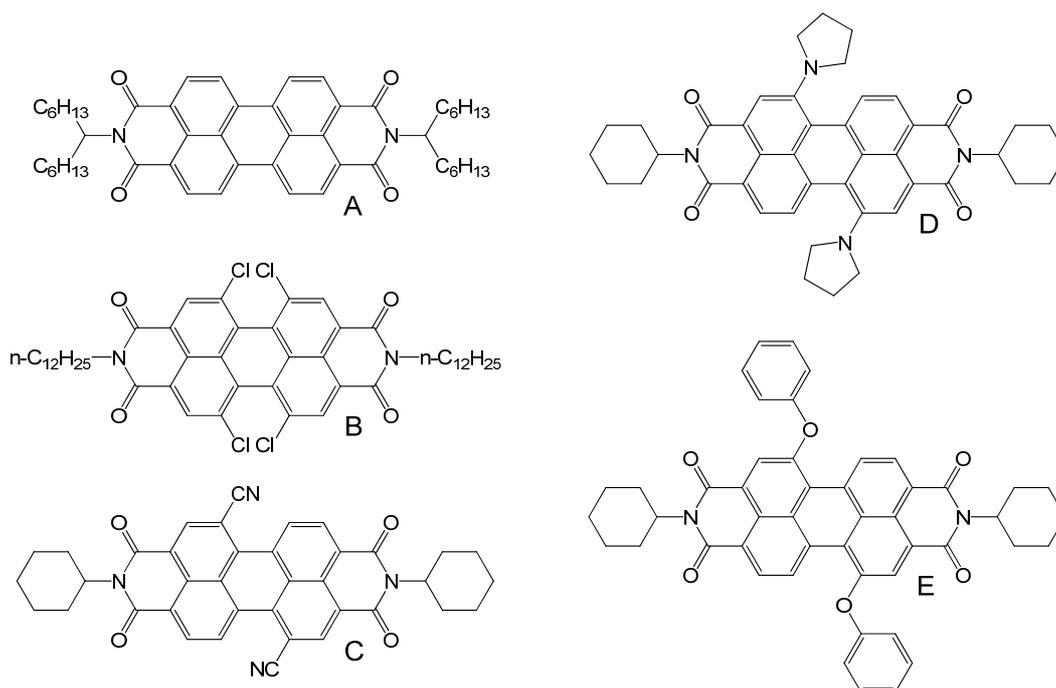
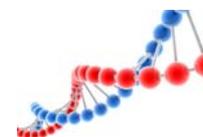


Abb. 77: Exemplarische Darstellung von modifizierten Perylenbisimidchromophoren.

Durch zwei elektronenschiebende Gruppen an den Positionen 1 und 7, wie dies zum Beispiel mit Pyrrolidin der Fall ist, wird das Absorptionsverhalten stark bathochrom verschoben, und die Emission erfolgt im NIR-Bereich. Diese Veränderungen werden durch einen internen Ladungstransferprozess hervorgerufen, der zusätzlich die Quantenausbeute des Chromophors stark erniedrigt.^[267] Interessanterweise



verändert sich das optische Verhalten des Farbstoffes in Vergleich zum unmodifizierten Perylenbisimid durch elektronenziehende Gruppen in der Buchtregion kaum.^[191] Substituenten beeinflussen auch die elektrochemischen Eigenschaften des PBI. Aus dem von sich aus schon leicht reduzierbaren Perylenbisimid wird durch weitere elektronenarme Gruppen, wie Chlor oder Cyanide, ein sehr starkes Oxidationsmittel, vergleichbar mit *p*-Chloranil. Mit elektronenschiebenden Substituenten, wie der Phenoxygruppe, wird die Reduktion um ca. 0.1 V ungünstiger. Zusätzlich wird bei CV Messungen ein neues, reversibles und niedriges Oxidationspotential detektiert. Bei Pyrrolidin zeigen sich sogar zwei reversible Oxidationsprozesse. Elektronenschiebende Gruppen vermindern folglich den Elektronenmangel und erschweren so eine Reduktion deutlich. Tabelle 12 zeigt den Einfluss von verschiedenen Substituenten auf die Redoxeeigenschaften des Perylenbisimids.

Tabelle 12: Redoxeeigenschaften der in Abb. 77 dargestellten Chromophore; in V gegen Fc.

Struktur aus Abb. 77	LM	E_{red} (PBI ⁻ / PBI ²⁻)	E_{red} (PBI / PBI ⁻)	E_{ox} (PBI / PBI ⁺)	E_{ox} (PBI ⁺ / PBI ²⁺)
A ^[244]	CH ₃ CN	-1.21	-0.98	+1.21	Irrev.
B ^[183]	CH ₂ Cl ₂	-1.07	-0.87	--	--
C ^[263]	PrCN	-0.92	-0.59	--	--
D ^[266, 268]	PrCN	-1.46	-1.28	+0.16	+0.23
E ^[205]	CH ₂ Cl ₂	-1.29	-1.11	+1.05	--

Es ist nicht verwunderlich, dass Substituenten in der Buchtregion auch einen großen Einfluss auf die Geometrie des Perylenbisimids besitzen. Röntgenkristallographie,^[269-274] Molekülberechnungen^[275-277] und NMR Studien^[278] belegen, dass es durch sterische Effekte zu einer Verdrehung der beiden Naphthalin-Einheiten kommt, wodurch die für PBI charakteristische Planarität^[204, 279] zerstört wird. Abhängig von der Anzahl und dem räumlichen Anspruch der Substituenten beträgt dieser Verdrehungswinkel bis zu 37°.^[183]

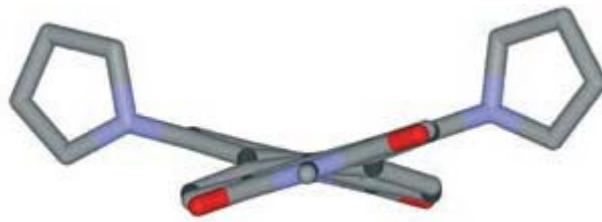
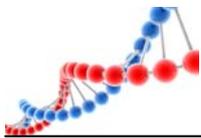


Abb. 78: Berechnete molekulare Struktur eines Dipyrrolidinyl-Substituierten PBI (Blick entlang der N-N-Achse); Der Verdrehungswinkel beträgt 24 – 25°. ^[267, 272]

Die fehlende Planarität und die dadurch verminderte Molekülsymmetrie ist verantwortlich für die breiteren Banden und die verminderte vibronische Feinstruktur in den UV/Vis-Absorptionsspektren.^[267] Zusätzlich hat diese Störung auch einen erheblichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Chromophore. Unmodifizierte Perylenbisimide können aufgrund ihres planaren aromatischen Systems hervorragend π -Stapel ausbilden und so ausgedehnte Aggregate erzeugen. Diese Eigenschaft ändert sich durch Verdrehung extrem. Mit der berechneten Struktur von 1,7-dipyrrolidinyl-substituierten PBI (Abb. 78), lässt sich dies leicht verdeutlichen. Beide Pyrrolidinringe werden aus der aromatischen Ebene gedrückt und befinden sich auf der gleichen Seite des PBI-Gerüsts. Der resultierende Verdrehungswinkel zwischen der 1,12 und 6,7 Position beträgt 24°.^[266] Hierdurch entstehen zwei π -Oberflächen mit unterschiedlicher sterischer Hinderung. Eine Stapelung von Chromophoren ist in dieser Anordnung nur auf der sterisch ungehinderten Seite energetisch sinnvoll. Es bilden sich somit nicht ausgedehnte Aggregate, sondern ausschließlich Dimere, die durch π -Wechselwirkungen die Energie des Systems minimieren.^[267] Ein Vorteil der Störung der Stapelneigenschaften ist jedoch sicherlich die erhöhte Löslichkeit der modifizierten Chromophore im Vergleich zu dem unmodifizierten PBI. ^[187, 191]

4.1. Buchtregionmodifizierte Perylenbisimide in biologischen Systemen

Für die Erforschung von Proteinfunktionen ist die Markierung dieser Enzyme mit Sondenbausteinen hilfreich. Fluoreszenzsonden ermöglichen hierbei die Detektion von molekularen Wechselwirkungen, Konformationsänderungen und Bewegungen.^[280] Dass die verwendete Sonde weder die Struktur, noch die Funktion



oder Aktivität des Proteins beeinflussen darf, ist selbstverständlich. Zusätzlich sollte sie aber noch über eine längere Zeit photostabil sein, um eine visuelle Beobachtung zu ermöglichen.^[281] Obwohl die Perylenbisimidchromophore diese Voraussetzungen erfüllen, werden diese nur selten auf dem Gebiet der Biomolekülmarkierung eingesetzt. Einige wenige Beispiele gibt es aber dennoch.

Grundsätzlich müssen die verwendeten Bausteine eine funktionelle Gruppe für die Biokonjugation besitzen. Diese kann unter anderem eine Carbonsäure oder eine Aminogruppe sein. Hierdurch bilden sich Esterverbindungen mit den Aminosäuren Lysin, Glutamin oder Asparagin aus. Einige Beispiele hierfür sind in Abb. 79 dargestellt.

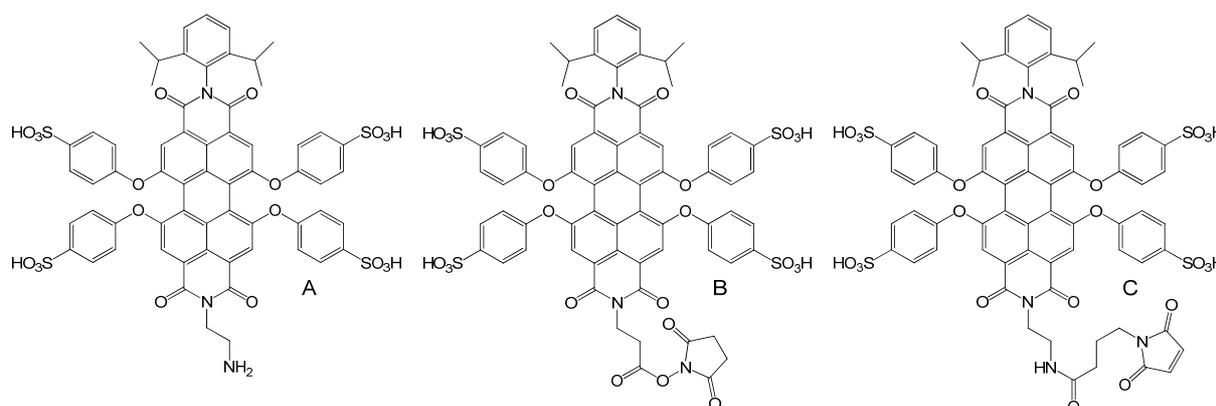
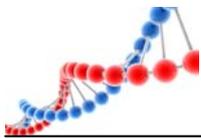


Abb. 79: Buchtregionmodifizierte PBI als Biomarker.^[175]

Der häufigste Ansatz für die selektive Proteinmarkierung ist die Einführung einer Cysteinpunktmutation an der gewünschten Stelle der Proteinoberfläche. Das in Abb. 79 gezeigte Perylenbisimid **C** besitzt eine Maleimidgruppe und eignet sich somit hervorragend zur selektiven Reaktion mit diesen reaktiven Schwefelfunktionen.^[281]

Es ist eine weit verbreitete Methode, Proteine zur besseren Reinigung mit einem Oligohistidinterminus zu versehen. Diese funktionelle Gruppe kann neben dem eigentlichen Verwendungszweck zusätzlich auch zur Markierung mit Chromophoren genutzt werden. Hierfür müssen die Farbstoffe lediglich mit einer Nitrilotriessigsäure-Gruppe (NTA) modifiziert sein. Abb. 80 rechts zeigt ein entsprechendes PBI-Derivat. In Gegenwart von Ni^{2+} -Ionen bildet sich zwischen dem Oligohistidin-Motiv und der NTA-Gruppe ein stabiler Komplex aus.^[282] Da die photophysikalischen Eigenschaften



des verwendeten Chromophors, in Gegensatz zu anderen Sonden, in der Gegenwart von Nickelionen nicht beeinflusst werden, eignet sich dieser Perylenbisimidbaustein sehr gut für diese Art der Markierung.^[175, 283-285] Dies wurde am Beispiel der ATP-Synthetase (Abb. 80) demonstriert.^[282] Zusätzlich schränkt das sehr geringe Molekulargewicht bzw. die geringe Größe des Chromophors dessen Anwendungsmöglichkeit nicht so sehr ein, wie dies bei z. B. Quantendots oder autofluoreszierenden Proteinen der Fall ist.^[175]

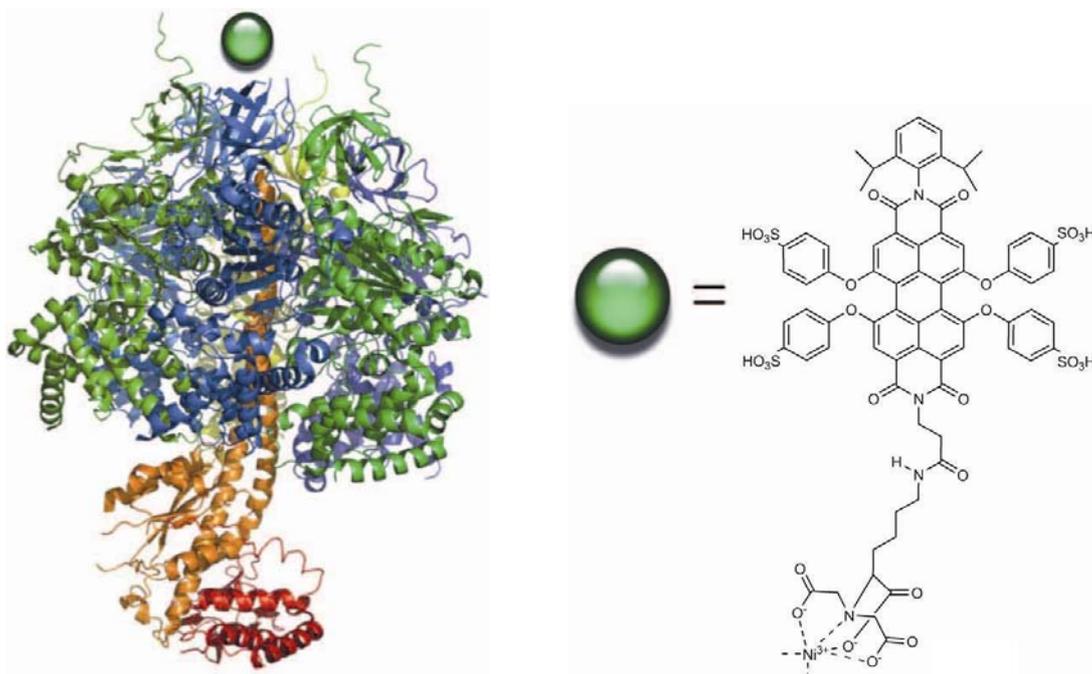
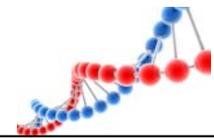


Abb. 80: Markierung eines Proteins mit einem Ni-NTA-funktionalisierten PBI Farbstoff.^[282]

Buchtregionssubstituierte Perylenbisimide werden im Gegensatz zu dem unmodifizierten Chromophoren in der aktuellen Oligonukleotidforschung nur wenig genutzt. Die bisherigen Experimente beschränkten sich zum einen auf nicht kovalent gebundene Farbstoffmoleküle und deren Wechselwirkung mit DNA bzw. mit G-Quadruplex Motiven^[286-288] und auf wenige kovalent gebundene Beispiele, bei denen der Chromophor entweder als Strangabschluss oder als Verbindungselement zwischen zwei Oligonukleotiden dient.

Müllen *et al.* modifizierten postsynthetisch DNA-Stränge mit einem vierfach buchtsubstituierten Perylenbisimidderivat mithilfe aktivierter Carbonsäureester als



Imid-Substituenten. Hierdurch entstanden zwei Oligonukleotidstränge (ON1 und ON2), die in ihrer Mitte den Chromophor beinhalteten (siehe Abb. 81). Es war möglich die DNA durch Zugabe von Lipiden in unpolaren n-Decan zu lösen. Dieser Prozess konnte dank des inkorporierten Farbstoffes mit dem Auge verfolgt werden. Da ON1 und ON2 in Teilbereichen komplementär zueinander waren, wurde durch Hybridisierung beider Stränge die Ausbildung einer supramolekularen, kettenförmigen Überstruktur beobachtet.^[229]

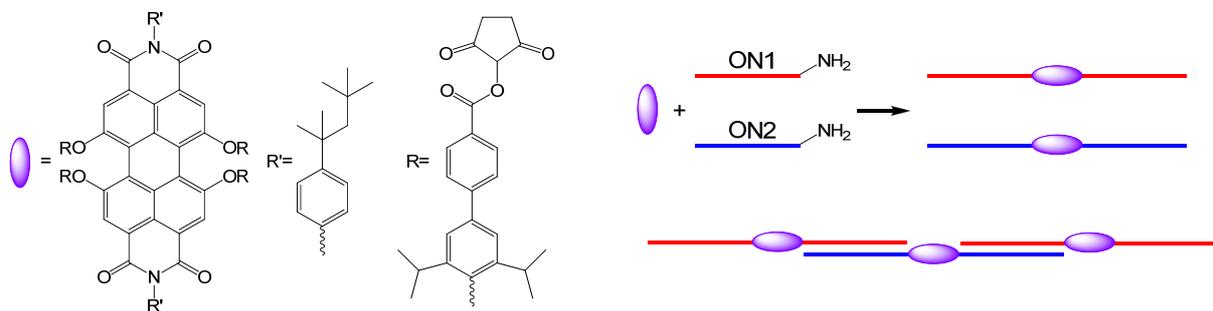


Abb. 81: links: modifizierter PBI-Baustein; rechts: gebildete Oligonukleotidstränge und deren kettenförmige Überstruktur.

Durch Verwendung eines morpholinsubstituierten Perylenbisimidbausteins wurde von *Mokhir et al.* ein einfacher, effizienter und billiger Test zur Beobachtung von Protein-DNA Wechselwirkungen entwickelt. Das verwendete Chromophor-ss-DNA-Konjugat zeigt in Gegenwart von physiologischen Albuminkonzentrationen eine deutliche Emission, da der Chromophor von der wässrigen Umgebung durch das globuläre Protein effektiv abgeschirmt wird.

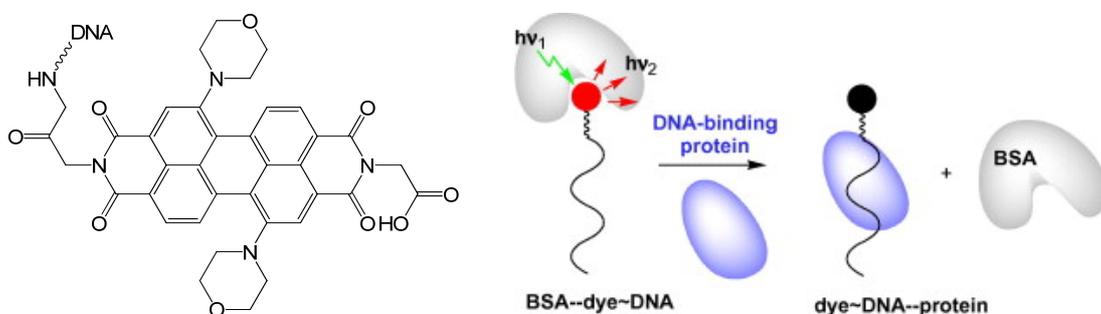
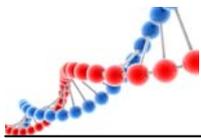


Abb. 82: links: Der von *Mokhir et al.* verwendete Chromophor; rechts: Schematischer Ablauf der Proteindetektion.



Durch Zugabe eines ss-DNA-Bindungsproteins wird der vorher stabile Komplex aufgelöst und der Farbstoff wird dem wässrigen Medium ausgesetzt. Hierdurch wird seine Emissionsintensität signifikant verringert, was spektroskopisch in Echtzeit verfolgt werden kann.^[289]

Die Elektronentransporteigenschaften einzelner isolierter Moleküle standen in den letzten Jahren stark im Focus der Wissenschaft. Schlüsselschritt zur erfolgreichen Untersuchung ist die reproduzierbare Kontaktierung dieser Bausteine mit Nanoelektroden. Eine vielversprechende Möglichkeit, diese präzisen elektrischen Kontakte zu dem Molekül aufzubauen, ist die Verwendung einer langen DNA-Doppelhelix ($l > 1 \mu\text{m}$!) als potentieller Leiter. *Bao et al.* haben hierfür die ersten Grundlagen geschaffen. Da die direkte Verknüpfung eines künstlichen Bausteins mit einer sehr langen DNA Sequenz sterisch sehr ungünstig ist, wurde zu diesem Zweck ein Umweg gegangen. Sie synthetisierten ein Tetrachlor-Perylenbisimidderivat (TCPBI), das über eine Amidbindung an zwei kurze 12mere gekoppelt wurde. Hierdurch entstand ein 5'-DNA-TCPBI-DNA-5' (DTD) Motiv. Durch Zugabe eines 2.7 kbp langen Doppelstrangs, der an einem 3'-Terminus ein zu DTD komplementäres klebriges Ende besitzt, anschließender Hybridisierung und Ligation, war es möglich, den Chromophor zentral in einem 5.4 kbp langen Strang zu platzieren. Durch die Kombination von AFM und Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie gelang es, diese 1.75 μm lange Anordnung nachzuweisen.^[290]

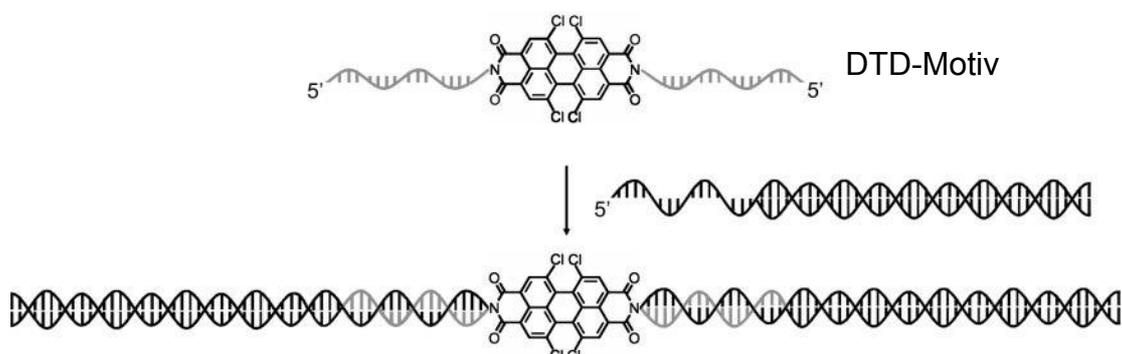
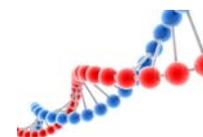


Abb. 83: Schematische Vorgehensweise zur Darstellung eines 5.4 kbp langen, mittig modifizierten Doppelstrangs.^[290]



Tinnefeld et al. untersuchten zum ersten Mal die photophysikalischen Eigenschaften eines in der Buchtregion modifizierten Perylenbisimids in wässriger Pufferlösung mit Hilfe von Einzelmolekülspektroskopie. Hierzu wurde der Chromophor über eine Amidbindung mit einem DNA-Einzelstrang verknüpft und auf einer Oberfläche immobilisiert. Durch diese Strategie kann der Fluorophor über eine längere Zeit beobachtet werden, besitzt aber annähernd die gleichen Eigenschaften eines ungebundenen Chromophors in Lösung. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte das PBI eine hohe Emissionsintensität mit gleichmäßiger spektraler Verteilung und Fluoreszenzlebenszeit. Durch Zugabe von Reduktions- und Oxidationsmitteln in unterschiedlichen Konzentrationen konnte über photoinduzierten Ladungstransfer die Fluoreszenz des Chromophors variiert werden. Das Perylenbisimid besaß so entweder ein blinkendes oder ein durchgehend stabiles Emissionsverhalten.^[230]

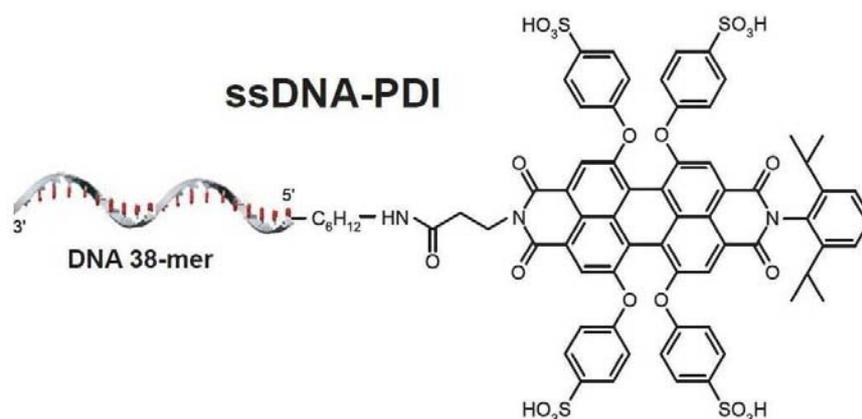


Abb. 84: Das von *Tinnefeld et al.* zur Einzelmolekülspektroskopie verwendete PBI-DNA-Motiv.^[230]

4.2. Synthese des pyrrolidinmodifizierten Perylenbisimidbausteins

Wie in Kapitel 3 bereits ausführlich beschrieben, ist der verwendete Perylenbisimidbaustein **7** im photoangeregten Zustand in der Lage, ein Elektronenloch in den Basenstapel zu injizieren. Hierdurch ist eine breite Anwendbarkeit dieses Moleküls in der Oligonukleotidchemie erschwert. Die Redox Eigenschaften des Chromophors können jedoch durch Modifikationen an der Buchtregion mit der Einführung von Substituenten deutlich verändert werden.

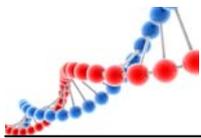


ca. -1.47 V befinden. Eine Reduktion der natürlichen Basen gilt somit auch als unwahrscheinlich.

Zusätzlich zu den verbesserten elektrochemischen Eigenschaften wird durch die Pyrrolidinsubstituenten die Emission des Chromophors in den nahen Infrarotbereich verschoben. Dieser Wellenlängenbereich ist seit längerem im Focus der medizinischen Analytik, da er sich hervorragend für Anwendungen im biologischen Gewebe eignet.^[300] Spektroskopische Verfahren haben den Vorteil, Proben nicht-invasiv zu untersuchen und diese somit nicht zu zerstören. Leider limitieren die hohe Absorption und die Autofluoreszenz von biologischen Geweben im UV/Vis- und im fernen IR-Bereich den breiten Einsatz dieser Methode. Lediglich in einem kleinen Wellenlängenbereich zwischen 700 – 1100 nm ist eine breite Anwendbarkeit möglich, da hier der Einfluss der hauptabsorbierenden Zellbestandteile, Oxy- und Deoxyhämoglobin ($\lambda_{\max} < 600$ nm) und Wasser ($\lambda_{\max} > 1150$ nm) nur minimal ist.^[301, 302] Somit könnten der neue Chromophor bzw. die damit modifizierten Oligonukleotide auch für die Zellanalytik von großem Interesse sein.

Um das erwünschte, in der Buchtregion modifizierte Perylenbisimidderivat zu erhalten, musste im ersten Schritt der aromatische Bereich an den Positionen 1 und 7 aktiviert werden. Hierzu wurde das kommerziell erhältliche Ausgangsprodukt **5** abweichend von bereits veröffentlichten Vorschriften^[272, 286, 292, 296, 297] mit 6 Äquivalenten Brom in Gegenwart von katalytischen Mengen an elementarem Iod in konzentrierter Schwefelsäure bei 95 °C über 18 Stunden gerührt. Das erhaltene tiefrote Produkt ist ein Gemisch aus 1,6- und 1,7-Dibromoperylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydrid (**9**). Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit beider Isomere war eine Trennung nach diesem Syntheseschritt leider nicht durchführbar.^[272] Es lässt sich jedoch anmerken, dass das 1,7-Regioisomer eindeutig das Hauptprodukt dieser Reaktion ist.^[291, 303, 304]

In der zweiten Synthesestufe wurde der Chromophor mit den bereits in Kapitel 3 verwendeten Aminen unsymmetrisch substituiert. Hierfür wurde **9** in Gegenwart von Zinkacetat eine Stunde in Pyridin bei 120 °C gerührt. Die Temperatur wurde anschließend auf 75 °C gesenkt, die beiden Amine über einen Zeitspanne von 2 – 3 Stunden zugetropft, und die Lösung für weitere 10 Stunden gerührt. Die Einhaltung der exakten Temperatur und der entsprechenden Reaktionszeiten war bei dieser



Stufe von größter Bedeutung. Sowohl eine Temperaturerhöhung, als auch verlängerte Zeitabschnitte führten unweigerlich zur Zerstörung des erwünschten Produkts. Das zugesetzte Zinkacetat hatte in diesem Reaktionsschritt zwei Aufgaben. Analog zu Kapitel 3 diente es als katalytische Lewisäure und beschleunigte die Bildung des Imids, zusätzlich maskierte das doppelt geladene Ion das freie Elektronenpaar der Stickstoffatome der beiden Amidgruppen. So konnte eine aromatische Substitution der Bromatome in der Buchtregion verhindert werden. Durch den Einsatz eines Eduktgemisches aus 1,6- und 1,7-Isomeren und durch die unsymmetrische Substitution mit zwei unterschiedlichen Aminen bildeten sich die vier verschiedenen in Abb. 86 dargestellten Produktderivate von **10**.

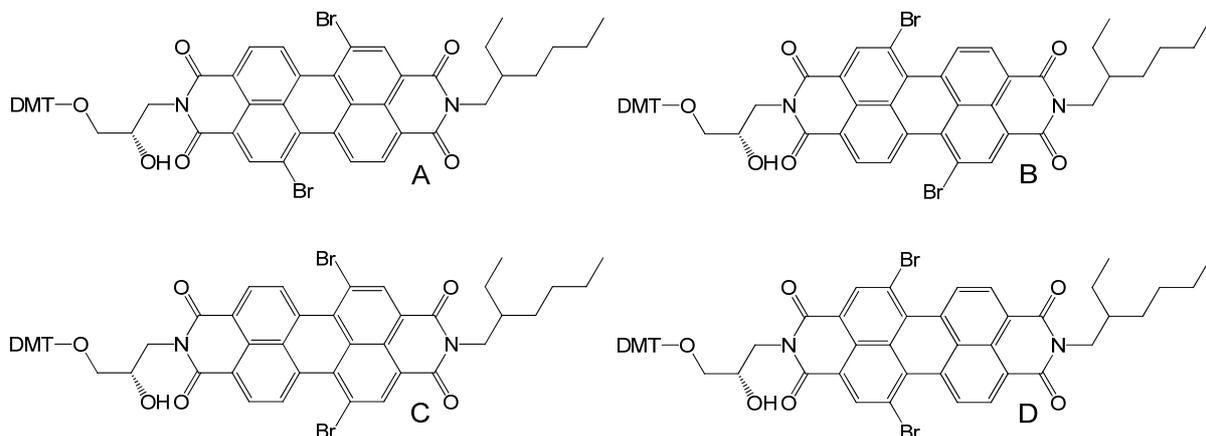
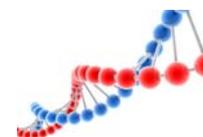


Abb. 86: Die vier möglichen Perylenbisimidisomere nach der zweiten Synthesestufe.

Eine Abtrennung der beiden 1,6-Isomere (**C** und **D**) konnte nun über normale Säulenchromatographie erfolgen. Dies wurde durch 2D-NMR spektroskopische Untersuchungen zweifelsfrei belegt. Die 1,7-modifizierten Isomere **A** und **B** wären theoretisch über eine Rotation um ihre C_2 Achse ineinander überführbar und müssten so nicht voneinander getrennt werden. Diese Drehung wird jedoch eventuell über sich ausbildenden Wasserstoffbrücken zwischen der Hydroxygruppe des Linkermoleküls und der Carbonylgruppe des Bisimids oder durch weiter sterische Einschränkungen^[303] erschwert oder verhindert. Um diese offene Frage abzuklären, wurde die Rotationsbarriere um die betreffende Bindung quantenmechanisch abgeschätzt.



Die Geometrie des Grundzustandes von **10** wurde über die Dichtefunktionaltheorie mit dem Programm *Gaussian03*^[305] berechnet. Das der Rechnung zu Grunde liegende Funktional lautete B3LYP und der verwendete Basissatz war 3-21+G*. Die Berechnungen beziehen sich auf die Gasphase bei 0 K. Ein Ausschnitt der optimierten Geometrie ist in Abb. 87 ersichtlich.

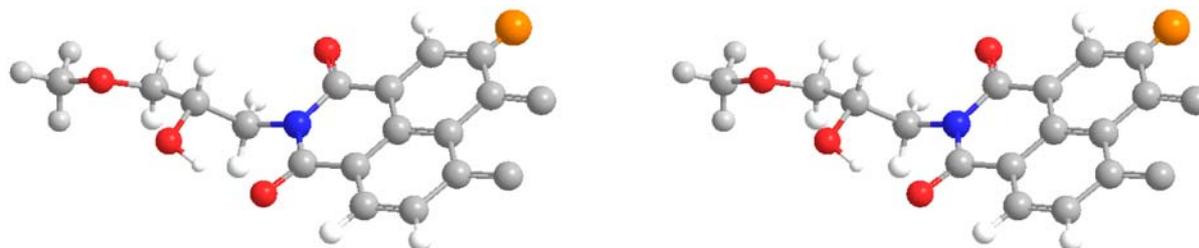
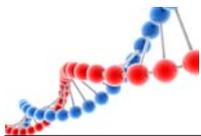


Abb. 87: Ausschnitt der optimierten Geometrie von **10** bei 0 K.

Die Rotationsbarriere um die C-N Bindung wurde ebenfalls mit *Gaussian03* berechnet. Hierbei war klar zu erkennen, dass diese $< kT$ bei $T = 25\text{ °C}$ ist. Somit kann eine Rotation um diese Bindung bei Raumtemperatur erfolgen und die beiden Isomere sind ineinander überführbar. Ausschlaggebend für die Höhe der Rotationsenergie war erstaunlicherweise nicht, wie angenommen, die Wasserstoffbrücke zwischen dem Wasserstoffatom der Hydroxygruppe des Linkermoleküls und der Carbonylgruppe des Bisimids, sondern die sterische Hinderung zwischen dem Wasserstoffatom an der R-CH₂-N-Gruppe und dem freien Elektronenpaar der Imidgruppe.

Die beiden Pyrrolidiningruppen wurden anschließend über eine nukleophile aromatische Substitution in die Buchtregion des Perylenbisimids eingeführt. Hierzu wurde **10** in Pyrrolidin gelöst und 24 Stunden bei 55 °C gerührt.^[268, 272] Der Beginn der Reaktion konnte mit dem Auge verfolgt werden. Bereits nach wenigen Minuten verfärbte sich die anfangs tiefrote Lösung blaugrün und schlug zum Reaktionsende hin in ein sattes dunkelgrün um, welches charakteristisch für das erhaltene Produkt **11** ist.

Für eine spätere elektrochemische Charakterisierung des Chromophors **11** in saurer Umgebung musste, um eine Verfälschung der Messdaten auszuschließen, die säurelabile DMT-Schutzgruppe abgespalten werden. Hierzu wurde **11** bei



Raumtemperatur in DCM gelöst und solange mit 2%iger Dichloressigsäure versetzt, bis das Edukt vollständig zum entschützten Produkt **13** umgesetzt war. Da eine Aufkonzentration der Lösung im Vakuum die Säurekonzentration immens erhöht und das Produkt unweigerlich zerstört hätte, wurde die Lösung ohne weitere Behandlung mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Der fertige Phosphoramiditbaustein **12** konnte durch eine Modifikation der in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* etablierten Phosphoramiditsynthese erhalten werden. Um das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite zu verlagern, mussten die sonst üblichen 2 – 3 Äquivalente β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit auf 20 erhöht werden. Auch der Anteil von Triethylamin ist mit 10.5 Äquivalenten deutlich größer als normal.

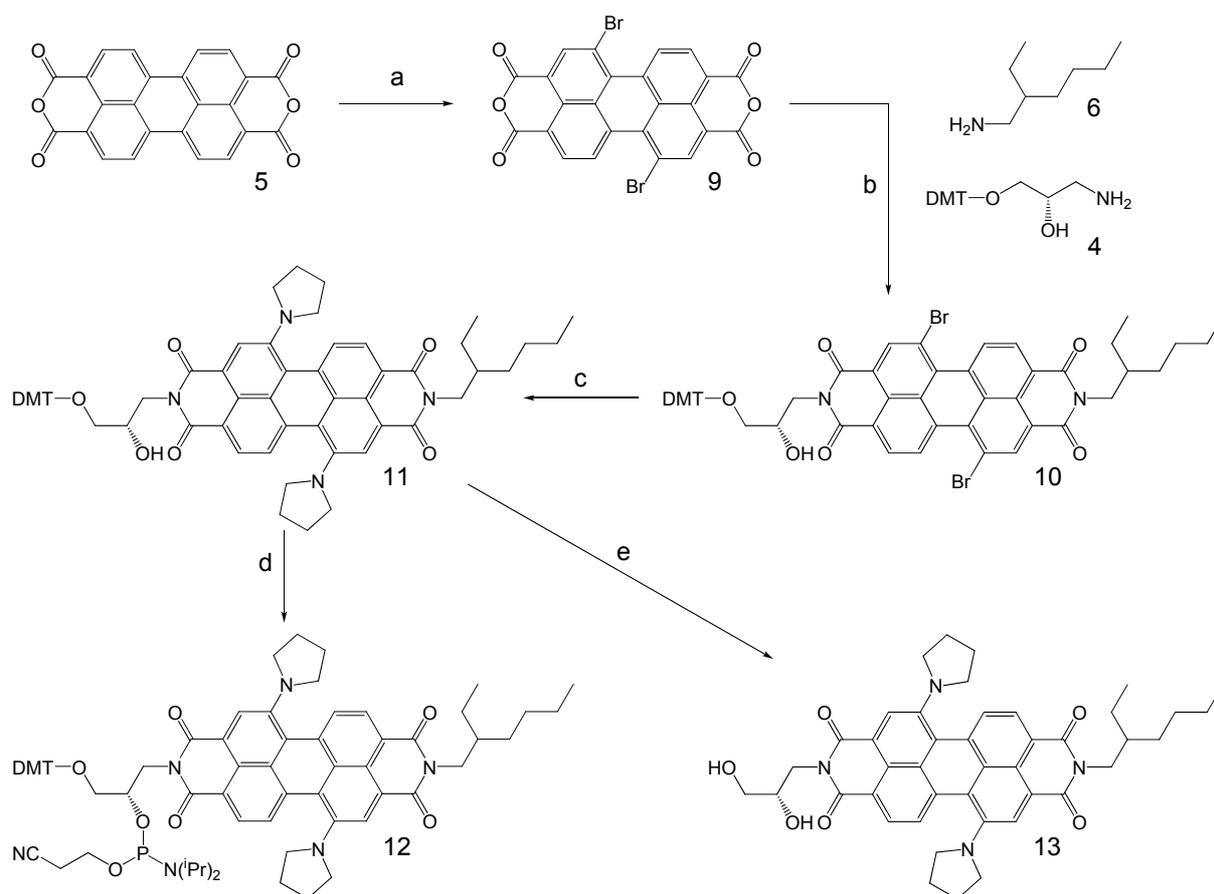
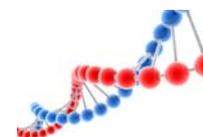


Abb. 88: Syntheschema des pyrrolidinmodifizierten Perylenbisimidbausteins; a) Br_2 , I_2 , H_2SO_4 , 95°C , 18 h, quant.; b) $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, Pyridin, 75°C , 15 h, 25 %, c) Pyrrolidin, 55°C , 24 h, 82 %, d) β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, NEt_3 , abs DCM, RT, 1.5 h, 74 %; e) Dichloressigsäure, DCM, RT, 10 min, 93 %.



4.3. Spektroskopische und elektrochemische Charakterisierung des pyrrolidinmodifizierten Perylenbisimidbausteins **11**

Das synthetisierte, artifizielle Nukleosid **11** wurde zunächst spektroskopisch untersucht. Abb. 89 links zeigt das UV/Vis-Absorptionsspektrum von APBI **11**. Um eventuelle Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren auszuschließen, wurde die Messung in DMSO durchgeführt. Das Spektrum zeigt eindeutig den $S_0 \rightarrow S_1$ Übergang mit dem Hauptmaximum bei 708 nm und einer Schulter bei etwa 655 nm und den $S_0 \rightarrow S_2$ Übergang bei 435 nm, der ebenfalls eine Schulter bei 415 nm besitzt. Die Anwesenheit der beiden Aminsubstituenten verschiebt folglich das Absorptionsmaximum im Vergleich zum unmodifizierten PBI ($\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$ ^[245]) um ca. 180 nm stark bathochrom. Diese Werte decken sich mit bereits bekannten dipyrrolidinsubstituierten Perylenbisimiden.^[266, 294, 299, 306] Die Form der UV/Vis-Absorptionskurve belegt zusätzlich, dass sich keine Wechselwirkungen zwischen einzelnen Chromophoren ausgebildet haben und die Moleküle als Monomere vorliegen. Die Gegenwart von Dimeren würde eine Spiegelung des Graphen in der NIR-Region mit einem Maximum bei 655 nm und einer Schulter bei 708 nm verursachen.^[266, 294, 306]

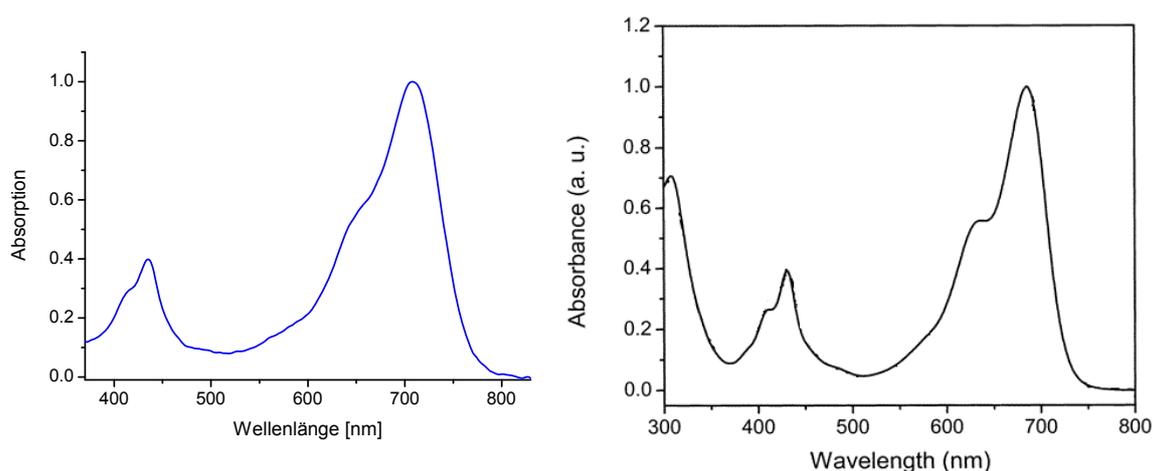
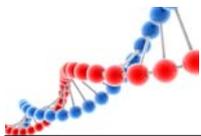


Abb. 89: links: Normiertes UV/Vis-Absorptionsspektrum von APBI **11** in DMSO; rechts: Vergleichspektrum in Toluol von *Wasielewski et al.*^[266]

Da sich 1,6- (blau) und 1,7- (grün) diamino-substituierte Perylenbisimide optisch und spektroskopisch deutlich voneinander unterscheiden^[291, 292] und sich das gemessene



Spektrum in seiner Gestalt sehr gut mit den bekannten Spektren deckt, ist dies ein weiterer Beweis, dass es sich bei **11** ausschließlich um das 1,7-Isomer handelt.

Die Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors wurden ebenfalls zum Ausschluss etwaiger Wechselwirkungen in DMSO untersucht. Um ein vollständiges Emissionsspektrum zu erhalten, wurde, basierend auf die UV/Vis-Messung, das Perylenbisimidderivat im Bereich der $S_0 \rightarrow S_1$ Schulter bei 650 nm angeregt. Die erhaltene Emissionskurve ist in seiner Gestalt spiegelbildlich zu dem Absorptionsspektrum im NIR-Bereich. Dies bedeutet, dass der angeregte Zustand auf dem PBI Chromophor lokalisiert ist.^[174] Das Maximum der breiten Bande liegt bei einer Wellenlänge von 752 nm und besitzt eine geringe, fast vernachlässigbare Schulter bei ungefähr 830 nm. Auch dies deckt sich unter geringen Abweichungen mit literaturbekannten Werten.^[307] Da diese Emissionsbande an der Grenze des sichtbaren Bereiches des Spektrums (380 – 750 nm) ist, kann die Fluoreszenz leider nicht mit dem Auge verfolgt werden.

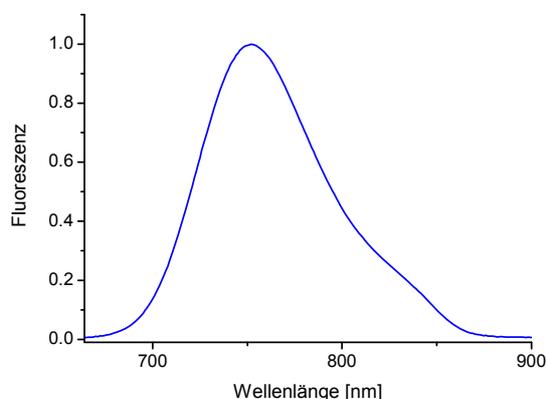


Abb. 90: Normiertes Emissionsspektrum von APBI 11 in DMSO.

Berechnungen haben gezeigt, dass sich die Strukturen des APBI im Grundzustand und im niedrigsten angeregten Zustand deutlich unterscheiden. Durch die Anregung rotieren die beiden Pyrrolidinringe in die aromatische Ebene des PBI, wodurch sich die gesamte Geometrie um die Stickstoffatome abflacht. Durch verbesserte Orbitalüberlappung wird ein Ladungstransfer von den freien Elektronenpaaren des Pyrrolidin-Stickstoffs in das π -System des Perylenbisimids ermöglicht, was eine



Veränderung der Dipolübergangsmomente hervorruft.^[266] Zusätzlich verursacht eine durch Anregung bedingte Geometrieänderung eine breite, strukturlose Emissionsbande des Chromophors.

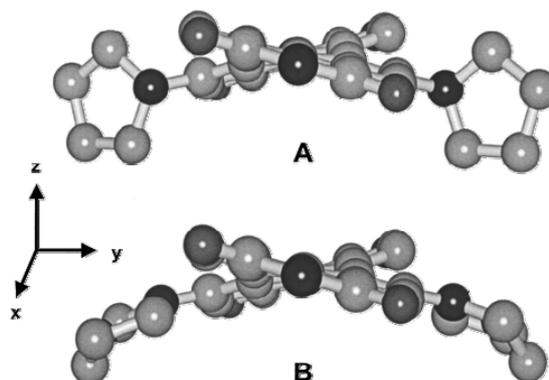


Abb. 91: Berechnete energetisch minimierte Struktur von 1,7-Dipyrrolidinsubstituierten PBI in Grundzustand (A) und im angeregten Zustand (B).^[266]

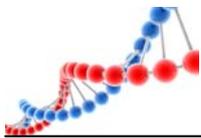
Zum Abschluss der spektroskopischen Untersuchungen wurde der molare Extinktionskoeffizient des Amino-perylenbisimids **11** ermittelt. Dies war unter anderem notwendig, um in späteren Experimenten die Konzentration von synthetisierten Oligonukleotidsträngen anhand der Farbstoffabsorption zu bestimmen. Hierbei bedient man sich dem Gesetz nach *Lambert-Beer*, mit dem sich der molare Extinktionskoeffizient bei bekannter Chromophorkonzentration in der Probenlösung über die Absorption berechnen lässt.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 14: Gesetz nach Lambert-Beer.

- A: gemessene Absorption
- ε : molarer Extinktionskoeffizient
- c: Konzentration der Probe
- d: Schichtdicke der durchstrahlten Probe

Um etwaige Fehler auszuschließen, wurde der molare Extinktionskoeffizient anhand gemittelter Werte einer Konzentrationsreihe (10.2 – 102.0 μM) für die beiden Maxima bei 708 nm und 435 nm bestimmt. Es zeigte sich, dass sich $\varepsilon_{435 \text{ nm}}$ über den gesamten Konzentrationsbereich linear verhält. Für $\varepsilon_{708 \text{ nm}}$ trifft dies nur über die



ersten vier Werte (10.2 – 61.2 μM) zu, weshalb auch nur diese für die Mittelwertbestimmung herangezogen wurden. Diese Abweichung ist wohl auf mögliche Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen in der Lösung bei steigender Konzentration zurückzuführen.

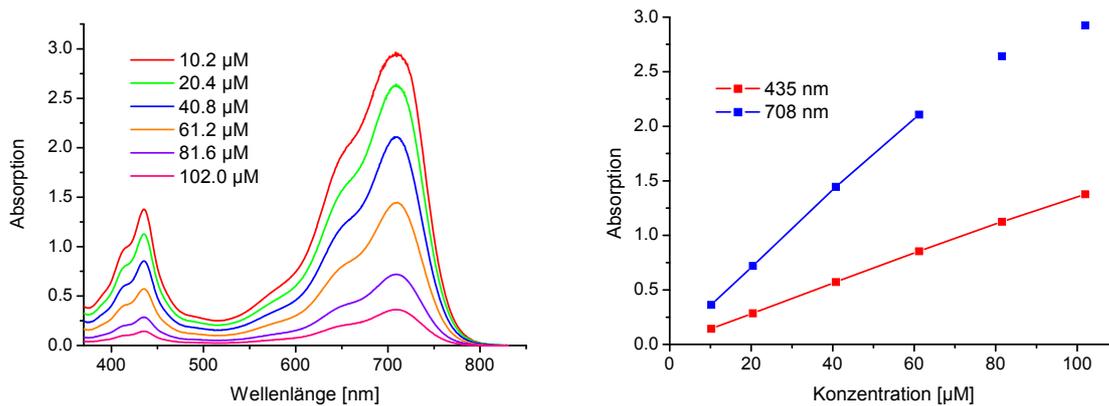
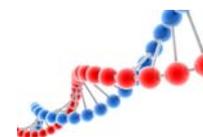


Abb. 92: links: UV/Vis-Absorptionsmessungen von 11 in verschiedenen Konzentrationen (10.2 – 102.0 μM); rechts: Auftragung der Absorption bei 435 und 708 nm in Abhängigkeit der Konzentration.

Da, wie aus Abb. 92 klar hervorgeht und literaturbekannt ist, ^[266, 294, 306] mögliche Aggregationsprozesse durch π -Stapelung des aromatischen APBI-Gerüsts keinen Einfluss auf die Bande bei 375 – 470 nm ausüben, wurde ausschließlich der molare Extinktionskoeffizient bei 435 nm zur Berechnung der jeweiligen Farbstoffkonzentration in der Probenlösung herangezogen.

Tabelle 13: Experimentell bestimmter molarer Extinktionskoeffizient von APBI 11 bei 708 und 435 nm.

Wellenlänge [nm]	Molarer Extinktionskoeffizient ϵ $\left[\frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
708	35207
435	13921



Um die Effektivität und die Wirksamkeit der Redoxfeinabstimmung zu überprüfen, wurde der neue Amino-perylenbisimidbaustein mittels Cyclovoltammetrie untersucht. Die Messungen wurden in trockenem DCM durchgeführt, als Leitsalz diente Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat. Der Chromophor besitzt zwei getrennte und vollständig reversible Oxidationspotentiale, die sich bei +0.24 V und +0.37 V (vs. Fc) befinden. Der Abstand zwischen den jeweiligen Halbpotentialen beträgt 50 – 60 mV. Diese Daten stimmen recht präzise mit den bereits literaturbekannten Werten für *N*-pyrrolidinsubstituierte Perylenbisimide überein.^[191, 266, 268, 298] Das einzige, ebenfalls reversible Reduktionspotential liegt bei -1.29 V (vs. Fc). Da die beiden zugehörigen Halbpotentiale einen Abstand von 130 mV besitzen, deutet dies auf zwei sich überlagernde Potentiale bei ungefähr -1.26 V und -1.33 V hin. Dies deckt sich erneut mit literaturbekannten Werten, die bei etwa -1.28 V bzw. -1.46 V liegen.^[191, 266, 268]

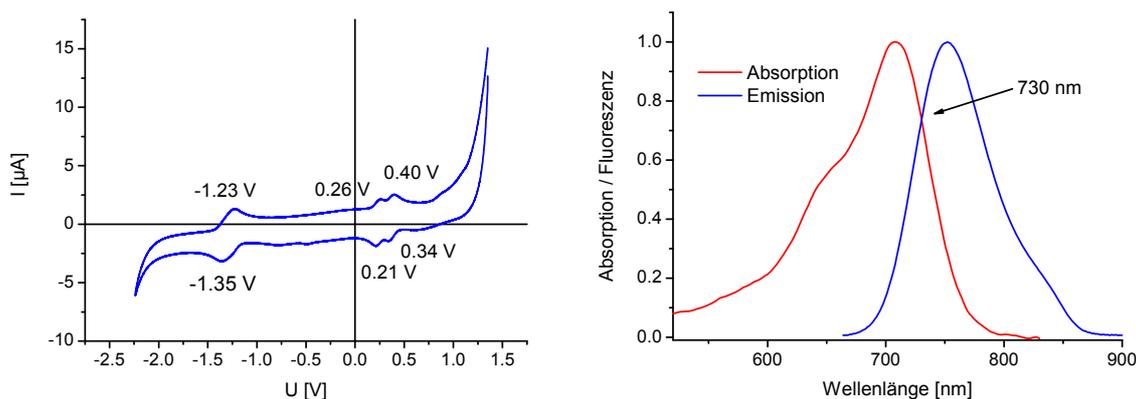
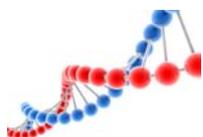


Abb. 93: links: Cyclovoltammogramm des Chromophors **11**, bereits gegen Fc korrigiert; rechts: Normiertes UV/Vis-Absorptions- und Emissionsspektrum von **11** zur Ermittlung von E_{00} .

Um jedoch ein aussagekräftiges Resultat über die Oxidations- bzw. Reduktionsfähigkeit des Chromophors gegenüber den natürlichen Basen zu erhalten, müssen dessen Potentiale im photoangeregten Zustand abgeschätzt werden. Das hierfür benötigte E_{00} wurde rechnerisch aus dem Schnittpunkt der auf eins normierten UV/Vis-Absorptions- und Emissionskurven von **11** erhalten. Der Energieunterschied zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand beträgt bei 730 nm 1.7 eV. Somit befinden sich die beiden angeregten Oxidationspotentiale bei -1.46 und -1.33 V und das angeregte Reduktionspotential



bei +0.41 V (vs. Fc). Ermittelt man nun die Triebkraft des Oxidationsprozesses des potentiellen Redoxpaares APBI / Guanin unter Zuhilfenahme der *Rehm-Weller-Gleichung*^[43, 44] zeigt sich, dass ΔG mit ca. +0.3 – +0.5 eV positiv ist. Dies schließt eindeutig eine Oxidation von Guanin und somit auch aller anderen Basen aus. Die Betrachtung der potentiellen Reduktionsprozesse zeigt, dass APBI zusätzlich nicht in der Lage ist, die natürlichen Basen zu reduzieren.

Zusammenfassend lässt sich somit ganz klar feststellen, dass die Modifikation der Buchtregion mit zwei elektronenschiebenden Pyrrolidinringen exakt das erwartete, veränderte Redoxverhalten des Chromophors ergeben hat.

Tabelle 14 Reduktions- und Oxidationspotentiale von 11 im Grund- und im angeregten Zustand.

	E_{red} [V]	E_{ox1} [V]	E_{ox2} [V]	E_{red}^* [V]	E_{ox1}^* [V]	E_{ox2}^* [V]
gegen Fc	-1.29	+0.24	+0.37	+0.41	-1.46	-1.33
gegen NHE	-0.66	+0.90	+1.00	+1.04	-0.83	-0.70

4.4. Spektroskopische Untersuchung amino-perylenbisimidmodifizierter Oligonukleotide

Um die veränderten Redox Eigenschaften des neuentwickelten Chromophors **11** nicht nur im CV-Experiment, sondern in einer realen Basenumgebung zu überprüfen, wurde das Phosphoramidit **12** mithilfe der automatisierten Festphasensynthese in ein Testoligonukleotid (DNA62) eingebaut. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit des APBI in Acetonitril wurde Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet und das standardisierte Kopplungsprotokoll des Syntheseautomaten angepasst. Die Kupplungszeit wurde von 96 s (Standardbasen) auf 1450 s verlängert und die Anzahl der benötigten Pulse von sieben auf zweiunddreißig erhöht. Außerdem wurde ein dritter Kupplungsschritt eingeführt. Gleichzeitig mussten, um ein Ausfallen des künstlichen Bausteins im System zu verhindern, zusätzliche Equilibrier- und Waschschriffe mit Dichlormethan hinzugefügt werden.

In DNA62 ist das künstliche Nukleosid an beiden Seiten von einem Guanin flankiert. Sollte es zu photoangeregten Ladungstransferprozessen zwischen APBI und den



natürlichen Basen kommen, müsste die zu erwartende Emissionsintensität des Chromophors in Anlehnung an die in Kapitel 3.3 erzielten Ergebnisse annähernd vollständig gelöscht sein. Um ebenso einen Einfluss der Gegenbasen auf den künstlichen Baustein zu untersuchen, wurde DNA62 mit vier verschiedenen Gegensträngen hybridisiert.

DNA62: 3'-AGT-CAC-TG**AP**-GTC-TGA-CG-5'

DNA63: 5'-TCA-GTG-AC **G** -CAG-ACT-GC-3'

DNA64: 5'-TCA-GTG-AC **A** -CAG-ACT-GC-3'

DNA65: 5'-TCA-GTG-AC **T** -CAG-ACT-GC-3'

DNA66: 5'-TCA-GTG-AC **C** -CAG-ACT-GC-3'

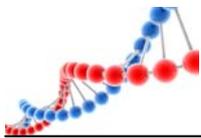
Allgemein lässt sich feststellen, dass sowohl die UV/Vis-Absorptions-, als auch die Fluoreszenzspektren des Chromophors in DNA im Vergleich zum freien Farbstoff in DMSO bathochrom verschoben sind. Grund hierfür sind sehr wahrscheinlich solvatochrome Effekte wegen der unterschiedlichen Lösungmittelpolarität.

Im UV/Vis-Absorptionsspektrum von DNA62 zeigt sich sowohl für den Einzelstrang als auch für die vier Duplexe der zu erwartende Kurvenverlauf des Chromophor-Monomers. Die beiden Hauptmaxima von DNA62 sind bei ca. 450 und 747 nm. Die Gegenbase A weicht deutlich ab, was auf eine besondere strukturelle Situation mit hinweist.

Tabelle 15: UV/Vis-Absorptionsmaxima von DNA62 im Einzel- und Doppelstrang.

DNA	$\lambda_{\max 1}$ [nm]	$\lambda_{\max 2}$ [nm]
DNA62	450	747
DNA62-63	456	756
DNA62-64	459	767
DNA62-65	456	763
DNA62-66	456	759

DNA62 besitzt sowohl im Einzel-, als auch im Doppelstrang eine sehr breite Emissionsbande ohne Feinstruktur. Die höchste Emissionsintensität weist DNA62 auf, dessen Maximum bei 778 nm liegt. Analog zu den UV/Vis-Absorptionsspektren



sind auch die Fluoreszenzmaxima der Doppelstränge deutlich rotverschoben. Adenin besitzt auch hier eine Sonderrolle, mit erhöhter bathochromer Verschiebung. Die Emissionsintensitäten sind in allen Doppelsträngen um den Faktor 3.2 verringert. Dies weist auf einen Löschprozess im Doppelstrang hin, der unabhängig von der entsprechenden Gegenbase ist.

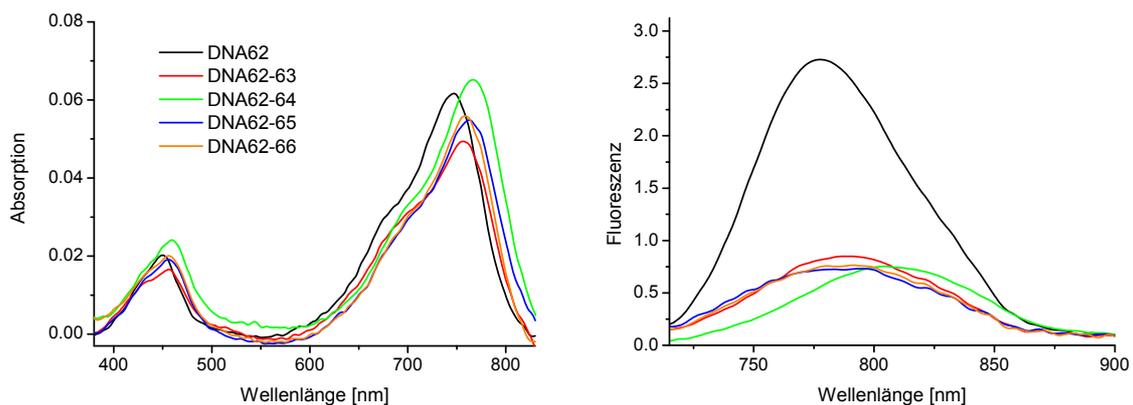


Abb. 94: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von DNA62, DNA62-63, DNA62-64, DNA62-65 und DNA62-66.

Tabelle 16: Emissionsmaxima von DNA62 im Einzel- und Doppelstrang.

DNA	λ_{max} [nm]
DNA62	778
DNA62-63	790
DNA62-64	809
DNA62-65	791
DNA62-66	791

Eine Ladungstransferreaktion vom Chromophor auf die natürlichen Basen als Ursache für die verringerte Emissionsintensität lässt sich aus mehreren Gründen ausschließen. Die in den Cyclovoltammetrie Messungen erhaltenen Werte deuten darauf hin, dass sowohl eine Oxidation, als auch eine Reduktion der Nukleobasen durch den photoangeregten Farbstoff unwahrscheinlich ist. Sollten diese Erwartungen nicht zutreffen, so müsste die Emission im Einzelstrang annähernd komplett gelöscht sein, da hier APBI von der am leichtesten zu oxidierenden Base



(Guanin) flankiert ist (vgl. DNA15, Kapitel 3.3). Wird die Emissionsintensität von DNA62 mit dem reinen Farbstoff **11** verglichen (Abb. 95), zeigt sich, dass die Intensität annähernd übereinstimmt. Eine Löschung der APBI-Fluoreszenz im Einzelstrang kann somit ausgeschlossen werden.

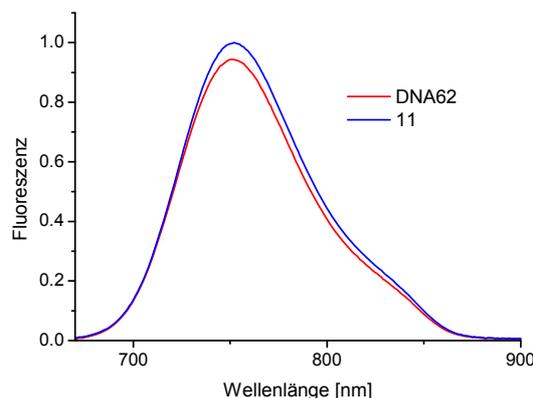
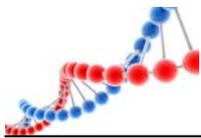


Abb. 95: Vergleich der Emissionssintensität von DNA62 mit dem APBI-Chromophor 11 in DMSO.

In den Doppelsträngen ist die Intensität für alle vier Gegenbasen gleich. Es lässt sich somit keine Präferenz für eine der vier Gegenbasen erkennen. Sollte es zu reduktiven oder oxidativen Ladungstransferprozessen kommen, so gilt es als sehr unwahrscheinlich oder sogar als unmöglich, dass dies für alle vier Nukleotide mit der gleichen Ladungstransferrate geschieht. Es muss folglich einen anderen Grund für die Fluoreszenzlöschung geben.

Da die Verschiebung sowohl der UV/Vis-Absorptions-, als auch der Emissionsmaxima bei allen Doppelstränge vergleichbar ist, ist eine strukturelle Veränderung des APBI Grundgerüsts anzunehmen.^[266]

Abb. 96 zeigt noch einmal die berechnete Struktur des APBI mit einem Verdrehungswinkel von ca. 24° .^[266] Diese energetisch günstigste Geometrie des Chromophors wird sich auch durch den Einsatz als künstliche Base in einen einzelsträngigen Oligonukleotid nicht sonderlich verändern, da dieser keine definierte Form besitzt. Durch Zugabe eines passenden Gegenstrangs bildet sich jedoch die steife und wohl definierte Struktur des DNA-Doppelstrangs. Da sich der Chromophor nun aufgrund von π -Stapelwechselwirkungen mit den benachbarten Basen im



Inneren des Basenstapels befindet, schränkt sich dessen räumliches Platzangebot stark ein. Der Gedanke liegt nahe, dass sich wegen der sterischen Bedingungen in der starren Doppelhelix, der Verdrehungswinkel stark abflacht und sich die Pyrrolidinringe planar zur aromatischen PBI-Ebene verdrehen müssen. Durch diese Umgestaltung der Molekülgeometrie verändert sich zusätzlich die Überlappung der Orbitale und das aromatische System wird bis in die Pyrrolidinringe erweitert.

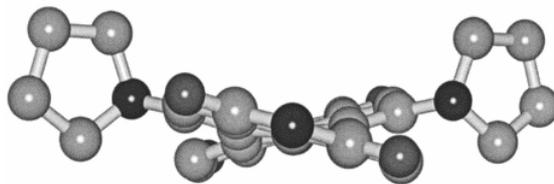


Abb. 96: Berechnete Geometrie des APBI-Chromophors.^[266]

Dies bedeutet, dass im photoangeregten APBI durch diese Abflachung und einer somit besseren Überlappung der Orbitale ein interner Ladungstransfer zwischen den elektronenreichen Aminengruppen und dem elektronenarmen Perylenbisimidgrundgerüst stattfindet, wodurch die Fluoreszenzquantenausbeute deutlich gesenkt wird.^[266, 308]

Um eine Information über die Stabilität der Doppelstränge zu erhalten, wurden Schmelztemperaturuntersuchungen durchgeführt. Alle gemessenen Werte befinden sich in einem engen Bereich zwischen 63.7 und 65.8 °C. Auch hier zeigt sich wieder die besondere Stellung von A als Gegenbase zur APBI-Modifikation, da dieser Duplex die höchste Schmelztemperatur aufweist. Zur Überprüfung des Einflusses des Chromophors, wurden die Schmelztemperaturen mit dem eines unmodifizierten Doppelstrangs verglichen, der anstelle des APBI ein Guanin aufweist.^[239]

DNA62a: 3'-AGT-CAC-TG**G**-GTC-TGA-CG-5'

DNA66: 5'-TCA-GTG-AC**C**-CAG-ACT-GC-3'

Es lässt sich deutlich erkennen, dass die APBI-Modifikation den Duplex um 5.7 °C destabilisiert. Dies wurde erwartet, da DNA-Modifikationen, die über einen glykolartigen Linker in Oligonukleotide eingebaut wurden, zur lokalen Störung der DNA-Struktur führen.



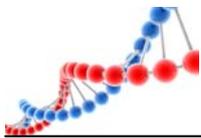
Tabelle 17: Schmelztemperaturen von DNA62 im Einzel- und Doppelstrang und von DNA62a-66.

DNA	T_m [°C]
DNA62-63	63.8
DNA62-64	65.8
DNA62-65	63.7
DNA62-66	65.0
DNA62a-66	70.7 ^[239]

Für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute von **11** wurde als Vergleichssubstanz ATTO 700 ($\Phi = 25\%$ in Wasser), ein kommerziell erhältlicher und wasserlöslicher Fluorophor der Firma ATTO-TEC GmbH verwendet. Die ermittelte Quantenausbeute von **11** in DNA62 in Wasser beträgt 2.1 %.

Das Kontrollexperiment mit DNA62 hat eindeutig ergeben, dass das photoangeregte dipyrrolidinsubstituierte Perylenbisimid in DNA keine Redoxaktivität aufweist. Zusätzlich ist aus vielen Veröffentlichungen bekannt, dass diese Chromophore miteinander aggregieren können und die sich so ausbildenden starken excitonischen Wechselwirkungen einen Einfluss auf das UV/Vis-Absorptions- und Emissionsverhalten besitzen.^[293, 294, 306] Es ist somit durchaus naheliegend, diesen neuen, veränderten Perylenbisimidbaustein in die von *Wagenknecht et al.* entwickelte^[169] und in den Kapiteln 2.7 und 3.4 näher beschriebene SONDENSEQUENZ einzubauen und sein Potential für die SNP-Detektion zu überprüfen.

DNA67 entspricht in seiner Basenabfolge exakt der von *Wagenknecht et al.* entwickelten Modellsequenz zur Detektion einer Punktmutation bzw. Deletion. Als einziger Unterschied ist der neue Chromophor **11** an die Position des ursprünglichen unmodifizierten Perylenbisimids getreten. Als Gegenstränge dienen fünf Oligonukleotide, die in an der zu untersuchenden SNP-Position ein alternierendes Nucleosid bzw. eine Deletion besitzen.



DNA67: 3'-CAG-TCA-**APAAP**-ACG-TAC-GT-5'
 DNA68: 5'-GTC-AGT- C **A** C -TGC-ATG-CA-3'
 DNA69: 5'-GTC-AGT- C **T** C -TGC-ATG-CA-3'
 DNA70: 5'-GTC-AGT- C **G** C -TGC-ATG-CA-3'
 DNA71: 5'-GTC-AGT- C **C** C -TGC-ATG-CA-3'
 DNA72: 5'-GTC-AGT- C **_** C -TGC-ATG-CA-3'

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum zeigt sowohl für den Einzel-, als auch für die Doppelstränge den typischen Kurvenverlauf des monomeren Chromophors. Dies bedeutet, dass sich weder bei DNA67, noch bei den fehlgepaarten Doppelsträngen excitonische Wechselwirkungen ausbilden. Die Bande für den $S_0 \rightarrow S_1$ Übergang ist bei allen Kurven in Vergleich zu DNA62 um ca. 10 nm für die Doppelstränge und um 18 nm für den Einzelstrang bathochrom verschoben. In Anbetracht der vorhergehenden Erklärung für dieses Verhalten deutet dies darauf hin, dass sich bereits in DNA67 die Molekülgeometrie des Chromophors verändert.

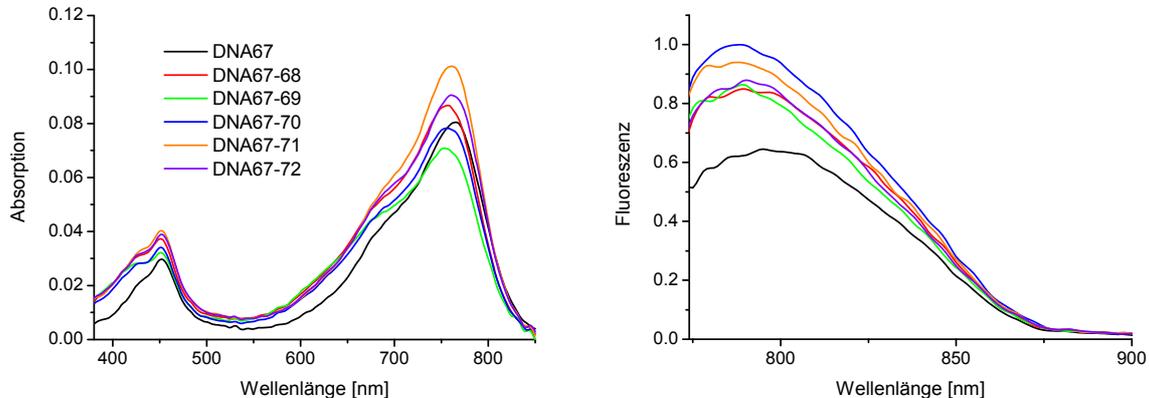
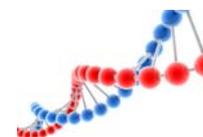


Abb. 97: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von DNA67 im Einzel- und Doppelstrang; $\lambda_{exc} = 760$ nm.

Die Emissionsspektren des Einzel- und Doppelstranges sind extrem intensitätsschwach. Um dennoch akzeptable Werte zu erhalten, wurde im Maximum der UV/Vis-Absorption bei 760 nm angeregt und die Schlitzbreite auf 8 nm erweitert. Die Fluoreszenzspektren sind aufgrund der Anregungswellenlänge nicht vollständig, lassen aber trotzdem eine verlässliche Interpretation zu. Alle Emissionen zeigen wieder eine breite, strukturlose Bande. Die Emissionsintensität von DNA67 ist am



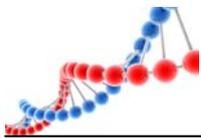
schwächsten. Dieses Resultat deckt sich mit den erhaltenen UV/Vis-Absorptionsspektren, die für DNA67 die stärkste Abflachung des Chromophors vermuten lassen.

Tabelle 18: UV/Vis-Absorptionsmaxima von DNA62 und DNA67 im Einzel- und Doppelstrang.

DNA	UV/Vis-Absorption		Emission
	$\lambda_{\max 1}$ [nm]	$\lambda_{\max 2}$ [nm]	λ_{\max} [nm]
DNA62	450	747	778
DNA67	452	765	795
DNA67-68	451	757	~ 786
DNA67-69	451	753	~ 786
DNA67-70	451	757	~ 786
DNA67-71	452	761	~ 786
DNA67-72	452	760	~ 786

Um eine effektive Aussage über die geringe Emissionsintensität von DNA67 zu erhalten, wurde auch diese Sequenz direkt mit dem reinen Chromophor **11** verglichen. Die Messung ergab, dass die Emission von DNA67 sehr stark gelöscht wird (min. 98 %).

Da sich im Anregungsspektrum keinerlei excitonische Wechselwirkung zwischen den beiden Chromophoren zeigt, ist eine Löschung aufgrund von Dimer-Wechselwirkungen und eines sich daraus ergebenden intermolekularen Ladungstransferprozessen auszuschließen. Die einzig plausible Erklärung liegt daher in einer veränderten Molekülgeometrie und einem damit verbundenen intramolekularen Ladungstransfer. Da bei DNA67 auch der Einzelstrang bereits bathochrom verschoben ist (im Vgl. zu DNA62), wird anscheinend bereits hier durch eine kurze Selbstkomplementarität der random coil vororganisiert, was die Struktur des Farbstoffes beeinflusst. Zusätzlich ist die Emission für alle DNA67 Proben deutlich stärker gelöscht, als dies bei DNA62 der Fall ist. Anscheinend beeinflussen sich die zwei nahe zusammenliegenden, sehr großen Chromophore sterisch so stark, dass der Verdrehungswinkel stärker verkleinert wird und das Gesamtsystem somit flacher wird.



Bei Betrachtung der Schmelztemperaturen der Doppelstränge zeigt sich, dass keine der Gegenbasen eine Präferenz für die Sondensequenz DNA67 besitzt. Alle ermittelten Temperaturen bewegen sich in einem engen Bereich zwischen 50.5 und 53.6 °C. Ein direkter Vergleich mit den bekannten Werten aus dem ursprünglichen *Wagenknecht et al.* System zeigt jedoch, dass die APBI-Chromophore einen stärker destabilisierenden Einfluss auf die Doppelhelix besitzen, als die unmodifizierten PBI-Bausteine. Dies ist aufgrund der gesteigerten Molekülgröße und der somit stärkeren sterischen Hinderung im Doppelstrang nicht sonderlich verwunderlich.

DNA67a 3'-CAG-TCA-**XAX**-ACG-TAC-GT-5'

Tabelle 19: Schmelztemperaturen von DNA67a.

DNA	X = APBI	X = PBI ^[169]
	T _m [°C]	T _m [°C]
DNA67a-68	51.8	54.8
DNA67a-69	52.2	56.8
DNA67a-70	50.5	54.1
DNA67a-71	53.0	55.8
DNA67a-72	53.6	57.9

Um dennoch die excitonischen Wechselwirkungen zwischen zwei APBI-Chromophoren in der DNA untersuchen zu können, wurde die selbstkomplementäre Sequenz DNA73 synthetisiert, in der die künstlichen Bausteine im Doppelstrang ein diagonales Basenpaar ergeben.

DNA73: 3'-GCA-CGT-AT**AP**-**C** AT-ACG-TGC-5'

DNA73: 5'-CGT-GCA-TA **C** -**APT**A-TGC-ACG-3'

Beide Chromophore werden durch das starre Gerüst des DNA-Doppelstrangs in räumliche Nähe zueinander gezwungen. Hierdurch bilden sie ein sogenanntes cofaciales Dimer aus. Anhand eines Modellsystems wurde ermittelt, dass sich beide Moleküle aufgrund der sterischen Hinderung zwischen den Pyrrolidinringen nur in einer isomeren Form (Abb. 98) gegenüberstehen können.^[294]

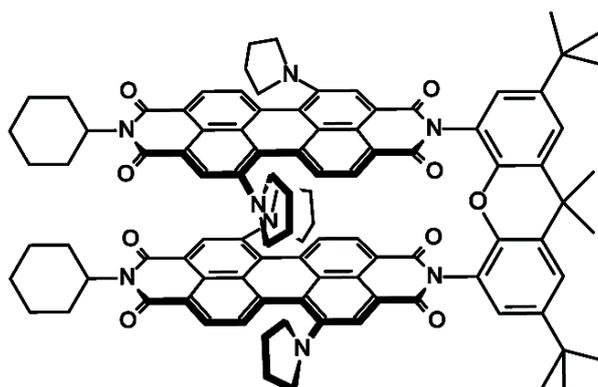


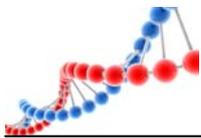
Abb. 98: Bevorzugtes Isomer eines cofacialen APBI-Dimers.^[294]

Diese cofaciale Aggregation des APBI lässt sich sehr deutlich aus der gespiegelten UV/Vis-Absorption im NIR-Bereich ableiten, was für starke excitonische Wechselwirkungen zwischen den gestapelten Chromophoren spricht. Noch klarer lässt sich die Dimerisierung beim direkten Vergleich der UV/Vis-Absorptionsverhältnisse der beiden vibronischen Übergänge der $S_0 \rightarrow S_1$ Anregung erkennen (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: UV/Vis-Absorptionsverhältnisse des $S_0 \rightarrow S_1$ – Übergangs von DNA73 als Einzel- und Doppelstrang

DNA	$\frac{\nu_0 \rightarrow \nu_1}{\nu_0 \rightarrow \nu_0}$
DNA73	0.8
DNA73-73	1.3

Aufgrund der Kopplung der parallelen Dipolübergangsmomente der Monomere kommt es zu einer Aufspaltung in zwei unterschiedliche Exciton-Energieniveaus (vgl. Kapitel 2.3 und 2.4). Das neue Hauptmaximum bei 686 nm entspricht dem Übergang aus dem Grundzustand in das unterste vibronische Niveau des oberen Exciton-LUMOs, während das kleinere Maximum (ca. 733 nm) den Übergang in den, nach der Excitontheorie eigentlich symmetrisch verbotenen, unteren LUMO-Zustand beschreibt.^[293, 294] Dieser normalerweise verbotene Übergang wurde auf der Basis von vibronischen Kopplungen im Exciton-Zustand von Dimeren erklärt, welche die Symmetrieeinschränkungen in Übereinstimmung mit dem einfachen Excitonmodell abbauen.^[309, 310] Zusätzlich sind beide Maxima im Vergleich zur Monomer-Absorption



deutlich hypsochrom ($\Delta\lambda \approx 7 - 10 \text{ nm}$) verschoben. Dies alles ist charakteristisch für die Ausbildung von sog. H-Aggregaten.^[306]

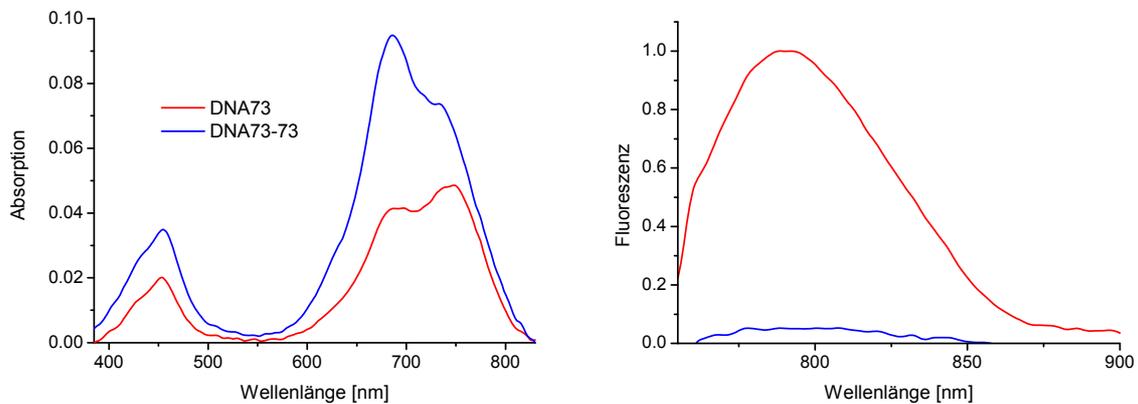
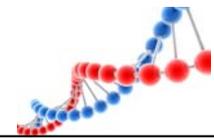


Abb. 99: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von DNA73 und DNA73-73; $\lambda_{\text{exc}} = 750 \text{ nm}$.

Im Fluoreszenzspektrum wird die Ausbildung von nicht fluoreszierenden H-Aggregaten im Doppelstrang noch bekräftigt. Die Emission von DNA73 als Einzelstrang ist wie erwartet breit und ohne Feinstruktur. Im Doppelstrang sinkt die Intensität auf fast null ab ($< 5 \%$). Eine zuverlässige Bestimmung des Fluoreszenzmaximums ist durch die sehr geringe Signalstärke nicht mehr möglich.

Untersuchungen im Modellsystem haben zusätzlich ergeben, dass auf die photochemische Anregung des APBI-Dimers innerhalb von 170 fs ein Ladungstransfer von einem Chromophor auf den anderen erfolgt ($\text{APBI}^{*+} - \text{APBI}^{\cdot-}$). Dies wird ermöglicht durch einen Symmetriebruch im untersten angeregten Singulett-Zustand.^[294] Diese Beobachtung deckt sich zusätzlich mit weiteren Erkenntnissen über photoangeregte Dimere in photosynthetischen Reaktionszentren, die einen ausgeprägten, intradimeren Ladungstransfercharakter besitzen.^[306, 311, 312]

Das CD-Spektrum von DNA73-73 zeigt zwischen 211 nm und 260 nm einen negativen Cotton-Effekt, einen Nulldurchgang bei 260 nm und einen positiven Cotton-Effekt zwischen 260 nm und 317 nm. Diese Signalstruktur ist charakteristisch für die B-DNA-Konformation.^[313] Auch die excitonischen Wechselwirkungen zwischen



den beiden Chromophoren werden durch mehrere Banden bestätigt. Von 317 nm bis 379 nm zeigt sich ein sehr ausgeprägter, negativer *Cotton*-Effekt, der von 379 nm bis 482 nm einen positiven Wert aufweist. Ab ca. 590 nm bis 766 nm besitzt das Spektrum erneut einen breiten negativen *Cotton*-Effekt. Die Helikalität der Dipolübergangsmomente ist negativ. Die gekuppelten Chromophore folgen somit nicht der durch die Doppelhelix induzierten rechtsgängigen Helikalität, sondern weisen eine linksgängige Orientierung auf.

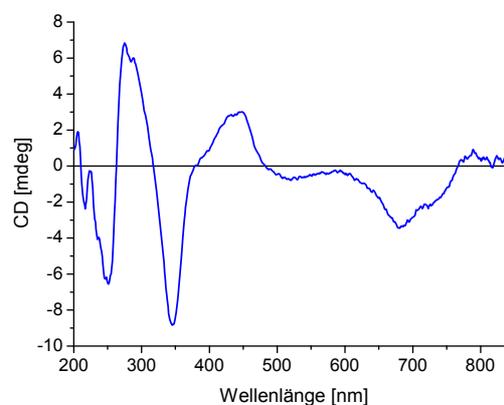


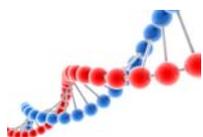
Abb. 100: CD-Spektrum von DNA73-73.

Um einen Einfluss des diagonalen APBI-Basenpaares auf die Duplexstabilität zu untersuchen, wurden Schmelztemperaturmessungen mit DNA73 in Vergleich zu einem unmodifizierten Referenzduplex vorgenommen. Dieser besitzt ein Guanin anstelle des Chromophors.

DNA74: 3'-GCA-CGT-ATG-CAT-ACG-TGC-5'

DNA74: 5'-CGT-GCA-TAC-GTA-TGC-ACG-3'

Es zeigt sich, dass der modifizierte Doppelstrang eine deutlich höhere Schmelztemperatur aufweist. Dies ist interessant, da DNA73 nicht nur ein, sondern zwei Chromophor-Linker-Motive besitzt, welche die Duplexstabilität normalerweise stark stören müssten.^[239, 252] Die Erklärung für die positive Abweichung ist die starke, excitonische Wechselwirkung zwischen den beiden Chromophoren. Diese Kopplung kompensiert nicht nur die destabilisierende Wirkung der beiden glycolartigen Linker,



sondern stabilisiert den Duplex zusätzlich um 3.5 °C. Somit können die beiden APBI-Farbstoffe als hydrophob interagierendes, diagonales Basenpaar betrachtet werden. Dieser Effekt deckt sich mit anderen künstlichen diagonalen Basenpaaren in Oligonukleotiden.^[169, 217, 220, 237, 314, 315]

Tabelle 21: Schmelztemperaturen von DNA73-73 und DNA74-74.

DNA	T _m [°C]
DNA73-73	78.0
DNA74-74	74.5

4.5. pH-Wert abhängige spektroskopische Untersuchung aminoperylenebisimidmodifizierter Oligonukleotide

Zur kontrollierten Veränderung des Redox-Verhaltens des Perylenbisimids wurde dessen aromatisches Grundgerüst mit zwei Pyrrolidinringen substituiert. Der verwendete Heterozyklus kann jedoch nicht nur als Elektronendonor, sondern auch als Lewis-Base fungieren. In der Literatur findet man zahlreiche Säurekonstanten, deren Werte je nach Amid-Substituent stark variieren.

Tabelle 22: Säurekonstanten verschiedener Pyrrolidinderivate.^[316]

Molekül	pK _S -Wert	Molekül	pK _S -Wert
	11.27		5.01
	10.46		5.28
	3.57		4.81



Aufgrund dieser großen Varianz ($pK_S = 3.57 - 11.27$),^[316] kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass der neue APBI-Baustein in der verwendeten NaP_i -Pufferlösung bei einem pH-Wert von 7 einfach oder vollständig protoniert bzw. deprotoniert vorliegt. Um den Einfluss der Protonenstärke auf den, in ein Oligonukleotid eingebrachten Baustein zu prüfen, wurden die bereits vorgestellten Oligonukleotide DNA62 und DNA73 zusätzlich bei zwei weiteren pH-Werten untersucht. Es wurden die beiden extremen pH-Werte 3 und 13 gewählt, weil diese gut mit dem verwendeten Phosphatpuffer eingestellt werden konnten. Somit musste das Puffersystem nicht gewechselt werden, was einen direkten Vergleich der erhaltenen Ergebnisse erlaubt. Zusätzlich gewährleisten diese Werte, dass bei pH 3 das APBI vollständig protoniert und bei pH 13 deprotoniert vorliegt, wodurch es möglich wird, eventuelle Unterschiede des optischen Verhaltens präzise auf den Protonierungsgrad zurückzuführen.

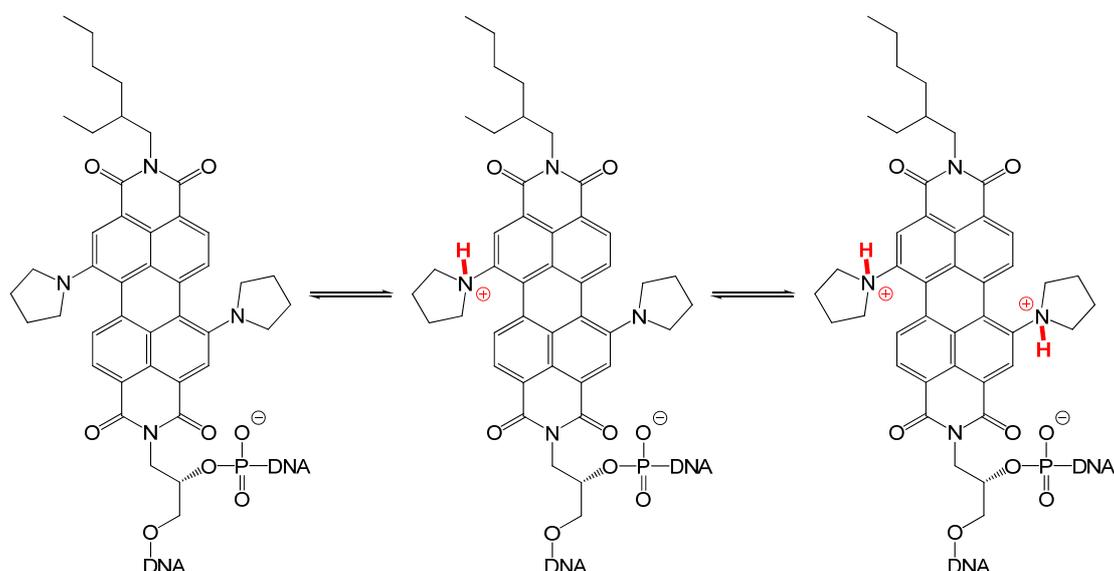


Abb. 101: Mögliche Protonierungszustände des Chromophors 11 in DNA.

Als erster Schritt musste überprüft werden, inwieweit eine vollständige Protonierung des Amino-perylenbisimids das Redoxverhalten des Chromophors beeinflusst. Das APBI-Derivat **13** wurde in Anwesenheit von 0.3 % Dichloressigsäure in DCM cyclovoltammetrisch untersucht. Als Leitsalz diente Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat.

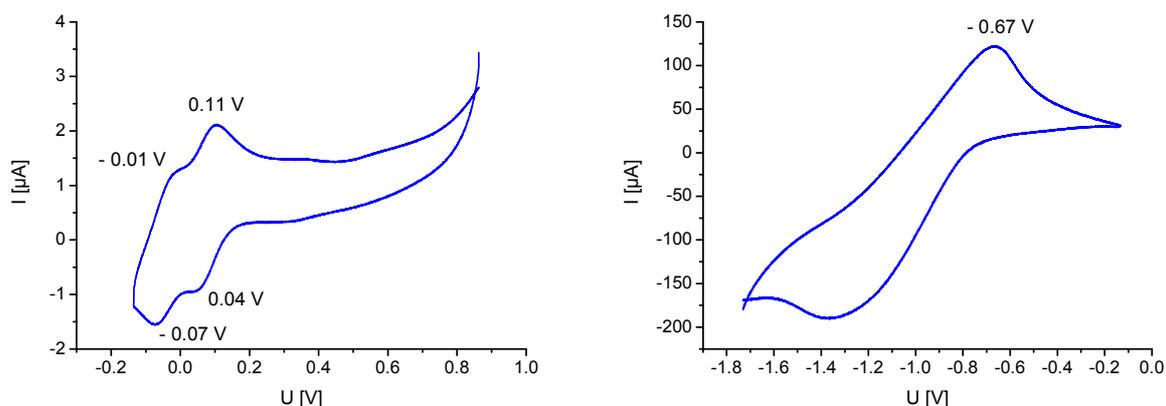
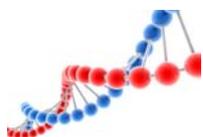


Abb. 102: Cyclovoltammogramm des Chromophors 13 in DCM + 0.3 % Dichloressigsäure; bereits gegen Fc korrigiert; links: Reduktiver Zyklus; rechts: Oxidativer Zyklus.

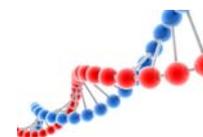
Der Farbstoff besitzt im protonierten Zustand zwei reversible Oxidationspotentiale, die sich bei +0.08 V und -0.04 V (vs. Fc) bzw. bei +0.71 und +0.59 V (vs. NHE) befinden. Der Abstand der jeweiligen Halbpotentiale beträgt 60 – 70 mV. Zusätzlich zeigt sich ein irreversibles Reduktionspotential bei -0.67 V. Ein weiteres Signal bei ca. -1.36 V ist auf eine Zersetzung des Lösungsmittels in Gegenwart von Protonen zurückzuführen.

Tabelle 23 Reduktions- und Oxidationspotentiale von 11 im Grund- und im angeregten Zustand in DCM + 0.3 % Dichloressigsäure.

	E_{red} [V]	E_{ox1} [V]	E_{ox2} [V]	E^*_{red} [V]	E^*_{ox1} [V]	E^*_{ox2} [V]
gegen Fc	-0.67 ^[a]	-0.04	+0.08	+1.03	-1.74	-1.62
gegen NHE	-0.04	+0.59	+0.71	+1.66	-1.11	-0.99

[a] irreversibel

Um jedoch eine Aussage über das Oxidations- bzw. Reduktionsvermögen des protonierten Chromophors **11** zu erhalten, müssen die Potentiale nicht im Grundzustand, sondern im photoangeregten Zustand betrachtet werden. Unter Verwendung von $E_{00} = 1.7 \text{ eV}$ (730 nm) betragen die angeregten Oxidationspotentiale -1.74 V und -1.62 V und das angeregte Reduktionspotential +1.03 V (vs. Fc). Unter Zuhilfenahme der *Rehm-Weller*-Gleichung^[43, 44] zeigt sich, dass die der Oxidation von Guanin zugrundeliegende Triebkraft (ΔG) mit ca. -0.1 –



-0.3 eV negativ ist. Das bedeutet, dass durch die Protonierung der beiden *N*-Pyrrolidiny-Substituenten der elektronenschiebende Charakter des Amins verloren geht. Somit ist ein photoinduzierter Ladungstransfer zwischen dem Chromophor und Guanin wieder möglich. Eine Reduktion der natürlichen Basen ist auch im protonierten Zustand unmöglich. Es muss jedoch am Rande noch erwähnt werden, dass die für die Basen benutzten Potentiale im pH-neutralen Bereich bestimmt worden sind. Leider kann durch Literatur nicht belegt werden, ob sich deren Potentiale in einer sauren Umgebung ändern oder stabil bleiben.

Um ausschließlich den Einfluss des pH-Wertes der Pufferlösung auf den Chromophor in einem Oligonukleotid zu überprüfen, wurde zuerst nur der Einzelstrang von DNA62 untersucht. Hierdurch kann eine Einwirkung der Doppelhelix auf die geometrische Ausrichtung und damit auf das optische Verhalten des Farbstoffes ausgeschlossen werden.

Die UV/Vis-Absorptionsspektren zeigen annähernd keinen Einfluss des pH-Wertes auf die $S_0 \rightarrow S_2$ Bande. Diese ist für alle Kurven gleich und besitzt ihr Maximum bei ca. 449 nm. Im NIR-Bereich zeigen alle Kurven die typische Gestalt des monomeren Chromophors..

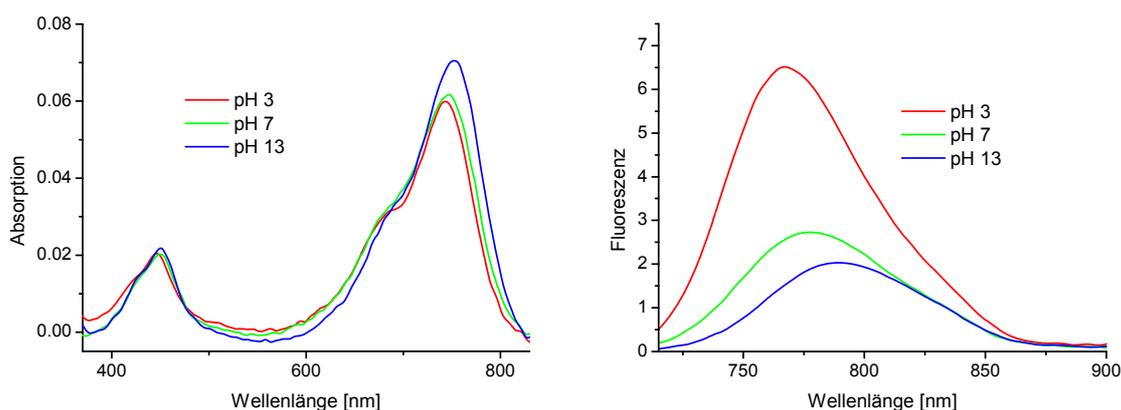
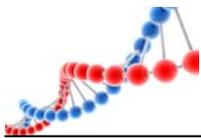


Abb. 103: UV/Vis-Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von DNA62 bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

Hier lässt sich jedoch eine deutlich bathochrome Verschiebung mit steigendem pH-Wert von 743 nm (pH 3) über 747 nm (pH 7) auf 752 nm (pH 13) feststellen. Auch die



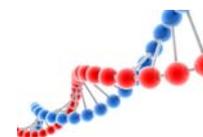
optische Dichte der einzelnen Kurven variiert im NIR-Bereich minimal. Dies deutet auf eine leichte Veränderung des Extinktionskoeffizienten der $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande hin

Das Fluoreszenzspektrum lässt auch einen deutlichen Einfluss des pH-Wertes erkennen. Auch hier kommt es analog zum UV/Vis-Absorptionsspektrum zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums von 767 nm (pH 3) über 778 nm (pH 7) auf 789 nm (pH 13). Zusätzlich sinkt mit steigendem pH-Wert die Emissionsintensität (vgl. Tabelle 24).

Tabelle 24: UV/Vis-Absorptions- und Emissionsdaten von DNA62 bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

pH	Absorption		Emission	
	$\lambda_{\max 1}$ [nm]	$\lambda_{\max 2}$ [nm]	λ_{\max} [nm]	rel. Intensität
3	448	743	767	6.52
7	449	747	778	2.73
13	450	752	789	2.03

Die beobachteten Effekte lassen sich gut über den Protonierungsgrad des Chromophors erklären. Bei pH 3 sind beide Aminfunktionen der Pyrrolidinringe protoniert. Die Elektronendichte des Aromaten wird durch die beiden positiven Ladungen erniedrigt. Hierdurch verschwindet der bathochrome Effekt der Pyrrolidinringe vollständig (vgl. Kapitel 4 - Einführung). Zusätzlich kann es in dem photoangeregten Farbstoff nicht mehr zu einem intramolekularen Ladungstransfer zwischen den Pyrrolidinsubstituenten und dem aromatischen Gerüst kommen. Daher wird die Emission nicht mehr verringert. Bei pH 13 dreht sich dieses Bild vollständig um. Beide Aminfunktionen sind hier vollständig deprotoniert. Dies bewirkt, dass die Elektronendichte im PBI durch die Substituenten stark erhöht wird. Hieraus resultiert die starke bathochrome Verschiebung in den Spektren. Zusätzlich wird die Fluoreszenz des angeregten APBI durch den möglichen internen Ladungstransfer wirksam gelöscht. pH 7 liegt zwischen diesen beiden Extremfällen. Da auch das optische Verhalten des Chromophors weder mit pH 3 noch mit 13 übereinstimmt, sondern irgendwo in der Mitte angesiedelt ist, liegt die Vermutung nahe, dass das



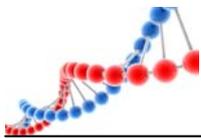
Molekül weder vollständig protoniert noch deprotoniert ist. Es bildet sich bei pH 7 folglich ein Zustand, der dem einfach protonierten ähnlich sein könnte.

Um eine Interpretation der erhaltenen Doppelstrang-Ergebnisse führen zu können, musste die Ausbildung einer Doppelhelix bei den extremen pH-Werten bestätigt werden. Hierzu wurde die Schmelztemperatur aller Systeme bestimmt. Es zeigte sich, dass bei pH 3 kein kooperativer Effekt während einer Temperaturerhöhung oder -erniedrigung eintritt. Dies deutet auf nicht vorhandene *Watson-Crick*-Basenpaarungen zwischen den beiden Einzelsträngen hin. Bei pH 13 lassen sich dagegen bei allen vier Doppelsträngen deutliche kooperative Effekte beobachten. Dies beweist, dass bei diesem pH-Wert Basenpaarungen und somit ein Doppelstrang ausgebildet werden. Jedoch ist die Schmelztemperatur bei DNA62-65 und DNA62-66 mit ca. 9°C sehr gering und bei DNA62-63 und DNA62-64 stark erniedrigt. Dies deutet auf eine starke Destabilisierung der Doppelhelix hin. Adenin als Gegenbase zu APBI besitzt analog zu den Messungen bei pH 7 (vgl. Kapitel 4.4) auch bei pH 13 eine Sonderrolle. Der Schmelzpunkt ist im Vergleich zu den übrigen mit einer Differenz von 8 – 18 °C am Höchsten. Das A–APBI-Basenpaar scheint den Strang deutlich zu stabilisieren.

Tabelle 25: Schmelztemperaturen der DNA62 Doppelstränge bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

DNA	T_m [°C]		
	pH = 3	pH = 7	pH = 13
DNA62-63	--	63.8	19.3
DNA62-64	--	65.8	27.5
DNA62-65	--	63.7	9.5
DNA62-66	--	65.0	9.0

Die Destabilisierung des DNA-Doppelstranges bei den extremen pH-Werten kann durch Betrachtung der pK_S -Werte der einzelnen Basen verstanden werden. Bei pH 3 liegen die Nukleoside teilweise protoniert vor. Dies scheint eine Ausbildung von stabilen *Watson-Crick*-Basenpaarungen unmöglich zu machen. Die komplementären Oligonukleotide formen deswegen wohl keinen Doppelstrang, sondern bleiben einzelsträngig. Das wird durch das Fehlen eines kooperativen Effektes während der



Schmelztemperaturbestimmung bestätigt. Bei pH 13 sind die Doppelhelices in Vergleich zu pH 7 „nur“ stark destabilisiert. Hier verursacht eine mögliche Deprotonierung der Basen ebenfalls eine Störung der *Watson-Crick*-Basenpaarung. Diese scheint jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei pH 3 zu sein.

Tabelle 26: pK_S-Werte der natürlichen Nukleoside.^[317, 318]

Nukleosid [N]	pK _S	
	NH → N ⁻	NH ⁺ → N
Adenosin	15.5	3.5 – 3.8
Guanosin	9.5 – 9.8	3.4
Cytidin	14.7	4.2 – 4.4
Thymidin	9.9 – 10.4	-4.8 – -5

Durch Hybridisierung mit den Gegensträngen ändert sich das eben beschriebene optische Verhalten von DNA62 leicht. Die Doppelhelix übt somit einen Einfluss auf den Chromophor aus, was in Bezug zu Kapitel 4.4 nicht verwunderlich ist. Bemerkenswert ist, dass sich die Doppelstränge mit den drei möglichen Gegenbasen, T, G und C zu APBI auch bei pH 3 und 13 ähnlich verhalten. Adenin besitzt hier wieder eine Sonderfunktion. Deswegen werden im Folgenden nur die Spektren für die stabilsten Oligonukleotide DNA62-63 (APBI – G) und DNA62-64 (APBI – A) besprochen.

Das UV/Vis-Absorptionsverhalten von DNA62-63 und DNA62-64 stimmt im weitesten mit dem des Einzelstranges überein. Erstaunlich ist, dass bei pH 3 der „Doppelstrang“ in beiden Fällen einen Einfluss auf das sonst völlig unveränderte S₀ → S₂ Absorptionsverhalten ausübt. Die Reihenfolge der bathochromen Verschiebung wird durch die Ausbildung einer starren Doppelhelix verändert. Sie ist nun von der geringsten zur höchsten Verschiebung pH 3, pH 13, pH 7.

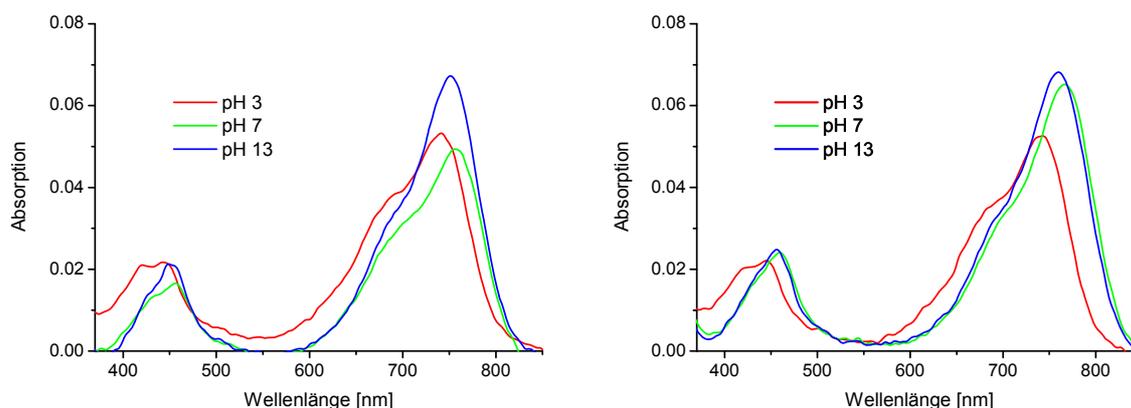
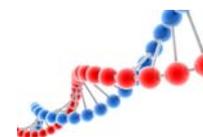
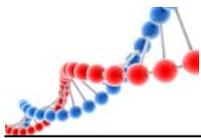


Abb. 104: UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA62-63 (links) und DNA62-64 (rechts) bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

Die Maxima bei pH 3 decken sich ziemlich mit den erhaltenen Werten für den Einzelstrang DNA62. Dies war so zu erwarten, da hier entsprechend der Schmelztemperaturmessungen ein Doppelstrang angezweifelt werden kann. Da die Abflachung des APBI-Gerüsts und somit die bathochrome Verschiebung abhängig von der Stabilität bzw. Flexibilität der Doppelhelix ist, sind beide Effekte bei pH 7 am Markantesten. Die Anwesenheit von Adenin als Gegenbase verstärkt zusätzlich die Änderung der Molekülgeometrie, da mit ihr der bathochrome Effekt bei pH 7 und 13 am Ausgeprägtesten ist.

Tabelle 27: UV/Vis-Absorptionsdaten von DNA62-63 und DNA62-64 bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

pH	DNA62-63		DNA62-64	
	$\lambda_{\max 1}$ [nm]	$\lambda_{\max 2}$ [nm]	$\lambda_{\max 1}$ [nm]	$\lambda_{\max 2}$ [nm]
3	421 / 443	742	423 / 445	742
7	456	756	459	767
13	452	751	456	760



Die Emissionsspektren ergeben eine ähnliche Interpretation der bereits erhaltenen Ergebnisse. Um eine eventuell durch den pH-Wert bedingte Veränderung des Extinktionskoeffizienten bei der Anregungswellenlänge zu kompensieren, wurden die Spektren gegen die jeweilige optische Dichte bei 700 nm korrigiert.

Auch hier kann der Protonierungsgrad in Verbindung mit der Doppelhelix als Erklärung für diese Ergebnisse herangezogen werden. Die Fluoreszenzintensität bei pH 13 sollte eigentlich am Geringsten und die Verschiebung ins Rote am Größten ausfallen, da hier beide freien Elektronenpaare für einen internen Ladungstransfer zur Verfügung stehen. Jedoch wird die Molekülgeometrie des Amino-perylenbisimids bei pH 7 durch die Ausbildung der stabilsten Doppelhelix deutlich stärker als bei pH 13 abgeflacht. Dies kompensiert vermutlich nicht nur die Effekte der vollständigen Deprotonierung, sondern übertrifft diese durch eine viel bessere Orbitalüberlappung zwischen dem elektronenarmen aromatischen PBI-Grundgerüst und den elektronenreichen Fünfringen. Bei pH 7 verursacht Adenin als Gegenbase eine zusätzliche Verstärkung der gerade genannten Effekte.

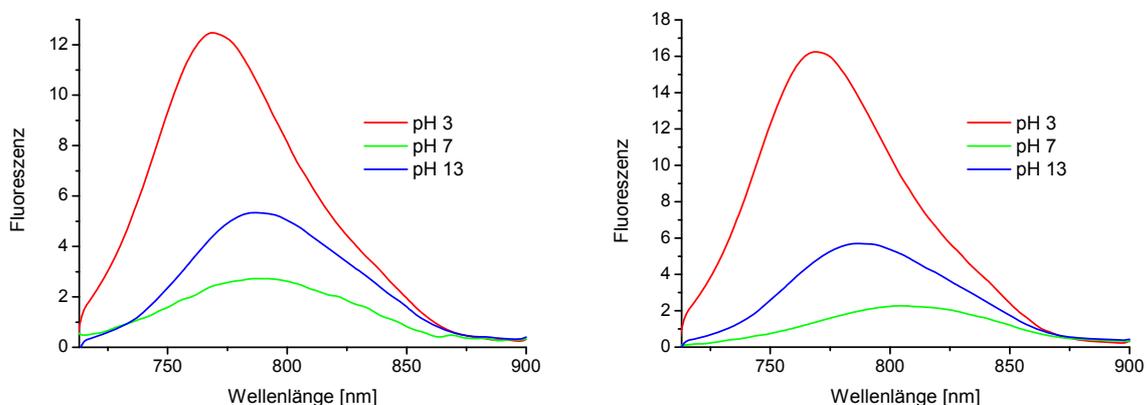


Abb. 105: Emissionsspektren von DNA62-63 (links) und DNA62-64 (rechts) bei den pH-Werten 3, 7 und 13; korrigiert gegen die optische Dichte bei $\lambda_{\text{exc}} = 700$ nm.

Die Verschiebung der Emissionsmaxima und die etwas breitere Emissionsbande bei pH 7 lassen sich in einer normierten Auftragung der Fluoreszenz leichter erkennen.

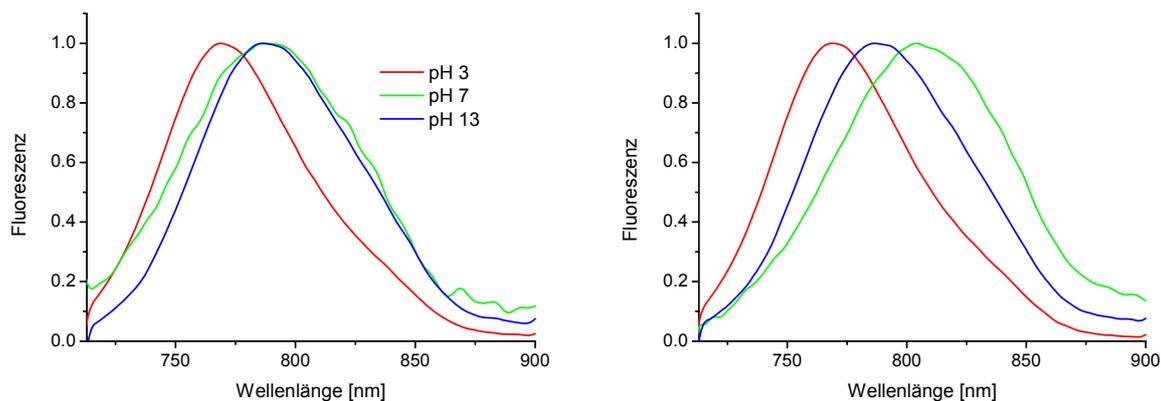
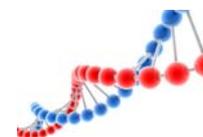


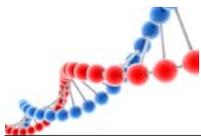
Abb. 106: Normierte Emissionsspektren von DNA62-63 (links) und DNA62-64 (rechts) bei den pH-Werten 3, 7 und 13; $\lambda_{\text{exc}} = 700 \text{ nm}$.

Tabelle 28: Emissionsdaten von DNA62-63 und DNA62-64 bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

pH	DNA62-63		DNA62-64	
	λ_{max} [nm]	rel. Intensität	λ_{max} [nm]	rel. Intensität
3	769	12.48	769	16.24
7	790	2.73	807	2.28
13	787	5.34	787	5.70

Um den Einfluss der Protonenstärke auf die Ausbildung von excitonischen Wechselwirkungen zwischen zwei APBI-Chromophoren zu überprüfen, wurde das Oligonukleotids DNA73 bei den pH-Werten 3 und 13 näher untersucht.

Hierfür musste jedoch auch erst mithilfe von Schmelztemperaturmessungen kontrolliert werden, ob sich in der jeweiligen Extremsituation überhaupt ein stabiler Doppelstrang bildet. Die erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den bereits bekannten von DNA62. Die Schmelztemperatur sinkt von pH 7 auf pH 13 um 33.5 °C! Bemerkenswert ist jedoch der Vergleich zwischen dem unmodifizierten Strang DNA74 und DNA73. Es zeigte sich erstaunlicherweise, dass die bei pH 7 bekannte, stabilisierende Wirkung des diagonalen APBI-Basenpaares bei pH 13 noch deutlicher ausgeprägt ist. Der Temperaturunterschied steigt um das 2.4fache von 3.5 °C auf 8.5 °C an. Bei pH 13 sind beide Amino-Gruppen deprotoniert, bei pH 7 kann dies nicht vollständig angenommen werden. Durch positive Ladungen im APBI-



Molekül kommt es zu einer Abstoßung zwischen den beiden Chromophoren, wodurch der stabilisierende Effekt der excitonischen Kopplung abgeschwächt wird.

Tabelle 29: Schmelztemperaturen von DNA73-73 und DNA74-74 bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

DNA	T_m [°C]		
	pH = 3	pH = 7	pH = 13
DNA73-73	--	78.0	34.5
DNA74-74	--	74.5	26.0

Die Absorptionsspektren zeigen für die Einzelstränge bei keinem der drei pH-Werte eine Ausbildung von excitonischen Wechselwirkungen. Alle Kurven besitzen die, für den monomeren Chromophor typische Form. Im Doppelstrang lässt sich eine cofaciale Aggregation der beiden APBI-Bausteine bei pH 7 und 13 wieder deutlich in der gespiegelten Kurvenform im NIR-Bereich erkennen. Dies spricht für starke excitonische Wechselwirkungen zwischen den beiden gestapelten Farbstoffmolekülen. Zusätzlich kommt es durch die Dimerisierung zu einer Blauverschiebung der NIR-Absorptionsbanden. Diese Veränderungen deuten auf H-Aggregate hin. Bei pH 3 ändert sich auch durch den kontrollierten Hybridisierungsvorgang die NIR-Absorptionsbande nicht. Das bedeutet, dass die beiden Chromophore voneinander isoliert vorliegen.

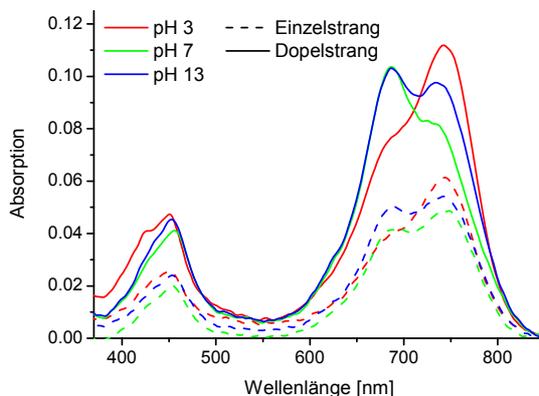
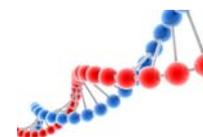


Abb. 107: UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA73 als Einzel- und Doppelstrang bei den pH-Werten 3, 7 und 13.


Tabelle 30: UV/Vis-Absorptionsdaten von DNA73 als Einzel- und Doppelstrang bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

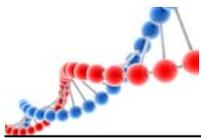
pH	DNA73			DNA73-73		
	$\lambda_{\max}1[\text{nm}]$	$\lambda_{\max}2[\text{nm}]$	$\lambda_{\max}3[\text{nm}]$	$\lambda_{\max}1[\text{nm}]$	$\lambda_{\max}2[\text{nm}]$	$\lambda_{\max}3[\text{nm}]$
3	451	~ 688	743	451	~ 688	742
7	453	690	743	456	687	729
13	453	690	742	453	687	734

Der Vergleich der UV/Vis-Absorptionsverhältnisse der vibronischen Übergänge $0 \rightarrow 1$ und $0 \rightarrow 0$ des $S_0 \rightarrow S_1$ Übergangs unterstützen die bisherige Diskussion. Bei pH 3 lässt sich keinerlei excitonische Kopplung zwischen den Molekülen erkennen, was vor Allem daran liegt, dass sich kein stabiler Doppelstrang ausbildet. Bei pH 7 und 13 zeigen sich dagegen deutliche excitonische Wechselwirkungen, wobei bei neutralem pH-Wert die Kopplung am Stärksten ausgeprägt ist.

Tabelle 31: UV/Vis-Absorptionsverhältnisse des $S_0 \rightarrow S_1$ – Übergangs von DNA73 als Einzel- und Doppelstrang bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

DNA	$\frac{V_0 \rightarrow V_1}{V_0 \rightarrow V_0}$		
	pH = 3	pH = 7	pH = 13
DNA73	0.7	0.8	0.9
DNA73-73	0.7	1.3	1.1

Die Fluoreszenz von DNA73 als Einzelstrang deckt sich vollständig mit Ergebnissen von DNA62. Die Emissionsintensität der breiten und feinstrukturlosen Banden sinkt mit steigendem pH-Wert. Zusätzlich verschiebt sich das Emissionsmaximum von 778 nm (pH 3) über 788 nm (pH 7) auf 790 nm (pH 13). Dieses Verhalten ist auf den Protonierungsgrad des Chromophors zurückzuführen, da eine geometrische Umorientierung des Chromophors im random coil auszuschließen ist. Im Doppelstrang sinkt die Emissionsintensität bei pH 7 um ca. 90 %, bei pH 13 um ca. 40 % ab. Bei pH 3 bleibt sie im Rahmen der Messgenauigkeit konstant. Eine exakte Bestimmung der neuen Fluoreszenzmaxima ist für pH 7 und 13 aufgrund der sehr flachen und intensitätsschwachen Kurve nicht möglich. Bei pH 3 kommt es zu keiner



Verschiebung des Maximums durch den kontrollierten Hybridisierungsvorgang. Die UV/Vis-Absorptionsverhältnisse der vibronischen Übergänge zeigen für pH 7 eine ausgeprägte und für pH 13 eine schwächere Kopplung zwischen den Chromophoren. Die Stärke dieser Wechselwirkung bestimmt die Effizienz des bereits besprochenen Ladungstransfercharakters zwischen den photoangeregten Molekülen. Deswegen ist die Löschung der Emissionsintensität bei pH 13 schwächer ausgeprägt, als bei pH 7. Dies unterstützt die in den UV/Vis-Absorptionsmessungen getroffene Interpretation als H-Aggregat.

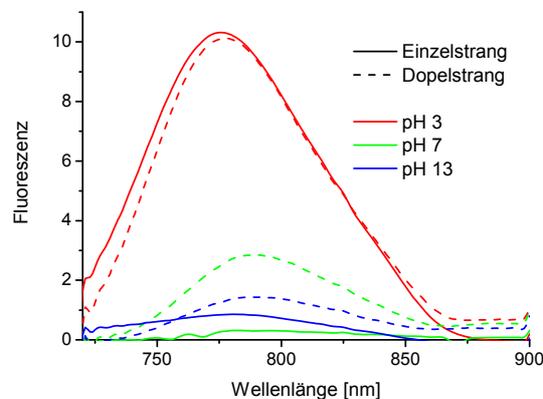
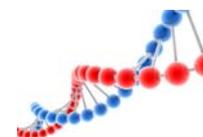


Abb. 108: Emissionsspektren von DNA73 als Einzel- und Doppelstrang bei den pH-Werten 3, 7 und 13; $\lambda_{\text{exc}} = 700 \text{ nm}$.

Tabelle 32: Emissionsdaten von DNA73 als Einzel- und Doppelstrang bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

pH	DNA73		DNA73-73	
	λ_{max} [nm]	rel. Intensität	λ_{max} [nm]	rel. Intensität
3	778	10.12	776	10.32
7	788	2.85	~ 796	0.31
13	790	1.43	~ 785	0.86

Die CD-Spektren von DNA73-73 besitzen für pH 7 und pH 13 die für die B-DNA-Konformation typische Signalstruktur zwischen 210 und 317 nm.^[313] Die excitonische Kopplung der Dipolübergangsmomente der beiden Chromophore zeigt sich zwischen 317 und 766 nm. Aufgrund der Abfolge von positiven und negativen *Cotton*-Effekten lässt sich eine negative Helikalität der Übergangsmomente ableiten. Die gekoppelten



Chromophore folgen somit nicht der durch die Doppelhelix induzierten rechtsgängigen Helikalität, sondern weisen eine linksgängige Orientierung auf. Das CD-Spektrum von DNA73-73 bei pH 3 bestätigt die bisherigen Ergebnisse, wonach sich keine definierte Doppelhelix bildet.

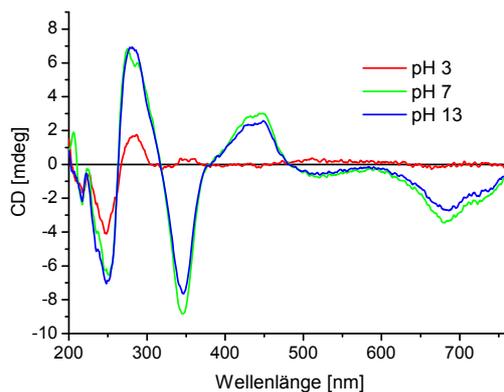
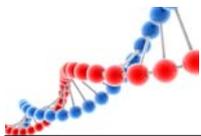


Abb. 109: CD-Spektrum von DNA73-73 bei den pH-Werten 3, 7 und 13.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der pH-Wert der Pufferlösung einen bedeutenden Einfluss auf den Protonierungsgrad des dipyrrolidinsubstituierten Perylenbisimids ausübt. Hierdurch werden dessen optische, elektronische und strukturelle Eigenschaften stark modifiziert. Zugleich verändert die Protonenstärke die Möglichkeit, von Oligonukleotiden stabile und starre Doppelstränge auszubilden, was sich auf die geometrische Umgestaltung des Chromophors innerhalb der Doppelhelix auswirkt.

4.6. Zusammenfassung

Der in Kapitel 3 beschriebene Perylenbisimidbaustein ist aufgrund seiner photoelektronischen Eigenschaften für eine breite Anwendung in der Oligonukleotidchemie weniger gut geeignet. Durch eine Modifikation des aromatischen Systems des Perylenbisimidfarbstoffkerns mit elektronenschiebenden Gruppen an den Positionen 1 und 7 der Buchtregion lassen sich die elektrochemischen Eigenschaften soweit verändern, dass Redoxprozesse mit den



Basen eines Oligonukleotids unwahrscheinlich werden. Aufgrund von Literaturdaten wurde hierfür das elektronenreiche Pyrrolidin als Substituent ausgewählt.^[191, 266, 268, 298]

Der neue Chromophor APBI konnte, ausgehend von Perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydrid, in einer dreistufigen Synthese dargestellt werden. Dazu wurde im ersten Schritt die Buchtregion an den Positionen 1 und 7 mit Bromsubstituenten modifiziert. Die nachfolgende Imidisierung mit einem verzweigten Alkylamin und mit dem bekannten Linkerbaustein (**4**) erhöhte zum Einen die Löslichkeit des Moleküls, zum Anderen wurde damit die für die automatisierte DNA-Festphasensynthese benötigte Funktionalität in das Molekül eingebracht. Im dritten Schritt ersetzen zwei Pyrrolidinringe durch eine elektrophile, aromatische Substitution die beiden Halogenatome. Hierdurch erhält der neue Chromophor seine charakteristische grüne Färbung. Das so erhaltene, fertige APBI wurde für die vollständige optische und elektrochemische Charakterisierung verwendet.

CV-Messungen belegten, dass durch den elektronenschiebenden Charakter der beiden Heterozyklen der photoangeregte APBI-Baustein nicht mehr in der Lage ist, die natürlichen Basen zu oxidieren oder zu reduzieren.

Der neu synthetisierte, zweifach pyrrolidinsubstituierte Perylenbisimidbaustein (**11**) wurde über den bekannten azyklischen Linkerbaustein (**4**) als Phosphoramidit (**12**) erfolgreich über die automatisierte DNA-Festphasensynthese in einige Oligonukleotidstränge eingebaut.

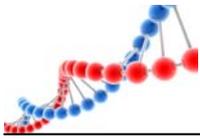
Um das neue Oxidationspotential des APBI in Oligonukleotiden zu überprüfen, wurde DNA62 synthetisiert. In dieser Sequenz ist der neue Chromophor von einem Guanin in sowohl 3'-, als auch 5'-Richtung flankiert. Die optischen Untersuchungen im Einzelstrang haben ergeben, dass Ladungstransferprozesse zwischen dem photoangeregten Chromophor und den natürlichen Basen keine dominierende Rolle spielen. Durch die Hybridisierung mit einem Gegenstrang sinkt die Emissionsintensität allerdings deutlich ab. Plausibler Grund für diesen Effekt ist höchstwahrscheinlich eine Änderung der Molekülgeometrie in der starren Umgebung des Doppelstranges. Durch diese Strukturmodifikation kommt es zu einer besseren Orbitalüberlappung zwischen den elektronenreichen Heterozyklen und dem



elektronenarmen PBI Grundgerüst. Dadurch wird die mögliche Fluoreszenz des angeregten Chromophors durch einen intramolekularen Ladungstransferprozess vermindert.

Eine Übertragung des neuen Bausteins auf das von *Wagenknecht et al.* entwickelte Sondenmotiv zur SNP-Detektion^[169] war leider nicht möglich. In dem dafür synthetisierten Oligonukleotid DNA67 kam es nicht zu der dafür benötigten Ausbildung von excitonischen Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren. Um dennoch die Auswirkung einer excitonischen Kopplung untersuchen zu können, wurde die selbstkomplementäre Sequenz DNA73 entwickelt. In dieser bilden zwei Chromophore nach erfolgter Hybridisierung ein künstliches, diagonales Basenpaar. Dieses stabilisierte den Doppelstrang aufgrund von starken π -Wechselwirkungen um mehrere °C. Die vollständige optische Untersuchung des Doppelstranges zeigte deutlich, dass es sich bei den gebildeten Dimeren um nicht fluoreszente H-Aggregate handelt.

Um den Effekt einer vollständigen Protonierung bzw. Deprotonierung des Farbstoffes zu untersuchen, wurden die Oligonukleotide DNA62 und DNA73 in Puffersystemen mit pH 3 und 13 gemessen und die erhaltenen Ergebnisse mit denen bei pH 7 verglichen. Es konnte belegt werden, dass der Protonierungsgrad der *N*-Aminosubstituenten einen deutlichen Einfluss auf die elektrochemischen und optischen Eigenschaften des APBI besitzt. Dieser spielt neben der hydrophoben Wechselwirkung des Chromophors eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung von excitonischen Kopplungen.



5. Untersuchung zwei- und dreidimensionaler DNA Strukturen

Als in den frühen 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts *Nadrian Seeman* über zwei- und dreidimensionale Nanostrukturen aus DNA laut nachdachte,^[319] war diese Vision für viele nicht nachvollziehbar. Auch 20 Jahre später, am Anfang des 21sten Jahrhunderts, waren erst nur ein paar entsprechende DNA-Strukturen bekannt, und nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit dieser Thematik. Mittlerweile ist die Anzahl der Interessierten auf über 60 Forschungsgruppen gestiegen und damit einhergehend in den letzten Jahren auch die Fähigkeit, mit dieser neuen Schlüsseltechnologie umzugehen.^[320] 2006 wurde von *Paul W. K. Rothemund* in der Zeitschrift *Nature* ein Artikel veröffentlicht, wie man durch Faltung eines DNA Stranges verschiedene definierte Formen und Bilder erzeugen kann.^[321] Diese Nukleinsäure - Origami (in Anlehnung an die japanische Papierfaltkunst), wie sie in Abb. 110 zu sehen sind, sind von ästhetischem Wert und von der Idee her genial durchdacht. Nur leider haben sie ein Manko, welches, wenn man es nicht beseitigt, dieses Wissen bald als unwichtig oder als pure Spielerei abstempeln wird. Diese Gerüste haben keine besondere Funktion.

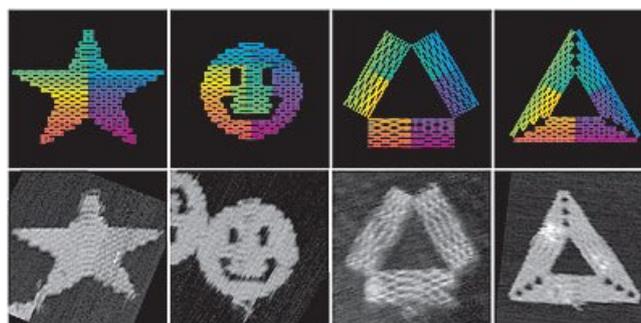
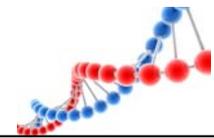


Abb. 110: DNA-Origami; obere Reihe: entworfene Gestalt; untere Reihe: AFM Bilder des gefalteten DNA Strangs.^[321]

Grundsätzlich haben sich vier Strategien bewährt, um aus DNA oder RNA^[322] als Konstruktionsmaterial zwei-^[323] und dreidimensionale^[324, 325] Komplexe aufzubauen.^[326] Strategie 1 geht von nicht kovalent gebundenen



Verzweigungspunkten aus. Diese drei-, vier- oder mehrarmigen Kreuzungen^[327, 328], sogenannte „Holliday Junctions“^[329], bestehen aus sich selbstorganisierenden DNA Einzelsträngen. Jeder Arm besitzt ein kohäsives, einzelsträngiges Ende, das mit einem komplementären Ende eines weiteren Kreuzungsarms hybridisiert. Die Enden werden im letzten Schritt enzymatisch durch Ligasen verbunden.^[330-332] Strategie 2 beschäftigt sich mit Oligonukleotiden, die an dem Kreuzungspunkt kovalent miteinander verbunden sind. Die Einzelstränge dieses Grundbausteins hybridisieren mit Einzelsträngen aus anderen Grundbausteinen und ergeben so ebenfalls ein dichtes Netzwerk, jedoch ohne Einsatz von Enzymen.^[326, 333] Bei Strategie 3 entspricht die Anzahl der DNA-Stränge der Anzahl von Flächen, die das gewünschte Objekt haben soll. Hierbei besteht jeder Strang aus mehreren Segmenten, die für je eine Kante der Fläche stehen. Abb. 111 zeigt, wie *Turberfield et al.* mit Hilfe dieser Strategie aus vier verschiedenen Oligonukleotiden einen Tetraeder bilden können.^[334-336]

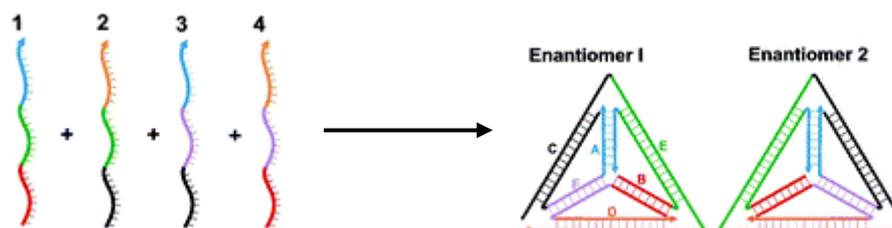


Abb. 111: Bildung von zwei Tetraederenantiomeren aus vier DNA Einzelsträngen.^[335]

Die letzte Strategie bezieht sich auf die schon bereits am Anfang erwähnte Möglichkeit, einen langen DNA-Strang mittels spezifischer kurzer Oligonukleotidstücke über „Double-Crossover-„ und „Paranemic-Crossover-Strukturen“ in die gewünschten, zum Teil sehr komplexen, zwei- oder dreidimensionalen Formen zu falten.^[321, 337-341] Fast alle dieser komplexen Netzwerke werden fehlerfrei oft nur durch sehr langsames Tempern der Einzelstränge erhalten (bis zu 0.2 °C pro Stunde).^[325, 342, 343]

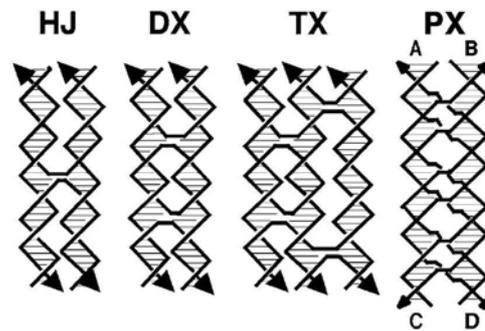
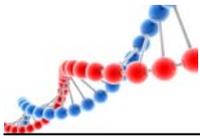


Abb. 112: Verschiedene Schlüssel motive in der strukturellen DNA Nanotechnologie.^[10]

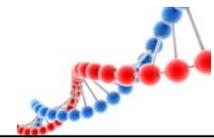
HJ:	Holliday Junction	DX:	Double Crossover
TX:	Triple Crossover	PX:	Paranemic Crossover

DNA eignet sich hervorragend als Baustoff, da für entsprechende komplexe Gerüste und für den Aufbau funktioneller π -Systeme eine definierte Struktur notwendig ist. Die Nukleinsäuren bringen von sich aus zahlreiche und einzigartige Eigenschaften mit, die dieser Anforderung gerecht werden:^[344]

- 1) Selbstorganisation zweier oder mehrerer Oligonukleotide entsprechend ihrer komplementären Sequenzen.
- 2) Helicale und lineare^[10] Duplexstruktur als Topologie mit einem Basenpaarabstand von 3.4 Å entlang der Helix und einem Durchmesser von ca. 2 nm.
- 3) Starrheit der Doppelstränge und Flexibilität von Einzelsträngen.^[345]
- 4) Möglichkeiten zur Modifizierung mit verschiedenen Bausteinen an exakten Positionen durch automatisierte Verfahren.
- 5) Molekulare Erkennung durch nukleinsäurebindende Verbindungen und Proteine.
- 6) Reversible Auflösung der Struktur bei starker Temperatursteigerung und Wiederausbildung bei Abkühlung.
- 7) Bildung komplexer zwei- und dreidimensionaler Strukturen.

Aber welche wirklichen Vorteile oder Anwendungen könnten sich durch solche DNA basierten Strukturen ergeben?

Durch die Entwicklung von z. B. dreidimensionalen Figuren wie Tetraeder^[335], Oktaeder^[337] oder Bipyramiden^[346] können Käfige im Nanometermaßstab gebaut werden. In diesen Käfigen ist es dann realisierbar, Gastmoleküle zu transportieren



oder auszurichten.^[10, 336] Es ist mittlerweile auch möglich, starre Boxen mit beweglichem Deckel aus DNA anzufertigen.^[338] In diesen „Nanocontainern“, deren Größe immerhin 42 x 36 x 36 nm beträgt, kann somit leicht ein Ribosom oder ein Poliovirus eingeschlossen werden. Durch einen äußeren Stimulus kann der Deckel geöffnet werden, wodurch die „Fracht“ erneut kontrolliert zugänglich ist. Hierdurch ist es durchaus denkbar, den Zugang von biologisch aktiven Molekülen, wie Enzyme, zu entsprechenden Substraten zu steuern.

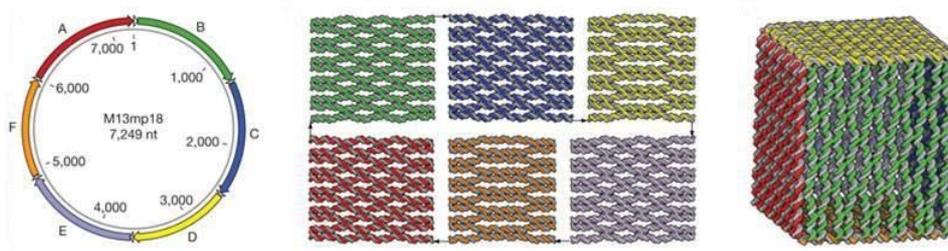
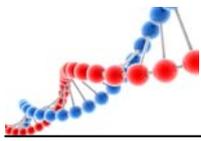


Abb. 113: Schematische Darstellung der DNA-Box von *Gothelf* und *Kjems*; links: zyklischer DNA Einzelstrang mit den für die Flächen benötigten, farbig markierten Teilbereichen ; mitte: in die sechs Flächen gefalteter Einzelstrang; rechts: aus den sechs Flächen gefalteter Kubus.^[338]

Neben den oben genannten, vierarmigen Verzweigungen finden auch dreiarmlige Kreuzungen Verwendung, um filigrane Geflechte aufzubauen. Hierbei wurde z. B. der Kreuzungspunkt von drei vollständig oder unvollständig gepaarten DNA Stränge verwendet, um in der entstehenden Lücke sogenannte „supramolekulare Zylinder“^[347] einzulagern. Diese Moleküle gehören zu einer Klasse, die spezifisch das dreiarmlige Konstrukt erkennen und nur in deren Kavität koordinieren.^[348] Der Vorteil dieser Zylinder liegt auf der Hand. Einerseits erhöhen sie die Stabilität und Rigidität der ganzen Struktur, andererseits ist es möglich, Peptide kovalent mit den Zylindern zu Verknüpfungen^[349] und so dem Gerüst Funktionalität zu verleihen. Außerdem hat sich gezeigt, dass sich allein durch Zugabe dieser supramolekularen Zylinder perfekte ypsilonartige Strukturen ohne vorhergehendes Annealing selbstständig ausbilden.^[348]

Ebenso gibt es erste Gehversuche im Bereich DNA basierter, intelligenter Schaltungen auf der Grundlage zweidimensionaler Anordnung von DNA-Bausteinen. Einfache XOR-Schaltungen (vom engl. eXclusive **OR**, entweder oder) wurden bereits



erfolgreich getestet.^[350, 351] Ebenso wurden schon zweidimensionale DNA-Systeme entwickelt, die im Binärcode bereits bis 8 zählen können.^[352]

Die Gruppe um *Seeman* ist in der Lage, unter Zuhilfenahme von Klammersequenzen Holliday-Strukturen zwischen einzelnen DNA-Strängen auszubilden, wodurch sich ein dreidimensionales, wabenförmig aufgebautes, lineares Strangbündel formt.^[353]

Shin et al. gelang es durch geschicktes Umplatzen dieser Klammersequenzen verdrillte und verkrümmte Stränge zu bilden und sogar den Verdrillungsgrad und den Winkel der Verbiegung exakt einzustellen. Dies ist bemerkenswert, weil es bis zu dieser Entdeckung fast nur möglich war, Gerüste und Strukturen aus geradlinigen DNA-„Bauteilen“ aufzubauen.^[345] Letztendlich war es sogar realisierbar, aus mehreren dieser präzise verbogenen Stränge mehrzählige Zahnräder aufzubauen, deren Nutzen für zukünftige Nanomaschinen immens sein könnte.^[354]

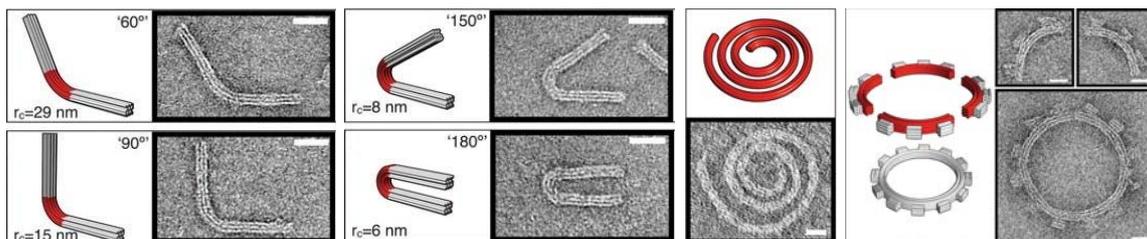
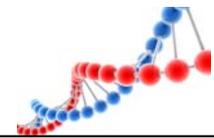


Abb. 114: Strukturen aus verbogenen und verdrillten DNA-Bündeln; Berechnete und durch TEM gefundene Strukturen; Maßstabsbalken entspricht 20 nm.^[354]

Eine weitere zukunftsweisende Anwendung von DNA-Origami ist der Aufbau von markierungsfreien Hybridisierungssonden.^[355] Hierzu wurden auf einem kachelförmigen DNA-Origami Bereiche mit unterschiedlichen, ungepaarten DNA-Reportersträngen versehen. Durch Zugabe einer Oligonukleotidprobenlösung hybridisiert an diese Reporterstränge ausschließlich die komplementäre DNA oder RNA Sequenz. Dieser so gebildete Doppelstrang hebt sich auf Grund seiner Starrheit im Höhenprofil deutlich von der DNA-Grundfläche ab. Durch die Anwendung von AFM können diese lokalen Erhebungen einwandfrei detektiert werden und deren Position den Reportersträngen exakt zugeordnet werden. Zusätzlich besitzen DNA-Doppelstränge und DNA-RNA-Hybride unterschiedliche, elastische Eigenschaften, wodurch auch zwischen diesen Systemen differenziert werden kann. Mit dieser Methode ist es bereits jetzt möglich, Oligonukleotide spezifisch bis zu einer



Konzentration von 200 pM nachzuweisen. *Yan et al.* gehen fest davon aus, diese Sensibilität noch drastisch erhöhen zu können. Dann wäre diese Technologie fähig, PCR-frei und markierungsfrei die Genexpression einer einzigen Zelle aufzuzeigen.

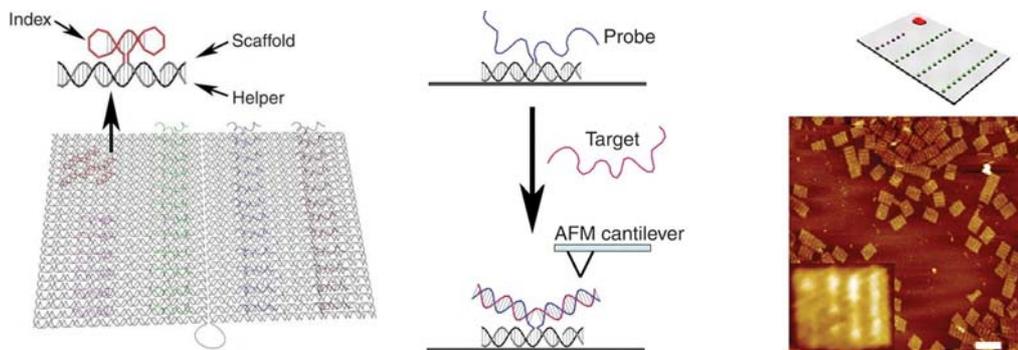


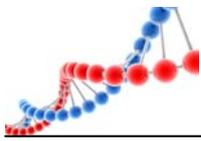
Abb. 115. Aufbau des Hybridisierungstests; links: DNA-Origami-„Platte“ mit Indexpunkt und vier farbig markierten Hybridisierungsbereichen; mitte: Hybridisierungssonde mit und ohne Zielsequenz und AFM-Detektion; rechts: AFM-Bild des funktionierenden DNA-Tests.^[355]

Dies sind nur ein paar wenige Beispiele aus einem nahezu unendlich wirkenden Pool von Möglichkeiten, wie DNA-Architektur angewendet werden kann.

Insgesamt kann man somit sagen, dass der Vorzug von DNA gestützten Strukturen die nanometergenaue Anordnung von molekularelektronischen oder optischen Komponenten ist.

5.1. Synthese perylenbisimidmodifizierter DNA zum kontrollierten Aufbau eines DNA-Netzwerks.

Die Synthese des Perylenbisimidbausteins **8** und der anschließende terminale Einbau am 5'-Ende in die DNA erfolgte analog zu Kapitel 3. Ziel war es, nach der oben erwähnten „Strategie 1“ ein DNA-Konstrukt zu entwerfen, mit dem es möglich ist, eine dreiarmlige Kreuzung aus 3 spezifischen Einzelsträngen auszubilden. Die sich so bildenden Doppelstränge besitzen jedoch, anstatt kohäsive, stumpfe Enden, die von einem Perylenbisimidmolekül abgeschlossen werden. Der Perylenbisimidbaustein ist aufgrund seines großen, ausgedehnten π -Systems in der



Lage, mit dem Basenstapel π - π -Wechselwirkungen auszubilden und liegt so als eine Art „Deckel“ auf dem stumpfen Ende der Doppelhelix.

DNA75: 3'-AAA-GTC-CGA-TCG-CCC-TTG-TAT-P-5'

DNA76: 3'-TAA-TCA-CAT-CCA-TCG-GAC-TTT-P-5'

DNA77: 3'-ATA-CAA-GGG-CCG-ATG-TGA-TTA-P-5'

Die Länge der synthetisierten DNA Stränge DNA75, DNA76 und DNA77 beträgt 21 Basen, plus den Perylenbisimid Deckel. Die Länge war so gewählt, dass ein Arm exakt 10 Basenpaare enthält. Wenn man von einer helikalen Drehung von 36° pro Basenpaar in B-DNA ausgeht,^[356] entspricht das genau einer vollständigen Umdrehung der Doppelhelix in jedem Arm. Auf diese Art und Weise sollte man eine Verdrehung des gewünschten Netzwerks aufgrund der Sekundärstruktur der DNA ausschließen können. In der Mitte jeder Sequenz befindet sich ein Cytidin, welches im fertigen „Ypsilon“ keine komplementäre Base im Gegenstrang zugewiesen bekommt. Dies sollte eine eventuell auftretende sterische Hinderung im Zentrum des Monomers ausschließen und einen Dreieckswinkel von genau 120° ermöglichen. In der Literatur findet man einige ähnliche dreiarmlige Strukturen, die auf diese gewünschte Nicht-Paarung verzichten,^[332, 357-359] aber auch Strukturen, die sogar zwei ungepaarte Basen in der Mitte aufweisen.^[358] Somit sollten die gewählten Sequenzen ein guter Mittelweg sein. *Wagenknecht et al.*^[169] und weitere Arbeitsgruppen^[221, 222, 224] haben deutlich gezeigt, dass der verwendete Perylenbisimidbaustein aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft am 5'-Ende der DNA als „fluoreszenzter DNA-Klebstoff“ wirkt. Diese Funktion wird zum Aufbau des DNA-Netzwerks genutzt. Die Enden der eigenständigen Ypsilon-Strukturen werden durch starke π - π -Wechselwirkungen der Perylenbisimidchromophore miteinander „verklebt“. Diese excitonischen Wechselwirkungen und somit die Aggregation der einzelnen Bausteine sollten sowohl durch UV/Vis-Absorptionsspektroskopie, Emissionsspektroskopie als auch CD-Spektroskopie nachweisbar sein. Der Unterschied zu der Eingangs vorgestellten Strategie 1 ist der bewusste Verzicht auf die enzymatische Verbindung der einzelnen Gerüstbausteine durch eine Ligase, was eine deutliche Vereinfachung und Verringerung der Arbeitsschritte darstellt.

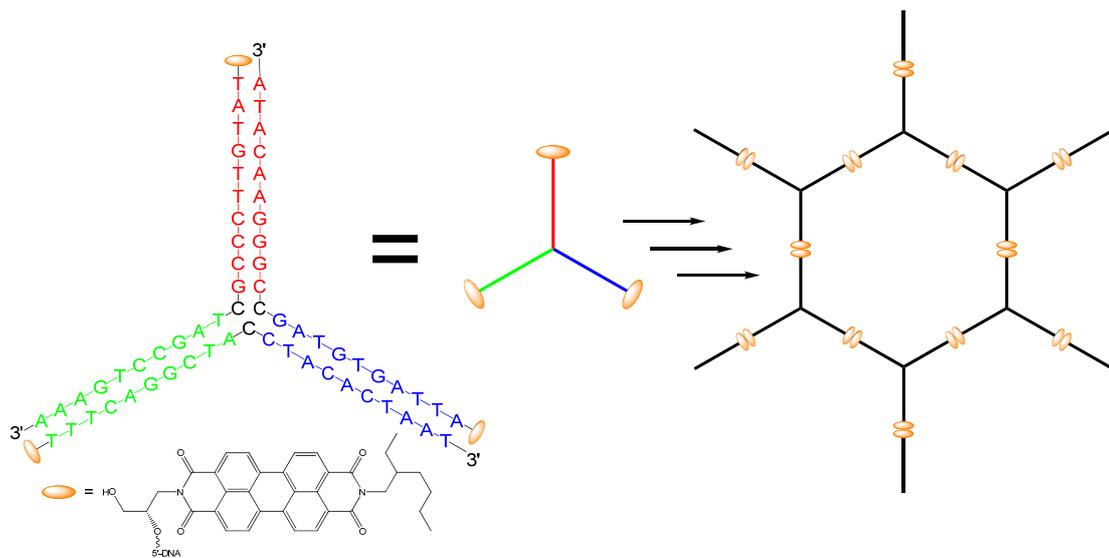
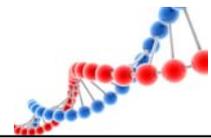


Abb. 116: Schematische Darstellung zum Aufbau eines DNA-Netzwerks aus DNA75, DNA76 und DNA77.

5.2. Spektroskopische Untersuchung der gebildeten DNA-Netzwerke mit perylenbisimidmodifizierten DNA-Strängen

Zunächst wurden die optischen Eigenschaften der Einzelstränge (DNA75, DNA76, DNA77), der möglichen Doppelstrangkombinationen (DNA75-76, DNA75-77, DNA76-77), die nur ein unvollständiges Ypsilon ergeben können, und des Dreifachstrangs (DNA75-76-77) untersucht.

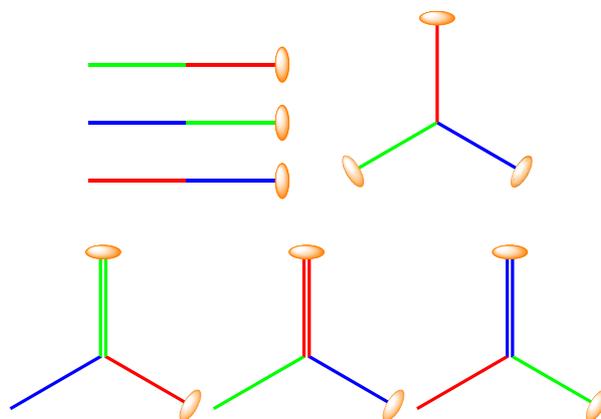
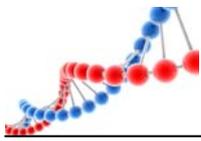


Abb. 117: Mögliche Einfach-, Doppel- und Dreifachstrangkombinationen aus DNA75, DNA76 und DNA77.



Hierzu wurde zuerst die UV/Vis-Absorption und die Emission der entsprechenden DNA Proben gleich nach der Probenvorbereitung, d.h. ohne vorherigen Annealingschritt bei 20 °C gemessen. Im Anschluss wurden diese Werte mit den optischen Eigenschaften bei 90 °C und mit den Werten nach kontrolliert, langsamem Annealing (Aufheizen auf 90 °C für 10 min gefolgt von langsamem Abkühlen mit 0.7 °C / min auf 20 °C) bei 20 °C verglichen.

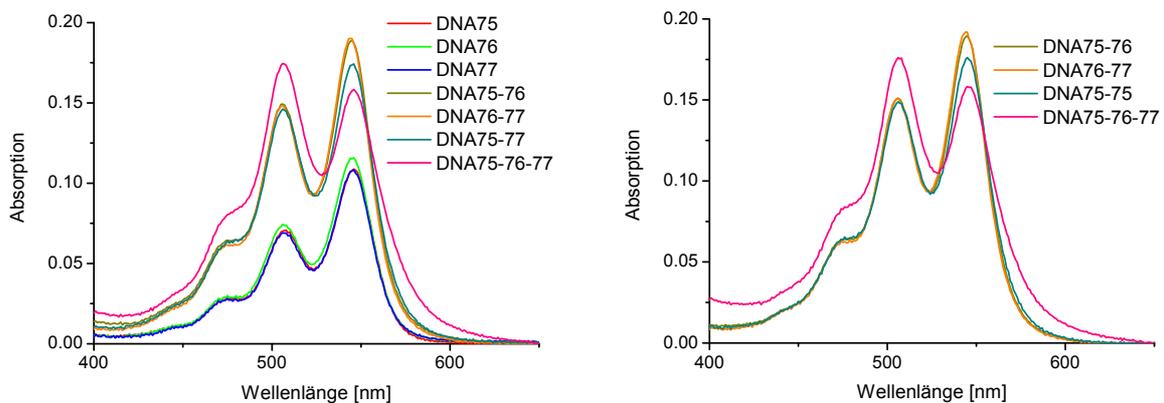
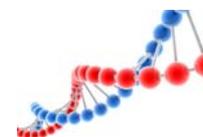


Abb. 118: UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA75, DNA76 und DNA77 als Einfach-, Doppel- und Dreifachstrang vor (links) und nach (rechts) dem Hybridisierungsschritt.

Die UV/Vis-Absorptionsspektren aller DNA-Proben (Abb. 118) zeigen bei 20 °C die typischen zwei Hauptbanden des Perylenbisimid bei ca. 506 nm und bei 545 nm ($\nu_0 \rightarrow \nu_1$ bzw. $\nu_0 \rightarrow \nu_0$). Diese Banden sind untereinander nicht verschoben, variieren jedoch stark in ihrer Peakhöhe. Sinnvoll ist es das Verhältnis zwischen erstem und zweitem Maximum $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ zu betrachten. Diese liegen für die Einzelstränge DNA75, DNA76 und DNA77 zwischen 0.64 und 0.66. Die Werte entsprechen in etwa dem Wert, der für ein Perylenbisimid-Monomer in einem DNA-Doppelstrang typisch ist (0.61).^[173] Dies bedeutet, dass in diesen Proben keine Dimere vorliegen. Das deckt sich auch mit vorhergehenden Studien, die belegen, dass man für eine Chromophor-Dimerbildung einen DNA-Doppelstrang benötigt.^[173, 221, 222] Der Dreifachstrang (DNA75-76-77), der eine vollständige Doppelhelix und somit eine intakte Ypsilon-Struktur ausbilden kann, weist einen Wert von 1.13 auf. Dies deutet wiederum auf eine starke Wechselwirkung zwischen den Chromophoren hin.^[169, 173, 217, 221, 222] Die unvollständigen Strukturen DNA75-76, DNA75-77 und DNA76-77



liegen zwischen den beiden Werten, was für eine geringere Tendenz zur Ausbildung von Perylenbisimid Aggregaten spricht. Das ist auch nicht verwunderlich, da nur ein Chromophor am Ende eines Doppelstrangs ist und Wechselwirkungen ausbilden kann, während der zweite in einem ungebundenen Einzelstrang vorliegt.

Tabelle 33: Verhältnisse der UV/Vis-Absorptionen $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ von DNA75, DNA76 und DNA77 als Einfach-, Doppel- und Dreifachstrang vor und nach dem Annealing-Schritt bei 20 °C.

DNA	Verhältnis $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$	
	vor dem Annealing	nach dem Annealing
PBI in DNA ^[173]	0.61	--
DNA75	0.66	--
DNA76	0.64	--
DNA77	0.64	--
DNA75-76	0.79	0.80
DNA75-77	0.84	0.85
DNA76-77	0.78	0.79
DNA75-76-77	1.13	1.12

Bemerkenswert ist, dass sich im direkten Vergleich der UV/Vis-Absorptionsspektren und auch in den gebildeten Verhältnissen nahezu kein Unterschied zwischen den Messungen „vor“ und „nach“ dem Annealing zeigt. Hier liegt die Vermutung nahe, dass sich an der strukturellen Beschaffenheit der Probe nichts geändert hat.

Die Messungen bei 90 °C (Abb. 119) zeigen keine excitonischen π - π -Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Perylenbisimidbausteinen mehr. Ebenso weisen sie im Vergleich zu 20 °C eine hypsochrome Verschiebung der beiden Maxima von 506 nm auf 502 nm und von 546 nm auf 539 nm auf. Die Spektren entsprechen exakt der Monomerabsorption des Chromophors. Dies ist nicht unerwartet, da für eine effektive Wechselwirkung ein DNA-Doppelstrang notwendig ist, der bei dieser hohen Temperatur, wie die Untersuchung der Schmelztemperaturen später zeigen wird, nicht mehr vorliegt. Das UV/Vis-Absorptionsverhältnis der beiden Maxima beträgt hier bei jeder Messung zwischen 0.71 und 0.73, was als „gleich“ angesehen werden kann.

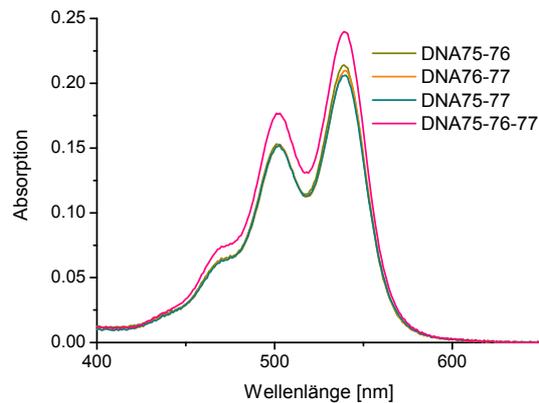
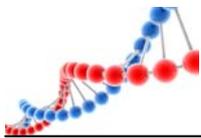


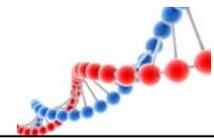
Abb. 119: UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA75, DNA76 und DNA77 als Doppel- und Dreifachstrang bei 90 °C.

Tabelle 34: Verhältnisse der UV/Vis-Absorptionen $A_{502 \text{ nm}} / A_{539 \text{ nm}}$ von DNA75, DNA76 und DNA77 als Doppel- und Dreifachstrang bei 90 °C.

DNA	Verhältnis $A_{502 \text{ nm}} / A_{539 \text{ nm}}$
DNA75-76	0.71
DNA75-77	0.73
DNA76-77	0.73
DNA75-76-77	0.73

Die ersten erhaltenen Hinweise über die Struktur der unterschiedlichen DNA-Konstrukte werden durch die Resultate der Emissionsmessungen untermauert. Es wurden die Fluoreszenzspektren der Einzel- und Doppelstränge und des Dreifachstrangs vor dem Annealing und nach dem Annealingschritt bei 20 °C gemessen und verglichen. Ebenso wurde die Fluoreszenz bei 90 °C bestimmt.

Die Emissionsspektren von DNA75, DNA76 und DNA77 zeigen zwei Banden bei 553 nm und bei 600 nm. Dies entspricht der Perylenbisimid-Monomeremission mit ihrer charakteristischen Feinstruktur. Bei der Betrachtung des Dreifachstrangs ändert sich dieses Bild drastisch. Die typische Feinstruktur verschwindet hier komplett. Das ehemalige Hauptmaximum bei 553 nm schrumpft bis auf ein Minimum und es bildet sich ein neues, sehr breites Hauptmaximum bei 680 nm. Diese rotverschobene Bande entspricht der excimerartigen Fluoreszenz des Perylenbisimiddimers.^[251]



Vergleicht man das Verhältnis der Emissionen $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$, so ergibt sich wie bei der UV/Vis-Absorption ein klarer Trend. Das Verhältnis des Einzelstrangs DNA77 befindet sich bei 4.3, was in etwa dem eines einzigen Chromophors in einem DNA-Doppelstrang entspricht (5.7).^[173] Bei DNA75 und DNA76 ist das Verhältnis auf Grund der annähernd nicht mehr zu detektierenden Bande bei 680 nm und des dadurch schlechten S/R-Verhältnisses extrem groß. Daraus ergibt sich die klare Schlussfolgerung, dass auch im angeregten Zustand im Einzelstrang keine excitonischen Wechselwirkungen zwischen zwei Perylenbisimidbausteinen vorliegen. Bei DNA75-76-77 wird dagegen ein Wert von 0.26 erhalten. Dieses Verhältnis deutet auf eine ausgeprägte Kopplung zwischen den Chromophoren hin. Die Doppelstränge DNA75-76, DNA75-77 und DNA76-77 liegen wie bei der UV/Vis-Absorption zwischen diesen Werten, was erneut für eine nur geringe Tendenz zur Ausbildung von Perylenbisimid-Dimeren im angeregten Zustand spricht.

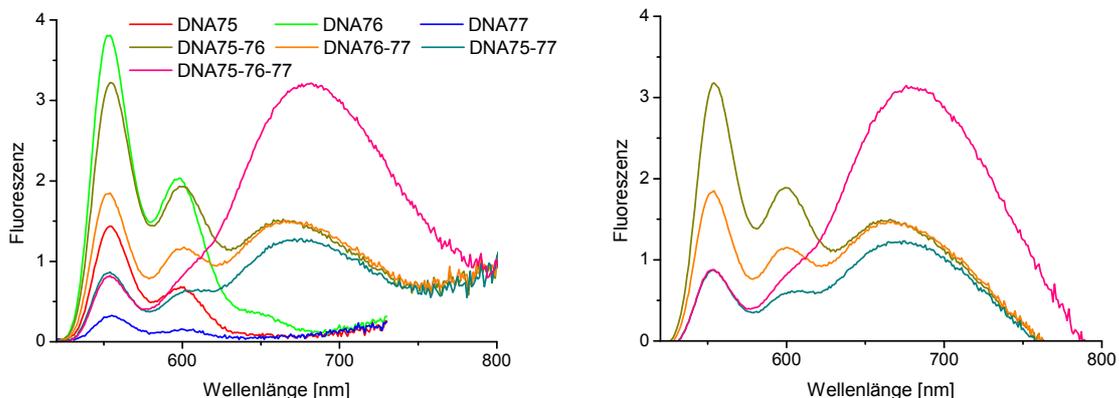


Abb. 120: Emissionsspektren von DNA75, DNA76 und DNA77 als Einfach-, Doppel- und Dreifachstrang vor (links) und nach (rechts) dem Hybridisierungsschritt.

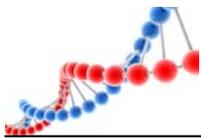


Tabelle 35: Verhältnisse der Emissionen $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA75, DNA76 und DNA77 als Einfach-, Doppel- und Dreifachstrang vor und nach dem Annealingschritt bei 20°C.

DNA	Verhältnis $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$	
	vor dem Annealing	nach dem Annealing
PBI in DNA ^[173]	5.7	--
DNA75	18	--
DNA76	>20	--
DNA77	4.3	--
DNA75-76	2.11	2.12
DNA75-77	0.47	0.71
DNA76-77	1.22	1.25
DNA75-76-77	0.26	0.29

Im Vergleich zu den UV/Vis-Absorptionsmessungen zeigen sich bei der Emission leichte Abweichungen zwischen den Verhältnissen „vor“ und „nach“ dem Annealingprozess. Dies ist jedoch durch das schlechte S/R-Verhältnis bei 680 nm bedingt. Hieraus ergeben sich auch innerhalb einer Gruppe (Einzelstränge, Doppelstränge) größere Abweichungen. Insgesamt weisen die Ergebnisse aber den gleichen Trend, wie bei den UV/Vis-Absorptionsmessungen beschrieben, auf.

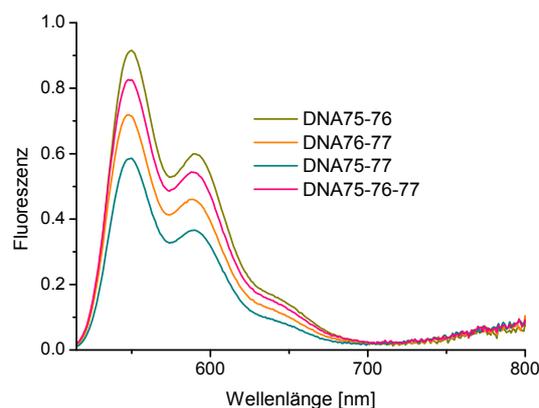
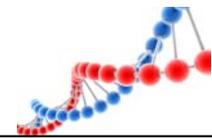


Abb. 121: Emissionsspektren DNA75, DNA76 und DNA77 als Doppel- und Dreifachstrang bei 90 °C.

Übereinstimmend mit den UV/Vis-Absorptionsspektren erkennt man in den Emissionsspektren (Abb. 121) bei 90 °C keine Wechselwirkungen zwischen den

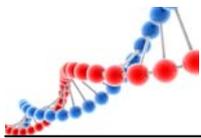


einzelnen Perylenbisimidbausteinen im angeregten Zustand mehr. Die Emission zeigt wieder die monomertypische Feinstruktur. Auch die Verhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ sind mit ca. 20 annähernd gleich.

Tabelle 36: Verhältnisse der Emissionen $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA75, DNA76 und DNA77 als Doppel- und Dreifachstrang bei 90 °C

DNA	Verhältnis $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$
DNA75-76	21
DNA75-77	22
DNA76-77	22
DNA75-76-77	19

Die CD-Spektren der Doppelstränge und des Dreifachstrangs zeigen alle zwischen 226 nm und 260 nm einen negativen *Cotton*-Effekt, einen Nulldurchgang bei ca. 260 nm und einen positiven *Cotton*-Effekt von 260 nm bis ca. 300 nm für die Doppelstränge und bis 340 nm für den Dreifachstrang. Diese Signalstruktur ist charakteristisch für die B-DNA-Konformation.^[313] Im langwelligen Bereich besitzen alle Spektren einen negativen *Cotton*-Effekt von 440 nm bis 553 nm, bei 553 nm den Nulldurchgang und von 553 nm bis 615 nm einen positiven *Cotton*-Effekt. Die Helikalität der Übergangsdipolmomente ist somit positiv. Die gekuppelten Chromophore folgen somit der rechtsgängigen Helikalität, die durch die Doppelhelixkonformation induziert wird. Die Signalintensität variiert allerdings sehr stark zwischen den Doppelsträngen zu dem Dreifachstrang. Bei den Doppelsträngen ist sowohl der positive, als auch der negative *Cotton*-Effekt sehr schwach ausgeprägt. Bei diesen unvollständigen Konstrukten ist jeweils nur ein Perylenbisimid am Ende eines Doppelstrangs und kann Wechselwirkungen ausbilden, während sich der zweite Chromophor am Ende eines Einzelstrangs befindet. Diese Anordnung stört vermutlich die perfekte Ausbildung von excitonischen Wechselwirkungen. Bei der vollständigen Ypsilon-Struktur sind die Signale dagegen stark ausgeprägt. Die vorhandenen CD-Banden im langwelligen Bereich deuten auf die Existenz von excitonisch gekuppelten Perylenbisimidaggregaten hin und unterstützen somit die Idee, dass die einzelnen Monomere untereinander wechselwirken und eine größere,



übergeordnete Struktur ausbilden. Da die Signalintensität sehr stark vom Winkel zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten abhängt^[360, 361] ($\Delta\epsilon \approx \sin(2\theta)$), ist es ganz offensichtlich, dass sich keine planare Überstruktur wie bei Graphen ausbildet, sondern dass die Bausteine gegeneinander verdreht sind und so eine gewellte Überstruktur hervorgerufen wird. Rechnungen von *Lewis et al.* ergeben für zwei Perylenbisimidcaps in DNA-Haarnadelschleifen im wässrigen Medium eine helikale Verdrehung von $\theta = 20^\circ$.^[222] Quantenmechanische Berechnungen eines Perylenbisimiddimers in der Gasphase kamen zu einem Winkel von $\theta = 30^\circ$.^[211]

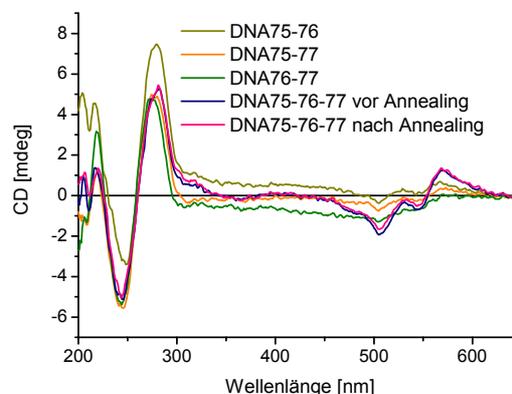
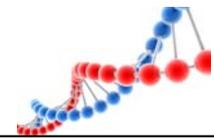


Abb. 122: CD-Spektren von DNA75, DNA76 und DNA77 als Doppel- und Dreifachstrang.

Da der Einfluss der NaCl-Konzentration im Puffer auf das Aggregationsvermögen von Perylenbisimid aus anderen Systemen bekannt ist,^[222] wurde dies auch in dieser Arbeit überprüft. Hierzu wurden sowohl UV/Vis-Absorption, Emission als auch Circular dichroismus von DNA75-76-77 bei verschiedenen Salzkonzentrationen (0 mM – 583 mM) gemessen.

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum (Abb. 123, links) zeigt bei einer Salzkonzentration von 0 mM eine typische Absorptionskurve des monomeren Perylenbisimid Chromophors. Das Verhältnis $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ hat einen Wert von 0.66, was mit dem der gemessenen Einzelstränge DNA75 (0.66), DNA76 und DNA77 (0.64) übereinstimmt. Dies bedeutet somit, dass keine Dimere im System vorliegen. Mit steigender Na^+ -Konzentration verändert sich die Kurvenform von der Monomerabsorption zur Dimerabsorption stetig, bis das Verhältnis bei einem Wert



um 1.0 stabil bleibt. Die Veränderungstendenzen der Kurvenform sind durch Pfeile im Spektrum illustriert. Trägt man das Verhältnis $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ gegen die Salzkonzentration auf (Abb. 124, links), so kann man diesen stetigen Monomer-Dimer-Übergang ganz klar erkennen. Es wird außerdem deutlich, dass ab einer Salzkonzentration von ca. 100 mM keine signifikante Veränderung des Verhältnisses mehr stattfindet. Dies ist also die minimale Salzkonzentration, die das System zur vollständigen Perylenbisimidaggregation benötigt.

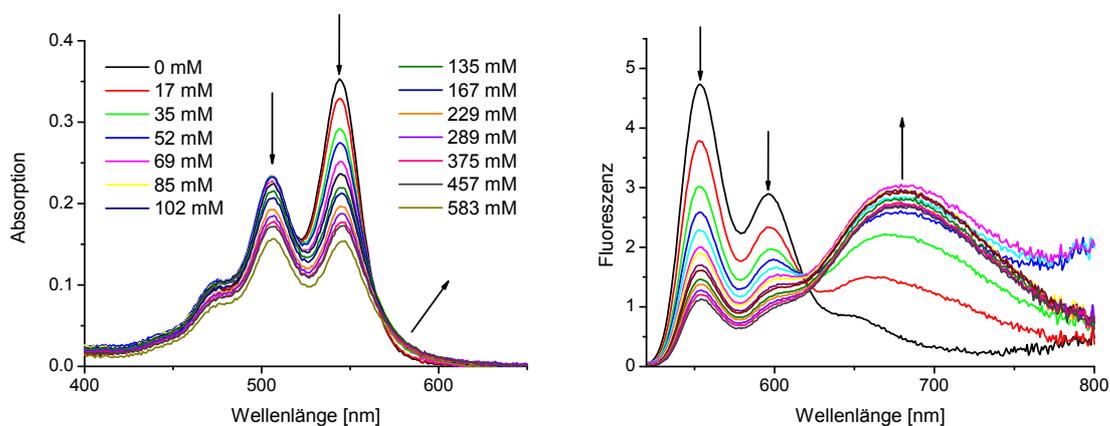
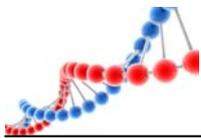


Abb. 123: UV/Vis-Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von DNA₇₅₋₇₆₋₇₇ bei unterschiedlicher NaCl Konzentration der NaP₁-Pufferlösung; Die Pfeile zeigen den Effekt der steigenden Salzkonzentration.

Das Emissionsspektrum von DNA₇₅₋₇₆₋₇₇ (Abb. 123, rechts) bestätigt die Resultate der UV/Vis-Absorptionsmessungen. Bei einer Salzkonzentration von 0 mM sieht man nur die typische Monomeremission mit der charakteristischen Feinstruktur. Sobald die Konzentration erhöht wird, nehmen die Bandenintensitäten bei 553 nm und bei 600 nm ab und es bildet sich die breite, rotverschobene Excimeremission der Dimere bei 680 nm. Dieser Übergang besitzt einen angedeuteten isoemissiven Punkt bei ca. 620 nm. Die Feinstruktur verschwindet komplett. Dieser Wandel ist im Spektrum ebenfalls durch Pfeile illustriert. Betrachtet man die Verhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ so erhält man für eine NaCl-Konzentration von 0 mM einen Wert von 10.4, der mit steigender Konzentration zu 0.4 abfällt. Die Auftragung $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ gegen die Na^+ -Konzentration (Abb. 124, rechts) bestätigt erneut, dass sich ab einer



Salzkonzentration von 100 mM ein konstanter Wert einstellt und sich somit die Struktur des DNA-Gebildes nicht mehr verändert.

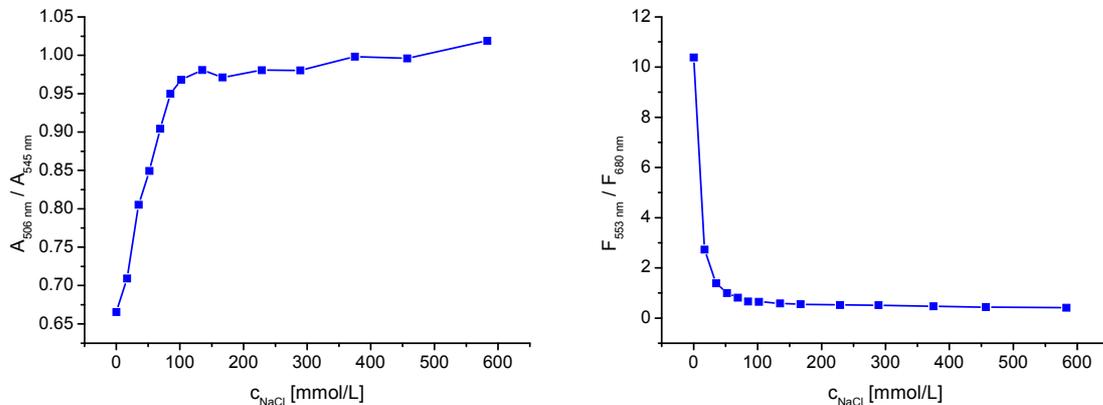


Abb. 124: Auftragung der Verhältnisse $A_{506\text{ nm}} / A_{545\text{ nm}}$ (links) und $F_{553\text{ nm}} / F_{680\text{ nm}}$ (rechts) von DNA75-76-77 gegen die NaCl Konzentration der NaP_i-Pufferlösung.

Einen weiteren Beleg für die Notwendigkeit von NaCl zur Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen zwischen zwei Perylenbisimidchromophoren bieten die CD-Spektren von DNA75-76-77. Bei allen Salzkonzentrationen (0 mM bis 167 mM) zeigen die Spektren das typische Bild einer doppelsträngigen B-DNA. Ein Struktureffekt der B-DNA, welcher die Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren verhindern würde, kann somit ausgeschlossen werden. Bei 0 mM Na⁺-Ionen zeigt sich kein *Cotton*-Effekt im Bereich zwischen ca. 440 nm bis ca. 620 nm, was eine Wechselwirkung zwischen den Perylenbisimidmolekülen ausschließt. Da sich dies mit den UV/Vis-Absorptions- und Emissionsspektren deckt, kann ein möglicher Einfluss des Verdrehungswinkels (z. B. $\theta = 180^\circ$) unberücksichtigt bleiben. Erst wenn Salz in der Lösung vorhanden ist, bilden sich entsprechende negative (447 nm bis 552 nm) und positive (552 nm bis 620 nm) *Cotton*-Effekte mit einem Nulldurchgang bei 552 nm. Diese werden definitiv durch Dimerwechselwirkungen verursacht.

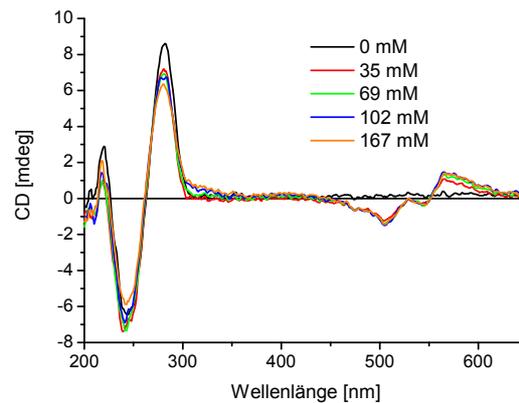
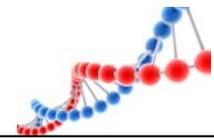


Abb. 125: CD-Spektren von DNA75-76-77 bei fünf unterschiedlichen NaCl Konzentrationen.

Das Aggregationsverhalten der einzelnen Chromophore wird durch die Konzentration der vorhandenen DNA und somit der vorhandenen Perylenbisimidmoleküle beeinflusst. Um dies nachzuweisen, wurden UV/Vis-Absorption, Emission und Circular dichroismus von DNA75-76-77 bei drei verschiedenen Oligonukleotidkonzentrationen (2.50 μM , 1.75 μM und 1.00 μM) gemessen.

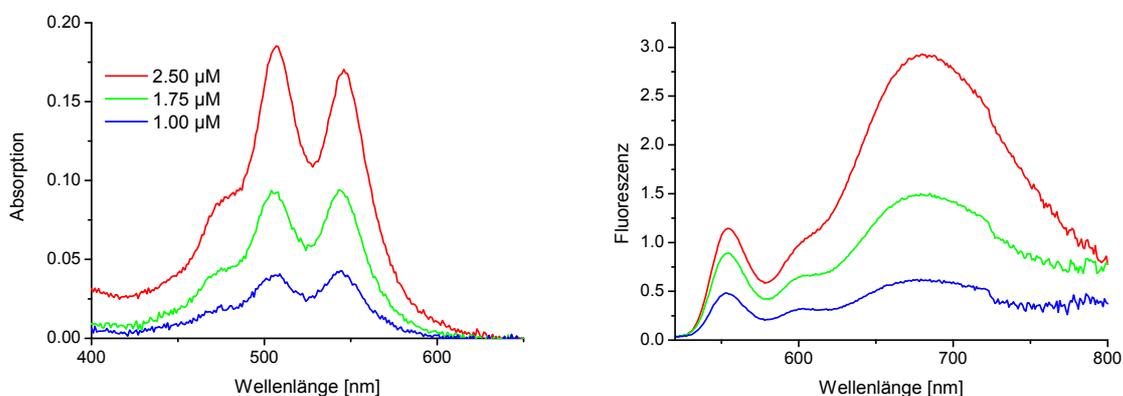


Abb. 126: UV/Vis-Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von DNA75-76-77 bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen.

Am einfachsten lassen sich bei diesen Messungen wiederum die Verhältnisse $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ der UV/Vis-Absorption und die Verhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ der Fluoreszenz miteinander vergleichen, da aufgrund der veränderten DNA Konzentrationen die Intensität der gemessenen Kurven stark variiert.

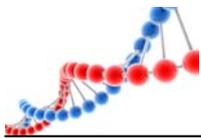


Tabelle 37: Verhältnisse der Absorptionen $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ und der Emissionen $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA75-76-77 bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen.

DNA-Konzentration [μM]	Verhältnis $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$	Verhältnis $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$
1.00	0.98	0.79
1.75	1.02	0.60
2.50	1.18	0.39

Sowohl die Werte $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ als auch $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ belegen die zunehmende Aggregation mit höherer DNA-Konzentration im Grundzustand und im angeregtem Zustand.

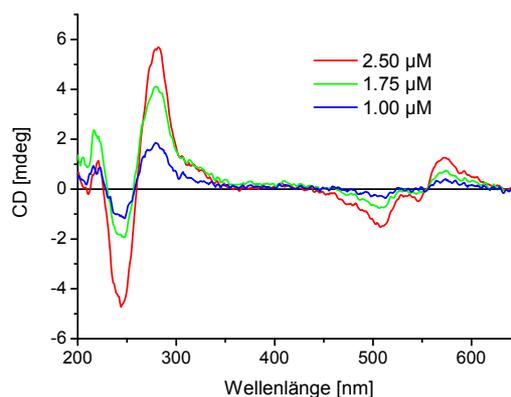
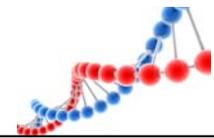


Abb. 127: CD-Spektren von DNA75-76-77 bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen.

Die CD Spektrum unterstützen dieses Bild. Bei allen drei DNA-Konzentrationen besitzen die Kurven die gleiche Gestalt. Der einzige Unterschied zwischen den Messergebnissen ist die Ausprägung des CD-Signals. Während bei 2.5 μM die Signale stark ausgeprägt sind, was für starke Wechselwirkungen spricht, sind bei sinkender Konzentration die Signale deutlich schwächer ausgeprägt. *Lewis et al.* konnten einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Farbstoffkonzentration und Aggregationsvermögen detektieren.^[222] Messungen bei höheren Konzentrationen als 2.5 μM waren leider nicht möglich, da bereits ab 4 μM nach kurzer Zeit rote Aggregate aus der Probenlösung ausfallen (siehe Abb. 128) und so keine Reproduzierbarkeit der Messungen mehr möglich war. Diese „Flocken“ sind wieder



ein äußerlich sichtbares Indiz für die Aggregation bzw. Netzwerkbildung der entsprechenden DNA-Monomere.



Abb. 128: Nach wenigen Minuten ausgefallene Flocken von DNA75-76-77; $c_{\text{DNA}} = 10 \mu\text{M}$.

Um die Frage abzuklären, ob es sich bei der Emission um eine Excimeremission zweier PBI-Chromophore oder um einen Relaxationsprozess eines bereits aggregierten Dimers handelt, wurden Anregungsspektren des dreifachmodifizierten Monomerbausteins (DNA75-76-77) bei drei unterschiedlichen Konzentrationen ($1.00 \mu\text{M}$, $1.75 \mu\text{M}$ und $2.50 \mu\text{M}$) bei den Wellenlängen 553 nm und 680 nm gemessen. Die Messungen erfolgten sowohl bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$, was deutlich unter der Schmelztemperatur des DNA-Konstrukts ist, als auch bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$, da bei dieser Temperatur nur noch Einzelstränge vorliegen.

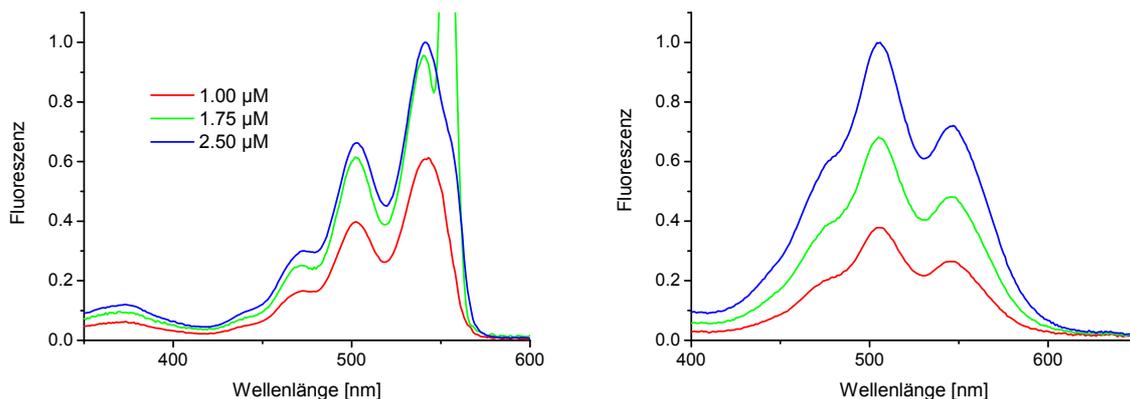
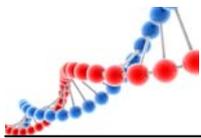


Abb. 129: Anregungsspektren von DNA75-76-77 bei drei unterschiedlichen Konzentrationen ($1.00 \mu\text{M}$, $1.75 \mu\text{M}$ und $2.50 \mu\text{M}$); Anregungswellenlänge links: 553 nm, rechts: 680 nm; Temperatur: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Das Anregungsspektrum bei 553 nm stimmt bei allen drei Konzentrationen im Wesentlichen mit dem UV/Vis-Absorptionsspektrum des Perylenbisimidmonomers



überein. Das Verhältnis $A_{506\text{nm}} / A_{545\text{nm}}$ liegt bei ca. 0.65, was im Vergleich mit den hervorgehenden Messungen auch typisch für Monomere des Chromophors ist. Da das Anregungsspektrum das Absorptionsverhalten im Grundzustand beschreibt, ergibt sich hieraus, dass diese Emission ganz klar von nichtaggregierten Perylenbisimidmolekülen stammt. Das Anregungsspektrum bei 680 nm deckt sich ebenfalls in seiner Gestalt mit dem UV/Vis-Absorptionsspektrum von Perylenbisimiddimeren. Einzig das Verhältnis $A_{506\text{nm}} / A_{545\text{nm}}$, welches bei allen drei Konzentrationen mit ca. 1.41 viel höher als das von DNA75-76-77 (1.13) ist, weicht ab. Dies zeigt, dass nicht alle Perylenbisimdbausteine in der DNA-Lösung DNA75-76-77 miteinander wechselwirken, sondern ca. 2/3 bzw. 65 %. Das würde bedeuten, dass pro Ypsilon-Struktur zwei Chromophore als Dimer vorliegen. Jedenfalls beweist dieses Anregungsspektrum, dass die rotverschobene Emission bei 680 nm größtenteils von einem strukturellen Relaxationsprozess von bereits vor der Anregung aggregierter Chromophore ausgeht.^[211]

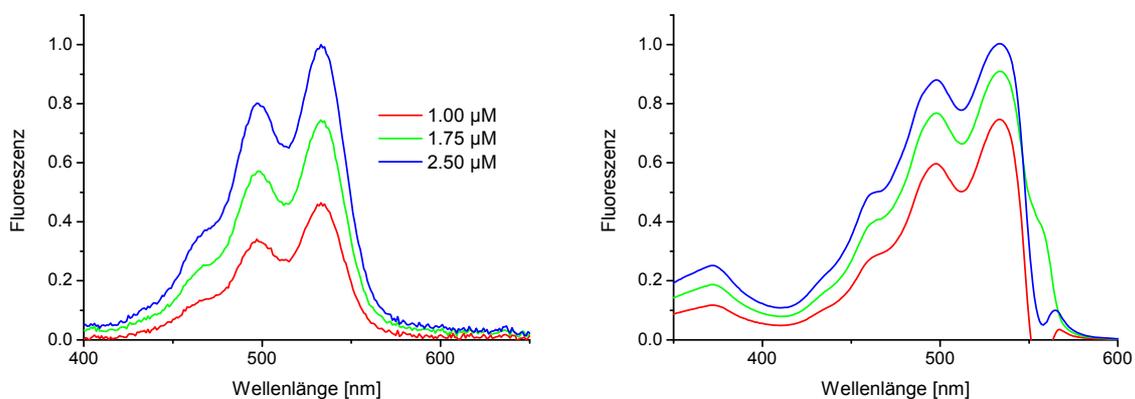


Abb. 130: Anregungsspektren von DNA75-76-77 bei drei unterschiedlichen Konzentrationen (1.00 μM , 1.75 μM und 2.50 μM); Anregungswellenlänge links: 553 nm, rechts: 680 nm; Temperatur: 90 °C.

Die Spektren bei 90 °C stimmen in ihrer Gestalt sowohl bei der Anregungswellenlänge von 553 nm, als auch bei 680 nm im Wesentlichen mit der Gestalt der UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA75-76-77 bei dieser Temperatur überein. Man kann somit bei 90 °C nur monomere Perylenbisimid-Moleküle anregen, was in Anbetracht des Schmelzpunktes des DNA-Gerüsts nicht verwunderlich ist.

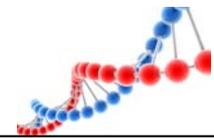


Tabelle 38: Verhältnisse der Anregungsspektren $A_{506\text{ nm}} / A_{545\text{ nm}}$ von DNA75-76-77 bei drei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen; T = 20 °C und 90 °C.

λ_{em}	konz. [μM]	T = 20 °C	T = 90 °C
		$A_{506\text{ nm}} / A_{545\text{ nm}}$	$A_{506\text{ nm}} / A_{545\text{ nm}}$
553 nm	1.00	0.65	0.80
	1.75	0.64	0.85
	2.50	0.66	0.88
680 nm	1.00	1.43	0.72
	1.75	1.42	0.77
	2.50	1.39	0.80

5.3. Spektroskopische Untersuchung der gebildeten DNA-Netzwerke mit perylenbisimidmodifizierten und unmodifizierten DNA-Strängen

Zusätzlich zu den in Kapitel 5.2 genannten Kombinationen aus den Sequenzen DNA75, DNA76 und DNA77 ergeben sich noch zahlreiche weitere Zusammensetzungsmöglichkeiten, wenn man den Satz der zur Verfügung stehenden DNA-Stränge erweitert. Hierzu wurden die unmodifizierten Stränge DNA78, DNA79 und DNA80 synthetisiert. Diese neuen Oligomere sind absolut identisch mit den Strängen DNA75, DNA76 und DNA77, mit der Ausnahme, dass sie keinen Perylenbisimidbaustein am 5'-Ende des DNA-Strangs aufweisen.

DNA75: 3'-AAA-GTC-CGA-TCG-CCC-TTG-TAT-P-5'

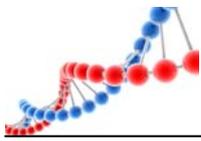
DNA78: 3'-AAA-GTC-CGA-TCG-CCC-TTG-TAT-5'

DNA76: 3'-TAA-TCA-CAT-CCA-TCG-GAC-TTT-P-5'

DNA79: 3'-TAA-TCA-CAT-CCA-TCG-GAC-TTT-5'

DNA77: 3'-ATA-CAA-GGG-CCG-ATG-TGA-TTA-P-5'

DNA80: 3'-ATA-CAA-GGG-CCG-ATG-TGA-TTA-5'



Durch den Einsatz dieser neuen Stränge war es möglich, Ypsilonstrukturen zu entwickeln, die nicht nur wie bisher drei Perylenbisimid-Chromophore besitzen, sondern auch Monomere, die zwei oder nur einen Farbstoffbaustein aufweisen. Dadurch wird es realisierbar, auch weniger verzweigte Netzwerkstrukturen zu betrachten und in die Diskussion einzubeziehen.

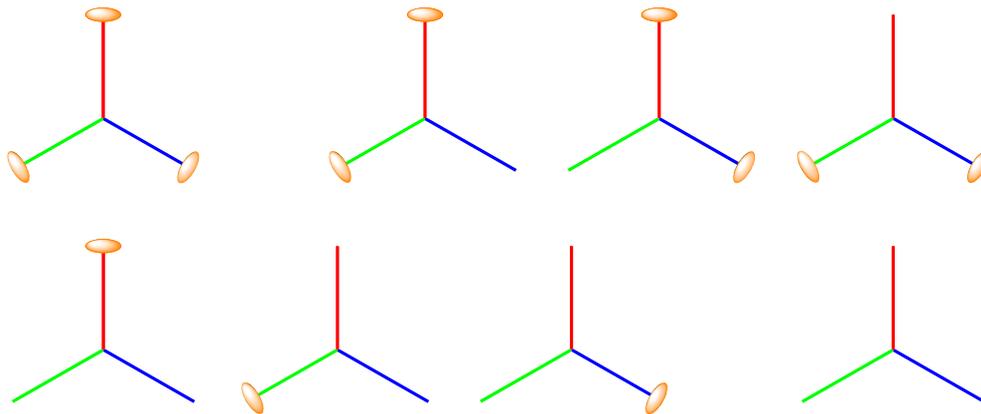


Abb. 131: Schematische Darstellung aller Kombinationsmöglichkeiten DNA75 bis DNA80 zu vollständigen Ypsilonstrukturen mit drei, zwei, einem und ohne Perylenbisimidchromophor.

Im Folgenden wird auf die neuen Strukturen eingegangen, wobei nur noch vollständige Ypsilon-Systeme betrachtet werden. Unvollständige Gerüste aus Doppelsträngen oder Einzelstränge werden in der folgenden Diskussion aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mehr oder nur noch am Rande berücksichtigt. Die Messungen der Spektren erfolgte analog zu Kapitel 5.2.

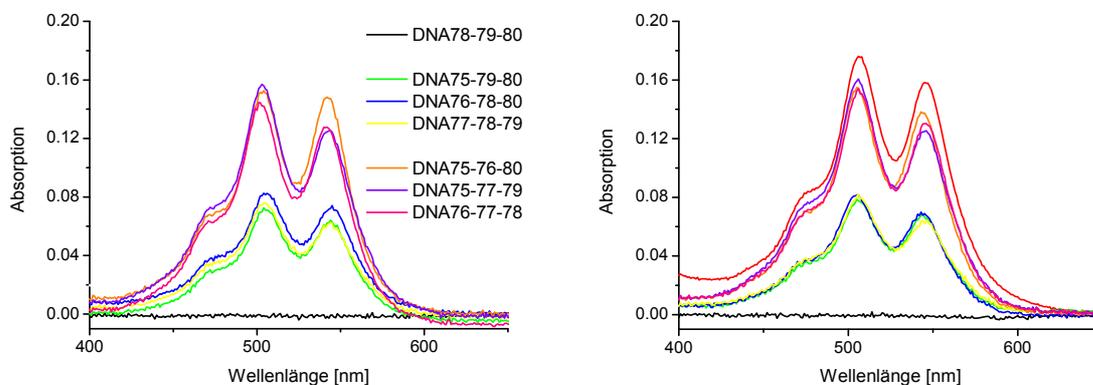
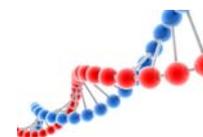


Abb. 132: UV/Vis-Absorptionsspektren vor (links) und nach (rechts) dem kontrollierten Annealing der Dreifachstränge aus DNA75 bis DNA80.



Bei der Betrachtung der UV/Vis-Absorptionsspektren zeigen sich erneut die charakteristischen Hauptbanden des Perylenbisimids mit dem für Dimer-Wechselwirkungen typischen Intensitätsmuster.

Das Verhältnis der Intensitäten $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$, ist stets größer als eins (siehe Tabelle 39). Dies deutet darauf hin, dass der Großteil der vorhandenen Farbstoffe nicht als Monomer, sondern als Dimer vorliegt. Beim direkten Vergleich der gebildeten Absorptionsverhältnisse der einzelnen Monomerguppen fällt auf, dass keine Gruppe eine gesteigerte oder verminderte Tendenz, Aggregate auszubilden, besitzt. Da entstehende Netzwerke aus DNA75-76-77 räumlich deutlich anspruchsvoller sind als die Dimere aus z. B. DNA75-79-80, lässt sich daraus schließen, dass eine sterische Hinderung keinen negativen Effekt auf die Aggregation ausübt. Vergleicht man die Werte „vor“ und „nach“ dem Annealingprozess, so fällt auf, dass sich diese, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, nicht signifikant unterscheiden.

Tabelle 39: Verhältnisse der UV/Vis-Absorptionen $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ der Dreifachstränge aus DNA75 bis DNA80 vor und nach dem Annealing-Schritt bei 20 °C.

DNA	Verhältnis $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$	
	vor dem Annealing	nach dem Annealing
DNA78-79-80	--	--
DNA75-76-77	1.13	1.12
DNA75-79-80	1.11	1.15
DNA76-78-80	1.11	1.17
DNA77-78-79	1.21	1.28
DNA75-76-80	1.02	1.13
DNA75-77-79	1.25	1.28
DNA76-77-78	1.13	1.18

Alle Emissionsspektren sind dominiert von einer rotverschobenen Bande mit einem sehr breiten Maximum bei 680 nm. Diese Emission ist wieder kennzeichnend für excimerartige Wechselwirkungen zwischen zwei Perylenbisimid-Chromophoren.

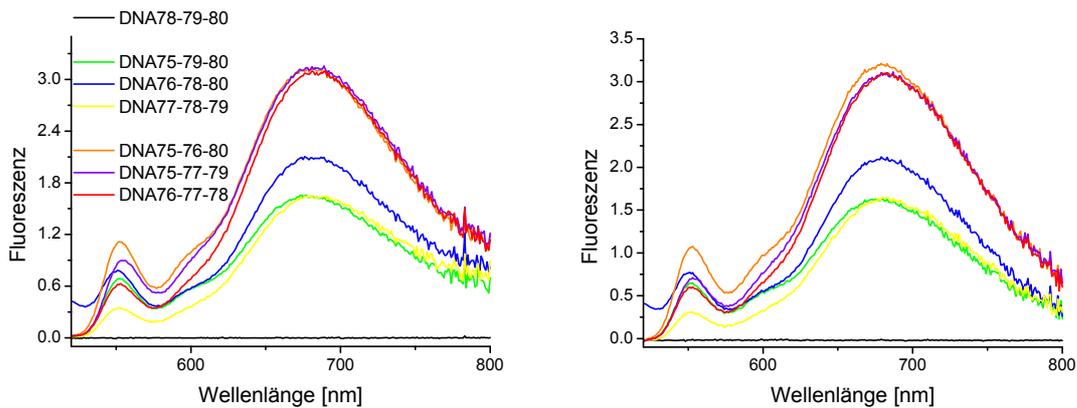
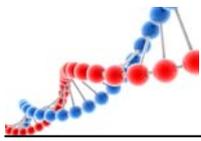
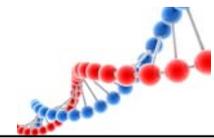


Abb. 133: Fluoreszenzspektren vor (links) und nach (rechts) dem kontrollierten Annealing der Dreifachstränge aus DNA75 bis DNA80.

Vergleicht man die berechneten Verhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$, die alle deutlich kleiner als 0.5 sind, mit dem typischen Monomerverhältnis des Perylenbisimidbaustein in DNA (5.7),^[173] so zeigt sich die stark dominierende Präsenz der Dimerbildung im angeregtem Zustand.

Tabelle 40: Verhältnisse der Emissionen $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ der Dreifachstränge aus DNA75 bis DNA80 vor und nach dem Annealing-Schritt bei 20°.

DNA	Verhältnis $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$	
	vor dem Annealing	nach dem Annealing
DNA78-79-80	--	--
DNA75-76-77	0.26	0.29
DNA75-79-80	0.42	0.40
DNA76-78-80	0.37	0.37
DNA77-78-79	0.21	0.19
DNA75-76-80	0.36	0.34
DNA75-77-79	0.29	0.23
DNA76-77-78	0.20	0.20



Der Trend, der bereits im Kapitel 5.2 angesprochen worden ist, setzt sich auch hier klar und deutlich fort. Die Ergebnisse der Messungen „vor“ und „nach“ dem kontrollierten Annealingprozess sind nahezu identisch.

In Abb. 134 sind exemplarisch zwei repräsentative CD-Spektren für die beiden Bausteingruppen mit jeweils einem (DNA76-78-80) oder zwei (DNA75-77-79) Chromophoren dargestellt. Beide Spektren haben die für die B-DNA Konformation.^[313] typische Gestalt. Des Weiteren zeigt sich in beiden Spektren ein weiterer *Cotton*-Effekt im längerwelligen Bereich. Diese intensiven CD Banden weisen auch hier auf die Existenz von excitonisch gekoppelten Perylenbisimidaggregaten hin. Dies bedeutet, dass auch zweifach und einfach modifizierte Ypsilon-Strukturen untereinander wechselwirken. Die gekoppelten Perylenbisimide folgen der rechtsgängigen Helikalität, die durch die Doppelhelixkonformation induziert wird. Ein Unterschied in den Spektren für die Messungen vor und nach dem kontrollierten Annealingschritt zeigt sich, wie erwartet, nicht.

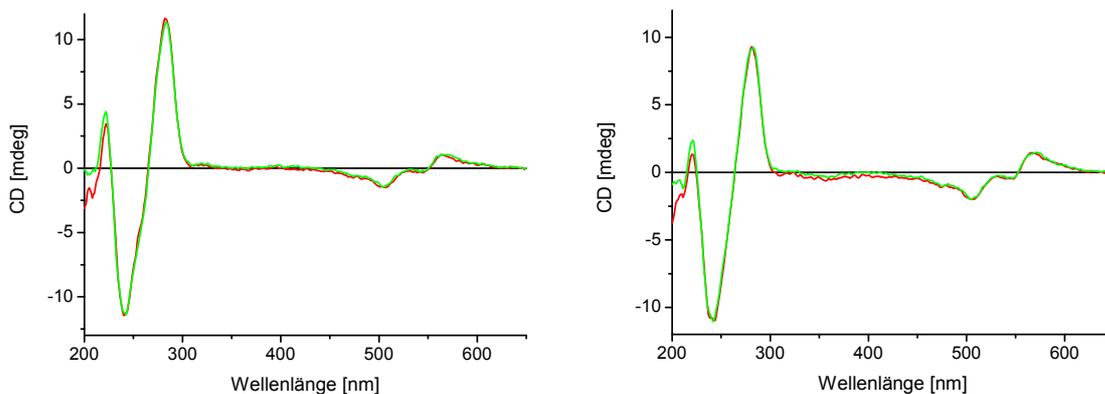
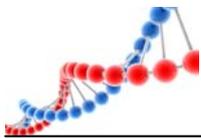


Abb. 134: CD-Spektren von DNA76-78-80 (links) und DNA75-77-79 (rechts) vor (rote Kurve) und nach (grüne Kurve) dem Annealingprozess.

Um die verschiedenen gemessenen CD-Kurven miteinander vergleichen zu können, wurden diese gegen die Perylenbisimidkonzentration der jeweiligen Dreiarmkreuzungen korrigiert (Abb. 135). Das CD-Signal von DNA76-78-80, das nur ein Perylenbisimid besitzt, zeigt die stärkste Signalintensität, DNA75-77-79 mit zwei



Chromophoren die mittlere Intensität und DNA75-76-77 mit drei Modifikationen das schwächste Signal. Dieser Trend lässt sich bei Betrachtung der Sterik der sich gebildeten Überstruktur erklären. DNA76-78-80 beinhaltet nur einen Chromophor. Die Monomere sind somit in der Lage, sich ohne Einschränkungen gegeneinander helikal zu verdrehen. Mit steigender Anzahl an Perylenbisimidid in einem DNA-Baustein steigt die Anzahl der möglichen Wechselwirkungen und der Freiheitsgrad der potentiell möglichen Verdrehung sinkt. Hierdurch verkleinert sich der mögliche Verdrehungswinkel zwischen den Chromophoren, was sich direkt auf die Signalintensität im CD-Spektrum auswirkt.

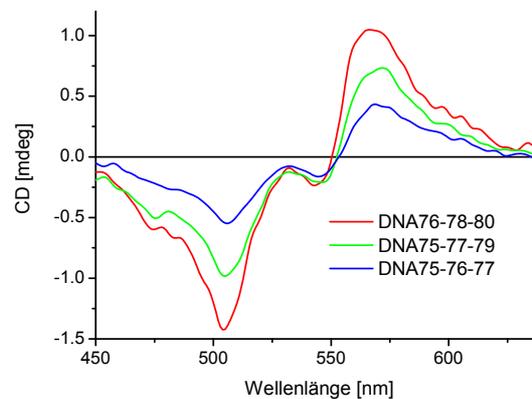


Abb. 135: CD-Spektren von DNA76-78-80, DNA75-77-79 und DNA75-76-77 korrigiert gegen die Perylenbisimidkonzentration.

Vergleicht man die Schmelztemperaturen der einzelnen Monomerstrukturen, so überrascht, dass sich diese (egal ob mit 0, 1, 2 oder 3 Chromophoren) kaum voneinander unterscheiden und bei ca. 44 °C liegen. Die Schmelztemperatur von DNA75-76-77 beträgt 46.5 °C, was nur minimal höher ist. Daraus ergibt sich, dass die Perylenbisimidkappen keinen oder maximal einen geringen Einfluss auf die thermische Stabilität des DNA-Duplex haben.

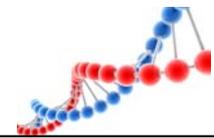


Tabelle 41: Schmelztemperaturen der Zweifachstränge aus DNA78 bis DNA80 und der Dreifachstränge aus DNA75 bis DNA80.

DNA	T_m [°C]	DNA	T_m [°C]
DNA75-76-77	46.5	DNA78-79	35.8
		DNA78-80	48.0
DNA78-79-80	44.3	DNA79-80	36.5
DNA75-79-80	44.4	DNA75-76-80	44.8
DNA76-78-80	45.1	DNA75-77-79	44.1
DNA77-78-79	43.3	DNA76-77-78	43.6

Sehr auffällig ist die Schmelztemperatur von DNA78-80 (48.0 °C), die sich deutlich von DNA78-79 (35.8 °C) und DNA79-80 (36.5 °C), aber auch von den kompletten Ypsilon-Strukturen unterscheidet. Bei der Betrachtung der unvollständigen Strukturen DNA75-76, DNA75-77 und DNA76-77 ergibt sich ein ähnliches Bild. Um einen möglichen Einfluss der ungepaarten Arme auf dieses Verhalten zu überprüfen, wurden die Schmelztemperaturen der einzelnen Arm-Doppelstränge DNA81-82, DNA83-84 und DNA85-86 bestimmt.

DNA81: 3'-AAA-GTC-CGA-T-5'

DNA82: 5'-TTT-CAG-GCT-A-3'

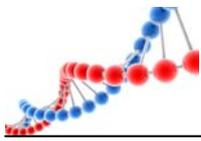
DNA83: 3'-GCC-CTT-GTA-T-5'

DNA84: 5'-CGG-GAA-CAT-A-3'

DNA85: 3'-TAA-TCA-CAT-C-5'

DNA86: 5'-ATT-AGT-GTA-G-3'

DNA78-80 besitzt eine höhere Schmelztemperatur als der unmodifizierte Kontrollduplex DNA83-84. Dies zeigt, dass die freien „Arme“ eine Stabilisierung des Doppelstrangs bewirken. Diese Stabilisierung wird durch die Anwesenheit der Chromophore in DNA75-77 noch verstärkt. Bei DNA78-79 ist dieser Trend



entgegengesetzt. Die Schmelztemperatur ist hier im Vergleich zur unmodifizierten Probe DNA81-82 deutlich geringer ($\Delta T = 5 \text{ }^\circ\text{C}$). Durch die Gegenwart von Perylenbisimid verringert sich diese bei DNA75-76 um weitere $5 \text{ }^\circ\text{C}$. DNA79-80 weicht wie DNA76-77 nicht vom Kontrolldoppelstrang DNA85-86 ab. Hier haben folglich weder die freien Arme, noch die Chromophore einen Einfluss auf die Stabilität.

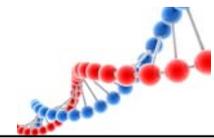
Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich somit keine klare Regel für die Stabilisierung oder Destabilisierung der Doppelstränge durch die ungepaarten DNA-Stränge oder durch den Chromophor ableiten. Lediglich ein klarer Trend innerhalb einer jeden Gruppe ist erkennbar.

Tabelle 42: Gegenüberstellung der Schmelztemperaturen der Doppelstränge aus DNA75 bis DNA86.

DNA	T_m [$^\circ\text{C}$]	DNA	T_m [$^\circ\text{C}$]	DNA	T_m [$^\circ\text{C}$]
DNA75-76	30.8	DNA78-79	35.8	DNA81-82	40.8
DNA75-77	50.0	DNA78-80	48.0	DNA83-84	43.7
DNA76-77	35.0	DNA79-80	36.5	DNA85-86	35.4

In Kapitel 5.2 ist deutlich geworden, dass das UV/Vis-Absorptionsverhalten der Ypsilonstruktur DNA75-76-77 stark temperaturabhängig ist. Zwar zeigen sich bei jeder der gemessenen Temperaturen ($20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $90 \text{ }^\circ\text{C}$) die typischen zwei Hauptbanden des Perylenbisimid, jedoch verändert sich die jeweilige Intensität drastisch. Hierzu wurden zur genaueren Untersuchung UV/Vis-Absorptionsspektren bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Um die Übersichtlichkeit in diesem Kapitel zu garantieren, wird zu jeder Monomergruppe (1 – 3 Chromophore) jeweils nur ein Beispiel behandelt.

Betrachtet man die UV/Vis-Absorptionsverhältnisse $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ von DNA75-76-77, DNA75-76-80 und DNA75-79-80 in Abhängigkeit der Temperatur (Abb. 140), wird die thermisch induzierte Unterbrechung der Chromophor-Chromophor Wechselwirkungen eindeutig. Alle Kurven besitzen einen sigmoidalen Verlauf entsprechend einer DNA-Schmelztemperaturkurve. Sie beginnen bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ mit



Werten zwischen 1.11 und 1.16, was kennzeichnend für Dimere ist, fallen bis ca. 55 °C auf Werte zwischen 0.69 bis 0.73, typisch für Monomere und bleiben ab 60 °C nahezu konstant. Der Wendepunkt in allen Kurvenverläufen stimmt gut mit den Schmelztemperaturen der Monomerstrukturen, die zwischen 44.4 °C und 46.8 °C liegen, überein. Hierdurch wird deutlich belegt, dass die Dimer-Wechselwirkung mit der Dehybridisierung der DNA-Helix endet.

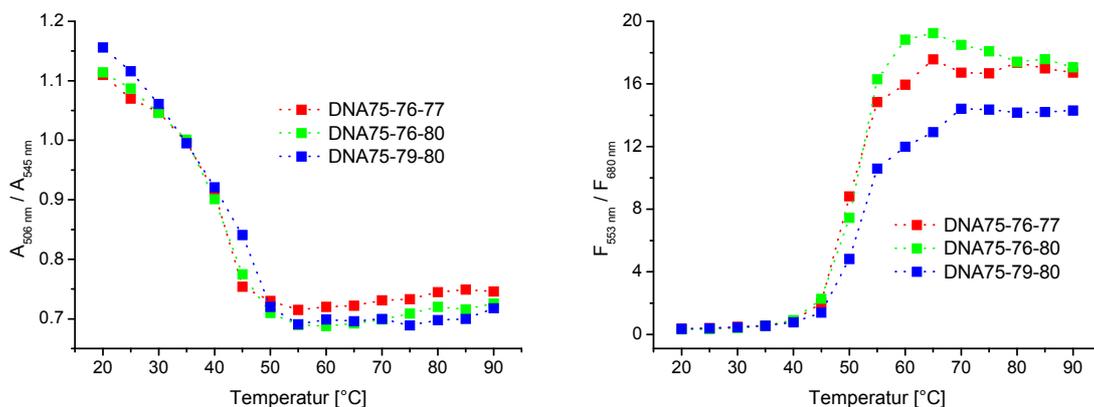
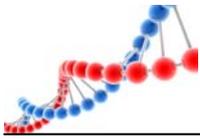


Abb. 136: Auftragung der UV/Vis-Absorptions- $A_{506 \text{ nm}} / A_{545 \text{ nm}}$ (links) und Emissionsverhältnisse $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ (rechts) von DNA75-76-77, DNA75-76-80 und DNA75-79-80 bei der Temperatur von 20 °C bis 90 °C.

Entsprechend der temperaturabhängigen UV/Vis-Absorptionsmessungen wurden auch Fluoreszenzmessungen bei einer langsamen Temperaturerhöhung von 20 °C auf 90 °C durchgeführt (siehe Abb. 141). Betrachtet man das Emissionsverhältnis $F_{553 \text{ nm}} / F_{680 \text{ nm}}$ von DNA75-76-77, DNA75-76-80 und DNA75-79-80 in Abhängigkeit zur Temperatur, so ergibt sich erneut ein sigmoidaler Kurvenverlauf, der einen Wendepunkt im Bereich der Schmelztemperaturen der DNA-Doppelstränge aufweist. Diese Spektren verdeutlichen nochmals die kooperative Auflösung der Chromophor-Wechselwirkungen.



5.4. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Um die strukturelle Beschaffenheit der gebildeten DNA-Netzwerke zu charakterisieren, wurden die Proben DNA75-76-77 (drei Chromophore), DNA75-79-80, DNA76-78-80, DNA77-78-79 (jeweils ein Chromophor) und DNA78-79-80 (Kontrollkonstrukt ohne Chromophor) mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Nach den bis jetzt über die spektroskopischen Untersuchungen erhaltenen Erkenntnissen müsste sich für DNA75-76-77 eine größere, verzweigte Überstruktur aus einzelnen Ypsilonbausteinen ergeben, da pro Grundbaustein drei Chromophore, die jeweils aggregieren können, vorhanden sind. Bei DNA75-79-80, DNA76-78-80 und DNA77-78-79, die nur einen Perylenbisimidbaustein besitzen, sollten nur Dimere auftreten. Dies würde verdeutlichen, dass sich die einzelnen Ypsilons nicht zufällig sondern perylenbisimidvermittelt aneinanderlagern. DNA78-79-80 sollte zwar die Ypsilonstruktur bilden, enthält jedoch keinen Chromophor zur Aggregation. Hier dürften sich nur einzelne, räumlich separierte DNA-Punkte zeigen.

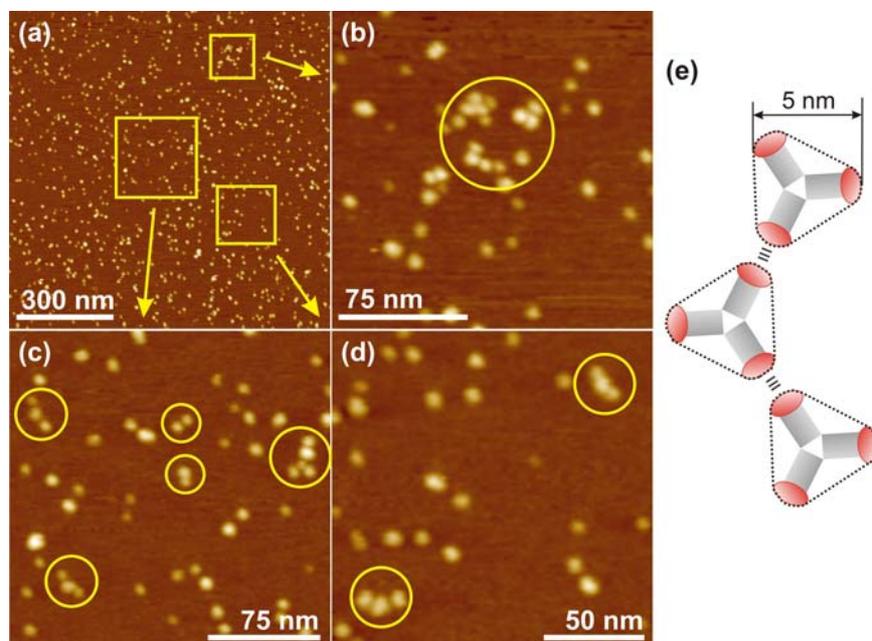


Abb. 137: AFM Höhenprofil von DNA75-76-77 nach Immobilisierung auf einer Mica-Oberfläche. Die Höhenskala z beträgt in allen Abbildungen 5 nm. (a) Übersichtsbild der gemessenen Probe; (b-d) Vergrößerungen einzelner Bereiche von (a) mit den gebildeten DNA75-76-77 Aggregaten (gelb markiert). (e) Illustration der gefundenen Strukturelemente.

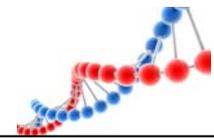
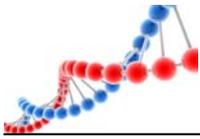


Abb. 137 zeigt das ermittelte AFM Höhenprofil von DNA75-76-77 auf einer Mica-Oberfläche im Überblick und daraus drei stark vergrößerte Bereiche. Der Überblick (a) zeigt eine Oberfläche, die mit Partikeln übersät ist. Alle einzelnen Punkte besitzen einen Durchmesser von ca. 5 nm und stehen für jeweils ein „DNA-Ypsilon“. Würden zwei Arme der Dreiarmkreuzung eine lineare, ungebogene Helix bilden, so wäre der zu erwartende Durchmesser ca. 8 nm. Da der gefundene Durchmesser deutlich kleiner ist, spricht dies für keine lineare, sondern für eine gebogene Ausrichtung der Doppelhelix und unterstützt die Idee einer ypsilonartigen Gestalt. In den Vergrößerungen (b – d) erkennt man zahlreiche Aggregate der „DNA-Partikel“. Es sind Dimere, Trimer bis hin zu fünf aggregierten Monomeren zu sehen. Auch die Verbindungswinkel von ca. 120° , die die übergeordneten Strukturen ausbilden, deuten zweifelsfrei auf eine Ypsilon-Grundstruktur hin. Leider konnte jedoch kein weiträumig ausgedehntes Netzwerk detektiert werden. Einen Grund hierfür liefern möglicherweise die deutlichen CD Signale der gemessenen DNA-Proben. Da bei allen Messungen klare *Cotton*-Effekte im Bereich zwischen 477 nm und 620 nm zu detektieren waren, kann nicht von einer planaren, sondern einer dreidimensionalen Struktur ausgegangen werden. Dieses filigrane Geflecht wird nur durch π - π -Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Chromophoren und nicht kovalent zusammengehalten. Nach drop-casting der DNA-Proben auf Mica wird dieses dreidimensionale Konstrukt auf eine zweidimensionale Oberfläche gezwungen, wobei die Wechselwirkungen zwischen DNA und Mica extrem stark sind. Durch die Reduzierung um eine Dimension ist die helikale Verdrehung der Chromophore nicht mehr möglich und das gebildete Gerüst bricht in einzelne, kleinere Teilstücke auf.

Die AFM Bilder von DNA75-79-80, DNA76-78-80 und DNA77-78-79 besitzen eine Fülle von Partikeln, deren Durchmesser analog zu DNA75-76-77 5 nm aufweist. Es handelt sich somit um die gebildeten DNA-Dreiarmkreuzungen. Auf allen Höhenprofilen existieren durchwegs nur Dimere. Es konnten keine höher verzweigten Strukturen entdeckt werden. Dies beweist, dass sich die gebildeten Aggregate nur aufgrund der Wechselwirkungen der Perylenbisimidbausteine und sich nicht durch eine statistische Verteilung bilden. Die dunklen Stellen in den AFM Höhenprofilen ergeben sich durch die Oberflächenbeschaffenheit (leichte



Höhenfehler) der Mica-Oberfläche und haben keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Messergebnisse.

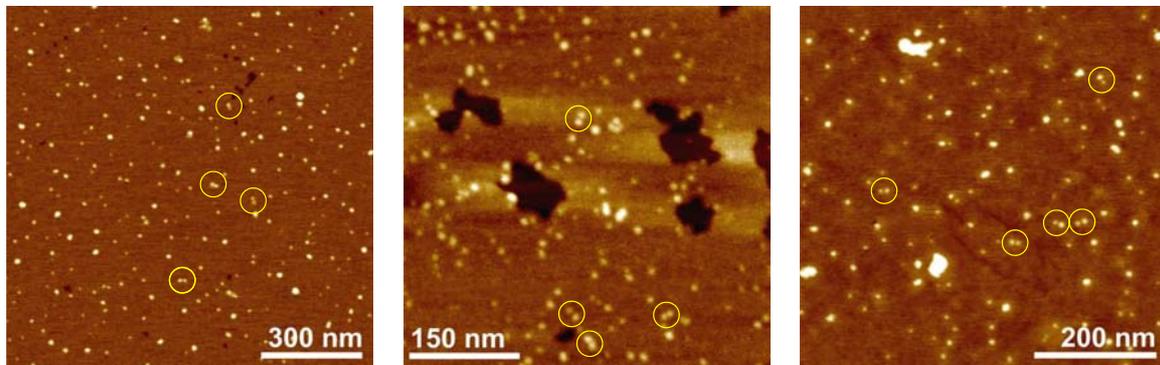


Abb. 138: AFM Höhenprofil von DNA75-79-80 (links), DNA76-78-80 (mitte) und DNA77-78-79 (rechts) nach Immobilisierung auf einer Mica-Oberfläche. Die Höhenskala z beträgt in allen Abbildungen 3 nm. Die gebildeten Dimere wurden exemplarisch gelb markiert.

Als letzter Hinweis, dass sich die gefundenen Strukturen einzig auf Chromophor-Wechselwirkungen stützen, dient die AFM Aufnahme von DNA78-79-80. Dieses Konstrukt besteht nur aus unmodifizierter DNA. Diese kann zwar die ypsilonartige Struktur ausbilden, sollte jedoch nur als Monomer vorliegen. Abb. 139 bestätigt diese These.

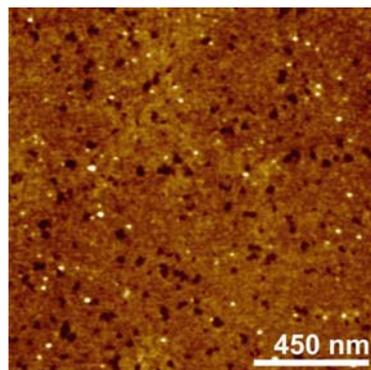
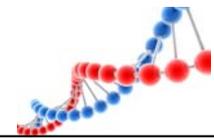


Abb. 139: AFM Höhenprofil von DNA78-79-80 nach Immobilisierung auf einer Mica-Oberfläche. Die Höhenskala z beträgt 2 nm.

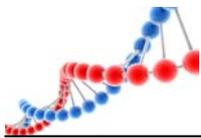
Es finden sich auf dem gesamten Höhenprofil nur isolierte Partikel. Die Höhe der gemessenen Strukturen ist mit 2 nm deutlich geringer als die der zuvor detektierten und entspricht der Höhe eines DNA-Doppelstrangs. Dieser Höhenunterschied lässt



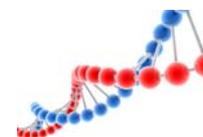
sich mit der Tatsache erklären, dass monomere Strukturen plan auf der Oberfläche aufliegen. Sobald jedoch Aggregate vorliegen, sind die einzelnen Bausteine leicht gegeneinander verdreht, wodurch sich ein größeres Höhenprofil ergibt.

5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der synthetisierte (vgl. Kapitel 3) Perylenbisimidbaustein **8** konnte erfolgreich am 5'-Ende von drei Oligonukleotidsträngen über die automatisierte DNA-Festphasensynthese eingeführt werden. Die so entstandenen DNA-Sequenzen waren zueinander teilkomplementär und bildeten über die Watson-Crick-Basenpaarungen eine ypsilonartige Struktur aus. Diese entstandenen Dreiarmkreuzungen besitzen am Ende eines jeden Arms einen Perylenbisimid-Chromophor, der als eine Art Deckel auf der Doppelhelix einen Abschluss bildet. Aufgrund ihrer stark hydrophoben Eigenschaft und des großen konjugierten π -Systems bilden Perylenbisimidmoleküle untereinander starke π - π -Wechselwirkungen aus. Es war erstaunlich, festzustellen, dass die drei modifizierten DNA-Stränge DNA75, DNA76 und DNA77 sofort nach der Probenvorbereitung spontan, ohne das übliche Annealing die richtigen Basenpaarungen ausbilden und die gewünschte ypsilonartige Monomerstruktur DNA75-76-77 formen. Nach der Bildung der Dreiarmkreuzungen kam es ebenfalls sofort zur spontanen Aggregation der Monomere über die Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen und es entstanden größere, übergeordnete Netzwerkstrukturen. Dies konnte durch zahlreiche Experimente und Messungen wie UV/Vis-Absorptionsspektroskopie, Emissionsspektroskopie, CD-Spektroskopie und AFM Messungen belegt werden. Als Kontrollexperimente und zur Bildung weniger verzweigter Strukturen wurden Oligonukleotide synthetisiert, die in ihrer Basenabfolge absolut identisch zu DNA75, DNA76 und DNA77 sind, jedoch keinen künstlichen Baustein am terminalen 5'-Ende besitzen. Somit war es möglich, nicht nur dreifach, sondern auch zweifach und einfach perylenbisimidmodifizierte Ypsilonstrukturen zu bilden und deren Überstruktur zu untersuchen. Auch diese neuen Monomerbausteine aggregieren sofort nach der Probenvorbereitung spontan und formen entsprechende Netzwerke. Thermische Untersuchungen zeigten, dass sich bei höheren Temperaturen die



gebildete Tertiärstruktur aufgrund der Dehybridisierung des DNA-Doppelstrangs auflöst, sich jedoch nach Abkühlen unter die DNA-Schmelztemperatur wieder bildet. Grund hierfür ist die Eigenschaft des Perylenbisimids, nur am Ende eines DNA-Doppelstrangs, jedoch nicht eines Einzelstrangs, Dimere auszubilden. Durch eine Erhöhung der DNA-Konzentration fielen die gebildeten Aggregate aus und wurden so optisch sichtbar gemacht. Leider beträgt die Quantenausbeute des Perylenbisimids in DNA⁷⁵⁻⁷⁶⁻⁷⁷ nur 1.4 %. Die Quantenausbeute des freien Farbstoffes in Dichlormethan ist mit 72.7 % deutlich höher. Der Abfall der Quantenausbeute ist bedingt durch Lösprozesse in der DNA, die jedoch nicht vollständig sind.^[173] Perylenbisimid ist als schwach fluoreszierender „Klebstoff“ für DNA und folglich zur Ausbildung größerer Netzwerkstrukturen geeignet - nicht sehr hell leuchtend, aber immerhin noch detektierbar. Wirft man jedoch den Blick über den Tellerrand dieser Ergebnisse, so tritt ganz deutlich hervor, dass es sehr gut gelungen ist, Farbstoffmoleküle so an einem DNA-Gerüst auszurichten, dass sie die Selbstassoziation der DNA kontrollieren. In Anbetracht der in der Einleitung bereits genannten Vorteile von DNA-Architektur und unter dem Aspekt, dass Perylenbisimid stabile Radikalanionen formen kann, können diese Ergebnisse auch als Grundlage für zukünftige DNA-basierte, molekularelektronische Bauteile, die z. B. in Solarzellen oder Feldtransistoren zum Einsatz kommen könnten,^[362] verwendet werden.



6. Materialien und Methoden

6.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Reagenzien

Die bei der Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck*, *Riedel-de Haen* und *Sigma Aldrich* bezogen. Die verwendete Qualität war mindestens p.A. (pro analysi).

Unmodifizierte Oligonukleotide

Unmodifizierte DNA wurde ausschließlich von *Metabion* bezogen, war bereits über HPLC gereinigt und lyophilisiert. Die Stoffmenge der gekauften Stränge variierte zwischen 0.02, 0.04, 0.2 und 1.0 μmol . Die DNA wurde vor ihrer Verwendung in entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage gelöst und ihre Konzentration über UV/Vis-Absorption bestimmt.

Lösungsmittel

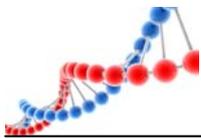
Alle verwendeten Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe p.A.. Trockene Lösungsmittel wurden von *Alfa Aesar* und *Fluka* bezogen und unter Stickstoff aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Reaktionsführung

Alle Reaktionen wurden zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Stickstoffatmosphäre (Trocknung über BTS-Katalysator, konzentrierter Schwefelsäure, Kaliumhydroxid und Silicagel) bzw. unter Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,996 % Reinheit) durchgeführt.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)



Es wurden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* verwendet. Die Beschichtung bestand aus 60 F₂₅₄ Kieselgel mit einer Schichtdicke von 0.25 mm. Die visuelle Auswertung erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Die chemische Auswertung erfolgte gegebenenfalls durch Anfärben mit Schwefelsäure (3 %) in Methanol und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftfön.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als stationäre Phase wurde Kieselgel der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40 – 63 μm verwendet. Die verwendete Säule wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[363] bei einem Überdruck von 0.2 – 0.6 bar chromatographiert. Die zu reinigende Substanz wurde entweder im Laufmittel gelöst, oder auf Kieselgel absorbiert aufgetragen.

Sublimationstrocknung

Wässrige Lösungen wurden an der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1- 2 LD Plus von *Christ* nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff getrocknet.

DNA-Festphasensynthese

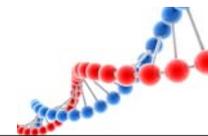
Die DNA-Festphasensynthese erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems*. Als Träger dienten CPGs mit 1 μmol Belegung (500 Å). Phosphoramidite, CPG-Säulen und Synthesizer-Chemikalien stammten von *Glen Research* und *Proligo*.

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*

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



NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden an einem Bruker *Avance 300*, *Avance 400* oder *Avance 600-Kryo* durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, NMR-Spektroskopie der Universität Regensburg in deuterierten Lösungsmitteln gemessen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalteten ca. 10 mg Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel. 2D-Spektren enthielten 0.1 mmol Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz diente das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels

- DMSO- d_6 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.49$ ppm; $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39.4$ ppm
- DCM- d_2 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 5.31$ ppm; $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 53.7$ ppm

Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizität der ^1H -Signale wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett von Dublett), m (Multiplet) und bs (breites Singulett).

Spektroskopie

Für alle spektroskopischen Messungen wurden Quarzglas-Küvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Während der spektroskopischen Untersuchung wurde das Spektrometergehäuse stetig mit Stickstoff gespült. Zur Messung wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*Uvasol*®, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet. Soweit nicht anders angegeben, enthielten alle Lösungen folgende Konzentrationen und wurden bei 20 °C spektroskopisch untersucht:

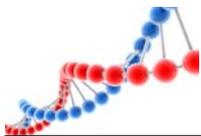
$$c_{(\text{DNA})} = 2.5 \mu\text{M}$$

$$c_{(\text{NaPi})} = 10 \text{ mM}$$

$$c_{(\text{NaCl})} = 250 \text{ mM}$$

UV/Vis-Absorptionsmessung

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden in einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit temperierbaren Küvettenhalter 6 x 6 aufgenommen. Die Spektren wurden gegen die UV/Vis-Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende



Messparameter wurden verwendet: SBW: 2.0 nm, Average time 0.1 s, Data interval 1.0, Light source change over 350 nm.

Temperaturabhängige UV/Vis-Absorptionsmessung

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden über einen Temperaturbereich von 20 – 90 °C im Abstand von 5 °C aufgenommen. Vor jeder Messung wurde die Temperatur 6 min konstant gehalten.

Schmelztemperaturmessungen

Die Schmelzpunktmessungen erfolgten analog den UV/Vis-Absorptionsmessungen über einen Temperaturbereich von 10 – 90 °C bzw. 4 – 90 °C. Die Temperatur am Start- bzw. Endpunkt wurde jeweils 10 min konstant gehalten. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min, Die Messdaten wurden in 0.5 °C Abständen erfasst.

Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenzmessungen werden an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* von *Jobin-Yvon* mit einem Peltiere-Element *LFI-3751* zur Temperatursteuerung von *Wavelength Electronics* durchgeführt. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: Increment: 1.0 nm, Increment time: 0.2 s.

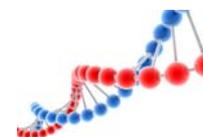
Die Anregungswellenlänge beträgt, soweit nicht anders angegeben, für Systeme mit Perylenbisimid $\lambda = 505$ nm und für Systeme mit Amino-perylenbisimid $\lambda = 650$ nm.

Temperaturabhängige Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenzspektren wurden über einen Temperaturbereich von 20 – 90 °C im Abstand von 5 °C aufgenommen. Vor jeder Messung wurde die Temperatur mit einer Toleranz von 0.1 °C 6 min konstant gehalten.

Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute erfolgte für Perylenbisimid mit einer basischen Fluoresceinlösung. Die Quantenausbeute von Fluorescein beträgt nach der *Weber-Teale* Methode 92 %.^[364] Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute von Amino-perylenbisimid wurde ATTO 700 der Firma



ATTO-TEC GmbH verwendet. Die Quantenausbeute dieses Farbstoffes in wässriger Lösung beträgt nach Firmenangaben 25 %.

Zirkulardichroismus (CD)

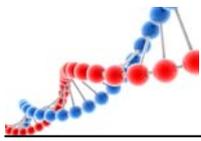
CD-Messungen wurden an einem *Jasco J-715 Spektropolarimeter* mit *PTC-150J* Thermostat durchgeführt. Die Spektren wurden gegen die UV/Vis-Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: Sensitivity: 100 mdeg, Data Pitch: 1 nm, Scanning Mode: continuous, Scanning Speed: 200 nm/min, Response: 1.0 s, Band Width: 1 nm, Accumulation: 5.

Cyclovoltametrie (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. Während der gesamten Messung wurde die Zelle mit Argon gespült. Die Messungen wurden in trockenem Dichlormethan und um eine ausreichende Leitfähigkeit zu gewährleisten und Migrationsströme zu verhindern mit Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat als Leitsalz durchgeführt. Die Angabe der Potentialwerte erfolgte gegen Ferrocen (Fc^+ / Fc) als internen Standard. Die erhaltenen Potentiale wurden mit einem Umrechnungsfaktor von +0.63 V auf Potentiale gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) umgerechnet.^[365]

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Reversed-phase HPLC erfolgte an einem *Shimadzu* HPLC System (Entgaser, Pumpeneinheit LC-10AT, Autosampler SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Für die analytische Chromatographie wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm) verwendet. Präperative Trennung erfolgte über eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 10 mm Innendurchmesser, 5 μm). Zur Herstellung der Laufmittel wurde Acetonitril (*LiChrosolv*, *Merck*) und entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet. Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5, Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B)



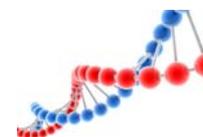
durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min für analytische Methoden und 2.5 mL/min für präperative Methoden. Die Detektion erfolgte über die UV/Vis-Absorption der DNA bei $\lambda = 260$ nm sowie über die UV/Vis-Absorption von Amino-perylenbisimid bei $\lambda = 435$ nm und $\lambda = 704$ nm bzw von Perylenbisimid bei $\lambda = 548$ nm. Die Produkte der Chromatographie wurden in sterilen Kunststoffröhrchen (Falcon-Tubes, 15 mL) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Die verbliebene DNA wurde in 100 μ L HPLC-Wasser aufgenommen und als Stammlösung verwendet.

Tabelle 43: Übersicht über die verwendeten Trennmethode und Detektionswellenlängen.

Nukleotid	Laufzeit [min]	Gradient [% von B]	Detektionswellenlängen [nm]
Amino-perylenbisimid	0 – 45	0 – 50	260, 290, 435, 704
	45 – 50	50	
Perylenbisimid	0 – 45	0 – 50	260, 290, 548
	45 – 50	50	

Atomic Force Microscopy (AFM)

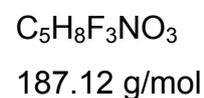
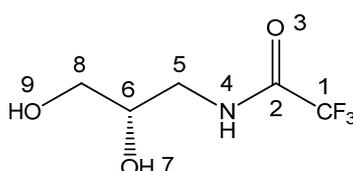
AFM Messungen wurden an einem *MultiModeTM Nanoscope IV* System von *Veeco Metrology Inc.* im „tapping mode“ durchgeführt. Für die Oberflächenabtastung wurden Silizium Cantilever NSG03 von NT-MDT mit Länge von 135 μ m, einer Breite von 30 μ m, einer Dicke von 1.5 μ m, einer Resonanzfrequenz von ca. 80 kHz und einer Federkonstante von ca. 1.74 N/m benutzt. Die zu messende Probe wurde mit dem sogenannten „Drop-cast“ Verfahren vorbereitet. Hierzu wurde die DNA-Lösung auf eine frisch gereinigte Mica-Oberfläche getropft und nach ca. 30 – 90 s mit entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage abgewaschen. Die Mica-Oberfläche wurde anschließend unter dem Stickstoffstrom getrocknet.



6.2. Synthesevorschriften

6.2.1. Darstellung des azyklischen Aminopropandiol-Linkers

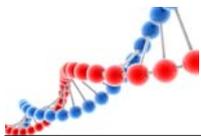
(S)-N-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid (2)



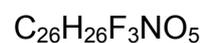
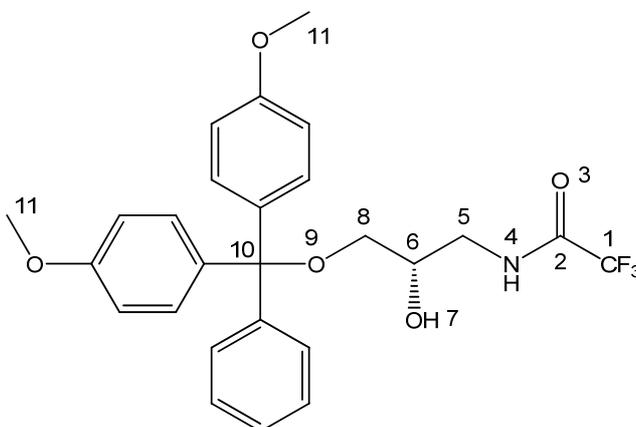
1.00 g (11.0 mmol, 1 eq.) (S)-1-Amino-propan-2,3-diol wurden in 10.9 mL Methyltrifluoracetat (110 mmol, 10 eq.) suspendiert und über Nacht unter Lichtschutz gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels blieb ein gelbliches Öl zurück. Das Rohprodukt wurde dreimal mit jeweils 30.0 mL Toluol coevaporiert und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 2.02 g (10.8 mmol) eines farblosen Öls (98 %) erhalten.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.26 (s, 1H, 4), 4.72 (bs, 2H, 7/9), 3.59 (m, 1H, 6), 3.28 (m, 1H, 5), 3.26 (m, 2H, 8), 3.09 (m, 1H, 5)

^{13}C -NMR (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ = 156.6 (q, J = 36 Hz, 2), 116.7 (q, J = 288 Hz, 1), 69.9 (6), 64.0 (8), 43.1 (5)



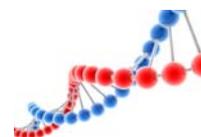
(S)-N-(3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl)-trifluoracetamid (3)



2.52 g (13.5 mmol, 1 eq.) (S)-N-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid wurden in 70.0 mL Tetrahydrofuran und 3.50 mL (25.2 mmol, 1.9 eq.) Triethylamin gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter ständigem Rühren portionsweise 4.80 g (13.5 mmol, 1 eq.) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid gegeben und die Lösung 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1.50 mL Methanol abgebrochen und noch 1 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen. Die Lösung wurde dreimal mit je 70.0 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 70.0 mL Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels und Trocknen im Hochvakuum erhielt man 5.80 g (11.8 mmol, 87 %) eines farblosen Öls.

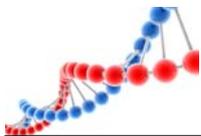
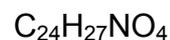
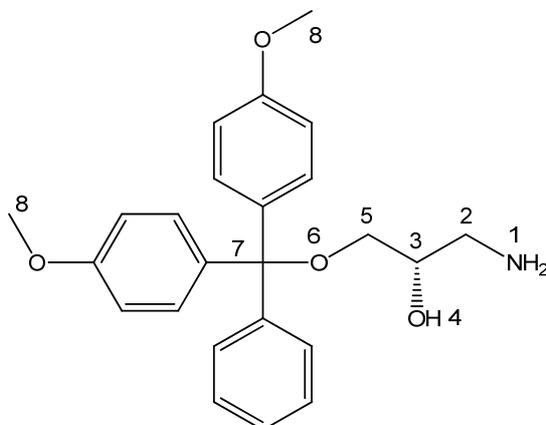
DC (DCM / MeOH 50:1) $R_f = 0.44$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.30$ (s, 1H, 4), 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.18 (m, 7H, arom.), 6.86 (m, 4H, arom.), 5.11 (s, 1H, 7), 3.82 (m, 1H, 6), 3.72 (s, 6H, 11), 3.37 (m, 1H, 5), 3.15 (m, 1H, 5), 2.96 (m, 1H, 8), 2.87 (m, 1H, 8).



$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ = 158.2 (arom.), 156.4 (q, J = 36 Hz, 2), 145.2, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8 (arom.), 116.2 (q, J = 288 Hz, 1), 113.3 (arom.), 85.5 (10), 69.6 (6), 64.1 (8), 55.2 (11), 43.2 (5).

ESI-MS m/z (%): 488.3 (100) $[\text{M-H}^+]$

**(S)-3-(Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propylamin (4)**

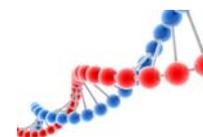
In einer Mischung von 75.0 mL Methanol, 75.0 mL konzentrierter Ammoniaklösung (32 %) und 30.0 mL THF wurden 5.80 g (11.9 mmol 1 eq.) (S)-N-(3-[Bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl)-trifluoracetamid über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Methanol und THF wurden aus der Lösung entfernt und der verbleibende Rest wurde dreimal mit jeweils 25.0 mL DCM ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden abgezogen und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 4.44 g (11.3 mmol, 95 %) eines weißen, erstarrten Schaums erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.17 (m, 7H, arom.), 6.87 (m, 4H, arom.), 4.67 (bs, 1H, 4), 3.72 (s, 6H, 8), 3.56 (m, 1H, 3) 3.30 (bs, 2H, 1), 2.93 (m, 1H, 5), 2.83 (m, 1H, 5), 2.66 (m, 1H, 2), 2.45 (m, 1H, 2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 158.2, 145.4, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8, 113.3 (arom.), 85.3 (7), 71.5 (3), 65.9 (5), 55.2 (8), 43.2 (2)

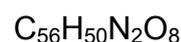
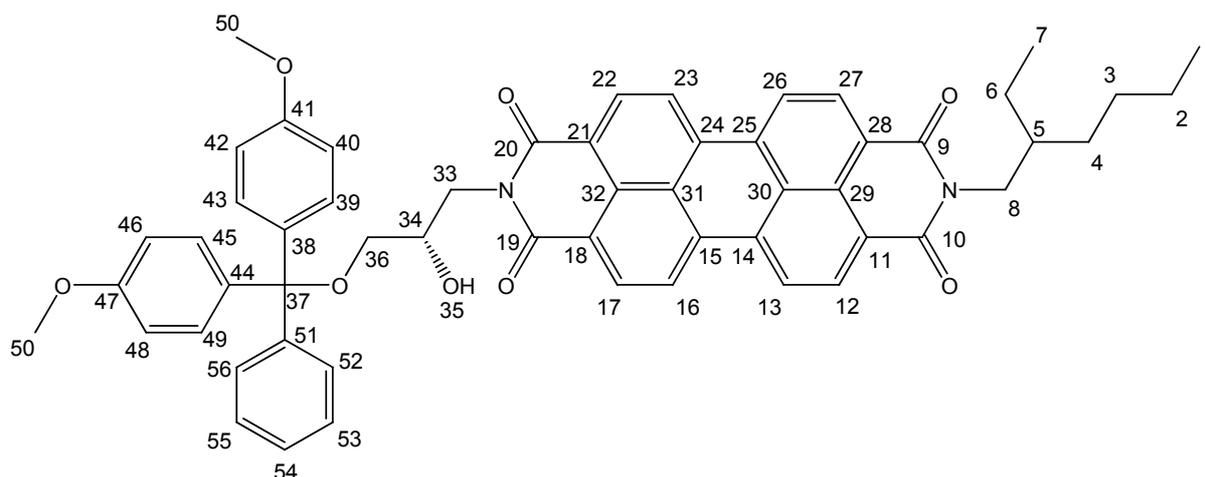
ESI-MS: m/z (%): 303.0 (100) [DMT^+], 787.5 (10) [2MH^+]

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



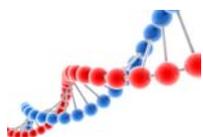
6.2.2. Darstellung des unmodifizierten Perylenbisimidbausteins

***N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (7)**



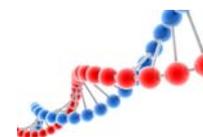
1.00 g (2.50 mmol, 1 eq.) Perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydride wurden zusammen mit 1.09 g (4.90 mmol, 1.94 eq.) $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 50.0 ml Pyridin suspendiert und 1 h unter Rückfluss gerührt. Dann wurde eine Lösung von 1.20 mL (0.950 g, 7.30 mmol, 1.92 eq.) 2-Ethylhexylamin und 1.47 g (3.70 mmol, 0.98 eq.) (S)-3-(Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propylamin in 20 mL Pyridin zugegeben und die Lösung 23 h unter Rückfluss weitergerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der dunkelrote Feststoff in Dichlormethan gelöst und mit verdünnter KOH-Lösung ausgeschüttelt, bis die wässrige Phase keine grüne Färbung mehr aufwies. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Das so erhaltene dunkelrote Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (SiO_2 , DCM / Aceton 20:1) gereinigt. Nach der Trocknung im Hochvakuum erhielt man 0.617 g (0.7 mmol, 28 %) eines dunkelroten Pulvers.

DC (DCM / Aceton 10:1) $R_f = 0.26$

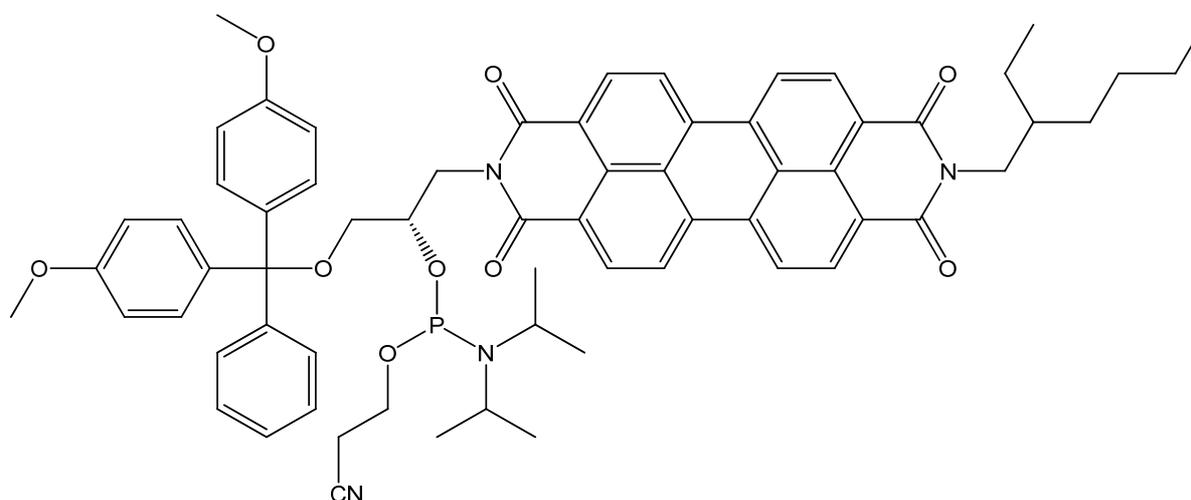


¹H-NMR (600 MHz, DCM-d₂): δ = 7.87 (m, 4H, 13/16/23/26), 7.54 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 52/56), 7.42 (m, 8H, 12/17/22/27 & 39/43/45/49), 7.32 (dd, 2H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.6 Hz, 53/55), 7.22 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, 54), 6.86 (d, 4H, *J* = 9.0 Hz, 40/42/46/48), 4.46 (m, 1H, 33a), 4.28 (m, 1H, 34), 4.05 (m, 1H, 33b), 3.99 – 3.89 (m, 2H, 8), 3.78 (s, 6H, 50), 3.37 (m, 1H, 35), 3.26 (m, 2H, 36), 1.86 (m, 1H, 5), 1.42 – 1.27 (m, 8H, 2/3/4/6), 0.94 (m, 3H, 7), 0.89 (m, 3H, 1)

¹³C-NMR (150.9 MHz, DCM-d₂): δ = 163.31, 163.07 (9/10/19/20), 158.99 (41/47), 145.56 (54), 136.47 (38/44), 133.17, 133.14, 132.85, 132.82 (Perylen), 130.50 (39/43/45/49), 130.49, 130.34 (13/16/23/26), 128.55 (52/56), 128.36 (Perylen), 128.21 (53/55), 127.09 (54), 124.80, 124.77, 122.84, 122.81, 122.54, 122.31 (Perylen), 113.47 (40/42/46/48), 86.37 (37), 69.34, 69.29 (34), 66.29 (36), 55.55 (50), 44.52 (8), 44.19 (33), 38.29, (5), 31.07 (4), 29.01 (3), 24.36(6), 23.52 (2), 14.31 (1), 10.75 (7)



***N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-[(2-cyanoethoxy)-*N,N*-(diisopropylamino)-phosphanyloxy]-propyl)-perylene-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (8)**



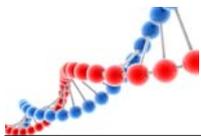
$C_{65}H_{67}N_4O_9P$

1079.22 g/mol

In 10 mL abs. Dichlormethan wurden 333 mg (0.38 mmol, 1 eq.) *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-perylene-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid gelöst, mit 0.248 mL (180 mg, 1.78 mmol, 4.7 eq.) trockenem Triethylamin versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Zur Lösung wurden dann 0.203 mL (215 mg, 0.91 mmol, 2.4 eq.) β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit hinzugegeben. Nach ca. 120 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.1 mL Ethanol abgebrochen und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene, tiefrote Rohprodukt wurde über Flashchromatographie (SiO₂, DCM / Aceton 10:1 + 0.1 Vol% NEt₃) gereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum erhielt man 308 mg (0.29 mmol, 75 %) eines dunkelroten erstarrten Schaums.

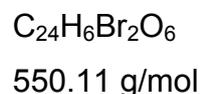
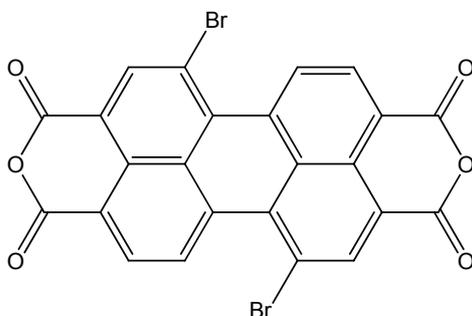
DC (DCM / Aceton 10:1) $R_f = 0.73$

³¹P-NMR (121 MHz, DCM-d₂): $\delta = 149.6, 147.6$



6.2.3. Darstellung des aminomodifizierten Perylenbisimidbausteins

1,7-Dibromoperylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydrid (**9**)

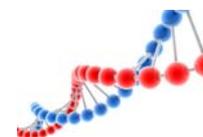


5.00 g (12.7 mmol, 1 eq.) Perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydrid wurden in 150 ml konzentrierter Schwefelsäure suspendiert und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde 0.259 g (1.00 mmol 0.08 eq.) I₂ zugegeben, auf 85 °C erwärmt und 45 min gerührt. Zu dieser Suspension wurden anschließend 3.92 mL (12.2 g, 76.5 mmol, 6 eq.) Brom zugespritzt und über Nacht bei 95 °C weitergerührt.

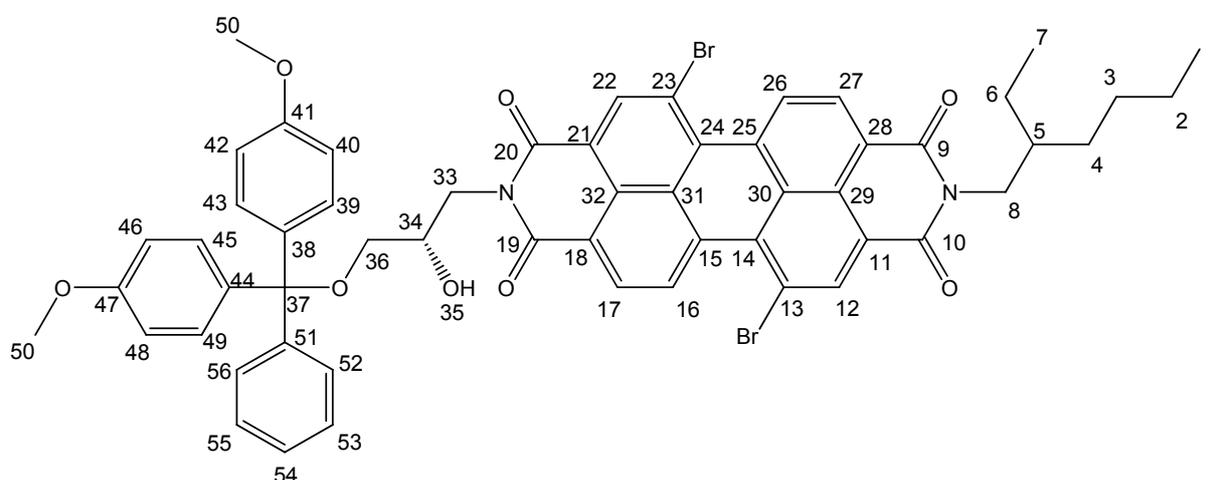
Am Folgetag wurde, nach Abkühlen auf Raumtemperatur, das nicht abreagierte Br₂ mit Stickstoff ausgetrieben und das Rohprodukt durch Zugabe von Wasser gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und solange mit Wasser gewaschen bis die Waschlösung einen neutralen pH-Wert aufwies. Eine weitere Aufreinigung war wegen der geringen Löslichkeit des Produkts nicht möglich. Nach Trocknen im Hochvakuum und anschließender Lyophilisation erhielt man 6,91 g (12.6 mmol; 99 %) eines kräftig rostroten Pulvers.

CI-MS: m/z (%) 550.3 (100) [M⁻]

EI-MS: m/z (%) 549.9 (100) [M⁺], 505.9 (32) [M⁺ -CO₂]



***N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-1,7-dibromoperylen-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (10)**



1.00 g (1.80 mmol, 1 eq.) 1,7-Dibromoperylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydride wurden zusammen mit 200 mg (0.90 mmol, 0.5 eq.) $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 200 mL Pyridin suspendiert und auf 75 °C unter rühren erwärmt. Sobald die Suspension die Temperatur von 75 °C erreicht hat, wurde eine Lösung von 299 μL (236 mg, 1.80 mmol, 1 eq.) 2-Ethylhexylamin und 1.44 g (3.70 mmol, 2 eq.) (*S*)-3-(Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propylamin in 30.0 mL Pyridin über 2 – 3 h zugetropft. Die Suspension wurde weitere 12 h bei 75 °C gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Das so erhaltene brombeerrote Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie vorgereinigt. Das vorgereinigte Produkt wurde durch eine zweite Säulenchromatographie aufgereinigt und im Hochvakuum getrocknet.

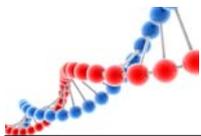
1. Säule: SiO_2 , DCM / Aceton 20:1;

DC (DCM / Aceton 15:1) $R_f = 0.63$

2. Säule: SiO_2 ; PE / Aceton 3:2

DC (PE / Aceton 3:1) $R_f = 0.27$

Es wurden 480 mg (0.5 mmol, 25 %) eines dunkelroten Pulvers erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DCM-d₂): δ = 9.51 (d, 1H, *J* = 8.16 Hz, 16), 9.50 (d, 1H, *J* = 8.13 Hz, 26), 8.91 (s, 1H, 12), 8.89 (s, 1H, 22), 8.68 (d, 1H, *J* = 8.16 Hz, 17), 8.68 (d, 1H, *J* = 8.13 Hz, 27), 7.46 – 7.44 (m, 2H, 52/56), 7.34 – 7.30 (m, 4H, 39/43/45/49), 7.28 – 2.25 (m, 2H, 53/55), 7.20 – 7.17 (m, 1H, 54), 6.81 – 6.78 (m, 4H, 40/42/46/48), 4.58 – 4.52 (m, 1H, 33a), 4.33 – 4.29 (m, 1H, 33b), 4.18 – 4.08 (m, 3H, 8/34), 3.74 (s, 6H, 50), 3.32 – 3.29 (m, 1H, 36), 3.26 – 3.22 (m, 1H, 36), 2.81 (d, 1H, 35), 1.97 – 1.91 (m, 1H, 5), 1.29 – 1.42 (m, 8H, 2/3/4/6), 0.82 – 0.97 (m, 6H, 1/7),

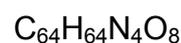
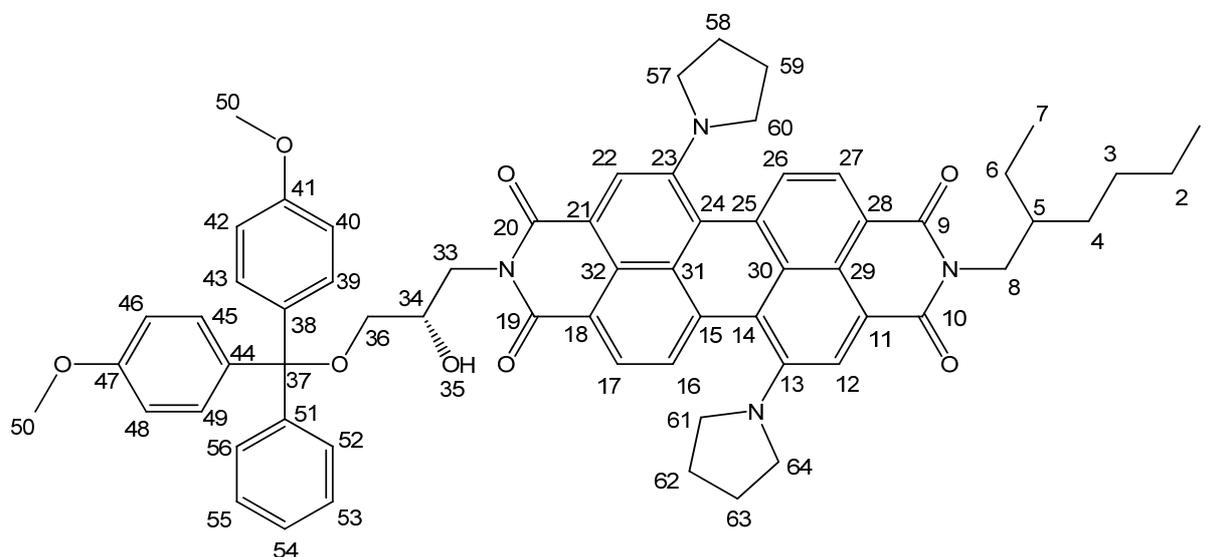
¹³C-NMR (150.9 MHz, DCM-d₂): δ (ppm) = 164.0 (19), 163.6 (9), 163.5 (20), 163.1 (10), 159.0 (41/47), 145.3 (51), 138.4 (22), 138.2 (12), 136.3 (arom.), 136.2 (38/44), 133.7, 133.5, 133.3, 133.1 (arom.), 130.4 (39/43/45/49), 130.2 (17/27), 129.7, 129.6, 129.0 (arom.), 128.9 (16/26), 128.4 (52/56), 128.1 (53/55), 127.4, 127.3 (arom.), 127.1 (54), 123.8, 123.3, 122.9, 121.2, 121.0 (arom.), 113.4 (40/42/46/48), 86.6 (37), 70.1 (34), 66.2 (36), 55.5 (50), 44.6 (8), 44.4 (33), 38.3 (5), 31.1, 29.1, 24.4, 23.4 (2/3/4/6), 14.2, 10.8 (1/7)

ESI-MS: m/z (%) 1036.3 (100) [M⁻]

HR-EI-MS: m/z (%) 1034.1746 (1) [M⁺]



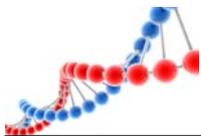
***N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-1,7-dipyrrolidinylperylene-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (11)**



494 mg (0.5 mmol 1 eq.) *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-1,7-dibromoperylen-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid wurden in 40.0 mL Pyrrolidin gelöst und 24 h bei 55 °C gerührt. Bereits nach wenigen Minuten konnte man einen deutlichen Farbumschlag von rot nach blaugrün sehen. Nach der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel entfernt und das tiefgrüne Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM / Aceton 20:1) gereinigt. Man erhielt 396 mg (0.4 mmol, 82 %) eines dunkelgrünen Pulvers.

DC (DCM / Aceton 15:1) $R_f = 0.60$

¹H-NMR (600 MHz, DCM-d₂): $\delta = 8.41$ (s, 1H, 22), 8.36 (s, 1H, 12), 8.34 (d, 1H, $J = 8.14$ Hz, 17), 8.33 (d, 1H, $J = 8.14$ Hz, 27), 7.65 (d, 1H, $J = 8.14$ Hz, 26), 7.60 (d, 1H, $J = 8.14$ Hz, 16), 7.50 – 7.47 (m, 2H, 52/56), 7.38 – 7.35 (m, 4H, 39/43/45/49), 7.28 – 7.25 (m, 2H, 53/55), 6.83 – 6.79 (m, 4H, 40/42/46/48), 4.56 – 4.50 (m, 1H, 33a), 4.41 – 4.37 (m, 1H, 33b), 4.23 – 4.17 (m, 1H, 34), 4.17 – 4.07 (m, 2H, 8), 3.77 – 3.65 (m, 9H, 50/Pyrrolidin), 3.31 – 3.21 (m, 3H, 35/36), 2.88 – 2.69 (m, 4H, Pyrrolidin), 2.11 –



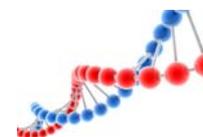
1.90 (m, 10H, 5/Pyrrolidin), 1.44 – 1.29 (m, 8H, 2/3/4/6), 0.97 – 0.93 (m, 3H, 7), 0.92 – 0.88 (m, 3H, 1)

¹³C-NMR (150.9 MHz, DCM-d₂): δ = 165.3 (19/20), 164.7 (10), 164.6 (9), 158.9 (41/47), 147.0, 146.8 (arom.), 145.5 (51), 136.5 (44), 136.5 (38), 134.9, 134.4 (arom.), 130.3 (39/43/45/49), 128.5 (52/56), 128.1 (53/55), 128.0 (arom.), 127.1 (17), 127.0 (54), 126.8 (27), 124.3 (26), 123.9 (16), 122.6, 122.4 (arom.), 122.1 (22), 121.7, 121.1 (arom.), 121.0 (12), 119.6, 119.0, 118.7 (arom.), 113.4 (40/42/46/48), 86.4 (37), 70.6 (34), 66.4 (36), 55.6 (50), 52.5 (Pyrrolidin), 44.5 (33), 44.3 (8), 38.4 (5), 31.2 (4), 29.2 (3), 26.2 (Pyrrolidin), 24.5 (6), 23.5 (2), 14.3 (1), 10.9 (7)

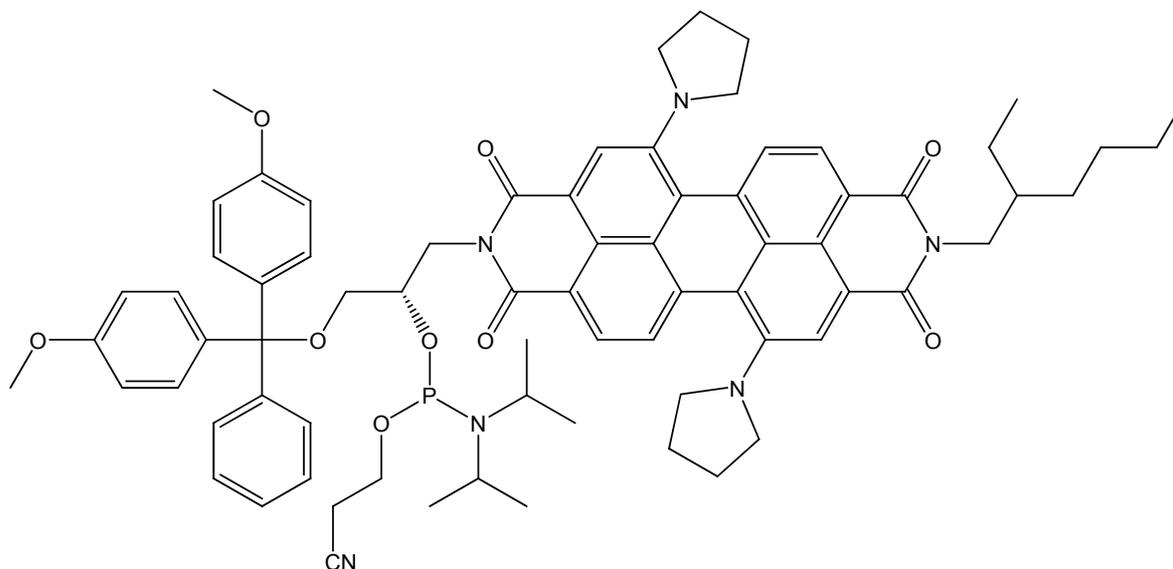
ESI-MS: m/z (%) 1015.5 (100) [[M-H]⁻]

HR-EI-MS: m/z (%) 1016.4744 (45) [M⁺]

Elementaranalyse: (%): C 74.68, H 6.43, N 5.06



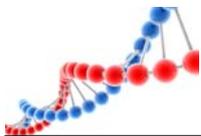
***N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-[(2-cyanoethoxy)-*N,N*-(diisopropylamino)-phosphanyloxy]-propyl)-1,7-Dipyrrolidinylperylene-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (12)**



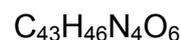
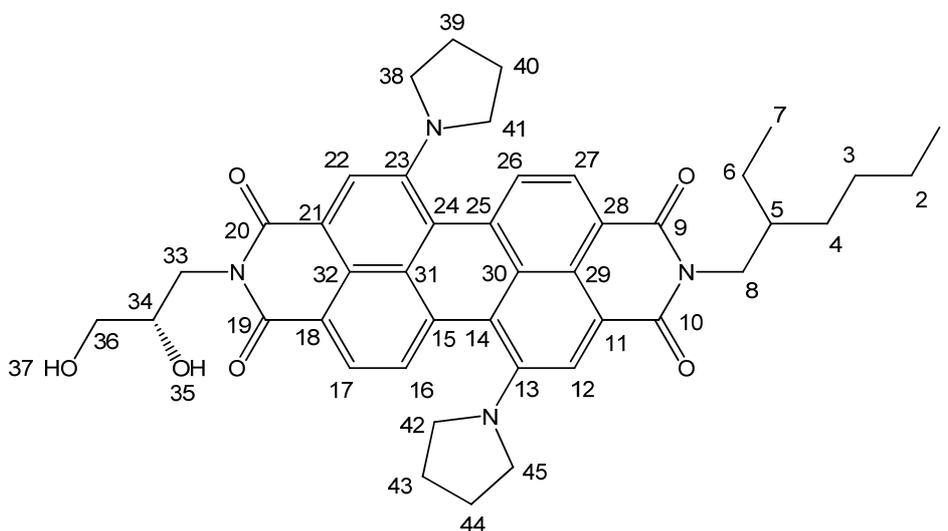
In 10.0 mL abs. Dichlormethan wurden 182 mg (0.18 mmol, 1 eq.) *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-1,7-dipyrrolidinylperylene-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden 0.262 mL (190 mg, 1.88 mmol, 10.5 eq.) trockenes Triethylamin zugefügt und weitere 30 min gerührt. Die Lösung wurde hierauf mit 0.798 mL (847 mg, 3.58 mmol, 20 eq.) β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt. Nach ca. 40 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.100 mL Methanol abgebrochen und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene dunkelgrüne Rohprodukt wurde über Flashchromatographie (SiO₂, DCM / Aceton 15:1 + 0.1 Vol% NEt₃) gereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum erhielt man 162 mg (0.13 mmol, 74 %) eines dunkelgrünen, erstarrten Schaums.

DC (DCM / Aceton 15:1) $R_f = 0.83$

³¹P-NMR (121 MHz, DCM-d₂): $\delta = 149.6, 149.4$



***N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(2,3-(*S*)-dihydroxypropyl)-1,7-dipyrrolidinylperylene-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (13)**



In 10.0 mL abs Dichlormethan wurden 0.116 g (0.11 mmol, 1 eq.) *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-O-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-1,7-dipyrrolidinylperylene-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid mit 0.100 mL (0.154 g, 1.20 mmol, 10.5 eq.) 1 %iger Dichloressigsäure versetzt, worauf sich ein sofortiger Gelbstich der Lösung zeigte. Die Lösung wurde unmittelbar auf eine Chromatographiesäule aufgetragen und gereinigt (DCM / MeOH 93:7). Es wurden 75.6 mg (0.11 mmol, 93 %) eines grünen Pulvers erhalten.

DC (DCM / MeOH 93:7) $R_f = 0.25$

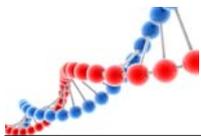
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DCM- d_2): $\delta = 8.34$ (s, 1H, 22), 8.31 (d, 1H, $J = 7.92$ Hz, 17), 8.25 (d, 1H, $J = 7.92$ Hz, 27), 8.21 (s, 1H, 12), 7.53 (d, 1H, $J = 7.92$ Hz, 26), 7.45 (d, 1H, $J = 7.92$ Hz, 16), 4.48 – 4.44 (dd, 1H, $^3J = 14.09$ Hz, 33a), 4.39 – 4.35 (dd, 1H, $^3J = 14.09$ Hz, 33b), 4.16 – 4.06 (m, 3H, 8/34), 3.69 – 3.62 (m, 5H, 36/Pyrrolidin), 3.51 (bs, 1H, 35), 2.99 (bs, 1H, 37), 2.78 – 2.64 (m, 4H/Pyrrolidin), 2.09 – 1.88 (m, 10H, 5/Pyrrolidin), 1.44 – 1.29 (m, 8H, 2/3/4/6), 0.97 – 0.93 (m, 3H, 1), 0.92 – 0.89 (m, 3H, 1)



¹³C-NMR (150.9 MHz, DCM-d₂): δ = 165.6 (19/20), 164.5 (10), 164.4 (9), 146.9, 146.6, 135.0, 133.8, 130.0, 129.8 (arom.), 127.3 (17), 126.7 (27), 124.4 (26), 123.7 (16), 122.4, 122.1, 122.0 (arom.), 121.2 (22), 121.1 (arom.), 120.8 (12), 119.5, 118.9, 118.3, 117.5 (arom.), 71.1 (34), 64.1 (36), 52.5 (Pyrrolidin), 44.3 (8), 43.2 (33), 38.4 (5), 31.2 (4), 29.2 (3), 26.1 (Pyrrolidin), 24.5 (6), 23.5 (2), 14.3 (1), 10.9 (7)

ESI-MS: m/z (%) 714.3 (100) [M⁺]

HR-EI-MS: m/z (%) 714.3403 (100) [M⁺]



6.3. Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden

Allgemein

Die Synthese von DNA-Oligonukleotiden erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909* Syntheseautomaten von *Applied Biosystems*. Reagenzien zum Betrieb des Automaten und Phosphoramidite (A(Bz), C(bz), G(^tBu), T) wurden von *Proligo* bezogen. Das Gerät wurde mit Argon als Schutzgas betrieben. Als Trägermaterialien dienten CPG-Säulen mit 500 Å Porengröße und 1 µmol Belegung (*Proligo*). Die 5'-terminale DMT-Schutzgruppe wurde an sämtlichen DNA-Strängen durch den Syntheseautomaten abgespalten (trityl-off-Synthese). Artificielle DNA-Bausteine wurden in Dichlormethan aufgenommen und mit einer Konzentration von 0.1 mol/L in den Syntheseautomaten eingesetzt. Zusätzlich wurde Dichlormethan, zum Equilibrieren des Systems, vor dem Einbau der künstlichen Base und als Spüllösung nach dem Kupplungsschritt, in den Syntheseautomaten eingesetzt.

Kupplungsprotokolle

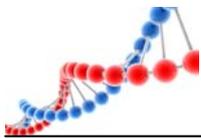
Der Syntheseautomat förderte die Reagenzien aus ihren Reservoirs in Pulsen zu je 16 µL durch die Reaktionsgefäße. Die Kupplungsprotokolle bestehen aus Einzelschritten, welche die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 s bedeutet ein schnellstmögliches Durchlaufen eines Einzelschritts. Für den Einbau der Standardphosphoramidite (A(Bz), C(bz), G(^tBu), T) wurde das Standardprotokoll (siehe Tabelle 44) verwendet.

Dbk:	3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan
Wsh:	Acetonitril
Act:	0.45 M Tetrazol in Acetonitril
Caps:	Acetanhydrid in THF / Pyridin (Cap A) und <i>N</i> -Methylimidazol in THF / Pyridin (Cap B)
Ox:	Iod in Wasser / THF / Pyridin



Tabelle 44: Standardprotokoll zur Kupplung am Beispiel des Phosphoramidits A(Bz).

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
\$Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	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	7	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



Kupplungsprotokolle der modifizierten Bausteine

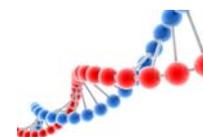
Um eine exzellente Kupplungseffizienz der künstlichen Basen zu gewährleisten, musste das Standardprotokoll im Bereich \$Coupling für jeden Baustein individuell modifiziert werden.

Für Amino-perylenbisimid wurde hierfür die Kupplungszeit von 96 s (Standardbasen) auf 1450 s verlängert und die Anzahl der benötigten Pulse von sieben auf zweiunddreißig erhöht. Außerdem wurde ein dritter Kupplungsschritt eingeführt. Gleichzeitig mussten, um ein Ausfallen des künstlichen Bausteins im System zu verhindern, zusätzliche Equilibrier- und Waschschrte mit Dichlormethan hinzugefügt werden. Tabelle 45 zeigt das veränderte Kupplungsprotokoll mit dem Sonderbaustein **12** an Position 7 und Dichlormethan an Position 5.

Tabelle 45: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den künstlichen DNA-Baustein 12.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
\$Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
22	5 + Act	PULSE	15	0
24	7 + Act	PULSE	15	0
24	7 + Act	PULSE	10	500
24	7 + Act	PULSE	7	500
22	5 + Act	PULSE	3	450
3	5	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	8	0
1	Wsh	PULSE	40	0

Für Perylenbisimid war ebenfalls eine Modifikation des Kupplungsprotokolls notwendig. Diese war jedoch im Vergleich zu Amino-perylenbisimid im Bezug auf das Standardprotokoll weniger drastisch. Die Kupplungszeit wurde für diesen Baustein auf 400 s verlängert. Die Anzahl der benötigten Pulse erhöhte sich nur auf zehn. Zusätzliche Kupplungsschritte waren nicht notwendig. Wie bei Amino-perylenbisimid mussten auch für diese künstliche Base, damit ein Ausfallen des Bausteins im System verhindert werden konnte, zusätzliche Equilibrier- und Waschschrte mit



Dichlormethan hinzugefügt werden. Tabelle 46 zeigt das veränderte Kupplungsprotokoll mit dem Sonderbaustein 8 an Position 7 und Dichlormethan an Position 5.

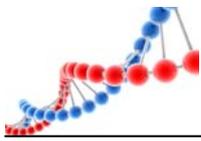
Tabelle 46: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den künstlichen DNA-Baustein 8.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
\$Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
22	5 + Act	PULSE	10	0
24	7 + Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	5	250
22	5 + Act	PULSE	3	150
3	5	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	40	0

Für den zweiten Einbau von Perylenbisimid in den Molecular Beacon DNA48 wurde wegen der Länge des Stranges und der daraus resultierenden höheren sterischen Hinderung ein verlängertes Kupplungsprotokoll verwendet.

Tabelle 47: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den zweiten Einbau von 8 in DNA48.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
\$Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
22	5 + Act	PULSE	10	0
24	7 + Act	PULSE	7	0
24	7 + Act	PULSE	7	450
24	7 + Act	PULSE	5	450
22	5 + Act	PULSE	3	350
3	5	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	40	0



Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide

Die CPG-Säulen wurden im Hochvakuum getrocknet, anschließend geöffnet, das CPG-Granulat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß umgefüllt und mit 700 µL konzentrierter Ammoniaklösung (>25 %, *trace select, Fluka*) versetzt. Die Abspaltung erfolgte über 15 Stunden bei 55 °C. Das CPG wurde nach der Reaktionszeit mittels Zentrifugenfilter abgetrennt und viermal mit jeweils 200 µL HPLC-Wasser gewaschen, bis man an ihm für Amino-perylenbisimid keine Grünfärbung und für Perylenbisimid keine Rotfärbung mehr erkennen konnte. Die vereinigten Filtrate wurden in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (35 min, Heizung 30 min, 100 mbar) von Ammoniak befreit. Von dieser Lösung wurden 20 µL direkt für die erste HPLC Analytik verwendet. Die verbliebene Lösung wurde in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Die so gewonnene DNA wurde in 200 µL Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage gelöst und über Reversed-phase HPLC gereinigt.

Charakterisierung der Oligonukleotide durch ESI-MS

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

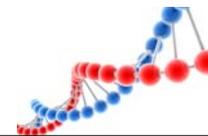
Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von unmodifizierten DNA-Stammlösungen wurde nach dem Gesetz nach *Lambert-Beer* aus der optischen Dichte bei $\lambda = 260$ nm bestimmt.^[366] Hierzu wurden je nach Konzentration 2 – 8 µL Stammlösung mit Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage auf 1 mL verdünnt und gemessen.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 15: Gesetz nach *Lambert-Beer*.

Hierbei gibt A für die gemessene UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260$ nm wieder, ε beschreibt den molaren Extinktionskoeffizienten der in der Lösung enthaltenen DNA, c steht für die Konzentration der DNA-Lösung und d für die Schichtdicke der durchstrahlten Probe.



Der molare Extinktionskoeffizient der DNA-Lösung in Wasser bei $\lambda = 260$ nm wird über folgende Formel berechnet.

$$\varepsilon = (A \cdot \varepsilon_A + T \cdot \varepsilon_T + G \cdot \varepsilon_G + C \cdot \varepsilon_C) \cdot 0.9$$

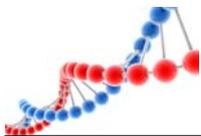
Gleichung 16: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten eines DNA-Strangs.

Dabei beschreibt A, T, G und C für die Anzahl der entsprechenden Nucleobase und ε_x steht für den entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen X bei $\lambda = 260$ nm. Die Hypochromizität wird durch den Faktor 0.9 berücksichtigt.

Tabelle 48: Molare Extinktionskoeffizienten der natürlichen Nucleoside.

Nucleosid	molarer Extinktionskoeffizienten	
	$\left[\frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$	
A	15 400	
T	8 800	
G	11 700	
C	7 300	

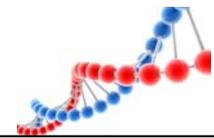
Die Bestimmung der Konzentration der modifizierten DNA-Stammlösungen erfolgte für Amino-perylenbisimid bei $\lambda = 436$ nm, für perylenbisimidmodifizierte DNA-Stränge bei $\lambda = 528$ nm bzw. für die DNA-Stränge DNA21, DNA26 und DNA32 bei $\lambda = 500$ nm. Da bei diesen Wellenlängen die natürlichen Nucleobasen nicht absorbieren, konnte deren Einfluss auf den Gesamtextinktionskoeffizienten vernachlässigt werden. Die Messung erfolgte nicht in Wasser, sondern in DMSO, um mögliche Wechselwirkungen zwischen den natürlichen Basen und des artifiziellen Nucleosids zu verhindern.

**Tabelle 49: Molare Extinktionskoeffizienten der artifiziellen Nukleoside.**

artifizielles Nukleosid	λ [nm]	molarer Extinktionskoeffizienten
		$\left[\frac{L}{mol \cdot cm} \right]$
Amino-perylenbisimid	436	13 921
Perylenbisimid	500	79 600
	528	62 500

Hybridisierung der Oligonukleotide

Der un-/modifizierte Einzelstrang wurde zusammen mit 1.0 eq. bzw. 1.2 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (Na-P_i) für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.



6.4. Anhang zu Kapitel 3 – Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base

Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung des Oxidationsvermögens zu Guanin im Anhängigkeit des Abstands

DNA1: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA2: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- TTT-TTC-AGT-ACG-3'

DNA3: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA4: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCC**-TTT-TTC-AGT-ACG-3'

DNA5: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA-G**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA6: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- **CTT**-TTC-AGT-ACG-3'

DNA7: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA-AG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA8: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- **TCT**-TTC-AGT-ACG-3'

DNA9: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA-AAG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA10: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- **TTC**-TTC-AGT-ACG-3'

DNA11: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA-AAA-G**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA12: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- TTT-**CTC**-AGT-ACG-3'

DNA13: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA-AAA-AG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

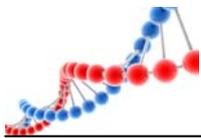
DNA14: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCT**- TTT-**TCC**-AGT-ACG-3'

DNA15: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**GPG**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA16: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**CCC**- TTT-TTC-AGT-ACG-3'

DNA17: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PC**-AAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA18: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-**TCG**-TTT- TTC-AGT-ACG-3'



DNA19: 3'-CGT-TGA-GAA-AAA-**PA**-CAA-AAG-TCA-TGC-5'

DNA20: 5'-GCA-ACT-CTT -TTT-TCT-**G**TT- TTC-AGT-ACG-3'

Tabelle 50: ESI-MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten perylen-bisimidmodifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang	Masse berechnet [Da]	Masse gefunden [Da]	$\epsilon_{528 \text{ nm}} \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
DNA1	8687.7	1738.3 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2172.5 [M-4H] ⁴⁻	
DNA3	8703.6	1741.1 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2176.6 [M-4H] ⁴⁻	
DNA5	8703.6	1741.0 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2176.7 [M-4H] ⁴⁻	
DNA7	8703.6	1741.1 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2176.3 [M-4H] ⁴⁻	
DNA9	8703.6	1741.0 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2176.4 [M-4H] ⁴⁻	
DNA11	8703.6	1740.9 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2176.3 [M-4H] ⁴⁻	
DNA13	8703.6	1741.1 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2176.6 [M-4H] ⁴⁻	
DNA15	8719.6	1744.1 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2180.3 [M-4H] ⁴⁻	
DNA17	8663.6	1732.9 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2166.3 [M-4H] ⁴⁻	
DNA19	8663.6	1732.8 [M-5H] ⁵⁻	62 500
		2166.5 [M-4H] ⁴⁻	

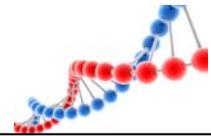
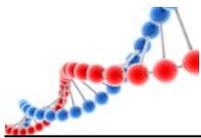


Tabelle 51: Schmelztemperaturen von DNA1 bis DNA20

DNA-Duplex	T_m [°C]	DNA-Duplex	T_m [°C]
DNA1-2	70.4	DNA3-4	71.5
DNA5-6	70.8	DNA7-8	70.9
DNA9-10	71.4	DNA11-12	71.3
DNA13-14	72.0	DNA15-16	73.4
DNA17-18	72.7	DNA19-20	71.2

Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung perylenbisimidmodifizierter DNA zur möglichen Detektion von SNPs

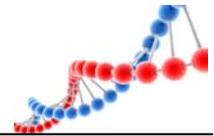
- DNA21: 3'-CCC-TC T-CT **P-GPC**-GCG-TGT-CTC-CTT-5'
- DNA22: 5'-GGG-AGA-GAC-**ACG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'
- DNA23: 5'-GGG-AGA-GAC-**TCG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'
- DNA24: 5'-GGG-AGA-GAC-**GCG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'
- DNA25: 5'-GGG-AGA-GAC-**CCG**-CGC-ACA-GAG-GAA-3'
-
- DNA26: 3'-**P**-ATA-**AGA**-ATA-**P**-5'
- DNA27: 5'-TAT-T**CT**-TAT-3'
- DNA28: 5'-TAT-T**GT**-TAT-3'
- DNA29: 5'-TAT-T**TT**-TAT-3'
- DNA30: 5'-TAT-T**A**T-TAT-3'
- DNA31: 5'-TAT-T**GG**-TAT-3'
-
- DNA32: 3'-**P**-ATA-AGC-CGA-ATA-**P**-5'
- DNA33: 5'-TAT-T**CG**-GCT-TAT-3'
- DNA34: 5'-TAT-T**CT**-GCT-TAT-3'
- DNA35: 5'-TAT-T**CC**-GCT-TAT-3'
- DNA36: 5'-TAT-T**CA**-GCT-TAT-3'
- DNA37: 5'-TAT-T**CA**-**ACT**-TAT-3'


Tabelle 52: ESI-MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten perylen-bisimidmodifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang	Masse berechnet [Da]	Masse gefunden [Da]	$\epsilon_{500 \text{ nm}} \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
DNA21	7858	1572.6 [M+5H] ⁵⁺	79 600
		1965.6 [M+4H] ⁴⁺	
DNA26	4029.9	1007.2 [M-4H] ⁴⁻	79 600
		1343.2 [M-3H] ³⁻	
		987.1 [M-5H] ⁵⁻	
DNA32	4937.1	1234.0 [M-4H] ⁴⁻	79 600
		1645.7 [M-3H] ³⁻	

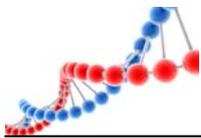
Tabelle 53: Schmelztemperaturen von DNA21 bis DNA37

DNA-Duplex	T _m [°C]	DNA-Duplex	T _m [°C]
DNA21-22	72.5	DNA21-23	72.5
DNA21-24	72.3	DNA21-25	75.0
DNA26-27	12.3	DNA26-28	--
DNA26-29	--	DNA26-30	--
DNA26-31	--		
DNA32-33	42.3	DNA32-34	23.1
DNA32-35	24.0	DNA32-36	22.4
DNA32-37	--		



Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung perylenbisimidmodifizierter Molecular Beacons

- DNA38: 3'-APC-TAA-TCT-TAT-AGT-AGA-AAC-CAC-AAA-GTA-ATT-APC-T-5'
 DNA39: 5'-GA-ATA-TCA-TCT-T TG-GTG-TTT-CAT-3'
 DNA40: 5'-GA-ATA-TCA-TCT-GTG-GTG-TTT-CAT-3'
 DNA41: 5'-GA-ATA-TCA-TCG-GTG-GTG-TTT-CAT-3'
- DNA42: 3'-APC-TAA-TGT-ACG-TCA-GTT-GAC-TAT-TAP-CT-5'
 DNA43: 5'-CA-TGC-AGT-CAA-CTG-A-3'
- DNA44: 5'-ATT-ACA-TGC-AGT-CAA-CTG-ATA-AT-3'
 DNA45: 5'-ATT-ACA-TGC-AGA-CAA-CTG-ATA-AT-3'
 DNA46: 5'-ATT-ACA-TGC-AGC-CAA-CTG-ATA-AT-3'
 DNA47: 5'-ATT-ACA-TGC-AGG-CAA-CTG-ATA-AT-3'
- DNA48: 3'-APC-TAA-TTT-GAC-CGT-ACG-TCA-GTT-GAC-TGG-TCA-AAT-TAP-CT-5'
 DNA49: 5'-GCA-TGC-AGT-CAA-CTG-AC-3'
 DNA50: 5'-A-CTG-GCA-TGC-AGT-CAA-CTG-ACC-AG-3'
 DNA51: 5'-AA-CTG-GCA-TGC-AGT-CAA-CTG-ACC-AGT-3'
- DNA52: 3'-APC-AAG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTT-TPC-T-5'
 DNA53: 5'-TTC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAA-A-3'
 DNA54: 5'-TTC-ATG-CAG-ACA-ACT-GAA-A-3'
 DNA55: 5'-TTC-ATG-CAG-CCA-ACT-GAA-A-3'
 DNA56: 5'-TTC-ATG-CAG-GCA-ACT-GAA-A-3'
- DNA57: 3'-APC-ACG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTT-TPC-T-5'
 DNA58: 5'-GC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAA-3'
 DNA59: 5'-GC-ATG-CAG-ACA-ACT-GAA-3'
 DNA60: 5'-GC-ATG-CAG-CCA-ACT-GAA-3'
 DNA61: 5'-GC-ATG-CAG-GCA-ACT-GAA-3'


Tabelle 54: ESI-MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten perylen-bisimidmodifizierten Oligonukleotide.

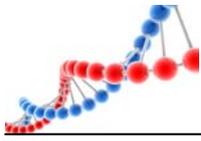
DNA-Strang	Masse berechnet [Da]	Masse gefunden [Da]	$\epsilon_{528 \text{ nm}} \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
DNA38	11985.3	1498.2 [M-8H] ⁸⁻	125 000
		1712.5 [M-7H] ⁷⁻	
		1998.2 [M-6H] ⁶⁻	
		2398.1 [M-5H] ⁵⁻	
		1588.6 [M-6H] ⁶⁻	
DNA42	9520.8	1906.2 [M-5H] ⁵⁻	125 000
		2382.9 [M-4H] ⁴⁻	
		1469.3 [M-9H] ⁹⁻	
DNA48	13226.4	1653.3 [M-8H] ⁸⁻	125 000
		1889.6 [M-7H] ⁷⁻	
		2205.1 [M-6H] ⁶⁻	
DNA52	8286.6	1382.9 [M+6H] ⁶⁺	125 000
		1659.5 [M+5H] ⁵⁺	
		2074.1 [M+4H] ⁴⁺	
DNA57	8262.6	1377.0 [M-6H] ⁶⁻	125 000
		1652.6 [M-5H] ⁵⁻	
		2066.1 [M-4H] ⁴⁻	

**Tabelle 55: Schmelztemperaturen in NaP_i-Puffer von DNA38 bisDNA61.**

DNA-Duplex	T _m [°C]	DNA-Duplex	T _m [°C]
DNA38	46.2	DNA38-39	64.5
DNA38-40	59.3	DNA38-41	58.8
DNA42	63.3	DNA42-43	58.9
DNA42-44	69.3	DNA42-45	63.8
DNA42-46	63.8	DNA42-47	67.5
DNA48	84.3	DNA48-49	52.0
DNA48-50	78.4	DNA48-51	77.4
DNA52	62.1	DNA52-53	67.4
DNA52-54	60.4	DNA52-55	60.6
DNA52-56	64.5		
DNA57	58.5	DNA57-58	64.8
DNA57-59	57.4	DNA57-60	57.0
DNA57-61	62.7		

Tabelle 56: Schmelztemperaturen in NaP_i-Puffer + 40 Vol% EtOH von DNA38, DNA38 mit Gegensträngen, DNA42 und DNA42 mit Gegensträngen.

DNA-Duplex	T _m [°C]	DNA-Duplex	T _m [°C]
DNA38	23.7	DNA38-39	42.8
DNA38-41	38.5		
DNA42	38.3		
DNA42-44	45.8	DNA42-45	42.3
DNA42-46	42.3	DNA42-47	45.7



6.5. Anhang zu Kapitel 4 – Pyrrolidinmodifiziertes Perylenbisimid als artifizielle DNA-Base

DNA62: 3'-AGT-CAC-TG**AP**-GTC-TGA-CG-5'

DNA63: 5'-TCA-GTG-AC **G** -CAG-ACT-GC-3'

DNA64: 5'-TCA-GTG-AC **A** -CAG-ACT-GC-3'

DNA65: 5'-TCA-GTG-AC **T** -CAG-ACT-GC-3'

DNA66: 5'-TCA-GTG-AC **C** -CAG-ACT-GC-3'

DNA67: 3'-CAG-TCA-**APAAP**-ACG-TAC-GT-5'

DNA68: 5'-GTC-AGT- C **A** C -TGC-ATG-CA-3'

DNA69: 5'-GTC-AGT- C **T** C -TGC-ATG-CA-3'

DNA70: 5'-GTC-AGT- C **G** C -TGC-ATG-CA-3'

DNA71: 5'-GTC-AGT- C **C** C -TGC-ATG-CA-3'

DNA72: 5'-GTC-AGT- C C -TGC-ATG-CA-3'

DNA73: 3'-GCA-CGT-AT**AP**- **C** AT-ACG-TGC-5'

DNA73: 5'-CGT-GCA-TA **C** -**APTA**-TGC-ACG-3'

DNA74: 3'-GCA-CGT-AT**G**-**C**AT-ACG-TGC-5'

DNA74: 5'-CGT-GCA-TA**C**-**G**TA-TGC-ACG-3'



Tabelle 57: ESI-MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten aminoperylenbisimidmodifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang	Masse berechnet [Da]	Masse gefunden [Da]	$\epsilon_{436 \text{ nm}} \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
DNA62	5671.7	1133.3 [M-5H] ⁵⁻	13 921
		1416.9 [M-4H] ⁴⁻	
		1889.7 [M-3H] ³⁻	
DNA67	6112.5	1222.2 [M-5H] ⁵⁻	13 921
		1527.8 [M-4H] ⁴⁻	
		2037.5 [M-3H] ³⁻	
DNA73	5944.7	1187.9 [M-5H] ⁵⁻	13 921
		1485.3 [M-4H] ⁴⁻	
		1980.8 [M-3H] ³⁻	

Tabelle 58: Schmelztemperaturen bei pH 7 von DNA62 und DNA67 mit Gegensträngen.

DNA-Duplex	T_m [°C]	DNA-Duplex	T_m [°C]
DNA62-63	63.8	DNA62-64	65.8
DNA62-65	63.7	DNA62-66	65.0
DNA67-68	51.8	DNA67-69	52.2
DNA67-70	50.5	DNA67-71	53.0
DNA67-72	53.6		
DNA73-73	78.0	DNA74-74	74.5

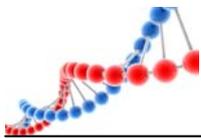
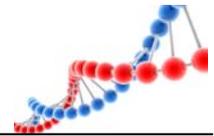


Tabelle 59: Schmelztemperaturen bei pH 3 von DNA62 mit Gegensträngen, DNA73-73 und DNA74-74.

DNA-Duplex	T_m [°C]	DNA-Duplex	T_m [°C]
DNA62-63	--	DNA62-64	--
DNA62-65	--	DNA62-66	--
DNA73-73	--	DNA74-74	--

Tabelle 60: Schmelztemperaturen bei pH 13 von DNA62 mit Gegensträngen, DNA73-73 und DNA74-74.

DNA-Duplex	T_m [°C]	DNA-Duplex	T_m [°C]
DNA62-63	19.3	DNA62-64	27.5
DNA62-65	9.5	DNA62-66	9.0
DNA73-73	34.5	DNA74-74	26.0



6.6. Anhang zu Kapitel 5 – Untersuchung zwei- und dreidimensionaler DNA Strukturen

Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung dreidimensionaler DNA Strukturen

DNA75: 3'-AAA-GTC-CGA-TCG-CCC-TTG-TAT-P-5'

DNA76: 3'-TAA-TCA-CAT-CCA-TCG-GAC-TTT-P-5'

DNA77: 3'-ATA-CAA-GGG-CCG-ATG-TGA-TTA-P-5'

DNA78: 3'-AAA-GTC-CGA-TCG-CCC-TTG-TAT-5'

DNA79: 3'-TAA-TCA-CAT-CCA-TCG-GAC-TTT-5'

DNA80: 3'-ATA-CAA-GGG-CCG-ATG-TGA-TTA-5'

DNA81: 3'-AAA-GTC-CGA-T-5'

DNA82: 5'-TTT-CAG-GCT-A-3'

DNA83: 3'-GCC-CTT-GTA-T-5'

DNA84: 5'-CGG-GAA-CAT-A-3'

DNA85: 3'-TAA-TCA-CAT-C-5'

DNA86: 5'-ATT-AGT-GTA-G-3'

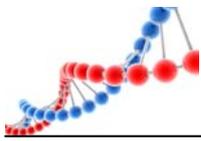
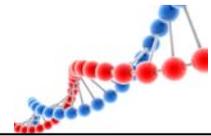


Tabelle 61: ESI-MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten perylen-bisimidmodifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang	Masse berechnet [Da]	Masse gefunden [Da]	$\epsilon_{528 \text{ nm}} \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
DNA75	7016.3	1505.6 [M+5H] ⁵⁺	62 500
		1756.7 [M+4H] ⁴⁺	
		2341.9 [M+3H] ³⁺	
DNA76	6975.3	1397.3 [M+5H] ⁵⁺	62 500
		1746.3 [M+4H] ⁴⁺	
		2328.2 [M+3H] ³⁺	
DNA77	7129.3	1428.2 [M+5H] ⁵⁺	62 500
		1785.0 [M+4H] ⁴⁺	
		2379.7 [M+3H] ³⁺	

Tabelle 62: Schmelztemperaturen der verschiedenen Doppel- und Dreifachstränge aus DNA75 bis DNA86.

DNA-Duplex	T _m [°C]	DNA-Duplex	T _m [°C]
DNA75-76	30.8	DNA75-76-80	44.8
DNA75-77	50.0	DNA75-77-79	44.1
DNA76-77	35.0	DNA76-77-78	43.6
DNA78-79	35.8	DNA75-79-80	44.4
DNA78-80	48.0	DNA76-78-80	45.1
DNA79-80	36.5	DNA77-78-79	43.3
DNA81-82	48.8	DNA78-79-80	44.3
DNA83-84	43.7	DNA75-76-77	46.5
DNA85-86	35.4		



Verwendete temperaturabhängige UV/Vis-Absorptions- und Emissionsspektren zur Untersuchung dreidimensionaler DNA Strukturen

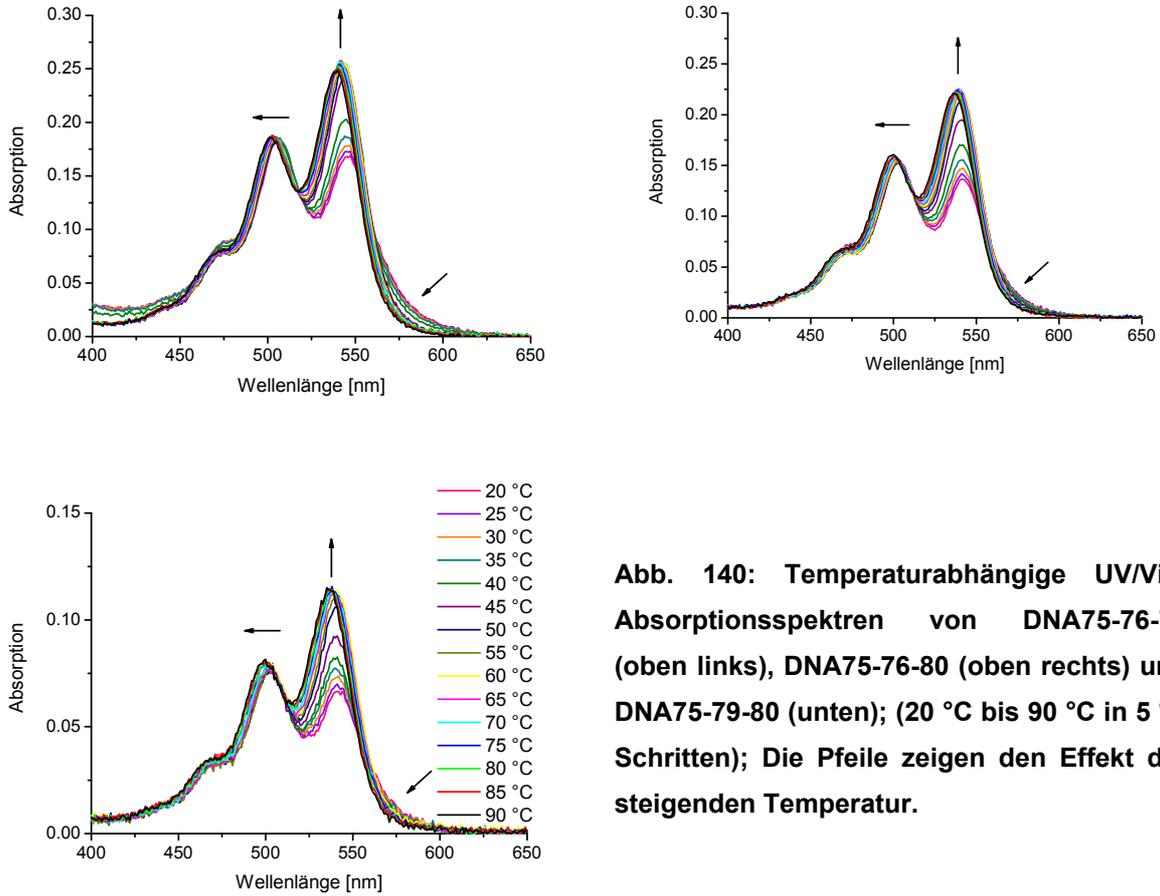


Abb. 140: Temperaturabhängige UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA75-76-77 (oben links), DNA75-76-80 (oben rechts) und DNA75-79-80 (unten); (20 °C bis 90 °C in 5 °C Schritten); Die Pfeile zeigen den Effekt der steigenden Temperatur.

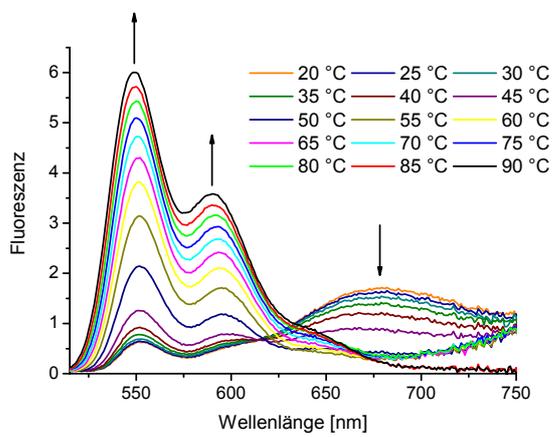
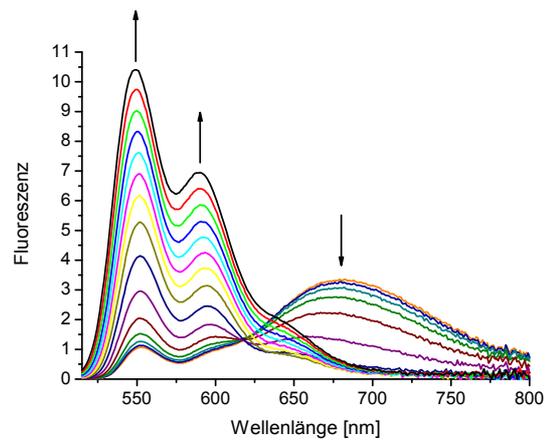
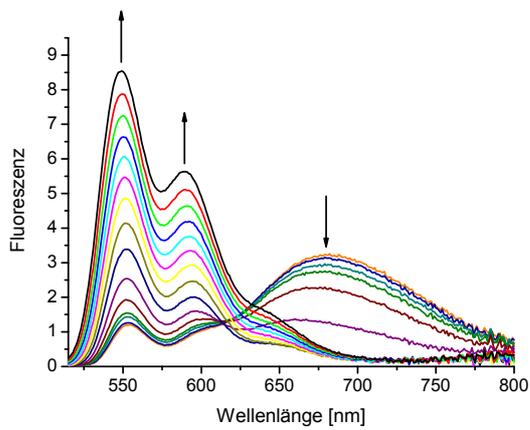
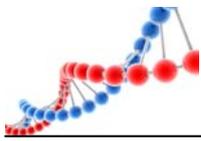
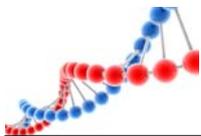


Abb. 141: Temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA75-76-77 (oben links), DNA75-76-80 (oben rechts) und DNA75-79-80 (unten); (20 °C bis 90 °C in 5 °C Schritten); Die Pfeile zeigen den Effekt der steigenden Temperatur.

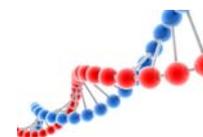


7. Literaturverzeichnis

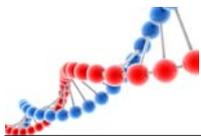
- [1] R. W. Armstrong, J.-M. Beau, S. H. Cheon, William J. Christ, H. Fujioka, W.-H. Ham, L. D. Hawkins, H. Jin, Sung Ho Kang, Y. Kishi, M. J. Martinelli, W. W. McWhorter, M. Jr. Mizuno, M. Nakata, A. E. Stutz, F. X. Talamas, Mikio Taniguchi, J. A. Tino, K. Ueda, J.-i. Uenishi, J. B. White, M. Yonaga, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7530–7533.
- [2] Y. Kishi, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 313-324.
- [3] A. Eschenmoser, C. E. Wintner, *Science* **1977**, *196*, 1410-1420.
- [4] N. Hall, *Chem. Comm.* **2003**, 661-664.
- [5] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Nature* **2008**, *321*, 1795-1799.
- [6] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045-3046.
- [7] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.
- [8] 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.
- [9] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [10] N. C. Seeman, *Mol Biotechnol* **2007**, *37*, 246-257.
- [11] C. Lin, Y. Liu, H. Yan, *Biochemistry* **2009**, *48*, 1663-1674.
- [12] H. Yan, *Science* **2004**, *306*, 2048-2049.
- [13] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158.
- [14] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [15] R. Kronberg, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7082-7092.
- [16] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 770-772.
- [17] J. Yokota, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 497-503.
- [18] M. Hallek, H. Buening, M. Ried, U. Hacker, C. Kurzeder, C.-M. Wendtner, *Internist* **2001**, *10*, 1306-1313.
- [19] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 505-508.
- [20] W. E. Evans, M. V. Relling, *Science* **1999**, *286*, 487-491.
- [21] A. Sharma, R. G. Shulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Inc: New York, 1999.
- [22] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH: Weinheim, 2002.



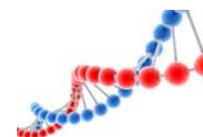
- [23] M. Kasha, *Discussion of the Faraday Society* **1950**, 9, 14-19.
- [24] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, 142, 463.
- [25] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem* **1971**, 75, 991-1024.
- [26] B. Speiser, *Chem. in unserer Zeit* **1981**, 15, 62-67.
- [27] S. R. Rajski, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutation Res.* **2000**, 447, 49-72.
- [28] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 411-415.
- [29] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, 17, 53-120.
- [30] D. Wang, D. A. Kreuzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.
- [31] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374.
- [32] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 413-425.
- [33] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, 277, 673-676.
- [34] S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, 40, 5556-5564.
- [35] M. W. Grinstaff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3629-3635.
- [36] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265-322.
- [37] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12950-12955.
- [38] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12759-12765.
- [39] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, 406, 51-53.
- [40] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, 412, 318-320.
- [41] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1125-1129.
- [42] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6014-6019.
- [43] A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, 133, 93-98.
- [44] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 5529-5541.
- [45] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [46] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503-520.



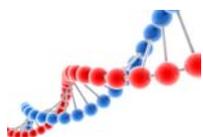
- [47] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 293-301.
- [48] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, *431*, 217-221.
- [49] N. Purdie, H. G. Brittain, Analytical Applications of Circular Dichroism. In *Tech. Instrum. Anal. Chem.*, Elsevier: Amsterdam, 1994; Vol. 14, p 348 pp.
- [50] N. Berova, L. D. Bari, G. Pescitelli, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914-931.
- [51] A. S. Davydov, *Ukr. J. Phys.* **2008**, *53*, 65-70.
- [52] A. S. Davydov, *Theory of Molecular Excitons. Translated from the Russian by Michael Kasha and Max Oppenheimer*. McGraw-Hill Book Co.: New York, 1962; p 174 pp.
- [53] N. Harada, Nakanishi.K, *Accounts of Chemical Research* **1972**, *5*, 257-263.
- [54] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Liu, X. Zuo, D. M. Tiede, H. Long, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14445-14453.
- [55] N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroic Spectroscopy. Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*. Univ. Sci. Books: Mill Valley, Calif., 1983; p 460 pp.
- [56] K. Tsubaki, K. Takaishi, H. Tanaka, M. Miura, T. Kawabata, *Organic Letters* **2006**, *8*, 2587-2590.
- [57] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2217-2223.
- [58] A. Eisfeld, J. S. Briggs, *Chem. Phys.* **2006**, *324*, 376-384.
- [59] E. E. Jelley, *Nature* **1936**, *138*, 1009-1010.
- [60] A. H. Herz, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1977**, *8*, 237-298.
- [61] M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- [62] H. Kuhn, C. Kuhn, Chromophore coupling effects. In *J-Aggregates*, Hrsg. T. Kobayashi, World Scientific Publishing Co Pte Ltd: Singapore, 1996; pp 1-40.
- [63] G. Scheibe, *Z. Elektrochem.* **1948**, *52*, 283-292.
- [64] D. Möbius, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 437-444.
- [65] T. Kobayashi, *J-Aggregates*. World Scientific Publishing Co Pte Ltd: Singapore, 1996.
- [66] W. L. Lewschin, *Z. Phys.* **1927**, *43*, 230.
- [67] E. Rabinowitch, L. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 69-78.
- [68] T. Förster, E. König, *Z. Elektrochem.* **1957**, *61*, 344-348.
- [69] K. Bergmann, C. T. O'Konski, *Z. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 2169-2177.



- [70] W. West, S. Pearce, *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 1894-1903.
- [71] U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7026-7030.
- [72] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.
- [73] N. Cooper, N. B. Liebert, *Photogr. Sci. Eng.* **1972**, *16*, 25-34.
- [74] R. W. Chambers, T. Kajiwara, D. R. Kearns, *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 380-387.
- [75] K. Teuchner, B. Bornowski, W. Becker, S. Dähne, *Z. Chem.* **1976**, *16*, 449-450.
- [76] S. K. Rentsch, D. Fassler, P. Hampe, R. Danielius, R. Gadonas, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *89*, 249-253.
- [77] V. Sundstöm, T. Gillbro, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 2733-2743.
- [78] M. van der Auweraer, G. Biesmans, F. C. De Schryver, *Chem. Phys.* **1988**, *119*, 355-375.
- [79] M. van der Auweraer, B. Verschuere, F. C. De Schryver, *Langmuir* **1988**, *4*, 583-588.
- [80] L. Lu, R. J. Lachicotte, T. L. Penner, J. Perlstein, D. G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8146-8156.
- [81] S. Zeena, K. G. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7859-7865.
- [82] N. K. Petrov, A. V. Starostin, G. K. Chudinova, M. V. Alfimov, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1990**, 1918-1920.
- [83] R. J. Hartley, L. R. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3436-3442.
- [84] J. Hinatu, H. Masuhara, N. Mataga, Y. Sakata, S. Misumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 1032-1036.
- [85] G. N. Taylor, E. A. Chandross, A. H. Schiebel, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2693-2697.
- [86] T. Foerster, K. Kasper, *Z. Elektrochem.* **1955**, *59*, 977.
- [87] J. B. Birks, *Nature* **1967**, *214*, 1187-1190.
- [88] T. V. Ivanova, G. A. Mokeeva, B. Y. Sveshnikov, *Optics and Spectroscopy* **1962**, *12*, 325.
- [89] E. Döller, T. Förster, *Z. physik. Chem. N.F.* **1962**, *31*, 274.
- [90] J. B. Birks, L. G. Christophorou, *Proc. Roy. Soc.* **1963**, *A 274*, 552.
- [91] J. B. Birks, L. G. Christophorou, *Nature* **1962**, *194*, 442-444.



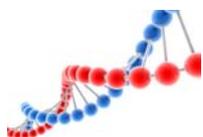
- [92] R. Kato, S. Sinha, S. Murata, M. Tachiya, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2001**, *145*, 23-34.
- [93] T. Förster, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 333-343.
- [94] J. N. Murrell, J. Tanaka, *J. Mol. Phys.* **1964**, *4*, 363-380.
- [95] T. Azumi, A. Armstrong, J. McGlynn, *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 3839-3852.
- [96] B. Stevens, *Adv. Photochem.* **1971**, *8*, 161.
- [97] A. Gilbert, J. Baggot, *Essentials of Molecular Photochemistry*. Blackwell Science Publications: Oxford, 1991.
- [98] B. Stevens, M. I. Ban, *Trans. Faraday Soc.* **1964**, *60*, 1515.
- [99] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*. Wiley: New York, 1970.
- [100] A. Penzkofer, W. Leupacher, *J. Lumin.* **1987**, *37*, 61-72.
- [101] W. H. Melhuish, *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 229-235.
- [102] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1623-1633.
- [103] 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.
- [104] A. J. Schafer, J. R. Hawkins, *Nature Biotechnol.* **1998**, *16*, 33-39.
- [105] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, *234*, 177-186.
- [106] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7842-7849.
- [107] P. Y. Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, *2*, 235-258.
- [108] G. C. Johnson, J. A. Todd, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, *10*, 330-334.
- [109] N. J. Risch, *Nature* **2000**, *405*, 847-856.
- [110] I. G. Gut, *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 475-492.
- [111] S. B. Gabriel, S. F. Schaffner, H. Nguyen, J. M. Moore, J. Roy, B. Blumenstiel, J. Higgins, M. DeFelice, A. Lochner, M. Faggart, S. N. Liu-Cordero, C. Rotimi, A. Adeyemo, R. Cooper, R. Ward, E. S. Lander, M. J. Daly, D. Altshuler, *Science* **2002**, *296*, 2225-2229.
- [112] R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6230-6234.
- [113] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Chem. Commun.* **2004**, 1704-1705.



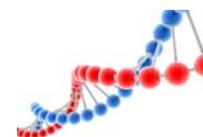
- [114] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4820-4827.
- [115] A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatami, I. Saito, *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 122-127.
- [116] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7827-7831.
- [117] A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 958-963.
- [118] R. H. E. Hudson, A. Ghorbani-Choghamarani, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1845-1848.
- [119] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2203-2206.
- [120] D. V. Jarikote, O. Köhler, E. Socher, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187-3195.
- [121] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.
- [122] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2004**, 2674-2675.
- [123] O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938-2939.
- [124] V. Karunakaran, J. L. P. Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954-2962.
- [125] D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 300-310.
- [126] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [127] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856-870.
- [128] Y. Kim, D. Sohn, W. Tan, *Int J Clin Exp Pathol.* **2008**, *1*, 105-116.
- [129] X. Fang, X. Liu, S. Schuster, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2921-2922.
- [130] J. Li, W. Tan, K. Wang, D. Xiao, X. Yang, X. He, Z. Tang, *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 1149-1153.
- [131] G. Yao, W. H. Tan, *Anal. Biochem.* **2004**, *331*, 216-223.
- [132] H. Wang, J. Li, H. Liu, Q. Liu, Q. Mei, Y. Wang, J. Zhu, N. He, Z. Lu, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e66.
- [133] X. H. Fang, J. J. Li, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3280-3285.



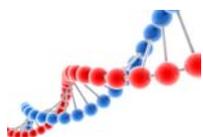
- [134] W. H. Tan, X. H. Fang, J. Li, X. J. Liu, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1107. **2000**, *6*, 1107-1111.
- [135] J. J. Li, X. Fang, S. M. Schuster, W. Tan, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1091-1094.
- [136] D. P. Bratu, B. J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13308-13313.
- [137] C. D. Medley, T. J. Drake, J. M. Tomasini, R. J. Rogers, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4713-4718.
- [138] J. Perlette, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5544-5550.
- [139] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1319-1330.
- [140] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4208-4215.
- [141] L. Tan, Y. Li, T. J. Drake, L. Moroz, K. M. Wang, J. Li, A. Munteanu, C. Y. J. Yang, K. Martinez, W. H. Tan, *Analyst* **2005**, *130*, 1002-1005.
- [142] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6171-6176.
- [143] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55-75.
- [144] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 187-191.
- [145] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819. **1978**, *47*, 819-846.
- [146] D. M. J. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 507-517.
- [147] Y. Saito, Y. Shinohara, S. S. Bag, Y. Takeuchi, K. Matsumoto, I. Saito, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 934-939.
- [148] H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7044-7047.
- [149] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Springer: New York, 1999; Vol. 3.
- [150] D. L. Dexter, *J. Phys. Chem.* **1953**, *21*, 836-850.
- [151] M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466-3471.
- [152] IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*. 2 Ausg.; 1997.
- [153] M. K. Johansson, H. Fidler, D. Dick, R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6950-6956.
- [154] R. F. Khairutdinov, N. Serpone, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2602-2610.
- [155] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 402-405.



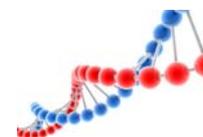
- [156] P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336-342.
- [157] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.
- [158] A. Tsourkas, M. A. Behlke, Y. Q. Xu, G. Bao, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3697-3703.
- [159] C. J. Yang, H. Lin, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12772-12773.
- [160] T. N. Grossmann, L. Roglin, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5315-5318.
- [161] Y. Xiao, K. J. I. Plakos, X. H. Lou, R. J. White, J. R. Qian, K. W. Plaxco, H. T. Soh, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4418-4422.
- [162] E. Socher, L. Bethge, A. Knoll, N. Jungnick, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9555-9559.
- [163] K. Ebata, M. Masuko, H. Ohtani, M. Kashiwasake-Jibu, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 836-839.
- [164] M. Masuko, H. Ohtani, K. Ebata, A. Shimadzu, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5409-5416.
- [165] P. L. Paris, J. M. Langenhan, E. T. Kool, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 3789-3793.
- [166] E. V. Bichenkova, H. E. Savage, A. R. Sardarian, K. T. Douglas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 956-964.
- [167] L. Walsh, A. Gbaj, H. E. Savage, M. C. Bacigalupo, E. V. Bichenkova, K. T. Douglas, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2007**, *25*, 219-229.
- [168] D. M. Kolpashchikov, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4709-4723.
- [169] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2652-2654.
- [170] K. Fujimoto, H. Shimizu, M. Inouye, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3271-3275.
- [171] R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227-1230.
- [172] K. Fujimoto, Y. Muto, M. Inouye, *Chem. Commun.* **2005**, 4780-4782.
- [173] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [174] T. A. Zeidan, R. Carmieli, R. F. Kelley, T. M. Wilson, F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13945-13955.



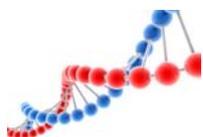
- [175] T. Weil, T. Vosch, J. Hofkens, K. Peneva, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9068-9093.
- [176] F. C. De Schryver, T. Vosch, M. Cotlet, M. Van der Auweraer, K. Müllen, J. Hofkens, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 514-522.
- [177] H. Langhals, *Heterocycles* **1995**, *1*, 477-400.
- [178] W. Herbst, K. Hunger, *Industrial Organic Pigments: Production, Properties, Applications*. 2. Ausg.; WILEY-VCH, Weinheim: 1997.
- [179] C. Jung, N. Ruthardt, R. Lewis, J. Michaelis, B. Sodeik, F. Nolde, K. Peneva, K. Müllen, C. Bräuchle, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 180-190.
- [180] A. Liscio, G. De Luca, F. Nolde, V. Palermo, K. Müllen, P. Samori, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 780-781.
- [181] J. P. Schmidtke, R. H. Friend, M. Kastler, K. Müllen, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 174704.
- [182] M. A. Angadi, D. Gosztola, M. R. Wasielewski, *J. Appl. Phys.* **1998**, *83*, 6187-6189.
- [183] Z. Chen, M. G. Debije, T. Debaerdemaeker, P. Osswald, F. Würthner, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 137-140.
- [184] L. Zang, Y. Che, J. S. Moore, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1596-1608.
- [185] X. Meng, W. Zhu, H. Tian, *Opt. Sci. Eng.* **2008**, *133*, 129-172.
- [186] R. Schroeder, B. Ullrich, *OSA Trends Opt. Photonics Ser.* **2002**, *64*, 115-121.
- [187] A. C. Grimsdale, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5732-5772.
- [188] P. Tinnefeld, K. D. Weston, T. Vosch, M. Cotlet, T. Weil, J. Hofkens, K. Müllen, F. C. De Schryver, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14310-14311.
- [189] P. Pösch, M. Thelakkat, H. W. Schmidt, *Synth. Met.* **1999**, *102*, 1110-1112.
- [190] S. Schols, S. Verlaak, C. Rolin, D. Cheyngs, J. Genoe, P. Heremans, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 136-144.
- [191] F. Würthner, *Chem. Commun.* **2004**, 1564-1579.
- [192] M. Kardos, Fortschritte der Teerfarben. In Hrsg. P. Friedländer, Springer Verlag: Berlin, 1917; Vol. 12.
- [193] G. Geissler, H. Remy, *Ger. Pat. Appl.*, DE 1130099. Hoechst AG: 1959.
- [194] H. Langhals, S. Demmig, T. Potrawa, *J. Prakt. Chem.* **1991**, *333*, 733-748.
- [195] A. Rademacher, S. Märkele, H. Langhals, *Chem. Ber.* **1982**, *115*, 2927-2934.
- [196] C. Kohl, T. Weil, J. Qu, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5297-5310.



- [197] J. Qu, C. Kohl, M. Pottke, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1554; **2004**, *116*, 1554-1557.
- [198] H. Langhals, S. Demmig, H. Huber, *Spectrochim. Acta* **1988**, *44A*, 1189-1193.
- [199] L. Flamigni, B. Ventura, A. Barbieri, H. Langhals, F. Wetzels, K. Fuchs, A. Walter, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 13406-13416.
- [200] F. Graser, E. Hädicke, *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, 1994-2011.
- [201] F. Graser, E. Hädicke, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 483-494.
- [202] E. Hädicke, F. Graser, *Acta Crystallogr., Sect. C* **1986**, *42*, 189-195.
- [203] E. Hädicke, F. Graser, *Acta Crystallogr., Sect. C* **1986**, *42*, 195-198.
- [204] G. Klebe, F. Graser, E. Hädicke, J. Berndt, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1989**, *45*, 69-77.
- [205] F. Würthner, C. Thalacker, S. Diele, C. Tschierske, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2245-2253.
- [206] H. Langhals, J. Karolin, L. B.-A. Johansson, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2919-2922.
- [207] M. Sadrai, G. R. Bird, *Opt. Commun.* **1984**, *51*, 62-64.
- [208] H.-G. Löhmannsröben, H. Langhals, *Appl. Phys. B* **1989**, *48*, 449-452.
- [209] R. Reisfeld, G. Seybold, *Chimia* **1990**, *44*, 295-297.
- [210] W. E. Ford, P. V. Kamat, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6373-6380.
- [211] R. F. Fink, J. Seibt, V. Engel, M. Renz, M. Kaupp, S. Lochbrunner, H.-M. Zhao, J. Pfister, F. Würthner, B. Engels, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12858-12859.
- [212] T. A. Zeidan, M. Hariharan, K. Siegmund, F. D. Lewis, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 916-922.
- [213] W. Wang, W. Wan, H.-H. Zhou, S. Niu, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5248-5249.
- [214] H. Kashida, K. Sekiguchi, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11554-11557.
- [215] S. Bevers, T. P. O'Dea, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11004-11005.
- [216] S. Bevers, S. Schutte, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5905-5915.
- [217] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6640-6645.
- [218] C. Brotschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1911-1923.



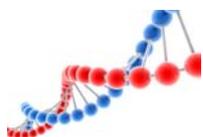
- [219] A. Zahn, C. Brotschi, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2125-2129.
- [220] V. L. Malinovskii, F. Samain, R. Häner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4464-4467.
- [221] Y. Zheng, H. Long, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Chem. Commun.* **2005**, 4795-4797.
- [222] M. Hariharan, Y. Zheng, H. Long, T. A. Zeidan, G. C. Schatz, J. Vura-Weis, M. R. Wasielewski, X. Zuo, D. M. Tiede, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5920-5929.
- [223] R. Carmieli, T. A. Zeidan, R. F. Kelley, Q. Mi, F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 4691-4700.
- [224] P. P. Neelakandan, Z. Pan, M. Hariharan, Y. Zheng, H. Weissman, B. Rybtchinski, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15808-15813.
- [225] N. Rahe, C. Rinn, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 2120-2121.
- [226] W. Wang, L.-S. Li, G. Helms, H.-H. Zhou, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1120-1121.
- [227] W. Wang, W. Wan, H.-H. Zhou, S. Niu, A. D. Q. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5248-5249.
- [228] A. E. Clark, C. Qin, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7586-7595.
- [229] M. A. Abdalla, J. Bayer, J. O. Rädler, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3967-3970.
- [230] T. Cordes, J. Vogelsang, M. Anay, C. Spagnuolo, A. Gietl, W. Summerer, A. Herrmann, K. Müllen, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2404-2409.
- [231] A. V. Ustinov, V. V. Dubnyakova, V. A. Korshun, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1467-1473.
- [232] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.
- [233] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1845-1847.
- [234] C. Prunkl, S. Berndl, C. Wanninger-Weiß, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 32-43.
- [235] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 48-50.
- [236] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4263-4266.
- [237] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.



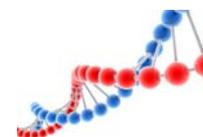
- [238] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Goepferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 7, 1239-1248.
- [239] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051-1054.
- [240] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 558-564.
- [241] D. Lachmann, S. Berndl, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, 6, (13).
- [242] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4977-4986.
- [243] H. Langhals, *Heterocycles* **1995**, 40, 477-500.
- [244] J. Salbeck, H. Kunkely, H. Langhals, R. W. Saalfrank, J. Daub, *Chimia* **1989**, 43, 6-9.
- [245] C. Wagner, *Darstellung und Untersuchung von Ladungsdonor und -akzeptorsystemen für den reduktiven Elektronentransfer durch DNA*. 1. Ausg.; Dr. Hut Verlag: München, 2007.
- [246] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nature Rev. Cancer* **2001**, 1, 68-76.
- [247] P. Lamb, L. Crawford, *Mol. Cell. Biol.* **1986**, 6, 1379-1385.
- [248] D. R. Walker, J. P. Bond, R. E. Tarone, C. C. Harris, W. Makalowski, M. S. Boguski, M. S. Greenblatt, *Oncogene* **1999**, 18, 211-218.
- [249] A. D. Q. Li, W. Wang, L.-Q. Wang, *Chem. - Eur. J.* **2003**, 9, 4594-4601.
- [250] D. Pörschke, *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **1977**, 24, 191-218.
- [251] Z. Chen, V. Stepanenko, V. Dehm, P. Prins, L. D. A. Siebbeles, J. Seibt, P. Marquetand, V. Engel, F. Würthner, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 436-449.
- [252] E. Meggers, L. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 1092-1102.
- [253] D. L. Sokol, X. Zhang, P. Lu, A. M. Gewirtz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 11538-11543.
- [254] N. Dave, J. Liu, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 15694-15699.
- [255] J. Piskur, A. Rupprecht, *FEBS Lett.* **1995**, 375, 174-178.
- [256] H. Langhals, *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, 1309-1343.
- [257] G. Seybold, G. Wagenblast, *Dyes Pigm.* **1989**, 11, 303-317.
- [258] E. Fron, R. Pilot, G. Schweitzer, J. Q. Qu, A. Herrmann, K. Müllen, J. Hofkens, M. van der Auweraer, F. C. De Schryver, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 597-604.



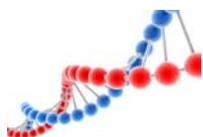
- [259] M. Sandrai, L. Hadel, R. R. Sauers, S. Husain, K. Krogh-Jespersen, J. D. Westbrook, G. R. Bird, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7988-7996.
- [260] A. Böhm, H. Arms, G. Henning, P. Blaschka, *BASF AG 1997*, *Ger. Pat. Appl.*, *DE 19547209 A1*.
- [261] U. Rohr, P. Schlichting, A. Böhm, M. Groß, K. Meerholz, C. Bräuchle, K. Müllen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1434-1437.
- [262] A. Böhm, H. Arms, G. Henning, P. Blaschka, *BASF AG 1997*, *Ger. Pat. Appl.*, *DE 19547210 A1*.
- [263] M. J. Ahrens, M. J. Fuller, M. R. Wasielewski, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2684-2686.
- [264] L. M. A. Perdigão, A. Saywell, G. N. Fontes, P. A. Staniec, G. Goretzki, A. G. Phillips, N. R. Champness, P. H. Beton, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7600-7607.
- [265] Y. Zhao, M. R. Wasielewski, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *40*, 7047-7050.
- [266] A. S. Lukas, Y. Zhao, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1299-1306.
- [267] Z. Chen, U. Baumeister, C. Tschierske, F. Würthner, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 450-465.
- [268] Y. Zhao, M. R. Wasielewski, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7047-7050.
- [269] F. Würthner, P. Osswald, R. Schmidt, T. E. Kaiser, H. Mansikkamäki, M. Könemann, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3765-3768.
- [270] F. Würthner, A. Sautter, C. Thalacker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1243-1245.
- [271] P. Osswald, D. Leusser, D. Stalke, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 250-253.
- [272] F. Würthner, V. Stepanenko, Z. Chen, C. R. Saha-Möller, N. Kocher, D. Stalke, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7933-7939.
- [273] S. Leroy-Lhez, J. Baffreau, L. Perrin, E. Levillain, M. Allain, M.-J. Blesa, P. Hudhomme, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6313-6320.
- [274] M. Sadrai, G. R. Bird, J. A. Potenza, H. J. Schugar, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1990**, *46*, 637-640.
- [275] J. Hofkens, T. Vosch, M. Maus, F. Köhn, M. Cotlet, T. Weil, A. Herrmann, K. Müllen, F. C. De Schryver, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *333*, 255-263.



- [276] J. Qu, N. G. Pschirer, D. Liu, A. Stefan, F. C. De Schryver, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 528-537.
- [277] A. Sautter, D. G. Schmid, G. Jung, F. Würthner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5424-5430.
- [278] F. Würthner, *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 2341-2349.
- [279] P. Zugenmaier, J. Duff, T. L. Bluhm, *Cryst. Res. Technol.* **2000**, *35*, 1095-1115.
- [280] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, *312*, 217-224.
- [281] K. Peneva, G. Mihov, F. Nolde, S. Rocha, J.-i. Hotta, K. Braeckmans, J. Hofkens, H. Uji-i, A. Herrmann, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3420-3423.
- [282] K. Peneva, G. Mihov, A. Herrmann, N. Zarrabi, M. Borsch, M. D. Thomas, K. Müllen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5398-5399.
- [283] C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 418-419.
- [284] S. Lata, M. Gavutis, R. Tampe, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2365-2372.
- [285] A. N. Kapanidis, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12123-12125.
- [286] M. Franceschina, A. Alvinola, V. Casagrandea, C. Mauriello, E. Pascucci, M. Savino, G. Ortaggia, A. Bianco, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1848-1858.
- [287] M. Franceschin, E. Pascucci, A. Alvino, D. D'Ambrosio, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2515-2522.
- [288] B. Tuesuwan, J. T. Kern, P. W. Thomas, M. Rodriguez, J. Li, W. M. David, S. M. Kerwin, *Biochemistry* **2008**, *47*, 1896-1909.
- [289] A. Fülöp, D. Ariana, A. Lysenkob, A. Mokhir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3104-3107.
- [290] J. K. Lee, F. Jäckel, W. E. Moerner, Z. Bao, *Small* **2009**, *5*, 2418-2423.
- [291] G. Goretzki, E. S. Davies, S. P. Argent, W. Z. Alsindi, A. J. Blake, J. E. Warren, J. McMaster, N. R. Champness, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8808-8814.
- [292] M. J. Ahrens, M. J. Tauber, M. R. Wasielewski, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2107-2114.



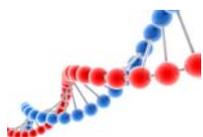
- [293] J. Feng, Y. Zhang, C. Zhao, R. Li, W. Xu, X. Li, J. Jiang, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7000-7010.
- [294] J. M. Giaimo, A. V. Gusev, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8530-8531.
- [295] L. Rossetti, M. Franceschin, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *2005*, 413-420.
- [296] A. Alvino, M. Franceschin, C. Cefaro, S. Borioni, G. Ortaggi, A. Bianco, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7858-7865.
- [297] M. Franceschin, A. Alvino, G. Ortaggi, A. Bianco, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9015-9020.
- [298] Y. Shibano, T. Umeyama, Y. Matano, H. Imahori, *Organic Letters* **2007**, *9*, 1971-1974.
- [299] Y. Shibano, T. Umeyama, Y. Matano, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, Y. Araki, O. Ito, H. Imahori, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6133-6142.
- [300] S. Daehne, U. Resch-Genger, O. Wolfbeis, *Near-Infrared Dyes for High Technology Applications*. 1. Ausg.; Kluwer Academic Publishers: 1998.
- [301] K. Stefflova, J. Chen, G. Zheng, *Front Biosci* **2007**, *12*, 4709-4721.
- [302] Erhan İ. Altinoğlu, J. H. Adair, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2010**, *2*, (5), 461-477.
- [303] P. Rajasingh, R. Cohen, E. Shirman, L. J. W. Shimon, B. Rybtchinski, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5973-5979.
- [304] P. Rajasingh, R. Cohen, E. Shirman, L. J. W. Shimon, B. Rybtchinski, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 4268-4275.
- [305] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B.



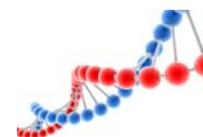
- Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople *Gaussian 03, Revision B.03*, Gaussian Inc.: Pittsburgh PA, 2003.
- [306] B. Rybtchinsky, L. E. Sinks, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12268-12269.
- [307] Y. Shibano, T. Umeyama, Y. Matano, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, H. Imahori, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4425-4428.
- [308] S. Vajiravelu, L. Ramunas, G. J. Vidas, G. Valentas, J. Vygintas, S. Valiyaveetil, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 4268-4275.
- [309] R. L. Fulton, M. Gouterman, *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 2280-2286.
- [310] L. Oddos-Marcel, A. B. F. Madeore, D. Neher, A. Ferencz, H. Rengel, G. Wegner, C. Kryschi, H. P. Trommsdorff, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 11850-11856.
- [311] E. J. P. Lathrop, R. A. Friesner, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 3056-3066.
- [312] L. L. Laporte, V. Palaniappan, C. Kirmaier, D. G. Davis, C. C. Schenck, D. Holten, D. F. Bocian, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17696-17707.
- [313] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. 3. Ausg.; Springer Verlag: New York, 1984.
- [314] S. Hainke, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8250-8253.
- [315] M. Kaufmann, M. Gisler, C. J. Leumann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3810-3813.
- [316] M. D. Rozeboom, K. N. Houk, S. Searles, S. E. Seyedrezai, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3448-3453.
- [317] S. Steenken, *Free Rad. Res. Comms.* **1992**, *16*, 349-379.
- [318] P. Cysewski, *Computational Methods in Science and Technology* **2010**, *16*, 51-72.
- [319] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237-247.
- [320] N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1971-1978.
- [321] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- [322] A. Chworos, I. Severcan, A. Y. Koyfman, P. Weinkam, E. Oroudjev, H. G. Hansma, L. Jaeger, *Science* **2004**, *306*, 2068-2072.



- [323] J. Malo, J. C. Mitchell, C. Venien-Bryan, J. R. Harris, H. Wille, D. J. Sherratt, A. J. Turberfield, *Angew. Chem* **2005**, *117*, 3117-3121.
- [324] P. J. Paukstelis, J. Nowakowski, J. J. Birktoft, N. C. Seeman, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1119-1126.
- [325] J. Zheng, J. J. Birktoft, T. W. Y. Chen, R. Sha, P. E. Constantinou, S. L. Ginell, C. Mao, N. C. Seeman, *Nature* **2009**, *461*, 74-77.
- [326] J. Zimmermann, M. P. Cebulla, S. Monninghoff, G. v. Kiedrowski, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3682-3686.
- [327] Y. Wang, J. E. Mueller, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5667-5674.
- [328] X. Wang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8169–8176.
- [329] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427-431.
- [330] Y. W. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1661–1669.
- [331] N. C. Seeman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3220-3238.
- [332] J. B. Lee, A. S. Shai, M. J. Campolongo, N. Park, D. Luo, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2081-2084.
- [333] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. v. Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3311-3315.
- [334] R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, *310*, 1661–1665.
- [335] R. P. Goodman, R. M. Berry, A. J. Turberfield, *Chem. Commun.* **2004**, 1372-1373.
- [336] C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7414–7417.
- [337] W. M. Shih, J. D. Quisbe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618-621.
- [338] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*, 73-77.
- [339] S. M. Douglas, A. H. Marblestone, S. Teerapittayanon, A. Vazquez, G. M. Church, W. M. Shih, *Nucleic Acid Res.* **2009**, *37*, 5001-5006.
- [340] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, A. Lind-Thomsen, W. Mamdouh, K. V. Gothelf, F. Besenbacher, J. Kjems, *ACS Nano* **2008**, *2*, 1213-1218.



- [341] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414-418.
- [342] D. Liu, M. Wang, Z. Deng, R. Walulu, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2324-2325.
- [343] F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5884-5887.
- [344] H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2838-2841.
- [345] A. Somoza, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9406-9408.
- [346] C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6992-6993.
- [347] M. J. Hannon, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, I. Meistermann, C. J. Isaac, K. J. Sanders, A. Rodger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 879-884.
- [348] D. Boer, J. Kerckhoffs, Y. Parajo, M. Pascu, I. Usón, P. Lincoln, M. Hannon, M. Coll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2336-2339.
- [349] L. Cardo, M. J. Hannon, *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 784-792.
- [350] H. Mao, T. H. LaBean, J. H. Reif, N. C. Seeman, *Nature* **2000**, *407*, 493-496.
- [351] P. W. K. Rothmund, N. Papadakis, E. Winfree, *PLoS Biol* **2004**, *2*, 2041-2053.
- [352] R. D. Barish, P. W. K. Rothmund, E. Winfree, *Nano Letters* **2005**, *5*, 2586-2592.
- [353] F. Mathieu, S. Liao, J. Kopatsch, T. Wang, C. Mao, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 661-665.
- [354] H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science* **2009**, *325*, 725-730.
- [355] Y. Ke, S. Lindsay, Y. Chang, Y. Liu, H. Yan, *Science* **2008**, *319*, 180-183.
- [356] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 2179-2183.
- [357] L. Cerasino, M. J. Hannon, E. Sletten, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6245-6251.
- [358] J. Malina, M. J. Hannon, V. Brabec, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3871-3877.
- [359] A. Oleksi, A. G. Blanco, R. Boer, I. Uson, J. Aymami, A. Rodger, M. J. Hannon, M. Coll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1227-1231.
- [360] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8206-8215.



- [361] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12729-12731.
- [362] V. Palermo, E. Schwartz, C. E. Finlayson, A. Liscio, M. B. J. Otten, S. Trapani, K. Müllen, D. Beljonne, R. H. Friend, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, P. Samorì, *Adv. Mater.* **2009**, *22*, E81-E88.
- [363] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [364] J. N. Demasa, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem* **1971**, *75*, 991-1024.
- [365] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97-102.
- [366] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.

DNA-Logo: © LoopAll; iStockphoto®