

Funktionalisierte DNA: Netzwerke mit Perylenbisimid, Hybride mit PyrrolidinyI-PNA und kupferfreie „Click“-Reaktion

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich



genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Claudia Stubinitzky

aus Lenggries

Karlsruhe, 2014

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Michael A. R. Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

Meiner Familie und Philipp

Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis Juni 2014 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung sowie für die wissenschaftlichen Freiheiten und die sehr gute Arbeitsatmosphäre. Außerdem möchte ich mich für die vielen hilfreichen Gespräche bedanken sowie der Unterstützung während meines Thailandaufenthalts.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

Prof. Dr. Tirayut Vilaivan von der Chulalongkorn-Universität (Bangkok) und seiner Gruppe für die wissenschaftliche Betreuung während meines Forschungsaufenthalts in Thailand, der Unterstützung in der Organisation sowie für die schöne Zeit bei gemeinsamen Unternehmungen.

Dem Karlsruher House of Young Scientists (KHYS) für die finanzielle Unterstützung während meiner Zeit im Ausland.

Dr. Kele und Gergely Cserép für die tolle Kooperation bezüglich des COMBO-Projekts.

Prof. Dr. Hölscher und Dr. Daniel Ebeling für die Zusammenarbeit zur Anfertigung der AFM-Bilder.

Meinen Bachelorstudentinnen Linda Antusch und Andrea Bijeljanin sowie meiner Praktikantin Marina Merker für die schöne Zeit beim gemeinsamen Forschen.

Frau Sommer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen und den vielen netten Gesprächen.

Frau Roßnagel und Frau Kernert für die Anfertigung der EI- und FAB-Massenspektren sowie Annette Hochgesand für die MALDI-Massen und Herrn Dr. Weis für die Durchführung der ESI-Massen.

Frau Lang und Frau Ohmer für die Messung der NMR-Proben.

Meinen Kollegen Dr. Sabrina Sezi, Sebastian Barrois, Effi Bätzner, Dr. Christian Wellner, Stefanie Arndt, Peggy Bohländer, Andreas Dittmer, Dr. Thomas Ehrenschwender, Philipp Ensslen, Nadine Gaß, Annette Hochgesand, Dr. Carolin Holzhauser, Dr. Florian Menacher, Marcus Merkel, Dr. Alexander Penner, Barbara Reiß, Dr. Moritz Rubner, Dr. Wolfgang Schmucker, Heidi Walter, Dr. Michael Weinberger, Dr. Ulrike Wenge, Martin Weiser, David Rombach, Damian Ploschik, Krisana Peewasan und Svenja Kusterer für die schöne Zeit und die gute Zusammenarbeit im „AKW“.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Strukturvariierte und durch ein Bipyridinkomplex stabilisierte Perylenbisimid-DNA-Netzwerke	3
1. Theoretischer Hintergrund	3
1.1. DNA Nanostrukturen.....	3
1.2. Metallkomplexierung mit Bipyridin in DNA	5
1.3. Perylenbisimid allgemein	8
1.4. Perylenbisimid in DNA	11
2. Zielsetzung.....	16
3. Synthese	17
3.1. Synthesestrategie	17
3.2. Synthese des Bipyridinliganden.....	17
4. Triangulare und <i>Holliday</i> Perylenbisimid-DNA-Strukturen.....	19
5. Mit Bipyridin und Metallionen komplexierte Perylenbisimid-DNA-Netzwerke ..	26
6. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	32
III. Detektionsmethode zur Einzelbasendiskriminierung mithilfe der Pyrrolidinyl-PNA und von magnetischen Fe_xO_y-Partikeln	33
1. Theoretischer Hintergrund	33
1.1. Peptidnukleinsäure	33
1.2. Einzelbasendiskriminierung mithilfe von Peptidnukleinsäuren.....	37
1.3. Das Protein p53.....	41
2. Zielsetzung.....	43
3. Synthese	44
4. Einzelbasendiskriminierung der PNA und DNA im Vergleich.....	47
5. Einzelbasendiskriminierung mit PNA in Bezug auf das Protein p53	50
6. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	55
IV. Monobenzozyklooktin als DNA-Baustein für die kupferfreie „Click“-Reaktion	57
1. Theoretischer Hintergrund	57
1.1. Die „Click“-Chemie zur postsynthetischen DNA-Modifizierung	57
1.2. Kupferfreie „Click“ Reaktionen zur Biokonjugation.....	59
1.3. Monobenzozyklooktin für die kupferfreie „Click“-Reaktion	61

2. Zielsetzung.....	65
3. Synthese	66
3.1. Synthese des COMBO-Nukleotids.....	66
3.2. Kupferfreie „Click“-Reaktion.....	67
4. Spektroskopische Untersuchung	68
5. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	70
V. Zusammenfassung.....	71
VI. Experimenteller Teil	73
1. Materialien und Geräte.....	73
2. Optische Spektroskopie	78
3. Synthesevorschriften.....	80
3.1. Synthese des Perylenbisimidbausteins.....	80
3.2. Synthese des Bipyridinliganden.....	80
3.3. Synthese des Monobenzyklooctinnukleotids.....	84
4. DNA-Synthese	88
4.1. Synthese modifizierter DNA.....	88
4.2. Aufarbeitung und Reinigung	91
4.3. Postsynthetische Modifizierung	92
4.4. Charakterisierung der DNA-Oligonukleotide	93
5. PNA-Synthese	95
5.1. Synthese modifizierter PNA.....	95
5.2. Aufarbeitung und Reinigung	96
5.3. Charakterisierung modifizierter PNA.....	96
6. Liste verwendeter DNA- und PNA-Sequenzen	97
VII. Ergänzende Spektren und Tabelle	101
1. Aggregationsversuche mit Perylenbisimid	101
2. Einzelbasendiskriminierungsexperimente mit Pyrrolidiny-PNA	103
VIII. Literaturverzeichnis	107
IX. Anhang	117

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
acpc	2-Aminozyklopentancarbonsäure
Bp	Basenpaare
bpy	Bipyridin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cEnd	Endkonzentration
COMBO	Carboxymethylmonobenzozyklooktin
CPG	Controlled Pore Glass
CuAAC	Cu-Azid-Alkin-Zykloaddition
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
d.h.	das heißt
DIEA/DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT/DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
dU	2'-Desoxyuridin
eq	Äquivalent
exc	Anregung (<i>excitation</i>)
FAB	<i>Fast atom bombardment</i>
FC	Flash-Säulenchromatographie

FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin
h	Stunde
HATU	1-[bis(Dimethylamin)methylen]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]pyridinium-3-oxid-hexafluorophosphat
HBTU	N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
J	Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
LM	Lösungsmittel
M	molar, mol/L
m	Multiplett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisation
max.	maximal
mbar	Millibar
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
mind.	mindestens
μ L	Mikroliter
mL	Milliliter
μ M	mikromolar
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NaPi	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
ns	Nanosekunden

p.A.	für Analyse (pro analysi)
PBI	Perylenbisimid
pfp	pentafluorphenyl
PNA	Peptidnukleinsäure
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
ss	einzelsträngig (single stranded)
sog.	sogenannt
SPAAC	<i>strain-promoted</i> Azid-Alkin-Zykloaddition
θ	chiraler Winkel
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammonium Fluorid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
T_m	Schmelztemperatur
TMS	Trimethylsilyl
U	Uracil
usw.	und so weiter
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190 – 800 nm)
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

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

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

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

I. Einleitung

Die Idee, winzig kleine Maschinen entwickeln zu können, welche definierte Funktionalitäten besitzen, ist bereits seit mehreren Jahrzehnten ein beliebtes Motiv im *Science-Fiction*-Bereich. Im Film *Fantastic Voyage* von 1966 wird ein geschrumpftes U-Boot im Mikrometermaßstab dargestellt, welches in einem menschlichen Körper eine lebensbedrohliche Krankheit bekämpfen soll. Aber auch in einem Roman von *Michael Crichton (Prey)* wird die Herstellung von Nanorobotern mithilfe von genmanipulierten Bakterien beschrieben.^[1] In der Realität können wir solche Visionen zwar noch nicht umsetzen, aber es ist möglich, kleine natürliche Bausteine zu verwenden und diese auf verschiedene Art und Weise zu funktionalisieren, um somit dem „Roboter im Nanometermaßstab“ näher zu kommen. Die DNA ist nicht nur Träger der genetischen Information, sondern besitzt aufgrund ihrer Selbstorganisation sowie ihrer physikochemischen Eigenschaften ein hohes Potenzial als maschinenähnliches Nanobauteil. Dabei können die Eigenschaften der DNA optimiert oder funktionalisiert werden, was im Bereich der Nanotechnologie, Biophysik, der Materialwissenschaften, der Biologie, Biosensorik bis hin zur Therapie von Interesse ist und Anwendung findet.^[2]

In den vergangenen Jahren sind eine Reihe von dreidimensionalen DNA-Strukturen entwickelt worden.^[3] Mithilfe nur weniger DNA-Stränge gelang es Polyeder,^[4-6] und unter Verwendung ganzer Helixbündel Origamistrukturen, zusammensetzen.^[7-9] Darüber hinaus konnte man durch Einsatz organischer Linker-Moleküle ebenfalls die Topologien zahlreicher DNA-Strukturen definieren.^[10] Solche dreidimensionalen DNA-Netzwerke fanden bereits Einsatz zum Transport kleiner Nanoobjekte wie z.B. Wirkstoffe oder Proteine.^[8, 11] Des Weiteren werden modifizierte Nukleinsäurestrukturen oder Nukleinsäuremimetika als Sensoren *in vitro* und auch *in vivo* eingesetzt, um Zielmoleküle wie niedermolekulare Verbindungen oder andere Nukleinsäuresequenzen zu detektieren.^[2, 12-14] Solche Erkennungsversuche können Grundlagen therapeutischer Ansätze darstellen. Hierbei liegt das Interesse vor allem an dem Nukleinsäuremimetikum Peptidnukleinsäure (PNA), welche eine höhere Bindungsaffinität gegenüber komplementärer Nukleinsäuren sowie eine gesteigerte biologische Stabilität besitzt.^[15] Weiterführend ist man auf der Suche nach bioorthogonalen Reaktionen zur Modifizierung von Nukleinsäuren beispielsweise mit

Fluorophoren, die ohne Metallkatalyse ablaufen können und folglich die *in vivo*-Anwendungen nicht mehr limitieren.^[16]

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei nicht komplementäre Bindungsmotive zur Ausbildung von DNA-Netzwerken miteinander kombiniert. Darüber hinaus wird das Einzelbasendiskriminierungspotenzial einer zyklischen Peptidnukleinsäure (PyrrolidinyI-PNA) dargestellt sowie eine kupferfreie und bioorthogonale Reaktion mithilfe von Monobenzozyklootin zur DNA-Modifizierung präsentiert.

II. Strukturvariierte und durch ein Bipyridinkomplex stabilisierte Perylenbisimid-DNA-Netzwerke

1. Theoretischer Hintergrund

1.1. DNA Nanostrukturen

Selbstassemblierung, die spontane Assoziation von Komponenten in eine geordnete Struktur durch nichtkovalente Interaktionen, ist die meist genutzte Methode der Natur, um Komplexität zu erreichen. Als das bemerkenswerteste, natürlich vorkommende und selbstassemblierende Molekül zählt die DNA. Das Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen, π -Stapelung sowie elektrischen und hydrophoben Interaktionen befähigen die DNA, mit ihrem Gegenstrang zu assemblieren und dabei extrem präzise Regeln der Basenpaarungen zu befolgen. Zusätzliche Eigenschaften, wie die Rigidität im Nanomaßstab, einem Durchmesser von ~ 2 nm und einer nahezu unendlichen Anzahl an Sequenzmöglichkeiten, eröffnen neue Perspektiven des genetischen Materials des Lebens.^[17]

Vor mehr als drei Jahrzehnten beschrieb *Nadrian Seeman* die Fähigkeit der DNA, *Holliday*- und andere Mehrwegstrukturen auszubilden.^[18-19]



Abb. 1: Geometrie einer *Holliday*-Struktur mit vier DNA-Strängen.^[20]

Darüber hinaus zeigte er, dass aus DNA-Strängen mit wechselseitigen, komplementären Sequenzen ein molekularer Würfel aufgebaut werden kann (siehe Abb. 2 a).^[21] Diese zwar einfache, aber beeindruckende Struktur hat viele Wissenschaftler inspiriert, an DNA basierten Selbstassemblierungsstrukturen zu arbeiten. Weiterführend berichtete *Rothemund* im Jahre 2006 die „Origami“-Methode, die es ermöglicht, durch definiertes Falten eines langen DNA Strangs mithilfe einer

großen Anzahl kleiner Gegenstränge, diskrete Objekte, wie beispielsweise ein lachendes Gesicht oder einen Stern, zu formen und diese durch AFM bildlich darzustellen (siehe Abb. 2 b).^[22]

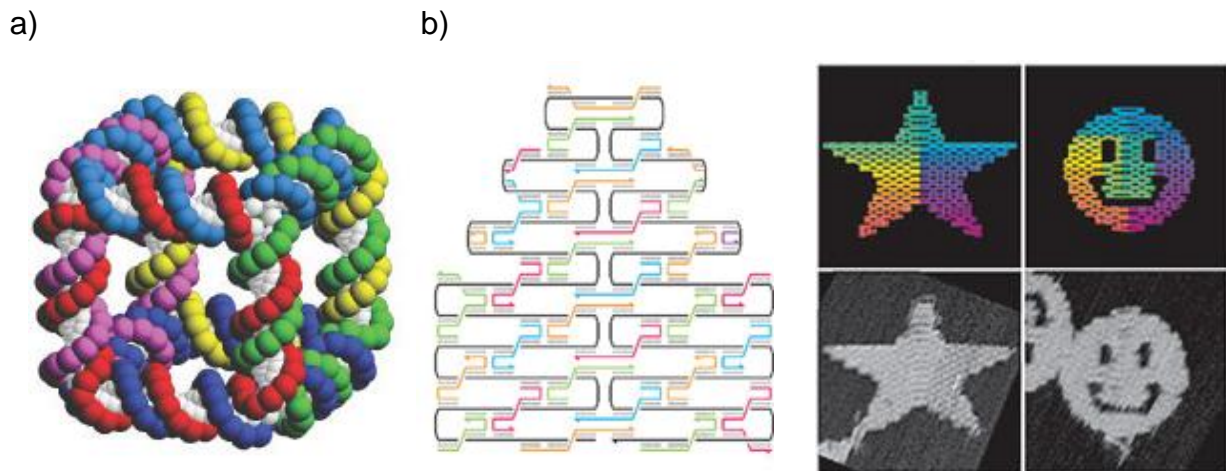


Abb. 2: a) Molekularer Würfel bestehend aus sechs DNA-Strängen^[23] sowie b) Faltungsschema und Beispielsstrukturen von DNA-Origami.^[22]

Seitdem ist die DNA-Nanotechnologie und durch die Einführung von computergestützten Konzeptionsgeräten und Simulationsmethoden zu einem weitreichenden wissenschaftlichen Gebiet geworden. Mittlerweile wurden zahlreiche Variationen an triangularen, komprimierten und gespannten DNA-Strukturen realisiert und diese erfolgreich für praktische Anwendungen eingesetzt.^[24]

1.1.1. Supramolekulare DNA Aggregate

Synthetische Moleküle in die DNA zu inkorporieren ist hinsichtlich ihres Potenzials, auf die Aggregatstruktur Einfluss zu nehmen sowie neue Motive in der DNA-Nanotechnologie zu ermöglichen, außerordentlich spannend.^[17]

Bergstrom^[25], *Shchepinov*^[26] und *Kiedrowski*^[27] präsentierten bereits vor einiger Zeit verzweigte DNA-Konstrukte mit einem organischen Kern, die durch Selbstassemblierung Nanostrukturen ausbilden. Die verwendeten, identischen DNA-Stränge führen jedoch zu Mischungen der DNA-Aggregate. Mit dem Ziel, lediglich nur ein definiertes Assemblierungsprodukt zu erhalten, entwickelte *Sleiman et al.* einen DNA-Baustein, dessen DNA-Arme nicht mehr selbstkomplementär oder identisch sind, und somit nur ein bestimmtes Hexamer entsteht (siehe Abb. 3).^[28]

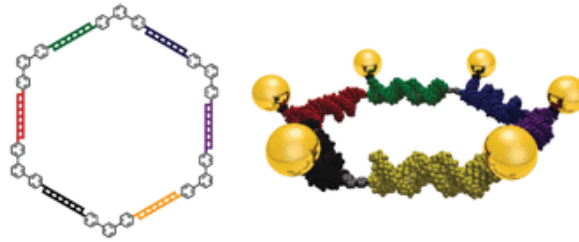


Abb. 3: DNA-Bausteine mit organischen Enden zur Synthese diskreter DNA-Hexamere.^[28]

Bis heute wurden zahlreiche organische Moleküle, vor allem organische Chromophore^[29-30] sowie Metall-Ligand-Komplexe^[31-32], in einer großen Variationsvielfalt in Nucleinsäuren inkorporiert.^[29, 33] Die entsprechenden π - π -Wechselwirkungen der Chromophore sowie Metall-Ligand-Interaktionen liefern ein wichtiges und nicht kovalentes Bindungsmotiv, das mit den Standard Watson-Crick typischen Wasserstoffbrückenbindungen natürlicher DNA Basenpaare und folglich mit unmodifizierten DNA-Architekturen kombiniert werden kann.^[31] Das Einbringen von Metallkomplexen ermöglicht DNA-Stabilitäten zu modulieren sowie die Reversibilität und die Robustheit zu beeinflussen. Außerdem können entsprechende DNA-Konstrukte elektronische, katalytische und photochemische Eigenschaften besitzen, die für Anwendungen in den Materialwissenschaften und der Biotechnologie relevant sind.^[34] Bipyridin ist beispielsweise ein Ligand, der sich bereits in der Oligonukleotidchemie zur Ausbildung von Metallkomplexen etabliert hat. Dagegen können chromophormodifizierte DNA-Stränge als Redox- oder Fluoreszenzmarker verwendet werden, die in der Pharmakotherapie und Nanotechnologie von Bedeutung sind.^[29] Bezüglich der verschiedenen Chromophortypen in DNA besitzt vor allem Perylenbisimid aufgrund seines ausgedehnten, aromatischen Systems ein besonders hohes Potenzial, supramolekulare Strukturen auszubilden.

1.2. Metallkomplexierung mit Bipyridin in DNA

Bipyridinkomplexe können mithilfe verschiedener Strategien in höher geordnete DNA-Strukturen inkorporiert werden, wobei eine Möglichkeit die Verwendung von bereits metallkomplexierten Bipyridinbausteinen ist. *Sleiman et al.* verknüpfte als eine der Ersten einen Bipyridin-Ruthenium-Komplex mit zwei DNA-Armen, die durch

II.1. Theoretischer Hintergrund

Hybridisierung mit komplementären Sequenzen höher geordnete, zyklische Strukturen ausbilden (siehe Abb. 4).^[35]

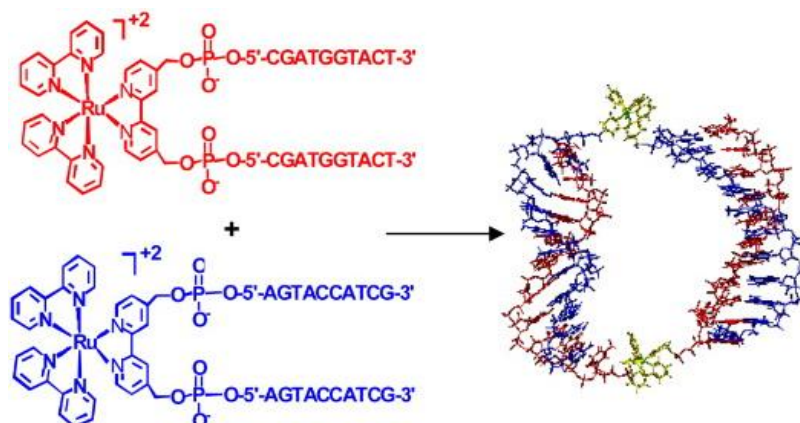


Abb. 4: Bipyridin-Ru-Komplexe modifiziert mit DNA und ihre Selbstassemblierung zu diskreten zyklischen Strukturen.^[35-36]

Darüber hinaus gelang *McLaughlin et al.* die Synthese eines Ru-Komplex mit sechs DNA-Armen^[37] sowie eines Ni-Komplex mit vier DNA-Armen^[38], die beide unter Verwendung von entsprechenden Gegensträngen ebenfalls zur Ausbildung höher geordneter Strukturen verwendet werden (siehe Abb. 5).

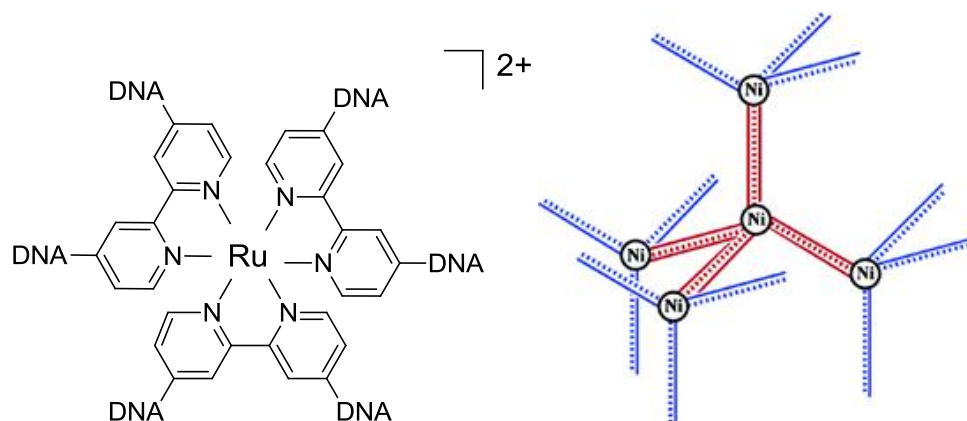


Abb. 5: (links) Ru-Komplex mit sechs DNA-Armen und (rechts) Ni-Komplex mit vier DNA-Armen, die zu höher geordneten Strukturen hybridisieren können.^[38]

Neben der Inkorporation von bereits metallkomplexierten Bipyridinliganden in die DNA kann der direkte Einbau von nicht komplexiertem Bipyridin jedoch von Vorteil sein. In der Regel ist der individuelle Ligand ohne Metall besser kompatibel zu den DNA-Synthesemethoden. Dies ermöglicht die Verwendung von kinetisch labilen Metallionen sowie den Einbau des Liganden als Phosphoramiditderivat.^[36] Auf diesem Weg wurden bereits Peptidnukleinsäuren^[39-41], DNA-Duplexe^[42-43], aber auch trianguläre DNA^[44-45] mit Bipyridin modifiziert und ihr Stabilisierungspotenzial durch die Ausbildung von Komplexen mit verschiedenen Metallen analysiert. *Wilker et al.*

untersuchte Bipyridinkomplexe im DNA-Rückgrat und stellte fest, dass Ni^{II} -Ionen im Vergleich zu anderen Metallionen die höchste Stabilisierung der DNA-Duplexe hervorrufen.^[43] Dies lässt sich nicht nur aufgrund der steigenden Schmelztemperatur sondern auch durch spektroskopische Änderungen in der Absorption nachvollziehen. Die in Anwesenheit von Metallionen auftretende Bande bei 310-320 nm ist zurückzuführen auf den π - π^* - und n - π^* -Übergang der koordinierten Bipyridinliganden im Metallkomplex.^[46-47] Der Einbau der Bipyridinkomplexe in die triangulare DNA erfolgte am Verzweigungspunkt sowie am 5'-terminalen Ende.^[44-45] Mit Bipyridin am Strangende modifizierte Oligonukleotide sind in der Lage, in Anwesenheit bestimmter Metallionen ein DNA-Netzwerk auszubilden (siehe Abb. 6 links). Das Interesse an solchen Komplexen lässt sich damit begründen, als DNA basierte Nanodrähte oder als elektronische Nanokreisläufe einzusetzen.^[45] *Shionoya et al.* dagegen synthetisierte eine triangulare DNA mit Oligonukleotiden, die in der Sequenzmitte mit Bipyridin postsynthetisch mithilfe der „Click“-Reaktion modifiziert wurden. Durch die Ausbildung von 3:1 Ligand-Metallkomplexen wird das DNA-Gerüst am Verzweigungspunkt stabilisiert (siehe Abb. 6 rechts). Dieses Motiv eignet sich gut, um in DNA-Origami und 3D-Nanoarchitekturen integriert zu werden, deren Stabilität und Rigidität durch die reversible Metallkoordination am Verzweigungspunkt reguliert werden kann.^[44]

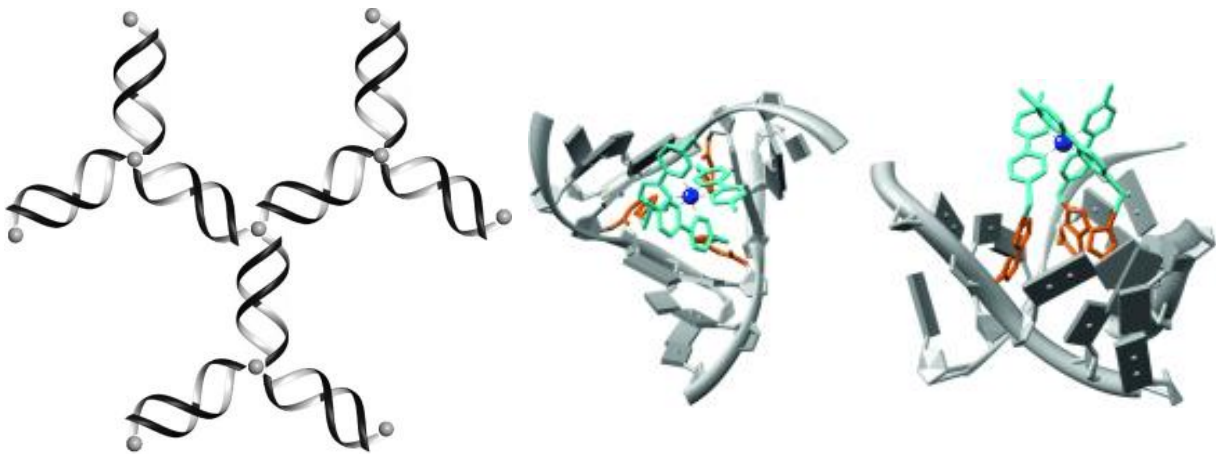


Abb. 6: (links) DNA basiertes Netzwerk verbunden durch Bipyridinkomplexe; (rechts) triangulare DNA, deren thermische Stabilität durch Metallkomplexierung mit Bipyridin erhöht wird.^[44-45]

1.3. Perylenbisimid allgemein

Die Farbstoffklasse der Perylenbisimide (PBI) wurde ursprünglich aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit in der Industrie als Küpenfarbstoff zum Färben von Textilien verwendet. PBIs besitzen herausragende Eigenschaften wie eine hohe Extinktion, hohe Quantenausbeuten in der Fluoreszenz, photochemische und thermische Inertness, eine starke Farbvielfalt sowie eine Elektronenleitfähigkeit. Aus diesem Grund wurde das Interesse in der akademischen und industriellen Forschung geweckt und mittlerweile haben sich die Perylenbisimide für zahlreiche Anwendungen als Pigmente^[48], Fluoreszenzfarbstoffe^[49-51] und als leitende Materialien für organische, elektronische Systeme^[52-68] etabliert. Darüber hinaus wurde das Aggregationsverhalten dieser planaren, hydrophoben, aromatischen Moleküle hinsichtlich der molekularen Selbstassemblierung intensiv untersucht^[67, 69-76]. Das ausgedehnte, quadrupolare π -System ermöglicht die Bildung zahlreicher supramolekularer Architekturen mit herausragenden photophysikalischen Eigenschaften.^[77]

1.3.1. H- und J- Aggregate von Perylenbisimiden in Lösung

Die Selbstassemblierung von Farbstoffen in Lösung führt zu starken intermolekularen van-der Waals Wechselwirkungen zwischen den Molekülen. Die Aggregate zeigen signifikante Änderungen der Absorptionsbanden im Vergleich zu den Monomeren. Je nach spektraler Verschiebung kann man die verschiedenen Aggregationsarten unterscheiden. Die sog. bathochrom verschobene J-Bande (J für Jelly nach seinem Entdecker)^[78] sowie die hypsochrom verschobene H-Bande (H für hypsochrom)^[79] wurden mithilfe der excitonischen Kupplungstheorie von Kasha erklärt.^[80] Hinsichtlich dieser Theorie wird ein Farbstoffmolekül als ein Dipol betrachtet, das im angeregten Zustand der Farbstoffaggregate, je nach Art der Dipolwechselwirkung, in zwei Energieniveaus aufspaltet (siehe Abb. 7).^[80]

Allgemein gilt, dass die J-Aggregation zu einem rot verschobenen, schmaleren Absorptionsspektrum mit steigender Extinktion führt, wogegen die H-Aggregation ein blau verschobenes, breiteres Absorptionsspektrum mit reduzierter Quantenausbeute in der Fluoreszenz zeigt.^[81]

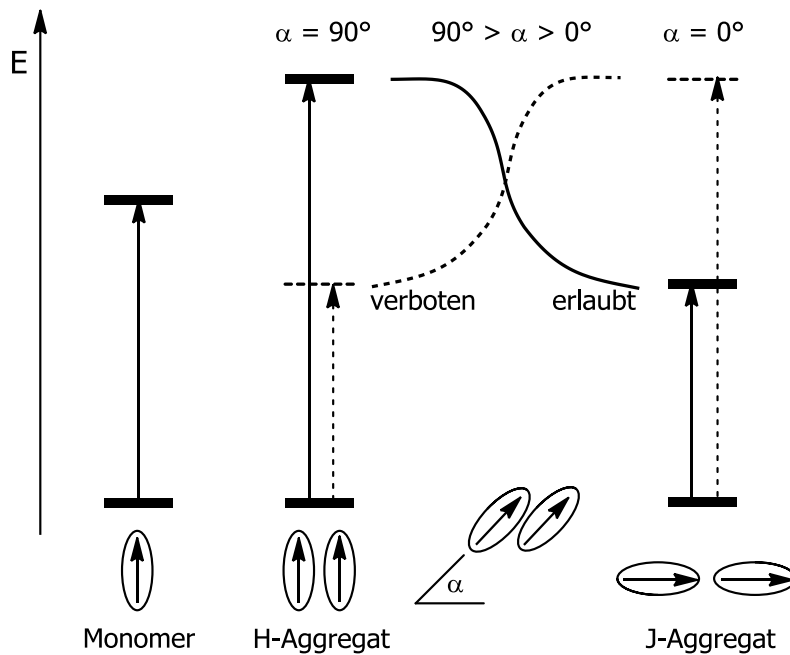


Abb. 7: Vergleich der elektronischen Übergänge von Monomer und der H- und J-Aggregate basierend auf die Exciton-Wechselwirkungen.

Würthner et al. untersuchte das Aggregationsverhalten von Perylenbisimiden in Lösung. Je nach Alkylsubstitution kann sich die π -Stapelung von einem ordinären H-Aggregat zu einem seltener vorkommenden J-Aggregat ändern. Der Grund dafür sind die sterischen Effekte der peripheren Seitenketten, welche die Selbstassemblierung dirigieren. Mit linearen Alkylketten substituierte Perylenbisimide bilden H-Aggregate, wogegen verzweigte Alkylsubstituenten aufgrund des höheren sterischen Bedarfs zur Ausbildung von J-Aggregaten führen (siehe Abb. 8).^[82]

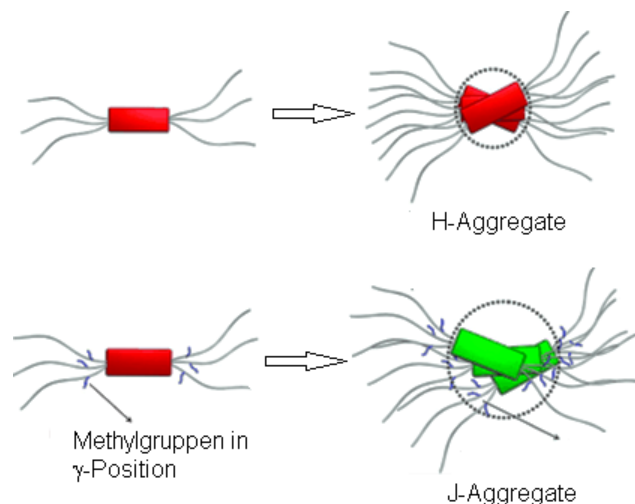


Abb. 8: Schematische Darstellung von PBI Chromophoren mit (oben) linearen und (unten) verzweigten Alkylsubstituenten.^[82]

Darüber hinaus kann das Aggregationsverhalten durch die Temperatur und die Konzentration der Perylenbisimide beeinflusst werden. Bei intermediärer Temperatur

II.1. Theoretischer Hintergrund

und Konzentration bildet sich ein kompaktes, sandwichähnliches Dimer mit H-typischem excitonischem Charakter und einer daraus resultierenden Fluoreszenzlöschung. Andererseits werden bei hohen Konzentrationen bzw. niedrigeren Temperaturen Aggregate mit J-typischem excitonischem Charakter ausgebildet (siehe Abb. 9).^[81]

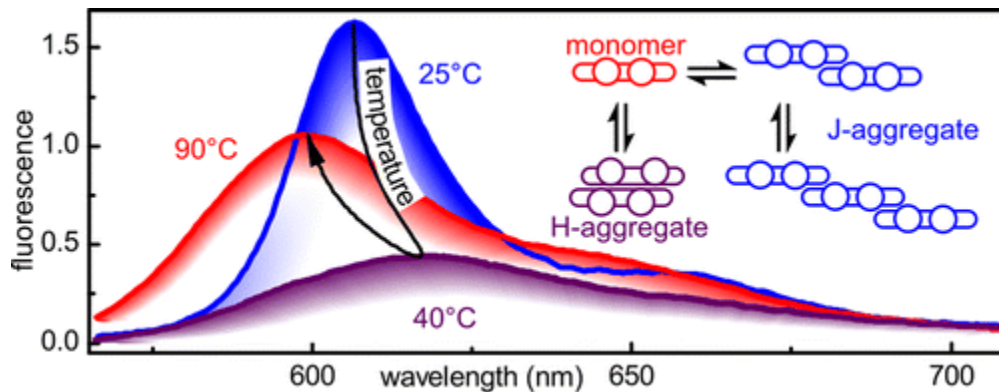


Abb. 9: Schematische Darstellung der konzentrations- und temperaturabhängigen Ausbildung von H- und J-Aggregaten der Perylenbisimide.^[81]

1.3.2. Selbstassemblierung von Perylenbisimid in Wasser

Wasser besitzt im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln eine besondere Rolle für die supramolekulare Chemie. Bereits in Lösung treten gezielte Interaktionen und Selbstassemblierungsprozesse der Perylenbisimide auf, welche die Ausbildung von ausgedehnten Architekturen ermöglichen.^[77] Dies lässt sich mit der sog. *Linear Free Energy Relationship* (LFER) erklären, welche die freie Gibbs'sche Bindungsenergie $-\Delta G^\circ$ und die Lösungsmittelparameter $E_T(30)$ ins Verhältnis setzt (siehe Abb. 10 links). Diese zeigt eine Abnahme der Perylenbisimidaggregation mit steigender Lösungsmittelpolarität bei aliphatischen und dipolar-aprotischen Lösungsmitteln sowie einen Aggregationsanstieg mit steigender Lösungsmittelpolarität bei stark dipolaren und protischen Lösungsmitteln. Der zusätzliche hydrophobe Effekt in Wasser und die dadurch gesteigerte Interaktion der hydrophoben π -Oberflächen führt zu einem Maximalwert der freien Gibbs'schen Energie und folglich zu einem maximalen Aggregationsverhalten.^[83] Die Änderungen der Absorptionseigenschaften ermöglichen, die Aggregation der Perylenbisimide spektroskopisch nachzuvollziehen (siehe Abb. 10 rechts).^[77]

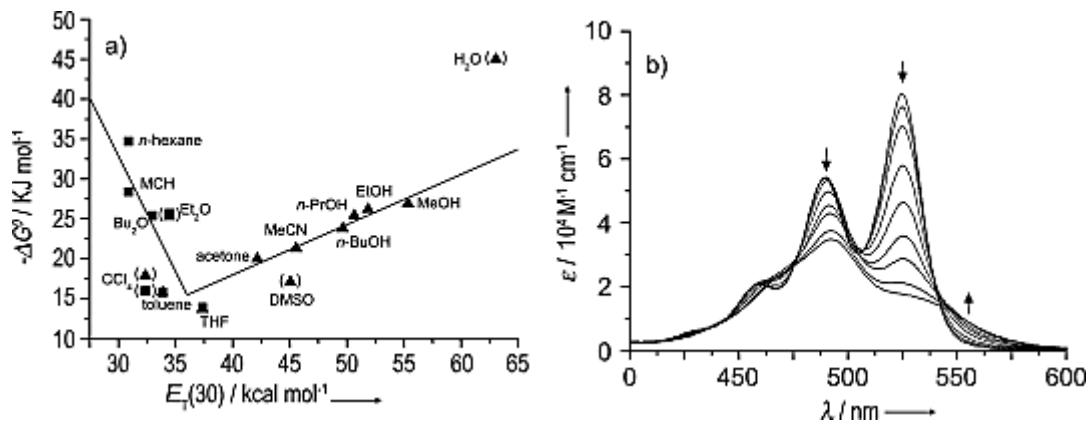


Abb. 10: (links) Auftragung der freien Gibbs'schen Energie $-\Delta G^\circ$ der isodesmischen Aggregation gegen die Lösungsmittelpolarität $E_T(30)$ für PBI; (rechts) Konzentrationsabhängiges UV/Vis-Spektrum von PBI in MeOH bei 25 °C.^[77]

Zwei erfolgreiche Strategien wurden zur Synthese von wasserlöslichen Perylenbisimid entwickelt, welche den Grundstein der synthetischen Verfügbarkeit dieser Farbstoffklasse legten. *Langhals et al.* integrierte löslichkeitsfördernde Substituenten am Imidstickstoff,^[67, 84] wogegen *Seybold et al.* diese an der sog „Bay-Region“^[85-86] anbrachte (siehe Abb. 11). Die Substitution in der „Bay-Region“ verändert die Absorptions- und Emissionsbanden deutlich. Die Imidsubstitution dagegen hat keinen oder wenig Einfluss auf die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der PBIs.

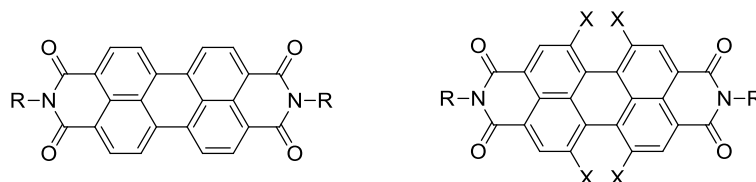


Abb. 11: PBIs (links) imidsubstituiert und (rechts) substituiert an der „Bay-Region“.

Mittlerweile wurden zahlreiche Derivate für die Anwendung als Fluoreszenzstandards entwickelt, die aufgrund ihrer intensiven gelb-grünen Photolumineszenz in fluoreszierenden Lichtsammelsystemen oder als Farbstofflaser verwendet werden.^[84]

1.4. Perylenbisimid in DNA

Die chemische Resistenz, die einzigartigen Fluoreszenz- und Selbstassemblierungseigenschaften sowie die elektronischen Eigenschaften der Perylenbisimide haben das Interesse für deren Anwendung in der DNA-Analytik und in der DNA-basierten Nanotechnologie geweckt.^[54, 59, 61-62, 87]

II.1. Theoretischer Hintergrund

Perylenbisimid wurde zunächst an die interne und terminale Position von DNA Doppelsträngen als Basensurrogat mithilfe der automatisierten Phosphoramiditmethode eingebaut und das Aggregationsverhalten des artifiziellen Bausteins in DNA untersucht.^[60, 88]

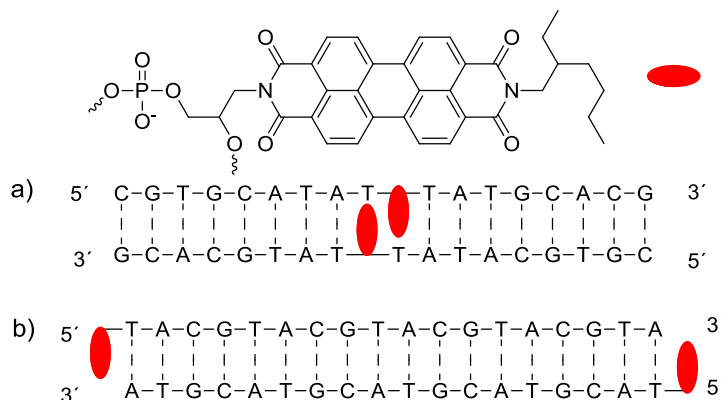


Abb. 12: An der (a) internen und (b) terminalen Position eingebautes PBI in DNA.^[89]

Unterhalb der Schmelztemperatur der DNA-Duplexe wurde, vergleichbar mit den Nanoaggregaten der PBI-Monomere^[90], eine excimertypische Fluoreszenz mit einer breiten Bande bei ≈ 660 nm festgestellt. Auch die Absorption bestätigte aufgrund der verschobenen Absorptionsintensitäten bei 506 und 545 nm die π - π -excitonischen Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen. Oberhalb der Schmelztemperatur dagegen entsprechen sowohl die Fluoreszenz, mit klar definierten Signalen bei 558 und 603 nm, als auch die Absorption den Perylenbisimidmonomeren. Das Aggregationsverhalten von PBI in DNA wurde folglich verwendet, um weitere supramolekulare DNA-Strukturen zu entwickeln. Mittlerweile wurde PBI in zahlreiche Oligonukleotidkonjugate eingebaut und beispielsweise in thermophilen *Foldameren*^[54, 61, 91], in DNA-*Tripelhelices*^[63, 92], für Elektronentransferstudien^[64] sowie als Fluoreszenzlöcher in hochsensitiven *Molecular beacons*^[58, 93] untersucht.

Lewis et al. analysierte die hydrophobe Assemblierung der Perylenbisimide in Haarnadeln^[94], Haarnadel-Dimeren^[62-63, 65, 95] und DNA-Hanteln^[76] (siehe Abb. 13). DNA-Konjugate aus reinen A-T-Basenpaaren, welche über einen PBI-Linker (Abb. 13 a) miteinander verbunden sind, liegen in reinem Wasser als Monomer vor (Abb. 13 b) und bilden in Anwesenheit von NaCl Haarnadel-Dimere (Abb. 13 c)^[62-63]. Das entsprechende Monomer-Dimer-Gleichgewicht ist neben der Salzkonzentration von der Temperatur sowie der Konzentration des Konjugats abhängig.^[76]

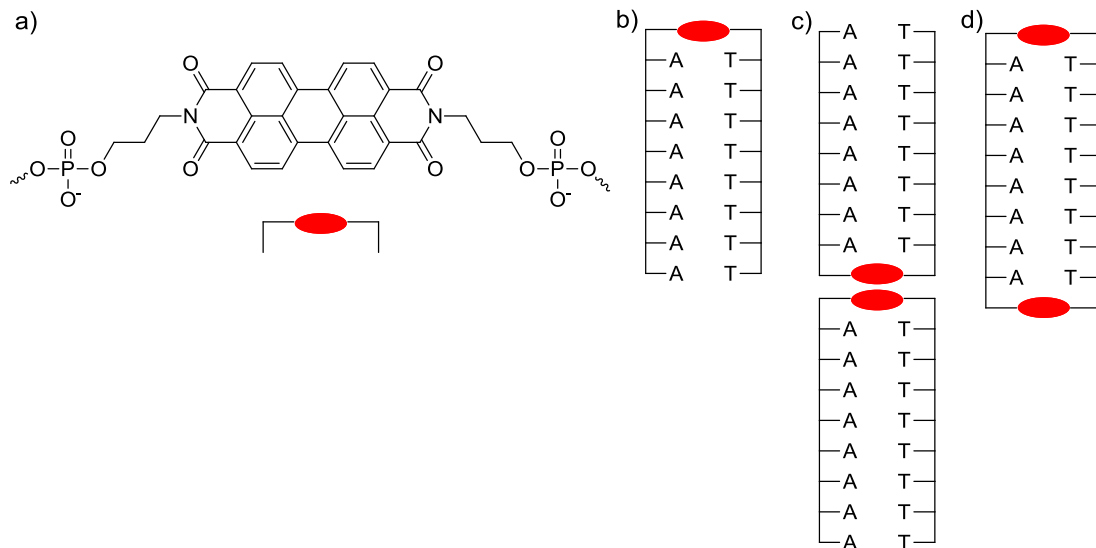


Abb. 13: Strukturen von (a) PBI-Linker, (b) PBI-Haarnadel, (c) PBI-Haarnadel-Dimer und (d) PBI-Hantel.^[89]

Weiterführend konnten mithilfe von TEM- und AFM Messungen die Hantel-Assemblierungen bildlich dargestellt werden. Diese zeigen verzweigte Fäden, welche der Zusammenlagerung von ~ 10-30 Hantel-Monomeren entsprechen (siehe Abb. 14).^[76]

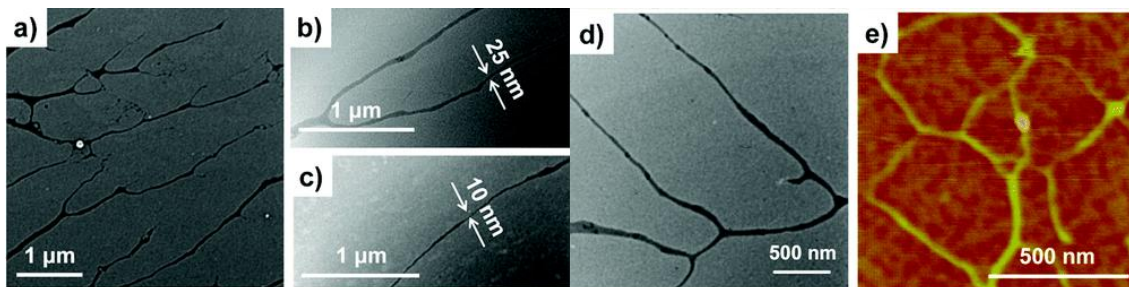


Abb. 14: (a-d) TEM und (e) AFM Bilder der PBI-Hantel-Assemblierungen.^[76]

Aufgrund des hohen Aggregationspotenzials von Perylenbisimid an der terminalen Position von Oligonukleotiden, welches durch die starken quadrupolaren- und Dispersionswechselwirkungen des Chromophors bedingt ist, wurde das Interesse der Chromophore zur Ausbildung von selbstaggregierenden, verzweigten DNA Architekturen und Netzwerken geweckt.^[96]

1.4.1. Triangulare Perylenbisimid-DNA-Netzwerke

Verzweigte DNA-Konstrukte sind, wie bereits beschrieben, mittlerweile weit etablierte Bausteine für nanotechnologische Anwendungen^[17, 97], nanomechanische Anordnungen^[98-99], makroskopische Selbstassemblierungen^[100] sowie für DNA

Origami^[22]. Im Speziellen konnten triangulare DNA-Konstrukte bereits als Reaktoren im Yokolitermaßstab^[101] sowie als strukturänderndes Bauelement in DNA Nanoanordnungen^[102] eingesetzt werden.

Perylenbisimid wurde bereits für zwei verschiedene Zwecke in die triangulare DNA eingebracht. Am Verzweigungspunkt führen die starken Interaktionen zwischen den PBI-Chromophoren zu einer Stabilisierung des DNA-Konstrukts (siehe Abb. 15 a). Die ausgebildete triangulare DNA weist dabei die charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften der molekularen Aggregate auf.^[103] Im Gegensatz dazu verhalten sich PBI-Moleküle am 5'-Ende als „klebrige Deckel“, welche die Ausbildung von größeren DNA-Gebilden ohne den Einsatz von enzymatischer Legierung oder der Verwendung von überhängenden DNA-Abschnitten ermöglichen (siehe Abb. 15 b). Diese können ebenfalls über die excimertypischen, spektroskopischen Eigenschaften nachvollzogen werden. Ein bedeutender Vorteil der PBI getriebenen Assemblierung ist ihre Reversibilität. Zumal das Aggregationsverhalten der modifizierten Oligonukleotide nicht im Einzelstrang beobachtet wird, können die Aggregate durch Aufheizen aufgehoben und durch Abkühlen wieder ausgebildet werden. Der Nachteil dieser Struktur jedoch ist, dass sie bei einer kritischen Konzentration $> 5 \mu\text{M}$ innerhalb von Minuten zu einem unlöslichen roten Feststoff aggregiert (siehe Abb. 15 c).^[96]

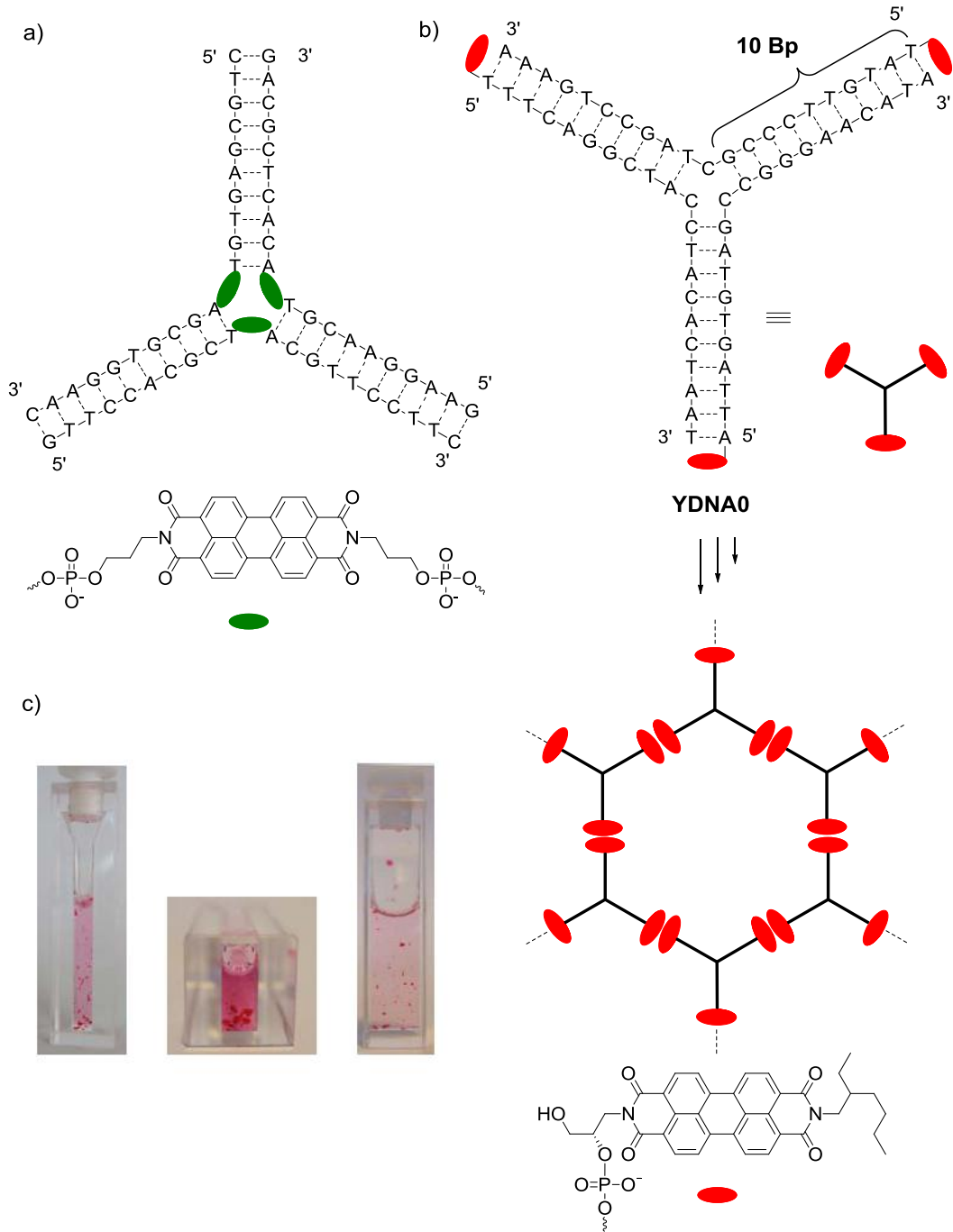


Abb. 15: Perylenbisimid am a) Verknüpfungspunkt und am b) 5'-Ende der triangulären DNA sowie c) der DNA-Feststoff nach Überschreiten der kritischen Konzentration.^[89]

2. Zielsetzung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten zunächst durch Sequenzvariationen Perylenbisimid modifizierte, triangulare als auch *Holliday* DNA-Strukturen synthetisiert und optisch-spektroskopisch untersucht werden. In der triangularen DNA sollten die „Armlängen“ der in Kapitel II.1.4.1 beschriebenen **YDNA0** verkürzt sowie Cytidin am Verzweigungspunkt entfernt werden, um die Einflüsse auf die kritische Konzentration bestimmen zu können.

Weiterführend war das Ziel, die beschriebenen, nichtkovalenten Bindungsmotive der π - π -Wechselwirkungen von Perylenbisimid sowie die Metall-Ligand-Interaktionen mit Bipyridin zur Synthese von triangulärer DNA und zur Ausbildung höher geordneter Strukturen zu kombinieren. Hierfür sollte die in Kapitel II.1.4.1 beschriebene trianguläre DNA nach der von Shionoya in Kapitel II.1.2 beschriebenen Methode mit einem neuen Bipyridinbaustein im Verzweigungspunkt modifiziert und das Stabilisierungspotenzial durch Ausbildung von 3:1 Ligand-Metallkomplexen des bifunktionalen DNA-Konstrukts analysiert werden (siehe Abb. 16:).

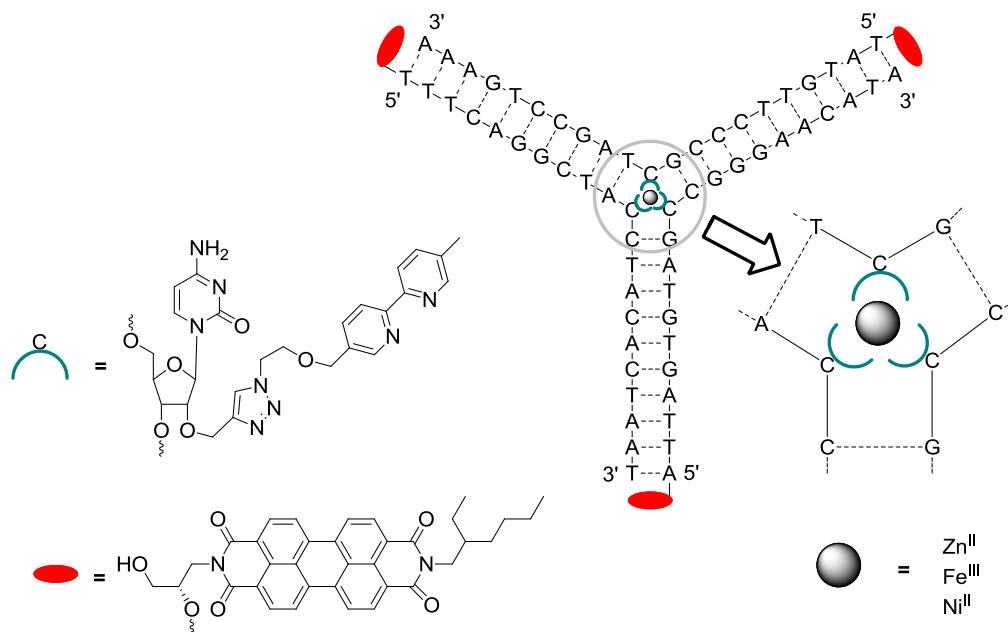
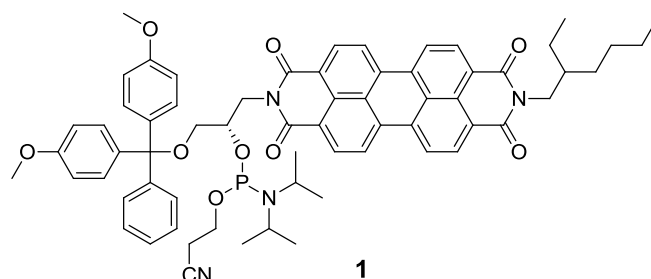


Abb. 16: Bifunktionale, trianguläre DNA sowie die Strukturen der Bipyridinyl-2'-Modifikation und der Perylenbisimid Modifikation.

3. Synthese

3.1. Synthesestrategie

Der Phosphoramiditbaustein von Perylenbisimid **1** wurde nach der bereits bekannten Strategie synthetisiert und in Oligonukleotide mithilfe der standardisierten Methode eingebaut.^[60]



Für die Synthese der bifunktionalisierten DNA-Stränge wurde zusätzlich ein kommerziell erhältliches, alkinmodifiziertes Cytidinderivat in den Strang inkorporiert und postsynthetisch mit einem azidfunktionalisierten Bipyridinbaustein unter Verwendung der Cu-katalysierten „Click“-Reaktion verknüpft.

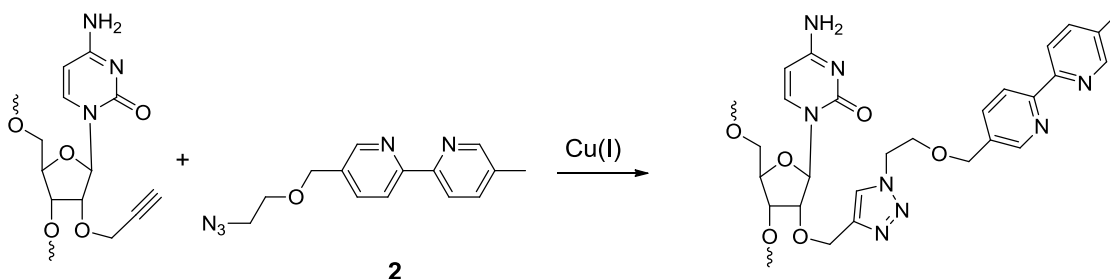


Abb. 17: Cu(I)-katalysierte [3+2] Huisgen Zyклоaddition von alkinmodifizierter DNA mit azidmodifiziertem Bipyridin.

3.2. Synthese des Bipyridinliganden

Der erste Syntheseschritt des Bipyridinliganden **2** stellt eine radikalische Monobromierung von Dimethylbipyridin **3** mit AIBN und NBS nach einer bereits bekannten Methode dar.^[104] Das gewünschte Produkt **4** wurde dabei mit einer Ausbeute von 22 % erhalten, da als Nebenprodukt die Zweifachbromierung nicht vermieden werden kann. Als Nächstes erfolgte, angelehnt an die Literatur^[105], die Substitution mit Ethylenglykol mithilfe von Natriumhydrid mit einer Ausbeute von 94 %. Unter Verwendung der Appel-Reaktion wurde die Hydroxygruppe von **5**

II.3. Synthese

zunächst zum Bromid, anschließend mittels der Finkelsteinreaktion zum Iodid (**6**) mit einer Ausbeute von 80 % umgesetzt. Im letzten Schritt erfolgte ein Iod-Azid-Austausch mit NaN_3 , der mit einer Ausbeute von 66 % den gewünschten azidfunktionalisierten Bipyridinliganden **2** lieferte.

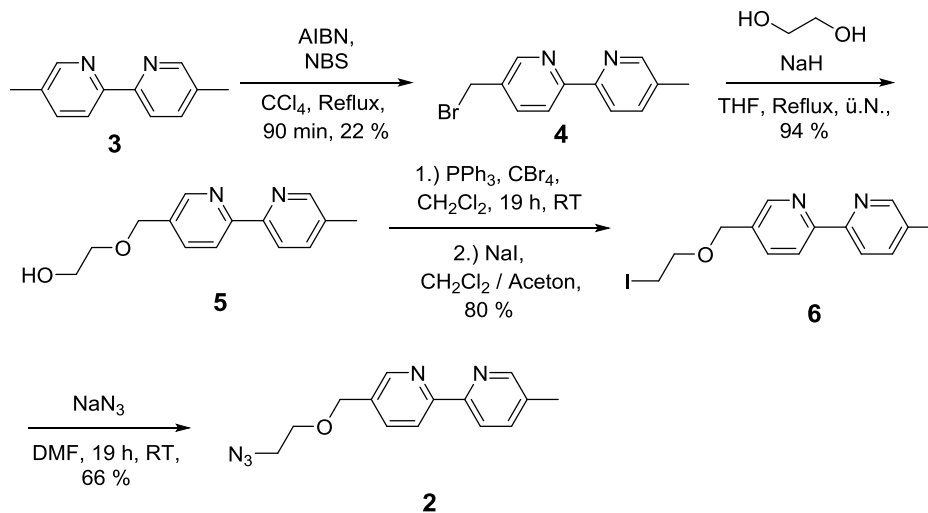


Abb. 18: Syntheschema des azidmodifizierten Bipyridinliganden **2**.

4. Triangulare und *Holliday* Perylenbisimid-DNA-Strukturen

In Kapitel II.1.4.1 wurde bereits eine triangulare DNA beschrieben, die am 5'-Terminus mit Perylenbisimid modifiziert ist (**DNA0**, siehe Abb. 15). Diese Struktur besteht aus drei DNA-Armen mit je zehn Basenpaaren und enthält Cytidin in der Sequenzmitte, um sterische Hinderungen zu vermeiden. In der Annahme, dass ein Basenpaar einer 36° Drehung in der B-DNA entspricht, ist jeder Arm dieses DNA-Konstrukts einmal vollständig gedreht.

Um zu untersuchen, ob Cytidin als Abstandhalter in der Sequenzmitte tatsächlich notwendig ist, wurde **YDNA1** ohne Cytidin am Verknüpfungspunkt synthetisiert. Darüber hinaus wurde **YDNA2** hergestellt, deren DNA-Arme um je ein Basenpaar verkürzt sind, um ebenfalls den Einfluss auf die Stabilität zu analysieren. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob und wie sich diese kleinen Strukturänderungen auf die kritische Konzentration auswirken.

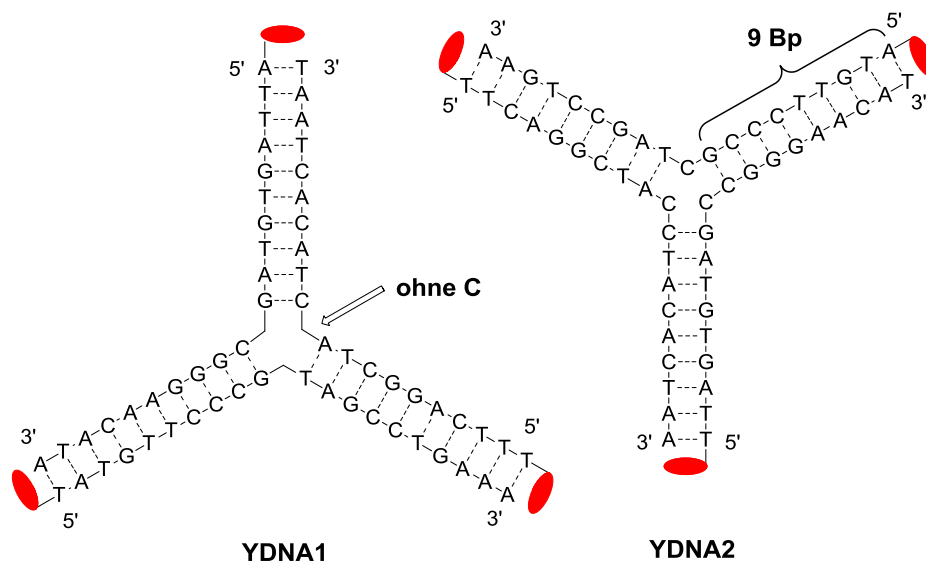


Abb. 19: Sequenzvariationen der triangularen Perylenbisimid-DNA.^[89]

Das Entfernen von Cytidin in den Sequenzmitten der Oligonukleotide von **YDNA1** führt zu einer Stabilisierung des Konstrukts, was durch Schmelztemperaturmessung ermittelt werden konnte (siehe Tabelle 1). Jedoch zeigte das Ausfallen als Feststoff über Nacht bei einer Konzentration $< 5 \mu\text{M}$ eine Abnahme der kritischen Konzentration. Im Vergleich dazu erzeugt zwar das Verkürzen der DNA-Arme eine weniger verdrehte Doppelhelix, die genauso wie bei **YDNA1** eine Abnahme der kritischen Konzentration mit sich bringt, aber keinen positiven Einfluss auf die Stabilität der triangularen DNA hat.

II.4. Triangulare und *Holliday* Perylenbisimid-DNA-Strukturen

Es lässt sich folgern, dass die Löslichkeit der mit Perylenbisimid modifizierten DNA-Konstrukte nicht von der helikalen Verdrehung der DNA-Arme abhängt, sondern von der Länge der einzelnen hydrophilen DNA-Stränge. Darüber hinaus ist Cytidin am Verknüpfungspunkt nicht notwendig, sondern erhöht nach Entfernung die Stabilität.

Tabelle 1: Schmelztemperaturen der triangularen **YDNA0-2** und **XDNA1**.

YDNA	YDNA0	YDNA1	YDNA2	XDNA1
T_m [°C]	46,3	49,3	44,9	46,6
ΔT_m [°C]	-	+3,0	-1,4	-

Weiterführend wurde eine *Holliday* DNA-Struktur entwickelt, die aus vier am 5'-Ende mit Perylenbisimid modifizierten Oligonukleotiden besteht. Jeder Strang enthält zwei Bereiche zur Ausbildung der DNA-Arme mit je zehn Basen und kein Cytidin in der Sequenzmitte (siehe Abb. 20).

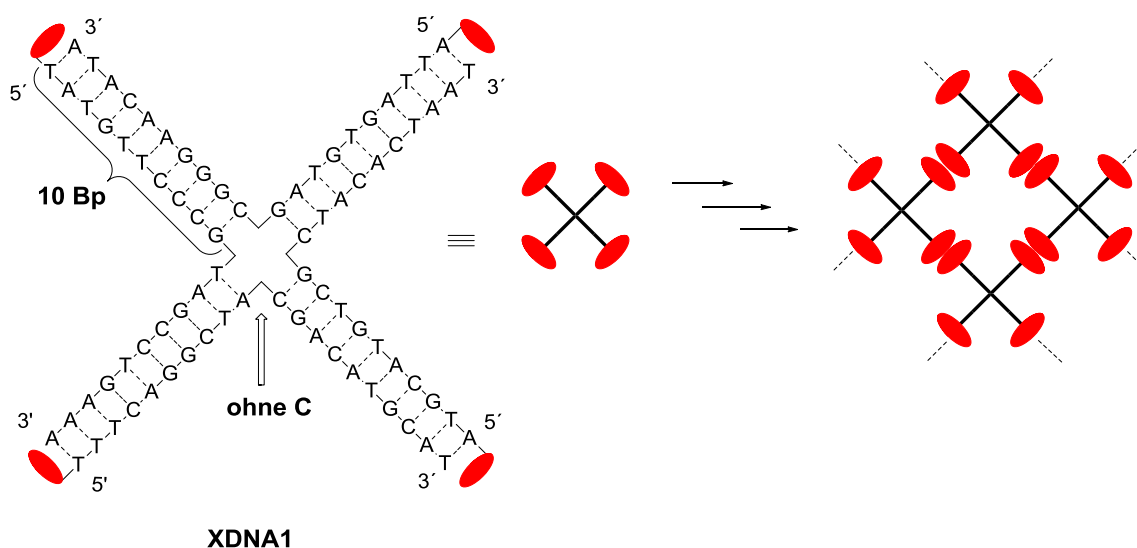


Abb. 20: Sequenz und schematische Darstellung des postulierten Aggregationsverhaltens der *Holliday* DNA-Struktur.^[89]

In allen neu entwickelten Strukturen dient die Perylenbisimidmodifikation als „molekularer Kleber“, welcher aufgrund von π - π -Wechselwirkungen sowohl die triangulare als auch die *Holliday* DNA spontan zu höher geordneten Strukturen aggregiert. Dieses Aggregationsverhalten konnte stets spektroskopisch durch eine hypsochrome Verschiebung in der Absorption sowie durch eine bathochrome Verschiebung in der Fluoreszenz beobachtet werden (siehe Abb. 21).

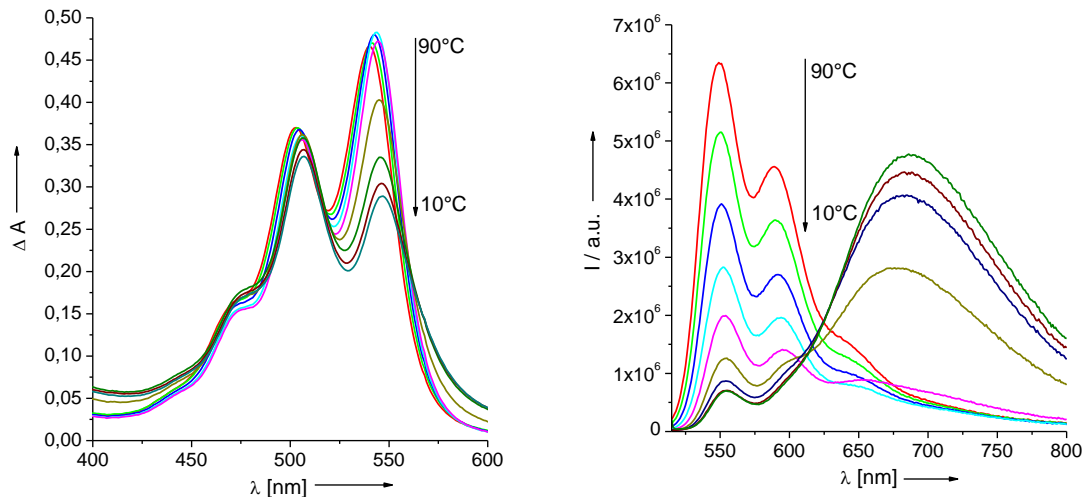


Abb. 21: Temperaturabhängige Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der Perylenbisimid modifizierten triangularen und *Holliday* DNA-Strukturen repräsentativ am Beispiel von **YDNA2**.

Die Verhältnisse der Absorptionsmaxima bei 506 nm und 544 nm ermöglichen die rechnerische Bestimmung, ob es sich um eine Monomer- oder Aggregatabsorption von Perylenbisimid handelt. Bei $T > T_m$ ist das Absorptionsverhältnis $A_{506}/A_{544} \leq 1$, wogegen bei $T < T_m$ das Verhältnis auf > 1 steigt (siehe Abb. 22). Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Farbstoff H-Aggregate ausbildet, wodurch excitonische Wechselwirkungen entstehen. Dies führt zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, wodurch A_{506}/A_{544} geändert wird.

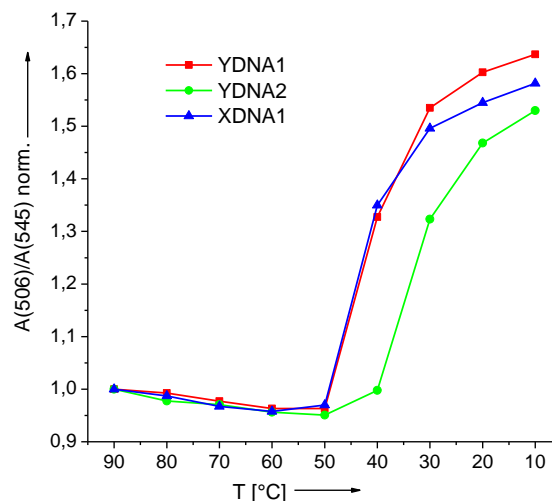


Abb. 22: Temperaturabhängige Absorptionsverhältnisse (A_{506}/A_{544}) von **YDNA1-2** und **XDNA1**.

Die Fluoreszenz dagegen entspricht bei $T < T_m$ einem breiten Signal bei 680 nm, wobei die Ausbildung von H-Aggregaten eigentlich eine Fluoreszenzlöschung mit sich bringt. Die vorhandene Fluoreszenz kann jedoch damit begründet werden, dass im angeregten Zustand eine Konformationsänderung der Aggregate stattfindet, wodurch eine excimerartige Fluoreszenz entsteht. Bei $T > T_m$ dagegen dominiert das

Fluoreszenzmaximum bei 553 nm. Folglich lässt sich für aggregierte Perylenbisimide stets ein Fluoreszenzverhältnis von $F_{553}/F_{680} < 1$ berechnen.

Dieser Prozess ist darüber hinaus reversibel, womit gezeigt werden konnte, dass durch eine thermische Dehybridisierung die PBI-vermittelten Aggregate getrennt werden, die sich jedoch beim Abkühlen wieder ausbilden können.

4.1.1. Nachweis der Perylenbisimid-Netzwerke

Die spektroskopischen Untersuchungen der Perylenbisimid vermittelten Assemblierung ermöglichen die PBI-Dimerbildung nachzuvollziehen. Diese Methode ist somit zwar ein eindeutiges Indiz, aber noch kein wirklicher Beweis, dass höher geordnete Strukturen entstehen. Aus diesem Grund sollte versucht werden, die Netzwerke mittels Gelelektrophorese (PAGE) nachzuweisen.

Folglich wurde die native PAGE unter Verwendung der oben beschriebenen **YDNA1** durchgeführt und anschließend mittels eines Fluoreszenzscanners analysiert. Dazu wurden die Gele mit einer LED bei $\lambda = 470 \pm 20$ nm angeregt und die Fluoreszenz unter Verwendung eines Cy3- oder eines Cy5- Emissionsfilters gemessen. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass die Cy3-Emission dem Perylenbisimidmonomer und die von Cy5 dem Perylenbisimidaggregat in den Wellenlängen entspricht. Es sollte gezeigt werden, dass sich Oligonukleotid-einzelstränge sowie Zweistrangkombinationen im Gel aufgrund der jeweiligen Laufstrecken wesentlich vom vollständig ausgebildeten, triangularen Konstrukt unterscheiden. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Einzelstränge zur Ausbildung von **YDNA1** werden in Tabelle 2 noch einmal genauer aufgeführt.

Tabelle 2: Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide von **YDNA1**.

YDNA1	Sequenz 3' → 5'
YDNA1a	3'-AAAGTCCGATGCCCTTGTAT- PBI -5'
YDNA1b	3'-TAATCACATCATCGGACTTT- PBI -5'
YDNA1c	3'-ATACAAGGGCGATGTGATTA- PBI -5'

Wie in Abb. 23 zu sehen ist, besitzen die Einzelstränge als auch die Zweistrangkombinationen ähnliche Laufstrecken im Gel, wobei wesentlich breitere Banden bei der Kombination zweier Oligonukleotide entstehen. Dies lässt sich mit

der teilweise bereits auftretenden Hybridisierung erklären, wodurch erste π - π -Wechselwirkungen zwischen den Perylenbisimidbausteinen auftreten können. Die teilweise hybridisierten Doppelstränge sowie Aggregatmischungen im Gel führen zu einer breiten Fluoreszenzbande. Darüber hinaus ist die Fluoreszenz von **YDNA1c** unter Verwendung der Emissionsfilter Cy3 und Cy5 kaum wahrzunehmen, was auf die Anzahl der Guaninbasen im Strang zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass Guanin die Fluoreszenzintensität durch Elektronentransferprozesse von Perylenbisimid löscht.^[106-107] Die Kombination aller zu **YDNA1** hybridisierenden DNA-Stränge zeigt unter Verwendung des Cy3-Filters keinerlei Fluoreszenz, d.h. keine Monomerfluoreszenz von Perylenbisimid ist vorhanden. Wie zu erwarten war, wird mithilfe des Cy5-Filters jedoch eine deutliche Fluoreszenz der Aggregate erhalten. Diese fallen bereits in der Geltasche aus und haben somit zu den Vergleichssträngen einen deutlich unterscheidbaren Abstand in der Laufstrecke.

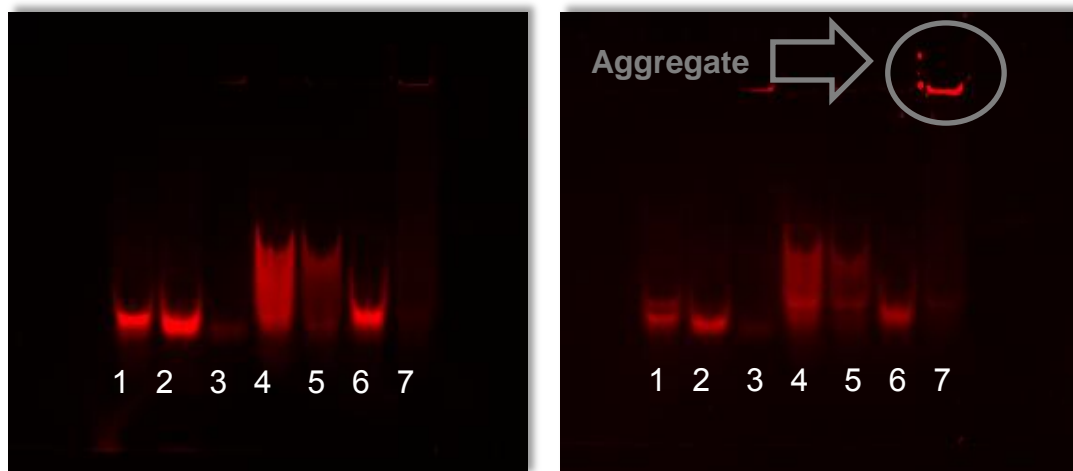


Abb. 23: native PAGE von **YDNA1** unter Verwendung des (links) Cy3- und (rechts) Cy5-Emissionsfilters, Auftragung: 1 = **YDNA1a**, 2 = **YDNA1b**, 3 = **YDNA1c**, 4 = **YDNA1a+b**, 5 = **YDNA1a+c**, 6 = **YDNA1b+c**, 7 = **YDNA1a-c**.

Letztendlich konnte mithilfe der Gelelektrophorese zwar bewiesen werden, dass durch das Aggregieren von Perylenbisimid in **YDNA1** sich höher geordnete Strukturen ausbilden, allerdings liefern sie keinerlei Informationen über die Struktur der gebildeten Netzwerke. Um diese dennoch bildlich darzustellen, wurden AFM-Messungen durchgeführt.

Die DNA-Arme der **YDNA1-2** und **XDNA** enthalten maximal 10 Basenpaare, was einer Armlänge von 3,4 nm entspricht. Da dies weit unter dem Auflösungspotenzial von AFM-Messungen im *Tapping*-Modus an Luft liegt, wurde eine größere, triangulare DNA synthetisiert. Die Sequenzen der DNA-Arme von **YDNA3** enthalten

drei Mal die Armsequenzen von **YDNA0** und sind ebenfalls an den 5'-Enden mit Perylenbisimid modifiziert. Demzufolge besitzt **YDNA3** 30 Basenpaare pro Arm, was einer Länge von 10,2 nm entspricht (siehe Abb. 24). Darüber hinaus diente **YDNA4** als nicht aggregierende Referenz. Sie enthält die gleiche Sequenz wie **YDNA3**, ist aber nicht mit Perylenbisimid modifiziert.

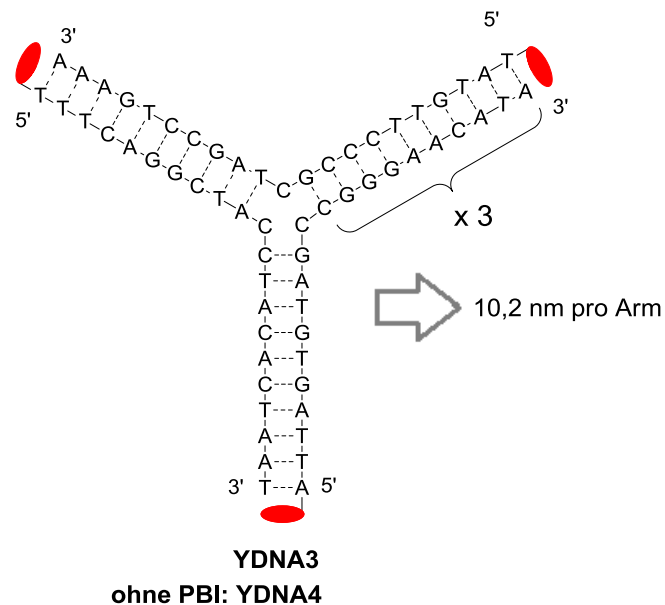


Abb. 24: Schematische Darstellung der Sequenzen **YDNA3** und **YDNA4**.

Die AFM-Messungen wurden an Luft durchgeführt und die DNA wurde gelöst in deionisiertem Wasser und durch Zugabe von 3 mM NiCl_2 oder 10 mM MgCl_2 auf frisch gespaltenen Glimmer gebunden. Die AFM-Bilder mit **YDNA3** zeigen deutlich die Ausbildung regelmäßig höher geordneter Strukturen durch die Assemblierung der triangularen DNA. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ konnte ein vollständiges Netzwerk abgebildet werden (siehe Abb. 25), wogegen bei einer Konzentration von $0,02 \mu\text{M}$ mit NiCl_2 mehrere kleine „Knäule“ zu sehen sind (siehe Abb. 26). Das Kontrollexperiment mit **YDNA4** beweist, dass die Aggregation von **YDNA3** eindeutig durch die Perylenbisimidmodifizierung bedingt ist. Darüber hinaus gelang es eine Tetramerstruktur der **YDNA3** darzustellen, welche einen Einblick liefert wie sich die Netzwerke strukturell zusammensetzen (siehe Abb. 27).

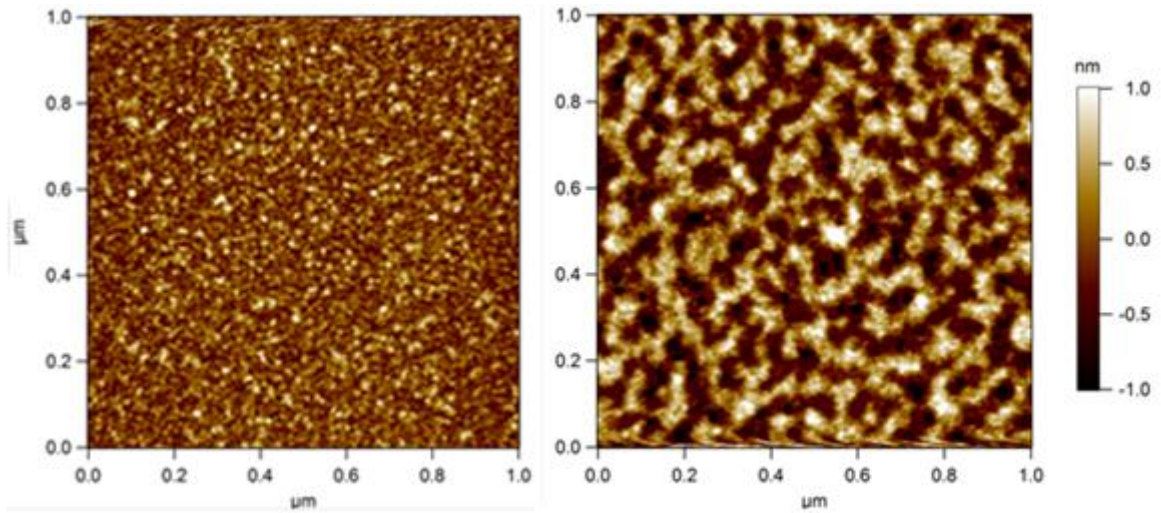


Abb. 25: AFM Messungen von (links) **YDNA4** 1 μM und (rechts) **YDNA3** 1 μM mit je 3 mM NiCl_2 .

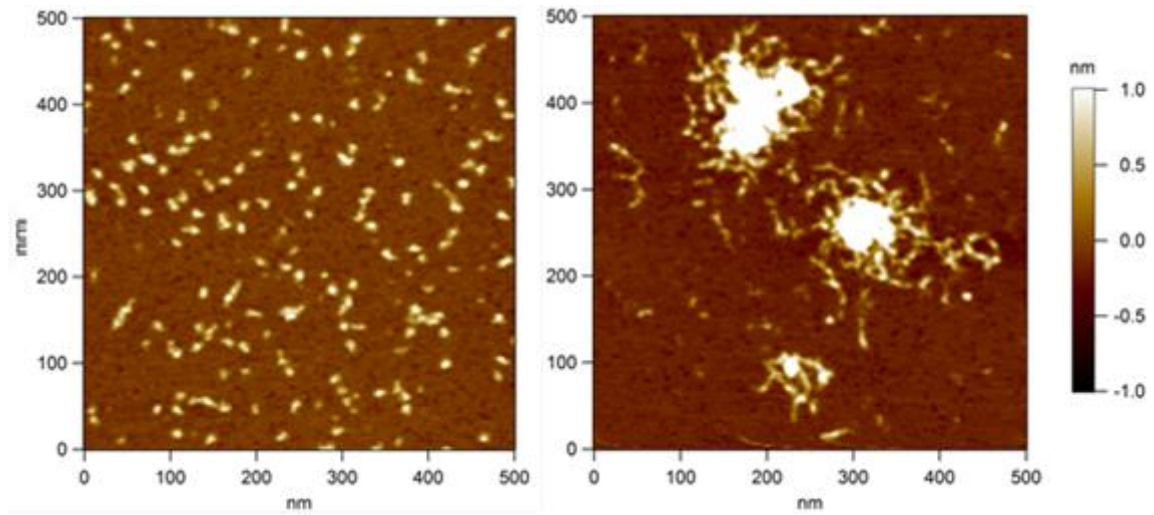


Abb. 26: AFM Messungen von (links) **YDNA4** 0,02 μM und (rechts) **YDNA3** 0,02 μM mit je 3 mM NiCl_2 .

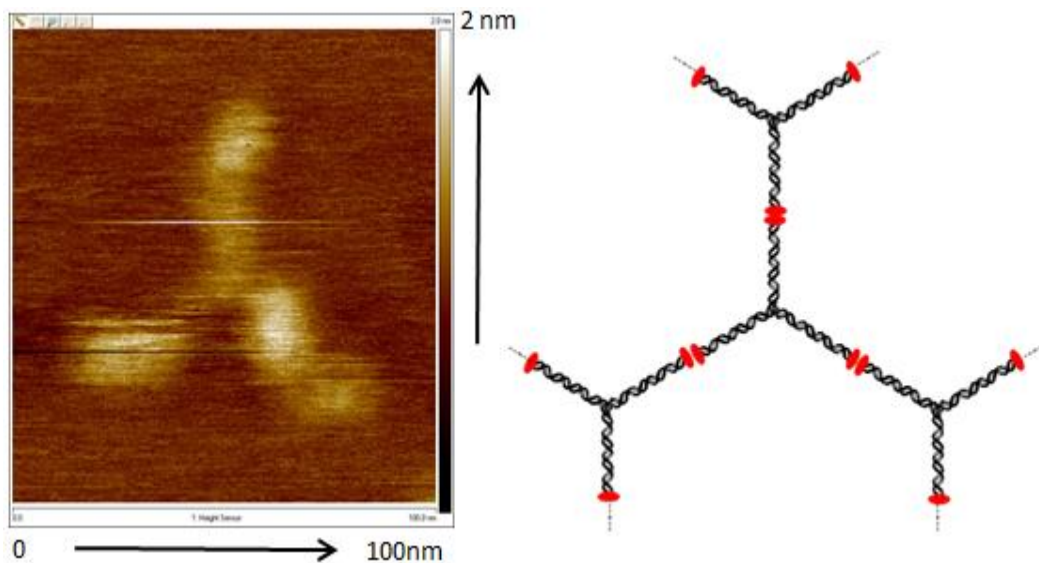


Abb. 27: (Links) AFM Messung von **YDNA3** 1 μM mit 10 mM MgCl_2 und (rechts) eine repräsentative Abbildung der tetrameren Struktur von **YDNA3**.

5. Mit Bipyridin und Metallionen komplexierte Perylenbisimid-DNA-Netzwerke

Wie in Kapitel II.4 gezeigt wurde, liefert das Entfernen von Cytidin am Verknüpfungspunkt von **YDNA0** eine thermische Stabilisierung von $\Delta T_m = 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Um eine noch stabilere, mit Perylenbisimid modifizierte, triangulare DNA zu erhalten, welche zu bifunktionalisierten Netzwerken aggregieren kann, sollten Metallkomplexe mit Bipyridin am Verknüpfungspunkt inkorporiert werden. Die von *Shionoya* beschriebene Methode (siehe Kapitel II.1.2.) zeigte bereits, dass sich durch Metallkomplexierung triangulare DNA-Konstrukte stabilisieren lassen. Mithilfe des neuen Bipyridinliganden **2** (bpy) und dem kommerziell erhältlichen 2'-O-Propargylcytidin sollte dies auf **YDNA0** übertragen werden. Dementsprechend wurde **YDNA5** mit der gleichen Sequenz wie **YDNA0** synthetisiert, die in der Sequenzmitte Bipyridin, aber an den 5'-Enden kein Perylenbisimid enthält (siehe Abb. 28). Perylenbisimid wurde zunächst weggelassen, um einen Einfluss auf die Ausbildung der Komplexe erst einmal zu verhindern.

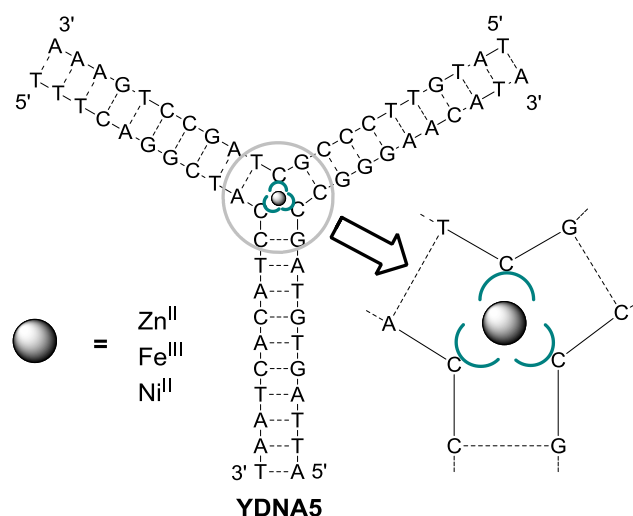


Abb. 28: Schematische Darstellung von **YDNA5**.

Zur Untersuchung der Stabilisierung der oktaedrischen Komplexe mit drei Bipyridinliganden am Verknüpfungspunkt wurden die Metallionen Fe^{III} , Zn^{II} und Ni^{II} verwendet. Die Ausbildung der $[\text{M}(\text{bpy})_3]^{2+/3+}$ Komplexe konnte vor allem durch die steigende Absorption im Bereich von 300-330 nm (Komplexbande) nachvollzogen werden (siehe Abb. 29). Messungen mit Überschuss an EDTA dienen dabei als Referenz. Bei der Verwendung von 1,1 eq Zn^{II} sowie 1,1 eq Ni^{II} erreicht die Komplexbande ein Sättigungsplateau. Die entsprechenden Schmelztemperaturen

bestätigen den signifikanten positiven Effekt auf die thermische Stabilität, wobei dieser mit Ni^{II} höher ist ($\Delta T_m = 16,6 \text{ }^\circ\text{C}$) als mit Zn^{II} -Ionen ($\Delta T_m = 6,4 \text{ }^\circ\text{C}$). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Zn^{II} im Vergleich zu Ni^{II} mit Bipyridin eine kleinere Bruttostabilitätskonstante aufweist, deren Werte proportional zur Komplexstabilität sind (siehe Tabelle 3). In beiden Fällen ist die Hybridisierung der metallkomplexierten DNA-Konstrukte vollkommen reversibel. Im Fall von Fe^{III} zeigte die Schmelzkurve bei 1,1 eq einen Zweistufenübergang, was sich mit einem vorhandenen Gemisch der metallfreien und der stabileren, Metall enthaltenden triangularen DNA erklären lässt. Mithilfe eines Titrationsexperiments wurde festgestellt, dass erst bei 6 eq Fe^{III} eine Sättigung der Komplexbande entsteht (siehe Abb. 29).

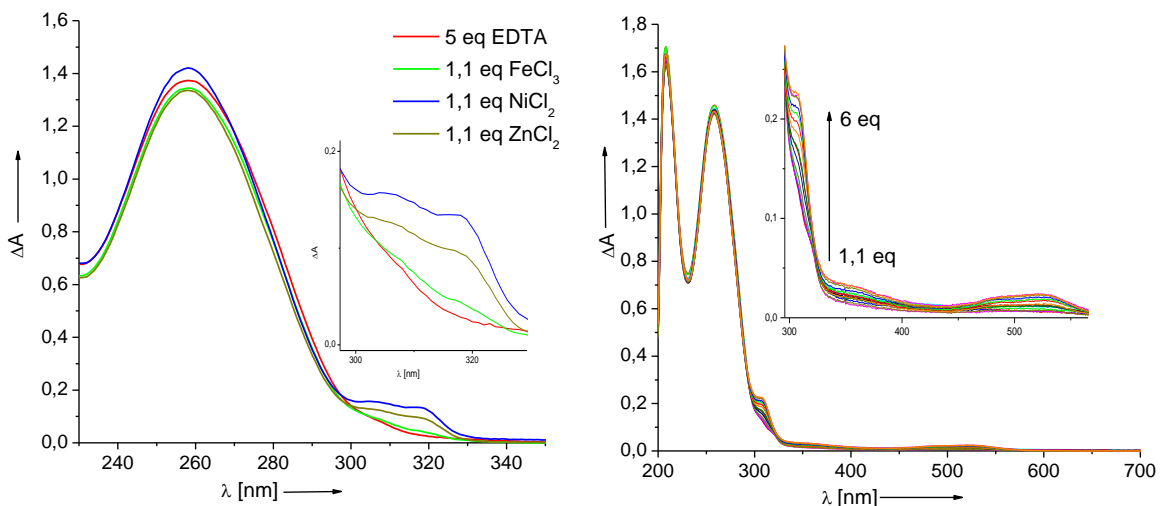


Abb. 29: (Links) Absorptionsspektren von **YDNA5** in Anwesenheit verschiedener Metallionen und EDTA als Referenz; (rechts) Absorptionsspektren von **YDNA5** während der Titration mit Fe^{III} .

Die Schmelzkurve mit 6 eq Fe^{III} zeigte tatsächlich nur noch einen einzigen Übergang und lieferte einen Stabilisierungseffekt von $16,7 \text{ }^\circ\text{C}$. Im Vergleich zu Ni^{II} und Zn^{II} ist die Hybridisierung mit Fe^{III} jedoch nicht reversibel, nachdem einmal auf $90 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgeheizt wurde. Eine mögliche Erklärung ist, dass es sich bei 1,1 eq Fe^{III} nicht um die Anwesenheit zwei verschiedener Spezies handelt, sondern dass der erste Übergang der Schmelzkurve der Dehybridisierung der DNA entspricht, der Komplex aber erst im zweiten Übergang aufgehoben wird.

Tabelle 3: Schmelztemperaturen von **YDNA5** sowie die Bruttostabilitätskonstanten von Zn^{II} und Ni^{II} .

YDNA5	EDTA (5 eq)	Fe^{III} (6 eq)	Zn^{II} (1,1 eq)	Ni^{II} (1,1 eq)
$\text{Log}\beta_3 [\text{M}(\text{bpy})_3]^{2+}$	-	-	13,2	20,2
$T_m [^\circ\text{C}]$	45,5	62,2	51,9	62,1
$\Delta T_m [^\circ\text{C}]$	-	+ 16,7	+ 6,4	+ 16,6

Die Untersuchung der Stabilitätszunahme von **YDNA6** wurde, wie für **YDNA5**, mit den Metallionen Fe^{III} , Ni^{II} und Zn^{II} untersucht und die Messungen mit EDTA als Referenz verwendet. Auch hier zeigten die Schmelzkurven unter Verwendung von 1,1 eq Ni^{II} den deutlichsten positiven Effekt (siehe Abb. 32), der allerdings im Vergleich zu **YDNA5** um 6,6 °C niedriger ist. Was diesen Unterschied erzeugt, kann im Moment noch nicht erklärt werden. Darüber hinaus wurde ebenfalls mit Fe^{III} eine Titration durchgeführt und die Messung der Schmelztemperatur mit 6 eq wiederholt, deren Komplexbildung, wie zuvor beschrieben, nicht reversibel ist.

Tabelle 4: Schmelztemperaturen von **YDNA6**.

YDNA6	EDTA (5 eq)	Fe^{III} (6 eq)	Zn^{II} (1,1 eq)	Ni^{II} (1,1 eq)
T_m [°C]	47,6	55,9	54,8	57,6
ΔT_m [°C]	-	+ 8,3	+ 7,2	+ 10,0

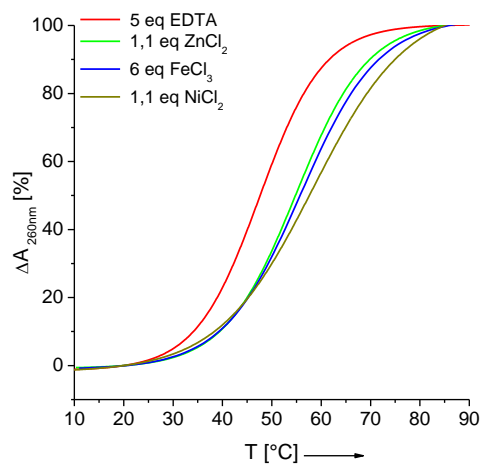


Abb. 32: Schmelzkurven von **YDNA6** in Anwesenheit verschiedener Metallionen und EDTA als Referenz.

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie bei verschiedenen Temperaturen (90 °C → 10 °C) zeigten in Anwesenheit von Fe^{III} und Zn^{II} bei $T > T_m$ ein Absorptionsverhältnis ($A_{506/544}$) von 0,7 – 0,8, das typisch für Perylenbisimid-monomere ist. Dagegen steigt das Verhältnis bei $T < T_m$ auf > 1 , das charakteristisch für aggregiertes Perylenbisimid ist und somit die Ausbildung eines Netzwerks andeutet. Zusätzlich steigt die Absorption bei 308 nm, was die Komplexbildung nach der Hybridisierung widerspiegelt. Die Fluoreszenzmessungen bestätigten das Ergebnis. Bei $T < T_m$ und der Anregung bei 505 nm ist die Fluoreszenz der rot verschobenen, strukturlosen und excimertypischen Bande mit einem breiten Maximum bei 680 nm dominiert. Diese charakteristische Fluoreszenz zeigt ebenfalls

II.5. Mit Bipyridin und Metallionen komplexierte Perylenbisimid-DNA-Netzwerke

die Anwesenheit von aggregiertem Perylenbisimid, das nach Lichtanregung einer strukturellen Relaxation unterliegt.^[108] Darüber hinaus weist das Spektrum bei $T > T_m$ eine Fluoreszenz der Perylenbisimidmonomere bei 553 nm auf. Es konnte somit erfolgreich gezeigt werden, dass die Fluoreszenz von Perylenbisimid weder als Monomer noch als Dimer durch die Anwesenheit von Metallionen gelöscht wird.

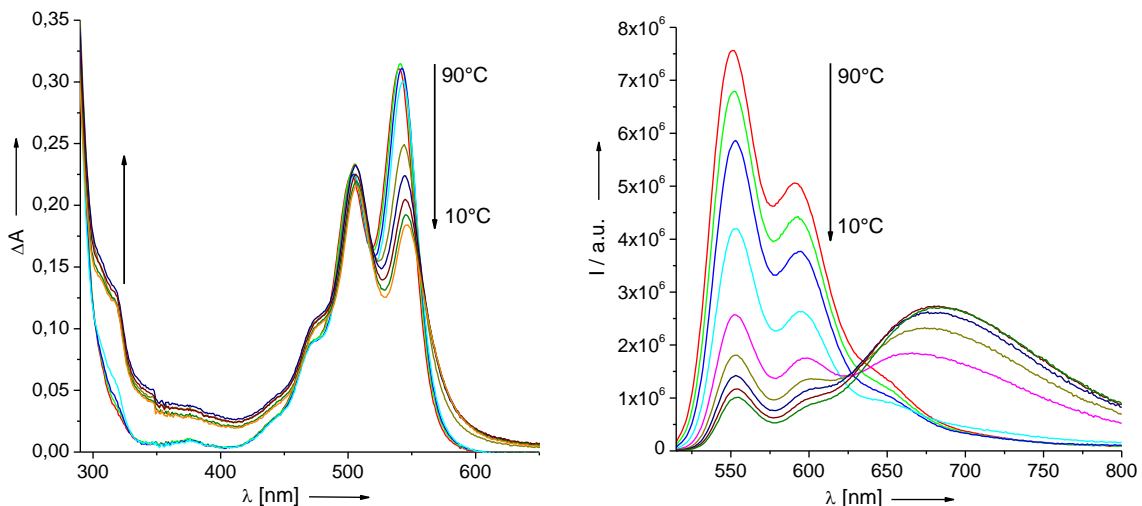


Abb. 33: (Links) Absorptions- und (rechts) Fluoreszenzspektrum von **YDNA6** repräsentativ am Beispiel von Zn^{II} .

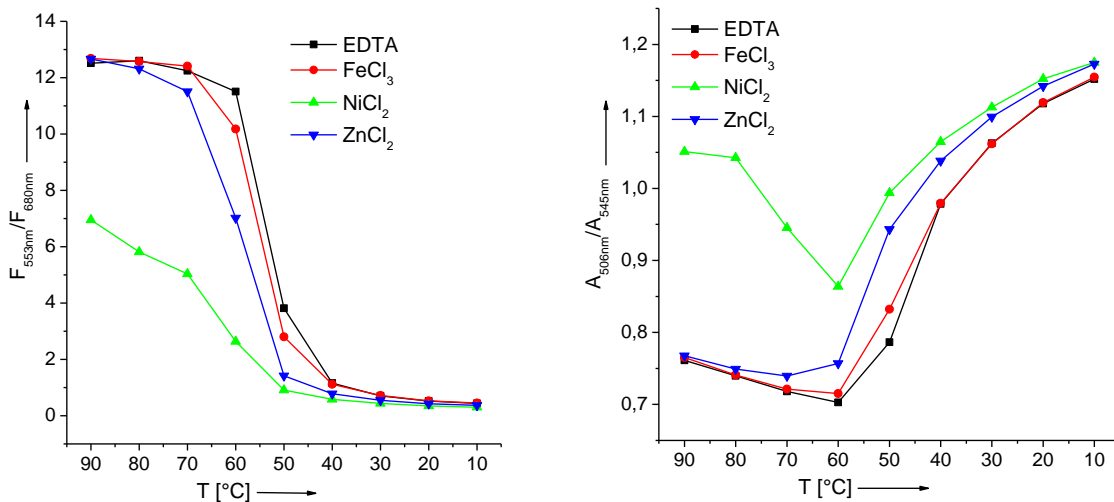


Abb. 34: Temperaturabhängige Absorptions- und Fluoreszenzverhältnisse von **YDNA6** in Anwesenheit verschiedener Metallionen und EDTA als Referenz.

Die Anwesenheit von Ni^{II} ist hinsichtlich der spektroskopischen Untersuchungen ein Spezialfall. Bei $T > T_m$ entspricht das Verhältnis von A_{506}/A_{544} einem Wert von 1,05 und das Verhältnis von F_{553}/F_{680} einem Wert von 7, was auf eine partielle Perylenbisimidassemblierung in der triangularen DNA hindeutet (siehe Abb. 34). Es ist jedoch bekannt, dass die doppelt helikale Struktur erforderlich ist, um das

Aggregieren von Perylenbisimid zu ermöglichen.^[60, 96] Daraus lässt sich folgern, dass dieses Verhalten durch die Anwesenheit von Ni^{II} beeinflusst ist. Die Absorptionsänderungen von 90 °C bis 10 °C bestätigen diese Interpretation, da das Absorptionsverhältnis A_{506}/A_{544} zunächst von 1,05 auf 0,85 abnimmt, wenn die Schmelztemperatur erreicht wird, und bei $T < T_m$ wieder auf 1,15 steigt. Auch die Komplexbande ist bei $T > T_m$ stets vorhanden. Es scheint, als würde der Bipyridylkomplex mit Ni^{II} in **YDNA6** stabil bleiben, selbst wenn die DNA-Arme der triangularen DNA nicht mehr hybridisiert sind ($T > T_m$) (siehe Abb. 34). Aus diesem Grund führt Ni^{II} im Gegensatz zu Zn^{II} und Fe^{III} zur partiellen Assemblierung von Perylenbisimid oberhalb der Schmelztemperatur.

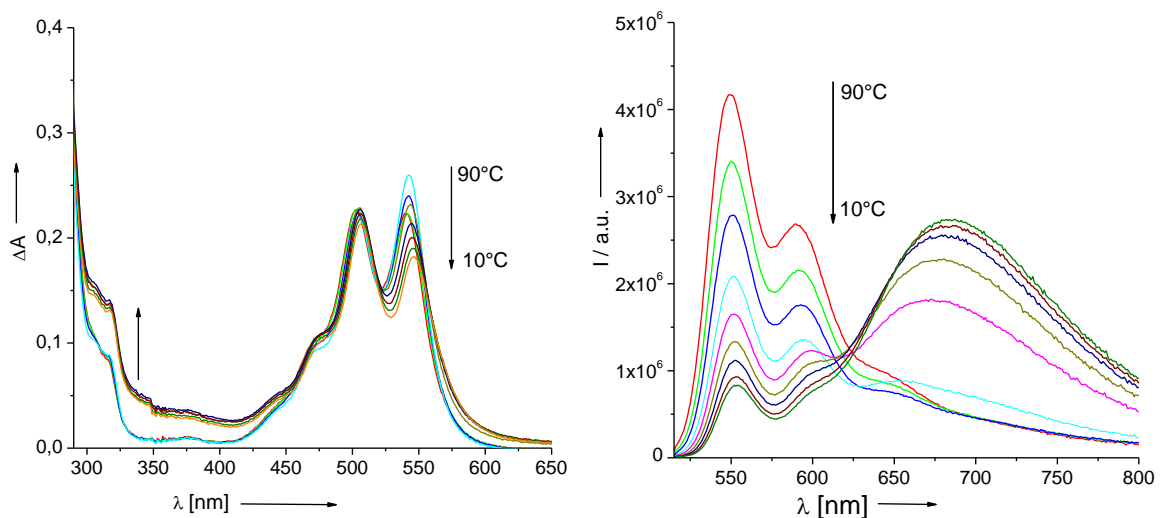


Abb. 35: (Links) Absorptions- und (rechts) Fluoreszenzspektrum von **YDNA6** in Anwesenheit von Ni^{II} .

Es konnte folglich eine triangulare bifunktionalisierte DNA synthetisiert werden, die aufgrund der Perylenbisimidmodifizierung höher geordnete Strukturen ausbildet und durch Metallkomplexe mit Bipyridin stabilisiert werden kann.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden erfolgreich neue am 5'-Ende mit Perylenbisimid modifizierte triangulare sowie *Holliday* DNA-Strukturen hergestellt, die höher geordnete Netzwerke durch die Perylenbisimid-Perylenbisimid-Wechselwirkungen ausbilden. Die Netzwerkbildung kann stets durch temperaturabhängige optisch-spektroskopische Untersuchungen nachvollzogen werden. Um Netzwerkstrukturen besser nachzuweisen, wurden erfolgreich Untersuchungen durch Gelelektrophorese sowie AFM-Messungen der Konstrukte durchgeführt, die eindeutig die Perylenbisimid bedingte Aggregation beweisen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Cytidin am Verknüpfungspunkt der triangularen DNA nicht notwendig ist um sterische Hinderungen zu vermeiden. Ferner führt das Entfernen von Cytidin zu einer leichten Stabilisierung der Konstrukte.

Außerdem wurden neue bifunktionale DNA-Architekturen entwickelt, welche auf den mit Perylenbisimid modifizierten triangularen DNA-Strukturen basieren und zusätzlich am Verknüpfungspunkt mit Bipyridin zur Ausbildung von Metallkomplexen modifiziert sind. In Anwesenheit der Metallionen Fe^{III} , Ni^{II} und Zn^{II} wurde ein eindeutiger Stabilisierungseffekt der triangularen DNA erhalten. Dabei sind, abgesehen von Fe^{III} , die Hybridisierungen der metallkomplexierten Konstrukte reversibel. Auch hier kann das Aggregationsverhalten von Perylenbisimid durch die signifikanten Änderungen der Absorption und Fluoreszenz nachvollzogen werden. Die Assemblierungen treten bei $T < T_m$ auf und werden durch die Anwesenheit der Metallionen nicht beeinflusst. Es wurde somit erfolgreich gezeigt, dass sich die beiden kombinierten Struktur motive nahezu unabhängig voneinander verhalten und somit für die Entwicklung DNA-inspirierter Biomaterialien zur Anwendung in der molekularen Elektronik oder als Lichtsammelsysteme verwendet werden können.

III. Detektionsmethode zur Einzelbasendiskriminierung mithilfe der Pyrrolidinyl-PNA und von magnetischen Fe_xO_y -Partikeln

1. Theoretischer Hintergrund

1.1. Peptidnukleinsäure

Vor mehr als zwanzig Jahren wurde von *Nielsen et al.* die Peptidnukleinsäure (PNA) eingeführt, die mit einer besonders hohen Affinität und Sequenzspezifität komplementäre DNA- und RNA-Sequenzen bindet.^[109] Die Struktur der originalen PNA (aeg-PNA) besteht aus Poly(N-aminoethylglycin), welches das natürliche Zucker-Phosphat-Rückgrat ersetzt und über Methylcarbonyllinker die natürlichen Nucleobasen enthält (siehe Abb. 36).^[15]

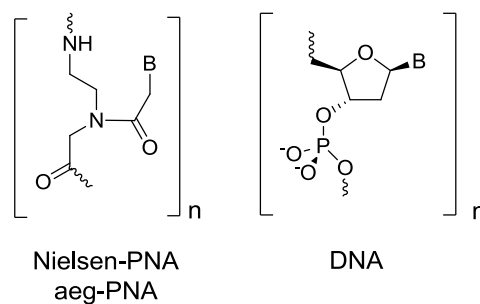


Abb. 36: Strukturen der aeg-PNA und der DNA im Vergleich.

Das elektrostatisch neutrale Rückgrat der PNA führt zu einer gesteigerten Stabilität der PNA-DNA-Hybride. Außerdem ermöglicht die unnatürliche Struktur die Resistenz gegenüber abbauender Enzyme wie den Nucleasen und Proteasen. Weiterführend ist die PNA neben der Hybridisierung von Nucleinsäureeinzelsträngen in der Lage, durch Triplexbildung oder Stranginvasion an DNA-^[109-110] oder RNA-Doppelstränge^[111] zu binden.^[112] Der Grund dafür ist das achirale und flexible Rückgrat der aeg-PNA, das die Bindungen der Nucleobasen sowohl nach Watson-Crick aber auch nach dem Hoogsten-Motiv ermöglicht (siehe Abb. 37). Aufgrund dieser herausragenden Eigenschaften liegt das Interesse der PNA zur Anwendung in der molekularen Biologie,^[113-114] in der Antigentechnologie,^[115] für die Diagnostik als Biosensor^[116] sowie zur Ausbildung von supramolekularen Konstrukten.^[117-118]

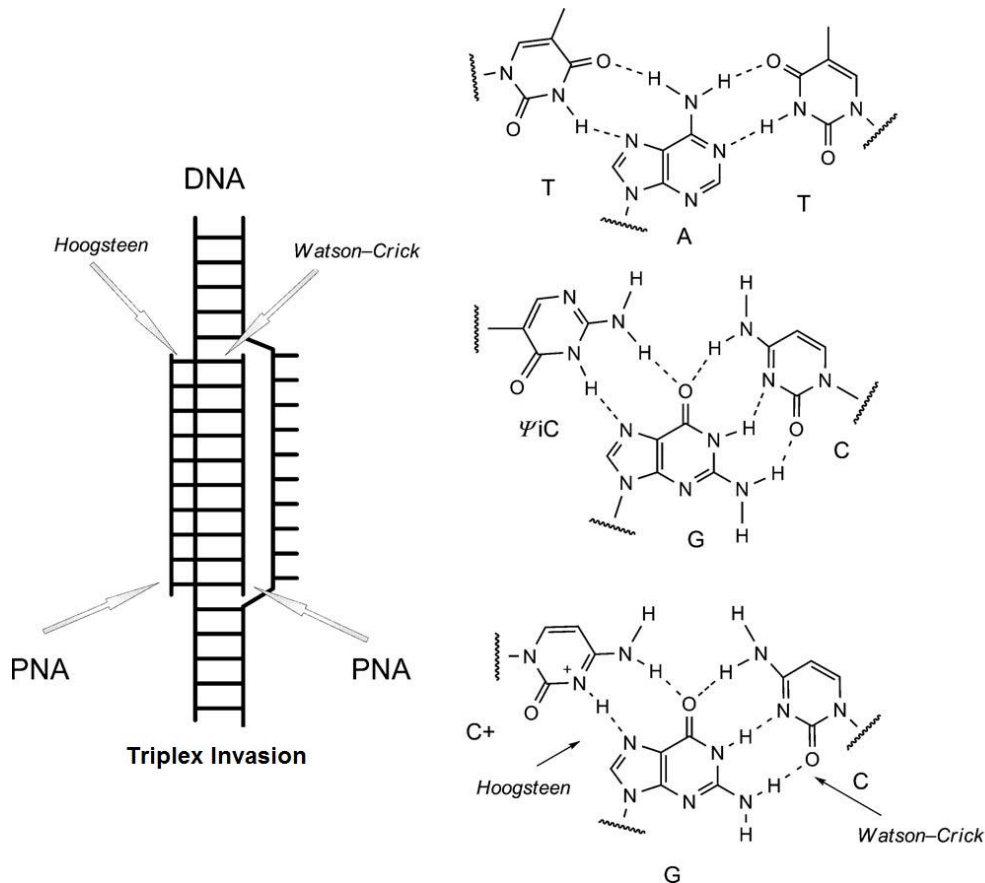


Abb. 37: Ausbildung einer Triplex-Invasion mit vorhandenen (oben) Thymin-Adenin, (mitte) Pseudoisocytosin-Guanin und (unten) Guanin-Cytosin Basenpaarungen nach dem Hoogsten Bindungsmotiv.^[119]

Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch limitierende Faktoren, wie eine schlechte Wasserlöslichkeit, eine fehlende Zellpermeabilität sowie die vorhandene Ambiguität in der DNA- bzw. RNA-Erkennung aufgrund der fehlenden Diskriminierung zwischen paralleler und antiparalleler Hybridisierung.^[120-121]

Mittlerweile wurden zahlreiche PNA-Derivate synthetisiert und hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften sowie der möglichen Anwendung im Bereich der Nukleinsäureerkennung charakterisiert.^[119] Durch die Einführung von kationischen Liganden wie Polyamin^[122] und Lysin^[123] am N/C-Terminus oder von Guanidinium im Rückgrat^[124] konnte die PNA-Löslichkeit erhöht werden. Darüber hinaus gelang es durch die Inkorporierung von Transfermolekülen, wie permeabler Peptide,^[125-126] die Zellpenetration zu erhöhen.^[120-121]

Aufgrund der vorhandenen azyklischen und flexiblen Struktur der aeg-PNA führt die Ausbildung eines Duplex zu einer Konformationsänderung, was einen Entropieverlust mit sich bringt. Auf der anderen Seite beinhalten die dabei entstehenden Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Wechselwirkungen der einzelnen Basen einen Enthalpiegewinn.^[120] Infolge dessen sollte durch eine konformative

Präorganisation der PNA-Struktur im Einzelstrang der Entropieverlust bei der Bildung eines Doppelstrangs reduziert werden, wobei die Enthalpieerhöhung jedoch weiterhin gegeben ist.^[121] Die Einschränkung der konformativen Freiheit der aeg-PNA kann beispielsweise durch Verbrückungen der Aminoethyl- oder Glicylacetylarmen mit Methylene oder Ethylenbrücken erfolgen (siehe Abb. 38), wodurch die Orientierung der Nucleobasen festgelegt wird. Die dabei entstehende Chiralität des PNA-Rückgrats könnte einen Einfluss auf die Bindungsselektivität gegenüber DNA oder RNA haben. Bei der Entwicklung von konformativ verschlossenen bzw. starren DNA Analoga^[127-129] (siehe Abb. 38) wurde bereits festgestellt, dass eine Präorganisation am 3'-endo-Zucker zu einer selektiven und besonders stabilen Ausbildung von DNA-RNA-Duplexe führt.^[121]

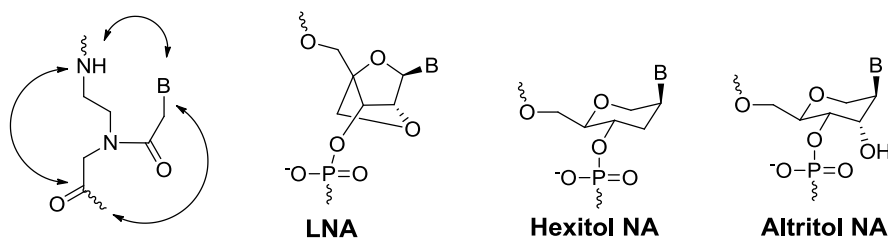


Abb. 38: Mögliche Positionen zur Inkorporierung der Methylene und Ethylenbrücken sowie die Strukturen der LNA, Hexitol NA und Atritol NA.

Mittlerweile wurden zur Flexibilitätseinschränkung der aeg-PNA zahlreiche zyklische Derivate entwickelt, wobei die Struktur der natürlich vorkommenden Nucleinsäuren als Vorbild diente. Ein dabei oft verwendetes Strukturmotiv ist die natürlich vorkommende Aminosäure Prolin, die aufgrund der Vielseitigkeit und leicht beeinflussbaren Stereochemie^[130-131] zur Entwicklung zahlreicher, strukturell eingeschränkter Peptidnucleinsäuren verwendet wurde.^[121] In den meisten Analoga stellte sich allerdings heraus, dass die Strukturänderungen die Hybridisierungseigenschaften der PNA verschlechtern^[132] oder in schwer einschätzbaren Sequenzabhängigkeiten resultieren.^[119]

Eine recht einfache konformative Einschränkung gelang *Apella et al.* durch die Inkorporierung eines Zyklopentanrings in das aeg-Rückgrat (cyp-PNA, siehe Abb. 39).^[133] Aufgrund der begünstigten Konformationsänderung wird die DNA-Erkennung im Duplex aber auch im Triplex oder Quadruplex erhöht sowie die Sequenzspezifität verbessert.^[134-135]

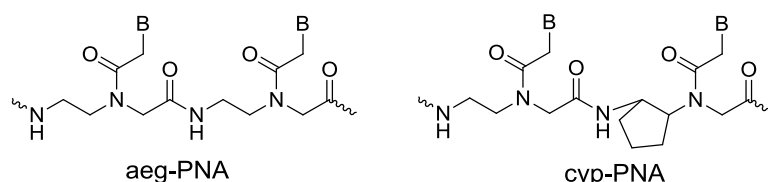


Abb. 39: Allgemeine Struktur der aeg-PNA (links) und der Zykllopentan modifizierten cyp-PNA (rechts) im Vergleich.

Darüber hinaus gelang durch die Kombination sich abwechselnder Einheiten aus nukleobasenmodifiziertem D-Prolin und einer β -Aminosäure die Entwicklung einer neuen Klasse der Pyrrolidinyl-PNA, welche mit einer noch stärkeren Affinität und Sequenzspezifität komplementäre DNA-Stränge bindet.^[136]

1.1.1. Pyrrolidinyl-PNA

Mit Hilfe eines Faltungskonzepts von β -Peptiden^[137] entwickelte *Vilaivan et al.* konformativ eingeschränkte PNA-Analoga, welche auf einer Pyrrolidinstruktur basieren und mit verschiedenen β -Aminosäuren untersucht wurden.^[138-140] Durch die Kombination von Prolin mit einer D-Aminopyrrolidincarbonsäure (DAPC) (siehe Abb. 40) wurde festgestellt, dass eine bevorzugte und sequenzspezifische Hybridisierung mit komplementären DNA- im Vergleich zu RNA-Strängen auftritt.^[139] Die gesteigerte Hybridstabilität kann jedoch, bedingt durch die vorhandene pH-Abhängigkeit, auf eine elektrostatische Anziehungskraft des positiv geladenen Stickstoffs der PNA und der negativ geladenen Phosphatgruppe der DNA zurückgeführt werden. Um zu beweisen, dass die zyklische Struktur der β -Aminosäure DAPC der ausschlaggebende Grund der starken Bindungseigenschaften ist, wurde ein neutrales DAPC-Analogon mit Prolin kombiniert.^[139, 141] Daraufhin erfolgte die Verknüpfung einer 2-Aminozyklopentancarbonsäure (ACPC) als neutrales Strukturmetikum mit den nukleobasenmodifizierten Prolinderivaten. Die Untersuchungen aller vier Stereoisomere (siehe Abb. 40) ergaben eindeutig, dass die strukturelle Rigidität des PNA Rückgrats und die vorteilhafte Konformation der PNA-Nukleobasen verantwortlich sind, um mit den komplementären DNA-Nukleobasen interagieren zu können.

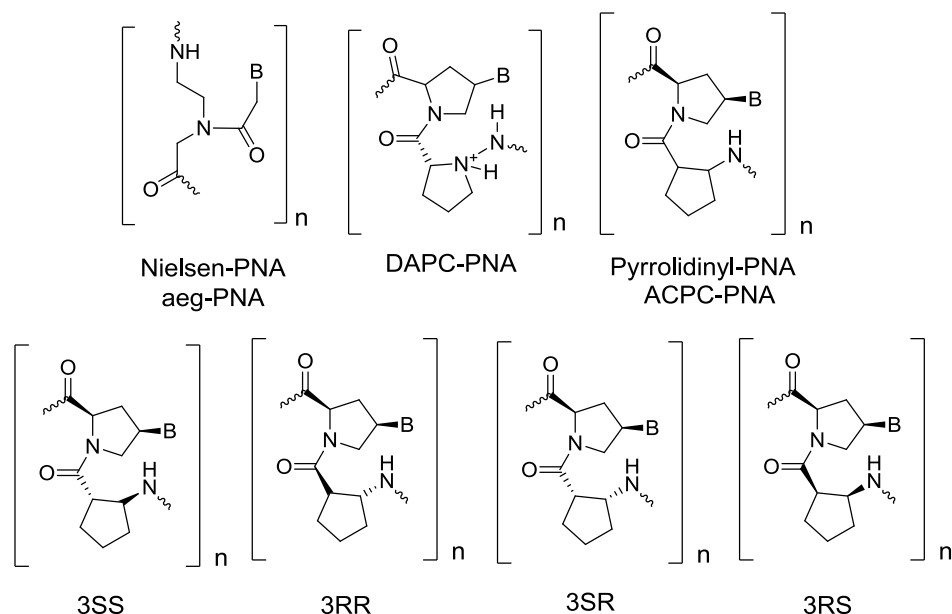


Abb. 40: (Oben) Strukturen der aeg-PNA, DAPC-PNA und ACPC-PNA im Vergleich; (unten) alle vier Stereoisomere der ACPC-PNA.

Der SS-ACPC-Baustein, welcher stereochemisch dem DAPC-Baustein am nächsten ist, zeigte dabei die bemerkenswerteste Affinität und Sequenzspezifität. Dadurch wurde bewiesen, dass nicht die positive Ladung der PNA, sondern die Stöchiometrie der ausgebildeten DNA-PNA-Hybride für die hohe, sequenzspezifische Hybridisierung verantwortlich ist.^[141]

Darüber hinaus konnte im Vergleich zur originalen aeg-PNA gezeigt werden, dass die SS-ACPC-PNA eine bessere DNA-Spezifität^[142], eine antiparallele Selektivität und darüber hinaus keine Selbsthybridisierungseigenschaften aufweist. Aus diesen Gründen wurde das Interesse an dieser Pyrrolidiny-PNA geweckt, um sie für die Diagnostik und möglicherweise in der Therapie anzuwenden.^[136]

1.2. Einzelbasendiskriminierung mithilfe von Peptidnukleinsäuren

Der Austausch einer einzelnen Base im menschlichen Genom ändert nicht nur die Struktur, sondern auch die Funktion des kodierenden Proteins und hat somit einen erheblichen Einfluss auf zahlreiche physiologische Eigenschaften der menschlichen Existenz. Durch Bestimmung solcher Informationen könnten beispielsweise Erbkrankheiten sowie die Wirkungen entsprechender medikamentöser Behandlungen vorhergesagt werden. Aus diesen Gründen ist es in den Bereichen der chemischen Biologie, Biotechnologie, Medizin und der Pharmakogenomik von

besonderer Bedeutung, Hochdurchsatzscreenings zu entwickeln, welche Einzelnukleotidpolymorphismen auf eine ökonomische und exakte Art und Weise detektieren können.^[143-167]

Die Erkennung von DNA- oder RNA-Sequenzen basiert im Allgemeinen auf der Hybridisierung einer Zielsequenz unter Verwendung einer komplementären Oligonukleotidprobe,^[12, 168-169] welche entweder natürlichen Nukleinsäuren^[170-172] oder artifiziellen Äquivalenten,^[167, 173-179] wie verschlossenen/verbrückten Nukleinsäuren (LNA/BNA)^[180-181] oder Peptidnukleinsäuren (PNA),^[109, 182] entspricht.^[183] Aufgrund der Fähigkeit der PNA, mit einer höheren Sequenzselektivität DNA oder RNA zu binden als die natürliche DNA oder RNA, besitzen die PNA basierten Methoden ein besonders hohes Potenzial zur Einzelbasendiskriminierung.

Seitz et al. inkorporierte den Fluoreszenzfarbstoff Thiazolorange in die aeg-PNA als Basensurrogat und entwickelte somit eine sog. FIT- (*forced intercalation*) Probe. Durch die Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Gegenstrang interkaliert der Farbstoff im Duplex, was zu einem erheblichen Fluoreszenzanstieg führt. Dagegen ist die entstehende Fluoreszenzintensität bei einer benachbarten Basenfehlpaarung im Duplex deutlich geringer (siehe Abb. 41).^[184-185]

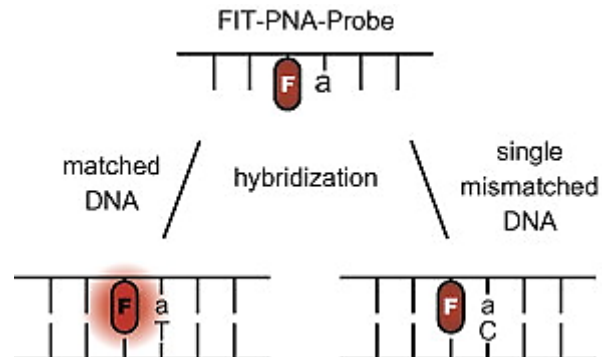


Abb. 41: Darstellung des Prinzips der FIT Probe mithilfe der aeg-PNA.^[184]

Des Weiteren hat *Komiyama et al.* Einzelbasendiskriminierungen mithilfe von Einzelstrang spezifischen Nukleasen durchgeführt. Das Prinzip basiert auf der Tatsache, dass Oligonukleotide gegenüber dem enzymatischen Abbau der S1 Nuklease geschützt sind, wenn sie an komplementäre PNA binden.^[186] Man stellte fest, dass die strukturellen und physiochemischen Änderungen eines Duplex mit Einzelbasenfehlpaarung im Vergleich zum komplementären Duplex ausreichen, um mit der S1-Nuklease oder einer Mung-Bohnen-Nuklease DNA-Gegenstränge zu hydrolisieren. Darüber hinaus kann nach der erfolgten enzymatischen Verdauung der Farbstoff DiSC₂(5) in die Lösung gegeben werden, welcher durch Bindung an einen

vorhandenen PNA-DNA-Duplex die Farbe ändert.^[187-188] Bei einer violetten Farbe ist die untersuchte DNA absolut komplementär zur PNA. Bei einer auftretenden Einzelbasenfehlpaarung wird dagegen eine blaue Farbe erhalten (siehe Abb. 42).^[167]

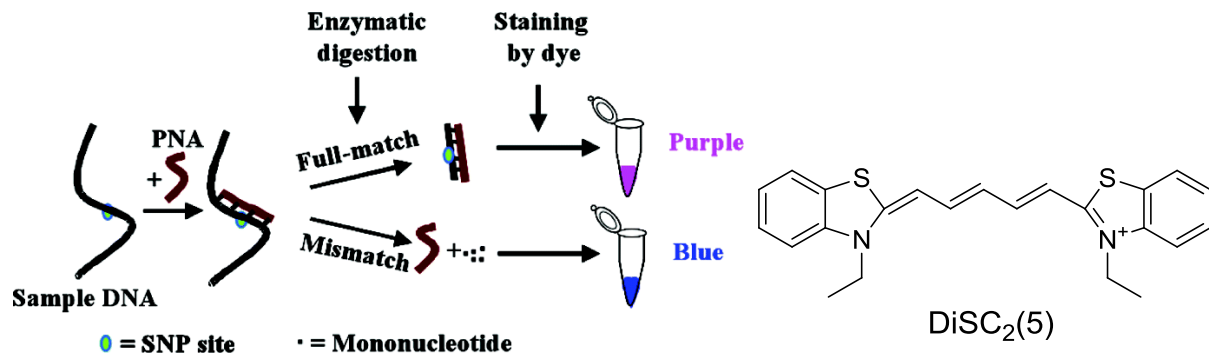


Abb. 42: (Links) Schematische Darstellung der Einzelbasendiskriminierung mithilfe von aeg-PNA, Nuklease und DiSC₂(5); (rechts) Struktur des 3,3'-Diethylthiadicarbocyaninfarbstoffs (DiSC₂(5)).^[167]

Weiterführend entwickelte *Apella et al.* zwei „Sandwich“ Hybridisierungsmethoden mithilfe der cyc-PNA. In einer Variante wurde dabei die cyc-PNA über einer Amidbindung auf einer Plastikoberfläche immobilisiert sowie eine Reporter cyc-PNA mit sechs Biotinmodifikationen am Strangende in Lösung gegeben. In Anwesenheit der Ziel-DNA bildet sich ein nichtkovalenter Dreikomponentenkomplex aus den beiden cyc-PNA-Strängen und der Ziel-DNA (siehe Abb. 43). Mithilfe eines mit Streptavidin modifizierten Enzyms, der Polyhorseradishperoxidase, und anschließender Reagenzbehandlung kann der Komplex angefärbt werden, wodurch nicht nur die Bestimmung der Qualität, sondern auch der Quantität der Ziel-DNA ermöglicht wird.^[189]

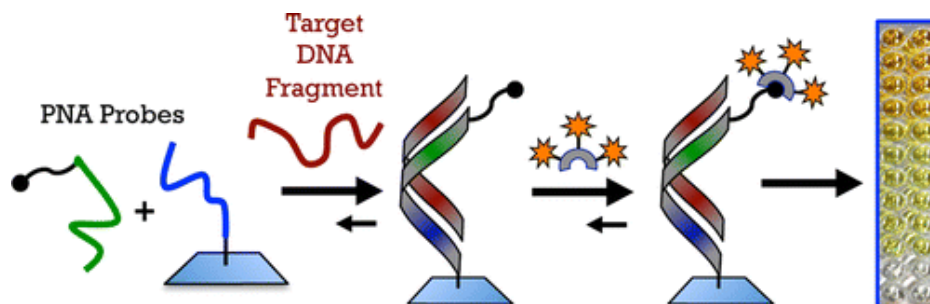


Abb. 43: Schematische Darstellung der „Sandwich“ Hybridisierung mithilfe der cyc-PNA.^[189]

In einer weiteren Methode entwarf *Morii et al.* einen PNA Heteroduplex unter Verwendung pseudokomplementärer DNA oder RNA, welcher in der Lage ist, Einzelbasenfehlpaarungen in DNA- oder RNA-Einzelsträngen zu diskriminieren. Mithilfe von DNA wurde bereits gezeigt, dass durch Verwendung von DNA-DNA Duplexproben die Hybridisierung mit Einzelbasenfehlpaarung enthaltenen DNA Gegensträngen reduziert wird.^[190-191] Ein entscheidender Nachteil dieser Strategie ist

jedoch, dass unter Verwendung von PNA die Hybridisierungseffizienz mit der Zielsequenz deutlich absinkt, da der Probeduplex mit PNA wesentlich stabiler ist. Aufgrund der Tatsache, dass die thermische Stabilität im Duplex durch ein 2'-Desoxyinosin dl-C Basenpaar anstelle eines G-C Basenpaars an gleicher Position leicht abnimmt^[192-194], wurde mit einem dl enthaltenen DNA-Gegenstrang ein PNA Heteroduplex ausgebildet. Mithilfe der unterschiedlichen thermischen Stabilitäten wird dadurch begünstigt, dass in Anwesenheit komplementärer Ziel-DNA ein Strangaustausch stattfindet, der Duplex aber bei vorhandener Einzelbasenfehlpaarung weitestgehend bestehen bleibt. Weiterführend wurde der Heteroduplex mit einer Fluoreszenzprobe kombiniert. Der N-Terminus der PNA wurde dabei mit einem Cy5-Fluorophor modifiziert und mit einem Riboinosin und Cy5-Löscher enthaltenen RNA-Gegenstrang hybridisiert. Im Heteroduplex wird die Fluoreszenz von Cy5 gelöscht und in Anwesenheit der Ziel-RNA findet ein Strangaustausch statt, wodurch die Cy5 Fluoreszenz regeneriert wird (siehe Abb. 44).^[183]

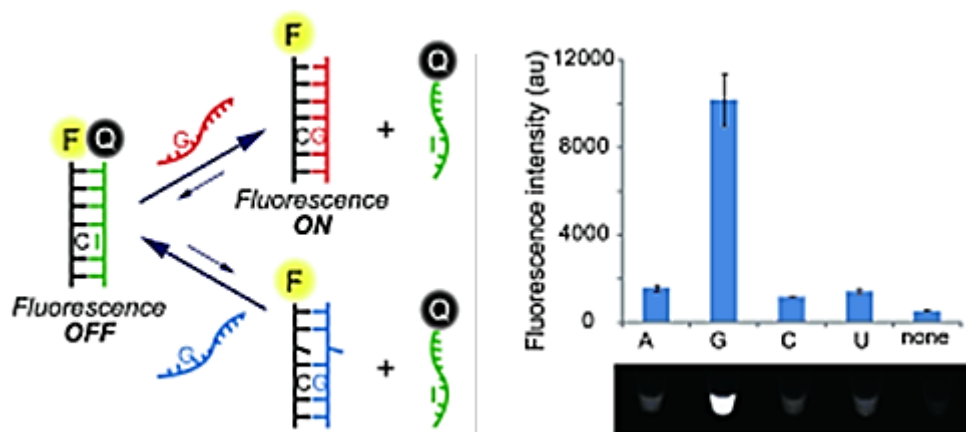


Abb. 44: (Links) Schematische Darstellung der Detektion komplementärer RNA mithilfe einer Cy5 markierten aeg-PNA Heteroduplexprobe; (rechts) Fluoreszenzintensitäten von Cy5 bei der Einzelbasendiskriminierung von RNA-N (N = A, G, C oder U).^[183]

Der entscheidende Nachteil der meisten Hybridisierungstechniken zur Erkennung einzelsträngiger DNA- oder RNA-Sequenzen ist jedoch die fehlende Exaktheit in der Einzelbasendiskriminierung als auch die fehlende Unterscheidung von DNA und RNA. Aufgrund der in Kapitel III.1.1.1 beschriebenen, positiven Eigenschaften der Pyrrolidiny-PNA soll das Einzelbasendiskriminierungspotenzial dieser PNA-Struktur genauer untersucht werden.

Durch Inkorporierung der Fluoreszenzfarbstoffe Pyren und Thiazolorange in die Pyrrolidiny-PNA konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Hybridisierung mit

dem absolut komplementären DNA-Gegenstrang ein signifikanter Fluoreszenzanstieg erhalten wird.^[195-196] Allerdings konnte man nur durch Einsatz einer enzymatischen Verdauung mithilfe der S1 Nuklease zwischen komplementären und nicht komplementären DNA-Gegensträngen differenzieren (siehe Abb. 45).^[196]

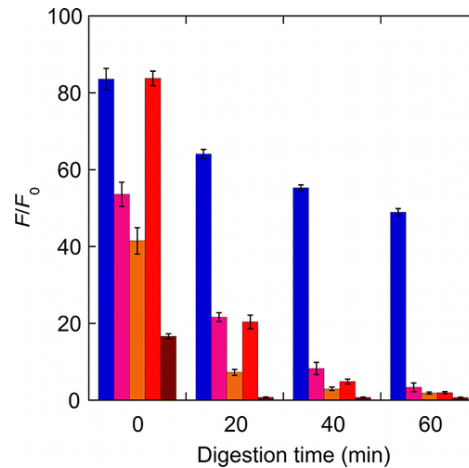


Abb. 45: Kinetiken des Abbaus von komplementären und Einzelbasenfehlpaarung (sm) enthaltenen Hybriden mithilfe der S1 Nuklease, welche durch die Emission bei 528 nm bestimmt wurde: (komplementär: blau, smA: pink, smC_3': orange, smC_5': rot, unpassend: braun).^[196]

Im Moment ist es von großem Interesse, weitere Visualisierungsmethoden zu untersuchen, um das Einzelbasendiskriminierungspotenzial der Pyrrolidiny-PNA noch besser darzustellen. Dabei können beispielsweise für die aeg-PNA oder cyc-PNA aber auch mithilfe von natürlichen Nukleinsäuren verwendete Methoden auf die Pyrrolidiny-PNA übertragen und getestet werden. Darüber hinaus eröffnet der Einsatz von anorganischen, magnetischen Partikeln, welche bereits als Trägersysteme für therapeutische Zwecke an Bedeutung gewonnen haben, neue Herangehensweisen.^[197-201]

1.3. Das Protein p53

In jeder Zelle unseres Körpers mutiert die DNA in etwa tausend Mal am Tag, wobei viele dieser Mutationen zu Krebserkrankungen und vielleicht sogar zum Tod führen können. Allerdings besitzen vielzellige Organismen ein effizientes Kontrollsystem, indem das Tumorsupressorprotein p53, das auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird^[202-203], ein zentrales Element darstellt.^[204] Ursprünglich wurde p53 als ein Onkogen entdeckt, welches für die Entstehung verschiedener Krebsarten verantwortlich ist.^[205-207] Mittlerweile ist aufgeklärt, dass das natürliche p53 als

III.1. Theoretischer Hintergrund

Tumorsuppressor wirkt und nur das inaktive p53 für schädliche Effekte verantwortlich ist.^[208-209] Die Struktur des Proteins setzt sich aus 393 Aminosäuren zusammen, welche in vier funktionellen Domänen angeordnet sind, einer aminoterminalen Domäne sowie einer DNA bindenden Domäne, welche den größten Teil des Proteins ausmacht und auch als *Core*-Domäne bekannt ist (siehe Abb. 46). Daran schließt sich die Tetramerisierungsdomäne gefolgt von einer Regulierungsdomäne.^[204, 210-211] Bei auftretendem zellulären Stress durch DNA-Schäden ist p53 in der Lage, durch Bindung an DNA-Konsensussequenzen die Transkription entsprechender Zielgene anzuregen, deren Produkte entweder eine DNA-Reparatur oder einen programmierten Zelltod einleiten.^[204]

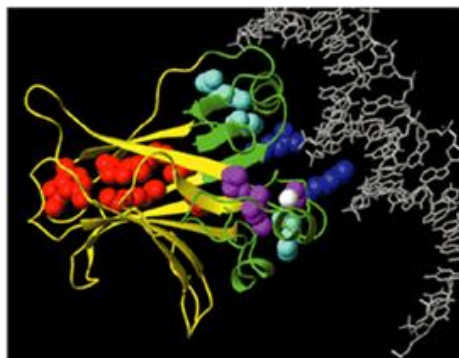


Abb. 46: Darstellung der *Core*-Domäne des Proteins p53 komplexiert mit DNA (grau).^[212]

In mehr als 50 % aller menschlichen Tumoren liegt das Protein p53 aufgrund von Mutationen des p53-Gens inaktiv vor, was die Bedeutung von p53 zur Prävention von Krebs deutlich macht. Aufgrund der Mutationen finden Konformationsänderungen des Proteins statt, wodurch es nicht mehr an seine Konsensus-DNA binden kann und somit inaktiv wird. Heute sind mehr als 20 000 Mutationen bekannt^[213], wobei über 95 % davon an der DNA bindenden Domäne lokalisiert sind. Von besonderem Interesse sind die sog. „Hot-Spot-Mutationen“, welche ungefähr ein Viertel aller vorkommenden p53 Mutationen ausmachen (siehe Abb. 47).^[204]

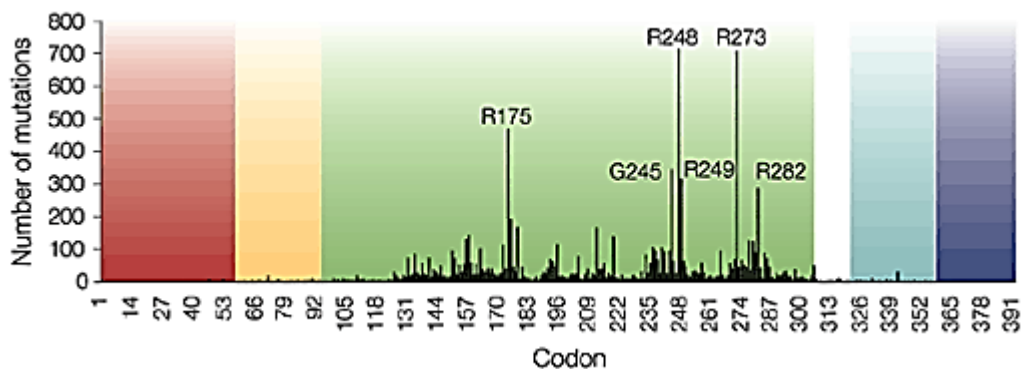


Abb. 47: Häufigkeit und Verteilung der p53 Mutationen.^[212]

2. Zielsetzung

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das Basendiskriminierungspotenzial der Pyrrolidinyl-PNA mithilfe von anorganischen, magnetischen Partikeln dargestellt werden. Hierfür sollte eine zufällig gewählte Sequenz der Pyrrolidinyl-PNA zunächst getestet werden, welche mit Biotin modifiziert ist und somit an Streptavidin beschichtete Fe_xO_y -Partikel immobilisiert werden kann. Als Referenz sollte eine biotinylierte DNA dienen. Das Ziel war es zu zeigen, dass in Anwesenheit zweier DNA-Gegenstränge, die sich in nur einer Base unterscheiden und mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind (Cy3 vs. Cy5), die Pyrrolidinyl-PNA im Vergleich zur DNA mit einer hohen Selektivität den komplementären Strang bindet (siehe Abb. 48).

Anschließend sollten die Experimente einen biologisch relevanten Hintergrund bekommen, wofür Pyrrolidinyl-PNA-Stränge für die „Hot-Spot-Mutationen“ R175H und R248Q des Proteins p53 synthetisiert und hinsichtlich ihres Diskriminierungspotenzials untersucht werden sollten. Um Sequenzabhängigkeiten auszuschließen oder zu erkennen, sollten die natürlichen als auch die mutierten Sequenzen getestet werden.

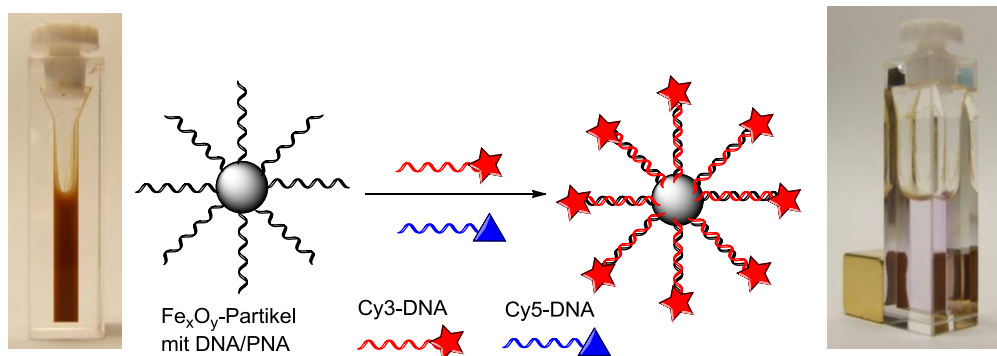


Abb. 48: Schematische Darstellung der Einzelbasendiskriminierung mithilfe von magnetischen Partikeln.

3. Synthese

Die Pyrrolidiny-PNA wurde manuell nach der von *Vilaivan et al.* entwickelten Strategie^[112, 136] an einer aminfunktionalisierten Festphase hergestellt. In der Regel wird die Pyrrolidiny-PNA mit maximal 12 Basen und einem Lysin synthetisiert, um Löslichkeitsprobleme zu vermeiden. Der Mechanismus lässt sich allgemein in drei Schritte gliedern: 1.) Entschützung 2.) Kupplung und 3.) Capping.

Zunächst wird Lysin an die Festphase gebunden. Nach Entfernen der Fmoc-Gruppe werden die Monomerbausteine **7** (B = A, G, C, T) sowie die SS-ACPC β -Aminosäure **8** mithilfe der allgemeinen Syntheseschritte gekuppelt (siehe Abb. 49). Der Guanosinbaustein wird aus synthetischen Gründen nicht als Pentafluorphenylester (pfp) eingesetzt, wodurch die Reagenzien HATU und DIEA für eine erfolgreiche Peptidbindung hinzugegeben werden müssen.

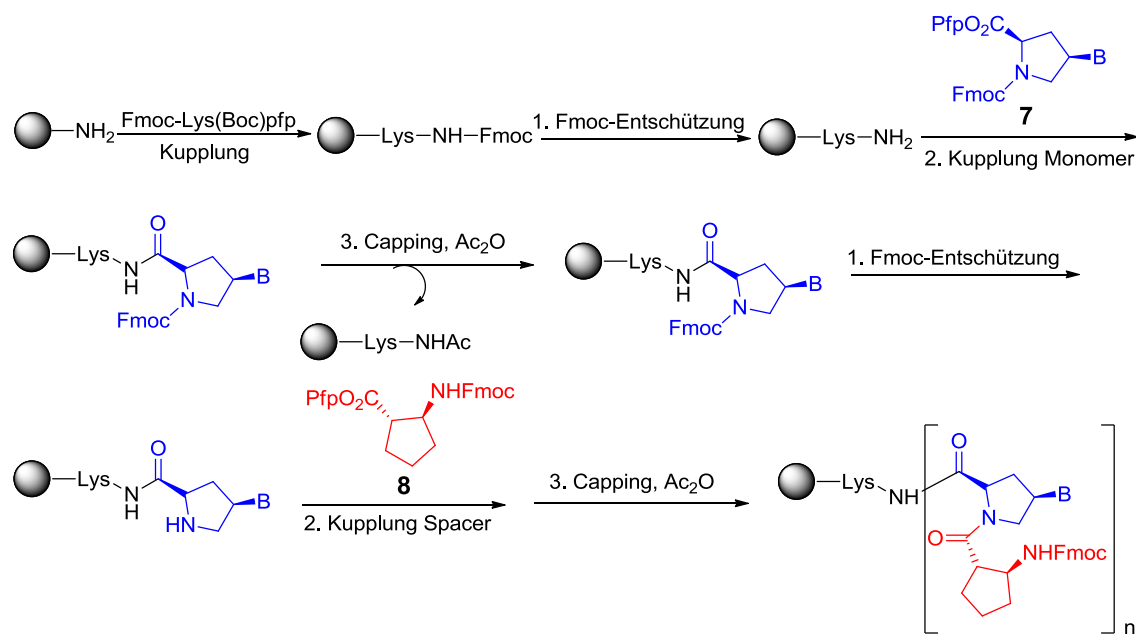


Abb. 49: Schematische Darstellung der Pyrrolidiny-PNA-Synthese Teil 1.

Im Folgenden entspricht die Synthese einem Zyklus (siehe Abb. 50). Bei der Herstellung einer PNA aus 12 Basen werden die Schritte 1.) - 3.) zur Kupplung der einzelnen Monomerbausteine und der β -Aminosäure weitere 22 Mal wiederholt. Mithilfe einer DC-Kontrolle kann stets überprüft werden, ob die jeweiligen Bausteine erfolgreich an die Festphase gebunden werden, da beim Entschützen Dibenzofulvenpiperidin freigesetzt wird, welches bei den Wellenlängen 264 nm und 300 nm der UV-Lampe absorbiert.

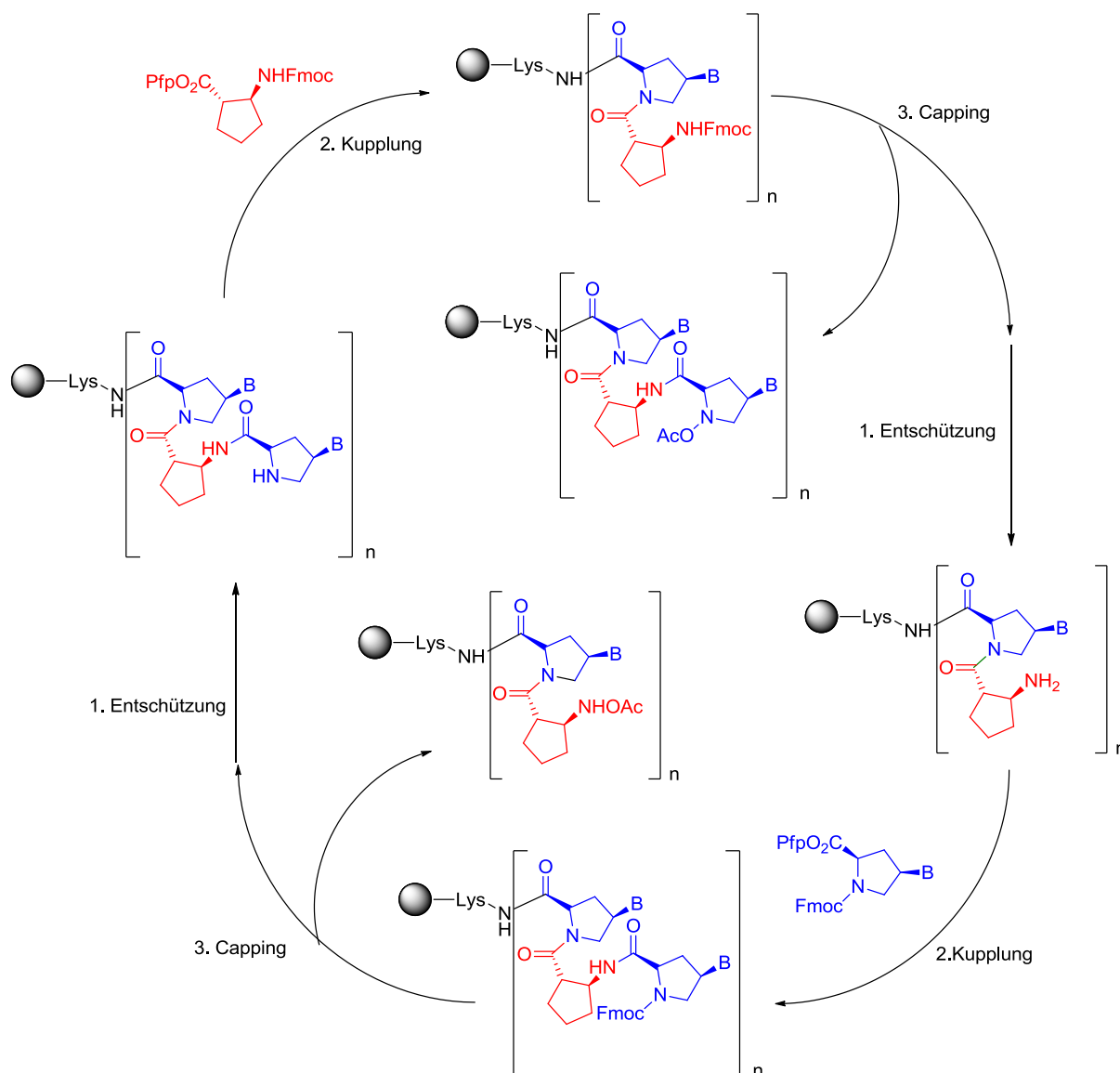


Abb. 50: Schematische Darstellung der Pyrrolidyl-PNA-Synthese Teil 2.

Nachdem die letzte β -Aminosäure an die PNA gebunden wurde, kann der Strang an der Festphase mit Biotin modifiziert werden. Hierfür werden ebenfalls die Schritte 1.) – 3.) verwendet, wodurch zwei Mal der O-Linker **9** zur Vermeidung sterischer Hinderungen und letztendlich Biotin mit der PNA verknüpft wird (siehe Abb. 51).

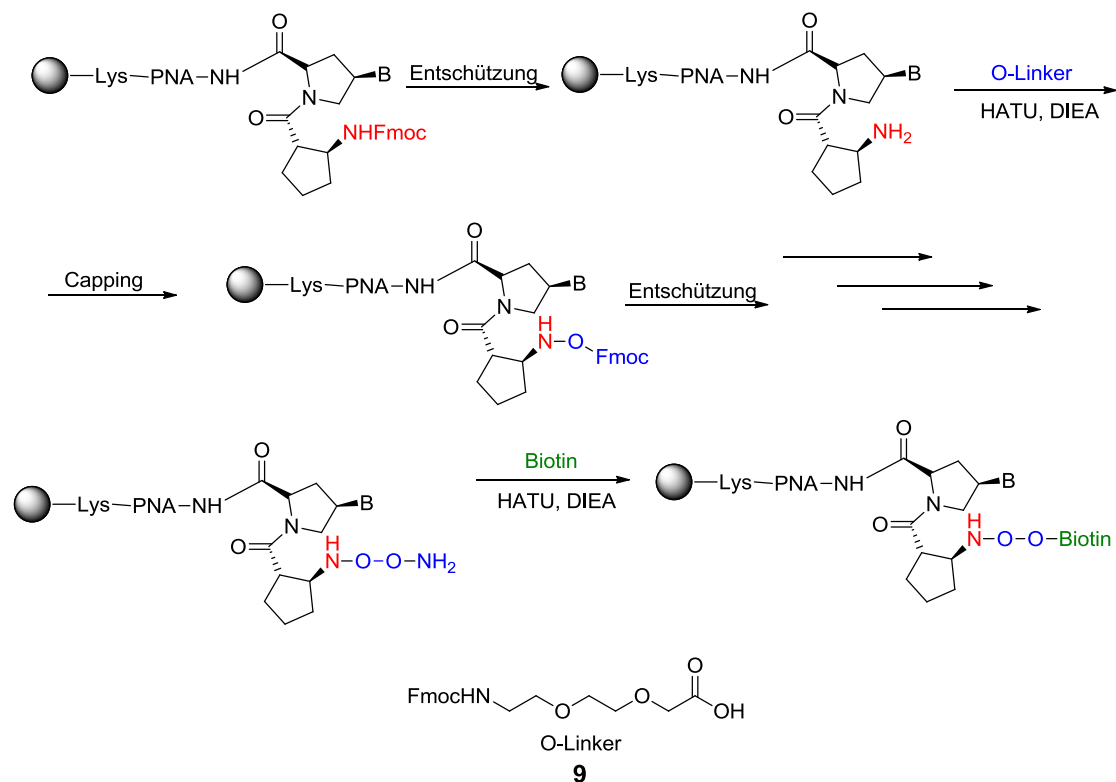


Abb. 51: Schematische Darstellung der Biotinylierung der Pyrrolidinyl-PNA.

Am Syntheseende werden die Schutzgruppen der Monomerbausteine, welche die Aminofunktionen während der Synthese enthalten, unter Verwendung von Dioxan/NH₄OH (1:1) bei 60°C entfernt. Anschließend wird mithilfe von TFA die Pyrrolidinyl-PNA von der Festphase abgespalten, mit Ether gefällt und über RP-HPLC aufgereinigt.

4. Einzelbasendiskriminierung der PNA und DNA im Vergleich

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Einzelbasendiskriminierungspotenziale von PNA und DNA begannen mit willkürlich gewählten Sequenzen (siehe Abb. 52). **PNA1** enthält zwölf Basen und ist über einen kurzen PEG-Linker am N-Terminus mit Biotin modifiziert, wogegen die entsprechende **DNA0** aus 25 Basen besteht und am 5'-Ende eine Biotinmodifikation trägt. Als Gegenstränge wurden eine Cy3-modifizierte, komplementäre **DNA1a** sowie eine Cy5-modifizierte und in einer Base zu unterscheidende **DNA1b** verwendet. Diese enthalten je 15 Basen, womit gewährleistet wird, dass die T_m -Werte mit der längeren **DNA0** und mit der kürzeren **PNA1** vergleichbar sind.

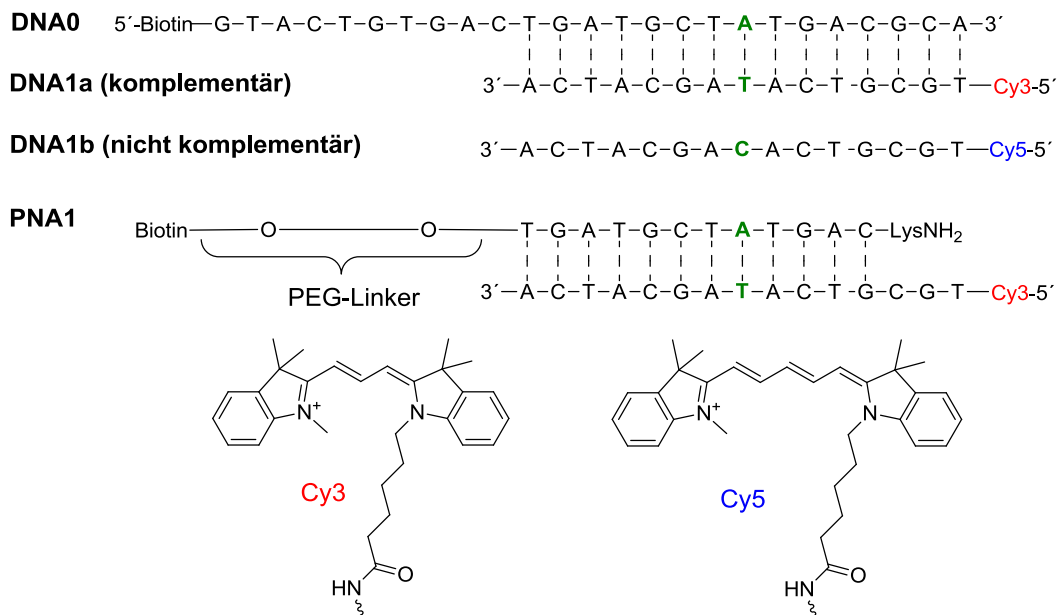


Abb. 52 Sequenzen der biotinylierten **DNA0** und **PNA1**, der modifizierten DNA Gegenstränge sowie die Strukturen des Cy3- und Cy5-Farbstoffs.

Die erfolgreiche Immobilisierung der biotinylierten Oligonukleotide auf den mit Streptavidin beschichteten Fe_xO_y-Partikel konnte durch die Absorptionsabnahme bei 260 nm beobachtet werden (siehe Abb. 53 links). Um sicher zu sein, dass die DNA nicht unspezifisch auf der Partikeloberfläche bindet, wurde in einem vergleichbaren Experiment Cy3-modifizierte und nicht Biotin enthaltene DNA auf die Streptavidin beschichteten Partikel gegeben, wobei keine Absorptionsabnahme des Farbstoffs zu sehen war (siehe Abb. 53 rechts). Dies bestätigt, dass biotinylierte Oligonukleotide tatsächlich durch Ausbildung eines Biotin-Streptavidin-Komplexes auf den Partikeln gebunden werden.

III.4. Einzelbasendiskriminierung der PNA und DNA im Vergleich

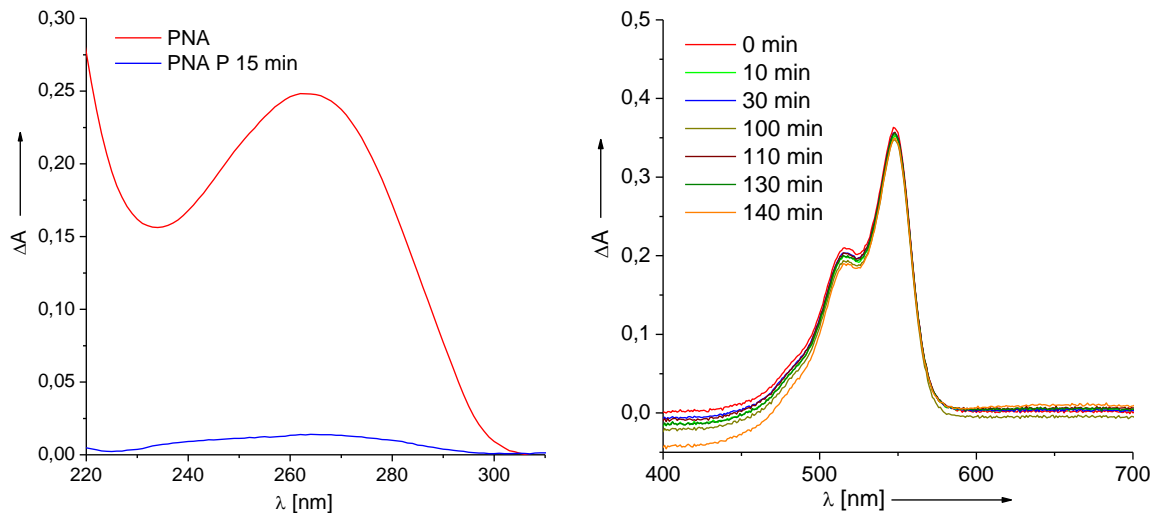


Abb. 53: (Links) Immobilisierung biotinylierter PNA auf Streptavidin beschichtete Fe_xO_y -Partikel (P); (rechts) Kontrollexperiment mit nicht biotinylierter, Cy3-modifizierter DNA (5'-Cy3-TGCGTCATAGCATCA-3') in Anwesenheit von P.

Daraufhin wurden **DNA1a** und **DNA1b** in einem äquimolaren Verhältnis auf die Partikel gegeben. Beide Farbstoffe besitzen sehr hohe Extinktionskoeffizienten, wodurch die Hybridisierung der modifizierten DNA-Stränge mit Absorptionsmessungen nachvollzogen werden kann. Die Ausgangsabsorptionen von Cy3 (550 nm) und Cy5 (645 nm) wurden zu Beginn des Experiments normalisiert, um einen Vergleichswert zur Berechnung der Selektivitäten von **DNA0** und **PNA1** zu erhalten. Die Absorptionsabnahme der Farbstoffe wurde bis zu 60 min nach Zugabe der Partikel bestimmt. Allerdings ist es nicht möglich, die entsprechende quantitative Menge der DNA Gegenstränge zu hybridisieren, was eine limitierte Erreichbarkeit der immobilisierten PNA/DNA verdeutlicht. Mithilfe eines Kontrollexperiments konnte gezeigt werden, dass durch die Oligonukleotidimmobilisierung auf den Partikeln und darauffolgender Hybridisierung der DNA-Gegenstränge die gleiche Duplexmenge auf der Partikeloberfläche erhalten wird (68 %), als wenn zuerst die Duplexe hybridisiert und anschließend auf den Partikeln immobilisiert werden (73 %). Daraus lässt sich folgern, dass sterische Hinderungen verantwortlich sind, welche die quantitative Hybridisierung des Gegenstrangs auf den Partikeln verhindern.

Wie erwartet, konnte **DNA0** nicht zwischen komplementärer **DNA1a** und der in einer Base zu unterscheidenden **DNA1b** diskriminieren. Ferner zeigte sich mit einer Selektivität von 0,6, dass mit einer leichten Bevorzugung die nicht komplementäre **DNA1b** gebunden wurde (siehe Abb. 54). Im Gegensatz dazu konnte unter Verwendung von **PNA1** eine 5-6-fache Selektivität erhalten werden, wodurch das

bessere Einzelbasendiskriminierungspotenzial der PNA im Vergleich zur DNA hervorgeht.

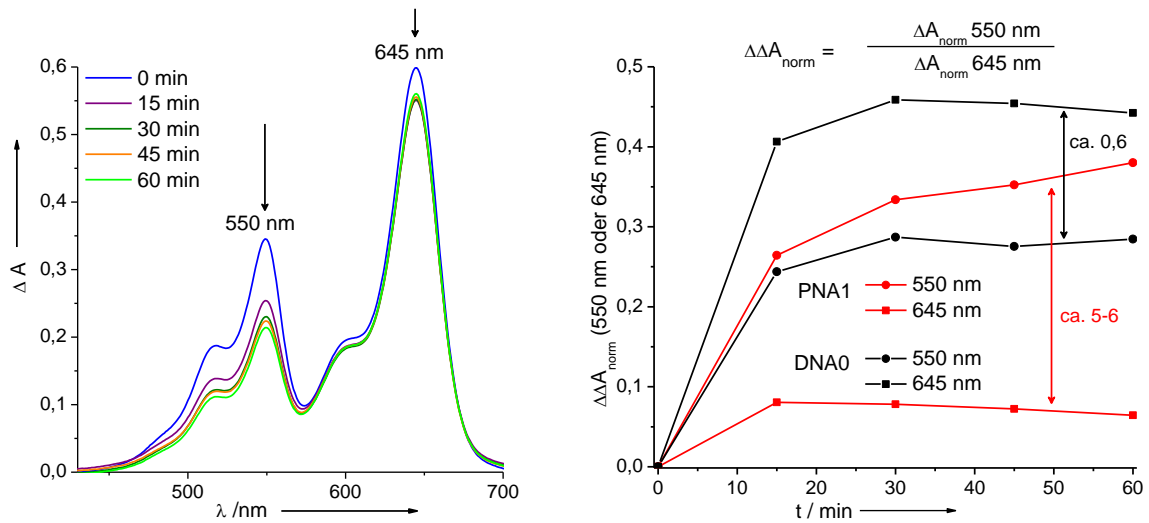


Abb. 54: (Links) UV/Vis-Absorption von **DNA1a-b** während der Hybridisierung mit **PNA1** enthaltenen Fe_xO_y -Partikeln; (rechts) Selektivitäten $\Delta\Delta A_{\text{norm}}$ von **DNA0** und **PNA1** gegenüber der komplementären **DNA1a** und der Einzelbasenfehlpaarung enthaltenen **DNA1b**.

Durch Betrachtung der Schmelztemperaturen der Hybride **PNA1-DNA1a/b** und **DNA0-DNA1a/b** kann dies bestärkt werden (siehe Tabelle 5). Der T_m -Wert des komplementären Duplex **PNA1-DNA1a** ist deutlich höher ($77,5\text{ }^\circ\text{C}$) als der des Hybrids **DNA0-DNA1a** ($63,5\text{ }^\circ\text{C}$). Aufgrund der Tatsache, dass **PNA1** wesentlich kürzer ist als **DNA0**, wird der außerordentlich stabilisierende Effekt durch die Hybridisierung von PNA mit DNA deutlich, welcher in Kapitel III.1.1 erklärt wurde. Darüber hinaus besitzen der komplementäre **PNA1-DNA1a** und der nicht komplementäre **PNA1-DNA1b** Duplex einen T_m -Unterschied von $41,0\text{ }^\circ\text{C}$. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Hybride in nur einer Base unterscheiden, ist dies ein außerordentlich hoher Wert, der vom Verhältnis jedoch mit vorherigen Studien übereinstimmt.^[112, 136]

Tabelle 5: Schmelztemperaturen der PNA-DNA und DNA-DNA Duplexe.

Strang	Match	T_m [$^\circ\text{C}$]	Mismatch	T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔT_m [$^\circ\text{C}$]
DNA0	DNA1a	63,5	DNA1b	52,5	11,0
PNA1	DNA1a	77,5	DNA1b	36,5	41,0

5. Einzelbasendiskriminierung mit PNA in Bezug auf das Protein p53

Zur Synthese der PNA-Stränge entsprechend der Hot-spot-Mutationen R175H (CGC vs. CAC)^[214] und R248Q (CGG vs. CAG)^[214] des Proteins p53 wurden jeweils ein natürlicher als auch ein mutierter Sequenzausschnitt des p53-Gens^[215] mit 12 Basen hergestellt (siehe Abb. 55). **DNA2-5** wurden als Gegenstränge verwendet, die entweder einen komplementären (z.B. **PNA2-DNA2**) oder einen Einzelbasenfehlpaarung enthaltenden Duplex (z.B. **PNA2-DNA3**) ausbilden und darüber hinaus entweder mit Cy3- oder Cy5-modifiziert sind. In allen vier Fällen sind die T_m -Werte der komplementären Duplexe wesentlich höher als die der entsprechenden Duplexe mit Fehlpaarung (siehe Tabelle 6).

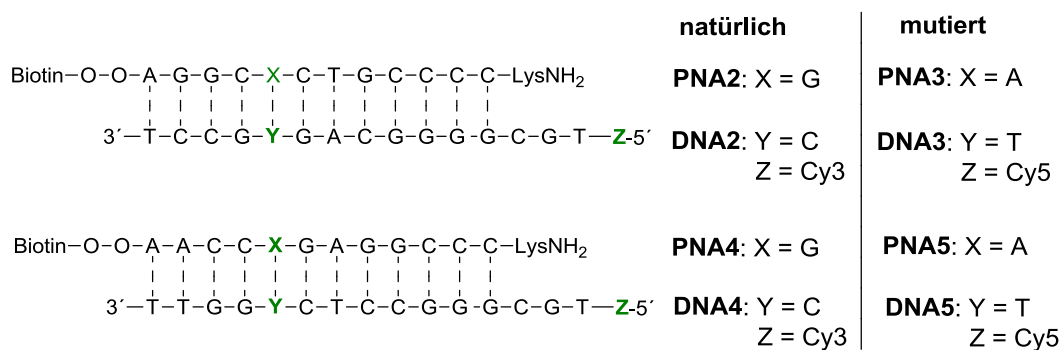


Abb. 55: Sequenzen von **PNA2-5** und von Cy3/Cy5-modifizierter **DNA2-5**.

Die Experimente zur Einzelbasendiskriminierung wurden mit **PNA2-5**, wie in Kapitel III.4 beschrieben, durchgeführt. **PNA3** und **PNA5** konnten erfolgreich diskriminieren und zeigten Selektivitäten mit einem Faktor von 4-5/5-6 gegenüber komplementärer DNA. Im Gegensatz dazu sind die Experimente mit **PNA2** und **PNA4** fehlgeschlagen, da diese Selektivitäten mit einem Faktor von 1 oder sogar weniger aufwiesen (siehe Abb. 56). Bei genauerer Betrachtung wurde festgestellt, dass stets bei der Diskriminierung der Fehlpaarung X = G und Y = T (**PNA2-DNA3**, **PNA4-DNA5**) keine hohe Selektivitäten erhalten wurden als bei X = A und Y = C. Dies spiegelt sich auch in den ΔT_m -Werten wieder, welche bei vorhandenen G-T Fehlpaarungen bei ~15 °C und bei den A-C Fehlpaarungen im Bereich von ~25 - 35 °C liegen. Die ungewöhnlich hohe Stabilität der G-T Hybridisierung ist zwar in der DNA-Chemie bereits bekannt^[216-217], wurde aber mit Hybriden der Pyrrolidiny-PNA bislang noch nicht festgestellt.

Im Grunde gibt es drei wesentliche Aspekte, worin sich die selektiven und unselektiven Experimente unterscheiden. Zum einen der Unterschied in den zu

diskriminierenden Sequenzen. **PNA3/PNA5** sollen zwischen A-T/A-C-Basenpaarung und **PNA2/PNA4** zwischen G-C/G-T Basenpaarung unterscheiden. Des Weiteren sind die ΔT_m -Werte mit **PNA3** und **PNA5** $> 20^\circ\text{C}$, wogegen die T_m -Unterschiede von **PNA2** und **PNA4** kleiner sind. Betrachtet man jedoch die ΔT_m -Werte entsprechender DNA-DNA Duplexe mit gleichen Sequenzen, sind diese stets geringer als die der PNA-DNA Hybride (siehe Kapitel VII.2). Darüber hinaus sind die Modifikationen der komplementären Gegenstränge unterschiedlich. Die selektiven Versuche wurden mit komplementären, Cy3-modifizierten Gegensträngen durchgeführt und für die unselektiven Experimente wurden komplementäre, Cy5-modifizierte Gegenstränge eingesetzt.

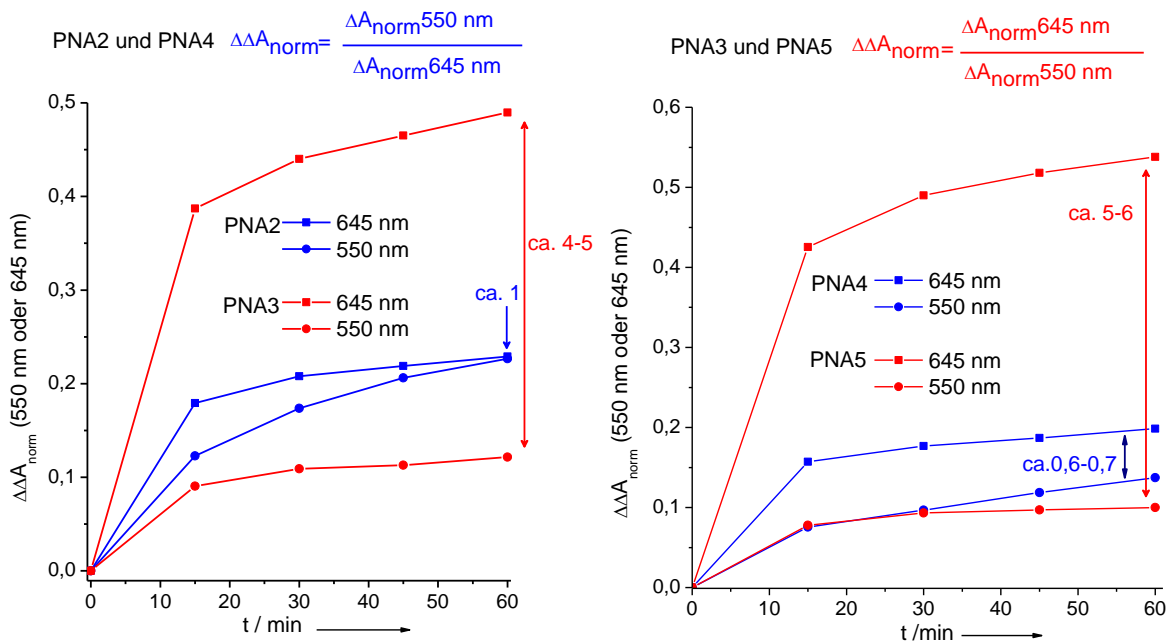


Abb. 56: Selektivitäten $\Delta\Delta A_{\text{norm}}$ von **PNA2/PNA3** (links) und **PNA4/PNA5** (rechts) gegenüber komplementärer und Einzelbasenfehlpaarung enthaltener DNA-Gegenstränge.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Diskriminierungspotenziale aufgrund von Sequenzabhängigkeiten, welche auch die verschiedenen ΔT_m -Werte erklären könnten, oder bedingt durch unerwünschte Farbstoffinteraktionen von Cy3 und Cy5 auftreten.

Dafür wurden die Experimente mit neuen Farbstoffmodifikationen an den DNA-Gegensträngen wiederholt. Dabei wurde der Cy3-Farbstoff in **DNA2/DNA4** durch Atto488 (**DNA6/DNA8**) und die Cy5-Modifikation in **DNA3/DNA5** durch DY649 (**DNA7/DNA9**) ersetzt (siehe Abb. 57). Obwohl Atto488 und DY649 im Vergleich zu den kationischen Cy3 und Cy5 negativ geladen sind, besitzen Atto488 und Cy3 sowie DY649 und Cy5 vergleichbare spektroskopische Eigenschaften. Darüber

hinaus zeigten die T_m -Messungen der entsprechenden PNA-Hybride mit **DNA6-9** ebenfalls vergleichbare Werte wie die zuvor beschriebenen Duplexe mit **DNA2-5** (siehe Tabelle 6).

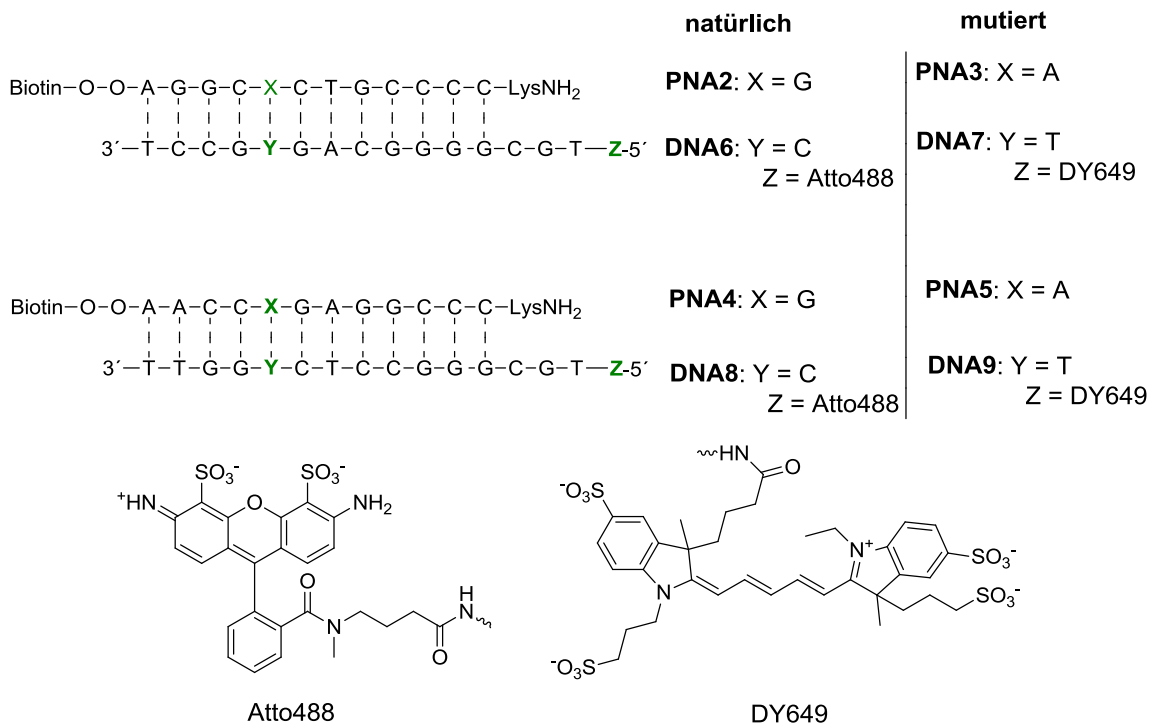


Abb. 57: Sequenzen von **PNA2-5** und von Atto488/DY649 modifizierter **DNA6-9**.

Mithilfe der neuen Farbstoffe gelang es zwar, die Selektivitäten der **PNA3** und **PNA5** von einem Faktor von 4-5/5-6 bereits nach 15 min der Partikelzugabe auf einen Faktor von 9-10/11-12 zu erhöhen. **PNA2** und **PNA4** zeigten jedoch weiterhin keine eindeutige Diskriminierung (siehe Abb. 58 links). Aufgrund der Ergebnisse, dass sich die T_m -Werte durch die neuen Modifikationen nicht im Wesentlichen ändern, haben die Farbstoffe keinen Einfluss auf die Duplexstabilitäten. Dies bestätigten darüber hinaus die T_m -Messungen unmodifizierter PNA-DNA Hybride (siehe Kapitel VII.2). Die Atto488- und DY649-Modifikationen bewirken, wie bereits beschrieben, eine Selektivitätserhöhung. Es liegt nahe, dass diese Beobachtungen auf die negativen Ladungen der Farbstoffe zurückzuführen sind. Aufgrund der positiv geladenen Cy3- und Cy5-Modifikationen können heterodimere und homodimere Interaktionen zwischen den Farbstoffen auftreten, welche die Hybridisierung mit der immobilisierten PNA auf den Partikeln verhindern. Diese excitonischen Wechselwirkungen können durch die Verhältnisse der Farbstoffabsorptionsmaxima bestimmt werden.

Tabelle 6: Schmelztemperaturen der PNA-DNA Duplexe entsprechend des Proteins p53.

Strang	Codon	Match	Codon	T _m [°C]	Mismatch	Codon	T _m [°C]	ΔT _m [°C]
PNA2	C <u>G</u> C	DNA2	G <u>C</u> G	65,1	DNA3	G <u>T</u> G	49,6	15,5
PNA3	C <u>A</u> C	DNA3	G <u>T</u> G	64,1	DNA2	G <u>C</u> G	29,3	34,8
PNA4	C <u>G</u> G	DNA4	G <u>C</u> C	70,7	DNA5	G <u>T</u> C	55,6	15,1
PNA5	C <u>A</u> G	DNA5	G <u>T</u> C	68,8	DNA4	G <u>C</u> C	43,3	25,5
PNA2	C <u>G</u> C	DNA6	G <u>C</u> G	67,4	DNA7	G <u>T</u> G	56,0	11,4
PNA3	C <u>A</u> C	DNA7	G <u>T</u> G	73,9	DNA6	G <u>C</u> G	35,9	38,0
PNA4	C <u>G</u> G	DNA8	G <u>C</u> C	70,5	DNA9	G <u>T</u> C	57,1	13,4
PNA5	C <u>A</u> G	DNA9	G <u>T</u> C	69,4	DNA8	G <u>C</u> C	46,3	23,1

Ein solches Aggregationsverhalten wurde bereits bei Perylenbisimid^[76, 88] und Thiazolorangefarbstoffen^[218-219] festgestellt. Es zeigte sich, dass die Absorptionsverhältnisse von Cy5 bei $\Delta A = 645 \text{ nm}$ und $\Delta A = 601 \text{ nm}$ im Laufe der Diskriminierungsexperimente von **PNA3** und **PNA5** mit **DNA3/DNA2** und **DNA5/DNA4** eindeutig abnehmen (siehe Abb. 58 rechts). Daraus lässt sich folgern, dass die terminal eingebauten Cy5 Modifikationen der Oligonukleotide miteinander aggregieren, wodurch die Stränge für die Hybridisierungsexperimente unzugänglich werden. Im Vergleich dazu konnten bei den negativ geladenen Atto488 und DY649 diese Farbstoffinteraktionen nicht beobachtet werden (siehe Abb. 58 rechts).

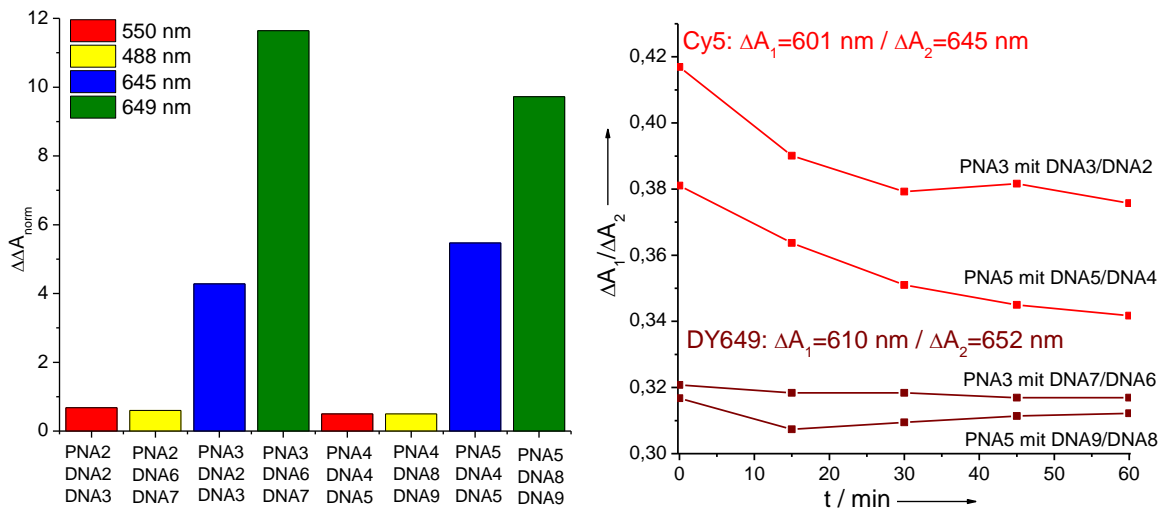


Abb. 58: (Links) Selektivitäten $\Delta\Delta A_{norm}$ von **PNA2-5** gegenüber der komplementären DNA-Gegenstränge unter Verwendung der Cy3/Cy5 und Atto488/DY649 Farbstoffkombinationen; (rechts) Absorptionsverhältnisse des Cy5 und des DY649 Farbstoffs im Verlauf der Diskriminierungsexperimente mit **PNA3** und **PNA5**.

Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass die Diskriminierungsunterschiede von **PNA2/PNA4** und **PNA3/PNA5** auf Sequenzabhängigkeiten zurückgeführt werden

können, welche aufgrund der hohen Stabilität der G-T Fehlpaarung vorhanden sind.^[216] Darüber hinaus ermöglichen die negativ geladenen Farbstoffe Atto488 und DY649 eine vollkommene reversible Hybridisierung der modifizierten DNA-Stränge mit der auf den magnetischen Partikeln immobilisierten PNA (siehe Abb. 59). Das bedeutet, dass durch Aufheizen auf 80 °C die ausgebildeten Duplexe auf den Partikeln vollständig dehybridisiert werden, was an den steigenden Absorptionsintensitäten der Farbstoffe beobachtbar ist. Durch anschließendes Abkühlen bilden sich die Duplexe wieder aus, das durch eine Absorptionsabnahme erkennbar wird. Diese Beobachtungen konnten mit den entsprechenden Cy3- und Cy5-Modifikationen allerdings nicht gezeigt werden (siehe Abb. 59). Dies bestätigt ebenfalls die Interpretation, dass die negativen Ladungen Farbstoffinteraktionen verhindern und dadurch die selektive Einzelbasendiskriminierung beeinflussen.

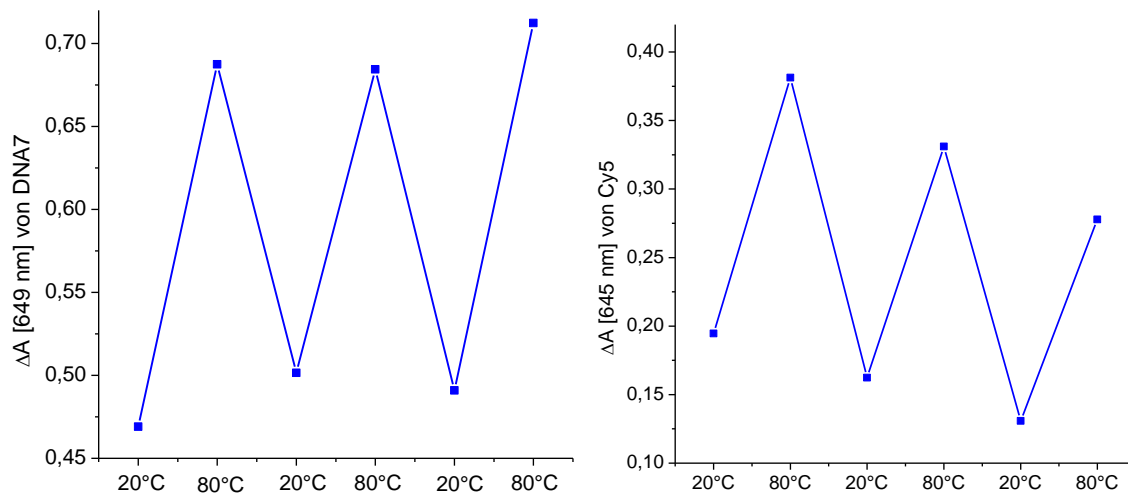


Abb. 59: Reversible Hybridisierung von **DNA7** (links) und einer Cy5 modifizierten DNA (5'-Cy5-GGGCAGTGCCT-3') (rechts) unter Verwendung von **PNA3** enthaltenen Fe_xO_y Partikel.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Pyrrolidinyl-PNA im Vergleich zur DNA besser in der Lage ist, Einzelbasenfehlpaarungen mit DNA Gegensträngen zu diskriminieren. Biotinylierte Pyrrolidinyl-PNA wurde dabei auf Streptavidin beschichtete, magnetische Fe_xO_y -Partikel immobilisiert, welche für die reversiblen Diskriminierungsexperimente eingesetzt wurden. Die Bestimmung der jeweiligen Selektivitäten konnte aufgrund der Farbstoffmodifikationen der DNA-Gegenstränge mithilfe der Absorptionsspektroskopie erfolgen. Bezüglich der „Hot-Spot-Mutationen“ R175H und R248Q des Proteins p53 wurden, unter Verwendung negativ geladener Farbstoffe, Selektivitäten der Pyrrolidinyl-PNA mit einem Faktor von 10-12 erreicht. Aufgrund der Tatsache, dass es sich hierbei um lineare PNA-Proben mit 12 Basen handelt, sind diese Werte bemerkenswert. Die Fähigkeit der Oligonukleotide zwischen einer einzelnen Basenfehlpaarung diskriminieren zu können, scheint durch thermodynamischen Antrieb und den dadurch bedingten hohen PNA-DNA Stabilitäten möglich zu sein. Allerdings sind ΔT_m -Werte von mehr als 20 °C notwendig, um eine eindeutige Selektivität gegenüber komplementärer DNA erhalten zu können. Im Falle der G-T Fehlpaarung erhält man mit der Pyrrolidinyl-PNA kleinere T_m -Unterschiede. Daraus lässt sich folgern, dass die Pyrrolidinyl-PNA im Vergleich zur DNA zwar eine bessere Einzelbasendiskriminierung besitzt, diese jedoch aufgrund von relativ stabilen G-T Fehlpaarungen sequenzabhängig ist.

IV. Monobenzyklooptin als DNA-Baustein für die kupferfreie „Click“-Reaktion

1. Theoretischer Hintergrund

1.1. Die „Click“-Chemie zur postsynthetischen DNA-Modifizierung

Im Jahr 2001 stellte *Sharpless* ein neues Synthesekonzept vor, welches er als „Click“-Chemie bezeichnete.^[220] Mit diesem Begriff wollte er alle Reaktionen beschreiben, auf die man sich, wie durch ein wahrzunehmendes imaginäres Geräusch (Klick), verlassen kann und welche dabei bestimmte Eigenschaften erfüllen. Sie sollen modular und breit anwendbar sein, stereospezifisch ablaufen, hohe Ausbeuten erzielen und darüber hinaus keine störenden oder schwer abtrennbaren Nebenprodukte generieren.^[221] In diesem Zusammenhang wurde die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen, welche bereits in den 60er Jahren von *Huisgen* genauer untersucht wurde^[222], wieder ins Leben gerufen. *Meldal*^[223] und *Sharpless*^[224] entdeckten fast zeitgleich, dass durch Verwendung eines Cu-Katalysators eine schnelle und auch regioselektive Umsetzung der Reaktion (CuAAC; *Cu-azide-alkyne-cycloaddition*) möglich ist, wodurch die Eigenschaften einer „Click“-Reaktion optimal erfüllt werden.^[225] Aufgrund der vorhandenen Bioorthogonalität der Azid- und Alkinfunktionalitäten sowie der hohen Stabilität des entstehenden Triazolrings konnte diese Methode zur Modifikation zahlreicher Biomoleküle verwendet werden.^[226-231] Demzufolge gelang es der CuAAC-Methode, bis heute dem bekanntesten Beispiel einer „Click“-Reaktion zu entsprechen.^[232]

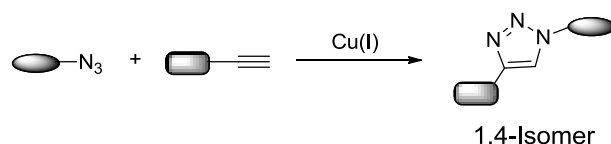


Abb. 60: Schematische Darstellung der CuAAC-Reaktion.

Die Anwendung der CuAAC zur DNA-Modifizierung war zunächst limitiert. Der Grund waren die durch Anwesenheit von Cu-Ionen verursachten DNA-Schäden, welche in den meisten Fällen zu Strangbrüchen führen.^[233-234] Dieses Problem konnte durch die Einführung eines TBTA (*T*ris(*b*enzyl*t*riazolyl*m*ethyl)*a*min)-Liganden gelöst werden, welcher Cu(I) stabilisiert sowie vor Oxidation und Disproportionierung schützt und darüber hinaus die katalytische Aktivität steigert.^[232, 235] *Carell et al.*

entwickelte daraufhin eine „Click“-Methode zur postsynthetischen DNA-Modifizierung, welche die Verknüpfung einer alkinfunktionalisierten DNA mit einem azidfunktionalisierten Baustein ermöglicht.^[232, 236-237] Hierbei ist es wichtig die Alkinfunktionalität in die DNA zu inkorporieren, da das Azid während der DNA-Synthese mit Phosphor(III) reagieren würde (Staudinger Ligation).^[238] Die Alkinfunktionalisierung erfolgt bevorzugt an der 5-Position der Pyrimidine^[239-240], an der 7-Position der 7-Deazapurine^[241], welche die natürlichen Purine ersetzen, sowie an der 2'-Position der Zuckerbausteine.^[242] Mittlerweile hat sich das „Click“-Konzept zur postsynthetischen DNA-Modifizierung längst etabliert und ist von großer Bedeutung in biomedizinischen Anwendungen wie in der Genanalyse, im Genom-Screening oder in der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung. Außerdem sind vor allem fluoreszenzmarkierte DNA-Stränge von besonderem Interesse, die beispielsweise in sog. FISH-Tests (*Fluorescence in situ hybridization*) in der Karzinomdiagnostik eingesetzt werden können.^[243]

Obwohl die CuAAC im Bereich der Nucleinsäurechemie sehr effektiv ist und einen breiten Anwendungsbereich findet, stellt die Zytotoxizität von Kupfer ein entscheidendes Problem dar. Aufgrund von verbleibenden Cu-Ionen der postsynthetisch modifizierten Oligonukleotide sind die *in vivo* Anwendungen limitiert.^[244] Ein weiterer entscheidender Nachteil ist, dass trotz Einsatz eines TBTA-Liganden die Gefahr von Cu-katalysierten DNA-Schäden in geringem Ausmaß besteht bleibt und dadurch die Reaktion stets unter Sauerstoffausschluss ablaufen sollte. Aus diesem Grund wird nach äquivalenten Reaktionen gesucht, welche keinen Metallkatalysator benötigen und für die postsynthetische DNA-Modifizierung verwendet werden können.^[245]

1.2. Kupferfreie „Click“ Reaktionen zur Biokonjugation

Zunächst wurde versucht, die Cu-katalysierte 1,3-dipolare Zykoaddition (CuAAC) zu optimieren, indem man die Alkinfunktionalitäten mit elektronenziehenden Substituenten aktivierte. Dadurch gelang es zwar, die Reaktion ohne Einsatz eines Cu-Katalysators mit hohen Ausbeuten und unter milden Bedingungen durchzuführen, jedoch blieb die DNA-Anwendung aufgrund von auftretenden Michael-Additionen mit biologischen Nucleophilen weiterhin limitiert.^[246]

Bertozzi et al. entwickelte einen alternativen Weg zur Alkinaktivierung, welcher auf der Verwendung von gespannten Alkinen basiert und somit für die [3+2]-Zykoaddition mit Aziden ohne Katalysator oder anderen Hilfsmitteln eingesetzt werden kann (SPAAC; *Strain-promoted-azide-alkyne-cycloaddition*).^[16]

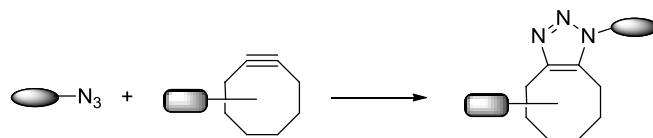


Abb. 61: Schematische Darstellung der SPAAC-Reaktion.

Bereits 1961 berichteten *Wittig* und *Krebs*, dass Cyclooctine, die kleinstmöglichen und stabilen Cycloalkyne, äußerst stark mit Phenylaziden zu Triazol reagieren.^[247] Die Zyklisierung in Cyclooctin führt zu einer deformierten Acetylenbindung mit einem Winkel von 163°,^[248] was in etwa 18 kcal/mol Ringspannung entspricht.^[249] Aufgrund dieser Destabilisierung im Grundzustand im Vergleich zum Übergangszustand der Reaktion können Cyclooctine mit einem erheblichen Reaktionsantrieb mit Aziden bei Raumtemperatur umgesetzt werden.^[250] Folglich gelang es, Biomoleküle mit der SPAAC-Methode zu modifizieren, die in Zellexperimenten keine Zytotoxizität mehr aufwiesen.^[16] Allerdings sollte die Reaktionskinetik durch die Substitution von elektronenziehenden Gruppen gesteigert werden, um bessere Ausbeuten zu erhalten.^[251] *Bertozzi et al.* wählte diesbezüglich Difluormethylen, was gegenüber biologischen Systemen inert ist und somit nicht als elektrophiler Michaelakzeptor für biologische Nucleophile fungieren kann.^[252] Im Bereich der Kohlenhydratchemie wurde unter der Verwendung von Difluorzyklooctin (DIFO) eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Aziden erhalten.^[253] *Boons et al.* dagegen untersuchte Dibenzozyklooctin (DIBO) zur Modifizierung von Glykoproteinen, dessen Ringspannung aufgrund der vorhandenen aromatischen Ringe erhöht wird.^[254] Diese

Verbindung besitzt eine vergleichbare Reaktivität mit DIFO^[255] und ist zusätzlich synthetisch leichter zugänglich.

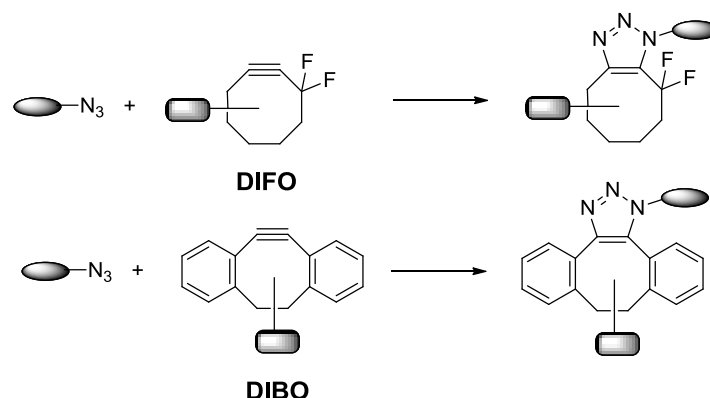


Abb. 62: Schematische Darstellung von DIFO (oben) und DIBO (unten) in der SPAAC-Reaktion.

Anschließend war das Ziel, Zyklooctinderivate in der DNA-Chemie einzusetzen, um somit DNA-Stränge kupferfrei modifizieren zu können. *Taton et al.* inkorporierte DIBO als Phosphoramidit terminal in die DNA,^[256] wogegen *Brown et al.* den Baustein als Oligonukleotidderivat einbaute.^[245] Dabei verknüpfte er DIBO entweder über einen Aminoethoxylinker an die 2'-Position der Ribose oder über einen Propargyllinker an die 5-Position von Thymin (siehe Abb. 63).^[245] Die SPAAC-Reaktion von DIBO mit einem Azid führt zu einem Gemisch aus vier Stereoisomeren. Aus diesem Grund integrierte Brown et al. weiterführend ein Zyklopropylzyklooctinderivat (BCN, *Bicyclo[6.1.0]nonyn*) (siehe Abb. 63), das vergleichbar schnell wie DIBO mit Aziden reagiert und darüber hinaus nur zwei Enantiomere als Produkt liefert.^[245]

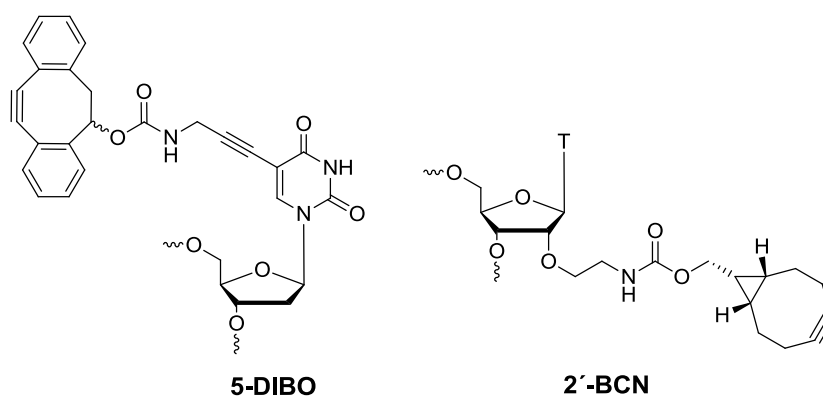


Abb. 63: (Links) DIBO- und (rechts) BCN-Oligonukleotid zur SPAAC-Reaktion in der DNA.

Eine weitere bioorthogonale Reaktion zur DNA-Modifizierung ohne Verwendung von Cu ist die inverse Diels-Alder-Reaktion (invDA) von Tetrazinen mit trans-Zyklooctenderivaten (siehe Abb. 64).^[257] Von allen bislang untersuchten Cu-freien Reaktionsmethoden zur Biokonjugation besitzt die invDA die höchsten

Reaktionskinetiken^[258]. Im Rahmen dieser Arbeit wird allerdings nicht weiter im Detail auf diese Reaktion eingegangen.

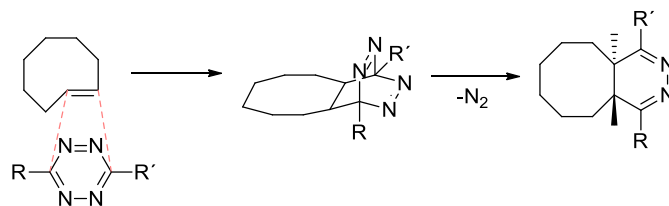


Abb. 64: Schematische Darstellung der invDA-Reaktion von Tetrazin mit trans-Zykloolefinen.

Nichtsdestotrotz ist die Verwendung von Aziden als reagierende Funktionalitäten aufgrund der kleinen Größe sowie der Tatsache, dass sie in biologischen Medien nahezu nie vorhanden^[259-260] sind, außerordentlich ansprechend. Aus diesem Grund ist man auf der Suche nach weiteren Zykloolefinderivaten, welche zur Biokonjugation und in der DNA-Chemie mithilfe der SPAAC verwendet werden können und darüber hinaus eine vergleichbare Reaktionskinetik wie CuAAC besitzen.

1.3. Monobenzylolefin für die kupferfreie „Click“-Reaktion

Houk et al. stellte eine Verzerrungs-/Interaktionstheorie zur Reaktivität der kupferfreien 1,3-dipolaren Zykoaddition auf, welche einen entscheidenden Einblick über die Reaktionskinetiken der SPAAC-Reaktionen liefert.^[261] Diese besagt, dass die Verzerrungsenergie, welche für die Verformung des 1,3-Dipols und dem dipolarophilen Reaktanden im Übergangszustand verantwortlich ist, im Gegensatz zu Grenzorbitalwechselwirkungen oder thermodynamischen Parametern die Reaktionsbarriere kontrolliert. In Abb. 65 sind die Verhältnisse der Aktivierungsenergie (ΔE^\ddagger), der Verzerrungsenergie (ΔE_d^\ddagger) und der Interaktionsenergie (ΔE_i^\ddagger) der Komponenten in der biomolekularen Reaktion von Azid und Acetylen dargestellt. Folglich lässt sich die Aktivierungsenergie aus der Summe der destabilisierenden Verzerrungen und der stabilisierenden Interaktionen berechnen ($\Delta E^\ddagger = \Delta E_d^\ddagger + \Delta E_i^\ddagger$).^[262]

Der Reaktivitätsanstieg der Verbindung DIFO kann dadurch erklärt werden, dass die Fluorierung zu Ladungstransferinteraktionen führt, was sowohl eine Abnahme der Verzerrungsenergie als auch einen Anstieg der Interaktionsenergie mit sich bringt. Letztendlich wird eine Herabsetzung der Aktivierungsenergie erhalten.^[262]

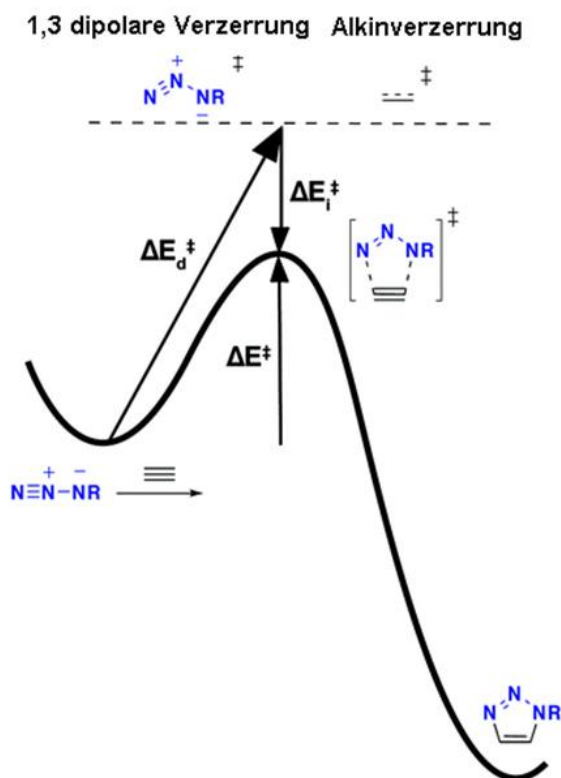


Abb. 65: Verhältnisse der Aktivierungsenergie, der Verzerrungsenergie und der Interaktionsenergie der Azid-Alkin-Zykloaddition.^[262]

Darüber hinaus stellte *Gobbard et al.* fest, dass die Reaktionskinetik von DIBO durch zwei sich entgegenwirkenden Faktoren beeinflusst wird.^[263] Auf der einen Seite führen die Arylringe zu einer erhöhten Ringspannung, welche die Reaktivität steigern. Allerdings werden diese wiederum von unerwünschten sterischen Interaktionen, wie z.B. von 1,3-diaxialen Wechselwirkungen (A-1,3-Spannung), negativ beeinflusst.^[264] Basierend auf diesen Ergebnissen sollten die reaktivitätssteigernden Faktoren von DIFO und DIBO miteinander kombiniert werden. *Bertozzi et al.* synthetisierte daraufhin einen Zyklooctinbaustein mit nur einem Benzolring, um sterische Probleme zu vermeiden, und modifizierte diesen zusätzlich mit Fluorid (DIFBO, Difluorbenzozyklooctin), was zum Erhalt einer optimalen Reaktionskinetik führen sollte. Allerdings ist dieser Baustein so reaktiv, dass er spontan zu zwei asymmetrischen Produkten trimerisiert (siehe Abb. 66).^[264]

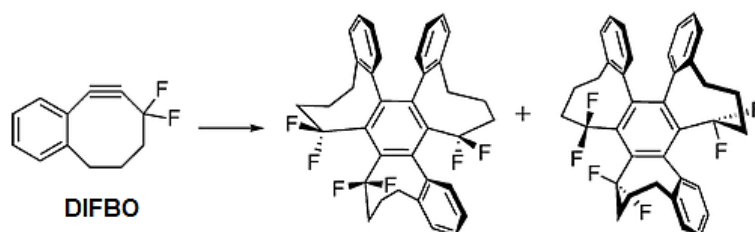


Abb. 66: Asymmetrische Trimerisierung von DIFBO.^[264]

Um jedoch die Balance zwischen Aktivität und Reaktivität zu halten, entwickelte *Kele et al.* ein Monobenzyklooctinderivat (COMBO, Carboxymethylmonobenzyklooctin) (siehe Abb. 67), welches einen Benzolring an der 5-6-Position enthält. Entsprechend der Theorie von *Gobbard et al.*^[263] wurde erwartet, dass COMBO eine vergleichbare Ringspannung wie DIBO aufweist, dessen Reaktivität aber weniger von sterischen Problemen beeinflusst wird.^[265]

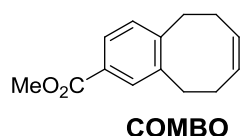


Abb. 67: Darstellung des Monobenzyklooctinderivat COMBO.

Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstanten 2ter Ordnung (k_2) der verschiedenen Zyklooctinderivate in der SPAAC-Reaktion mit Benzylazid, so weist COMBO im Vergleich zu DIFO^[253] und DIBO^[266] ein um den Faktor drei bzw. fünf höheren Wert auf. Darüber hinaus erhält man im Vergleich zu dem entsprechende fluorierten Regioisomer DIFBO^[264] eine vergleichbare Geschwindigkeitskonstante (siehe Tabelle 7) mit dem Vorteil, dass COMBO wegen der fehlenden Fluoridgruppen nicht trimerisieren kann. Aufgrund der Tatsache, dass fluorierte Verbindungen in der Regel eine höhere Reaktivität zeigen, sind die ähnlichen Werte von COMBO und DIFBO relativ überraschend. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die π -Orbitale der Dreifachbindung von COMBO mit den σ -Orbitalen des Zyklooctinrings hyperkonjugieren können, wodurch die Grenzorbitalwechselwirkungen erhöht werden bzw. die Interaktionsenergie steigt. Darüber hinaus besitzt COMBO im Vergleich zu DIFBO aufgrund der Arylmodifikation an der 5-6-Position eine höhere Ringspannung im Grundzustand, wodurch bereits eine ähnliche Struktur zum Übergangszustand vorhanden ist. Diese Faktoren führen dazu, dass DIFBO und COMBO im Schnitt die gleiche Reaktivität besitzen.^[265]

Tabelle 7: Geschwindigkeitskonstanten 2ter Ordnung (k_2) der verschiedenen Zyklooctinderivate in der Reaktion mit Benzylazid im Vergleich.

	DIFBO	DIFO	DIBO	COMBO
k_2 [$M^{-1} s^{-1}$]	0,22	0,88	0,05	0,24

Folglich sind die Vorteile von COMBO, dass durch Entfernen der Fluoridgruppen die synthetischen Schritte reduziert werden können. Darüber hinaus ist COMBO eine

stabile Verbindung, die zusammen mit ihrer hohen Reaktivität, der vorhandenen kleinen Größe und der geringen Lipophilie ein wichtiges bioorthogonales Reagenz darstellt. Diesbezüglich konnte es bereits erfolgreich mit Fluoreszein verknüpft und anschließend in Zellbildungsexperimenten eingesetzt werden.^[265] Das Ziel ist es folglich, COMBO für weitere Biokonjugationen wie beispielsweise zur kupferfreien, postsynthetischen DNA-Modifizierung zu verwenden.

2. Zielsetzung

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte COMBO als Oligonukleotidderivat in die DNA inkorporiert und anschließend kupferfrei mit einem azidfunktionalisierten Chromophor modifiziert werden.

Diesbezüglich war zunächst das Ziel eine Strategie zur Synthese eines 2'-Desoxyuridinbausteins, welcher an der 5-Position über einen Propargyllinker mit COMBO modifiziert ist, zu entwickeln (5-COMBO). Anschließend sollte der Baustein mithilfe der automatisierten Phosphoramiditmethode in die DNA eingebaut werden. Nach einer postsynthetischen SPAAC-Modifikation mit einem stark fluorogenen und solvatochromen Farbstoff sollten die spektroskopischen Eigenschaften des Fluorophors im DNA-Einzelstrang sowie im Doppelstrang untersucht werden.

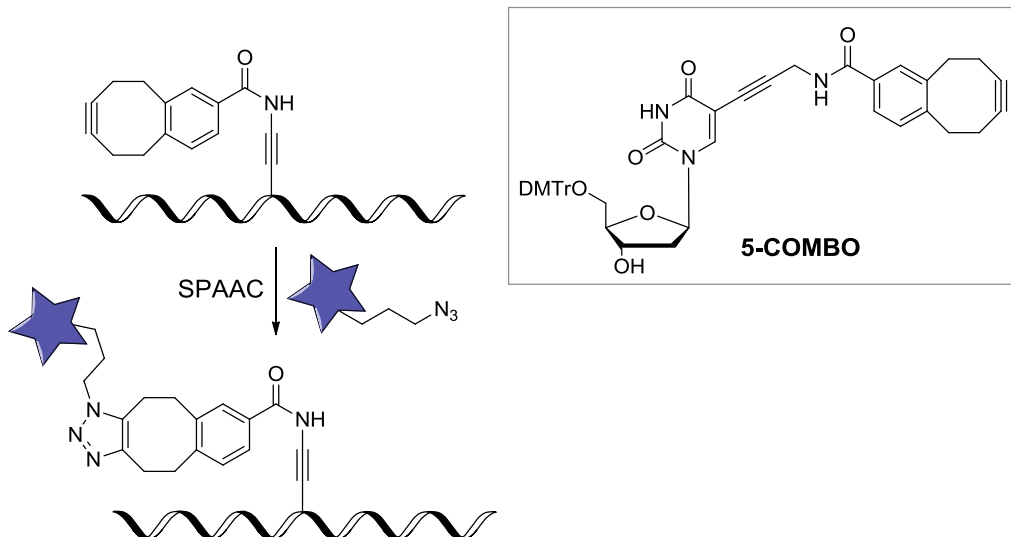


Abb. 68: Schematische Darstellung der Inkorporation von COMBO in die DNA sowie der postsynthetischen kupferfreien DNA-Modifizierung.

3. Synthese

3.1. Synthese des COMBO-Nukleotids

Die Synthese des COMBO modifizierten Oligonukleotids beginnt mit einer Sonogashira-Kupplung von DMT-geschütztem 5-Iod-2'-desoxyuridin **10**^[267] und Trifluorpropinacetamid **11**,^[268] wobei das reine Produkt **12** mit einer Ausbeute von 41 % erhalten wurde.^[269] Edukt und Produkt konnten aufgrund sehr ähnlicher R_f -Werte nur schwer mittels Flash-Chromatographie voneinander getrennt werden, was einen möglichen Ausbeuteverlust erklärt. Anschließend wurde die Aminfunktionalität in konz. NH_4OH mit einer Ausbeute von 71 % entschützt (**13**).^[270] Daraufhin erfolgte eine Peptidkupplung mit der COMBO-Säure **14** nach den von *Kele et al.* bereits veröffentlichten Bedingungen^[265] und einer Ausbeute von 65 %. Letztendlich konnte 5-COMBO **15** zum Phosphoramidit **17** mit DIPEA und dem Reagenz **16** in abs. DCM umgesetzt werden, welches anschließend mithilfe der standardisierten Methode in die DNA eingebaut wurde.

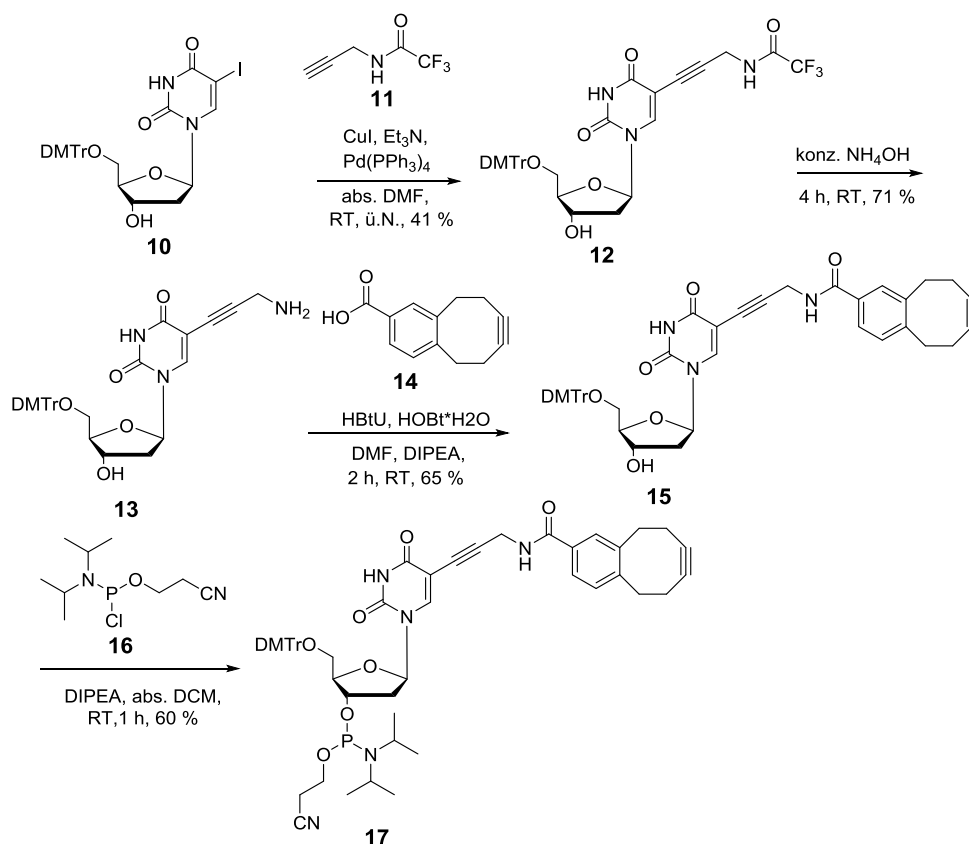


Abb. 69: Syntheschema des COMBO-modifizierten Oligonukleotids.

3.2. Kupferfreie „Click“-Reaktion

Die COMBO-modifizierte **DNA10** wurde zunächst mithilfe der RP-HPLC gereinigt, bevor diese für die kupferfreie „Click“-Reaktion verwendet wurde (siehe Abb. 70). **DNA10** und der Chinolin-Styryl-Cumarin Azidfarbstoff **18**^[271] wurden in ein Gemisch aus DMSO/H₂O (1/10) gegeben, wobei sofort ein Farbwechsel von rosa zu blau zu sehen war, was auf eine schnelle Reaktionskinetik hindeutet. Nach 3 h erfolgte die Ausbeutenbestimmung von **DNA11** während der RP-HPLC-Reinigung. Hierbei konnte durch Integrieren der Signale eine Ausbeute von 80 % bestimmt werden.

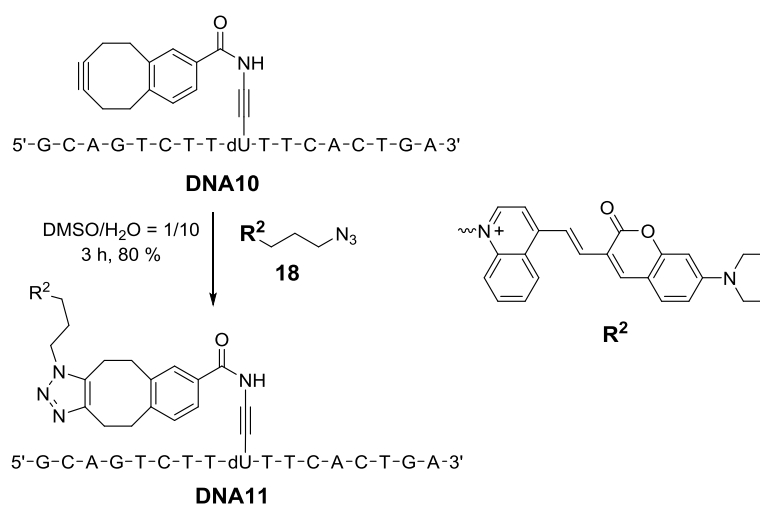


Abb. 70: Syntheschema der kupferfreien „Click“-Reaktion mit COMBO-modifizierter DNA.

4. Spektroskopische Untersuchung

Die modifizierte **DNA11** wurde mithilfe der Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert. Das Absorptionsmaximum des freien Farbstoffs **18** verschiebt sich im DNA-Einzelstrang von 535 nm zu 584 nm. Darüber hinaus erhält man ein ins blau verschobenes Emissionsmaximum ($\lambda_{Em} = 717$ nm) mit einem Fluoreszenzanstieg um den Faktor 130 (siehe Abb. 71).

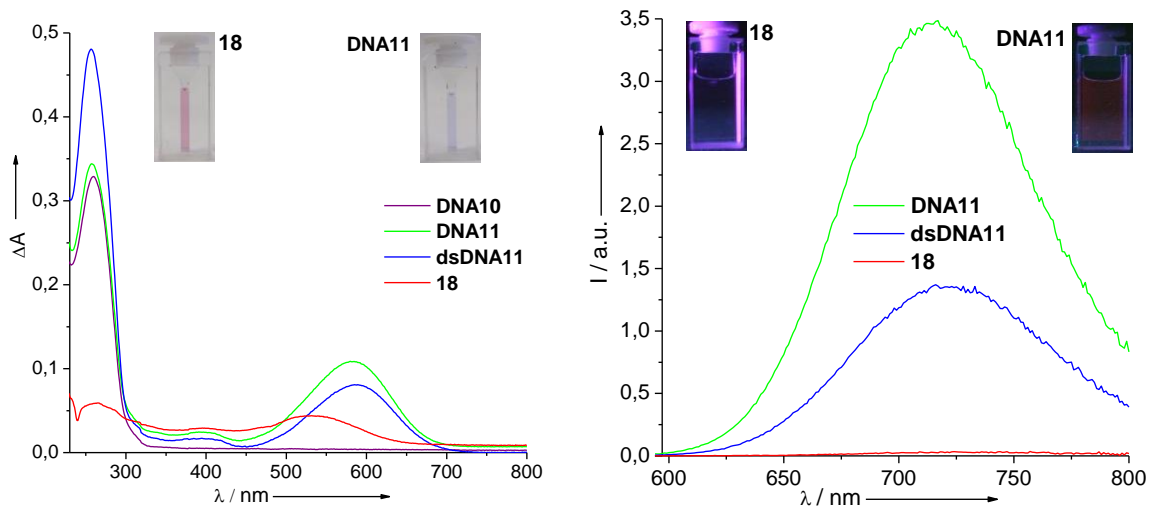


Abb. 71: (Links) UV-Vis-Absorption und (rechts) Fluoreszenz von **DNA10** (2,5 μM), dem Farbstoff **18** (2,3 μM in H_2O + 10 % DMSO) und der modifizierten **DNA11** (2,3 μM) im Einzelstrang sowie im Doppelstrang (**dsDNA11**); DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, pH = 7, 250 mM NaCl.

Um das Verhalten von **18** in DNA erklären zu können, wurden die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs in einer Polaritätsreihe von Nitrilen ($\text{MeCN} \rightarrow \text{DCN}$) untersucht (durchgeführt von *Gergely Cserép, Kele et al.*). Dabei wurde mit sinkender Polarität eine Rotverschiebung in der Absorption sowie eine Blauverschiebung in der Fluoreszenz beobachtet (siehe Abb. 72). Daraus lässt sich folgern, dass die spektroskopischen Änderungen des Farbstoffs in der DNA aufgrund einer weniger polaren Umgebung entstehen. In einem hydrophoberen Umfeld werden die Franck-Codon-Zustände verschoben, was zu einer Reduktion der *Internal Conversion* und letztendlich zu einem Fluoreszenzanstieg führt.^[272] Darüber hinaus war zu erwarten, dass der Farbstoff im wässrigen Medium, welches das Standardmilieu von DNA-Lösungen entspricht, mit den Wassermolekülen interagiert und dies einen Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften hat. Löst man den freien Farbstoff in Acetonitril und erhöht schrittweise den Wasseranteil, so erhält man eine Blauverschiebung mit steigendem Extinktionskoeffizienten in der Absorption als

auch eine Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute. Aufgrund der Farbstoffinteraktionen mit den DNA-Basen sind die Wechselwirkungen mit Wasser reduziert.

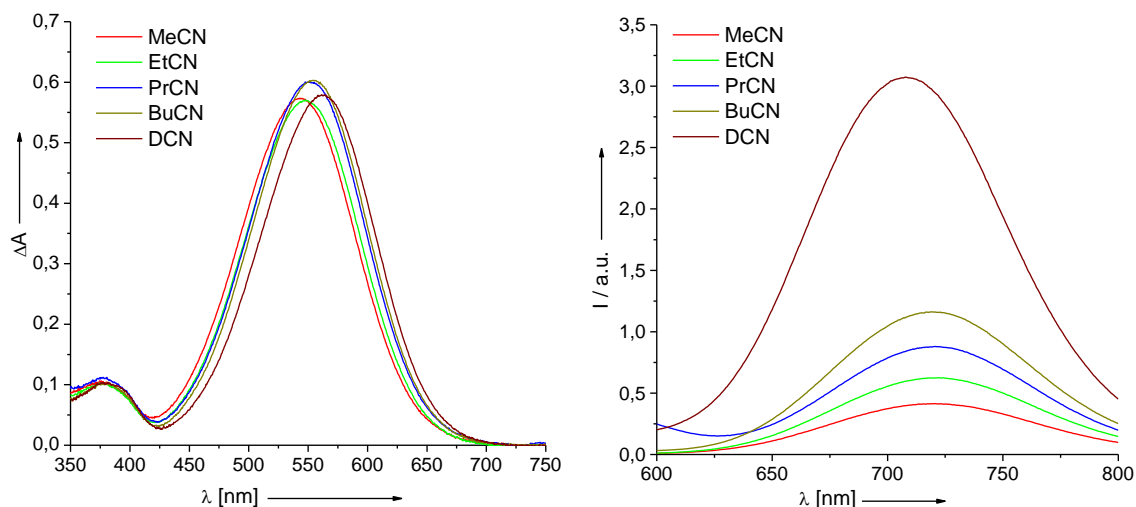


Abb. 72: Darstellung der Solvatochromie von **18** mit (links) Absorptions- und (rechts) Fluoreszenzmessungen in einer Polaritätsreihe von Nitrillösungsmitteln.

Anschließend wurde **DNA11** mit dem komplementären Gegenstrang (**dsDNA11**) hybridisiert. Dies führt zu einer leichten Blauverschiebung in der Absorption sowie zu einer Fluoreszenzabnahme, welche allerdings im Vergleich zum freien Farbstoff immer noch eine um den Faktor 50 höhere Intensität besitzt. Dieses Verhalten ist teilweise damit zu begründen, dass die Extinktion des Farbstoffs im Doppelstrang abnimmt. Der entscheidende Grund hierfür sind vermutlich Ladungstransferinteraktionen mit den umgebenden Nukleinsäurebasen.

Der Doppelstrang **dsDNA11** besitzt einen T_m -Wert von 58,2 °C, welcher im Vergleich zum unmodifizierten Duplex ($T_m = 59,5$ °C) um 1,3 °C niedriger ist. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Inkorporation von **18** in die DNA keine erhebliche Duplexdestabilisierung mit sich bringt.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde ein Monobenzozyklootinderivat (COMBO) über einen Propargyllinker an die 5-Position von 2'-Desoxyuridin erfolgreich verknüpft und mithilfe der automatisierten Phosphoramiditmethode in die DNA eingebaut. Anschließend konnte die COMBO enthaltene DNA kupferfrei unter Verwendung eines Chinolin-Styryl-Cumarin Azidfarbstoffs postsynthetisch modifiziert werden, wodurch ein erheblicher Fluoreszenzanstieg im wässrigen Medium erhalten wurde. Aufgrund der hohen Reaktivität, der kleinen Größe und der geringen Lipophilie von COMBO wurde eine Methode entwickelt, welche bislang als kupferfreie, postsynthetische DNA-Modifizierung dem CuAAC-Konzept bereits ein Stück näher kommt. Aus diesem Grund besteht das starke Interesse, dieses Prinzip für weitere bioorthogonale Reaktionen einzusetzen. Aufgrund der Verknüpfung vom COMBO über die 5-Position von 2'-Desoxyuridin, ist es für die Verwendung in der Polymerasekettenreaktion mit DNA-Polymerasen kompatibel. Darüber hinaus kann COMBO nicht nur mit Aziden, sondern auch mit Tetrazinen reagieren, was ebenfalls zahlreiche spannende Möglichkeiten zur Biokonjugation eröffnet.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde funktionalisierte DNA erfolgreich zur Ausbildung von mono- und bifunktionalisierten DNA-Netzwerken, zur Untersuchung des Einzelbasen-diskriminierungspotenzials der Pyrrolidiny-PNA sowie zur kupferfreien „Click“-Reaktion durch Inkorporation von Monobenzyklooktin eingesetzt.

Zum Aufbau von triangularen- und *Holliday*-Strukturen wurden modifizierte DNA-Stränge verwendet, die am 5'-Ende mit Perylenbisimid modifiziert sind und aufgrund von π - π -Wechselwirkungen der Farbstoffmodifikation zu Netzwerken aggregieren. Die Ausbildung der höher geordneten Konstrukte konnte dabei mithilfe optisch-spektroskopischer Untersuchungen nachvollzogen werden. Weiterführend gelang es, AFM-Bilder der Aggregate aufzunehmen, um einen noch besseren bildlichen Nachweis der Netzwerkstrukturen zu erhalten. Darüber hinaus wurde das nichtkovalente Bindungsmotiv der Perylenbisimidaggregation mit dem der Metallkomplexierung von Bipyridin zur Entwicklung bifunktionaler DNA-Netzwerke in einer triangularen DNA kombiniert. Dabei wurden Bipyridine am Verzweigungspunkt angebracht, wodurch eine eindeutige Stabilisierung des DNA-Konstrukts in Anwesenheit von Metallionen wie Fe^{III} , Ni^{II} und Zn^{II} erhalten wurde. Die Kombination dieser unabhängigen Struktur motive kann beispielsweise bei der Entwicklung von DNA-inspirierten Biomaterialien in der Elektronik oder als Lichtsammelsysteme verwendet werden.

Außerdem wurde gezeigt, dass die Pyrrolidiny-PNA im Vergleich zur DNA in der Lage ist, Einzelbasenfehlpaarungen mit DNA-Gegensträngen zu diskriminieren. Biotinylierte PNA wurde diesbezüglich an Streptavidin beschichtete, magnetische Fe_xO_y -Partikel immobilisiert. In Anwesenheit zweier DNA-Gegenstränge, die mit verschiedenen Farbstoffen modifiziert sind und sich in nur einer Base voneinander unterscheiden, konnte die Pyrrolidiny-PNA im Vergleich zur DNA mit einer höheren Selektivität den komplementären Strang hybridisieren. Dies wurde durch die Farbstoffintensitäten nicht gebundener Gegenstränge mithilfe der Absorptionsspektroskopie bestimmt, indem die Hybrid enthaltenen Partikel mit einem Magneten abgetrennt wurden. Anschließend sollten Pyrrolidiny-PNA-Sequenzen bezüglich der „Hot-Spot-Mutationen“ des Proteins p53 eingesetzt werden, um eine mögliche biologische Anwendung zu demonstrieren. Unter Verwendung von DNA-

Gegensträngen mit negativ geladenen anstelle von positiv geladenen Farbstoffen, wurden Selektivitäten der Pyrrolidinyl-PNA erhöht und ein Faktor von 10-12 erreicht. Es zeigte sich allerdings, dass ΔT_m -Werte der komplementären und nicht komplementären Hybride von > 20 °C für eine eindeutige Diskriminierung notwendig sind. In Anwesenheit einer G-T-Fehlpaarung werden kleinere ΔT_m -Werte erhalten. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Pyrrolidinyl-PNA im Vergleich zur DNA zwar ein besseres, aber auch ein sequenzabhängiges Einzelbasendiskriminierungspotenzial aufweist.

Des Weiteren wurde 2'-Desoxyuridin an der 5-Position über einen Propargyllinker mit Monobenzozyklootkin (COMBO) modifiziert und anschließend mithilfe der automatisierten Phosphoramiditmethode in die DNA eingebaut. Folglich konnte die mit COMBO modifizierte DNA postsynthetisch mit einem hochfluorogenen und solvatochromen Chinolin-Styryl-Cumarin Azidfarbstoff kupferfrei modifiziert werden (SPAAC-Methode), wobei ein erheblicher Fluoreszenzanstieg des Farbstoffs im wässrigen Medium erhalten wurde. COMBO bietet im Vergleich zu Dibenzozyklootkin (DIBO), welches ebenfalls bereits in der DNA für kupferfreie Modifizierungen verwendet wurde^[245], einige Vorteile. COMBO ist reaktiver, kleiner und weniger lipophil. Diese Methode ist daher äußerst interessant für Biokonjugationen in lebenden Zellen einzusetzen.

Die DNA konnte folglich, je nach Funktionalisierung, für äußerst unterschiedliche Bereiche verwendet werden und eröffnet im Bereich der Nanotechnologie und Materialwissenschaften als auch in der Biosensorik zahlreiche spannende Möglichkeiten.

VI. Experimenteller Teil

1. Materialien und Geräte

Reagenzien

Die bei der Synthese und den Experimenten verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck*, *Riedel-de Haën*, *ABCR*, *Carl Roth*, *VWR*, *Sigma Aldrich* bezogen. Die dabei verwendete Qualitätsstufe war mindestens „zur Synthese“.

Lösungsmittel

Bei Synthesen verwendete Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe „p.A. (pro analysi)“. Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, trockene Lösungsmittel wurden von *Acros*, *Alfa Aesar*, *Fluka* bzw. *Sigma Aldrich* bezogen und unter Argonatmosphäre aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochreine (HPLC Grad) organische Lösungsmittel (*FisherScientific*, *VWR*) sowie entionisiertes und ultrafiltriertes Wasser aus einer *Millipore* Entsalzungsanlage verwendet.

Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte, Cy3-/Cy5-modifizierte Oligonukleotide wurden von *Metabion* und Atto488-/DY649-modifizierte Oligonukleotide wurden von *Biomers* bezogen. Diese waren bereits über HPLC aufgereinigt und lyophilisiert. Vor ihrer Verwendung wurde die DNA in entionisiertem Wasser gelöst und die Konzentration über UV/Vis Spektroskopie bestimmt.

Magnetische Mikropartikel

Pierce[®] *Streptavidin Magnetic Beads* von *Thermo Scientific* bestehen aus einer Streptavidin Monoschicht, die kovalent an die Oberfläche der Fe_xO_y-Partikel gebunden ist. Die Partikelkonzentration entspricht 10 mg/L und die Bindungskapazität beträgt ~ 3,500 pmol biotinyliertes Fluoreszein/mg Partikel.

Reaktionsführung

Wenn nötig, wurden Reaktionen zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Argonatmosphäre (Argon 4,6, 99,996 % rein) durchgeführt. Glasapparaturen wurden vorher im Hochvakuum ausgeheizt.

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 Auswertung erfolgte über die sichtbare Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. über Fluoreszenz, angeregt bei $\lambda = 366$ nm. Chemische Auswertung erfolgte gegebenenfalls durch Anfärben mit einer KMnO₄-Lösung (450 mg KMnO₄, 630 mg K₂CO₃, 45 mL H₂O, 750 μ L 5 % NaOH) oder mit Schwefelsäure (3 %) in Methanol und anschließendem Erhitzen mit einem Heißluftfön.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als stationäre Phase diente meist Kieselgel der Firma *Sigma Aldrich* mit einer Korngröße von 40-63 μ m. Die Säulen wurden nass gepackt und nach dem von Still beschriebenen Verfahren^[273] mit einem Überdruck von 0,3-0,4 bar durchgeführt. Die zu reinigende Substanz wurde entweder im Laufmittel gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert aufgetragen. Es wurden ausschließlich Glassäulen mit einer Fritte (Porengröße 2 oder 3) verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Reversed-phase HPLC erfolgte in Karlsruhe 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, 3 μ m) verwendet. Die präparative Trennung erfolgte über eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 10 mm, 5 μ m). Die Flussrate bei analytischen Methoden betrug 1 mL/min und bei semipräparativen Methoden 2,5 mL/min. Die entsprechende Säule wurde für die DNA-Aufreinigung mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6,5, Laufmittel A) äquilibriert und anschließend mit verschiedenen Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) eluiert. Für die PNA-Aufreinigung wurde Wasser + 0,1 % TFA (Laufmittel A) zur

Äquilibrierung und ein MeOH + 0,1 % TFA-Gradient (Laufmittel B) zur Eluierung verwendet. Die Detektion erfolgte über die DNA typische UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260$ nm sowie über eine zusätzliche UV/Vis-Absorption, die für den jeweiligen DNA Modifikationsbaustein charakteristisch ist.

In Thailand erfolgte die *reversed-phase* HPLC der PNA-Stränge an einem *Waters Delta 600TM* System (Pumpeneinheit, *Waters 996TM Photodiodenarraydetektor*) unter Verwendung einer ACE[®]C18-AR-Säule (150 x 4,6 mm, 5 μ m) mit den oben beschriebenen Methoden.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Für die Entsalzung nach den „Click“-Reaktionen wurden fertige *illustra NAPTM-5*-Säulen (*SephadexTM G-25 DNA Grade*) von *GE-Healthcare* verwendet. Für die Aufreinigung von DNA-Strängen wurde mit 5 mM Ammoniumacetat-Puffer äquilibriert und chromatographiert.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese erfolgte an einem *Expedite Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems*. Das Gerät wurde mit Argon als Schutzgas betrieben und als feste Phase diente CPG (*Controlled Pore Glass*) mit einer Belegung von 1 μ mol (500 Å). Phosphoramidit, *Synthesizer* Chemikalien und CPG-Säulen stammten von *ABI*, *Glen Research* und *Proligo Reagents*. Das 2'-O-Propargyl-Cytidin(n-bz)-phosphoramidit wurde von *ChemGenes* bezogen.

Pyrrolidiny-PNA-Festphasensynthese

Die PNA-Synthese erfolgte manuell in einer Filter enthaltenen Glaspipette im 0,75 μ mol oder 1,5 μ mol-Ansatz. *Novasyn TGR* von *Novabiochem* diente dabei als Festphase. Die PNA-Monomere wurden von *Vilaivan et al.* an der Chulalongkorn Universität in Bangkok hergestellt.^[112, 136]

Lyophilisation

DNA bzw. PNA in wässriger Lösung wurden entweder an der Gefriertrocknungsanlage *Alpha 1- 2 LD Plus* von *Christ* nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff oder in einem Vakuumkonzentrator (*Christ Alpha RVC*) getrocknet.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden entweder an Bruker Avance 300, Avance 400, Avance 600 oder Avance DRX 500 am Karlsruhe Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, in deuterierten Lösungsmitteln aufgenommen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalteten ca. 1-15 mg Substanz in 0,7-0,8 mL Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS) als Nullpunkt. Als Referenz diente das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels bzw. das Lösungsmittelsignal (^{13}C -NMR).^[274]

- MeCN- d_3 : ^1H -NMR: $\delta = 1,94$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 118,26$ ppm
- CDCl_3 : ^1H -NMR: $\delta = 7,26$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 77,16$ ppm
- DCM- d_2 : ^1H -NMR: $\delta = 5,31$ ppm; ^{13}C -NMR: $\delta = 53,7$ ppm
- DMSO- d_6 : ^1H -NMR: $\delta = 2,49$ ppm; ^{13}C -NMR: $\delta = 39,4$ 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 vom Dublett), m (Multipllett) und bs (breites Singulett).

Massenspektroskopie (MS)

Am Karlsruhe Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, wurden MALDI-TOF-Massenspektren an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linearen negativen Modus gemessen. An der Chulalongkorn Universität (Thailand) wurde ein *Microflex*-Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linear positiven Modus verwendet. Für DNA-Messungen wurden folgende Matrices eingesetzt:

- 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP, 0,3 M in Ethanol) / Diammoniumcitrat (0,1 M in Wasser) = 2:1
- Hydroxypikolinsäure (gesättigte Lösung in Acetonitril:Wasser = 1:1) / Diammoniumhydrogencitrat (0,44 M in Wasser) = 9:1

Zur Messung der PNA Massen wurde stets eine gesättigte Lösung von Cyano-4-hydroxymethylsäure in Acetonitril:Wasser + TFA = 1:1 + 0,1 % verwendet. Weitere Massenspektren am KIT wurden an einem *Finnigan* MAT95 gemessen. Hierbei dienten EI (Elektronenstoßionisation) und FAB (*Fast Atom Bombardement*) als Ionisierungsverfahren. An einem LTQ *Orbitrap* XL Massenspektrometer (*Thermo Fisher Scientific*) wurden mithilfe von ESI (Elektronensprayionisation) ebenfalls Messungen durchgeführt.

Gelelektrophorese

Native Polyacrylamidgele wurden an einer *Mini-PROTEAN*[®] *Tetra cell* Gelelektrophorese von *Bio-Rad* mit 0,75 mm Schichtdicke bei RT durchgeführt. Die Gele enthielten 12 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 2 mM EDTA, pH 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure. Als Puffer diente TBE (2 mM EDTA, pH 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure).

Atomkraftmikroskopie (AFM)

Am Karlsruhe Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrotechnologie, wurden die Messungen an einem *Dimension Icon Rasterkraftmikroskop* von *Veeco* im „Tapping Mode (Air-Standard)“ bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Oberflächenabtastung wurde der Cantilever SNL-10 von *Veeco* mit einer Dicke von 0,5-0,7 µm, einer Resonanzfrequenz von 40-75 kHz und einer Federkonstante von 0,58 N/m benutzt. Die zu messenden Proben wurden entweder mit MgCl₂ oder NiCl₂-Lösung versetzt ($c_{\text{End}}(\text{MgCl}_2/\text{NiCl}_2) = 10 \text{ mM}$), auf eine frisch gespaltene Mica-Oberfläche gegeben und nach ca. 3 min mit entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage abgewaschen. Die Mica-Oberfläche wurde anschließend mit einem Blasebalg getrocknet.

2. Optische Spektroskopie

Für alle spektroskopischen Messungen wurden Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Bei temperaturabhängigen Messungen wurde das Spektrometergehäuse stetig mit Druckluft gespült, um ein Beschlagen der Küvetten zu vermeiden. Für die Messungen wurden hochreine organische Lösungsmittel (*ThermoFisher, VWR*) bzw. 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 Temperatureinheit (*Cary 100 Temperature Controller*) oder an einem *Perkin Elmer Lambda 750* aufgenommen. Die Spektren wurden gegen die UV/Vis-Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden stets verwendet: SBW: 2,0 nm, Durchschnittszeit 0,1 s, Datenintervall 1,0 nm, Lampenwechsel bei 350 nm

Temperaturabhängige UV/Vis-Absorptionsmessung

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden über einen Temperaturbereich von 10 °C – 90 °C im Abstand von 10 °C aufgenommen. Vor jeder Messung wurde die Temperatur 10 min konstant gehalten.

Schmelztemperaturmessung

Die Schmelzpunktmessungen erfolgten über einen Temperaturbereich von 10 °C – 90 °C wobei die Absorptionsänderung bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ verfolgt wurde. Hierbei blieb die Temperatur am Start- sowie am Endpunkt jeweils 10 min konstant. Die Messdaten wurden in 0,5 °C Schritten, bei einer Heiz- und Kühlrate von 0,7 °C/min, erfasst.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-3* der Firma *Jobin-Yvon* oder einem *Horiba Jobin-Yvon Fluoromax-4-NIR* Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Proben wurden mit einem Peltier-Element *LFI-3751* thermostatisiert. Falls nicht anders angegeben, wurde bei 20 °C gemessen und die Spektren gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter blieben unverändert: Increment: 1 nm, Integration Time: 0,2 s. Die Anregungswellenlänge beträgt, soweit nicht anders angegeben, für Systeme mit Perylenbisimid $\lambda = 505$ nm und mit Chinolin-Styryl-Cumarin $\lambda = 579$ nm.

Temperaturabhängige Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenzspektren wurden über einen Temperaturbereich von 10 °C – 90 °C im Abstand von 10 °C aufgenommen. Vor jeder Messung wurde die Temperatur für 10 min konstant gehalten.

Fluoreszenzimager

Die Auswertung der Polyacrylamidgele wurde mit einem *Stella 8300* Fluoreszenzimager von *Raytest* durchgeführt. Die Anregung der Perylenbisimid modifizierten DNA-Stränge erfolgte mit einer LED bei 540 ± 10 nm. Die Emission wurde mit einer auf -20 °C gekühlten CCD-Kamera detektiert, wobei entsprechende Emissionsfilter (605 ± 10 nm, $700 \pm 17,5$ nm) verwendet wurden. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der *Aida Image Analyzer V 4.50* Auswertesoftware von *Raytest*.

3. Synthesevorschriften

Bereits bekannte Synthesevorschriften und spektroskopische Analysen werden nicht explizit aufgeführt, die entsprechenden Literaturstellen werden jedoch angegeben.

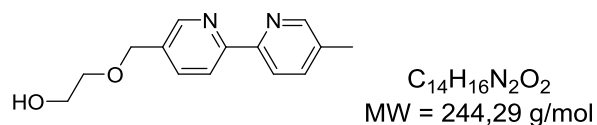
3.1. Synthese des Perylenbisimidbausteins

Der Perylenbisimidbaustein **1** wurde nach der Literatur hergestellt.^[60, 275-276]

3.2. Synthese des Bipyridinliganden

Die Synthese des monobromierten Bipyridins **4** wurde nach der Literatur durchgeführt.^[277]

(5)



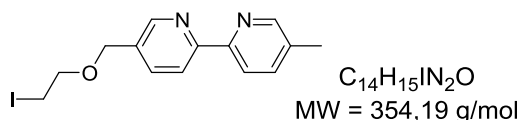
NaH (27 mg, 1,52 mmol, 2,0 eq) wurde bei RT in 3 mL THF suspendiert und trockenes Ethylenglykol (256 μ L, 4,56 mmol, 6,0 eq) zugegeben, wobei ein weißer Feststoff entstand. Das Reaktionsgemisch wurde auf 70 °C geheizt, das zuvor in 3 mL THF gelöste **4** (200 mg, 0,76 mmol, 1,0 eq) langsam zugetropft und über Nacht refluxiert. Die Reaktion wurde auf RT gekühlt und mit 0,5 mL gesättigter NH_4Cl -Lösung gequencht. THF wurde evaporiert, der Rückstand mit dest. Wasser versetzt und das Rohprodukt mit Ethylacetat (3 x 30 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter NH_4Cl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Ethylacetat wurde entfernt und das Rohprodukt mittels FC (Hexan/Aceton + NEt_3 = 8:2 + 0,1 %) gereinigt. Es wurden 175 mg (0,71 mmol) des Produkts als ein bräunliches Öl mit einer Ausbeute von 94 % erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8,62 (s, 1 H), 8,50 (s, 1 H), 8,35 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 8,27 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,80 (dd, J = 8,2, 2,1 Hz, 1 H), 7,62 (dd, J = 8,3, 2,3 Hz, 1 H), 4,63 (s, 2 H), 3,79 (d, J = 4,5 Hz, 2 H), 3,74 – 3,57 (m, 2 H), 2,39 (s, 3 H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 18,38, 61,89, 70,69, 71,65, 120,59, 136,49, 137,54, 148,56, 149,63

EI-MS m/z (%) = 244,1 (100) (M⁺), 183,1 (70) (M⁺-(CH₂)₂O₂H), 199,1 (35) (M⁺-(CH₂)₂OH)

(6)



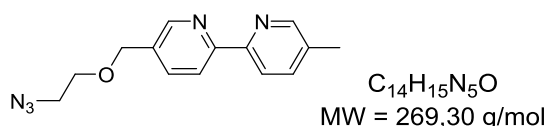
PPh_3 (65 mg, 2,46 mmol, 3,0 eq) und **5** (200 mg, 0,82 mmol, 1,0 eq) wurden in 5 mL DCM gelöst. Nach der Zugabe von CBr_4 (905 mg, 2,73 mmol, 3,3 eq) wurde die Reaktionsmischung für 19 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 100 mL Aceton und 30 mL DCM sowie NaI (4,0 g) zugegeben, wobei NaBr als weißer Feststoff ausfiel und sich die Lösung braun färbte. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockene eingengt. Der braune Rückstand wurde mit DCM aufgenommen, mit dest. Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und das Rohprodukt mittels FC (Hexan/Aceton + NEt_3 = 8:2+0,1 %) aufgereinigt. Es wurden 232 mg (0,655 mmol) des Produkts mit einer Ausbeute von 80 % als beiger Feststoff erhalten.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8,63 (s, 1 H), 8,51 (s, 1 H), 8,36 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 8,29 (s, 1 H), 7,83 (dd, J = 8,3, 2,1 Hz, 1 H), 7,63 (dd, J = 8,1, 2,1 Hz, 1 H), 4,65 (s, 2 H), 3,78 (t, J = 6;6 Hz, 2 H), 3,31 (t, J = 6;6 Hz, 2 H), 2,40 (s, 3 H)

^{13}C -NMR (75MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 18,38, 70,54, 76,59, 120,63, 133,50, 136,45, 137,48, 148,52, 149,67

EI-MS m/z (%) = 354,1 (100) (M^+)

(2)



6 (116 mg, 0,328 mmol, 1,0 eq) und NaN_3 (21 mg, 3,28 mmol, 10,0 eq) wurden in 6 mL trockenem DMF gelöst und für 19 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand in DCM wieder aufgenommen. Das Gemisch wurde drei Mal mit dest. H_2O gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden ohne weitere Aufarbeitung 58 mg (0,215 mmol) des Produkts als viskoses, bräunliches Öl mit einer Ausbeute von 66 % erhalten.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8,64 (d, J = 2,1 Hz, 1 H), 8,51 (d, J = 2,6 Hz, 1 H), 8,38 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 8,29 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,83 (dd, J = 8,2, 2,1 Hz, 1 H), 7,64 (dd, J = 8,2, 2,3 Hz, 1 H), 4,66 (s, 2 H), 3,89 – 3,60 (m, 2 H), 3,44 (t, J = 4.9 Hz, 2 H), 2,40 (s, 3 H)

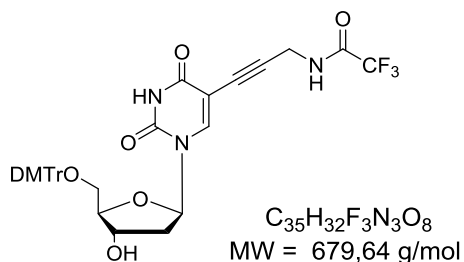
^{13}C -NMR (75MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 18,38, 50,87, 69,26, 70,72, 120,63, 136,37, 137,50, 184,42, 149,66

ESI-MS m/z (%) = 270,2 (100) (MH⁺)

3.3. Synthese des Monobenzyklootinnukleotids

Die Synthese von DMT-geschütztem 5-Iod-2'-Desoxyuridin **10** und Trifluorpropinacetamid **11** wurde nach Literaturbedingungen durchgeführt.^[267-268] COMBO **14** wurde im Arbeitskreis Dr. Péter Kele in Budapest hergestellt.^[265]

(12)

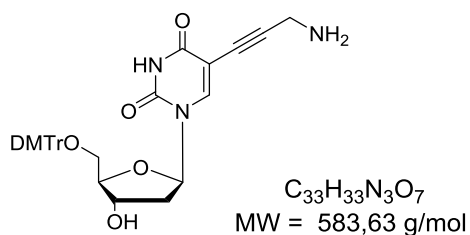


Zuerst erfolgte die Suspension von **10** (400 mg, 0,61 mmol, 1,0 eq) und CuI (26 mg, 0,13 mmol, 0,22 eq) unter Argon in abs. DMF (6 mL). Nach 30 min Rühren unter Lichtausschluss wurden Et_3N (168 μ L, 1,22 mmol, 2,0 eq) und **11** (278 mg, 0,061 mmol, 3,0 eq) zugegeben und anschließend wurde das Reaktionsgemisch drei Mal entgast. Nach Zugabe von $Pd(PPh_3)_4$ (42 mg, 0,0615 mmol, 0,10 eq) rührte die Suspension bei RT über Nacht. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und das Rohprodukt in 20 mL THF gelöst und mit 800 mg K_2CO_3 versetzt. Nach 2 h Rühren erhielt man nach Abfiltrieren der Salze einen Feststoff, der mittels FC (DCM:MeOH + Et_3N = 100:0 + 1 % \rightarrow 10:1 + 1 %) gereinigt wurde. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 27 % (110 mg, 0,162 mmol) erhalten.

DC (DCM:MeOH = 10:1): R_f = 0,2

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[269]

(13)

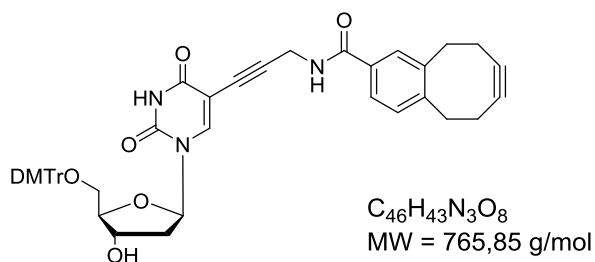


12 (110 mg, 0,16 mmol, 1,0 eq) wurde in konz. NH_4OH (10 mL) gelöst und für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und mit EtOH drei Mal coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels der FC (EtOAc:MeOH + NH_4OH = 10:0,5 + 1 % bis 8:2 + 1 %) aufgereinigt. Das saubere Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 71 % (66 mg, 0,11 mmol) erhalten.

DC (EtOAc:MeOH: NH_4OH = 8:2:1): R_f = 0,2

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[270, 278]

(15)



14 (10 mg, 0,05 mmol, 1,0 eq), HBTU (18 mg, 0,047 mmol, 0,94 eq) und HOBt*2 H₂O (8 mg, 0,05 mmol, 1,0 eq) wurden in abs. DMF gelöst. Nach 5 min Rühren wurde DIPEA (18 µL, 0,11 mmol, 2,2 eq) zugegeben und weitere 15 min gerührt. **13** (29,2 mg, 0,05 mmol, 1,0 eq) wurde zugegeben und weitere 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde direkt, ohne Evaporieren des Lösungsmittels, mittels FC (DCM + Et₃N → EtOAc:MeOH + Et₃N = 100 + 0,1 % → 30:1 + 0,1 %) aufgereinigt. Es wurden 25 mg (0,033 mmol) des Produkts als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 65 % erhalten.

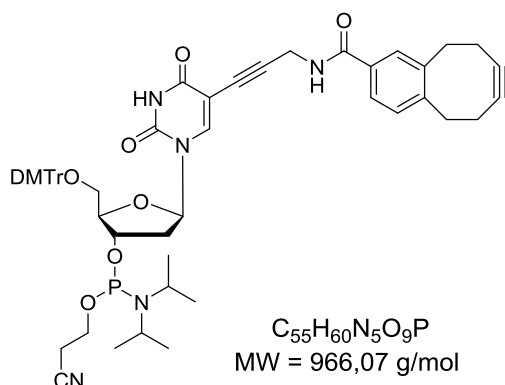
DC (EtOAc:MeOH = 30:1): R_f = 0,55

1H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11,68 (s, 1 H), 8,82 (t, J = 5,5 Hz, 1 H), 7,91 (s, 1 H), 7,71 (s, 1 H), 7,66 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,40 (d, J = 7,8 Hz, 2 H), 7,33 – 7,25 (m, 7 H), 7,20 (t, J = 7,3 Hz, 1 H), 6,90 (dd, J = 8,8, 3,8 Hz, 4 H), 6,10 (t, J = 6,7 Hz, 1 H), 5,33 (d, J = 4,6 Hz, 1 H), 4,26 (t, J = 5,0 Hz, 1 H), 4,15 (dd, J = 5,4, 3,0 Hz, 2 H), 3,95 – 3,87 (m, 1 H), 3,73 (d, J = 2,9 Hz, 6 H), 3,38 (d, J = 12,8 Hz, 2 H), 3,26 (dd, J = 10,5, 5,5 Hz, 1 H), 3,07 (dd, J = 10,7, 3,1 Hz, 1 H), 2,86 (t, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,44 (d, J = 16,9 Hz, 3 H), 2,28 (dt, J = 13,6, 6,8 Hz, 1 H), 2,23 – 2,14 (m, 3 H).

13C-NMR (126 MHz, DMSO): δ (ppm) = 166,25, 162,07, 158,57, 158,53, 149,82, 145,26, 145,21, 143,78, 141,57, 136,20, 135,65, 132,48, 131,23, 130,26, 130,09, 128,39, 128,00, 127,13, 125,81, 113,74, 113,70, 99,87, 99,74, 98,85, 90,26, 86,28, 85,46, 74,40, 70,94, 64,28, 60,23, 55,48, 37,38, 37,16, 29,67, 22,58, 22,48, 21,25.

HR-MS (FAB): m/z (MH⁺): 766,3

(17)



In abs. DCM wurde **15** (36 mg, 0,047 mmol, 1,0 eq) gelöst und mit DIPEA (37,6 μ L, 0,221 mmol, 4,7 eq) versetzt. Nach 15 min Rühren wurde in die Lösung β -Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit **16** (25,2 μ L, 0,1128 mmol, 2,4 eq) gegeben. Nach 1 h wurde das Rohprodukt direkt ohne evaporieren des Lösungsmittels mittels FC (DCM:Aceton + Et₃N = 10:3 + 0,1 %) aufgereingt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das reine Produkt mit Benzol lyophilisiert. Es wurden 27 mg (0,028 mmol) des Produkts als weißer Schaum mit einer Ausbeute von 60 % erhalten.

DC (DCM:Aceton + Et₃N = 10:3 + 0,1 %): R_f = 0,8

³¹P-NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) = 150,07, 149,66

4. DNA-Synthese

4.1. Synthese modifizierter DNA

Allgemein

Die automatisierte Synthese der DNA-Oligonukleotide erfolgte an einem *Expedite Nucleic Acid Synthesizer*. Dieser fördert die benötigten Reagenzien in Pulsen von je 16 μL durch die CPG-Säulen. Das Gerät folgt dabei einem festgelegten Kupplungsprotokoll, das die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse sowie die Zeitdauer (in Sekunden) jedes Syntheseschrittes definiert. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet einen schnellstmöglichen Durchlauf ohne zusätzliche Reaktionszeit. Die kommerziell erhältlichen DNA-Basen wurden in Acetonitril (*amidite diluent*) gelöst. Die natürlichen Basen wurden als 0,067 M Lösungen und der 2'-O-Propargyl-Cytidin Baustein als 0,1 M Lösung eingesetzt. Synthetisch hergestellte Basenanaloga wurden entweder in abs. Acetonitril oder DCM gelöst und mit einer Konzentration von 0,1 M verwendet. Bei allen Oligonukleotiden wurde am Ende der Synthese die 5'-terminale DMTr-Schutzgruppe entfernt (*trityl-off* Synthese). Für den Einbau der Phosphoramidite der natürlichen Basen A, G, C, T wurde folgendes Standardprotokoll verwendet (Tabelle 8).

Tabelle 8: Standardprotokoll zur Kupplung der Phosphoramidite natürlicher Basen am Beispiel von A. Erläuterungen: **Dbk:** 3 % Dichloressigsäure in CH₂Cl₂; **Wsh:** MeCN; **Act:** 0,45 M Tetrazol in MeCN; **Caps:** Ac₂O in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox:** Iod in Wasser/THF/Pyridin.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit (s) / Arg2
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1,5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	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	5	0
21	A + Act	PULSE	5	0
21	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 artifiziellen Basen zu gewährleisten, wurde das Standardprotokoll im Bereich „\$Coupling“ für jeden Baustein individuell modifiziert.

Tabelle 9 zeigt das veränderte Kupplungsprotokoll, welches für den Einbau des Sonderbausteins 2'-O-Propargyl-Cytidin verwendet wurde. Die Kupplungszeit wurde von 96 s (Standardbasen) auf 864 s verlängert.

Tabelle 9: Kupplungsprotokoll für den Einbau des Sonderbausteins 2'-O-Propargyl Cytidin.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit (s) / Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
25	8 + Act	PULSE	5	0
25	8 + Act	PULSE	2	64
2	Act	PULSE	1	500
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200

Für den Perylenbisimidbaustein wurde die Kupplungszeit auf 400 s verlängert und die Anzahl der benötigten Pulse von sieben auf 10 erhöht. Zusätzlich wurde ein weiterer Syntheseschritt eingeführt. Es wurden Äquilibrier- und Waschschrte mit Dichlormethan hinzugefügt, um ein Ausfallen des künstlichen Bausteins im Synthesegerät zu verhindern. Tabelle 10 zeigt das veränderte Kupplungsprotokoll mit dem PBI-Baustein 1 an Position 7 und Dichlormethan an Position 5.

Tabelle 10: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den PBI-Bausteins 1.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit (s) / 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

Tabelle 11 zeigt das veränderte Kupplungsprotokoll, welches für den Einbau des Sonderbausteins COMBO 17 verwendet wurde. Die Kupplungszeit wurde auf 1200 s verlängert und die Anzahl der benötigten Pulse auf 10 erhöht.

Tabelle 11: Modifiziertes Kupplungsprotokoll für den Sonderbaustein COMBO 17.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit (s) / Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
23	6 + Act	PULSE	5	0
23	6 + Act	PULSE	5	600
2	Act	PULSE	5	400
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	8	0

4.2. Aufarbeitung und Reinigung

Die vollständige Entschützung und Abspaltung der DNA vom CPG erfolgte mit 700 µL Ammoniaklösung (25%, *trace select*, *Fluka*) bei 40 °C. COMBO modifizierte DNA-Stränge wurden bei 36 °C abgespalten. Die Lösung wurde von der festen Phase abfiltriert und zwei Mal mit jeweils 300 µL Wasser gewaschen. Das vereinigte Filtrat wurde an einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (35 °C, 30 min, 100 mbar) von Ammoniak und anschließend von Wasser (ca. 10 h, 0,1 mbar) befreit. Die gefriergetrockneten Proben wurden in 300 µL HPLC-H₂O wieder aufgenommen und über *reversed-phase* HPLC gereinigt. Oligonukleotide, die postsynthetisch mithilfe der Cu-katalysierten „Click“-reaktion modifiziert wurden, sind nach der erfolgten Modifikation mit EDTA zum Entfernen der Cu-Komplexe behandelt worden. Anschließend konnten die Stränge entsalzt und mit der HPLC gereinigt werden. Zur Analytik und präparativen Trennung der Oligonukleotide wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 12: HPLC-Gradienten und –säulen sowie die Detektionswellenlängen, die für die Oligonukleotidreinigung verwendet wurden.Erläuterungen: A = 50 mM NH₄OAc-Puffer (pH 6,5), B = MeCN,

DNA/Modifikation	Säule	Gradient	Detektion
PBI	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 50 % B (45 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm},$ 548 nm
PBI-Bpy	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 50 % B (45 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm},$ 548 nm, 302 nm
PBI in 60mere	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 95 % B (45 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm},$ 548 nm
Bpy	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 15 % B (40 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm},$ 302 nm
COMBO	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 20% B (60 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm},$ 302 nm
COMBO+18	<i>Supelcosil</i> LC-318	0 – 20 % B (60 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm},$ 302 nm, 549 nm

4.3. Postsynthetische Modifizierung

CuAAC mit dem Bipyridinliganden

Die lyophilisierte DNA wurde nacheinander mit 25 μL einer 10 μM Natriumascorbatlösung (400 mM in Wasser), 34 μL einer 3,4 μM TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH = 3:1), 17 μL einer 1,7 μM Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphatlösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH = 3:1) sowie mit 114 μL des Bipyridinazids **2** (10 mM in DMSO/*t*BuOH = 3:1) versetzt. Die Proben wurden aufgeschlämmt und anschließend bei RT über Nacht geschüttelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels (Speedvac bei 40 °C, 0,1 mbar, 6 h) wurde der Rückstand mit 100 μL Natriumacetatlösung (300 mM in Wasser) aufgenommen. Anschließend wurden zur Fällung der DNA 1 mL EtOH in die Lösung gegeben, geschüttelt und über Nacht bei -38 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde zentrifugiert (15 min bei 13000 rpm) und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das DNA Pellet wurde erneut zwei Mal mit je 1 mL EtOH gewaschen.

Entkomplexieren und Entsalzen der DNA-Stränge

Das DNA-Pellet der Bipyridin modifizierten DNA-Stränge wurde zum Entkomplexieren in 1 mL einer 5 mM EDTA-Lösung aufgenommen und über Nacht bei RT geschüttelt. Um überschüssige Salze sowie Kupfer komplexiertes EDTA zu entfernen, wurde eine Größenausschlusschromatographie mit *illustra NAP-5*-Säulen der Firma *GE-Healthcare* durchgeführt. Die Säulen wurden zunächst mit 10 mL eines 10 mM Ammoniumacetat-Puffers äquilibriert. Anschließend wurde der entsprechende DNA-Strang (aufgenommen in 1 mL 5 mM EDTA-Lösung) auf die Säule geladen und daraufhin mit 4 mL eines 10 mM Ammoniumacetat-Puffers eluiert. Die gewonnenen Fraktionen wurden am *Nanodrop*-Spektrophotometer durch Absorption bei 260 nm und 302 nm identifiziert. Die Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und anschließend mittels *revers-phase* HPLC gereinigt.

SPAAC mit COMBO modifizierter DNA

DNA10 wurde in 150 μ L bidest. H₂O gelöst und mit 18,2 μ L einer 450 μ M Chinolin-Styryl-Cumarin-Lösung **18** (8,2 nmol in DMSO) versetzt. Die Lösung verfärbte sich bereits während der Zugabe des violetten Farbstoffs blau. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h geschüttelt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Die lyophilisierte DNA konnte ohne weitere Aufarbeitungsschritte direkt mittels HPLC gereinigt werden. Durch Integration der Edukt- und Produktabsorption bei 260 nm konnte die Ausbeute der Reaktion mit 79 % bestimmt werden.

4.4. Charakterisierung der DNA-Oligonukleotide

Charakterisierung der Masse durch MALDI-TOF / ESI-MS

MALDI-TOF-Massenspektren wurden am Karlsruher Institut für Technologie an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linearen negativen Modus gemessen. **YDNA3c** wurde aufgrund seiner großen Masse mittels ESI-MS an einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer bestimmt (siehe Kapitel VI.1).

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde nach dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz über die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ in Wasser bestimmt.^[279] Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten DNA-Strangs kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\epsilon_{260} = (A \cdot \epsilon_A + C \cdot \epsilon_C + G \cdot \epsilon_G + T \cdot \epsilon_T) \cdot 0,9$$

A	Anzahl der Adeninbasen
T	Anzahl der Thyminbasen
G	Anzahl der Guaninbasen
C	Anzahl der Cytosinbasen
ϵ_A	$15400 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ [279]
ϵ_T	$8800 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$
ϵ_G	$11700 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$
ϵ_C	$7300 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$
0,9	Faktor zur Berücksichtigung der Hypochromizität

Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide wurde entweder der entsprechende Extinktionskoeffizient ($\lambda = 260 \text{ nm}$ in H_2O) der Modifikationen addiert oder erfolgte, für Perylenbisimid modifizierte Stränge, bei 528 nm in DMSO. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die natürlichen DNA-Basen nicht und können daher für den Gesamtextinktionskoeffizienten vernachlässigt werden. DMSO wurde verwendet, um mögliche Aggregationen des Farbstoffs mit sich selbst oder mit den natürlichen Basen auszuschließen.

Tabelle 13: Molare Extinktionskoeffizienten der artifiziellen Nukleoside

Artifizielles Nukleosid	λ [nm]	Molarer Extinktionskoeffizient [l/mol*cm ⁻¹]
C(bpy)	260	25500
PBI	528	62500 (in DMSO)
18	260	12000

5. PNA-Synthese

5.1. Synthese modifizierter PNA

Allgemein

Die Synthese erfolgte manuell unter Verwendung von *Novasyn TGR* (1,5 μ M bzw. 0,75 μ M) als Festphase in einer Glasfilterpipette. Vor dem Synthesestart wurde das Harz zunächst für 10 min in trockenem DMF gequell und die Stammlösungen (SL1-3) vorbereitet:

SL1:	Piperidin	200 μ L
	DBU	20 μ L
	DMF	780 μ L
SL2:	DIEA	70 μ L
	DMF	930 μ L
SL3:	HOAt	1,1 mg
	DMF	20 μ L

Die Kupplung von Lysin, der einzelnen Monomere sowie der *acpc-spacer 8* erfolgten in je drei Schritten (Entschützung, Kupplung, Capping): Zwischen allen Syntheseschritten wurde je drei Mal mit trockenem DMF gewaschen und das Harz mit einem Blasebalg getrocknet.

Entschützung: das Harz wurde für 5 min in 100 μ L SL1 aufgenommen

Kupplung: Lysin / Monomere A-G-T-C und *acpc-spacer 8* wurden in ein Mikroreaktionsgefäß eingewogen und anschließend in 15 μ L SL2 und 15 μ L SL3 gelöst (G in 30 μ L SL2). Die Lösung wurde für X min auf das Resin gegeben (X = 30 min für A, C, *acpc-spacer 8*; X = 40 min für T, G (mit HATU)).

Einwaagen der Monomere für einen 1,5 μ mol-Ansatz:

A(pfp) = 4,44 mg, C(pfp) = 4,30 mg, T(pfp) = 3,77 mg, *acpc-spacer*(pfp) = 3,10 mg, G(OH) = 3,50 mg, HATU = 2,2 mg

Capping: Harz in 30 μ L SL2 + 5 μ L Acetanhydrid für 5 min

Biotin-Modifizierung

Nach Synthese der PNA-Sequenz erfolgte die Modifizierung mit Biotin unter Verwendung des allgemeinen Kupplungsprotokolls. Als Bausteine wurden zwei O-Linker **9** (4 eq) und Biotin (4 eq + 3,8 eq HATU) verwendet.

5.2. Aufarbeitung und Reinigung

Die vollständige Entschützung der PNA am Harz erfolgte mit 2 mL halbkonz. Ammoniaklösung (Dioxan:konz NH₄OH = 1:1) bei 60 °C über Nacht. Die Lösung wurde von der festen Phase abfiltriert und je dreimal mit DMF und MeOH gewaschen. Anschließend wurde das *Tenta Gel* mit N₂-Gas getrocknet.

Das Abspalten der PNA von der Festphase erfolgte drei Mal mit je 300 µL TFA für je 1 h. Die TFA-Lösungen wurden vereinigt und mit N₂-Gas eingedampft. Der PNA-Rückstand wurde drei Mal mit je 500 µL Diethylether gewaschen. Die getrockneten Proben wurden in 150 µL HPLC-H₂O wieder aufgenommen und über *reversed-phase* HPLC gereinigt. Zur präparativen Trennung der Oligonukleotide wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 14: HPLC-Gradienten und -säulen sowie die Detektionswellenlängen, die für die Oligonukleotidreinigung verwendet wurden.

Erläuterungen: A = H₂O + 0,1 % TFA, B = MeOH + 0,1 % TFA

DNA/Modifikation	Säule	Gradient	Detektion
Biotin-PNA	ACE® C18-AR / Supelcosil LC-318	0 – 80 % B (70 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$,

5.3. Charakterisierung modifizierter PNA

Die Charakterisierung der modifizierten PNA-Oligonukleotide erfolgte analog dem in Kapitel VI 4.4 beschriebenen Verfahren für DNA-Oligonukleotide.

6. Liste verwendeter DNA- und PNA-Sequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sowie die MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten der selbst synthetisierten und modifizierten Oligonukleotide angegeben.

Tabelle 15: PBI und/oder bpy modifizierte DNA-Sequenzen.

DNA	Sequenz 3'→5'	Basen
YDNA0a	3'-AAAGTCCGATCGCCCTTGTAT-PBI-5'	22
YDNA0b	3'-TAATCACATCCATCGGACTTT-PBI-5'	22
YDNA0c	3'-ATACAAGGGCCGATGTGATTA-PBI-5'	22
YDNA1a	3'-AAAGTCCGATGCCCTTGTAT-PBI-5'	21
YDNA1b	3'-TAATCACATCATCGGACTTT-PBI-5'	21
YDNA1c	3'-ATACAAGGGCGATGTGATTA-PBI-5'	21
YDNA2a	3'-AAGTCCGATCGCCCTTGTATA-PBI-5'	20
YDNA2b	3'-AATCACATCCATCGGACTT-PBI-5'	20
YDNA2c	3'-TACAAGGGCCGATGTGATT-PBI-5'	20
XDNA1a	3'-AAAGTCCGATGCCCTTGTAT-PBI-5'	21
XDNA1b	3'-ATACAAGGGCGATGTGATTA-PBI-5'	21
XDNA1c	3'-TAATCACATCGCTGTACGTA-PBI-5'	21
XDNA1d	3'-TACGTACAGCATCGGACTTT-PBI-5'	21
YDNA3a	3'-(AAAGTCCGAT) ₃ C(GCCCTTGTAT) ₃ -PBI-5'	62
YDNA3b	3'-(TAATCACATC) ₃ C(ATCGGACTTT) ₃ -PBI-5'	62
YDNA3c	3'-(ATACAAGGGC) ₃ C(GATGTGATTA) ₃ -PBI-5'	62
YDNA5a	3'-AAAGTCCGATC(bpy)GCCCTTGTAT-5'	21
YDNA5b	3'-TAATCACATCC(bpy)ATCGGACTTT-5'	21
YDNA5c	3'-ATACAAGGGCC(bpy)ATGTGATTA-5'	21

VI.6. Liste verwendeter DNA- und PNA-Sequenzen

YDNA6a	3`- AAAGTCCGAT C(bpy) GCCCTTGTAT- PBI -5`	22
YDNA6b	3`-TAATCACATCC C(bpy) ATCGGACTTT- PBI -5`	22
YDNA6c	3`-ATACAAGGGCC C(bpy) GATGTGATTA- PBI -5`	22

Tabelle 16: MALDI-Massen und ϵ -Werte der PBI und/oder bpy modifizierten DNA-Stränge.

DNA	Errechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	$\epsilon_{528 \text{ nm}}$ (DMSO) [a] $\epsilon_{260 \text{ nm}}$ (H ₂ O) [b] [L/mol*cm ⁻¹]
YDNA0a	7017,7	7018,7	62500 ^[a]
YDNA0b	6976,7	6976,1	62500 ^[a]
YDNA0c	7130,8	7134,6	62500 ^[a]
YDNA1a XDNA1a	6728,8	6729,4	62500 ^[a]
YDNA1b	6687,7	6688,3	62500 ^[a]
YDNA1c XDNA1b	6841,7	6841,3	62500 ^[a]
XDNA1c	6712,7	6713,9	62500 ^[a]
XDNA1d	6728,7	6729,4	62500 ^[a]
YDNA2a	6400,6	6400,6	62500 ^[a]
YDNA2b	6368,6	6367,0	62500 ^[a]
YDNA2c	6504,6	6504,3	62500 ^[a]
YDNA5a	6701,6	6707,7	204600 ^[b]
YDNA5b	6660,6	6664,1	205300 ^[b]
YDNA5c	6814,6	6814,2	225700 ^[b]
YDNA6a	7341,2	7341,5	62500 ^[a]
YDNA6b	7300,2	7301,5	62500 ^[a]
YDNA6c	7454,3	7456,7	62500 ^[a]

Tabelle 17: ESI-Masse und ϵ -Wert von der PBI modifizierten YDNA3c.

DNA	Errechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	$\epsilon_{528 \text{ nm}}$ (DMSO) [L/mol*cm ⁻¹]
YDNA3c	19196,8	19196,9	62500

VI.6. Liste verwendeter DNA- und PNA-Sequenzen

Tabelle 18: Biotinylierte PNA-Sequenzen.

PNA	Sequenz N→C	Basen
PNA1	Biotin-O-O-TGATGCTATGAC-LysNH ₂	12
PNA2	Biotin-O-O-AGGCGCTGCCCC-LysNH ₂	12
PNA3	Biotin-O-O-AGGCACTGCCCC-LysNH ₂	12
PNA4	Biotin-O-O-AACCGGAGGCCC-LysNH ₂	12
PNA5	Biotin-O-O-AACCAGAGGCCC-LysNH ₂	12

Tabelle 19: MALDI-Massen und ε-Werte der Biotin modifizierten PNA-Stränge.

PNA	Errechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	ε _{260 nm} (H ₂ O) [L/mol*cm ⁻¹]
PNA1	4723,1	4724,6	116900
PNA2	4670,1	4670,7	110000
PNA3	4654,1	4655,7	109300
PNA4	4703,1	4703,7	115400
PNA5	4687,1	4687,4	114700

Tabelle 20: Unmodifizierte DNA-Referenzstränge der biotinylierten PNA.

DNA	Sequenz 5'→3'	Basen
DNA12	5'-AGGCGCTGCCCC-3'	12
DNA13	5'-AGGCACTGCCCC-3'	12
DNA14	5'-AACCGGAGGCCC-3'	12
DNA15	5'-AACCAGAGGCCC-3'	12

Tabelle 21: Biotinylierte, Cy3/Cy5- und Atto488/Dy649 modifizierte DNA-Sequenzen.

DNA	Sequenz 3'→5'	Basen
DNA0	3'-ACGCAGTATCGTAGTCAGTGTCATG-Biotin-5'	25
DNA1a	3'-ACTACGATACTGCGT-Cy3-5'	15
DNA1b	3'-ACTACGACACTGCGT-Cy5-5'	15
DNA2	3'-TCCGCGACGGGGCGT-Cy3-5'	15
DNA3	3'-TCCGTGACGGGGCGT-Cy5-5'	15

VI.6. Liste verwendeter DNA- und PNA-Sequenzen

DNA4	3'-TTGGCCTCCGGGCGT- Cy3 -5'	15
DNA5	3'-TTGGTCTCCGGGCGT- Cy5 -5'	15
DNA6	3'-TCCGCGACGGGGCGT- Atto488 -5'	15
DNA7	3'-TCCGTGACGGGGCGT- DY649 -5'	15
DNA8	3'-TTGGCCTCCGGGCGT- Atto488 -5'	15
DNA9	3'-TTGGTCTCCGGGCGT- DY649 -5'	15

Tabelle 22: Unmodifizierte DNA-Referenzstränge der Cy3/Cy5 und Atto488/Dy649 DNA-Stränge.

DNA	Sequenz 3'→5'	Basen
DNA16	3'-TCCGCGACGGGGCGT-5'	15
DNA17	3'-TCCGTGACGGGGCGT-5'	15
DNA18	3'-TTGGCCTCCGGGCGT-5'	15
DNA19	3'-TTGGTCTCCGGGCGT-5'	15

Tabelle 23: COMBO modifizierte **DNA10** und nach der SPAAC mit **18** (**DNA11**).

DNA	Sequenz 3'→5'	Basen
DNA10	3'-AGTCACTT U(COMBO) TTCTGACG-5'	17
DNA11	3'-AGTCACTT U(COMBO+18) TTCTGACG-5'	17

Tabelle 24: MALDI-Massen und ϵ -Werte der **DNA10** und **DNA11**.

DNA	Errechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} (H₂O) [L/mol*cm ⁻¹]
DNA10	5369,3	5375,8	154900
DNA11	5823,8	5827,1	166900

VII. Ergänzende Spektren und Tabelle

1. Aggregationsversuche mit Perylenbisimid

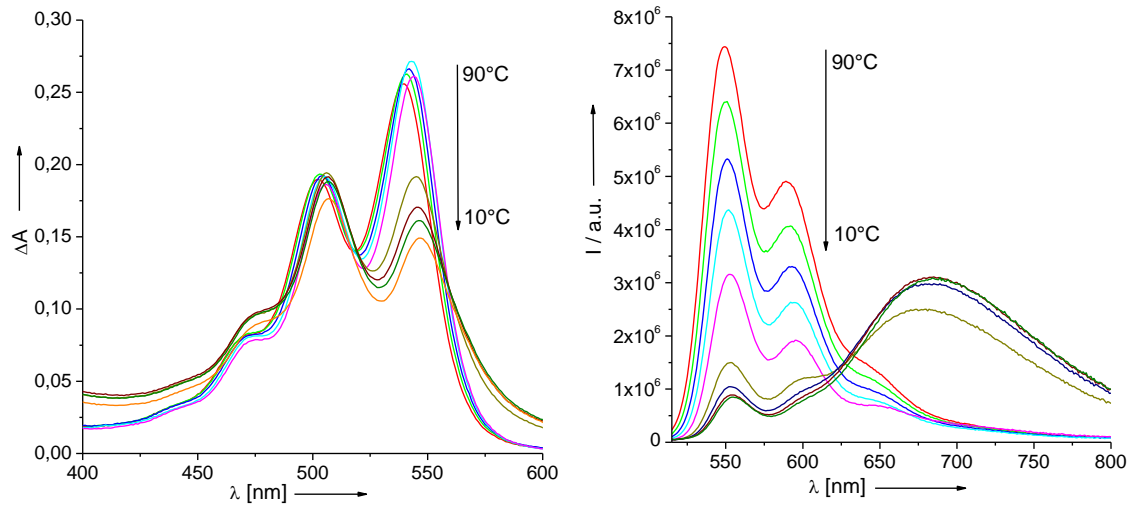


Abb. 73: Temperaturabhängige Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **YDNA1** (2,0 μM , in 10 mM NaP_i -Puffer, pH = 7,0, 250 mM NaCl).

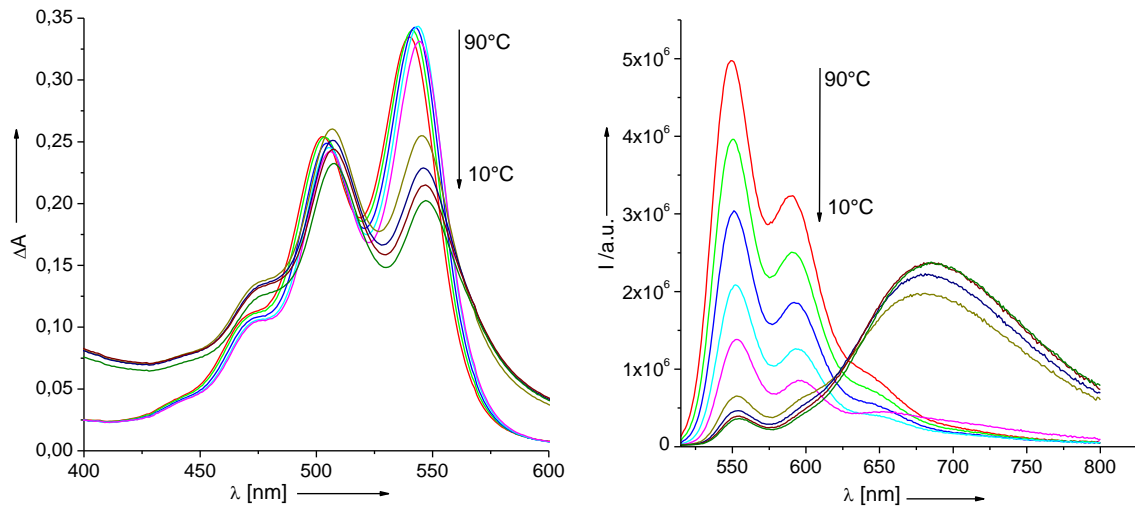


Abb. 74: Temperaturabhängige Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **XDNA1**, (2,0 μM , in 10 mM NaP_i -Puffer, pH = 7,0, 250 mM NaCl).

VII. Ergänzende Spektren und Tabelle

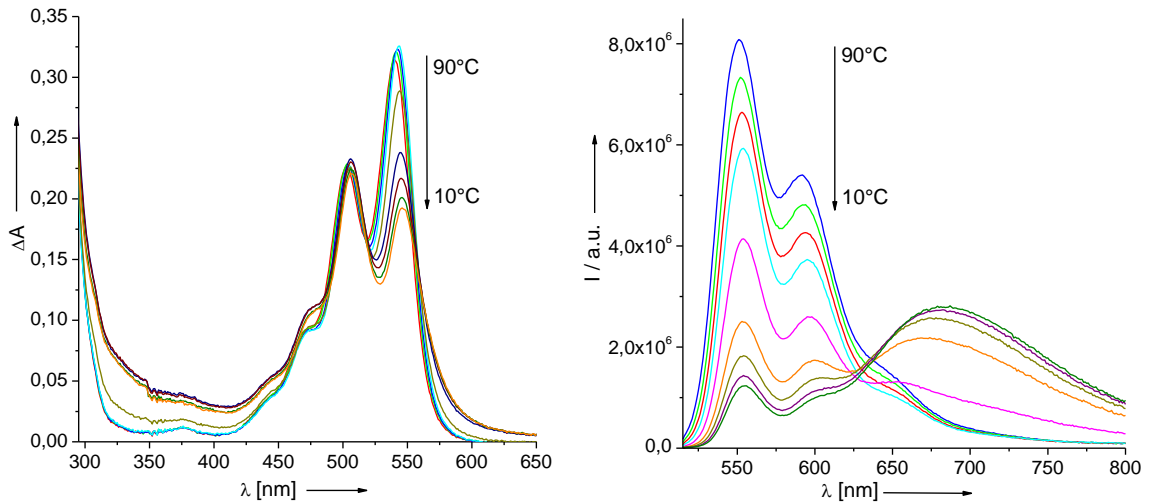


Abb. 75: Temperaturabhängige Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **YDNA6** mit 5 eq EDTA ($2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, pH = 7,0, 250 mM NaCl).

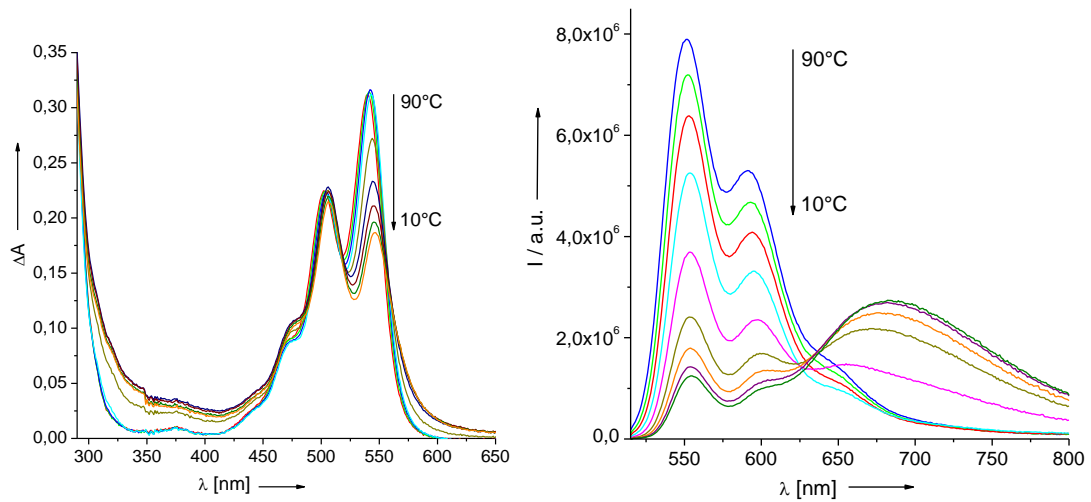


Abb. 76: Temperaturabhängige Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **YDNA6** mit 1,1 eq FeCl_3 ($2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, pH = 7,0, 250 mM NaCl).

2. Einzelbasendiskriminierungsexperimente mit Pyrrolidinyl-PNA

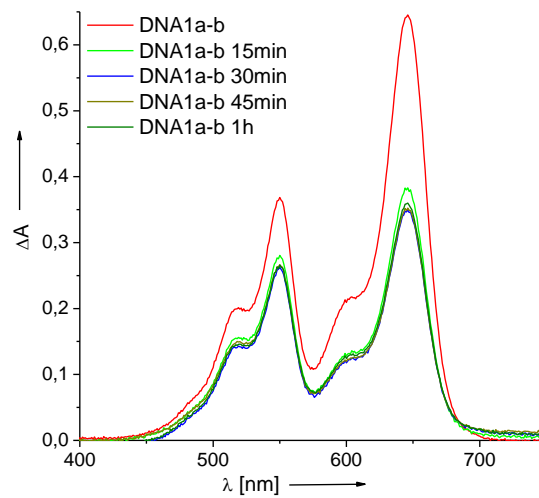


Abb. 77: UV/Vis-Absorption von **DNA1a-b** während der Hybridisierung mit **DNA0** enthaltenen Fe_xO_y -Partikel ($2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, $\text{pH} = 7,0$, 250 mM NaCl).

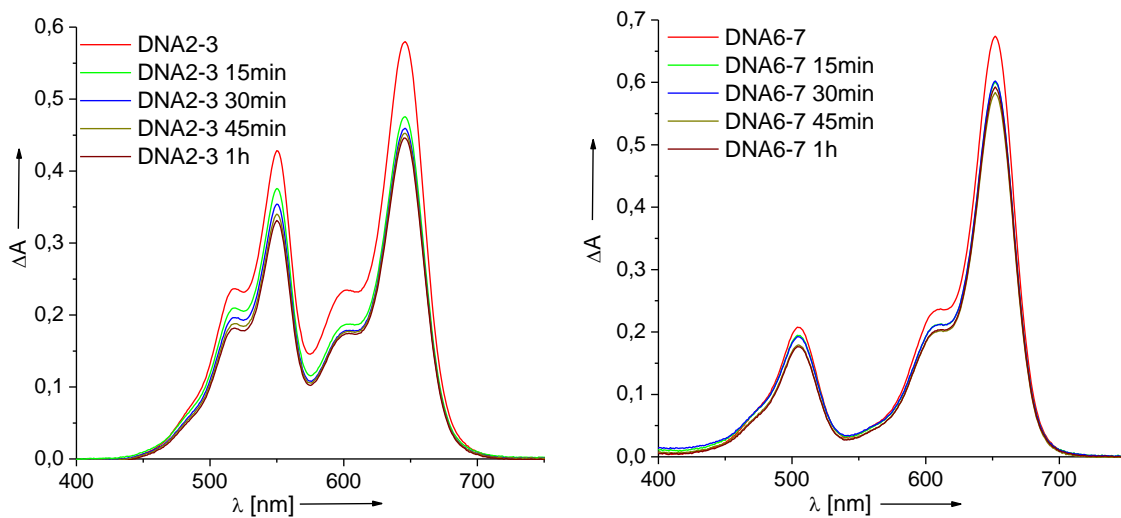


Abb. 78: UV/Vis-Absorption von **DNA2-3** (links) und **DNA6-7** (rechts) während der Hybridisierung mit **PNA2** enthaltenen Fe_xO_y -Partikel ($2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, $\text{pH} = 7,0$, 250 mM NaCl).

VII. Ergänzende Spektren und Tabelle

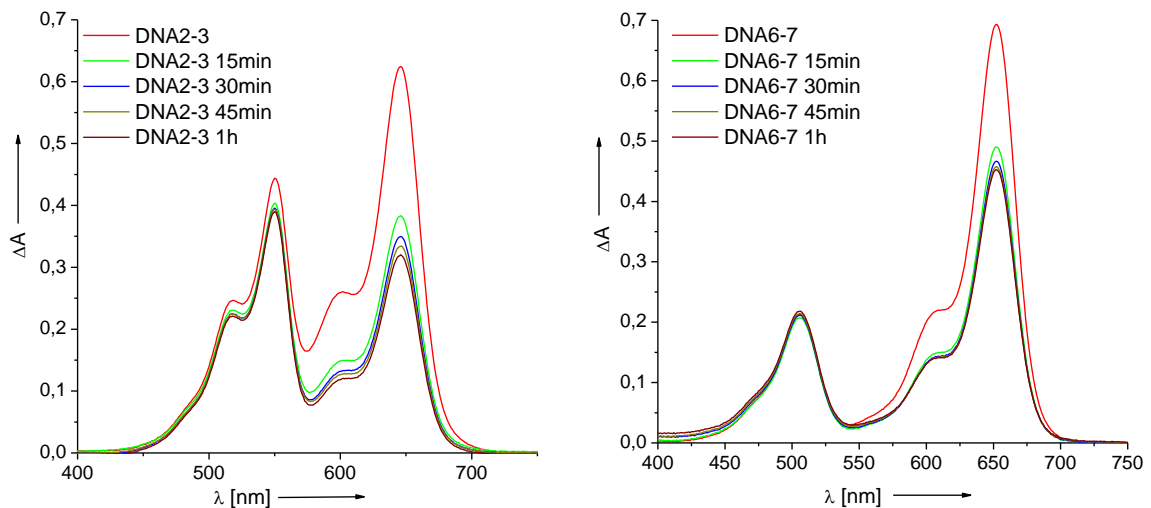


Abb. 79: UV/Vis-Absorption von **DNA2-3** (links) und **DNA6-7** (rechts) während der Hybridisierung mit **PNA3** enthaltenen Fe_xO_y -Partikel ($2,5 \mu\text{M}$ in 10mM NaP_i -Puffer, $\text{pH} = 7,0$, 250mM NaCl).

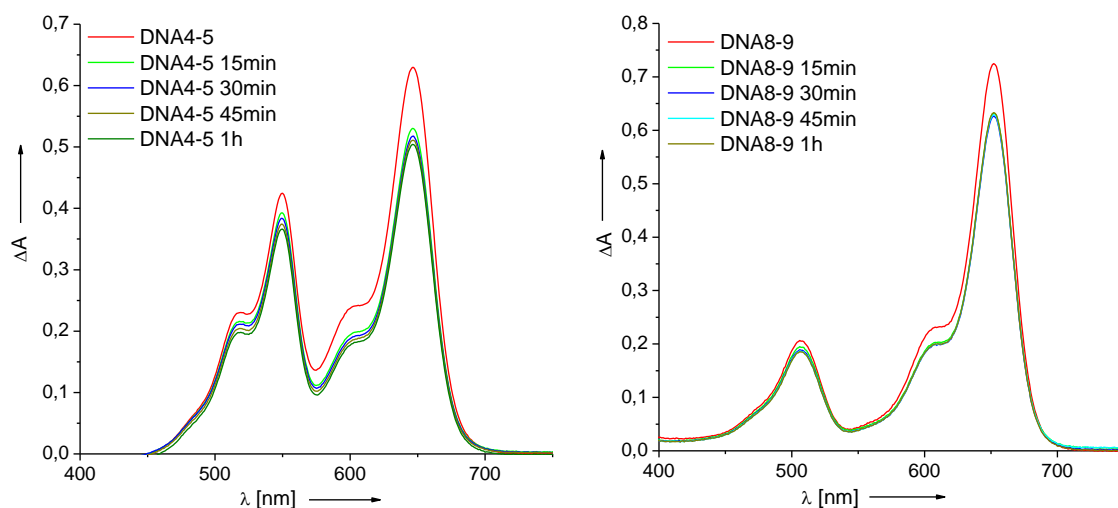


Abb. 80: UV/Vis-Absorption von **DNA4-5** (links) und **DNA8-9** (rechts) während der Hybridisierung mit **PNA4** enthaltenen Fe_xO_y -Partikel ($2,5 \mu\text{M}$ in 10mM NaP_i -Puffer, $\text{pH} = 7,0$, 250mM NaCl).

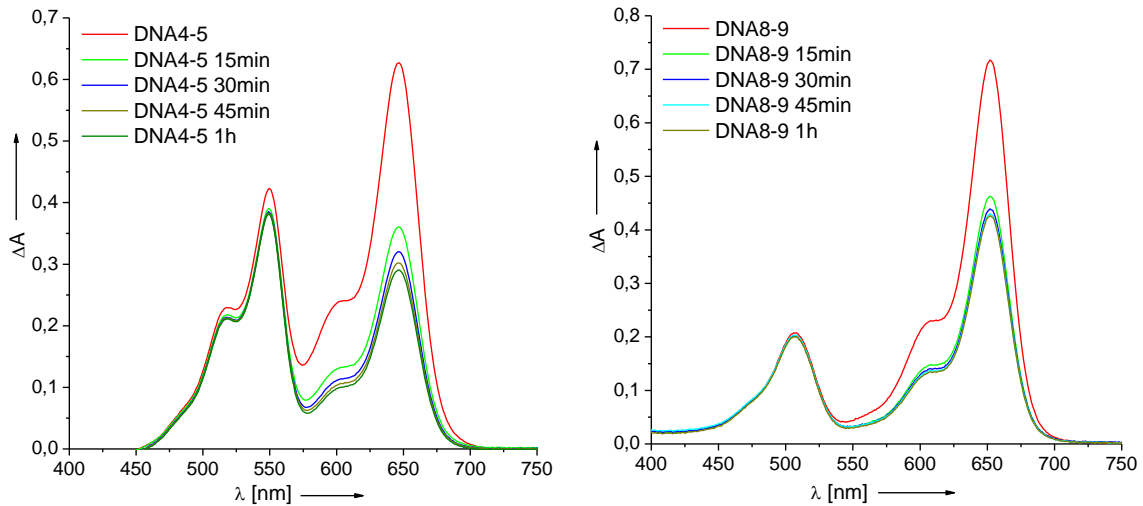


Abb. 81: UV/Vis-Absorption von **DNA4-5** (links) und **DNA8-9** (rechts) während der Hybridisierung mit **PNA5** enthaltenen Fe_xO_y-Partikel (2,5 μM in 10mM NaPi-Puffer, pH = 7,0, 250 mM NaCl).

Tabelle 25: Schmelztemperaturen unmodifizierter PNA-DNA und DNA-DNA-Duplexe entsprechend des Proteins p53.

Strang	Codon	Match	Codon	T _m [°C]	Mismatch	Codon	T _m [°C]	ΔT _m [°C]
PNA2	C<u>G</u>C	DNA16	G<u>C</u>G	69,2	DNA17	G<u>I</u>G	53,2	16,0
PNA3	C<u>A</u>C	DNA17	G<u>I</u>G	36,3	DNA16	G<u>C</u>G	69,8	33,5
DNA12	C<u>G</u>C	DNA16	G<u>C</u>G	66,3	DNA17	G<u>I</u>G	55,8	10,6
DNA13	C<u>A</u>C	DNA17	G<u>I</u>G	43,1	DNA16	G<u>C</u>G	62,3	19,2
PNA4	C<u>G</u>G	DNA18	G<u>C</u>C	70,0	DNA19	G<u>I</u>C	56,6	13,4
PNA5	C<u>A</u>G	DNA19	G<u>I</u>C	68,3	DNA18	G<u>C</u>C	47,2	21,1
DNA14	C<u>G</u>G	DNA18	G<u>C</u>C	63,9	DNA19	G<u>I</u>C	53,5	10,4
DNA15	C<u>A</u>G	DNA19	G<u>I</u>C	61,1	DNA18	G<u>C</u>C	45,9	15,2

VIII. Literaturverzeichnis

- [1] L. M. Smith, *Nature* **2010**, *465*, 167-168.
- [2] Y. Krishnan, F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3124-3156.
- [3] F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5884-5887.
- [4] R. P. Goodman, R. M. Berry, A. J. Turberfield, *Chem. Commun.* **2004**, 1372-1373.
- [5] C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6992-6993.
- [6] Y. He, T. Ye, M. Su, C. Zhang, A. E. Ribbe, W. Jiang, C. Mao, *Nature* **2008**, *452*, 198-201.
- [7] W. M. Shih, J. D. Quisbe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618-621.
- [8] 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*, 73-76.
- [9] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414-418.
- [10] J. Zimmermann, M. P. J. Cebulla, S. Mönninghoff, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3626-3630.
- [11] C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7414-7417.
- [12] 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.
- [13] P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 16-20.
- [14] J. Liu, Z. Cao, Y. Lu, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1948-1998.
- [15] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823.
- [16] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [17] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, *321*, 1795-1799.
- [18] X. Wang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8169-8176.
- [19] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237-247.
- [20] J. Watson, F. A. Hays, P. S. Ho, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3017-3027.
- [21] J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631-633.
- [22] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- [23] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427-431.
- [24] S. S. Simmel, P. C. Nickels, T. Liedl, *Acc. Chem. Res.* **2014**.
- [25] J. Shi, D. E. Bergstrom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 111-113.
- [26] M. S. Shchepinov, K. U. Mir, J. K. Elder, M. D. Frank-Kamenetskii, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3035-3041.
- [27] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3311-3315.
- [28] F. A. Aldaye, H. F. Sleiman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2204-2209.
- [29] T. J. Bandy, A. Brewer, J. R. Burns, G. Marth, ThaoNguyen, E. Stulz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 138-148.
- [30] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2009**, 2615-2624.
- [31] C. K. McLaughlin, G. S. Hamblin, H. F. Sleiman, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5647-5656.

- [32] G. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226-6236.
- [33] W. Schmucker, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2012**, *23*, 2435-2448.
- [34] H. Yang, K. L. Metera, H. F. Sleiman, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2403-2415.
- [35] D. Mitra, N. Di Cesare, H. F. Sleiman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5804-5808.
- [36] H. Yang, K. L. Metera, H. F. Sleiman, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2403-2415.
- [37] K. M. Stewart, J. Rojo, L. W. McLaughlin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5808-5811.
- [38] K. M. Stewart, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2050-2057.
- [39] R. M. Watson, Y. A. Skorik, G. K. Patra, C. Achim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14628-14639.
- [40] B. P. Gilmartin, K. Ohr, R. L. McLaughlin, R. Koerner, M. E. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9546-9555.
- [41] R. M. Franzini, R. M. Watson, G. K. Patra, R. M. Breece, D. L. Tierney, M. P. Hendrich, C. Achim, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9798-9811.
- [42] K. Wiederholt, L. W. McLaughlin, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2487-2493.
- [43] M. Rodriguez-Ramos, J. Wilker, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 629-639.
- [44] J.-L. H. A. Duprey, Y. Takezawa, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1212-1216.
- [45] N. Düpre, L. Welte, J. Gómez-Herrero, F. Zamora, J. Müller, *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 985-992.
- [46] J. Ferguson, C. J. Hawkins, L. A. P. Kane-Maguire, H. Lip, *Inorg. Chem.* **1969**, *8*, 771-779.
- [47] F. Vogtle, *Supramolekulare Chemie: Eine Einführung*, Teubner-Verlag, **1992**.
- [48] K. H. W. Herbst, *Industrial Pigments: Production, Properties, Applications*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [49] C. Huang, S. Barlow, S. R. Marder, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2386-2407.
- [50] H. Langhals, *Heterocycles* **2005**, *88*, 1309-1343.
- [51] H. Langhals, *Heterocycles* **1995**, *40*, 477-500.
- [52] A. F. X. Zhan, S. Barlow, T. J. Marks, M. A. Ratner, M. R. Wasielewski, W. R. Marder, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 268-284.
- [53] M. Stolte, F. Würthner, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5109-5115.
- [54] M. A. Abdalla, J. Bayer, J. O. Rädler, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3967-3970.
- [55] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6640-6645.
- [56] S. Bevers, T. P. O'Dea, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11004-11005.
- [57] S. Bevers, S. Schutte, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5905-5915.
- [58] N. Bouquin, V. L. Malinovskii, R. Häner, *Chem. Commun.* **2008**, 1974-1976.
- [59] N. Rahe, C. Rinn, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 2120-2121.
- [60] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [61] W. Wang, W. Wan, H.-H. Zhou, S. Niu, A. D. Q. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5248-5249.
- [62] Y. Zheng, H. Long, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Chem. Commun.* **2005**, 4795-4797.
- [63] Y. Zheng, H. Long, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Chem. Commun.* **2006**, 3830-3832.

- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] B. A. Jones, A. Facchetti, M. R. Wasielewski, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15259-15278.
- [67] F. Würthner, *Chem. Commun.* **2004**, 1564-1579.
- [68] T. M. Wilson, T. A. Zeidan, M. Hariharan, F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2385-2388.
- [69] F. Würthner, C. Thalacker, S. Diele, C. Tschierske, *Chem.-Eur.J.* **2001**, *7*, 2245-2253.
- [70] A. D. Q. Li, W. Wang, L.-Q. Wang, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4594-4601.
- [71] T. Tang, J. Qu, K. Müllen, S. E. Webber, *Langmuir* **2006**, *22*, 7610-7616.
- [72] L. Zang, Y. Che, J. S. Moore, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1596-1608.
- [73] J. Baram, E. Shirman, N. Ben-Shitrit, A. Ustinov, H. Weissman, I. Pinkas, S. G. Wolf, B. Rybtchinski, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14966-14967.
- [74] X. Zhang, S. Rehm, M. M. Safont-Sempere, F. Würthner, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 623-629.
- [75] T. F. A. De Greef, M. M. J. Smulders, M. Wolfs, A. P. H. J. Schenning, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5687-5754.
- [76] P. P. Neelakandan, Z. Pan, M. Hariharan, Y. Zheng, H. Weissman, B. Rybtchinski, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15808-15813.
- [77] D. Görl, X. Zhang, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2-23.
- [78] E. E. Jelly, *Nature* **1936**, *138*, 1009-1010.
- [79] K. Norland, S. Kenneth, A. Ames, T. Taylor, *Photogr. Sci. Eng.* **1970**, *14*, 295-307.
- [80] M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- [81] F. Fennel, S. Wolter, Z. Xie, P.-A. Plötz, O. Kühn, F. Würthner, S. Lochbrunner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18722-18725.
- [82] S. Ghosh, X.-Q. Li, V. Stepanenko, F. Würthner, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11343-11357.
- [83] Z. Chen, B. Fimmel, F. Würthner, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5845-5855.
- [84] H. Langhals, *Heterocycles* **1995**, *40*, 477-500.
- [85] G. Seybold, A. Stange, Patent: *DE 35 45 004*, **1987**.
- [86] G. Seybold, G. Wagenblast, *Dyes Pigm.* **1989**, *11*, 303-317.
- [87] S. Bevers, S. Schutte, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5905-5915.
- [88] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2652-2654.
- [89] E. Stulz, G. Clever (Eds.), *DNA in supramolecular chemistry and nanotechnology*, John Wiley & Sons, Ltd., **2014**, im Druck.
- [90] F. Würthner, Z. Chen, V. Dehm, V. Stepanenko, *Chem. Commun.* **2006**, 1188-1190.
- [91] W. Wang, L.-S. Li, G. Helms, H.-H. Zhou, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 1120-1121.
- [92] S. Bevers, S. Schutte, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5905-5915.

- [93] R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227-1230.
- [94] T. A. Zeidan, M. Hariharan, K. Siegmund, F. D. Lewis, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 916-922.
- [95] R. Carmieli, T. A. Zeidan, R. F. Kelley, Q. Mi, F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 4691-4700.
- [96] F. Menacher, V. Stepanenko, F. Würthner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6683-6688.
- [97] N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1971-1978.
- [98] K. Lund, A. J. Manzo, N. Dabby, N. Michelotti, A. Johnson-Buck, J. Nangreave, S. Taylor, R. Pei, M. N. Stojanovic, N. G. Walter, E. Winfree, H. Yan, *Nature* **2010**, *465*, 206-210.
- [99] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature* **2010**, *465*, 202-205.
- [100] J. Zheng, J. J. Birktoft, Y. Chen, T. Wang, R. Sha, P. E. Constantinou, S. L. Ginell, C. Mao, N. C. Seeman, *Nature* **2009**, *461*, 74-77.
- [101] M. H. Hansen, P. Blakskjær, L. K. Petersen, T. H. Hansen, J. W. Højfeldt, K. V. Gothelf, N. J. V. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1322-1327.
- [102] I. T. Seemann, V. Singh, M. Azarkh, M. Drescher, J. S. Hartig, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4706-4709.
- [103] M. Probst, D. Wenger, S. M. Biner, R. Haner, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 755-759.
- [104] R. Heck, F. Dumarcay, A. Marsura, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2438-2445.
- [105] Q. Xiao, Y. Liu, Y. Qiu, G. Zhou, C. Mao, Z. Li, Z.-J. Yao, S. Jiang, *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 525-533.
- [106] F. Würthner, V. Stepanenko, Z. Chen, C. R. Saha-Möller, N. Kocher, D. Stalke, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7933-7939.
- [107] F. Menacher, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4564-4570.
- [108] 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**, *140*, 12858-12859.
- [109] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [110] T. Bentin, G. I. Hansen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5790-5799.
- [111] M. Li, T. Zengeya, E. Rozners, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8676-8681.
- [112] C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka, T. Vilaivan, *Art. DNA: PNA & XNA* **2011**, *2*, 50-59.
- [113] P. E. Nielsen, M. Egholm, *Peptide Nucleic Acids, Protocols and Applications*, Horizon Press, Norfolk, **1999**.
- [114] A. RAY, B. NORDÉN, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041-1060.
- [115] L. Good, P. E. Nielsen, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 355-358.
- [116] E. Peter, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 71-75.
- [117] D. R. Corey, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 224-229.
- [118] P. E. Nielsen, *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 105-110.
- [119] P. E. Nielsen, *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 786-804.
- [120] V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 404-412.
- [121] Vaijayanti A. Kumar, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002, 2021-2032.
- [122] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1997**, *240*, 778-782.
- [123] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 3-7.

- [124] P. Zhou, M. Wang, L. Du, G. W. Fisher, A. Waggoner, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6878-6879.
- [125] M. C. de Koning, G. A. van der Marel, M. Overhand, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 734-740.
- [126] M. Eriksson, P. E. Nielsen, L. Good, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7144-7147.
- [127] J. Wengel, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 301-310.
- [128] E. Lescrinier, R. Esnouf, J. Schraml, R. Busson, H. A. Heus, C. W. Hilbers, P. Herdewijn, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 719-731.
- [129] B. Allart, K. Khan, H. Rosemeyer, G. Schepers, C. Hendrix, K. Rothenbacher, F. Seela, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2424-2431.
- [130] D. S. Robinson, J. P. Greenstein, *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 383-388.
- [131] T. R. Webb, C. Eigenbrot, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3009-3016.
- [132] K. N. Ganesh, P. E. Nielsen, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 931.
- [133] J. K. Pokorski, M. A. Witschi, B. L. Purnell, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15067-15073.
- [134] E. A. Englund, Q. Xu, M. A. Witschi, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16456-16457.
- [135] N. Zhang, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8424-8425.
- [136] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897-1900.
- [137] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.
- [138] T. Vilaivan, C. Suparpprom, P. Harnyuttanakorn, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533-5536.
- [139] T. Vilaivan, G. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326-9327.
- [140] T. Vilaivan, C. Suparpprom, P. Duanglaor, P. Harnyuttanakorn, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1663-1666.
- [141] C. Suparpprom, C. Srisuwannaket, P. Sangvanich, T. Vilaivan, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2833-2837.
- [142] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V. P. Hoven, X. Su, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1064-1069.
- [143] 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.
- [144] D. Altshuler, V. J. Pollara, C. R. Cowles, W. J. Van Etten, J. Baldwin, L. Linton, E. S. Lander, *Nature* **2000**, *407*, 513-516.
- [145] B. E. G. Rothberg, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 209-211.
- [146] A.-C. Syvanen, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 930-942.
- [147] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 505-508.
- [148] C. P. Leo, S. Y. Hsu, A. J. W. Hsueh, *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 369-381.
- [149] M. Cargill, D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemesh, L. Ziaugra, L. Friedland, A. Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G. Q. Daley, E. S. Lander, *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 231-238.
- [150] M. Stoneking, *Nature* **2001**, *409*, 821-822.
- [151] A. Chakravarti, *Nature* **2001**, *409*, 822-823.
- [152] J. G. Hacia, J.-B. Fan, O. Ryder, L. Jin, K. Edgemon, G. Ghandour, R. A. Mayer, B. Sun, L. Hsie, C. M. Robbins, L. C. Brody, D. Wang, E. S. Lander, R. Lipshutz, S. P. A. Fodor, F. S. Collins, *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 164-167.

- [153] K. H. Buetow, M. N. Edmonson, A. B. Cassidy, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 323-325.
- [154] G. Marth, R. Yeh, M. Minton, R. Donaldson, Q. Li, S. Duan, R. Davenport, R. D. Miller, P.-Y. Kwok, *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 371-372.
- [155] R. W. Mahley, S. C. Rall, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2000**, *1*, 507-537.
- [156] N. Jacobsen, J. Bentzen, M. Meldgaard, M. H. Jakobsen, M. Fenger, S. Kauppinen, J. Skouv, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e100.
- [157] E. R. Martin, E. H. Lai, J. R. Gilbert, A. R. Rogala, A. J. Afshari, J. Riley, K. L. Finch, J. F. Stevens, K. J. Livak, B. D. Slotterbeck, S. H. Slifer, L. L. Warren, P. M. Conneally, D. E. Schmechel, I. Purvis, M. A. Pericak-Vance, A. D. Roses, J. M. Vance, *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *67*, 383-394.
- [158] A. Grupe, S. Germer, J. Usuka, D. Aud, J. K. Belknap, R. F. Klein, M. K. Ahluwalia, R. Higuchi, G. Peltz, *Science* **2001**, *292*, 1915-1918.
- [159] K. J. Livak, *Genet. Anal. - Biomol. Eng.* **1999**, *14*, 143-149.
- [160] K. Lindblad-Toh, E. Winchester, M. J. Daly, D. G. Wang, J. N. Hirschhorn, J.-P. Lavolette, K. Ardlie, D. E. Reich, E. Robinson, P. Sklar, N. Shah, D. Thomas, J.-B. Fan, T. Gingeras, J. Warrington, N. Patil, T. J. Hudson, E. S. Lander, *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 381-386.
- [161] K. Irizarry, V. Kustanovich, C. Li, N. Brown, S. Nelson, W. Wong, C. J. Lee, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 233-236.
- [162] P. Ross, L. Hall, I. Smirnov, L. Haff, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 1347-1351.
- [163] V. Lyamichev, A. L. Mast, J. G. Hall, J. R. Prudent, M. W. Kaiser, T. Takova, R. W. Kwiatkowski, T. J. Sander, M. de Arruda, D. A. Arco, B. P. Neri, M. A. D. Brow, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 292-296.
- [164] M. K. Halushka, J.-B. Fan, K. Bentley, L. Hsie, N. Shen, A. Weder, R. Cooper, R. Lipshutz, A. Chakravarti, *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 239-247.
- [165] G. T. Marth, I. Korf, M. D. Yandell, R. T. Yeh, Z. Gu, H. Zakeri, N. O. Stitzel, L. Hillier, P.-Y. Kwok, W. R. Gish, *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 452-456.
- [166] *Nature* **2001**, *409*, 928-933.
- [167] M. Komiyama, S. Ye, Liang, Y. Yamamoto, T. Tomita, J.-M. Zhou, H. Aburatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3758-3762.
- [168] R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 5487-5502.
- [169] G. Bao, W. J. Rhee, A. Tsourkas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 25-47.
- [170] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9686-9687.
- [171] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4820-4827.
- [172] T. Kubota, S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, *PLoS One* **2010**, *5*, e13003.
- [173] H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097-1103.
- [174] K. L. Robertson, L. Yu, B. A. Armitage, A. J. Lopez, L. A. Peteanu, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6066-6074.
- [175] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1931-1934.
- [176] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2051-2060.
- [177] P. J. Hrdlicka, B. R. Babu, M. D. Sorensen, N. Harrit, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*.
- [178] L. Wang, C. J. Yang, C. D. Medley, S. A. Benner, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15664-15665.
- [179] Y. Wu, C. J. Yang, L. L. Moroz, W. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3025-3028.

- [180] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.
- [181] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J.-i. Andoh, K.-i. Morio, T. Doi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401-5404.
- [182] K. K. Jensen, H. Ørum, P. E. Nielsen, B. Nordén, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5072-5077.
- [183] K. Matsumoto, E. Nakata, T. Tamura, I. Saito, Y. Aizawa, T. Morii, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5034-5040.
- [184] L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 114-125.
- [185] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.
- [186] V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2103-2107.
- [187] J. O. Smith, D. A. Olson, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2686-2695.
- [188] B. Datta, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9612-9619.
- [189] C. M. Micklitsch, B. Y. Oquare, C. Zhao, D. H. Appella, *Anal. Chem.* **2012**, *85*, 251-257.
- [190] W. J. Kim, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 815-820.
- [191] Z.-S. Huang, W.-H. Su, J.-L. Wang, H.-N. Wu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5685-5693.
- [192] F. H. Martin, M. M. Castro, F. Aboul-ela, I. Tinoco, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 8927-8938.
- [193] N. E. Watkins, J. SantaLucia, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6258-6267.
- [194] X. Sun, J. K. Lee, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1848-1854.
- [195] C. Boonlua, C. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht, T. Vilaivan, *Chem. Asian J.* **2011**, *12*, 3251-3259.
- [196] B. Ditmangklo, C. Boonlua, C. Suparpprom, T. Vilaivan, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 614-625.
- [197] G. P. H. Dietz, M. Böhr, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *27*, 85-131.
- [198] R. Langer, N. A. Peppas, *AIChE Journal* **2003**, *49*, 2990-3006.
- [199] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1382-1395.
- [200] A. Rolland, *Advanced Gene Delivery: From Concepts to Pharmaceutical Products*, Harwood, Amsterdam, **1999**.
- [201] W. C. Heiser, *Gene Delivery to Mammalian Cells*, Humana Press, New Jersey, **2004**.
- [202] D. P. Lane, *Nature* **1992**, *358*, 15-16.
- [203] A. J. Levine, *Cell* **1997**, *88*, 323-331.
- [204] L. Römer, C. Klein, A. Dehner, H. Kessler, J. Buchner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6590-6611.
- [205] C. Chang, D. T. Simmons, M. A. Martin, P. T. Mora, *J. Virol.* **1979**, *31*, 463-471.
- [206] D. P. Lane, L. V. Crawford, *Nature* **1979**, *278*, 261-263.
- [207] D. I. H. Linzer, A. J. Levine, *Cell* **1979**, *17*, 43-52.
- [208] T. Soussi, Y. Legros, R. Lubin, K. Ory, B. Schlichtholz, *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 1-9.
- [209] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, *408*, 307-310.
- [210] T. Soussi, C. C. d. Fromentel, P. May, *Oncogene* **1990**, *5*, 945-952.
- [211] T. Soussi, P. May, *J. Mol. Biol.* **1996**, *260*, 623-637.
- [212] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 68-76.

- [213] M. Olivier, R. Eeles, M. Hollstein, M. A. Khan, C. C. Harris, P. Hainaut, *Hum. Mutat.* **2002**, *19*, 607-614.
- [214] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 68-76.
- [215] P. Lamb, L. Crawford, *Mol. Cell Biol.* **1986**, *6*, 1379-1385.
- [216] S. Pan, X. Sun, J. K. Lee, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *253*, 238-248.
- [217] P. S. Ho, C. A. Frederick, G. J. Quigley, G. A. v. d. Marel, J. H. v. Boom, A. H. Wang, R. Rich, *EMBO J.* **1985**, *4*, 3617-3623.
- [218] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [219] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.
- [220] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [221] D. Kunz, *Chem. Unserer Zeit* **2009**, *43*, 224-230.
- [222] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *2*, 565-598.
- [223] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [224] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711.
- [225] F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207-4220.
- [226] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507.
- [227] H. T. Ten Brink, J. T. Meijer, R. V. Geel, M. Damen, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 686-692.
- [228] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
- [229] T. Liebert, C. Hänsch, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 208-213.
- [230] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [231] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165.
- [232] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [233] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.
- [234] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. Narducci Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7003-7008.
- [235] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [236] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398-1399.
- [237] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [238] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [239] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [240] A. Samanta, A. Krause, A. Jaschke, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1313-1316.
- [241] F. Seela, S. A. Ingale, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 284-295.
- [242] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [243] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388-1405.
- [244] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolor, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993-18001.
- [245] M. Shelbourne, T. B. Jr, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11184-11186.
- [246] Z. Li, T. S. Seo, J. Ju, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3143-3146.
- [247] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.

- [248] H. Meier, H. Petersen, H. Kolshorn, *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 2398-2409.
- [249] R. B. Turner, A. D. Jarrett, P. Goebel, B. J. Mallon, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 790-792.
- [250] K. J. Shea, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4846-4855.
- [251] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644-648.
- [252] H.-J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 637-643.
- [253] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [254] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [255] S. M. van den Bosch, R. Rossin, P. Renart Verkerk, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, J. Lub, M. S. Robillard, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 415-423.
- [256] I. S. Marks, J. S. Kang, B. T. Jones, K. J. Landmark, A. J. Cleland, T. A. Taton, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1259-1263.
- [257] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [258] N. K. Devaraj, R. Weissleder, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816-827.
- [259] J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *Aldrichim. Acta* **2010**, *43*, 15-23.
- [260] M. F. Debets, C. W. J. v. d. Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. v. Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168-1184.
- [261] D. H. Ess, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10646-10647.
- [262] D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1633-1636.
- [263] K. Chenoweth, D. Chenoweth, W. A. Goddard III, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 5255-5258.
- [264] E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799-11805.
- [265] B. R. Varga, M. Kallay, K. Hegyi, S. Beni, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 822-828.
- [266] B. C. Sanders, F. Friscourt, P. A. Ledin, N. E. Mbua, S. Arumugam, J. Guo, T. J. Boltje, V. V. Popik, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *133*, 949-957.
- [267] R. H. E. Hudson, A. Ghorbani-Choghamarani, *Synlett* **2007**, 870-873.
- [268] Y. Saito, K. Matsumoto, S. S. Bag, S. Ogasawara, K. Fujimoto, K. Hanawa, I. Saito, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3578-3588.
- [269] T. R. Battersby, D. N. Ang, P. Burgstaller, S. C. Jurczyk, M. T. Bowser, D. D. Buchanan, R. T. Kennedy, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9781-9789.
- [270] J. A. Brazier, T. Shibata, J. Townsley, B. F. Taylor, E. Frary, N. H. Williams, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1362-1371.
- [271] G. B. Cserép, K. N. Enyedi, A. Demeter, G. Mező, P. Kele, *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 494-502.
- [272] A. Demeter, T. Bérces, K. A. Zachariasse, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 4611-4621.
- [273] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [274] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [275] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.
- [276] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4977-4986.
- [277] R. Heck, F. Dumarcay, A. Marsura, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2438-2445.

- [278] T. Brown, A. H. El-Sagheer, Patent: *US 2013/0231473A1*, **2013**.
[279] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.

IX. Anhang

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- C. Stubinitzky, T. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht: The base discriminating potential of pyrrolidinyI PNA demonstrated by magnetic Fe₃O₄ particles, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12*, 3586-3589.
- C. Stubinitzky, A. Bijeljanin, L. Antusch, D. Ebeling, H. Hölscher, H.-A. Wagenknecht: Bifunctional DNA Architectonics: Three-Way Junctions with Sticky Perylene Bisimide Caps and Central Metal Lock, *Chemistry - a European Journal* **2014**, *20*, 12009 – 12014.
- C. Stubinitzky, G. B. Cserép, E. Bätzner, P. Kele, H.-A. Wagenknecht: 2'-Uridine Conjugated with a Reactive Monobenzocyclooctyne as a DNA Building Block for Copper-Free Click-type Postsynthetic Modification of DNA, *Chemical Communications* **2014**, *50*, 11218-11221
- C. Wellner, C. Stubinitzky, H.-A. Wagenknecht, Metal ion-mediated and perylenebisimide-mediated DNA architectures in:
E. Stulz, G. Clever (Eds.), *DNA in supramolecular chemistry and nanotechnology*, **2014**, John Wiley & Sons Limited, im Druck

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Karlsruhe, der 01. Oktober 2014

Claudia Stubinitzky