

Funktionelle DNA-Bausteine: GFP-Chromophor,  
pyrenmodifiziertes 2'-Desoxyuridin und bioorthogonale  
Nukleosidtriphosphate

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

Ulrike Wenge

aus

Altdorf b. Nbg.

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012







Denn im Gegensatz zu Ideologien, Religionen oder Weltanschauungen bringen sie [die Wissenschaften] den Menschen nicht bei, WAS sie denken sollen, sondern WIE sie denken sollen.

*Vince Ebert* – Physiker und Kabarettist



---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Ulrike Wenge, geb. Bruckner

Geboren am 04.10.1983

Verheiratet

### Ausbildung

1990-1994            Grundschule Winkelhaid-Penzenhofen

1994-2003           Leibniz Gymnasium Altdorf b. Nbg.

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,7)

2003-2008           Chemiestudium an der Universität Regensburg

Abschluss: Dipl.-Chem. Univ. (Note: 1,3)

Schwerpunkte: Organische Chemie, Anorganische Chemie, Biochemie

### Beruflicher Werdegang

Aug. 2002 & 2003   Hilfskraft im Labor bei ReiColor Chemie-GmbH

2006-2008           Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Organische Chemie

Seit Okt. 2008      Wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe Wagenknecht im Rahmen einer Promotion

2008-2010           Universität Regensburg, Institut für Organische Chemie

2010-2012           Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie

### Poster-Präsentationen

- *Vielberth-Symposium on Functional Nucleic Acids (IV. Nucleinsäurechemie-Treffen) 2009*
- *XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Lyon 2010*
- *XV<sup>th</sup> Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components 2011*
- *5th Nucleic Acid Chemistry Meeting 2011*

**Veröffentlichungen**

- Synthetic GFP Chromophore and Control of Excited-State Proton Transfer in DNA: An Alternative Concept for Fluorescent DNA Labels with Large Apparent Stokes' Shifts; Ulrike Wenge, Hans-Achim Wagenknecht\* *Synthesis* **2011**, 502-508.
- Synthetic GFP chromophore in DNA with large apparent stokes shift; Ulrike Wenge, Hans-Achim Wagenknecht\* *Collection Symposium Series* **2011**, 12, 491-493.
- Photoinduced reductive electron transfer in LNA-DNA hybrids: Control by conformation vs. base stacking; Ulrike Wenge, Jesper Wengel, Hans-Achim Wagenknecht\* *Angewandte Chemie* **2012**, 124, 10168-10172.

**Auszeichnung**

Poster Prize — *XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Lyon*



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis September 2012 am *Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg* und am *Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)* unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die gute Betreuung und die Möglichkeit eigenständig zu forschen.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei

- allen Angehörigen des Arbeitskreises für die angenehme Zusammenarbeit.
- Ulrike Weck und Claudia Sommer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen Belangen.
- den NMR-Abteilungen der *Universität Regensburg* und des *KITs* für die zuverlässige Messung und Interpretation meiner Proben.
- Josef Kiermeier, Wolfgang Söllner, Annette Hochgesand und Karolin Niessner für die Anfertigung der Massenspektren meiner Proben.
- Dr. Frank Streckenbach, Anna-Lena Steck und Prof. Dr. Andreas Marx für die Unterstützung bei den Primerverlängerungsexperimenten.
- Prof. Dr. Jesper Wengel für die Bereitstellung der LNA-Oligonukleotide.
- Prof. Dr. Péter Kele für das cyclooctinmodifizierte Rhodamin 3G.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich vor allem in der Schreibphase unterstützten und bei meinem Mann Andreas, der mir stets zur Seite steht und das Leben so viel schöner macht.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A	Akzeptor
A	Absorption
abs.	absolut
AFM	atomic force microscope
a. u.	arbitrary unit
B <sub>2</sub> pin <sub>2</sub>	Bispinacolatdiboran
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
Bz	Benzoyl
C	Cytosin
<sup>CP</sup> C	<i>N</i> -4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin
CD	Cirkulardichroismus
CED-Cl	2-Cyanethyl- <i>N,N</i> -diisopropylchlorphosphoramidit
CPG	controlled pore glass
Cl	Chemische Ionisation
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition
D	Donor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DME	Dimethylethylenglykol
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DMTr-Cl	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphin)ferrocen

dtbpy	4,4'-Di- <i>tert</i> -butyl-2,2'-dipyridyl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminpropyl)carbodiimid
EE	Ethylacetat
EI	Elektronenionisation
ESI	Elektronensprayionisation
ESIPT	excited-state intramolecular proton transfer
ESPT	excited-state proton transfer
ET	Elektronentransfer
exc	Anregung (excitation)
eq.	Äquivalent
FAM	Fluoreszeinphosphoramidit
FC	Flash-Säulenchromatographie
Fluo	Fluoreszeinmarker
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G	Guanosin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
oGFP	1-(2-Azidethyl)-4-(2-hydroxybenzyliden)-2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-5(4 <i>H</i> )-on
HOAT	1-Hydroxy-7-azabenztriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
Ib	Isobutyryl
IC	internal conversion
IdU	5-Iod-2'-Desoxyuridin
ISC	intersystem crossing
LC	liquid chromatography
LED	Leuchtdiode
LNA	locked nucleotide acid
max	Maximum
MB	Molecular Beacon
MeoGFP	1-(2-Azidethyl)-4-(2-methoxybenzyliden)-2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-5(4 <i>H</i> )- on
MMTr	4-Monomethoxytrityl

---

MS	Massenspektrometrie
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer, pH 7
n. b.	nicht bestimmt
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
NT	Nukleotid
p.A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pATP	2'-O-Propargyladenosintriphosphat
PCR	polymerase chain reaction
pCTP	2'-O-Propargylcytosintriphosphat
PE	Petrolether
pGTP	2'-O-Propargylguanosintriphosphat
PNA	peptide nucleotide acid
pNTP	2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate
pUTP	2'-O-Propargyluridintriphosphat
Py	Pyren
PydA	8-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyadenosin
PydC	5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxycytosin
PydG	8-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyguanosin
1PydU	5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin
2PydU	5-(Pyren-2-yl)-2'-desoxyuridin
PS	Protonenschwamm <sup>®</sup>
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
R.T.	Raumtemperatur
SMFS	single molecule fluorescence spectroscopy
SNP	single nucleotide polymorphism
STM	scanning tunneling microscope
SWNT	single walled carbon nanotube
T	Thymidin
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin

---

TEAA	Triethylammoniumacetatpuffer
TFA	Trifluoracetat
TIPS	Triisopropyl
TIRFM	totale interne Reflektionsfluoreszenzmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMP	Trimethylphosphat
TMS	Trimethylsilyl
TRIS	2-Amin-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tU	5-[3-(4-(6-(Pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamidyl)-(propyn-1-yl)]-2'-desoxyuridin
tUTP	5-[3-(4-(6-(Pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamidyl)-(propyn-1-yl)]-2'-desoxyuridintriphosphat
U	Uridin
VER	vibrational energy relaxation
ZMW	zero-mode waveguide

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Motivation und Themenstellung.....	3
3	Entwicklung einer neuen fluoreszenten DNA-Sonde auf Basis des GFP-Chromophors.....	7
3.1	Fluorophore in Nukleinsäuren.....	7
3.1.1	Grundlagen der Molekülspektroskopie.....	7
3.1.2	Ausgewählte Vertreter von fluoreszenten Farbstoffen in der Nukleinsäureanalytik .....	12
3.1.3	Positionierung von Modifikationen in Nukleinsäuren.....	17
3.1.4	Automatisierte DNA-Festphasensynthese .....	19
3.1.5	Postsynthetische Modifizierung .....	21
3.1.6	Beispiele für Anwendungen fluoreszenter Nukleinsäuren.....	26
3.2	Grün Fluoreszierendes Protein .....	32
3.2.1	Biolumineszenz von Aequorea Aequorea .....	32
3.2.2	Natürliche Entstehung des GFP-Chromophors.....	33
3.2.3	Photochemie des GFP-Chromophors .....	33
3.3	GFP-Analogon als fluoreszente DNA-Sonde .....	37
3.3.1	Synthesestrategie .....	37
3.3.2	Synthese der azidmodifizierten GFP-Chromophore 1 und 2.....	38
3.3.3	Postsynthetische Modifizierung von DNA mit GFP-Analoga.....	40
3.3.4	Spektroskopische Untersuchung von oGFP und MeoGFP .....	40
3.3.5	Charakterisierung von GFP-modifizierter DNA .....	43
3.4	DNA-kontrollierte ES IPT-Prozesse als neues Konzept für fluoreszente Sonden .....	52
4	Bioorthogonale Triphosphate für postsynthetische Klick-Reaktionen.....	53

4.1	Enzymatische DNA-Synthese und Triphosphate .....	54
4.1.1	Polymerasekettenreaktion .....	54
4.1.2	Nukleosidtriphosphatsynthese .....	56
4.1.3	Effizienz des enzymatischen Einbaus von artifiziellen Nukleosidtriphosphaten .....	58
4.1.4	Basenmodifizierte 2'-Desoxynukleosidtriphosphate .....	59
4.1.5	Zuckermodifizierte 5'-Nukleosidtriphosphate .....	60
4.2	2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate .....	62
4.2.1	Synthese von 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphaten .....	62
4.2.2	Primerverlängerungsexperimente mit 2'-O-Propargylnukleosid- triphosphaten .....	63
4.2.3	Postsynthetische Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition .....	69
4.3	5-Tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxyuridintriphosphat .....	72
4.3.1	Synthesestrategie für 5-tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxyuridintriphosphat	72
4.3.2	Synthese des 5-tetrazinmodifizierten 2'-Desoxyuridintriphosphats .....	73
4.3.3	Primerverlängerungsexperimente mit 5-tetrazinmodifiziertem 2'- Desoxyuridintriphosphat .....	76
4.3.4	Postsynthetische Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf..	77
4.4	2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate und 5-tetrazinmodifiziertes 2'- Desoxyuridintriphosphat .....	80
5	Untersuchungen zum Ladungstransfer in Nucleinsäuren mit 2PydU als Elektronendonator .....	82
5.1	Theoretischer Hintergrund zu Ladungstransfer in Nucleinsäuren .....	82
5.1.1	Systeme zur Messung der Leitfähigkeit von Nucleinsäuren .....	83
5.1.2	Photoinduzierter oxidativer Lochtransfer und reduktiver Elektronentransfer in Nucleinsäuren .....	84
5.1.3	DNA vermittelte Ladungstransfermechanismen .....	85
5.1.4	Einflussfaktoren des DNA-vermittelten Ladungstransfers .....	89
5.1.5	Pyren als Ladungsdonor in Nucleinsäuren .....	91
5.1.6	Analyse des photoinduzierten Ladungstransfers .....	94
5.1.7	Struktur von Nucleinsäuren .....	99
5.1.8	Untersuchungen des Ladungstransfers abseits von B-DNA .....	105

---

5.2	2PydU als artifizielles Nukleotid in DNA .....	108
5.2.1	Synthese des 2PydU Bausteins.....	108
5.2.2	Synthese von 2PydU-modifizierter DNA .....	109
5.2.3	Charakterisierung von 2PydU in DNA.....	110
5.2.4	2PydU als Elektronendonator in verschiedenen Nukleinsäuren .....	116
5.3	LNA – Vielversprechender Kandidat für Ladungstransfer .....	126
6	Zusammenfassung.....	127
7	Experimenteller Teil.....	132
7.1	Materialien und Geräte .....	132
7.2	Synthesvorschriften .....	137
7.2.1	oGFP-Chromophore .....	137
7.2.2	2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate (9-12) .....	143
7.2.3	5-Tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxuridintriphosphat .....	146
7.2.4	2PydU .....	154
7.3	DNA-Synthese .....	157
7.3.1	DNA-Synthese nach der Phosphoramiditmethode.....	157
7.3.2	Enzymatische DNA-Synthese .....	159
7.3.3	Postsynthetische Modifizierung .....	160
7.3.4	Charakterisierung der Oligonukleotide.....	161
7.3.5	Hybridisierung.....	164
7.4	Belichtungsexperimente .....	165



# 1 Einleitung

Seit das Leben auf der Erde begann, blieben die Bausteine unseres Erbguts, die Nukleoside Adenosin, Thymidin, Guanosin und Cytidin unverändert.<sup>1</sup> So birgt die Desoxyribonukleinsäure seit Jahrtausenden in ihrer Sequenz den Code dieses Lebens. Ihre einzigartige Struktur aus zwei komplementären Strängen, die eine Doppelhelix bilden, ermöglicht die Replikation und Weitergabe der genetischen Information. Die Grundlage hierfür sind die sich selbst erkennenden Basenpaare.<sup>2</sup>

Die Entschlüsselung des Gencodes mit seinen drei Milliarden Nukleotiden war ein Jahrzehnte alter Traum, der 2000 Wirklichkeit wurde. Bereits 1990, begann in den USA das bis dato größte Forschungsprojekt der Welt mit der Gründung der *Human Genom Organisation* (HUGO). Das öffentlich finanzierte Projekt, mit *Francis Collins* an der Spitze, bekam 1998 durch die kommerziell arbeitende Firma *Celera Genomics* von *Craig Venter* Konkurrenz. Es entbrannte ein regelrechtes Rennen um die erste Genkarte des Menschen.<sup>3</sup> Letztendlich aber verkündeten die beiden zusammen mit *Bill Clinton* 2000 im Weißen Haus die erfolgreiche Sequenzierung des humanen Genoms.<sup>4-5</sup> Es herrschte eine euphorische Stimmung, die sich auch auf die Worte des Präsidenten niederschlug: „Ohne Zweifel halten wir hier die wichtigste und wundervollste Karte in Händen, die Menschen jemals erstellt haben.[...] Die Genomwissenschaft wird die Diagnose, Prävention und Behandlung der meisten, wenn nicht aller menschlicher Krankheiten revolutionieren.“<sup>6</sup>

Was ist, mehr als zehn Jahre später, von diesen Hoffnungen übrig geblieben? *Eric Lander*, Direktor des *Broad Institutes*, bezeichnete die Sequenz von 2001 als „eher ein Meilenstein auf der Reise zu besserer medizinischer Versorgung, als das Ziel.“<sup>7</sup>

Das neu gewonnene Wissen war enorm und zeigte, dass das Genom weitaus komplizierter ist als anfänglich Gedacht.<sup>8</sup> Es gibt nur etwa 21000 Gene und nicht wie vermutet 300000. Das sind nur 1,5 % des gesamten Erbguts. Demnach stellte sich die ursprüngliche These, dass ein Gen für die Produktion eines Proteins verantwortlich sei, als falsch heraus. Es wurde auch erkannt, dass die nicht-codierenden Bereiche der DNA zum Teil für die Produktion von micro-RNA verantwortlich sind. Diese vorher unbekanntes kleinen RNA-Moleküle übernehmen regulatorische Aufgaben in

den Zellen.<sup>9</sup> Mit der nun vorhandenen genetischen Referenz konnte die Evolution des Menschen genauer untersucht werden und so z.B. seine afrikanische Herkunft weiter untermauert werden.<sup>10</sup>

Aus den aufgeworfenen Fragen entstanden ganz neue Forschungsgebiete wie die Untersuchung der regulatorischen Mechanismen der DNA, insbesondere die Epigenetik<sup>11</sup> und die Suche nach Punktmutationen,<sup>12</sup> sogenannten SNPs (single nucleotide polymorphisms), in dem Genom verschiedener Menschen.

In der Medizin dagegen stellte sich schnell Ernüchterung ein. Es zeigte sich, dass für die meisten Erkrankungen mehrere Gene oder sogar ganze Gengruppen verantwortlich sind. Nur langsam werden neue Medikamente z.B. gegen Krebs entwickelt. Der Trend geht aber immer weiter in Richtung personalisierte Medizin, sodass nach vorhergehender Untersuchung des Erbguts ganz individuell behandelt werden kann.

Auch wenn man sich kurzfristig mehr von der Sequenzierung des menschlichen Genoms erhofft hat sind die Auswirkungen auf die Biotechnologie durchaus enorm. In der Entwicklung neuer Sequenziermethoden wurden riesige Fortschritte gemacht.<sup>13-</sup>

<sup>14</sup> Konnte 1990 eine Maschine 25000 Basen pro Wochen lesen, schaffen heutige 25 Milliarden.<sup>8</sup> Für einen personalisierten Behandlungsplan genügt jedoch schon häufig der Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen beim Patienten, sodass die Entwicklung in der molekularen Diagnostik immer weiter fortschreitet.<sup>15-16</sup>

Die chemische Modifizierung von Nukleinsäuren ist dabei ein unverzichtbares Werkzeug. Das Augenmerk liegt besonders auf der Einführung zusätzlicher Funktionalitäten, die sich die strukturierte Anordnung aus zwei komplementären DNA-Strängen und einem vom Wasser abgeschirmten  $\pi$ -Basenstapel im Inneren zu Nutze machen.

Anknüpfend an diesen Sachverhalt beschäftigt sich diese Arbeit mit der Auswirkung von LNA-Bausteinen auf die elektrische Leitfähigkeit der Nukleinsäuren, neuen bioorthogonalen Triphosphaten für die postsynthetische Modifizierung von DNA und der Entwicklung eines neuen Fluorophors mit einer großen apparenten Stokes-Verschiebung.

## 2 Motivation und Themenstellung

### Fluoreszente Sonde auf Basis des GFP-Chromophors

Die fluoreszente DNA-Analytik hat in den letzten 25 Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.<sup>15</sup> Sequenzierung, Molekularbiologie, mRNA-Expressionsstudien, molekulare Diagnostik und Forensik wären ohne lumineszente Moleküle nicht denkbar. Diese sollten kostengünstig, in großem Maßstab herstellbar und leicht in DNA einzubauen sein. Eine Anregungswellenlänge im sichtbaren Bereich des Lichtes wäre wünschenswert, um den Einsatz *in vivo* zu ermöglichen. UV-Licht würde die Schädigung von Gewebe und Erbgut nach sich ziehen. Außerdem können dann kostengünstige LEDs verwendet werden, statt teurer Hg- oder Xe-Lampen. Eine weitere, sehr positive Eigenschaft für einen Fluorophor ist eine große Stokes-Verschiebung. In optischen Geräten zur Auslesung der Fluoreszenz sind stets Anregungs- und Emissionsfilter im Einsatz, die eine Detektion des gestreuten Anregungslichts verhindern. Auf diese könnte bei Verwendung eines Chromophors mit großer Stokes-Verschiebung und schmalbandig emittierender LEDs verzichtet werden. Des Weiteren geht der Trend immer mehr zu ultrasensitiven Methoden, bis hin zur Einzelmoleküldetektion, um z.B. eine zeit- und kostenintensive Probenmengenvergrößerung mittels PCR zu umgehen.<sup>16</sup> Dafür ist es unverzichtbar, die Hintergrundfluoreszenz so gering wie möglich zu halten. Aber vor allem bei der postsynthetischen Modifizierung von Nukleinsäuren treten in der Praxis Probleme mit Resten an ungebundenen Markern auf, die auch durch mehrere Reinigungsschritte nicht entfernt werden können. Dies wird jedoch vermieden, wenn die Marker ihr Emissionsverhalten in Abhängigkeit von der kovalenten Bindung zu dem Oligonukleotid ändern. Ziel dieser Arbeit war es deshalb eine fluoreszente Sonde für DNA zu entwickeln, die diese Eigenschaften besitzt. Auf der Grundlage vorrangegangener Arbeiten<sup>17-18</sup> schien ein Analogon des GFP-Chromophors dafür geeignet.

Die Emission solcher GFP-Analoga (s. Abb. 1, **A**) ist in Lösung durch interne Konversion gelöscht.<sup>19</sup> Innerhalb des Proteins wird die freie Beweglichkeit des Moleküls

gehindert und ein Protonentransfer im angeregten Zustand zu einem nahegelegenen Aminosäurerest findet statt. Beides mündet in einer intensiven Anionenfluoreszenz.<sup>20</sup> Die Verschiebung der Hydroxygruppe von para- in ortho-Position (s. Abb. 1, **B**) ermöglicht einen internen Protonentransfer von der Phenolgruppe zum N2 des Imidazolrings im angeregten Zustand.<sup>18</sup> Dies zeigt sich in einer Rotverschiebung der Emission, sodass eine apparente Stokes-Verschiebung von über 200 nm ( $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ ) resultiert. Diese Tautomerisierung ist aber nur in aprotischen Lösungsmitteln vollständig. In wässrigem Medium besitzt das Molekül eine duale Emission. Die kovalente Anknüpfung von 4-(2-Hydroxybenzyliden)-2-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-on an DNA könnte sowohl eine Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute als auch einen vollständigen Protonentransfer im angeregten Zustand bewirken. Durch die Wechselwirkung mit den Basen sollte die Beweglichkeit des Chromophors gehindert werden und eine Abschirmung von der wässrigen Umgebung stattfinden. Eine neue fluoreszente Sonde für Nukleinsäuren mit großer apparenten Stokes-Verschiebung war das Ziel.

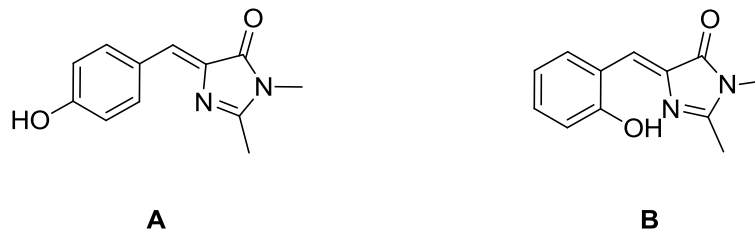


Abb. 1: GFP-Analogon mit para-ständiger (**A**) und ortho-ständiger Hydroxygruppe(**B**)

### Bioorthogonale Triphosphate

Bei der chemischen Modifizierung von Nukleinsäuren spielt natürlich nicht nur das einzuführende Molekül eine Rolle, sondern auch wie es in die DNA-Sequenz eingebaut wird. Zur Herstellung von Oligonukleotiden gibt es im Wesentlichen zwei Methoden. Auf der einen Seite die automatisierte chemische Synthese an der festen Phase<sup>21</sup> und auf der anderen Seite die enzymatische Synthese mit Polymerasen.<sup>22</sup> Prinzipiell sind beide Herangehensweisen dazu geeignet künstliche Bausteine umzusetzen,<sup>23-24</sup> aber Einschränkungen bestehen vor allem bei großen, empfindlichen Molekülen. Deshalb findet die postsynthetische Modifizierung immer mehr Anwendung.<sup>25</sup> Dabei werden kleine orthogonale funktionelle Gruppen in DNA eingeführt, die dann in einem zweiten Schritt mit einer Modifikation reagieren können. Dies ist besonders sinnvoll, wenn DNA-Polymerasen zum Einsatz kommen, weil diese Reportermoleküle von Enzymen besser umgesetzt werden. So ist es möglich hoch-

modifizierte Polynukleotide aus hunderten von Bausteinen herzustellen.<sup>26-27</sup> Die chemische Methode ist nicht in der Lage so lange Stränge zu synthetisieren. Auch ist ihr präparativer Aufwand sehr viel größer, da man einen Syntheseautomaten benötigt. Die enzymatische DNA-Herstellung dagegen braucht außer einem Heizblock prinzipiell keinerlei weitere Geräte, sodass sie in jedem biochemisch ausgerichtetem Labor durchgeführt werden kann.

Bisher wurden aber meist funktionelle Gruppen verwendet, die über lange Linkermoleküle an die Nukleinsäurebasen gebunden sind, sodass eine Wechselwirkung mit der DNA entweder unspezifisch oder gar nicht erfolgt.<sup>28</sup> 2'-O-Propargylnukleoside können mit der Phosphoramiditmethode in Oligonukleotide eingebaut werden<sup>29</sup> und mit Aziden in einer Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Zykloaddition reagieren.<sup>30-31</sup> Die 2'-Position ermöglicht dann eine spezifische Wechselwirkung mit den Basen.<sup>32</sup>

Um diese Verknüpfungsart auch auf längere Oligonukleotide ausweiten zu können, sollten die Triphosphate aller vier 2'-O-Propargylnukleoside synthetisiert (s. Abb. 2), auf ihre Substrateigenschaften gegenüber verschiedener DNA-Polymerasen getestet und bei erfolgreichem enzymatischem Einbau in Nukleinsäuren mit einem Nitrotiazid in einer Zykloaddition umgesetzt werden.

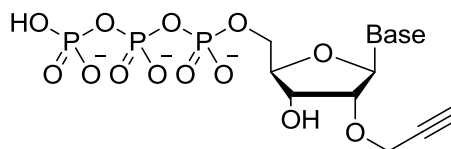


Abb. 2: 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphat

Obwohl sich die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition vielfach in der Biokonjugation bewährt hat,<sup>33</sup> ist die Verwendung von Cu-Ionen doch nachteilig, weil sie zelltoxisch sind.<sup>34</sup> Eine Alternative ist die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf.<sup>35</sup> Dazu sollte ein neues tetrazinmodifiziertes Nukleosid als Dien entwickelt und synthetisiert werden. Es wurde geplant, den Einbau in DNA wieder über Polymerasen durchzuführen, bevor eine postsynthetische Modifizierung mit einem octylsubstituierten Rhodamin 3G in einer [4+2]-Zykloadditionen erfolgen sollte.

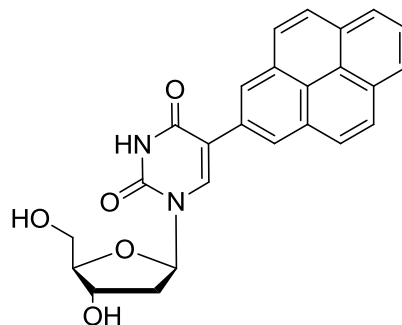
## 2PydU als Elektronendonator in verschiedenen Nukleinsäuren

Der  $\pi$ -Basenstapel im Inneren einer Doppelhelix ist fähig Ladung zu leiten.<sup>36</sup> Dies eröffnet ein weiteres interessantes Forschungsgebiet innerhalb der Nukleinsäurechemie. Bei photoinduziertem Ladungstransfer wird zwischen oxidativem Lochtransfer und reduktivem Elektronentransfer unterschieden.<sup>37</sup> Ersterer verursacht

oxidative Guaninschäden.<sup>38</sup> Diesen entscheidenden Nachteil besitzt der reduktive Elektronentransfer nicht und bietet damit, zusammen mit der Eigenschaft von DNA durch ihre Selbstorganisation komplexe 2- und 3-dimensionale Strukturen zu bilden,<sup>39</sup> die Möglichkeit der Anwendung in der molekularen Elektronik.<sup>40</sup>

Es gibt aber immer noch einige ungeklärte Sachverhalte, wie konformationelle Einflüsse,<sup>41-42</sup> Richtungs-<sup>43-45</sup> und Sequenzabhängigkeit.<sup>46-48</sup> Ohne das tiefere Verständnis für diese Eigenschaften des Elektronentransfers wird ein gezielter Einsatz von Ladungsleitern aus Nucleinsäuren nicht möglich sein. Des Weiteren ist die Effizienz des Elektronentransfers in DNA äußerst gering und es muss nach Wegen gesucht werden diese zu verbessern.<sup>46</sup>

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung des Einflusses der Helixkonformation auf den reduktiven Elektronentransfer in Nucleinsäuren. Dabei sollten DNA-Doppelstränge des B-Typs mit RNA:DNA- und LNA-DNA-Hybriden, des A-Typs verglichen werden. Die beiden Arten von Hybriden sind sich konformationell sehr ähnlich, jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Beweglichkeit. Dies ermöglicht die Differenzierung zwischen dem Einfluss der Helixkonformation und der Flexibilität auf den Elektronentransfer. Als Elektronendonator sollte 5-(Pyren-2-yl)-2'-desoxyuridin (2PydU) zum Einsatz kommen (s. Abb. 3), da es sich in einer vorangegangenen Arbeit als vielversprechender Kandidat für Ladungstransferprozesse über längere Distanzen erwies.<sup>49-50</sup>



**Abb. 3:** Elektronendonator 2PydU

## 3 Entwicklung einer neuen fluoreszenten DNA-Sonde auf Basis des GFP-Chromophors

### 3.1 Fluorophore in Nukleinsäuren

In den letzten 25 Jahren hat die Menschheit erhebliche Fortschritte in den Bereichen Molekularbiologie, DNA-Sequenzierung, mRNA-Expressionsstudien, molekulare Diagnostik und Forensik gemacht. Neben der Möglichkeit, die Probenmenge an Nukleinsäure mit der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reation; PCR) exponentiell zu vergrößern,<sup>51</sup> war die Weiterentwicklung der fluoreszenten DNA-Analytik dafür verantwortlich. Neue Fluorophore,<sup>52</sup> der effizientere Einbau dieser in DNA, sowohl postsynthetisch,<sup>25</sup> als auch über die Phosphoramiditmethode,<sup>24</sup> neue analytische Verfahren und die Verbesserung der Detektion bis hin zu einem einzigen Molekül<sup>16</sup> machten dies möglich. Es ist aussichtslos, dieses riesige Forschungsfeld im Rahmen dieser Arbeit vollständig aufzuzeigen, sodass im Nachfolgenden immer eine subjektive Auswahl getroffen werden muss.

#### 3.1.1 Grundlagen der Molekülspektroskopie

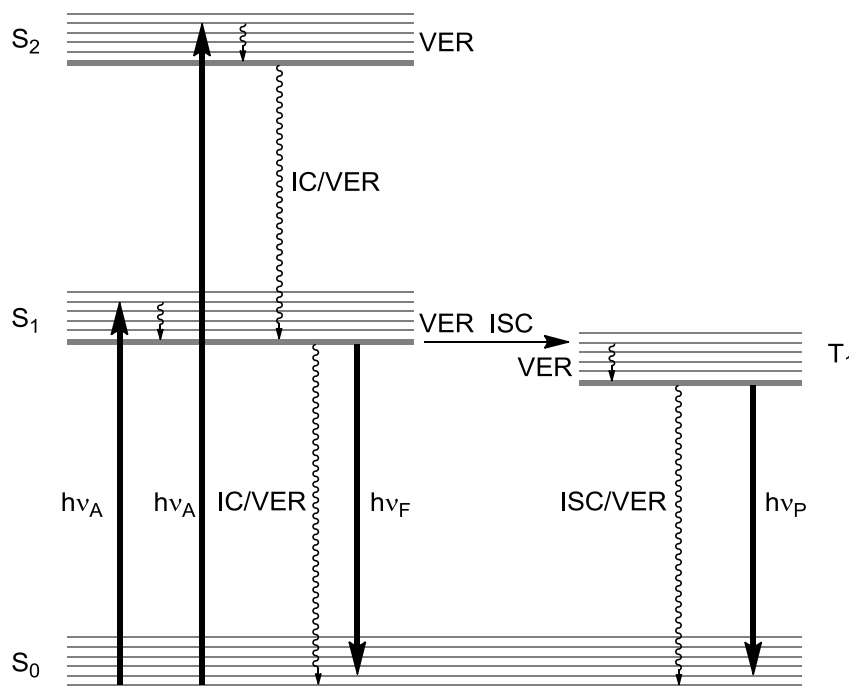
Der Prozess der Fluoreszenz wird in einem vereinfachten Jablonski-Diagramm (s. Abb. 4) dargestellt. Ein Molekül im elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ) absorbiert ein Photon geeigneter Energie, sodass es in einen energetisch höher liegenden Zustand überführt wird. Nach dem Franck-Condon-Prinzip verläuft dies ( $10^{-15}$  s) schneller als die Bewegung der Atomkerne ( $10^{-11}$  s), sodass ein vertikaler Übergang stattfindet. Die Population des angeregten Zustands folgt den spektroskopischen Auswahlregeln (z.B. Paritätsverbot), dem Überlapp der Wellenfunktionen, sowie der Größe des Übergangsdipolmoments. Von dort relaxiert das Elektron strahlungslos durch interne Konversion (internal conversion, IC,  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  s) und/oder Schwingungsrelaxation (vibrational energy relaxation, VER,  $10^{-12}$ - $10^{-10}$  s) in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Singulett-Zustands ( $S_1$ ). Die Rückkehr in den elektronischen

Grundzustand kann nun ebenfalls strahlungslos durch interne Konversion erfolgen oder das Molekül emittiert ein Photon, was als Fluoreszenz ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  s) bezeichnet wird. VER und IC sind der Grund dafür, dass die Fluoreszenz in den meisten Fällen langwelliger ist als die Absorption. Den Abstand zwischen den dazugehörigen Maxima nennt man Stokes-Verschiebung.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist der Anteil an absorbierten Photonen ( $I_{ab}$ ), der auch wieder emittiert wird ( $I_{em}$ ). Sie kann auch durch die Lebenszeit des angeregten Zustands ( $\tau$ ) wiedergegeben werden, die sich aus der inversen Summe der Geschwindigkeitskonstanten von strahlenden und strahlungslosen Prozessen zusammensetzt.  $\tau_0$  ist dabei die Fluoreszenzlebenszeit, die sich nur aus der Emission ergibt.<sup>53</sup>

$$\Phi = \frac{I_{em}}{I_{ab}} = \frac{\tau}{\tau_0}$$

- $\Phi$  Fluoreszenzquantenausbeute  
 $I_{em}$  emittierte Lichtintensität  
 $I_{ab}$  absorbierte Lichtintensität  
 $\tau$  Lebenszeit des angeregten Zustands  
 $\tau_0$  Fluoreszenzlebenszeit



**Abb. 4:** Vereinfachtes Jablonski-Diagramm; IC: Interne Konversion (internal conversion), VER: Schwingungsrelaxation (vibrational energy relaxation), ISC: Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität (intersystem crossing), A: Absorption, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, S: Singulett-Zustand, T: Triplett-Zustand



$I_{em}$  lässt sich mit einem sphärischen Detektor direkt messen, woraus sich dann die Quantenausbeute ergibt. Eine apparativ weniger aufwändige Methode besteht in der Verwendung eines Fluoreszenzstandards.<sup>54</sup>

Über folgende Gleichung lässt sich die gesuchte Fluoreszenzquantenausbeute berechnen:

$$\Phi_{Pr} = \Phi_{St} \cdot \frac{A_{St} \cdot n_{Pr}^2 \cdot F_{Pr}}{A_{Pr} \cdot n_{St}^2 \cdot F_{St}}$$

$\Phi_{Pr}$	Quantenausbeute der Probe
$\Phi_{St}$	Quantenausbeute des Standards
$A_{St}$	Absorption des Standards bei der Anregungswellenlänge
$A_{Pr}$	Absorption der Probe bei der Anregungswellenlänge
$n_{Pr}$	Brechungsindex des Probenlösungsmittels
$n_{St}$	Brechungsindex des Standardlösungsmittels
$F_{Pr}$	Fluoreszenz der Probe
$F_{St}$	Fluoreszenz des Standards

Die spektroskopischen Eigenschaften von Standard und Probe sollten sich so ähnlich wie möglich sein. Die Konzentrationen werden so gewählt, dass sich die Absorptionen in einem Maximum oder zumindest einer Schulter sehr ähnlich sind. Hier erfolgt die Anregung für die Bestimmung der Fluoreszenz. Die Emissionsspektren beider Substanzen, die sich im linearen Bereich des Detektors befinden müssen, werden integriert und für die Berechnung der Quantenausbeute herangezogen.

Eine weitere wichtige Kenngröße ist die Helligkeit  $B$ , die das Produkt aus molarem Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) und Quantenausbeute ( $\Phi$ ) ist.

$$B = \epsilon \cdot \Phi$$

Die Helligkeit ist der weitaus wichtigere Wert für analytische Anwendungen im Vergleich zur Quantenausbeute, da der Extinktionskoeffizient linear in die Fluoreszenzintensität nach *Parker* eingeht.

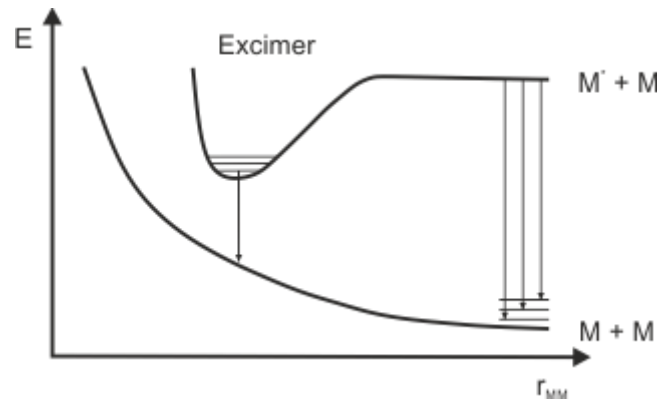
$$F = I_0 \cdot \Phi \cdot k \cdot \epsilon \cdot c \cdot d$$

$F$	Fluoreszenzintensität
$I_0$	Intensität des Anregungslichts
$k$	geometrischer Faktor
$c$	Konzentration
$d$	Schichtdicke

Das Parker-Gesetz ist nur bei geringen Konzentrationen linear, da es sonst zu Wechselwirkungen der Moleküle und einer Absorption des emittierten Lichts kommt. In Ausnahmefällen kann es auch zu einem spin-verbotenen Übergang in den Triplett-Zustand ( $T_1$ ) kommen (intersystem crossing, ISC). Durch Atome hoher Ordnungszahl kommt es zur Spin-Bahn-Kopplung, weshalb der Übergang möglich wird (heavy atom effect). Durch anschließende strahlungslose Desaktivierung (ISC/VER) oder Emission, hier der Phosphoreszenz ( $10^{-6}$ -1 s), gelangt das Molekül ebenfalls wieder in den Grundzustand ( $S_0$ ) zurück.

ISC ist aber nicht das einzige Phänomen, durch das es zur Löschung der Fluoreszenz kommen kann. Gerade bei Fluorophoren in DNA findet sehr häufig photoinduzierter Ladungstransfer statt, der in Abschnitt 5.1.2 näher erläutert wird. Des Weiteren, kann auch durch Coulomb-Wechselwirkungen oder Überlapp der Orbitale ein strahlungsloser Energietransfer zu einem Akzeptormolekül erfolgen.<sup>52</sup> Dabei muss sich die Emission des Donors mit der Absorption des Akzeptors spektral überschneiden und es kommt zu einer Löschung der Fluoreszenz des Donors und einem Anstieg der Emission des Akzeptors, soweit dieser lumineszent ist. Der strahlungslose Energietransfer ist sehr distanzabhängig. Im Falle einer dominierenden Dipol-Dipol-Wechselwirkung nimmt er mit  $R^6$  ab und findet höchstens bis zu einem Abstand von ca. 100 Å statt.

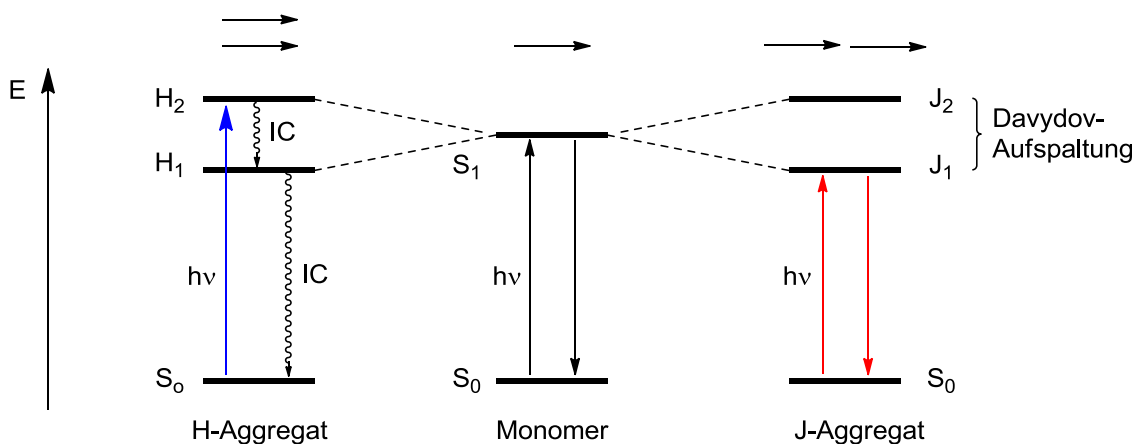
Eine andere Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen führt ebenfalls zu einer Verschiebung der Emission, die Excimerbildung.<sup>53</sup> Excimere (excited dimers) sind Dimere, die sich im angeregten Zustand bilden. Ein angeregtes Molekül trifft mit einem identischen nicht angeregten Molekül zusammen und es bildet sich eine bindende Wechselwirkung aus. Sind die beteiligten Moleküle nicht identisch spricht man von Exciplex (excited complex). Die Fluoreszenzbande, die dem Excimer zugeordnet werden kann, ist bei höheren Wellenlängen, als die der Monomere gelegen und zeigt keine vibronische Feinstruktur. Dieses Verhalten kann auf der Basis der Energiehyperflächen (s. Abb. 5) erklärt werden, da die Emission des Excimers auf dem ansteigenden Ast des rein repulsiven Grundzustands endet.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des photophysikalischen Verhaltens eines Excimers; M: Monomer, M<sup>\*</sup>: Angeregtes Monomer, r<sub>MM</sub>: Abstand der beiden Monomere

Wechselwirken Moleküle bereits im Grundzustand kann sich dies bereits in der Absorption bemerkbar machen und man spricht dann von einer excitonischen Kopplung.<sup>55-56</sup> Die Übergangsdipolmomente beeinflussen sich gegenseitig, sodass es zu einer Aufspaltung, der sogenannten Davydov-Aufspaltung des angeregten Zustands kommt. Je nachdem in welches Energieniveau dann die Anregung erfolgt, kommt es zu einer bathochromen (J-Aggregat) bzw. hypsochromen (H-Aggregat) Verschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zu den Monomeren (s. Abb. 6).

Bei parallel orientierten Übergangsdipolmomenten ist der Übergang nach H<sub>1</sub> verboten und bei hintereinander ausgerichteten der nach J<sub>2</sub>. Der Extinktionskoeffizient wird ebenfalls beeinflusst da er proportional zu dem Betrag des Übergangsdipolmoments ist, sodass er z.B. sinkt, wenn die Übergangsdipolmomente der Moleküle in entgegengesetzte Richtungen zeigen.<sup>57</sup> Die Fluoreszenz von H-Aggregaten ist meist aufgrund von interner Konversion gelöscht, es sei denn es liegt eine spezielle Anordnung der Chromophore zueinander vor.<sup>58</sup>



**Abb. 6:** Vereinfachtes Energieniveauschema von H-Aggregat, Monomer und J-Aggregat.

### 3.1.2 Ausgewählte Vertreter von fluoreszenten Farbstoffen in der Nukleinsäureanalytik

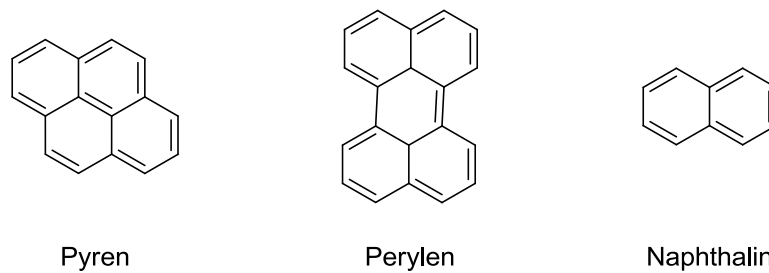
Die Entwicklung von neuen Fluorophoren hat in den letzten Jahren stark zugenommen, sodass eine vollständige Aufzählung dieser unmöglich ist. So wird im Weiteren z.B. nicht auf fluoreszente Basenanaloga<sup>59</sup> eingegangen. Vielmehr soll dieses Kapitel einen Überblick über die am häufigsten verwendeten Klassen von fluoreszenten Farbstoffen in der Bioanalytik verschaffen. Sie haben sich durchgesetzt, weil sie zumindest einige der folgenden wünschenswerten Eigenschaften besitzen.

- Unkomplizierte und kostengünstige Synthese im großen Maßstab
- Hohe Fluoreszenzquantenausbeute
- Große Helligkeit
- Absorption im sichtbaren Bereich
- Hohe Photostabilität
- Große chemische Stabilität
- Große Stokes-Verschiebung

#### **Polyaromatische Kohlenwasserstoffe**

Der wichtigste Vertreter dieser Klasse ist das Pyren (s. Abb. 7). Durch seine Eigenschaft Excimere zu bilden fand es schon vielfach Anwendung als Fluorophor in DNA.<sup>60-63</sup> Auch als Energiedonor in Kombination mit Nilrot<sup>64</sup> oder dem aromatischen Kohlenwasserstoff Perlyen<sup>65</sup> hat es sich bewährt. Trotz der häufigen Verwendung von Pyren in DNA, hat es doch erhebliche Nachteile die eine analytische Anwendung, vor allem in Zellen, fast unmöglich macht. Die Anregungswellenlänge von 340 nm (variiert je nach Wechselwirkung mit der DNA) ist äußerst ungünstig, da es zum einen dafür keine geeigneten LEDs gibt, so dass auf teurere Lichtquellen ausgewichen werden muss, und zum anderen schädigt UV-Licht das Gewebe und die Eindringtiefe in dieses ist sehr begrenzt.

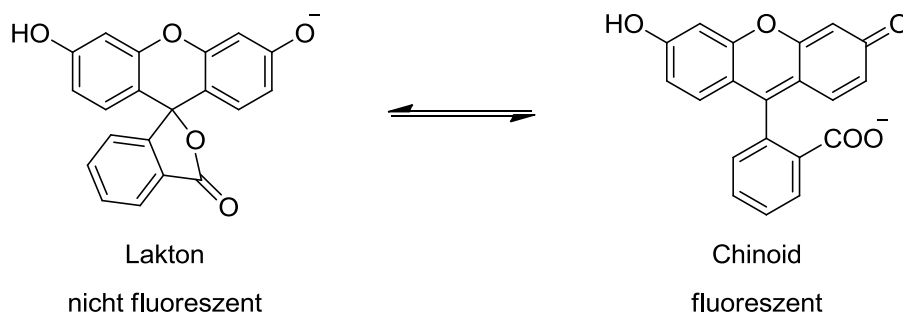
Für die Grundlagenforschung zu Elektronentransferprozessen (vgl. 5.1.5) ist Pyren jedoch neben Naphthalin<sup>43</sup> sehr nützlich.



**Abb. 7:** Wichtige Vertreter von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, zur Modifizierung von Nukleinsäuren

## Xanthine

Das grün leuchtende Fluoreszein ist ein sehr wichtiger Marker für Nukleinsäuren. Es existiert in einem Gleichgewicht zwischen der nichtleuchtenden geschlossenen Laktinonform und der offenen emittierenden Chinoidform (s. Abb. 8). Die Hydroxygruppen führen zu einer pH-Sensitivität der Emission.<sup>52</sup> Es ist kostengünstig als Phosphoramidit (fluorescein amidite; FAM) zu erwerben und besitzt eine hohe Quantenausbeute von 70 % in DNA (90 % frei in Lösung).<sup>66</sup>

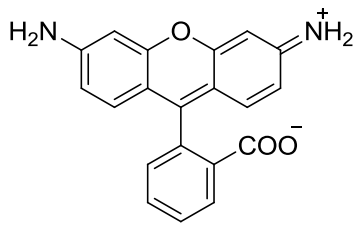


**Abb. 8:** Gleichgewicht zwischen der Lakton- und Chinoidform des Fluoreszeins

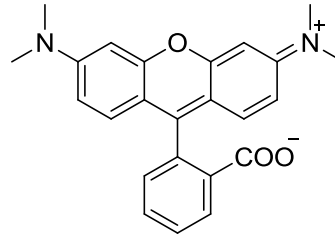
Die Modifikation mit Halogenen führt zu einer geringeren Basizität und einer bathochromen Verschiebung in Absorption und Fluoreszenz. Ein großer Nachteil ist jedoch die sehr geringe Photostabilität von Fluoreszeinderivaten.

Werden die Phenolgruppen des Fluoreszeins durch Amine ersetzt gelangt man zu den Rhodaminen. Diese finden vor allem Verwendung als Laserfarbstoffe. Das einfachste ist Rhodamin 110 (s. Abb. 9) mit seiner fluoreszeinähnlichen Emission. Eine Alkylierung der Amingruppen führt zu einer langwelligeren Absorption und Emission, jedoch auch zu einer geringeren Quantenausbeute (70 % frei in Lösung) durch die Rotation um die C-N-Bindung. Unter dem Namen TAMRA findet das tetramethylierte Rhodamin (s. Abb. 9) in DNA am häufigsten Verwendung als Energieakzeptor in Verbindung mit FAM, sodass eine Anregung des Fluoreszeins zu einer orangen Emission führt. Zu beachten ist jedoch, dass Rhodamine sehr basenempfindlich sind

und so nur postsynthetisch oder durch spezielle Arten der Phosphoramiditmethode an Nukleinsäuren gebunden werden können.<sup>52</sup>



Rhodamin 110

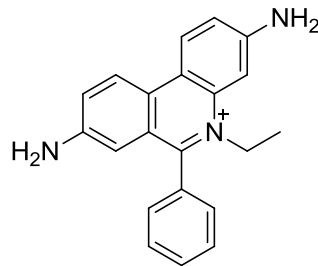


Tetramethylrhodamin

**Abb. 9:** Vertreter von Rhodaminfarbstoffen

### Phenanthridine

Ethidiumbromid (s. Abb. 10) war lange das Mittel der Wahl zu Anfärbung von Nukleinsäuren.<sup>67-68</sup> In den letzten Jahren ist es jedoch immer mehr von Cyaninfarbstoffen verdrängt worden, aufgrund seiner großen Mutagenität.<sup>69</sup>



Ethidium

**Abb. 10:** Ethidium als Vertreter der Phenanthridine

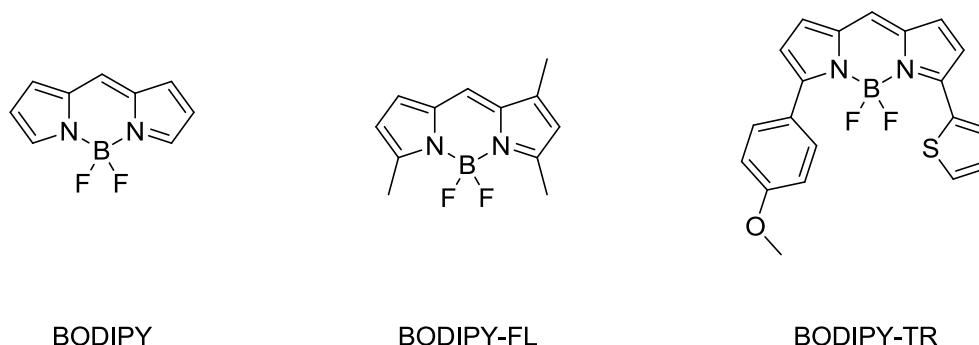
Durch die Interkalation in die Doppelhelix wird die Rotation des Phenylsubstituenten gehemmt, sodass es zu keinem fluoreszenzgelöschtem TICT-Zustand mehr kommen kann. Dies führt zu einem 20- bis 30-fachen Anstieg der roten Fluoreszenz.<sup>70</sup>

Kovalent an DNA geknüpft, wurde Ethidium auch als Lochdonor verwendet.<sup>71-72</sup>

### BODIPY-Farbstoffe

BODIPY-Farbstoffe haben als Grundkörper das 4,4-Difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (s. Abb. 11). Sie zeichnen sich durch ihre Insensitivität der spektralen Eigenschaften gegenüber Umwelteinflüssen und ihre große Quantenausbeute von über 90 % aus. Des Weiteren ermöglicht eine Substitution des Grundkörpers eine einfache Modulation der spektroskopischen Eigenschaften. Während das BODIPY-FL ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie Fluoreszein aufweist, verhält sich BODIPY-TR wie Tetramethylrhodamin. Ihr Einsatzbereich ist jedoch durch ihre Ba-

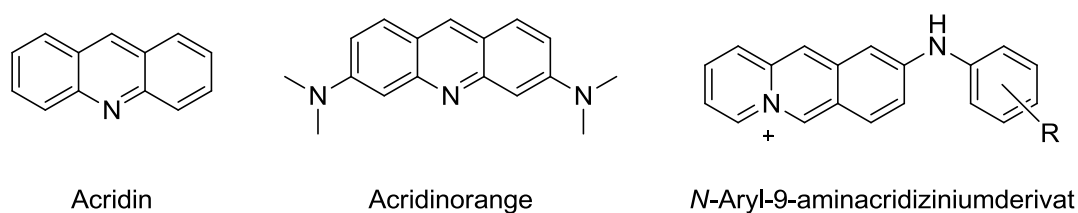
senlabilität etwas beschränkt.<sup>52</sup> Der Einbau in ein Oligonukleotid mittels Phosphoramiditmethode gelang trotzdem. Einerseits in Form einer Basenmodifikation,<sup>73</sup> und andererseits als Basensurrogat über einen azyklischen Linker.<sup>74</sup> Es zeigte sich, dass erstere Anordnung zu einer enormen Löschung der Fluoreszenz ( $\Phi \approx 3\%$ ) führt, während die zweite immer noch eine Fluoreszenzquantenausbeute von bis zu 70% aufweist.



**Abb. 11:** Das Grundgerüst der BODIPY-Fluorophore (links), sowie die zwei wichtigen Vertreter BODIPY-FL und BODIPY-TR

### Acridine

Acridinfarbstoffe leiten sich vom heterozyklischen Acridin (s. Abb. 12) ab und besitzen als auxochrome Gruppe primäre oder sekundäre Amine. In DNA findet vor allem das disubstituierte Acridinorange Anwendung. Der orange emittierende Farbstoff ist mit seiner planaren Struktur ein hervorragender Interkalator.



**Abb. 12:** Grundstruktur Acridin mit Acridinorange und N-Aryl-9-aminacridiziniumderivat

Die Verwandten N-Aryl-9-aminacridiziniumderivate sind ebenfalls nützliche Vertreter dieser Farbstoffe.<sup>75</sup> Ihre Fluoreszenz ist in Lösung gelöscht, wegen strahlungsloser Relaxation durch die Rotation um die N-Aryl-Bindung und eines Ladungstransfers vom Phenylsubstituenten auf das Acridiziniumchromophor. Die Wechselwirkung mit DNA führt jedoch zu einem 50-fachen Anstieg der Emission.

### Cyanine

Cyanine gehören zu der Familie der Polymethine. Sie besitzen ein quartäres Amin als Antiauxochrom, das mit einem tertiären als Auxochrom über eine Polymethin-

brücke konjugiert ist. Zwei Kettenatome befinden sich in einem heterozyklischen Ring (s. Abb. 13).

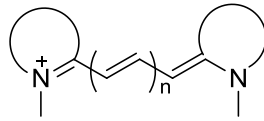


Abb. 13: Grundstruktur von Cyaninen

Die meist verwendeten Vertreter dieser Gruppe sind die Cy-Farbstoffe, die auf Sulfoindocyanin basieren. Die Zahl hinter Cy gibt die Anzahl der Atome zwischen den Dihydroindoleinheiten an. Das blau emittierende Cy2, das grüne Cy3 und das rote Cy5 sind zu den Standardchromophoren für Microarrays und andere analytische Analysen geworden (s. Abb. 14).<sup>52</sup>

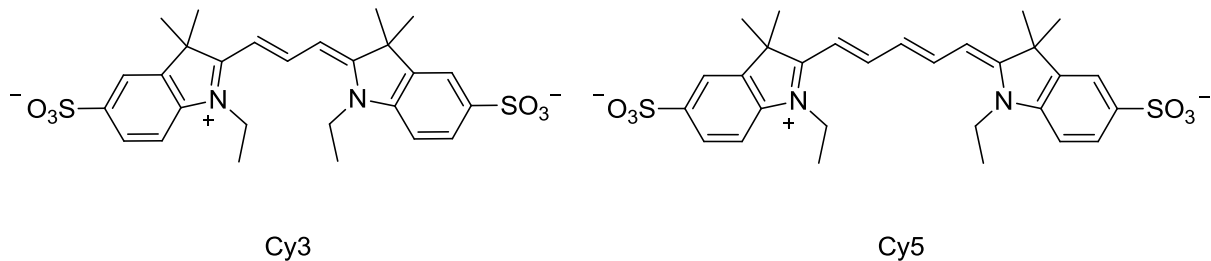


Abb. 14: Zwei Vertreter der Cy-Farbstoffe: Cy3 und Cy5

Sybrgreen<sup>®76</sup> hat das Ethidiumbromid als Anfärbereagenz für DNA nahezu vollständig verdrängt und Thiazolorange (TO), dessen grüne Fluoreszenz um das 18900-fache durch die Wechselwirkung mit DNA gesteigert wird,<sup>77</sup> ist in der DNA-Analytik ebenfalls weit vertreten (s. Abb. 15). In Kombination mit Thiazolrot (TR) ist es eine wertvolle fluoreszente Sonde.<sup>78-80</sup>

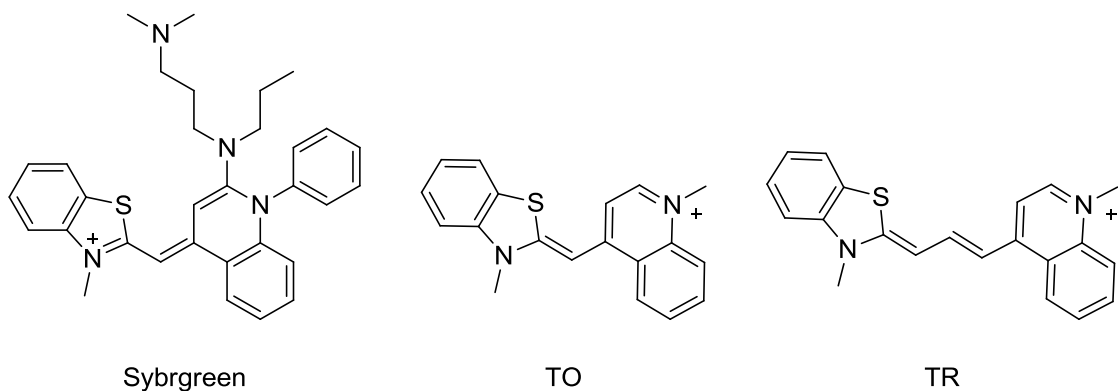


Abb. 15: Weitere Vertreter der Cyanine: Sybrgreen, Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR)

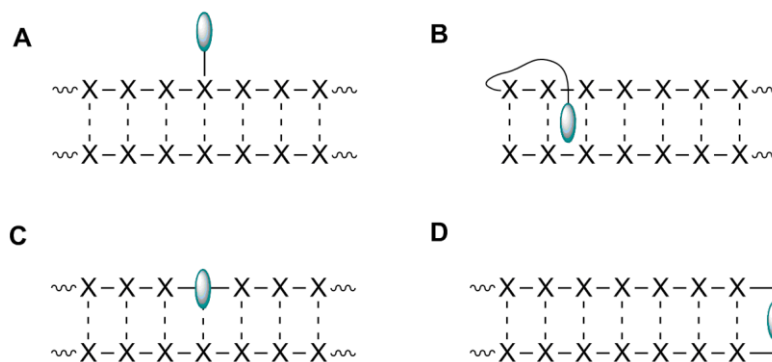


### 3.1.3 Positionierung von Modifikationen in Nukleinsäuren

Im Wesentlichen gibt es vier Varianten zur kovalenten Modifikation von Nukleinsäuren mit Fluorophoren oder anderen künstlichen Bausteinen.<sup>25,37</sup>

Sie können sich entweder

1. an den natürlichen Basen (s. Abb. 16, **A**),
2. am 3'- oder 5'-Ende (s. Abb. 16, **B**) und
3. am Rückgrat (s. Abb. 16, **C**) befinden oder
4. als Haarnadel (s. Abb. 16, **D**) fungieren.

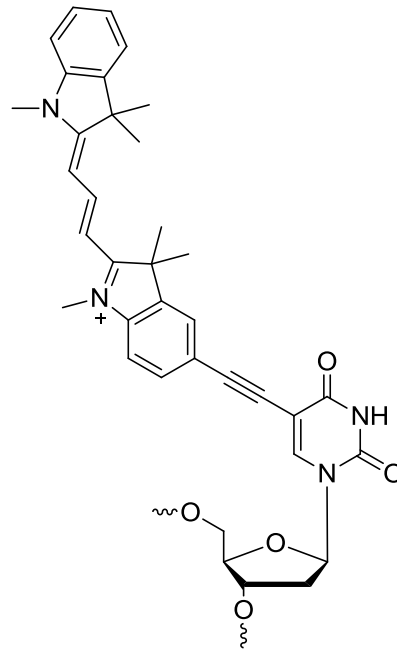


**Abb. 16:** Varianten kovalenter Modifikation von Nukleinsäuren

Artifizielle Bausteine an den Basen (s. Abb. 16, **A**) sollen in die große Furche zeigen und dabei die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen möglichst nicht stören. Bei Pyrimidinen erfolgt deshalb die Anknüpfung meist über eine Sonogashira- oder Suzuki-Kupplung an das C5. Ein Beispiel hierfür ist das Cy3-modifizierte Thymin der Arbeitsgruppe *Balasubramanian* (s. Abb. 17)<sup>81</sup> oder das 2PydU von *Waninger-Weiß* et al.<sup>82</sup> Schwieriger gestaltet sich die Situation bei Purinen. Das Anfügen eines Moleküls an das reaktive C8 ermöglicht eine gute Wechselwirkung mit der DNA, induziert jedoch eine Konformationsänderung. Die Base dreht sich in die syn-Position, sodass keine natürliche Basenpaarung mehr möglich ist.<sup>82-83</sup> Eine Alternative ist C7 bei 7-Deazapurinen.<sup>84-85</sup>

Oftmals sollen Fluorophore aber nicht nur in die große Furche zeigen, sondern direkt in den Basenstapel interkalieren<sup>86-88</sup> oder mit einem Löscher interagieren.<sup>66</sup> Dazu können sie z.B. über lange Alkyl linker am 3'- oder 5'-Ende angefügt werden (s. Abb. 16, **B**). Bei dieser Methode erfolgt die Interkalation jedoch weitestgehend unspezifisch.

Dieser Nachteil wird beseitigt, indem die Modifikation an die Stelle der Base tritt und direkt an das C1' der Desoxyribose angefügt wird (s. Abb. 16, **C**). Um labile glykosidische Bindungen zu vermeiden, werden meist C-Nukleoside verwendet.<sup>89</sup>



**Abb. 17:** Cy3-modifiziertes Thymidin der Arbeitsgruppe *Balasubramanian*

Zur Erleichterung der Synthese, wird hier oftmals ein azyklischer Linker anstelle des Zuckers verwendet. *Asanuma* und Mitarbeiter benutzten z.B. sehr erfolgreich L- oder D-Threoninol, um über dessen Aminfunktion ein Azobenzol anzuknüpfen (s. Abb. 18)<sup>90</sup> und in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* hat sich (S)-1-Amin-1,2-propandiol als Linkermolekül bei dem Einbau von Ethidium,<sup>72</sup> Perylenbisimid<sup>91</sup> und vielen anderen<sup>74,78,92</sup> bewährt (s. Abb. 10).

Die C2'-Position ist synthetisch leicht zu verändern, indem Ribose mit ihrer freien Hydroxygruppe verwendet wird. Dort lassen sich z.B. eine Azid-<sup>93</sup> oder Alkin-<sup>29</sup> Gruppe für die Postsynthese anbringen. Des Weiteren erlaubt die Verwendung dieser Position eine Wechselwirkung der Modifikation mit dem DNA-Basenstapel.<sup>94</sup> Eine direkte Einführung der artifiziellen Bausteine bei der chemischen Nukleinsäuresynthese, meist über die Phosphoramiditmethode, ist ebenfalls möglich, aber auch enzymatische Methoden, die in Kapitel 4 ausführlich behandelt werden, finden in den letzten Jahren immer mehr Anwendung.

Haarnadeln sind vor allem sehr beliebt, um Chromophore für Ladungstransferexperimente in DNA einzubringen (s. Abb. 16, **D**). Sie sind synthetisch leicht zugänglich und die intramolekulare Doppelhelix ist aus entropischen Gründen äußerst stabil, was eine gute Wechselwirkung der Modifikation mit dem Basenstapel ermöglicht.<sup>95</sup>

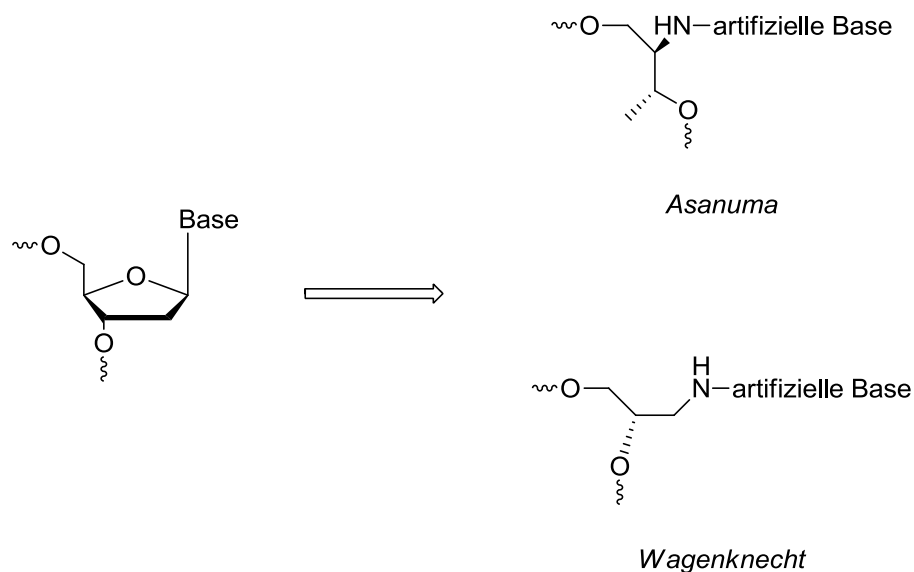


Abb. 18: Azyklische Linkersysteme der Arbeitsgruppen *Asanuma* und *Wagenknecht*

### 3.1.4 Automatisierte DNA-Festphasensynthese

Die von *Beaucage* und *Caruthers* entwickelte Phosphoramiditmethode,<sup>21,24,96</sup> ist die heute gebräuchlichste DNA-Festphasensynthese. In speziellen Fällen, z.B. bei der Synthese von Phosphorthioaten, wird die H-Phosphonatmethode verwendet. Bei oxidationsempfindlichen Bausteinen muss auf die Phosphortriestermethode zurückgegriffen werden.<sup>97</sup>

Die Synthese der DNA wird an einer festen Phase (controlled pore glass, CPG) von 3'- in 5'-Richtung durchgeführt. Die einzelnen Bausteine sind am 5'-OH mit 4,4'-Dimethoxytrytyl (DMTr) geschützt. Die exozyklischen Aminfunktionalitäten der natürlichen Basen sind im Falle von Adenin (A) und Cytosin (C) mit Benzoylresten (Bz) und bei Guanin (G) mit einem Isobutyrylrest (Ib) versehen. Am 3'-OH befindet sich das  $\beta$ -cyanethylgeschützte Phosphoramidit.

Im ersten Schritt des Synthesesyklus wird die DMTr-Gruppe des endständigen Nucleosids mit 3 %iger Trichloressigsäure in DCM abgespalten (s. Abb. 19, **A**). Die freie OH-Gruppe kann in Acetonitril den zuvor von Tetrazol protonierten Diisopropylaminrest am Phosphoratom des nächsten Nucleosids substituieren (s. Abb. 19, **B**). Die nicht gekuppelten Oligonukleotide werden mit Hilfe von 1-Methylimidazol und Pyridin in THF von Essigsäureanhydrid acetyliert (s. Abb. 19, **C**). Die so blockierten Reste, können im nächsten Kupplungsschritt nicht mehr weiter reagieren, was das Auftreten von Fehlsequenzen verhindert und die spätere Reinigung erleichtert. Abschließend wird der Phosphor mit Iod in wässrigem THF oxidiert (s. Abb. 19, **D**). Der entstehende Iodwasserstoff wird mit Pyridin abgefangen.

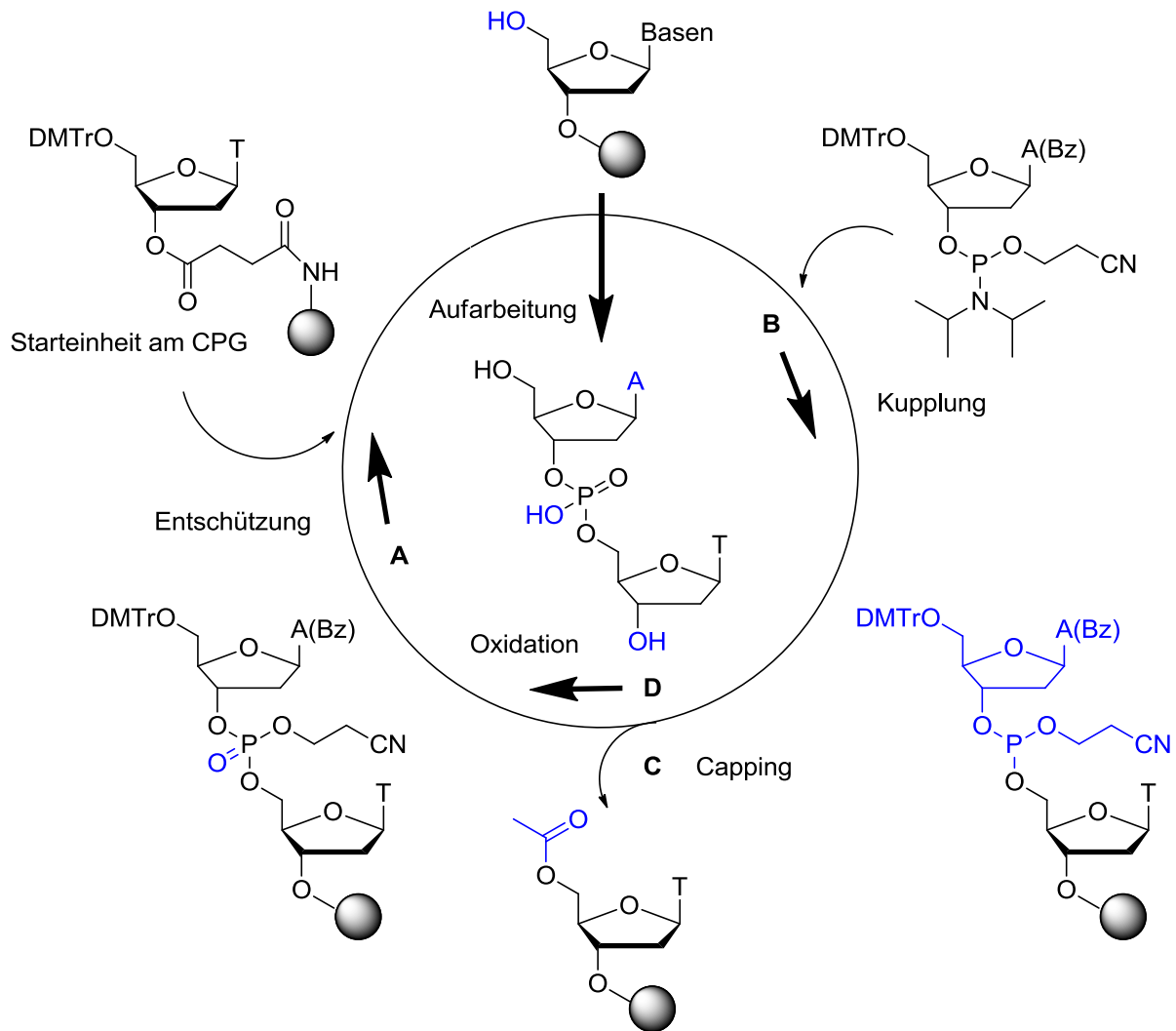


Abb. 19: DNA-Synthesesyklus der Phosphoramiditmethode

Die Farbintensität, des im nächsten Zyklus abgespalteten 4,4'-Dimethoxytritylkations, gibt Auskunft über die Kupplungseffizienz. Nach dem Anfügen des letzten Bausteins kann, je nach Bedarf, die DMTr-Gruppe entfernt oder am 5'-Ende belassen werden. Die DNA wird meist durch wässrigen, konzentrierten Ammoniak vom CPG abgespalten. Die Schutzgruppen der Basen und die Cyanethoxygruppen an den Phosphaten werden dabei ebenfalls entfernt.

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits angedeutet, lassen sich mit dieser Methode prinzipiell auch artifizielle Bausteine in DNA einbauen. Der direkte Einbau von Modifikationen ist jedoch nicht immer möglich. Die Moleküle müssen mit den Synthesebedingungen kompatibel sein. Das setzt die Beständigkeit gegenüber Säure, Base und Oxidation mit Iod voraus. Vor allem bei größeren, nicht nukleosidischen Molekülen kommt die geringe Kupplungseffizienz dazu, die einen hohen Materialeinsatz nach sich zieht und beispielsweise die Synthese mehrfach modifizierter DNA erheblich erschwert. Des Weiteren ist die chemische Synthese von Nukleinsäuren auf un-

gefähr 100 Basen beschränkt. Danach bricht die Kupplungseffizienz aus sterischen Gründen ein. Resultierend aus den genannten Nachteilen, findet der postsynthetische Ansatz immer mehr Anwendung.

### 3.1.5 Postsynthetische Modifizierung

Vor allem zur Einführung von großen und empfindlichen Molekülen in Nukleinsäuren eignet sich ein postsynthetischer Ansatz.<sup>25,32,94</sup> Hierbei werden zuerst möglichst orthogonale funktionelle Gruppen in die DNA mit der Phosphoramiditmethode oder enzymatisch eingebaut, die dann mit den Modifikationen reagieren können. Der enorme Vorteil dabei ist, dass diese relativ kleinen Gruppen eine sehr gute Kupplungseffizienz bei der chemischen Synthese haben<sup>29</sup> oder sogar als Substrat für Polymerasen dienen können,<sup>98-99</sup> was modifizierte Oligonukleotide mit mehreren hundert Basenpaaren ermöglicht.<sup>27</sup>

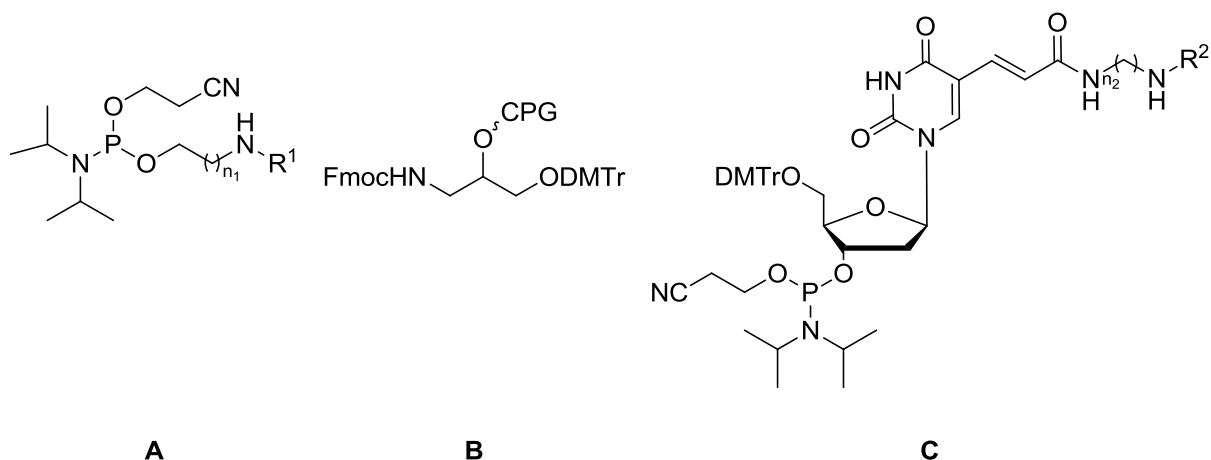
Bei der Kombination mit der Phosphoramiditmethode, kann diese Umsetzung entweder vor der Abspaltung der DNA von der festen Phase (solid phase) erfolgen<sup>100-101</sup> oder danach in Lösung.<sup>32,102</sup> Dabei ist aber die geringe Löslichkeit der DNA in organischen Lösungsmitteln zu beachten. Deshalb findet die postsynthetische Modifizierung meist in wässrigem Milieu statt oder die Natriumionen am Phosphordiesterückgrat werden über einen Ionentauscher durch Triethylammonium ersetzt, um das Oligonukleotid z.B. in DMF löslich zu machen.<sup>103</sup> So können viele Probleme des direkten Einbaus umgangen werden und ein Phosphoramidit oder Triphosphat ermöglicht die Insertion vieler Modifikationen. Die korrespondierenden Reaktionen müssen dabei regio- und chemoselektiv sein, unter milden Bedingungen durchgeführt werden können, effizient und schnell ablaufen, um Aufreinigungsprobleme zu vermeiden. Im Folgenden werden vier bei der Postsynthese verwendete Reaktionen erläutert.<sup>25</sup>

#### Amidkupplung

Die Amidkupplung ist eine weit verbreitete Reaktion<sup>104</sup> auch wenn sie mittlerweile weitestgehend durch die noch folgenden Methoden der postsynthetischen Modifizierung von Nukleinsäuren verdrängt wurde, da hinsichtlich der Orthogonalität zu den exozyklischen Aminfunktionen der Basen Probleme auftreten können. Deshalb werden vor allem reaktivere primäre Amine, die als Phosphoramidite käuflich erhältlich sind,<sup>105</sup> verwendet (s. Abb. 20).

5'-Aminmodifizier (s. Abb. 20, **A**) bestehen aus einem  $\beta$ -Cyanethylphosphoramidit für die automatisierte DNA-Synthese und einer primären Aminfunktion.<sup>106-107</sup> Als

Schutzgruppe dient entweder 4-Monomethoxytrityl (MMTr) oder Trifluoracetat (TFA). Die TFA-Gruppe wird bei der Aufarbeitung des Oligonukleotids mit Ammoniumhydroxid abgespalten. Zur Einführung der Sonde wird die funktionalisierte DNA in wässrigem Bicarbonatpuffer (pH 9) mit einem, in DMF gelöstem Aktivester über Nacht vereinigt. Nach Entsalzung und Aufreinigung über HPLC oder Elektrophorese erhält man das modifizierte Oligonukleotid in einer moderaten Ausbeute. Als Aktivester eignen sich Succinimide, Maleinimide oder Isothiocyanate, die unter den gewählten Bedingungen fast ausschließlich mit primären Aminen reagieren. Die MMTr-Schutzgruppe bietet den großen Vorteil, dass das Oligonukleotid für die Amidkupplung auf dem CPG belassen werden kann. Sie wird einfach am Ende der DNA-Synthese analog der DMTr-Gruppe automatisiert mit 3 %iger Di- oder Trichloressigsäure abgespalten. Die Reaktion kann nun unter wasserfreien Bedingungen in DMF mit klassischen Amidkupplungsreagentien wie Benzotriazolen durchgeführt werden, da die exozyklischen Aminfunktionen der Basen noch geschützt sind. Dies führt meist zu einer besseren Ausbeute. Des Weiteren erfordert die Festphasensynthese keine Entsalzung vor der Aufreinigung.



**Abb. 20:** Verschiedene käufliche Aminmodifizier; R = Aminschutzgruppe,  $n_1 = 3, 6, 12$ ,  $n_2 = 3, 6$

Das geschützte primäre Amin zur Postsynthese kann sich auch über einen Succinatlinker direkt am CPG befinden,<sup>108-109</sup> sodass nach der Abspaltung der DMTr-Gruppe die restlichen Nukleotide angefügt werden können (s. Abb. 20, **B**). Die Fmoc-Schutzgruppe wird bei der Aufarbeitung mit abgespalten und das Amin kann mit einer aktivierten Carbonylfunktion umgesetzt werden.

Bei internen Modifiern (s. Abb. 20, **C**) befindet sich das primäre Amin über eine lange Alkylkette am C5 von Thymidin und wurde bisher mit TFA geschützt.<sup>110</sup>

Dies lässt nur eine Modifizierung in Lösung zu, da die Entschützung zur Abspaltung der DNA vom CPG führt. Neuerdings wird Fmoc als Schutzgruppe verwendet, das sich selektiv mit Piperidin auf der festen Phase entfernen lässt.

### Staudinger-Ligation

Die Staudinger-Ligation nutzt Azidreste, die mit Triarylphosphinen zu Iminphosphoranen reagieren. Diese werden in Wasser zu den korrespondierenden Aminen und Triarylphosphinoxiden hydrolysiert.<sup>111</sup> Verwendet man Phosphine mit einem Arylliganden, der einen Ester trägt, kann dieser das intermediär gebildete Azaylid abfangen, und man erhält eine stabile Amidbindung.<sup>112</sup> Diese Reaktion kann ohne Zusatz weiterer Reagenzien bei Raumtemperatur durchgeführt werden, und fand daher Anwendung bei der Biokonjugation.<sup>113</sup> Weisbrod et al. nutzten sie zur Modifikation von DNA (s. Abb. 21).<sup>99</sup> Die Einführung des Azids geschah enzymatisch. 7-Deazaadenosin- oder 2'-Desoxyuridintriphosphat, mit Alkylazid an C7 bzw. C5 Position, können mit Hilfe der *Pwo* DNA-Polymerase in das Oligonukleotid inseriert werden. Die einzubringende Modifikation (R) befindet sich an einem Arylliganden des Phosphins.

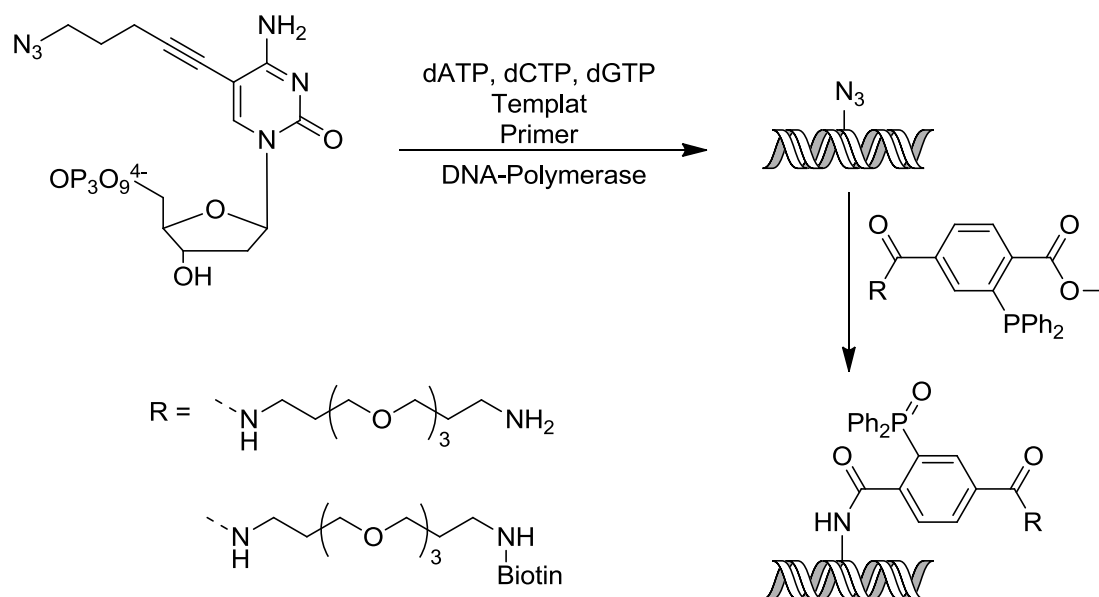


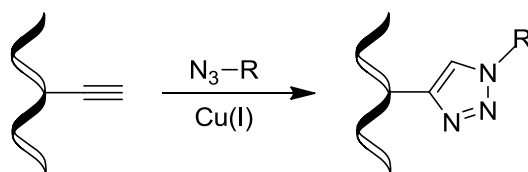
Abb. 21: Enzymatischer Einbau des Azidlinkers in DNA und anschließende Staudinger-Ligation

### Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition (CuAAC)

In den letzten Jahren hat sich die Kupfer(I)-katalysierte Variante der Huisgen-[2+3]-Zykloaddition<sup>114</sup> nicht nur in der organischen Synthese als unverzichtbares Hilfsmittel erwiesen, sondern auch zur Modifikation von Biomolekülen,<sup>115</sup> insbesondere von DNA.<sup>116</sup> Ein terminales Alkin reagiert mit einem Azid zu einem Triazol. Die Verwendung von Kupfer(I) als Katalysator, bewirkt eine definierte Regiochemie und ermög-

licht die Durchführung der Reaktion innerhalb weniger Stunden, in wässrigen Lösungsmitteln, bei Raumtemperatur.<sup>30-31</sup> Aufgrund dieser Eigenschaften gehört sie zu den Klick-Reaktionen, wie sie *Sharpless* definierte.<sup>117</sup>

Die Arbeitsgruppe *Carell* synthetisierte als Erste alkinmodifizierte 2'-Desoxyuridinphosphoramidite, um sie nach dem Einbau in DNA unter anderem mit azidmodifizierten Fluorophoren umzusetzen (s. Abb. 22).<sup>118</sup> *Seela* und Mitarbeiter erweiterten das Konzept auf alle vier Nukleoside.<sup>119</sup> Es folgten weitere sowohl alkin- als auch azidmodifizierte Nukleotide, die als Triphosphate zur enzymatischen Synthese von DNA dienen.<sup>27,98,116,120</sup> Azide können nicht als Phosphoramidit verwendet werden, da eine Staudingerreaktion mit dem Phosphin stattfinden würde. Eine chemische Synthese von azidfunktionalisierten Nukleinsäuren ist daher nur über Umwege möglich. *Miller* et al. substituierten Iodid durch Azid noch auf der festen Phase<sup>121</sup> und *Micura* und Mitarbeiter benutzten einen Phosphordiester, statt den reaktiveren Phosphor(III) bei der chemischen Synthese von 2'-azidsubstituierter RNA.<sup>93,122</sup>

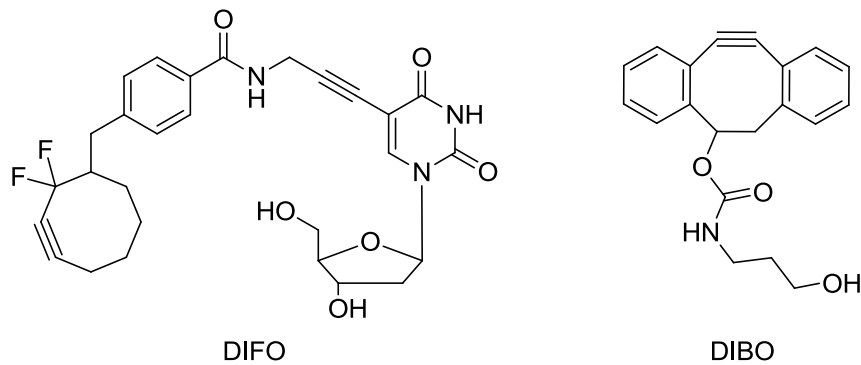


**Abb. 22:** Schematische Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition mit alkinfunktionalisierter DNA; R = Fluoreszein oder Cumarin

Mit unterschiedlichen Schutzgruppen an den Alkinresten ist es sogar möglich Oligonukleotide mit verschiedenen Modifikationen zu versehen. Eine dreistufige Markierung verwendet TMS und TIPS als Schutzgruppen. Das erste ungeschützte Alkin wird bereits nach der DNA-Synthese an der festen Phase umgesetzt. Bei der Abspaltung vom CPG wird die TMS-Gruppe entfernt und das nächste Molekül kann angefügt werden. Das letzte Alkin wird mit TBAF entschützt.<sup>123</sup>

Neuerdings wird aber immer mehr nach Möglichkeiten gesucht, die Kupferkatalyse zu umgehen, da die Metallionen für Zellen äußerst toxisch sind.<sup>34</sup> Gespannte Alkine, die ohne Katalysator mit Aziden bei Raumtemperatur reagieren,<sup>124</sup> sind eine Alternative. Beispiele hierfür sind Difluorcyclooctin (DIFO)<sup>125</sup> und Dibenzylcyclooctin (DIBO) (s. Abb. 23).<sup>126</sup>





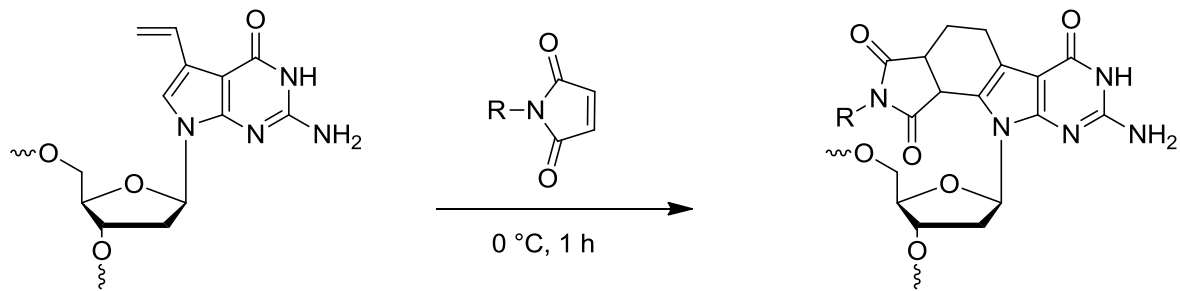
**Abb. 23:** Bausteine mit gespannten Alkinen zur kupferfreien Azid-Alkin-Zykloaddition

### Diels-Alder-Reaktion

Die konzertierte Diels-Alder-Reaktion<sup>127</sup> zwischen einem elektronenreichen Dien und einem elektronenarmen Dienophil bietet die idealen Voraussetzungen für die Modifizierung von DNA. Sie ist aufgrund der orthogonalen Funktionen spezifisch und kann unter milden Bedingungen in wässrigem Milieu ohne den Zusatz von Metallionen durchgeführt werden. Diese und noch andere Eigenschaften machen sie ebenfalls wie die CuAAC zu einer Klick-Reaktion.<sup>117</sup>

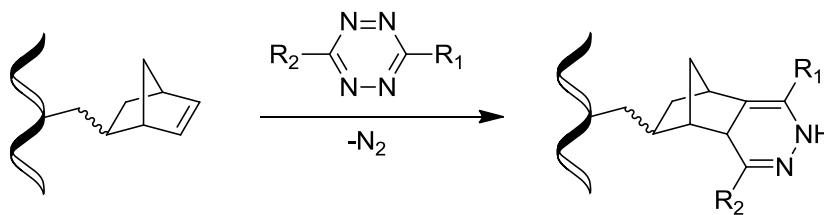
Als erstes wurde die Reaktion von *Seelig* et al. zur spezifischen Modifikation von RNA benutzt.<sup>128</sup> Mit der T7 RNA Polymerase synthetisierten sie eine endständig mit Anthrazen modifizierte RNA, die sie mit einem Biotin-Maleinimid-Konjugat umsetzten. *Hill* et al. zeigten dann, dass die Reaktion auch auf DNA übertragbar ist.<sup>129</sup> Sie fügten sowohl ein lineares, als auch ein zyklisches Dien endständig über die Phosphoramiditmethode an Oligonukleotide. Als Dienophil benutzen sie ebenfalls Maleinimid, das unter anderem mit Fluoreszein versehen war. *Graham* und Mitarbeiter bewiesen, dass auch Furan als Dien geeignet ist<sup>130</sup> und dehnten das Konzept neben *Okamoto* et al. und *Borsenberger* et al. auf interne Modifier aus, wobei letztere ein hexadien-modifiziertes Thymidintriphosphat verwendeten.<sup>131</sup>

*Okamoto* et al. wählten einen sehr eleganten Weg über ein 7-Vinyl-7-deazaguanosinphosphoramidit. Die Vinyl-doppelbindung und das Alken im Fünfring der Base bilden ein elektronenreiches Dien, sodass die Umsetzung mit dem Maleinimid-konjugat innerhalb von 1 h bei 0 °C quantitativ ist. Abschließend findet zur Rearomatisierung des Deazaguanins, eine [1,3]-H-Verschiebung statt (s. Abb. 24). Die bei dieser Postsynthese verwendeten Reste (R) waren z.B. Benzophenon, Pyren oder Biotin.<sup>132</sup>



**Abb. 24:** Diels-Alder-Reaktion von modifizierter DNA mit 7-Vinyl-7-deazaguanin

Dieses Beispiel umgeht durch die Hydridverschiebung schon einen großen Nachteil der normalen Diels-Alder-Reaktion. Sie ist reversibel. Das heißt bei erhöhten Temperaturen verläuft sie rückwärts. *Jäschke* und Mitarbeiter umgingen dieses Problem, indem sie als Diene Tetrazinderivate verwenden, die mit Norbornenen eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf und anschließender Freisetzung von Stickstoff eingehen (s. Abb. 25).<sup>35,133</sup> Das Dienophil wurde sowohl terminal als auch intern über verschiedene Linkerlängen mit der Phosphoramiditmethode eingebaut und mit verschiedenen Dienen sehr erfolgreich umgesetzt.



**Abb. 25:** Schematische Darstellung der inversen Diels-Alder Reaktion mit norbornenmodifizierter DNA;  $R_1$  = Aryl,  $R_2$  = Heteroaryl

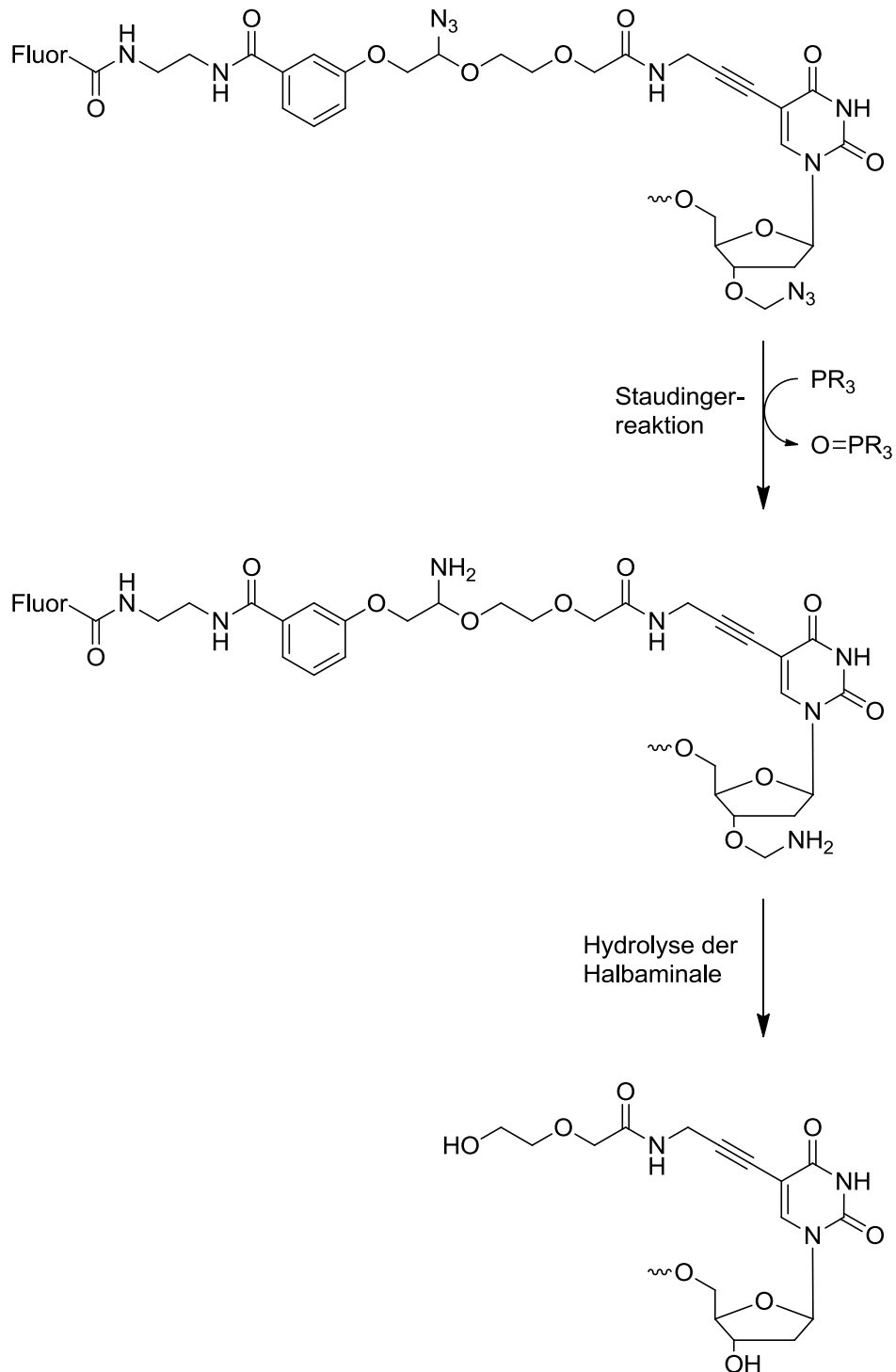
Sie konnten die Anwendung auch auf RNA erweitern, wobei sie mit der T7 RNA Polymerase das Norbornen endständig einbauten<sup>134</sup> und kombinierten sie mit der CuAAC-Reaktion.<sup>135</sup>

### 3.1.6 Beispiele für Anwendungen fluoreszenter Nukleinsäuren

Die fluoreszente DNA-Analytik ist in den letzten Jahren sehr weit fortgeschritten und viele Methoden werden schon standardmäßig in Laboren angewandt. Sie benötigen aber alle eine vorherige Vergrößerung der Probenmenge mittels PCR. Dies macht die Methoden teuer, fehleranfällig und zeitintensiv.<sup>15</sup> Deshalb liegt das Augenmerk zunehmend auf der Verbesserung der Nachweisgrenze unter Verwendung von Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie (single molecule fluorescence spectroscopy, SMFS).<sup>16</sup>

**Sequenzierung von DNA mit fluoreszenzmarkierten Triphosphaten**

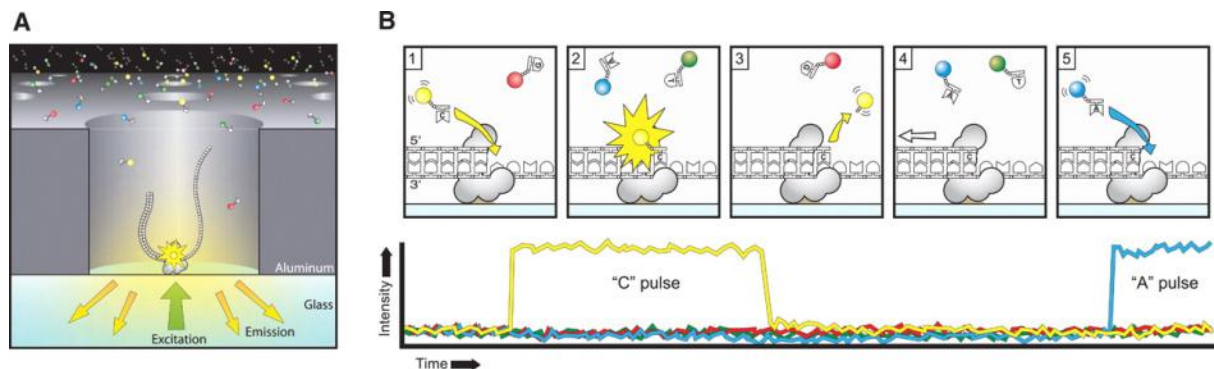
Die *Illumina* sequencing-by-synthesis Methode ist ein Verfahren, das DNA, während sie von einer Polymerase amplifiziert wird, sequenziert.<sup>13</sup>



**Abb. 26:** Sequencing-by-synthesis: Entschützung der 3'-Position und Abspaltung des Fluorophors von dem verlängerten Oligonukleotid durch die Staudingerreaktion

Dazu werden ungefähr 1000 Kopien eines Templats mit Primer auf der Oberfläche einer optisch transparenten Durchflusszelle angebracht. Die Verlängerung der DNA erfolgt mit vier verschiedenfarbig markierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs), die nur einen Einbaueinbau zulassen, da die 3'-Position durch einen Azidrest blockiert ist. Die überschüssigen dNTPs werden gewaschen, bevor die Identität des angefügten Nukleotids mit totaler interner Reflektionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) festgestellt wird. Ein wasserlösliches Phosphin setzt dann das Azid zu einem Halbaminal um, das zügig hydrolysiert wird, um die 3'-OH-Gruppe dem nächsten Nukleotideinbau zur Verfügung zu stellen (s. Abb. 26).<sup>16</sup>

Einen direkteren Ansatz verwendet die single molecule real time (SMRT) Sequenziermethode von *Pacific Biosciences*.<sup>14</sup> Die verschiedenen Fluorophore befinden sich dabei am  $\epsilon$ -Phosphor von 2'-Desoxynukleosidpentaphosphaten (dN5Ps) und werden bei der Verlängerungsreaktion abgespalten. Eine einzelne Polymerase ist auf der Oberfläche eines Lichtleiters (zero-mode waveguide, ZMW) immobilisiert, der es erlaubt ein sehr kleines Volumen von 10-20 Zeptoliter ( $10\text{-}20 \cdot 10^{-21}$  L) zu beleuchten (s. Abb. 27 A). Damit ist es möglich nur das Pentaphosphat zu detektieren, das in dem Moment von dem Enzym in die DNA eingebaut wird (s. Abb. 27 B). In diesem Verfahren erhält man am Schluss völlig unmodifizierte DNA, die weiter verwendet werden kann.



**Abb. 27:** Single molecule real time Sequenziermethode: Immobilisierung einer einzelnen DNA Polymerase auf einem Lichtleiter (A) und schematische Darstellung der Verlängerung des Primers mit entsprechendem Signal (B).<sup>136</sup>

### Hybridisierungsassays

Die vollständige Sequenzierung eines DNA-Fragments ist oftmals nicht nötig. Vielmehr reicht es in Bereichen wie Proteomik, Metabolomik, Genetik und Medizin bestimmte DNA Sequenzen, sogenannte Ziel-DNA (Target) nachzuweisen. Man benutzt dazu relativ kurze Oligonukleotidsonden (15-30mere), die nach der Hybridisierung mit der gesuchten komplementären Sequenz ein Signal erzeugen.<sup>15</sup>

Molecular Beacons,<sup>137</sup> haarnadelförmige Oligonukleotide, die in ihrer einfachsten Ausführung ein Fluorophor mit einem entsprechenden Löscher (Quencher) besitzen, sind solche Sonden (s. Abb. 28). In der geschlossenen Form sind sich die zwei Modifikationen im Stammbereich sehr nah, sodass es zu einem Energietransfer kommt und die Fluoreszenz gelöscht wird. Sollte aber ein passender Gegenstrang vorhanden sein, wird sich die Haarnadel öffnen und die Emission ansteigen. Dieser einfache Aufbau ist für große Probenmengen sehr gut geeignet, für geringe DNA-Konzentrationen wird jedoch die hohe Hintergrundfluoreszenz zum Hindernis.<sup>16</sup> Synthetische Probleme, die zu Beacons ohne Löscher führen, Verunreinigungen von ungebundenen artifiziellen Molekülen und einem geringen Anteil an geöffneten Haarnadeln auch unter dem Schmelzpunkt<sup>138-139</sup> sind dafür verantwortlich.



**Abb. 28:** Molecular Beacon mit Fluorophor (F) und Löscher (Quencher, Q), der an die Ziel-DNA bindet und zu leuchten beginnt

Die Verwendung von intelligenten Sonden (smart probes) verbessert die Nachweisgrenze auf bis zu 1 pM,<sup>16</sup> weil nur noch ein Fluorophor eingebaut wird und neben der Emissionsintensität auch Lebenszeit und Verweilzeit im Messvolumen betrachtet werden.<sup>140</sup> Die Löschung der Fluoreszenz im geschlossenen Zustand ist hier auf einen photoinduzierten Lochtransfer vom Reportermolekül zu dem Poly-G-Stamm zurückzuführen.<sup>141</sup>

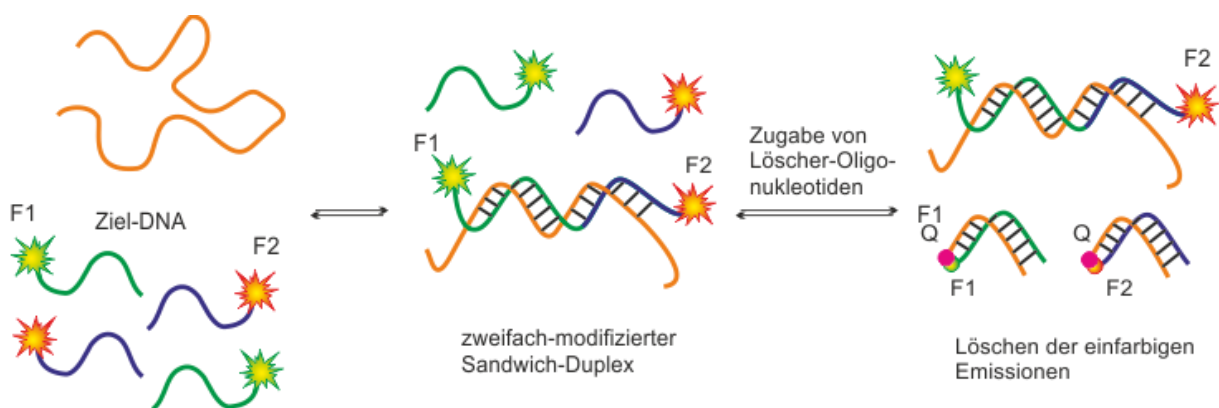
Für TIRFM eignet sich auch ein immobilisierter Molecular Beacon mit zwei Dicyanethylendihydrofuranen.<sup>142</sup> In geschlossenem Zustand bildet sie ein nichtfluoreszentes H-Dimer und in geöffnetem Zustand wird die erhöhte Emission beider Farbstoffe in einem Pixel beobachtet. Man erhält eine zweistufige Photobleichungssignatur, die es erlaubt gegen die Hintergrundfluoreszenz zu diskriminieren.

Statt eine Intensitätssteigerung zu registrieren, kann man auch eine co-lokalisierte Detektion zweier Farbstoffe benutzen.<sup>16</sup> Dabei wird mit zwei Lasern in das gleiche Messvolumen eingestrahlt, womit zwei verschiedene Emissionen detektiert werden können. Dies erreicht man mit einem Sandwich-Duplex (s. Abb. 29).<sup>143-144</sup>

Es werden zwei unterschiedlich modifizierte Oligonukleotidsonden benutzt, die an eine Ziel-DNA binden, sodass die zwei Fluoreszenzen sich in räumlicher Nähe befinden. Um die Emission von ungebundenen Sonden zu unterbinden, werden DNA-Fragmente mit Löschern zugegeben.

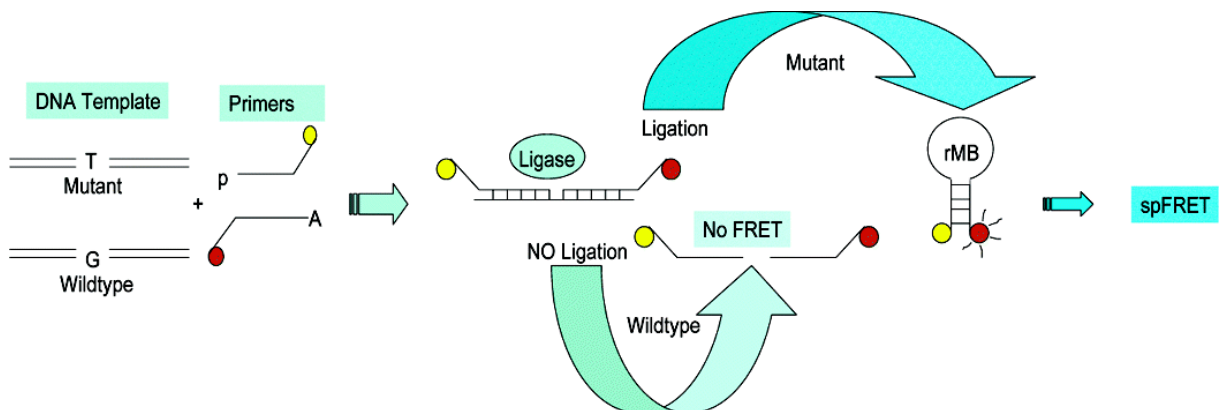
Eine Kombination aus Intensitätssteigerung und co-lokalisierter Detektion bringt die Verwendung von zwei Molecular Beacons, die an die Ziel-DNA binden.<sup>145</sup>

Neben Fluorophor- und Löscher-Paaren sind FRET-Systeme (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Systeme) mit emittierendem Akzeptor weit verbreitet. Sollte die Effizienz nicht bei 100 % liegen, ist eine co-lokalisierte Detektion möglich.<sup>16</sup>



**Abb. 29:** Co-lokalisierte Detektion einer Ziel-DNA mit zwei Sonden, die unterschiedliche Fluorophore tragen (F1 und F2) und Oligonukleotide mit einem Löscher (Q)

Für einen Energieübertrag muss der Abstand der beiden Moleküle im Nanometerbereich sein, das heißt nur ein gemeinsames Diffundieren durch das Messvolumen reicht nicht aus. Des Weiteren wird für die Emission von Photonen unterschiedlicher Wellenlänge nur ein Anregungslaser benötigt. *Wabuyele* et al. entwickelten einen inversen Molecular Beacon, der sich aufgrund einer templatbasierten Ligation bildet (s. Abb. 30).<sup>146</sup>

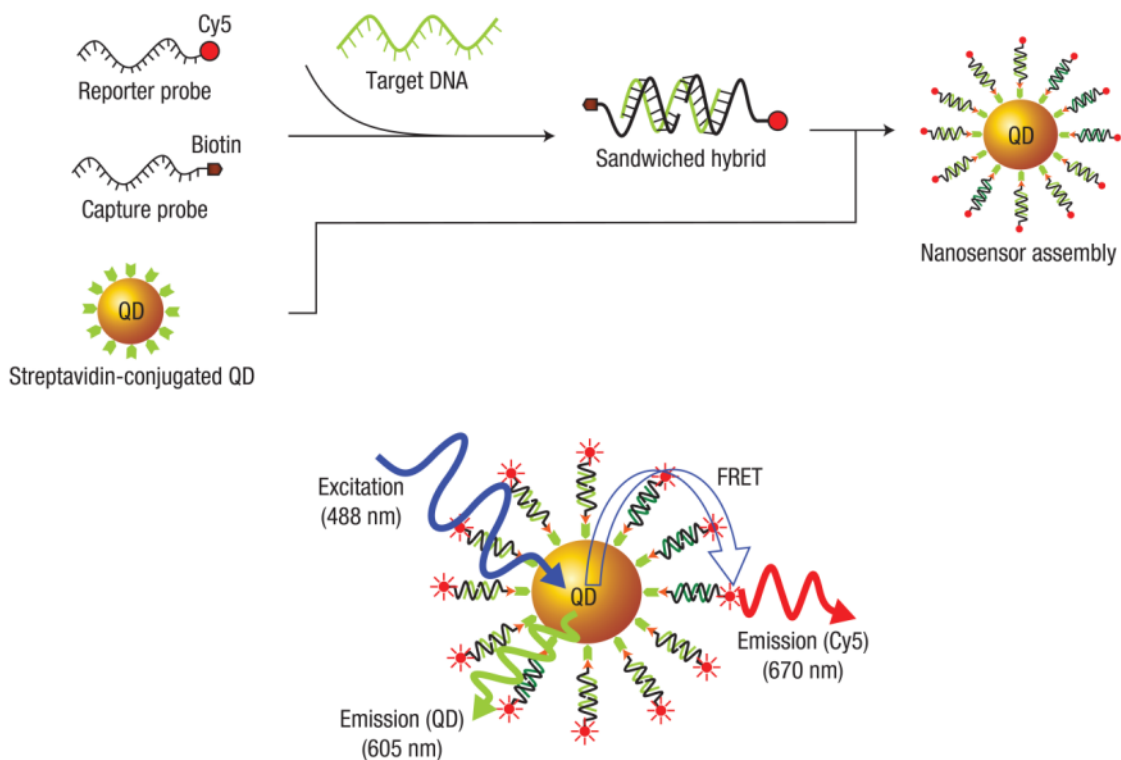


**Abb. 30:** Inverser Molecular Beacon auf Basis eines FRET-Systems, dessen Akzeptorchromophor bei Anwesenheit einer mutierten Ziel-DNA zu leuchten beginnt<sup>147</sup>

Zwei 10mere, einer mit Donor und der andere mit Akzeptor modifiziert, binden an die Ziel-DNA (DNA Template), wodurch beide ligiert werden können, sich eine Haarnadel ausbildet und die Donorfluoreszenz sinkt, während die Akzeptoremission steigt. Entscheidend ist, dass sich der Beacon erst ausbilden kann, wenn die Sonden verbunden sind (entropische Gründe) und dann stabiler ist als der Dublex mit der Ziel-DNA.

Ein Problem ist jedoch die direkte Anregung des Akzeptors und die oftmals geringe FRET-Effizienz, was ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis nach sich zieht.<sup>16</sup>

Multivalente Quantum Dots als Energiedonoren können dies verbessern. *Zhang* und Mitarbeiter benutzten einen streptavidinfunktionalisierten Quantum Dot als Donor für Cy5 (s. Abb. 31).<sup>148</sup> Die Anregungswellenlänge von 488 nm ermöglicht eine selektive Anregung des Donors und die Bindung von ungefähr 50 Akzeptorduplexen ermöglicht ein großes FRET-Signal.



**Abb. 31:** Nachweis einer Ziel-DNA (Target DNA) mit einem FRET-System aus einem streptavidinmodifiziertem Quantum Dot (QD) und Cy5<sup>149</sup>

## 3.2 Grün Fluoreszierendes Protein

### 3.2.1 Biolumineszenz von *Aequorea Aequorea*

1955 wurde zum ersten Mal berichtet, dass die Qualle *Aequorea Aequorea* grün fluoresziert, wenn man sie mit UV-Licht bestrahlt.<sup>150</sup> An ihrer Biolumineszenz sind zwei Proteine, das Aequorin und das Grün Fluoreszierende Protein (Green Fluorescent Protein, GFP), beteiligt. Das Aequorin enthält Coelenterazin, das mit gebundenem Sauerstoff oxidiert wird, sobald drei Calciumionen binden. Es bildet sich ein in vitro blau emittierender  $\text{Ca}_3$ -Apo-Aequorin-Coelenteramid-Komplex.<sup>151-152</sup> *Aequorea* leuchtet jedoch nicht blau, sondern es findet ein Energietransfer zum GFP statt, das dann grün fluoresziert ( $\lambda_{\text{max}} = 508 \text{ nm}$ ,  $\Phi = 0,8$ ) (s. Abb. 32).<sup>153-154</sup> 1979 konnte *Shimomura* das hieran beteiligte Chromophor, ein 4-(p-Hydroxybenzyliden)imidazolid-5-on, identifizieren.<sup>155</sup>

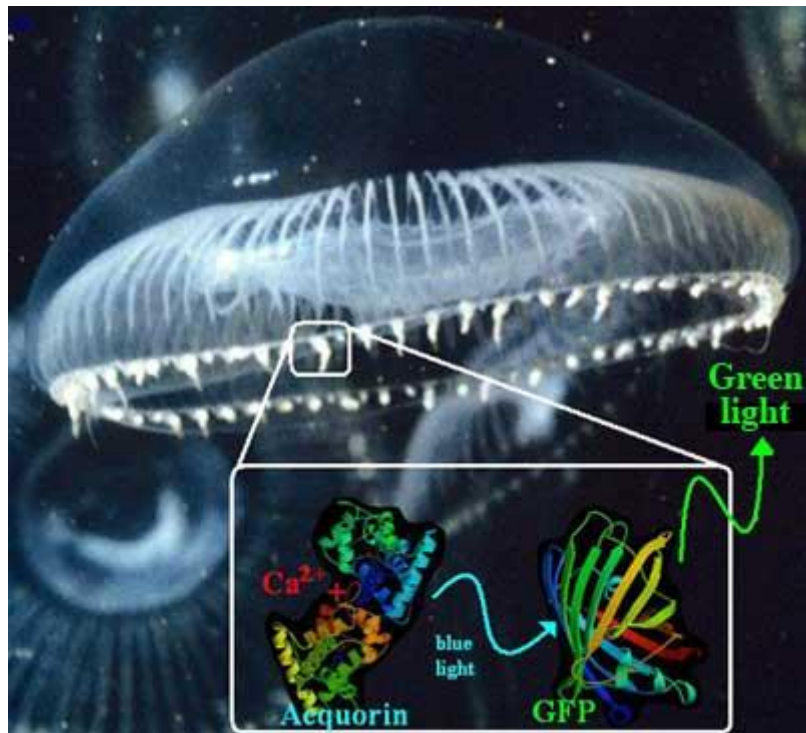


Abb. 32: Qualle *Aequorea Aequorea* mit den zwei Proteinen Aequorin und GFP (Photo: Osamu Shimomura)



### 3.2.2 Natürliche Entstehung des GFP-Chromophors

Das Chromophor des GFPs, 4-(p-Hydroxybenzyliden)imidazolid-5-on, wird durch eine autokatalytische und posttranslationale Zyklisierung seines eigenen Peptidrückgrats gebildet. Der Mechanismus ist mittlerweile fast vollständig geklärt (s. Abb. 33).<sup>156</sup>

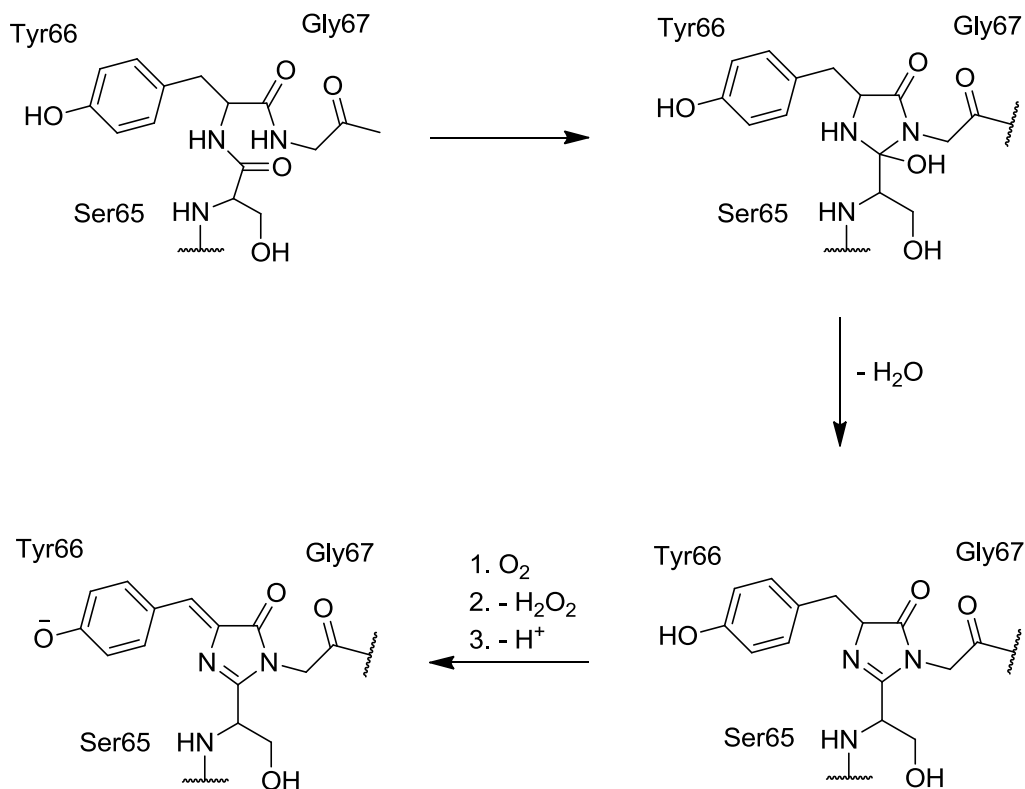


Abb. 33: Bildung des GFP-Chromophors aus Tyr66, Ser65 und Gly67

Die an der Reaktion beteiligten Reste sind Serin 65, Tyrosin 66 und Glycin 67. Zuerst findet ein nukleophiler Angriff vom Glycinstickstoff auf den Carbonylkohlenstoff des Tyrosins statt, gefolgt von einer Dehydratisierung. Unter Beteiligung von Sauerstoff wird dann zu einem ausgedehnten  $\pi$ -System oxidiert, das in der Proteinumgebung grün fluoresziert.<sup>157-159</sup>

### 3.2.3 Photochemie des GFP-Chromophors

Im Protein ist das Chromophor sowohl kovalent als auch über ein Wasserstoffbrückennetzwerk fest verankert. Wird es mit blauem Licht angeregt, findet ein Protonentransfer (excited-state proton transfer, ESPT)<sup>160-161</sup> vom Tyrosinrest über das Wasserstoffbrückennetzwerk zu einem nahe gelegenen Glutamatrest statt.<sup>20,162</sup> Dies resultiert in einer intensiven Anionenfluoreszenz (s. Abb. 34).<sup>18</sup>

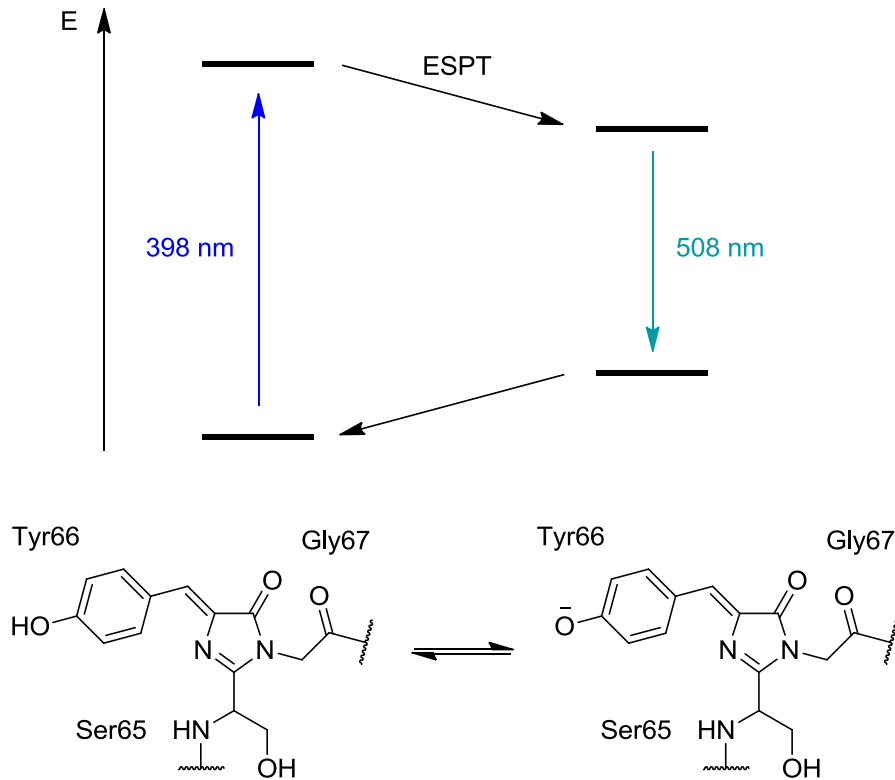


Abb. 34: Vereinfachtes Modell des photochemischen Verhaltens von GFP

In den letzten Jahren sind viele spektroskopische Studien an synthetischen Analoga des GFP-Chromophors,<sup>18-19,163-164</sup> wie Verbindung **A**<sup>165-168</sup> (s. Abb. 35), in Lösung durchgeführt worden. Bei allen wurde eine Hypsochromie der Emission und eine drastische Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute von bis zu vier Größenordnungen<sup>19</sup> im Vergleich zum Protein festgestellt. Die emittierende Spezies ist dabei die neutrale Form, die einer sehr effizienten strahlungslosen Desaktivierung unterliegt. Freie Rotation um die Aryl-Alken-Bindung und die Isomerisierung des Alkens führt zu einem nichtfluoreszierenden Intermediat, dessen Energiehyperpotentialfläche mit der des Grundzustands über eine konische Durchschneidung verbunden ist.<sup>18</sup> Die Proteinumgebung mit ihrem Wasserstoffbrückennetzwerk lässt dem Chromophor diese Bewegungsfreiheit nicht.

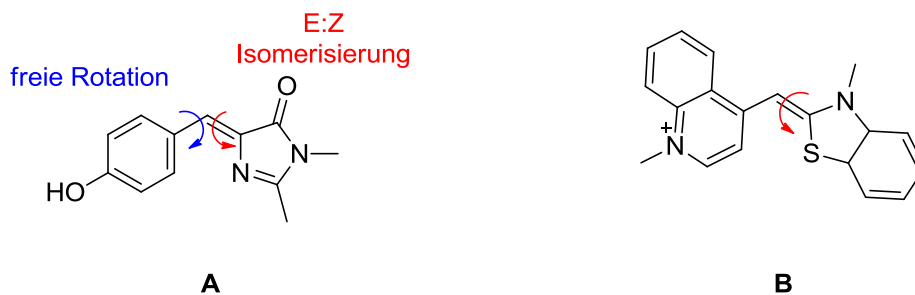


Abb. 35: Modellverbindung des GFPs (**A**) und Thiazolorange (**B**)

Es wurden einige Ansätze verfolgt die Rotation und Isomerisierung zu hemmen. *Wu* et al. ersetzte den Phenolring durch Pyrrol und komplexierten die beiden Ringe mit einer Bordifluorideinheit in Analogie zu den BODIPY-Farbstoffen,<sup>169</sup> wobei er deren Labilität in Lösung in Kauf nahm. Die Gruppe um *Tolbert* benutzte zur Fixierung Cadmium- und Zink-Kationen<sup>170</sup> und umgab das Chromophor mit einer synthetischen, hydrophoben Kapsel,<sup>171</sup> ähnlich der Proteinumgebung. *Paige* et al. ahmten das GFP durch ein RNA-Aptamer, genannt Spinach, nach und erhielten durch die Verwendung verschiedener Modellverbindungen eine beeindruckende Farbpalette.<sup>172</sup> Bei dem Cyaninfarbstoff Thiazolorange wird die Fluoreszenz durch eine sehr ähnliche cis-trans-Isomerisierung in Lösung wie im Falle des GFP-Chromophors gelöscht (s. Abb. 35, **B**). Durch kovalente Anbindung an Nukleinsäuren wird die Bewegungsfreiheit eingeschränkt und es kommt zu einem Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute.<sup>92,173</sup>

In Analogie zum Verhalten des Cyaninfarbstoffs führten *Diederichsen* und *Stafforst* zwei Modellverbindungen auf Basis des GFPs in PNA ein und hybridisierten sie mit komplementärer DNA, um durch  $\pi$ -Stapelung eine Versteifung des Chromophors zu erreichen.<sup>17</sup> Sie erhielten zwar eine Emissionssteigerung im Doppelstrang, aber eine Quantenausbeute von unter 0,5 % zeigt eindeutig, dass trotz der mit Röntgenstrukturanalyse nachgewiesenen Interkalation die Unterdrückung der internen Konversion unvollständig ist. So liegt die Vermutung nahe, dass der ESPT im Protein eine entscheidende Rolle für die Fluoreszenz spielen muss. Aus diesem Grund synthetisierte die Gruppe um *Chou* eine neue Modellverbindung mit ortho-ständiger Hydroxygruppe am Phenylring (s. Abb. 36).<sup>18</sup> Bei diesem Molekül kann sich eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen der OH-Gruppe und dem N2 des Imidazolons ausbilden und im angeregten Zustand findet ein intramolekularer Protonentransfer (excited-state intramolecular proton transfer, ESIPT) statt, sodass eine zwitterionische, tautomere Spezies entsteht, die bei 605 nm fluoresziert (s. Abb. 36). *Kang* et al. konnten bei dem gleichen Molekül keine Rotverschiebung der Emission feststellen.<sup>174</sup> Sie ersetzten einen Stickstoff des Fünfrings durch Sauerstoff und erhielten auf diese Weise eine größere Emission, was sie ebenfalls auf eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zurückführten. Eine analytisch äußerst wertvolle, große Stokes-Verschiebung erreichten sie damit aber nicht.

Eine Kombination der Ansätze von *Diederichsen* und *Chou*, das heißt Fixierung des Chromophors durch  $\pi$ -Stapelung UND ESIPT, könnte die gewünschte Steigerung in

der Emission und eine große Stokes-Verschiebung bringen und das GFP-Chromophor als neue Fluoreszenzsonde in DNA nutzbar machen.

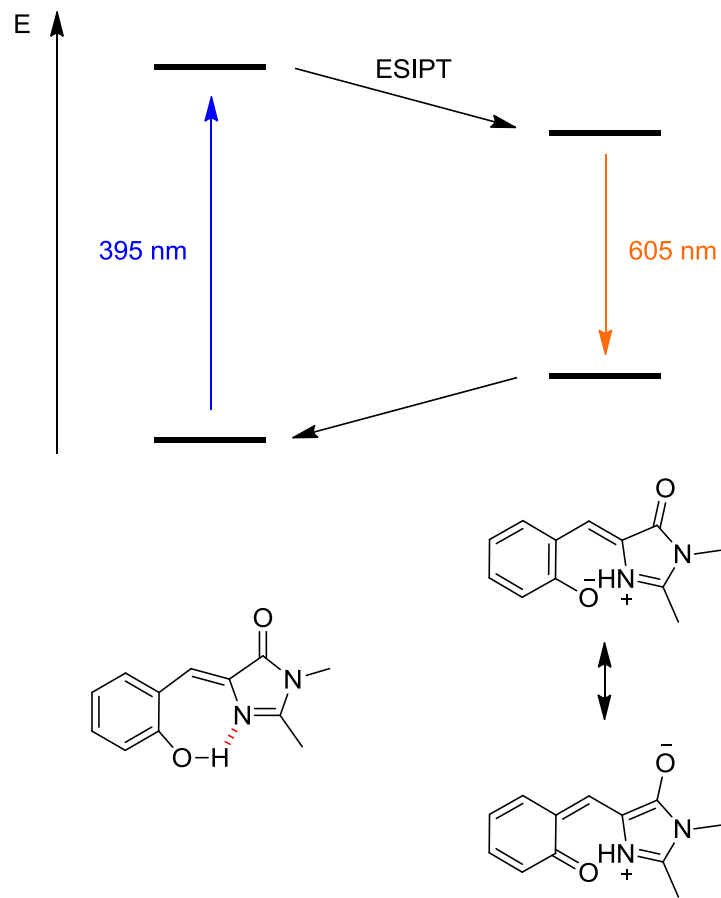
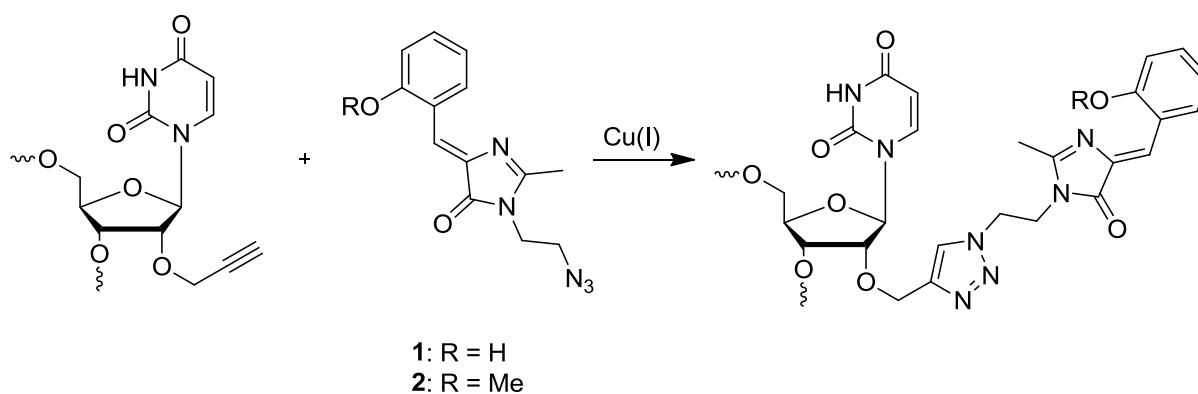


Abb. 36: Photochemisches Verhalten der Modellverbindung von Chou

### 3.3 GFP-Analogon als fluoreszente DNA-Sonde

#### 3.3.1 Synthesestrategie

Aufgrund der vorangegangenen Forschungsergebnisse wurde sich dafür entschieden, ein ortho-hydroxysubstituiertes GFP-Analogon (oGFP, **1**) zu synthetisieren, um durch einen ES IPT eine fluoreszente Sonde mit großer Stokes-Verschiebung zu erhalten. Eine weitere Verbindung mit methylierter OH-Gruppe (MeoGFP, **2**) dient als Vergleichssubstanz, inwiefern das photophysikalische Verhalten auch wirklich auf einen Protonentransfer zurückzuführen ist.



**Abb. 37:** Synthesestrategie für den Einbau von GFP-Analoga in DNA

Da beide Chromophore säurelabil sind,<sup>17</sup> konnte ein direkter Einbau über die Phosphoramiditmethode nicht erfolgen. Ein enzymatischer Einbau kam ebenfalls nicht in Betracht, weil einerseits für spektroskopische Untersuchungen eine zu große Menge an Oligonukleotid benötigt wird und zum anderen die Anknüpfung nicht über eine Base erfolgen sollte, sodass eine Polymerase das Molekül nicht als Substrat erkannt hätte (vgl. 4.1.3). Also war die postsynthetische Modifizierung das Mittel der Wahl. Wie bereits erläutert ist die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition dafür sehr gut geeignet (vgl. 3.1.5), solange keine Probleme mit Kupferionen auftreten, was hier nicht der Fall ist. Synthetisch am einfachsten ist es, wenn sich das Alkin in der DNA befindet. Deshalb wurde ein kommerziell erhältliches 2'-O-Propargyluridinphosphoramidit<sup>29</sup> verwendet. Durch die Anknüpfung der Chromophore am Zuckerrückgrat wird eine Wechselwirkung mit dem Basenstapel möglich,<sup>32</sup> die zu der gewünschten Hinderung der Molekülbewegung führen sollte. Die Verwendung von langen Alkylkern,

die prinzipiell eine Interkalation von Modifikationen ermöglichen, ist hier nicht sinnvoll, da die Imidazolone **1** und **2** nicht hydrophob genug sind, um sich freiwillig in das Innere der DNA zu begeben. Aus dem gleichen Grund wurde nur eine C2-Einheit zwischen Imidazolring und Azid gewählt. Der einzig mögliche Anknüpfungspunkt ist am N4, da N2 die für die intramolekulare Wasserstoffbrücke frei bleiben sollte.

### 3.3.2 Synthese der azidmodifizierten GFP-Chromophore 1 und 2

Der erste Schritt zu beiden Chromophoren **1** und **2** bildete eine literaturbekannte Er-lenmeyer Azlactonsynthese mit *o*-Anisaldehyd, *N*-Acetylglycin und Essigsäureanhydrid, das gleichzeitig als Lösungsmittel diente.<sup>175</sup> Die Methoxyschutzgruppe ist dabei notwendig, da die Hydroxygruppe den Ester sonst elektrophil angreift und ein Coumarinderivat entsteht. Das gelbe Azlacton **3** konnte in einer Ausbeute von 60 % gewonnen werden.

Das Imidazolone **4** wurde durch Umsetzung mit Ethanolamin in *n*-Propanol in einer Stufe synthetisiert.<sup>176</sup> Dabei lag der Schlüssel zum Erfolg in der relativ hohen Temperatur von 110 °C, sodass das entstehende Amid dehydratisiert und sich das gelbe Produkt **4** zu 46 % bildete. Eine direkte Synthese zu einem Bromfunktionalisierten Molekül mit 2-Bromethylamin war leider nicht möglich, da das Edukt in der Wärme polymerisiert. Auch der Umweg über eine Spaltung des Esters zur Säure und anschließender Amidkupplung war nicht erfolgreich.<sup>17</sup>

Die Versuche, das Hydroxid **4** über die Mitsunobu-Reaktion, eine Tosylierung oder Mesylierung in das entsprechende Azid zu überführen,<sup>177</sup> scheiterten. So musste der Umweg über das Bromid **5** gegangen werden, das mit der Appel-Reaktion<sup>178</sup> in einer Ausbeute von 61 % synthetisiert wurde. Es stellte sich heraus, dass das Phenol dabei noch geschützt sein muss, andernfalls ließ sich fast kein Produkt nachweisen.

Das gelbe methylierte Azid **2** ließ sich dann sehr einfach zu 40 % durch eine nukleophile Substitution mit Natriumazid in DMF gewinnen.

Im Falle des Chromophors **1** wurde jedoch erst die Methoxyschutzgruppe entfernt, da fraglich ist, ob das relativ labile Azid die folgende Prozedur überstanden hätte. Da das Chromophor säureempfindlich ist, wurde Bortribromid als Lewissäure zur Entschützung verwendet<sup>18</sup> und so konnte Verbindung **6** zu 72 % gewonnen werden.

Den letzten Schritt bildete wieder ein Brom-Azid-Austausch in DMF und das Chromophor **1** wurde zu 66 % isoliert.

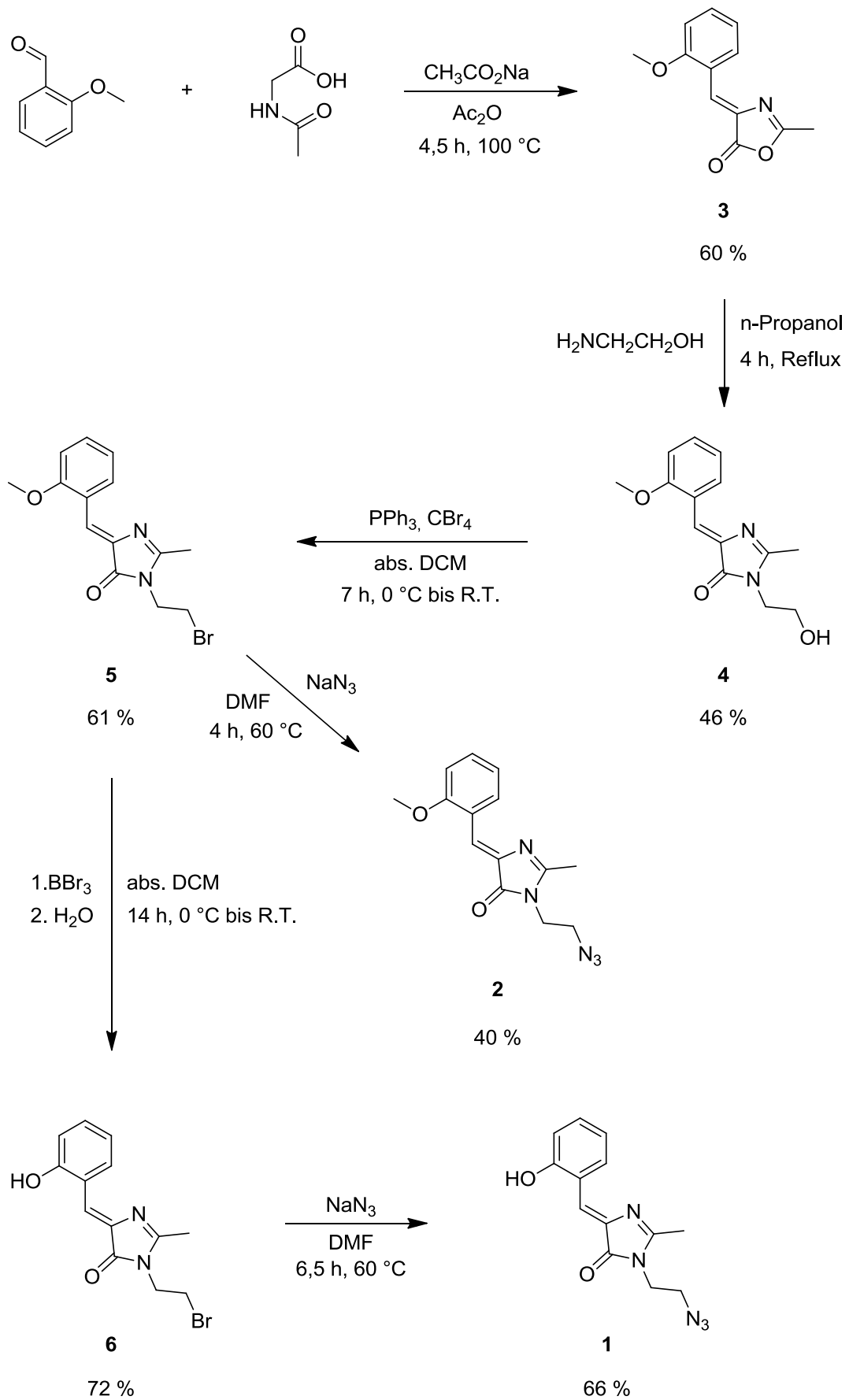


Abb. 38: Syntheschema der GFP-Analoga 1 und 2

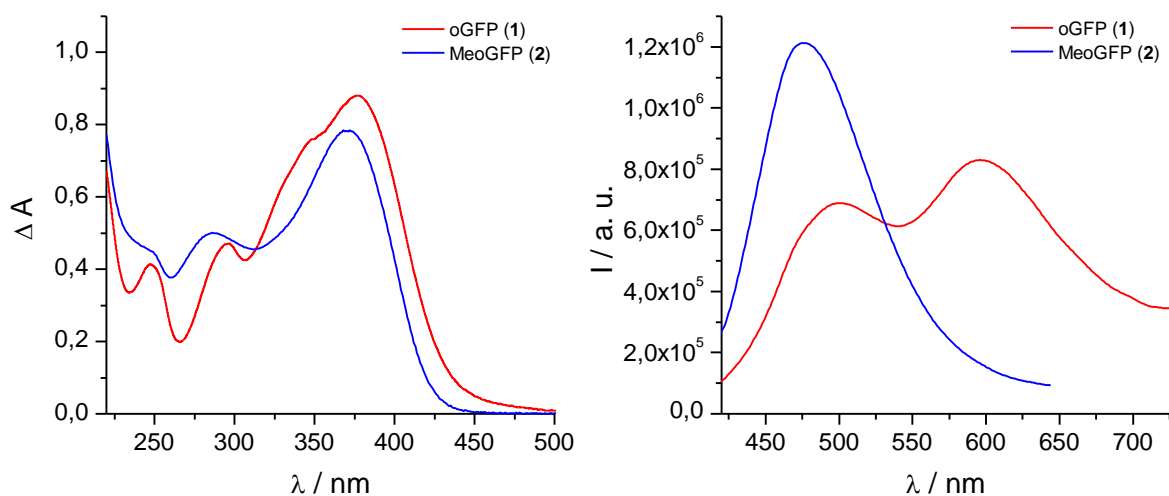
### 3.3.3 Postsynthetische Modifizierung von DNA mit GFP-Analoga

Das kommerziell erhältliche 2'-O-Propargyluridinphosphoramidit<sup>29</sup> wurde mit der DNA-Festphasensynthese nach *Caruthers* und *Beaucage* (vgl. 3.1.4) in die Mitte von vier verschiedenen 17meren eingebaut, die sich in den Nachbarbasen zu der Modifikation unterscheiden. Die kleine Propargylgruppe stellt keinerlei Hindernis bei der Oligonukleotidsynthese dar, sodass das Kupplungsprotokoll für Thymidin völlig unverändert genutzt werden konnte.

Die anschließenden Zykoadditionen mit den Aziden **1** und **2** wurden in Lösung nach einem Protokoll der Gruppe *Wagenknecht*<sup>32,102</sup> durchgeführt. Zunächst erfolgte die Entschützung der DNA und Abspaltung von der festen Phase mit wässrigem Ammoniak bei 50 °C über Nacht. Nach der Lyophilisation der Biomoleküle erfolgte die Postsynthese in DMSO/*t*-BuOH mit Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)hexafluorphosphat als Katalysator. Es wurde ebenfalls noch Natriumascorbat als Reduktionsmittel für Cu(II)-Ionen zugesetzt, da nicht unter Sauerstoffausschluss gearbeitet wurde und Cu(I) nicht wesentlich im Überschuss vorhanden war. Die Reinigung der modifizierten Oligonukleotide erfolgte über HPLC mit einer RP-18-Säule.

### 3.3.4 Spektroskopische Untersuchung von oGFP und MeoGFP

Zur spektroskopischen Charakterisierung von oGFP (**1**) und MeoGFP (**2**) wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Natriumphosphatpuffer bei neutralem pH-Wert aufgenommen (s. Abb. 39).

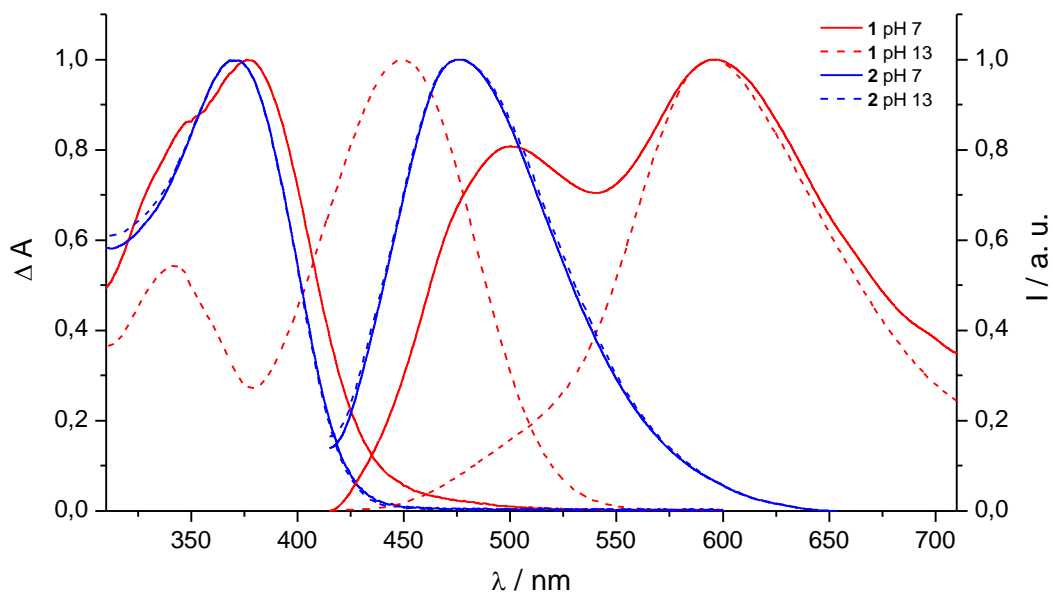


**Abb. 39:** Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ) (rechts) von oGFP (**1**) und MeoGFP (**2**) (100  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7)



Beide Substanzen zeigen eine breite Absorption mit einem Maximum bei 370 nm für **2** und 376 nm für **1**. oGFP weist noch eine blauverschobene Schulter auf. In der Fluoreszenz wird jetzt das unterschiedliche Verhalten der Chromophore deutlich. Das methylierte Imidazol **2** emittiert bei 478 nm und besitzt damit eine Stokes-Verschiebung von 108 nm ( $6106 \text{ cm}^{-1}$ ). Die Verbindung mit der freien Hydroxygruppe besitzt aber zwei Maxima, bei 501 und 596 nm. So ergeben sich zwei Stokes-Verschiebungen von 125 ( $6636 \text{ cm}^{-1}$ ) und 220 nm ( $9817 \text{ cm}^{-1}$ ). Der zweite äußerst große Wert deutet darauf hin, dass hier nicht mehr die gleiche Spezies emittiert, die das Licht absorbiert hat, sodass von einer chemischen Reaktion im angeregten Zustand ausgegangen werden kann.

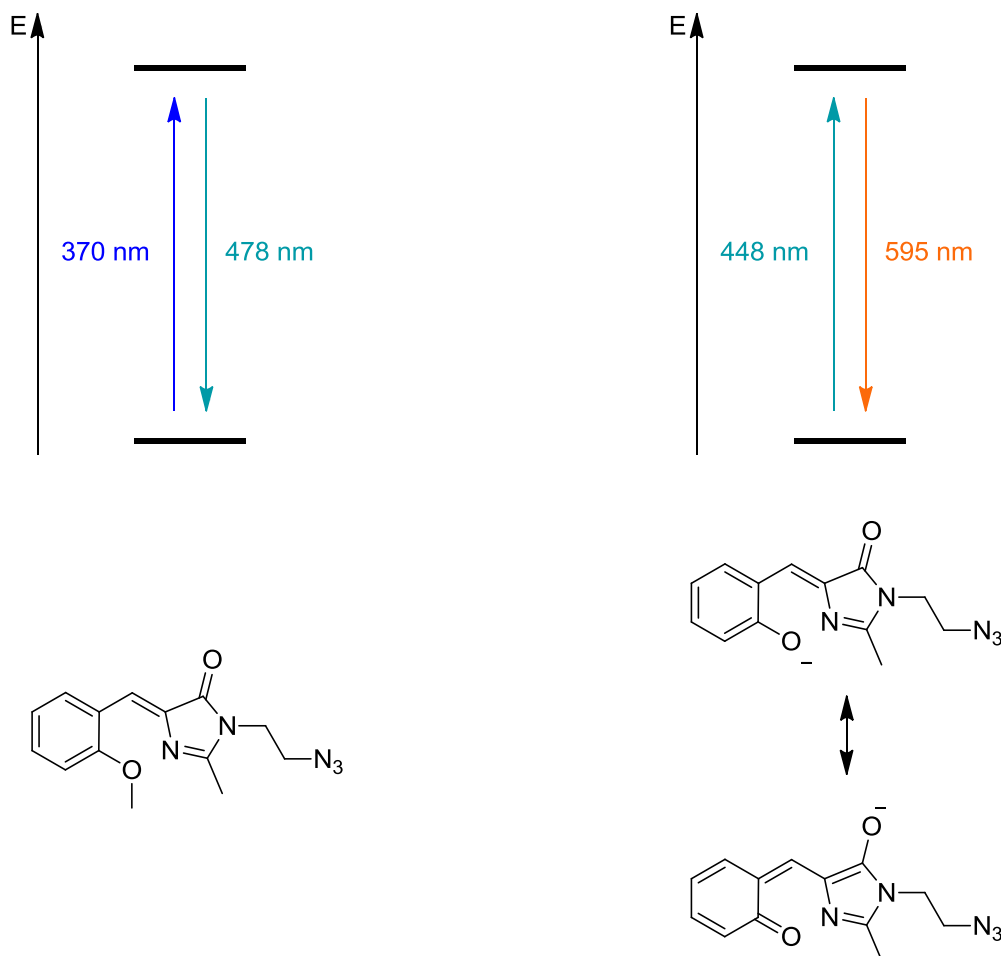
Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhalts wurden die gleichen Spektren auch noch bei pH 13 aufgenommen (s. Abb. 40).



**Abb. 40:** Absorptions- und Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ) von oGFP (**1**) und MeoGFP (**2**) mit auf 1 gesetzten Maxima ( $100 \mu\text{M}$ ,  $10 \text{ mM NaP}_i$ ) bei pH 7 und pH 13

Zur Verdeutlichung der Stokes-Verschiebung wurden die Absorptionen und Emissionen in einem Diagramm dargestellt (Maxima auf 1 gesetzt). Da MeoGFP (**2**) keine protische Gruppe besitzt, ergibt sich durch die Änderung des pH-Werts keine Änderung des optischen Verhaltens. Verbindung **1** weist jedoch eine erhebliche bathochrome Verschiebung der Absorption von 72 nm ( $\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ nm}$ ) auf und man beobachtet bei der Fluoreszenz fast ausschließlich das langwelligere Maximum bei 595 nm.

MeoGFP (**2**) zeigt keinerlei Besonderheiten bei seinen spektroskopischen Eigenschaften. Seine Quantenausbeute ist mit  $0,14 \cdot 10^{-3}$  in dem Bereich von Modellverbindungen des GFP-Chromophors<sup>19</sup> und damit äußerst gering, was auf die effiziente strahlungslose Desaktivierung zurückzuführen ist (s. Abb. 41 links). oGFP (**1**) unterscheidet sich von **2** nur in der ungeschützten Hydroxyfunktion am Benzolring. In basischem Medium wird diese deprotoniert, ein Anion entsteht, das mit seinem stärkeren positiven mesomeren Effekt die Absorption und Emission im Vergleich zur ungeladenen Spezies bathochrom verschiebt (s. Abb. 41 rechts).



**Abb. 41:** Photochemisches Verhalten von MeoGFP (**2**) (links) und oGFP (**1**) (rechts) bei pH 13

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist mit  $0,67 \cdot 10^{-3}$  größer als bei MeoGFP. Bei pH 7 ist oGFP ungeladen und gleicht in der Absorption seinem methylierten Verwandten (**2**). Die zwei Maxima der Emission lassen sich auf zwei verschiedene Spezies zurückführen. Das kurzwelligere entspricht der absorbierenden Substanz. Der langwelligeren Fluoreszenz geht ein intramolekularer Protonentransfer (ESIPT) von der Hydroxygruppe zu dem N2 des Imidazolons<sup>18</sup> voraus, da der  $pK_a$ -Wert von Phenolen und der  $pK_b$ -Wert von Aminen im angeregten Zustand sinkt (s. Abb. 42).<sup>53</sup> Der Proto-

nennttransfer findet statt, da sich im Grundzustand bereits zum Teil eine Wasserstoffbrücke ausbildet, die in Modellverbindungen mit der OH-Gruppe in para-Position nicht möglich ist. In aprotischen Lösungsmitteln verläuft der ESIPT vollständig.<sup>18</sup> Das wässrige Lösungsmittel scheint die Wasserstoffbrücke jedoch teilweise zu unterbrechen, wodurch beide Spezies vorliegen und woraus die duale Fluoreszenz resultiert. Dies scheint auch der Grund dafür zu sein, dass **1** mit einer Quantenausbeute von  $0,19 \cdot 10^{-3}$  nicht wesentlich an der Rotation und Isomerisierung gehindert wird.

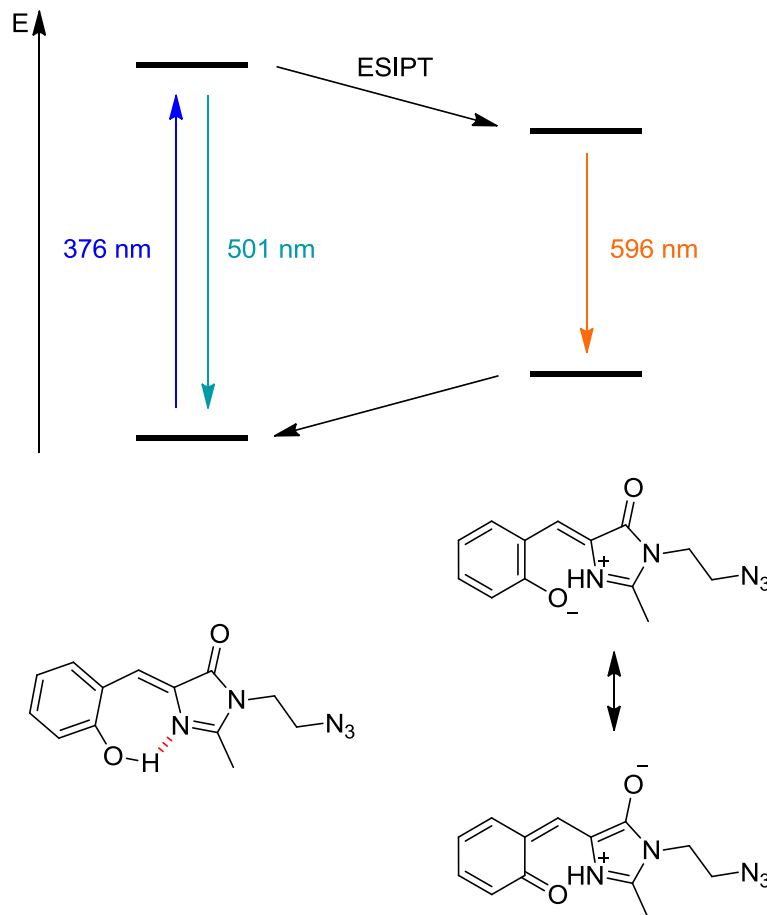
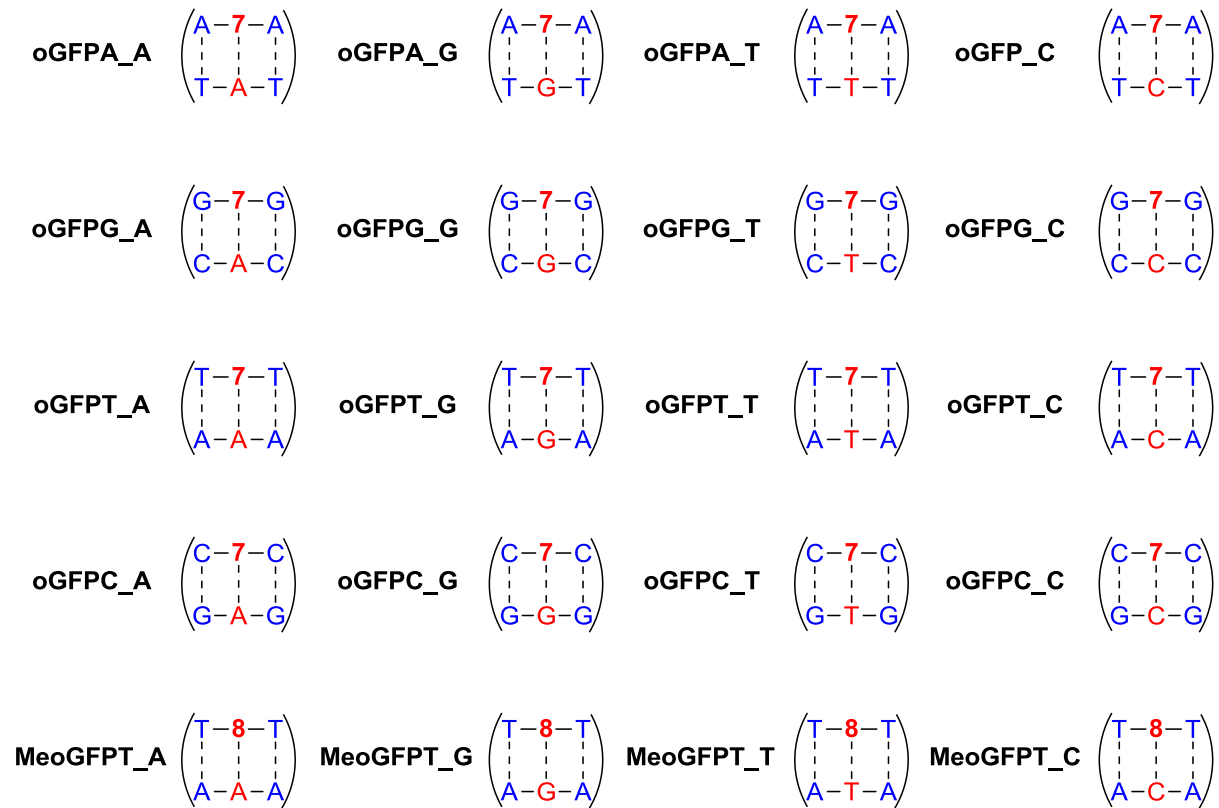
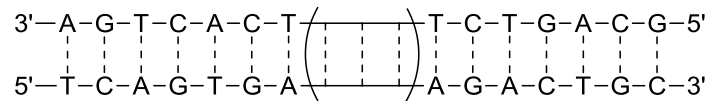


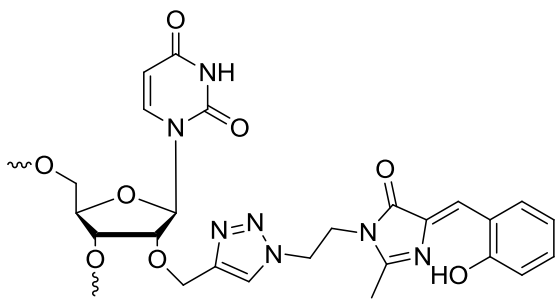
Abb. 42: Photochemisches Verhalten von oGFP (**1**) bei pH 7

### 3.3.5 Charakterisierung von GFP-modifizierter DNA

Nach den widersprechenden Ergebnissen der spektroskopischen Experimente mit den Aziden **1** und **2** wurden, wie beschrieben (vgl. 3.3.3), vier verschiedene Oligonukleotide mit oGFP modifiziert und eines mit MeoGFP. Die direkte Umgebung zu dem artifiziellen Baustein **7** (oGFP) wurde dabei variiert, damit man den Einfluss der Basen auf die Hemmung der strahlungslosen Desaktivierung und die Effizienz des ESIPT untersuchen kann (s. Abb. 43).



7 =



8 =

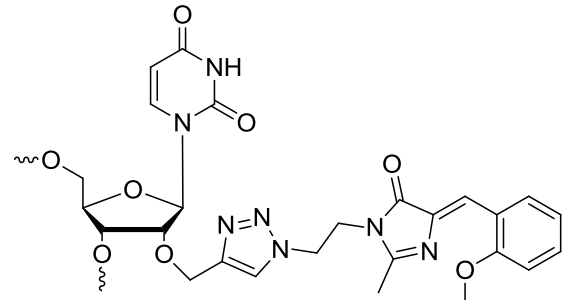


Abb. 43: DNA-Sequenzen vom oGFPX<sub>Y</sub> und MeoGFPT<sub>Y</sub> (X, Y = A, G, T, C) mit oGFP (7) und MeoGFP (8)

### Schmelztemperaturanalyse

Nukleinsäurebasen haben untereinander excitonische Wechselwirkungen (vgl. 3.1.1), die vom Einzelstrang zum Doppelstrang zunehmen.<sup>57,179</sup> Im Gegenzug sinkt der Extinktionskoeffizient bei 260 nm. Das Phänomen wird als Hypochromizität bezeichnet und dazu benutzt die Schmelztemperatur  $T_m$ , also die Temperatur bei der 50 % der Oligonukleotide einzelsträngig vorliegen, von Doppelhelices zu bestimmen.

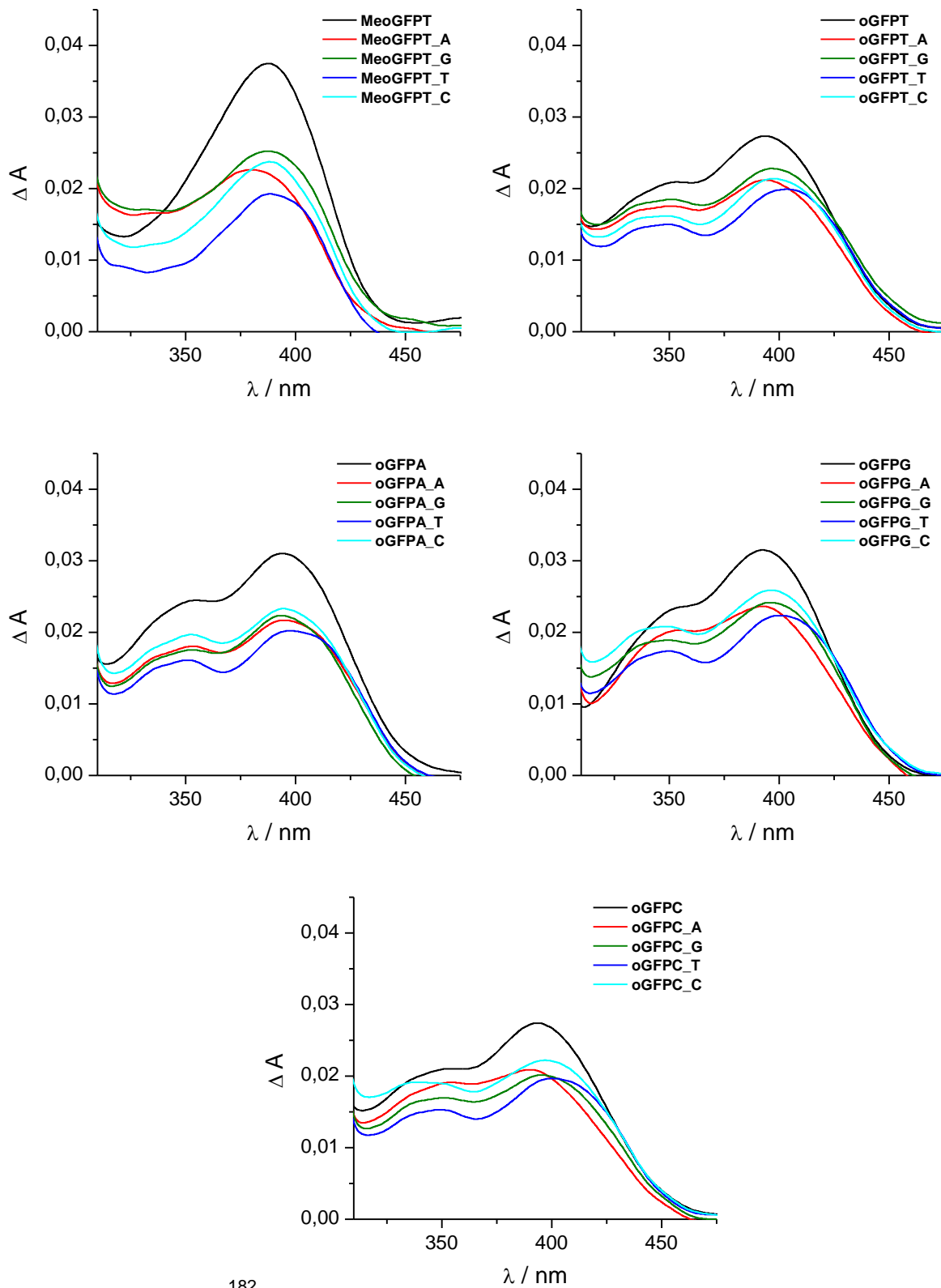
Die Schmelztemperaturen sind ein Maß für die Stabilität der Doppelstränge. Der Vergleich mit Referenzsträngen, die statt des modifizierten Uridins ein Thymidin enthalten, ermöglicht es den Einfluss der GFP-Chromophore auszumachen.

**Tab. 1:** Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) von **oGFPA\_Y** und **MeoGFPT\_Y** (X, Y = A, G, T, C);  $\Delta T_m$ : Unterschied der Schmelztemperaturen von Probe und Referenz (2,5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, 250 mM NaCl. pH 7); n. b.: nicht bestimmt

Duplex	$T_m /$ °C	Referenz- $T_m /$ °C	$\Delta T_m /$ °C	Duplex	$T_m /$ °C	Referenz- $T_m /$ °C	$\Delta T_m /$ °C
<b>oGFPA_A</b>	60,0	61,0	-1,0	<b>oGFPG_A</b>	66,0	68,0	-2,0
<b>oGFPA_G</b>	56,3	n. b.		<b>oGFPG_G</b>	62,0	63,8	-1,8
<b>oGFPA_T</b>	58,2	n. b.		<b>oGFPG_T</b>	63,3	60,3	+3,0
<b>oGFPA_C</b>	54,8	n. b.		<b>oGFPG_C</b>	60,5	58,3	+2,2
<b>oGFPT_A</b>	58,3	62,5	-4,2	<b>oGFPC_A</b>	63,8	66,0	-2,2
<b>oGFPT_G</b>	53,0	55,0	-2,0	<b>oGFPC_G</b>	60,5	n. b.	
<b>oGFPT_T</b>	57,8	53,2	+4,6	<b>oGFPC_T</b>	63,3	n. b.	
<b>oGFPT_C</b>	52,5	52,8	-0,3	<b>oGFPC_C</b>	58,3	n. b.	
<b>MeoGFPT_A</b>	57,3	62,5	-5,2	<b>MeoGFPT_T</b>	53,5	53,2	+0,3
<b>MeoGFPT_G</b>	51,7	55,0	-3,3	<b>MeoGFPT_C</b>	50,5	52,8	-2,3

Zuerst ist festzustellen, dass die Duplexe mit Guanosinen oder Cytidinen als Nachbarbasen höhere Schmelzpunkte aufweisen, weil der größere G-C-Gehalt einen Doppelstrang stabilisiert. Dies ist auf das bessere Stapelverhalten dieser Basen zurückzuführen.<sup>180</sup> Bei der Variation der Gegenbase ergibt Adenosin die größte Schmelztemperatur, da sich hier mit Uridin die korrekte Basenpaarung ausbilden kann. Es ist davon auszugehen, dass die GFP-Chromophore mit der DNA in Wechselwirkung treten, da sich eine Destabilisierung von bis zu -5,2 °C (**MeoGFPT\_A**) ergibt, die im Rahmen solcher Modifikationen liegt.<sup>32,102</sup> Auffällig ist jedoch die Stabilisierung von bis zu +4,6 °C, wenn sich gegenüber von **7** ein Thymidin im Gegenstrang befindet (**oGFPA\_T**), und dass dies für **8** (**MeoGFPT\_T**) nicht zu beobachten ist. Dieser Wert ist im Bereich einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung,<sup>181</sup> die zwischen der phenolischen Hydroxygruppe des Chromophors und einer Carbonylgruppe des gegenüberliegenden Thymidins entstehen könnte.

## UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzmessungen



**Abb. 44:** Absorptionsspektren von **oGFPX<sub>Y</sub>** und **MeoGFPT<sub>Y</sub>** (X,Y = A, G, T, C) (2,5 μM, 10 mM NaP<sub>i</sub>, 250 mM NaCl, pH 7)

Von allen modifizierten DNA-Strängen wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Sie besitzen zwei lokale Maxima, eines bei 260 nm, das hier nicht gezeigt ist und auf die natürlichen Basen zurückzuführen ist und die GFP-Absorption bei knapp 400 nm (s. Abb. 44). Sowohl MeoGFP, als auch oGFP besitzen eine geringere und rotverschobene Absorption in der DNA als ungebunden in Lösung (s. Abb. 45). Excitonische Wechselwirkungen mit den Basen sind für beide Effekte, Bathochromie und Hypochromie, verantwortlich.<sup>182-183</sup>

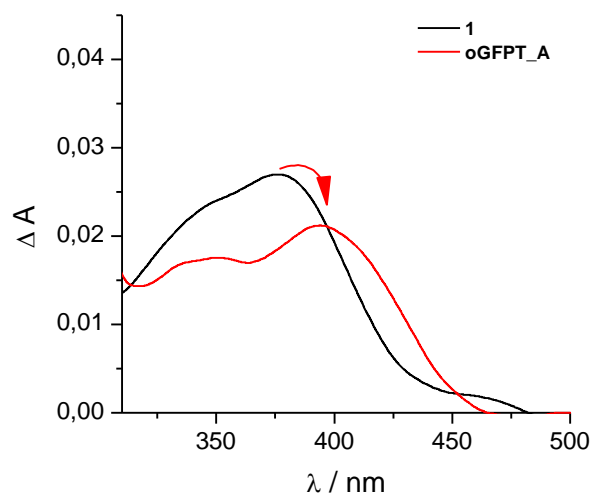
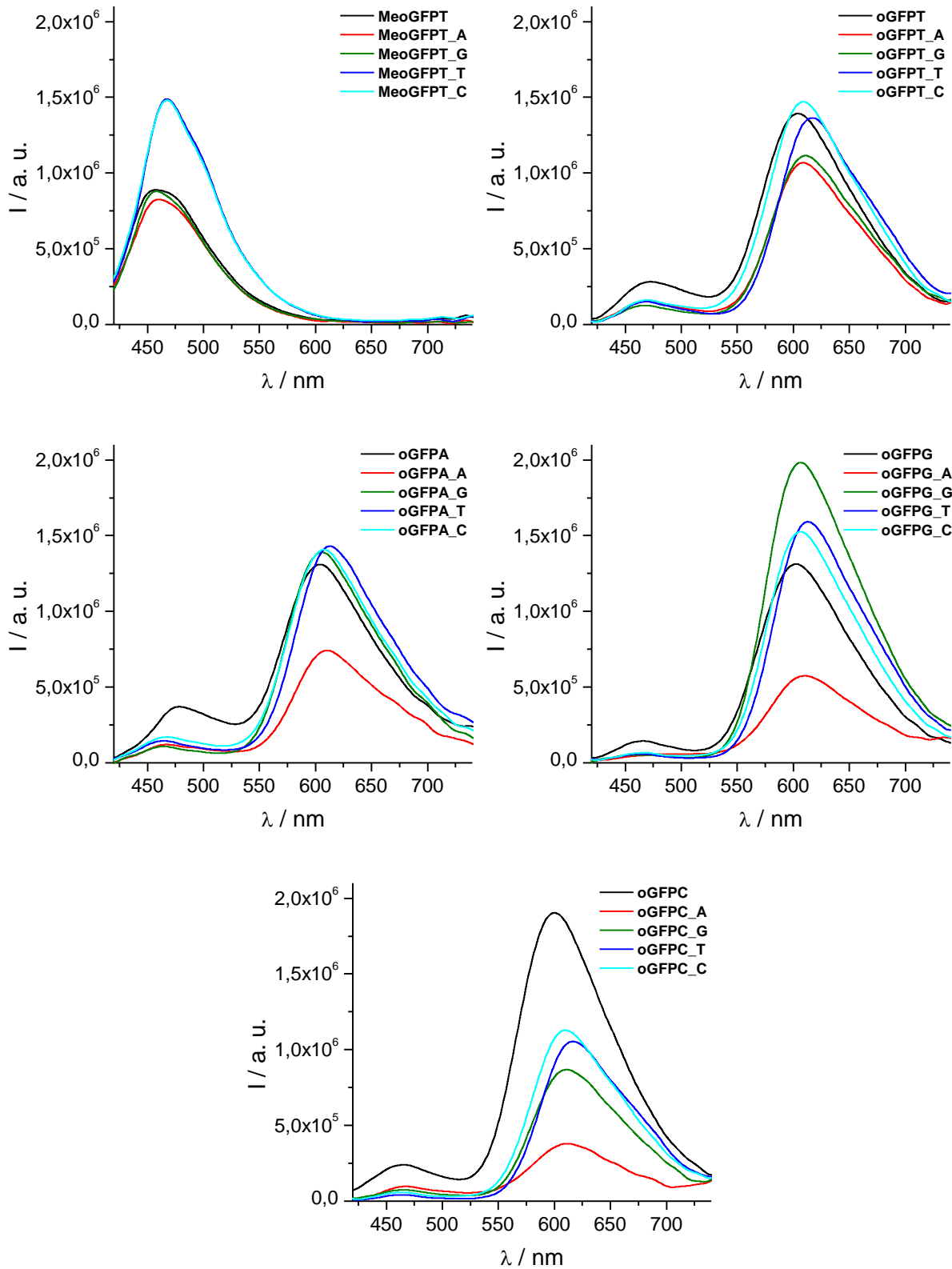


Abb. 45: Absorptionsspektren von **1** und **oGFPT\_A** (2,5 μM, 10 mM NaPi, 250 mM NaCl, pH 7)

Innerhalb der Lage der Maxima lässt sich ein Trend erkennen. **(Me)oGFPX\_A** besitzt (mit) das kurzwelligste und **oGFPX\_T** das langwelligste. Im Falle von **MeoGFPT\_T** lässt sich keine Verschiebung beobachten (s. Tab. 2).

Die Fluoreszenzspektroskopie ergab bei allen Oligonukleotiden eine erhebliche Steigerung der Quantenausbeute. Im Falle von **oGFPC** ist diese mit  $6,7 \cdot 10^{-3}$  35 mal größer als beim freien Chromophor (s. Tab. 2). Die Emissionen von **MeoGFPT\_Y** sind im Vergleich zu **2** hypsochrom verschoben, während die Wellenlängen der Fluoreszenzen von **oGFPX\_Y** durchweg größer sind (s. Abb. 46) als bei **1**. Die duale Emission des oGFPs verändert sich erheblich durch das Mitwirken der DNA. Zeigte **1** noch ein Verhältnis von 1,2 zwischen den Intensitäten der zwei Maxima (s. Tab. 2) in wässriger Umgebung, kommt es nun sogar schon in den Einzelsträngen zu einer Dominanz der langwelligeren Emission. Bei genauerem Vergleich der Emissionsmaxima fällt auf, dass Thymin als Gegenbase (**oGFPX\_T**) eine leichte Rotverschiebung in der Fluoreszenz bewirkt und die Maxima von **oGFPX** hypsochrom verschoben sind.



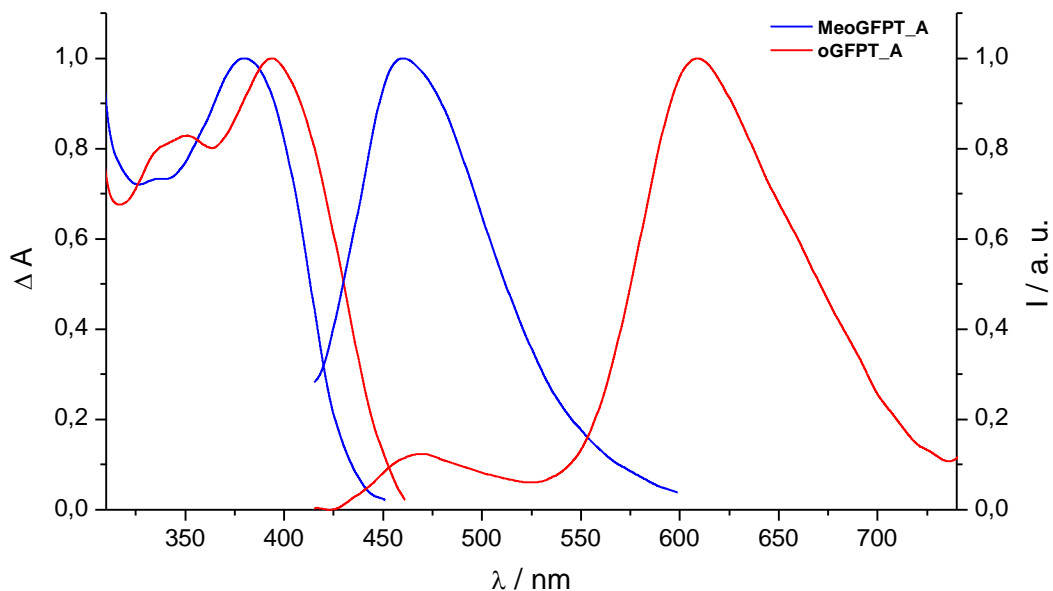
**Abb. 46:** Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ) von **oGFPX<sub>Y</sub>** und **MeoGFPT<sub>Y</sub>** (X,Y = A, G, T, C) (2,5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaPi}$ , 250 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7)



**Tab. 2:** Optische Eigenschaften von **oGFPX<sub>Y</sub>**, **MeoGFPT<sub>Y</sub>** (X, Y = A, G, T, C), **1** und **2**; F1: Fluoreszenzintensität des kurzwelligeren Maximums; F2: Fluoreszenzintensität des langwelligeren Maximums (2,5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, 250 mM NaCl, pH 7); n. b.: nicht bestimmt

Duplex	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	$\Delta\lambda / \text{nm}$	$\Phi / 10^{-3}$	$F_2 / F_1$
<b>2</b>	370	478	108	0,14	-
<b>1</b>	376	501 / 596	125 / 220	0,19	1,2
<b>1 (pH 13)</b>	448	595	147	0,67	-
<b>MeoGFPT</b>	388	458	70	1,7	-
<b>MeoGFPT_A</b>	382	460	78	2,7	-
<b>MeoGFPT_G</b>	386	458	72	n. b.	-
<b>MeoGFPT_T</b>	389	467	78	n. b.	-
<b>MeoGFPT_C</b>	389	467	78	n. b.	-
<b>oGFPT</b>	394	604	210	4,6	4,9
<b>oGFPT_A</b>	393	609	216	4,3	6,9
<b>oGFPT_G</b>	396	611	215	n. b.	8,8
<b>oGFPT_T</b>	403	617	214	n. b.	9,0
<b>oGFPT_C</b>	397	609	212	n. b.	9,1
<b>oGFPA</b>	394	604	210	4,1	3,5
<b>oGFPA_A</b>	394	610	216	3,8	6,2
<b>oGFPA_G</b>	394	606	212	n. b.	12,8
<b>oGFPA_T</b>	397	613	216	n. b.	9,9
<b>oGFPA_C</b>	395	608	213	n. b.	8,2
<b>oGFPG</b>	393	602	209	3,8	9,1
<b>oGFPG_A</b>	393	610	217	1,9	10,2
<b>oGFPG_G</b>	396	607	211	n. b.	38,3
<b>oGFPG_T</b>	400	613	213	n. b.	27,2
<b>oGFPG_C</b>	397	607	210	n. b.	22,6
<b>oGFPC</b>	393	600	207	6,7	7,9
<b>oGFPC_A</b>	390	611	221	2,1	3,9
<b>oGFPC_G</b>	396	611	215	n. b.	11,7
<b>oGFPC_T</b>	400	616	216	n. b.	25,2
<b>oGFPC_C</b>	397	610	213	n. b.	19,2

Betrachtet man alle Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen, Änderung der Schmelzpunkte zur Referenz, Lage der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima, Erniedrigung der Extinktionskoeffizienten, Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeuten und Veränderung der Verhältnisse der dualen Emission, so kann ganz klar von einer Interkalation oder zumindest einer starken Wechselwirkung der Chromophore mit den Basen über die kleine Furche ausgegangen werden. Dies führt zu einer Hemmung der Rotation und Isomerisierung innerhalb der GFP-Analoga, sodass die strahlungslose Desaktivierung vermindert wird und es zu einer erheblichen Zunahme der Fluoreszenz kommt. Die Hydroxygruppe von oGFP wird von der wässrigen Umgebung abgeschirmt, die Effizienz des ESIPT steigt dadurch und es wird eine Stokes-Verschiebung von maximal 221 nm ( $9274 \text{ cm}^{-1}$ ) erreicht (s. Abb. 47).



**Abb. 47:** Absorptions- und Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ) von **MeoGFPT\_A** und **oGFPA\_A** mit auf 1 gesetzten Maxima (100  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , 250 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7)

Eine detailliertere Betrachtung der Messergebnisse lässt auf unterschiedlich starke Wechselwirkungen der Chromophore mit der DNA schließen.

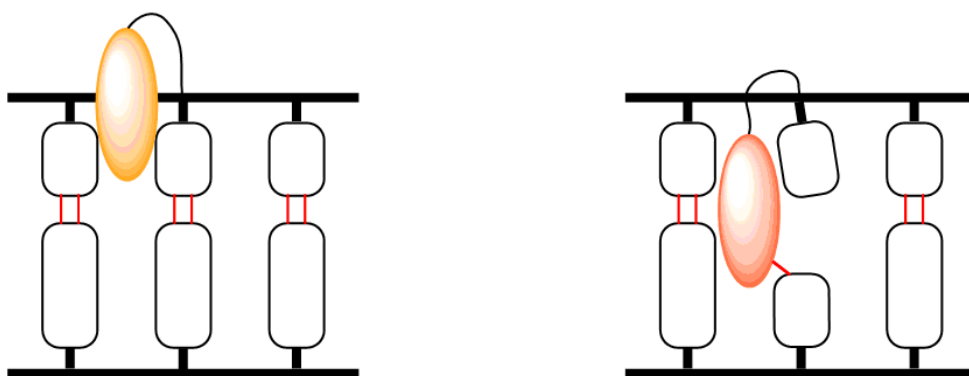
In den Einzelsträngen liegt schon eine Präorganisation des Chromophors und der DNA-Basen vor. Die völlig freie Bewegung ist nicht mehr möglich, da die Fluoreszenz schon erheblich gesteigert wurde. Die größeren Extinktionskoeffizienten und die bläulich verschobenen Emissionen im Vergleich zu den Doppelsträngen deuten darauf hin, dass eine enge  $\pi$ -Stapelung mit den Basen noch nicht vorhanden ist. Die Abschirmung von der wässrigen Umgebung ist schlechter als in den entsprechenden

Duplexen, da die Intensitätsverhältnisse der dualen Emission (mit) am niedrigsten sind.

Auch die Gegenstränge mit Adenosin als Gegenbase zu **7** bewirken keine erhebliche Steigerung in der Effizienz des ESIPT, die Fluoreszenzintensitäten sind niedrig und die Absorptionsmaxima liegen relativ kurzweilig. All dies weist auf eine schlechtere Interkalation von oGFP im Vergleich zu den anderen Duplexen hin. Wie aus den Schmelzpunktmessungen hervorgeht, sind die Wasserstoffbrückenbindungen hier intakt. Daraus wird gefolgert, dass das große Chromophor zu wenig Platz hat, um sich zwischen die Basenpaare zu schieben (s. Abb. 48 links).

Das Gegenteil ist mit Thymidin als Gegenbase der Fall. In dieser Fehlpaarung stimmt weder die Größenkomplementarität noch das Muster von Donor und Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen, sodass oGFP sowohl genug Raum zur Interkalation hat, also auch eine Wasserstoffbrücke zu einer Carbonylgruppe des Thymidin ausbilden kann (s. Abb. 48 rechts). Große positive  $\Delta T_m$ -Werte (anders als bei **MeoGFPT\_T**, wo keine freie Hydroxygruppe für eine Bindung bereit steht), hohe Effizienz des ESIPT und eine bathochrome Verschiebung der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima sind Beweis dafür.

Allgemein besitzen Oligonukleotide mit G-C-Paaren als Nachbarn höhere Verhältnisse in den Intensitäten der beiden Fluoreszenzmaxima (bis zu einem Faktor von 38,3). Die starken Stapeleffekte dieses Basenpaares wirken sich positiv auf die Abschirmung des Chromophors von der wässrigen Umgebung aus.



**Abb. 48:** Schematische Darstellung der Interkalation von oGFP in **oGFPT\_A** (links) und **oGFPT\_T** (rechts)

### 3.4 DNA-kontrollierte ESIPT-Prozesse als neues Konzept für fluoreszente Sonden

Die zwei GFP-Modellchromophore **1** und **2** wurden erfolgreich synthetisiert und mit Azidgruppen versehen, um sie mit einer Kupfer(I)-katalysierten Zykoaddition an Biomoleküle anknüpfen zu können. Das synthetische GFP-ähnliche Chromophor **1** besitzt die Hydroxygruppe in ortho-Position, statt in para-Position wie in natürlichem GFP. Diese Anordnung ahmt das Wasserstoffbrückennetzwerk im Protein nach, weil sich eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zu dem N2 des Imidazolrings ausbilden kann. Bei neutralem pH-Wert zeigt das Spektrum von oGFP eine duale Emission, die „normale“ und die ESIPT-getriebene rotverschobene Fluoreszenz. Nach dem Einbau des Moleküls in DNA als 2'-Modifikation wurden die Fluoreszenzspektren aller Einzel- und Doppelstränge von der bathochromen Bande dominiert. Die DNA schirmt oGFP von der wässrigen Umgebung ab, sodass die Wasserstoffbrückenbindung nicht unterbrochen wird. Die resultierende apparente Stokes-Verschiebung von ca. 215 nm ( $9000\text{ cm}^{-1}$ ) ist für ein einzelnes Fluorophor außergewöhnlich groß und ermöglicht eine gute Trennung von Anregungs- und Emissionslicht, eine sehr wünschenswerte Eigenschaft für viele bildgebende und bioanalytische Verfahren. Für beide Chromophore ließ sich aufgrund der Wechselwirkung mit DNA eine erhebliche Zunahme der Fluoreszenzintensität erzielen, was vor allem bei der Verwendung von Einzelmolekülspektroskopie ein extrem nützliches Verhalten ist, da die Hintergrundfluoreszenz minimiert wird. Leider ist die Quantenausbeute mit maximal  $6,7 \cdot 10^{-3}$  für analytische Zwecke immer noch zu gering.

Nichtsdestotrotz ist die Kombination beider Effekte, rotverschobene ESIPT-kontrollierte Fluoreszenz mit großer apparenter Stokes-Verschiebung und Steigerung der Intensität durch Hinderung der internen Konversion sehr attraktiv für das Design neuer und leistungsfähiger fluoreszenter Sonden für DNA und RNA, wie mittlerweile *Burger* und Mitarbeiter auch schon gezeigt haben.<sup>184</sup>

## 4 Bioorthogonale Triphosphate für postsynthetische Klick-Reaktionen

„Sometimes a good idea comes to you when you are not looking for it“: Damit hat der Erfinder der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), *Kary Mullis* recht und er selbst hatte auf einer nächtlichen Autofahrt durch Kalifornien im Frühling 1983 eine außergewöhnlich gute.<sup>51</sup> PCR vervielfältigt DNA in vitro auf Basis der natürlichen DNA-Replikation<sup>22,185</sup> und revolutionierte damit die molekulare Biologie.<sup>186</sup> Nun ist es möglich, jedes Gen aus jedem Organismus zu isolieren und zu untersuchen. Das Humangenomprojekt<sup>187</sup> wäre ohne diese Technik nicht durchführbar gewesen und auch etablierte Verfahren in der medizinischen Diagnostik und Forensik bauen darauf auf.<sup>15</sup>

Neben den Molekularbiologen entdeckten auch die Bioorganiker diese Methode für sich, um modifizierte Oligonukleotide herzustellen.<sup>28</sup> Dabei liegt das Augenmerk einerseits darauf, neue artifizielle Basenpaare zu entwickeln, um das genetische Alphabet der DNA zu erweitern,<sup>188</sup> und andererseits auf der Synthese von modifizierten Nukleinsäuren, deren Herstellung z.B. über automatisierte Festphasenmethoden nicht möglich ist. Der Vorteil bei der Verwendung von Enzymen sind die milden Bedingungen. Anders als bei der organischen Synthese (vgl. 3.1.4) kommen hier keine Säuren, Basen oder Oxidationsmittel zum Einsatz und der apparative Aufwand ist ebenfalls wesentlich geringer. Des Weiteren ist der Länge der DNA quasi keine Grenze gesetzt, sodass ganze artifizielle Gene konstruiert werden können.<sup>186</sup>

## 4.1 Enzymatische DNA-Synthese und Triphosphate

### 4.1.1 Polymerasekettenreaktion

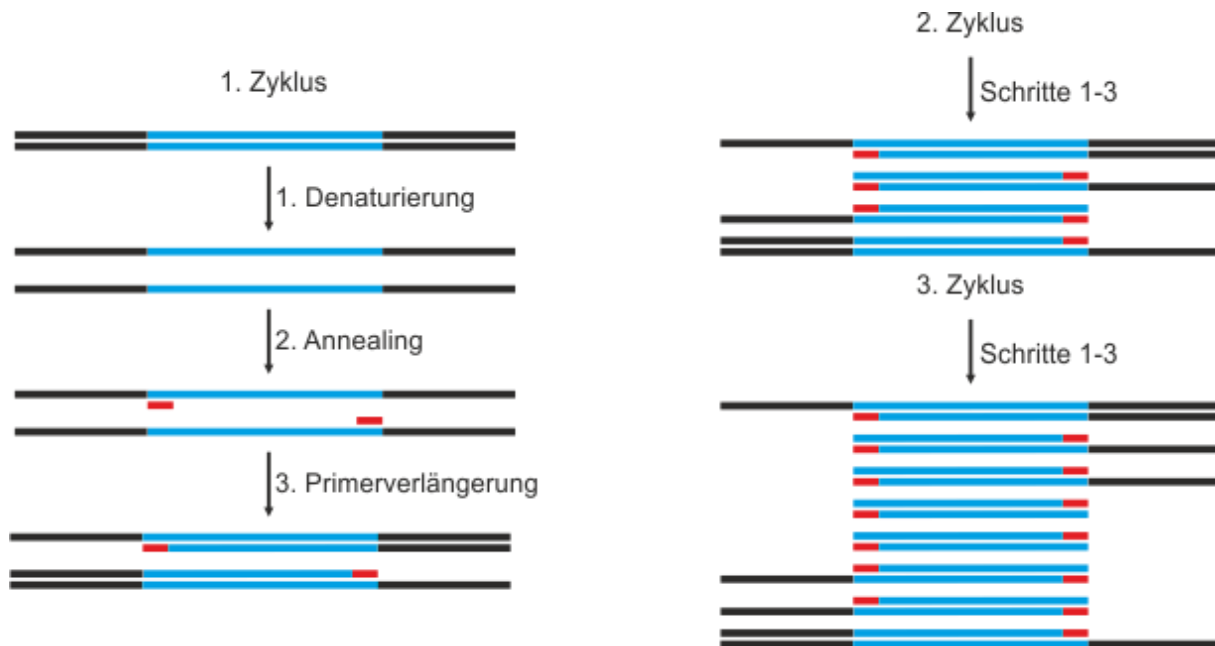
In lebenden Zellen ist ein hoch komplexes System mit verschiedensten Proteinen nötig, um das komplette Genom zu replizieren.<sup>189</sup> Vereinfacht gesagt, wird die DNA aufgewunden und jeder Strang dient als Templat zur Produktion eines Tochterstrangs.<sup>186</sup> Die Vervielfältigung basiert auf der Fähigkeit der Nukleotide nach den Watson-und-Crick-Regeln zu paaren. Eine große Anzahl an Proteinen und anderen Molekülen, wie RNA-Primern, werden benötigt, um die Effizienz und hohe Genauigkeit der DNA-Replikation in einer streng regulierten Art und Weise sicher zu stellen. PCR benötigt nur einige Komponenten des komplexen Systems der Replikationsmaschinerie, um DNA in einem kleinen Reaktionsgefäß zu kopieren:

- DNA-Templat
- DNA-Primer
- 2'-Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)
- DNA-Polymerase
- Zweiwertiges Metallkation (meist  $Mg^{2+}$ )
- Puffersystem

Das Aufwinden des Doppelstrangs übernimmt im Labor ein Heizschritt von 94-95 °C, Denaturierung genannt, wodurch die Wasserstoffbrücken und die  $\pi$ -Wechselwirkungen unterbrochen werden (s. Abb. 49). Dann erfolgt ein schnelles Abkühlen auf die Annealingtemperatur (~55 °C), sodass die Primer mit dem Templat hybridisieren können. Dies sind Oligonukleotide, die aus ungefähr 20 2'-Desoxynukleotiden bestehen und den zu kopierenden Bereich festlegen. Die Einzelstränge sind zu lang und zu komplex, um während der raschen Abkühlphase wieder zusammen zu finden. Die Temperatur wird auf einen optimalen Wert für die effiziente DNA-Synthese durch die Polymerase gebracht, meist um die 72 °C. Es werden thermostabile Enzyme verwendet, die durch die Denaturierung nicht zerstört werden und die Primerverlängerung bei relativ hohen Temperaturen erlaubt, was Falschpaarungen vermindert. Nachdem die Polymerase an den doppelsträngigen Abschnitt gebunden hat, beginnt

sie an das freie 3'-OH des Primers mit Hilfe von  $Mg^{2+}$  2'-Desoxynukleotide anzufügen.

Diese drei Schritte werden wiederholt bis die gewünschte Menge an DNA erreicht ist. Dabei erfolgen die Temperaturänderungen völlig automatisiert in einem PCR-Cycler. Bei einer Amplifikation mit theoretisch 100 % Effektivität entstehen nach 20 Zyklen aus einem einzigen Templatmolekül  $10^6$  Kopien. In der Praxis benötigt man dafür in der Regel zwischen 25 und 40.



**Abb. 49:** Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion: Theoretisch wird die Anzahl der Ziel-DNA bei jedem Zyklus verdoppelt; Der 1. Zyklus ergibt Produkte mit keiner definierten Länge, der 2. Zyklus ergibt die ersten Einzelstränge definierter Länge, der 3. Zyklus ergibt die ersten Doppelstränge definierter Länge

Bei Primerverlängerungsexperimenten geht es nicht um die Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts, sondern um die Untersuchung, ob sich ein künstliches Triphosphat als Substrat für eine DNA-Polymerase eignet und damit eine enzymatische Synthese von modifizierten Oligo- oder Polynukleotiden möglich ist.<sup>190-192</sup>

In solch einem Experiment wird das natürliche Triphosphat mit dem Analogon ersetzt. Bevor DNA-Bausteine und Enzym zugegeben werden, wird der kurze DNA-Primer mit der Templatsequenz hybridisiert. Die enzymatische Verlängerung erfolgt dann bei der optimalen Temperatur, die von der Polymerase bestimmt wird. Zur Analyse des synthetisierten Produkts wird eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt, wobei nur der Primerstrang entweder mit radioaktivem Phosphor oder einem Fluorophor markiert ist und so sichtbar gemacht werden kann. Unverlängerte Primer, vollständig mit natürlichen Nucleosiden verlängerte Pri-

mer und bis zur Stelle des künstlichen Einbaus verlängerte Primer dienen als Referenz.

#### 4.1.2 Nukleosidtriphosphatsynthese

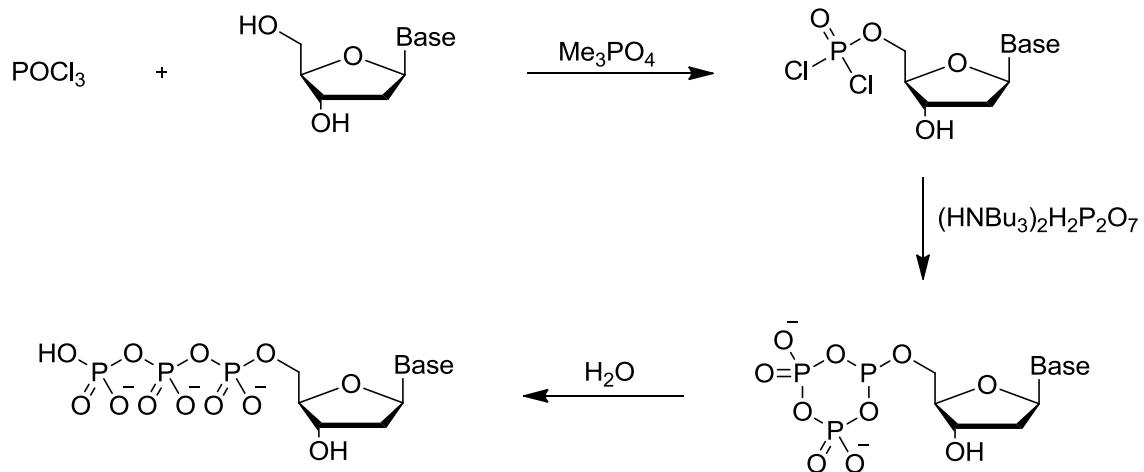
Das erste Triphosphat wurde 1949 von *Baddiley* et al. synthetisiert.<sup>193</sup> Es war das bis dahin einzige bekannte organische Derivat der Triphosphorsäure, Adenosintri-phosphat.<sup>194</sup> Die sequenzielle Strategie war sehr aufwendig und bestand aus der zweimaligen Kupplung von Dibenzylchlorphosphonat mit dem Monobenzylester von Adenosin-5'-monophosphonat bzw. -diphosphonat. Seitdem ist eine Vielzahl von verschiedenen Methoden entwickelt worden natürliche und modifizierte Triphosphate herzustellen. Es gibt einige Vorschriften, die für bestimmte Moleküle sehr gut funktionieren und andere, die für die meisten moderate Ausbeuten liefern, aber keine, die für alle anwendbar ist.

Die frühen Synthesen beschränkten sich auf natürliche Nukleoside, da hier das 5'-Monophosphat aus der Natur als Edukt verwendet werden konnte.<sup>194</sup> Die Anstrengungen richteten sich auf die Einführung einer reaktiven Abgangsgruppe am Phosphatrest wie DCC<sup>195-196</sup> oder Carbonyldiimidazol<sup>197</sup> und die anschließende Umsetzung mit Pyrophosphat. Dabei stellte die Unlöslichkeit der Phosphate in den gebräuchlichen wasserfreien organischen Lösungsmitteln ein Problem dar. Man griff schließlich auf sehr polare Systeme wie Pyridin, DMF oder DMSO zurück und überführte die geladenen Spezies in Salze mit Tributylammonium.

Mit der Entdeckung neuer natürlicher Nukleoside und Nukleotide und ihrer wichtigen Bedeutung in vielen zellularen Prozessen wuchs das Interesse an der Synthese artifizierlicher Triphosphate, was die Entwicklung effizienter 5'-Phosphorylierungsmethoden für Nukleoside voraussetzte.<sup>194</sup> Dichlorphosphorsäure und Phosphorylchlorid wurden standardmäßig für die Umsetzung mit Hydroxygruppen verwendet, jedoch erwiesen sie sich als zu reaktiv für die selektive Reaktion mit der 5'-OH-Gruppe in Anwesenheit von 2'-OH- und/oder 3'-OH-Gruppe. *Yoshikawa* et al. entdeckten, dass die Verwendung von Trimethylphosphat oder anderen Trialkylphosphaten als Lösungsmittel die Reaktion mit Nukleosiden an der 5'-Position beschleunigt.<sup>198</sup> Dies wurde einerseits auf die gute Löslichkeit, sowohl des Nukleosids als auch der geladenen Reagenzien zurückgeführt, und andererseits auf ein reaktives Intermediat, das sich aus  $\text{POCl}_3$  und Trimethylphosphat bildet, ähnlich dem Komplex aus DMF und  $\text{POCl}_3$ .<sup>199-200</sup> *Ludwig*<sup>201</sup> und andere<sup>202</sup> entwickelten im Anschluss auf Basis der Arbeit von *Yoshi-*



kawa eine dreistufige Triphosphatsynthese, die in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden kann (s. Abb. 50). Die Methode ist ebenfalls bei Edukten mit Doppel- und Dreifachbindungen anwendbar, wenn 1,8-Bisdimethylaminnaphtalin (Protonenschwamm<sup>®</sup>) zugesetzt wird, das die entstehende Salzsäure abfängt und so eine Addition an die Mehrfachbindung verhindert.<sup>203</sup>



**Abb. 50:** Ludwig-Methode zur Synthese von Nucleosidtriphosphaten: Phosphorylierung der 5'-Position mit  $\text{POCl}_3$  in Trimethylphosphat, anschließende Umsetzung mit Pyrophosphat zu zyklischem Intermediat und Hydrolyse

Obwohl die Verwendung von Phosphorylchlorid und Pyrophosphat sehr verbreitet ist, beinhaltet die Methode doch Nachteile.<sup>199</sup> Sie ist nicht vollständig selektiv für die 5'-Phosphorylierung, sodass ein Produktgemisch entsteht, dessen Reinigung meist mehrere Schritte erfordert, sodass die erzielten Ausbeuten häufig sehr niedrig sind.

Ludwig entwickelte zusammen mit Eckstein 1989 noch eine weitere schnelle Eintopfsynthese zur Herstellung von Nucleosidtriphosphaten (s. Abb. 51).<sup>204</sup> Die Schützung der Basen ist nicht nötig, aber die der Hydroxygruppen am Zucker. Meist wird hier erst die 5'-Position selektiv trityliert, dann die 2'- und/oder 3'-Position acetyliert und schließlich die primäre Alkoholfunktion wieder entschützt. Diese wird mit 2-Chlor-4*H*-1,3,2,-Benzdioxaphosphorin-4-on zu einem zyklischen Intermediat umgesetzt, bevor mit Iod oxidiert wird und nach der Reaktion mit wässrigem Ammoniak das ungeschützte Nucleosidtriphosphat vorliegt. Oft ist der Aufwand der erforderlichen

Schützung durch weit bessere Ausbeuten als bei der Ludwig-Methode gerechtfertigt, da keine Probleme bei der selektiven Phosphorylierung auftreten.

Es gibt noch viele weitere Methoden zur Synthese von Triphosphaten,<sup>199,205-206</sup> aber die Ludwig- und die Eckstein-Methode sind die am häufigsten angewandten. Im Ge-

gensatz zu anderen Vorschriften sind ihre Ausbeuten meist etwas geringer, aber sie sind für die meisten Nucleoside geeignet.

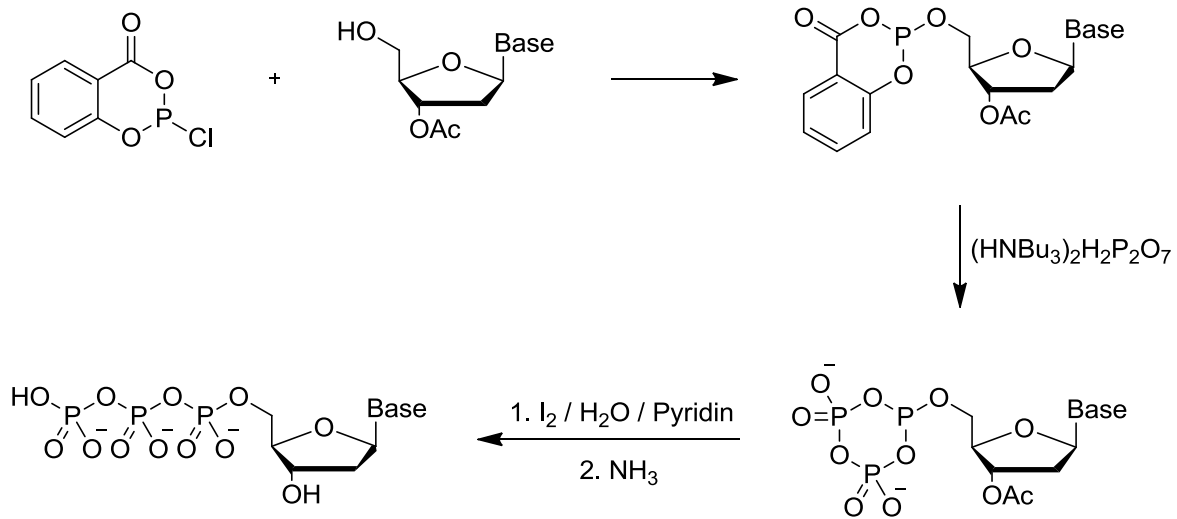


Abb. 51: Synthese nach Ludwig und Eckstein über ein zyklisches Intermediat zum Triphosphat

#### 4.1.3 Effizienz des enzymatischen Einbaus von artifiziellen Nucleosidtriphosphaten

DNA-Polymerasen lassen sich aufgrund ihrer primären Aminosäuresequenz verschiedenen Familien zuordnen: A, B, C, D, X und Y.<sup>207</sup> Sie alle katalysieren den Nucleotidyltransfer in verschiedenen zellulären Prozessen, wie der DNA-Replikation. Trotz ihrer funktionellen Bandbreite benutzen alle bisher in vitro untersuchten Enzyme zum Einbau von Nucleotiden einen Mechanismus mit zwei divalenten Metallionen und besitzen eine ähnliche strukturelle Architektur bei der Polymerasedomäne, die sich aus verschiedenen Subdomänen zusammensetzt. Als Antwort auf die Bindung eines dNTPs bewegen sie sich, sodass die verschiedenen konformationellen Dynamiken, von korrekten und inkorrekten Triphosphaten ausgelöst, unter dem Verdacht stehen, für die Genauigkeit der Polymerasen mit verantwortlich zu sein. Erst in den letzten Jahren wurde begonnen die Wechselwirkungen zwischen DNA-Templat, Primer und 2'-Desoxynucleosidtriphosphaten genauer zu untersuchen, um damit Rückschlüsse auf die Akzeptanz von künstlichen Triphosphaten ziehen zu können.<sup>207-210</sup> Wir sind aber noch weit davon entfernt, verlässliche Regeln aufzustellen. Vielmehr basieren das Design von modifizierten Triphosphaten und die Wahl einer entsprechenden Polymerase auf Erfahrungswerten aus Primerverlängerungsexperimenten. Klar ist, dass eine Vielzahl von physikochemischen Charakteristika der Analoga, wie Sterik und Elektrostatik bei der Bildung eines produktiven Enzym-Templat-Nucleotid-

Komplexes eine Rolle spielen. Auch die weitere Verlängerung des Primers nach dem künstlichen Baustein wird maßgeblich von dessen Einfluss auf die Sekundärstruktur des resultierenden Oligonukleotids bestimmt.<sup>207</sup> Im Allgemeinen eignen sich Polymerasen der B-Familie besser für den Einbau von Nukleosidtriphosphatanaloga als die der A-Familie.<sup>191,211-213</sup> Es muss jedoch für jedes neue dNTP wieder die Eignung verschiedener Enzyme untersucht werden, um eine effiziente Umsetzung zu erhalten.

#### 4.1.4 Basenmodifizierte 2'-Desoxynukleosidtriphosphate

Aus den vorangegangenen Aspekten ergibt sich für die Entwicklung von basenmodifizierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten der Grundsatz, je größer die Ähnlichkeit zu den kanonischen Nukleotiden, desto besser für einen effizienten enzymatischen Einbau. Für das Design von artifiziellen Basenpaaren, die eine hohe Selektivität bei PCR-Anwendungen besitzen sollen, gelten noch einmal spezielle Anforderungen.<sup>188</sup> Zur Einführung von künstlichen, relativ großen Resten hat sich deshalb die Verwendung von Linkern an den Purinen oder Pyrimidinen bewährt. Der Anknüpfungspunkt muss dabei so gewählt werden, dass möglichst keine Störung in der Struktur der Doppelhelix entsteht. Die 5-Position bei Pyrimidinen und die 7-Position bei 7-Deazapurinen (7-modifizierte Purine sind hydrolyseempfindlich) haben sich dabei bewährt, mutmaßlich weil die Modifikationen in die große Furche ragen und wenig sterische Probleme mit dem aktiven Zentrum der Polymerase auftreten. *Famulok* und Mitarbeiter waren die ersten, die ein komplettes Set aus vier modifizierten dNTPs hatten (C5-substituierte dTTPs und dCTPs und C7-substituierte 7-Deaza-dATPs und -dGTPs) und konnten damit hoch modifizierte DNA-Doppelstränge synthetisieren.<sup>26,214-215</sup> Linker an z.B. C8 bei Purinen induzieren bei größeren Resten eine Drehung der Base in syn-Konformation, sodass keine effiziente Umsetzung stattfinden kann.<sup>82-83</sup> Obwohl die exozyklischen Aminfunktionen von Adenosin und Cytosin in die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen involviert sind, eignen sie sich auch zur Anbringung von Alkyllinkern,<sup>216</sup> wenngleich C5-modifizierte dCTPs effizienter umgesetzt werden.

Die Struktur der Verbindung beeinflusst ebenfalls die Substrateigenschaften von modifizierten Triphosphaten.<sup>23</sup> Längere Linker reduzieren unvorteilhafte sterische Wechselwirkungen mit dem einzuführenden Rest und begünstigen so die Einbaueffizienz. Dabei stellt eine Anzahl von 8 bis 10 Atomen das Optimum dar, weil sehr lan-

ge Ketten wiederum negative Auswirkungen haben können. Die Struktur und Flexibilität von Linkern ist ebenfalls nicht vernachlässigbar, wie mehrere Studien mit substituiertem C5-dUTP<sup>217-220</sup> und C7-7-Deaza-dATP<sup>220</sup> unter Verwendung der *Taq*-Polymerase zeigten. Flexible gesättigte Alkyl- und cis-Alkenylreste führen wahrscheinlich zu einer unvorteilhaften Anordnung im Enzym-Substratkomplex, die eine Umsetzung verhindert. Durch rigide lineare Propinyl- und trans-Alkenyllinker wird solch eine Störung nicht hervorgerufen. Aus diesem Grund und der über die Sonogashira-Reaktion sehr guten synthetischen Zugänglichkeit fanden die propinylmodifizierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphate große Verwendung. Die Einführung eines Spinlabels<sup>221</sup> oder verschiedener Fluorophore, wie FluoroRed,<sup>222</sup> Rhodamin 110<sup>222</sup> und TAMRA<sup>223</sup> waren so möglich. *Hocek* und Mitarbeiter benutzten sehr erfolgreich halogenierte 2'-Desoxynukleosidtriphosphate, um in einer wässrigen Kreuzkupplungsreaktion verschiedene Alkinreste anzufügen.<sup>211</sup>

#### 4.1.5 Zuckermodifizierte 5'-Nukleosidtriphosphate

Zuckermodifizierte 5'-Nukleosidtriphosphate, vor allem an der 2'-Position, werden von DNA-Polymerasen meist nicht als geeignete Substrate erkannt.<sup>207</sup> Die Enzyme besitzen einen strikten Nukleotid-Selektionsmechanismus, um Fehleinbauten von Ribonukleotiden in DNA zu verhindern. Sie besitzen im aktiven Zentrum ein sogenanntes sterisches Tor, das entweder aus einem Aminosäurerest oder einem Segment des Proteinrückgrats besteht und die Umsetzung von 2'-modifizierten Nukleosidtriphosphaten verhindert. Durch gerichtete Evolution lassen sich aber Mutationen in Polymerasen erzeugen, die das aktive Zentrum zugänglicher machen.<sup>224-225</sup> Auch wenn das substituierte Substrat an den Primer angefügt wurde, ist die weitere Verlängerung oft nicht gegeben oder stark verlangsamt, da die Zuckerkonformation sich zu der normaler B-DNA unterscheidet und eine intakte Wechselwirkung zwischen Primer, Templat, dNTP und Polymerase so nicht mehr gegeben ist. Trotzdem gibt es einige Beispiele für erfolgreiche enzymatische Einbauten von zuckermodifizierten Nukleotiden.<sup>191</sup>

Als gut geeignetes Substrat für verschiedene DNA-Polymerasen erwiesen sich sowohl 2'-Fluor-2'-desoxynukleosidtriphosphate, als auch 2'-Fluor-D-arabino-2'-desoxynukleosidtriphosphate. Erstere werden neben anderen kommerziell erhältlichen Polymerasen am besten von *UITma* akzeptiert<sup>226</sup> und auch Polymerase  $\alpha$  und  $\beta$  erwiesen sich als geeignet.<sup>227</sup> Mit den Polymerasen der B-Familie, 9°N, Phusion High-

Fidelity und Deep Vent (exo-), ließ sich sogar enzymatisch 2'-Desoxy-2'-fluor- $\beta$ -D-arabinonukleinsäure (FANA) aus den vier entsprechenden Triphosphaten herstellen.<sup>228</sup> Der Halogenrest ist kleiner als eine Hydroxygruppe, sodass das sterische Tor ein geringeres Hindernis darstellt und er auch noch in eine andere Richtung als die Alkoholfunktion bei Ribonukleotiden zeigt.<sup>23</sup>

*Veedu* et al. benutzten Locked-Nukleosidtriphosphate (vgl. 5.1.7). Die *Pfu* DNA-Polymerase inseriert LNA-T, ist aber nicht fähig, den Primer vollständig zu verlängern<sup>229</sup> wie die Phusion High-Fidelity.<sup>230</sup> Die  $\theta$ N ist sogar fähig, LNA-A und LNA-T in DNA einzubauen und über LNA-Reste im Templat zu lesen.<sup>231</sup> *Imanishi* und Mitarbeiter waren die ersten, die erfolgreich die KOD Dash und KOD (exo-) für verschiedene zuckerüberbrückte Bausteine benutzten.<sup>232</sup> Dabei mussten sie eine sehr große Enzymmenge einsetzen. Es gelang ihnen aber nicht, mehr als drei LNA-Ts hintereinander an eine Primer anzufügen. Das dies doch möglich ist, zeigten *Veedu* et al.. Sie demonstrierten den effizienten Einbau von LNA-T, LNA-A und LNA-5-methyl-C gegenüber DNA und LNA in Primerverlängerungs- und PCR-Experimenten.<sup>233</sup> Das LNA-G-Triphosphat wurde in Kombination mit den anderen drei modifizierten Nukleotiden ebenfalls noch erfolgreich als Substrat für die KOD-Polymerase verwendet.<sup>190</sup>

*Akira* und Mitarbeiter versetzten den Anknüpfungspunkt der Base von C1' zu C2' und benutzten diese Isodesoxynukleosid-5'-triphosphate (INTPs) für Primerverlängerungsexperimente mit verschiedenen Polymerasen aus der A- und B-Familie.<sup>234</sup> Aus der A-Familie war nur das Klenowfragment (exo-) in der Lage, ein künstliches Triphosphat anzufügen, während dies alle Enzyme aus der B-Familie konnten. Für die Terminator-Polymerase war es sogar möglich, zwei INTPs in DNA einzubauen und das Volllängenprodukt zu erhalten. Nach einem weiteren künstlichen Nukleosid verändert sich die Templat-Primer-Doppelhelix wahrscheinlich zu stark, um von dem Enzym noch erkannt zu werden.

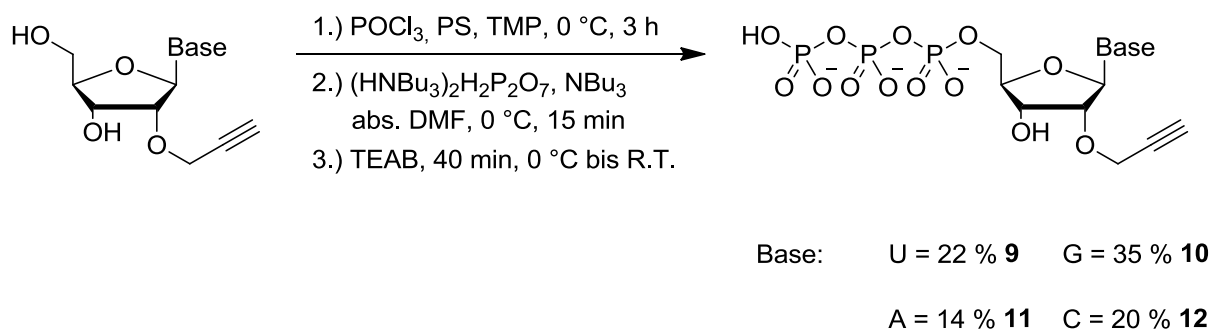
Fluormethylen stellt einen äußerst großen Rest für eine 2'-Modifikation dar. Dementsprechend schafften es *Zhou* et al. nicht, nach einem Einbau von (*E*)-2'-Desoxy-2'-(fluormethylen)cytidin (FMdC) den Primer weder mit Polymerase  $\alpha$  noch I wesentlich zu verlängern.<sup>235</sup>

Neben den schwierig umzusetzenden 2'-modifizierten Triphosphaten wurden auch noch weitere zuckermodifizierte Nukleosidtriphosphate wie 4'-Thio-,<sup>236</sup> Glycerol-,<sup>237</sup> Threose-<sup>192,238-239</sup> und 4'-Alkylnukleosidtriphosphate<sup>210</sup> z.T. mit Erfolg auf ihre Substrattauglichkeit für verschiedene Polymerasen untersucht.

## 4.2 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate

### 4.2.1 Synthese von 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphaten

Ungeschützte 2'-O-Propargylnukleoside (pNs) mit allen vier verschiedenen natürlichen Basen sind kommerziell erhältlich. Ihre Umsetzung zu Triphosphaten (pNTPs) erfolgte in einer Eintopf-drei-Reaktionen-Synthese nach Ludwig (s. Abb. 52).<sup>201</sup> Diese Methode wurde gewählt, da keine vorherige Schützung der 3'-Hydroxygruppe durchgeführt werden musste. Eine im Zweifelsfall etwas geringere Ausbeute wurde dabei in Kauf genommen, da die folgenden Primerverlängerungsexperimente und postsynthetischen Modifizierungen nur eine sehr geringe Substanzmenge benötigen.



**Abb. 52:** Synthese der 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate nach der Ludwig-Methode

Die gesamte Reaktion erfolgte unter Eiskühlung. Als Lösungsmittel für das 2'-Propargylnukleosid diente Trimethylphosphat, das einerseits fähig ist, alle Reaktionskomponenten zu lösen, und andererseits die Phosphorylierung an der 5-Position beschleunigt. Der Zusatz von Protonenschwamm<sup>®</sup> (PS) ist unbedingt nötig, da sonst eine Hydrochlorierung der Dreifachbindung stattfindet.<sup>203</sup> Als Phosphorylierungsmittel diente Phosphorylchlorid. Zunächst wurden nur 1,1 eq. zugeben und die Reaktion mit DC verfolgt. Für eine gute Ausbeute ist ein fast vollständiger Umsatz des Edukts notwendig, sodass nach etwa einer Stunde noch weitere 0,5 eq.  $\text{POCl}_3$  und Protonenschwamm zugegeben wurden. Nach weiteren 2 h wurde Pyrophosphat, in abs. DMF gelöst, im Überschuss zugegeben. Das Gegenion muss dabei Tributylammonium sein, da sonst die Löslichkeit nicht gegeben ist. Der Austausch der Natriumkationen gegen die Ammoniumionen erfolgte zuvor mittels eines Ionenauschers. Nach 15 min wurde mit Triethylammoniumbicarbonatpuffer hydrolysiert. Die Aufreinigung

des Produkts gestaltete sich schwierig, weil die Phosphorylierung nicht vollständig selektiv verläuft, sodass man ein Gemisch erhält. Zuerst erfolgte eine Ionentauscherchromatographie mit steigender Konzentration an Triethylammoniumbicarbonat im Laufmittel. Zur Entsalzung und Beseitigung der letzten Unreinheiten wurde das Triphosphat noch über eine RP-18-Säule mit einem Gradienten aus Triethylammoniumacetatpuffer und Acetonitril gereinigt. Der artifizielle Baustein wurde mehrmals lyophilisiert, um den Großteil der Salze zu entfernen, bevor auch noch die Triethylammoniumgegenionen mit einem Ionentauscher gegen Natriumionen ausgetauscht wurden. Mit dem Produkt wurde eine wässrige Stammlösung hergestellt und die Ausbeute mittels Konzentrationsbestimmung über UV/Vis-Spektrometrie und bekanntem Extinktionskoeffizienten bei 260 nm bestimmt. Bei neutralem pH-Wert können Triphosphate in Lösung bei -20 °C gelagert werden.

Diese Synthese war für die 2'-O-Propargylnukleoside mit allen vier Basen erfolgreich und hatte, gemessen an den für die Ludwig-Methode typischen Werten,<sup>118</sup> sehr gute Ausbeuten zwischen 14 und 35 %.

#### **4.2.2 Primerverlängerungsexperimente mit 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphaten**

Ziel war es, mit Hilfe von Enzymen die verschiedenen 2'-O-Propargylnukleoside in DNA einzubauen, um dann postsynthetisch eine artifizielle Funktion einzuführen. Der Anknüpfungspunkt am Zuckerrückgrat ermöglicht eine Wechselwirkung mit den DNA-Basen, anders als z.B. die C5-Position bei Pyrimidinen (vgl. 3.1.3). Wie bereits eingehend erläutert (vgl. 4.1.5), besitzen aber die meisten DNA-Polymerasen ein sterisches Tor, das die Umsetzung von 2'-modifizierten Triphosphaten verhindert, erst recht wenn die Modifikation so groß ist wie die Propargylgruppe.

##### **Polymerasenscreening**

Es wurden mit verschiedenen Polymerasen Primerverlängerungsexperimente durchgeführt, um deren Effizienz im Einbau der künstlichen Substrate zu testen. Die Wahl der Enzyme fiel dabei auf kommerziell erhältliche auf Basis der 9°N Polymerase, da sich diese für ähnliche Substrate bereits bewährt haben (vgl. 4.1.5) Die natürliche DNA-Polymerase gehört zur B-Familie und stammt aus den extrem thermophilen Meeresarchaen *Thermococcus* Spezies 9°N-7. Diese Archaeen wurden aus einer thermischen Quelle in 2500 m Tiefe und 9° nördlich des Äquators am östlichen Pazifischen Rücken isoliert.<sup>240</sup> Die 9°N<sup>TM</sup><sub>m</sub>, dessen Gen ein E. coli-Stamm trägt, besitzt

eine reduzierte 3'-5'-Exonukleasereaktivität (1-5 % des Wildtyps).<sup>241-242</sup> Terminator™ (Therm), Terminator™ II (Therm II), Terminator™ III (Therm III) und Terminator™  $\gamma$  (Therm  $\gamma$ ) sind ebenfalls verschiedene Mutanten der 9°N, aber besitzen alle weder eine 5'-3'-, noch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (exo-).

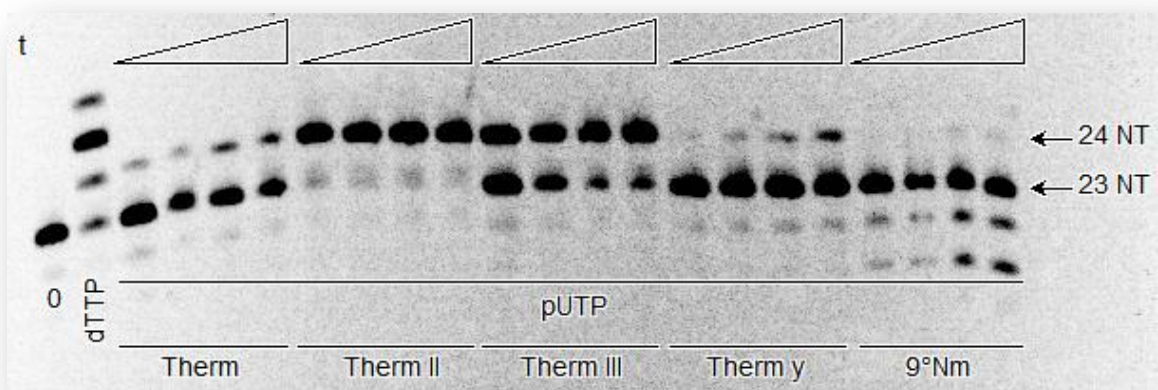
Als Templat diente ein 35mer und der Primer bestand aus 23 Nukleotiden mit einem Fluoreszeinmarker (Fluo, vgl. 7.3.2) am 5'-Ende zur Detektion auf dem denaturierenden Polyacrylamidgel.

**Primer:** 5'-Fluo-GAC-CCA-CTC-CAT-CGA-GAT-TTC-TC-3'

**Templat 1:** 3'-CTG-GGT-GAG-GTA-GCT-CTA-AAG-AGA-GGC-CGG-TCG-CG-5'

**Abb. 53:** DNA-Sequenzen von **Primer** und **Templat 1** für standing start Experimente

Für das Polymerasenscreening wurde nur das Triphosphat **9** als Substrat verwendet. Der Einbau sollte demnach gleich gegenüber dem Adenosin an Position 24 erfolgen (standing start Experiment). Dem Reaktionsansatz wurden auch keine weiteren natürlichen 2'-Desoxynukleosidtriphosphate zugesetzt, um einen Fehleinbau völlig auszuschließen. Die Standardpuffersysteme der jeweiligen Polymerasen wurden beibehalten, eine Temperatur von 59 °C gewählt, 0,2 U Enzym zugesetzt und die Reaktionen jeweils nach 5, 10, 20 und 30 min mit EDTA-haltigem Beladungspuffer abgestoppt.



**Abb. 54:** PAGE von Polymerasenscreening mit pUTP: Primer: 750 nM; Templat: 900 nM; Polymerase: 0,2 U; dTTP o. pUTP: 200  $\mu$ M; 59 °C, t: 5, 10, 20, 30 min; 0: keine dNTPs; 0 u. dTTP mit Therm nach 5 min abgestoppt

0 ist der Reaktionsansatz ohne dNTPs, sodass dies der unverlängerte Primer mit 23 Nukleotiden auf dem Gel ist. Als Referenz wurde dTTP mit der Terminator Polymerase verwendet. Bereits nach 5 min zeigt sich eine Verlängerung des Primers um 3 Nukleotide, das heißt dieses Enzym ist so reaktiv, dass Fehleinbauten stattfinden.



Für alle Terminator Polymerasen ist ein Einbau des künstlichen Triphosphats **9** zu beobachten. Dabei zeigen sich die Terminator II und Terminator III am reaktivsten. Dies ist auf die bessere Zugänglichkeit ihrer aktiven Zentren für das 2'-modifizierte Triphosphat zurückzuführen (vgl. 4.1.5). Der Umsatz des Substrats mit der  $9^{\circ}\text{N}_m$  ist zu niedrig, sodass die geringe aber vorhandene 3'-5'-Exonukleasereaktivität zum Abbau des Primers führt.

### Primerverlängerung mit Terminator II und Terminator III

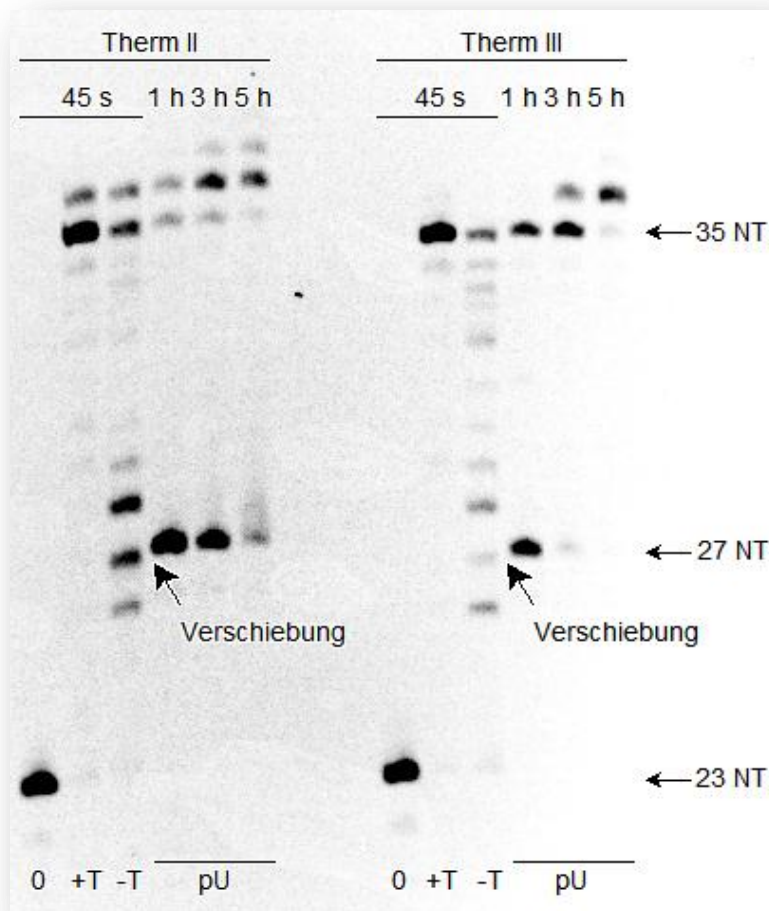
Bisher war nur ein Einfacheinbau von pUTP erfolgreich. Da Terminator II und Terminator III sich hier bewährt haben, sollte untersucht werden, ob sie auch fähig sind, Vollängenprodukt zu generieren. Dazu wurde ein Templat gewählt, dessen 27. Nukleotid ein Adenosin ist (s. Abb. 55). Dementsprechend wurden neben **9** auch noch die drei natürlichen Triphosphate dATP, dCTP und dGTP zugesetzt, die vor bzw. nach der Position 27 eingebaut werden sollten (running start Experiment). Im Allgemeinen setzen Polymerasen artifizielle Bausteine besser um, wenn sie nicht direkt an den ursprünglichen Primer angefügt werden.

**Primer:** 5'—Fluo—GAC—CCA—CTC—CAT—CGA—GAT—TTC—TC—3'

**Templat 2:** 3'—CTG—GGT—GAG—GTA—GCT—CTA—AAG—AGG—GCA—CGG—TCG—CG—5'

**Abb. 55:** DNA-Sequenzen von **Primer** und **Templat 2** für running start Experiment

Es zeigte sich, dass eine Verlängerung über pUTP hinaus äußerst langsam verläuft. Mit Erhöhung der Polymerasekonzentration und der Reaktionszeit gelang es trotzdem (s. Abb. 56). +T beinhaltete alle vier natürlichen 2'-Desoxynukleosidtriphosphate und zeigt neben der Bande für den vollständig verlängerten Primer (35 Nukleotide, NT) noch eine weitere mit 36 Nukleotiden. Diese templatlose Verlängerung ist ein bekanntes Phänomen<sup>232</sup> und Untersuchungen zeigten, dass vorzugsweise Adenosin angehängt wird.<sup>243-245</sup> Das ist entweder auf das bessere  $\pi$ -Stapelverhalten der Purinbase mit Primer und Templat zurückzuführen<sup>245</sup> oder, wie neuere Untersuchungen von *Blatter* et al. zeigten, eine Wechselwirkung mit einem Tyrosinrest der Polymerase, der ein Thyminid nachahmt.<sup>244</sup> Die Negativprobe (-T) enthält alle natürlichen 2'-Desoxynukleosidtriphosphate außer dTTP. Eigentlich müsste dementsprechend die Primerverlängerung bei 26 Nukleotiden stoppen. Dies ist aber nicht der Fall, weil beide Enzyme sehr reaktiv sind und einen Fehleinbau vornehmen, sodass sogar bei einer Reaktionszeit von nur 45 s hier z.T. Vollängenprodukt erreicht wird.



**Abb. 56:** PAGE von Primerverlängerung mit Therminator II und Therminator III; Primer: 750 nM; Templat: 900 nM; Polymerase: 2,0 U; dNTPs bzw. pUTP: 200  $\mu$ M; 59 °C; 0: keine dNTPs; +T: alle vier natürlichen dNTPs, -T: dATP, dGTP, dCTP; pU: dATP, dGTP, dCTP, pUTP

Mit pUTP statt dTTP in der Reaktionsmischung wird ebenfalls Volllängenprodukt erreicht, jedoch erst nach mehreren Stunden. Die templatlose Primerverlängerung ist ebenfalls zu beobachten. Therminator III erweist sich als reaktiver, da hier nach 5 h kein Primer mit 27 Nukleotiden mehr vorhanden ist. Mit der Therminator II ist hier noch eine Bande sichtbar, obwohl bereits z.T. zwei zusätzliche Nukleotide an das Volllängenprodukt angefügt wurden.

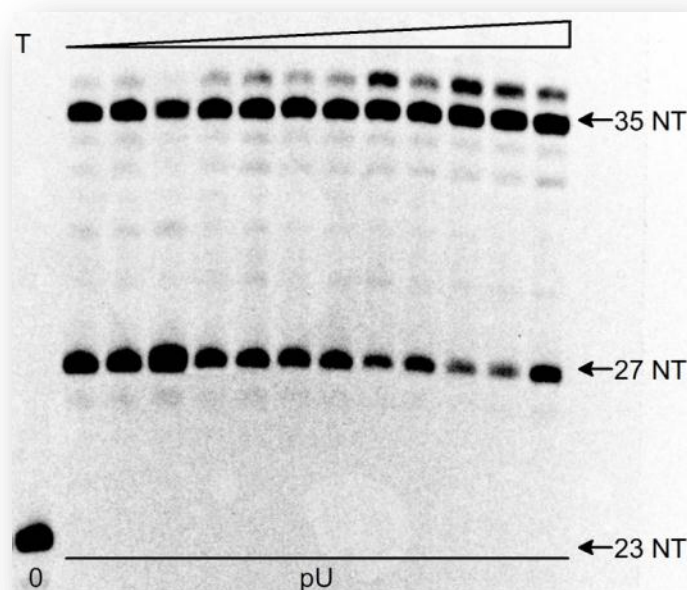
Da die Negativkontrolle bereits nach 45 s bei den gegebenen Bedingungen Volllängenprodukt zeigt, ist es fraglich, ob wirklich pUTP in die DNA eingebaut wurde oder nicht doch eines der natürlichen Triphosphate. Zum einen lässt sich ein leicht unterschiedliches Laufverhalten bei Nukleotid 27 zwischen -T und pUTP feststellen, was auf verschiedene Basen am 3'-Ende hindeutet. Zum anderen sind die Negativkontrollen für beide Polymerasen nach 1 h bereits vollständig positiv (Resultate nicht gezeigt), während mit Triphosphat **9** noch keine vollständige Verlängerung stattgefunden hat, sodass von einem erfolgreichen Einbau des 2'-O-Propargyluridins ausge-

gangen werden kann, der zu einer verlangsamten Umsetzung führt. Dies beruht auf einer Konformationsänderung der Primer-Templat-Doppelhelix, die durch den 2'-Rest induziert wurde und die Erkennung durch die Polymerase erschwert (vgl. 4.1.5).

In den folgenden Experimenten fand nur noch die Therminator III, aufgrund ihrer größeren Reaktivität, Verwendung.

### Temperaturabhängigkeit der Primerverlängerung mit pUTP

Jede Polymerase weist ein Temperaturoptimum auf, das sich mit artifiziellen Substraten ändern kann. Dementsprechend wurden Primerverlängerungsexperimente mit der Therminator III durchgeführt und die Temperatur zwischen 54,3 und 62,7 °C variiert. Es wurde dabei die Bildung des Vollängenprodukts beobachtet und nicht der Einbau von **9**, da die Verlängerung nach dem künstlichen Baustein der kritische Schritt ist. So wurde der **Primer** mit **Templat 2** verwendet.



**Abb. 57:** PAGE von Primerverlängerungsexperimenten mit pUTP bei verschiedenen Temperaturen; Primer: 750 nM, Templat: 900 nM; Therm III: 2,0 U; dNTPs u. pUTP: 200 μM; pU: dATP, dGTP, dCTP, pUTP; 3 h; T = 54,3–62,7 °C

Nach Integration der Banden stellte sich heraus, dass bei 60 °C 87 % Verlängerung erreicht wurden, für z.B. 59 °C nur 70 %. Dementsprechend wurden die folgenden DNA-Synthesen bei 60 °C durchgeführt.

### Primerverlängerung mit allen vier 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphaten

Die Bedingungen der Primerverlängerung mit pUTP wurden nun auf die drei weiteren 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate übertragen. Allerdings wurde die Polymerase-

menge auf 1,0 U reduziert und dafür die Zeit auf 16 h verlängert. Für alle Reaktionen wurde der gleiche **Primer** verwendet (s. Abb. 58). pATP sollte gegenüber Position 31 des **Templats 2** angefügt werden. Für pCTP und pGTP wurde jeweils ein neues Templat designt, das die Insertionsstelle an Position 27 trägt.

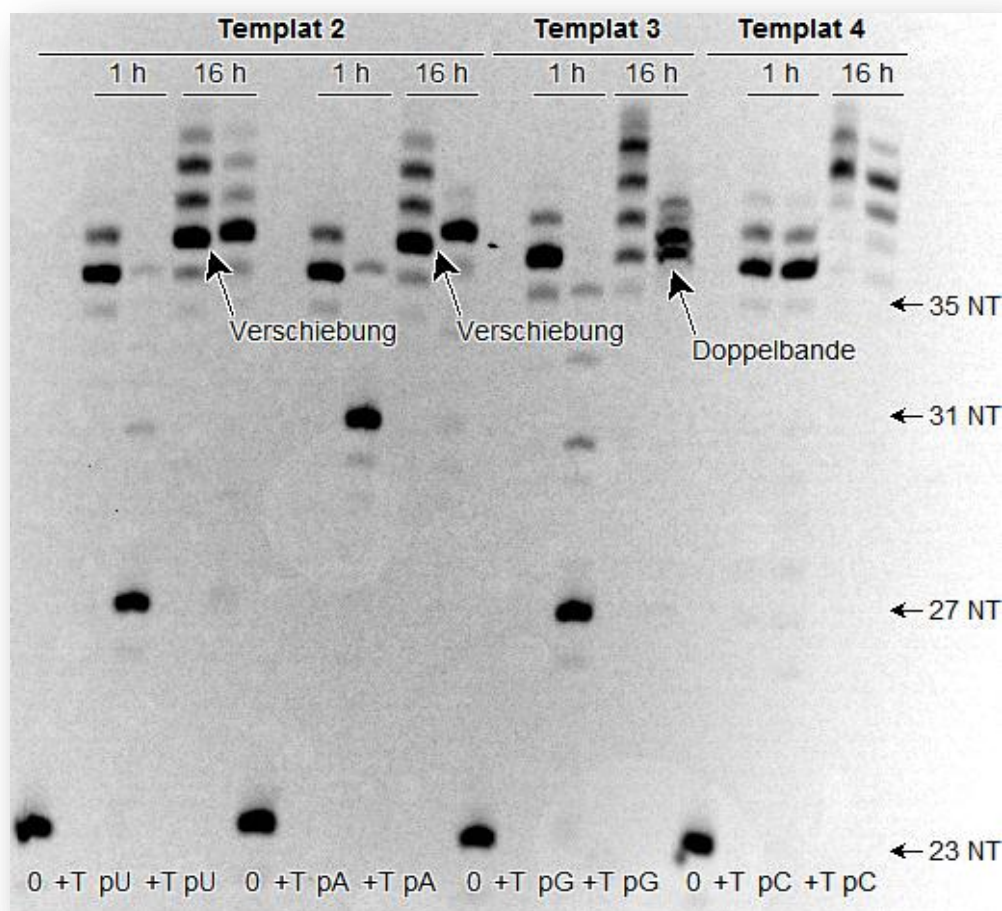
**Primer:** 5'—Fluo—GAC—CCA—CTC—CAT—CGA—GAT—TTC—TC—3'

**Templat 2:** 3'—CTG—GGT—GAG—GTA—GCT—CTA—AAG—AGG—GCA—CGG—TCG—CG—5'

**Templat 3:** 3'—CTG—GGT—GAG—GTA—GCT—CTA—AAG—AGG—GTC—AGT—GAT—GG—5'

**Templat 4:** 3'—CTG—GGT—GAG—GTA—GCT—CTA—AAG—AGC—CTG—ACT—CAT—CC—5'

**Abb. 58:** DNA-Sequenzen von **Primer** und **Templat 2-4**



**Abb. 59:** PAGE von Primerverlängerungen mit pNTPs; Primer: 750 nM; Template : 900 nM; Therm III: 1,0 U; dNTPS u. pNTPs: 200 µM; 60 °C; pU: dATP, dCTP, dGTP, pUTP; pA: dCTP, dGTP, dTTP, pATP; pG: dCTP, dATP, dTTP, pGTP; pC: dATP, dGTP, dTTP, pCTP

Nach 1 h zeigten die Reaktionen mit pUTP, pATP und pCTP eine Primerverlängerung bis 27 bzw. 31 Nukleotide (s. Abb. 59). Daraus lässt sich schließen, dass diese 2'-modifizierte Nukleotide in die DNA eingebaut wurden und ein weiteres Anfügen von Bausteinen extrem verlangsamten, weil die Negativprobe bei diesen Bedingun-

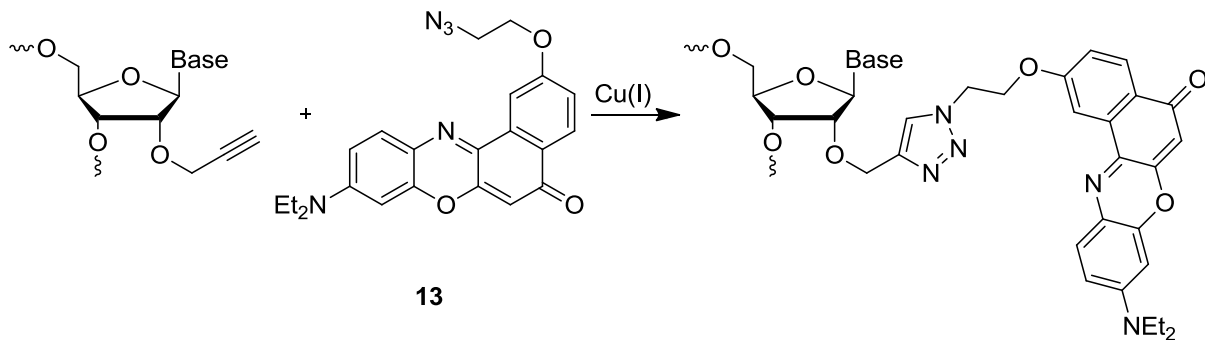
gen bereits Vollängenprodukt zeigte (Daten nicht gezeigt). Dies ließ sich nicht für pCTP feststellen, sodass eine erfolgreiche Insertion von artifiziellem Cytidin fraglich ist. Nach 16 h erreichten alle Ansätze Vollängenprodukt, das bereits um bis zu fünf weitere Nukleotide verlängert wurde. Auffällig ist wieder die unterschiedliche Mobilität zwischen dem verlängerten Primer mit natürlichen Nukleotiden und mit pUTP bzw. pATP. Dies ist ein klarer Hinweis auf die vorhandene Propargylgruppe. Auch das lässt sich bei **12** nicht beobachten. pGTP zeigt eine Doppelbande, die eventuell auf die Bildung von zwei verschiedenen Produkten schließen lässt: Eines mit Modifikation und eines mit einem Fehleinbau.

#### 4.2.3 Postsynthetische Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition

Für die postsynthetische Kupfer(I)-katalysierte Zykloaddition wurde die enzymatische DNA-Synthese nach den vorangegangenen Bedingungen durchgeführt, aber das Volumen von 20  $\mu$ L auf 1,3 mL vergrößert, um insgesamt 1,0 nmol modifiziertes Oligonukleotid zu erhalten. Die Reaktion wurde nicht mit EDTA-haltigem Puffer abgestoppt, da dies später zu einer Komplexierung des Kupfers führen könnte. Stattdessen fand eine phenolische Lösung Anwendung, die das Enzym denaturierte. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels HPLC und die Ausbeute wurde als 100 % angenommen.

Als Azid diente Nilrot (**13**) (s. Abb. 60). Dieser Farbstoff wurde gewählt, weil dessen Anregung und Emission von denen des Fluoreszeinmarkers spektral weit genug entfernt ist, um eine eindeutige Differenzierung zu erlauben. Der Baustein wurde von *Thomas Ehrenschwender* nach einer literaturbekannten Synthesevorschrift hergestellt.<sup>246-247</sup>

Die Zykloaddition wurde in wässriger DMSO/*t*-BuOH-Lösung mit einer sehr geringen DNA-Konzentration von 68  $\mu$ M durchgeführt. Das Azid war in starkem Überschuss (~40 eq.) vorhanden, genauso wie die Kupfer(I)-Quelle Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat (~100 eq.) und der TBTA-Ligand (~200 eq.). Trotz der großen Katalysatormenge wurde das Reduktionsmittel Natriumascorbat (~100 eq.) verwendet, um die Anwesenheit von Cu(I) sicher zu stellen. Nach 5, 10 und 30 min wurden jeweils Aliquote entnommen und mit EDTA-haltigem Beladungspuffer abgestoppt. Zur Analyse der Reaktion wurde eine hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt.

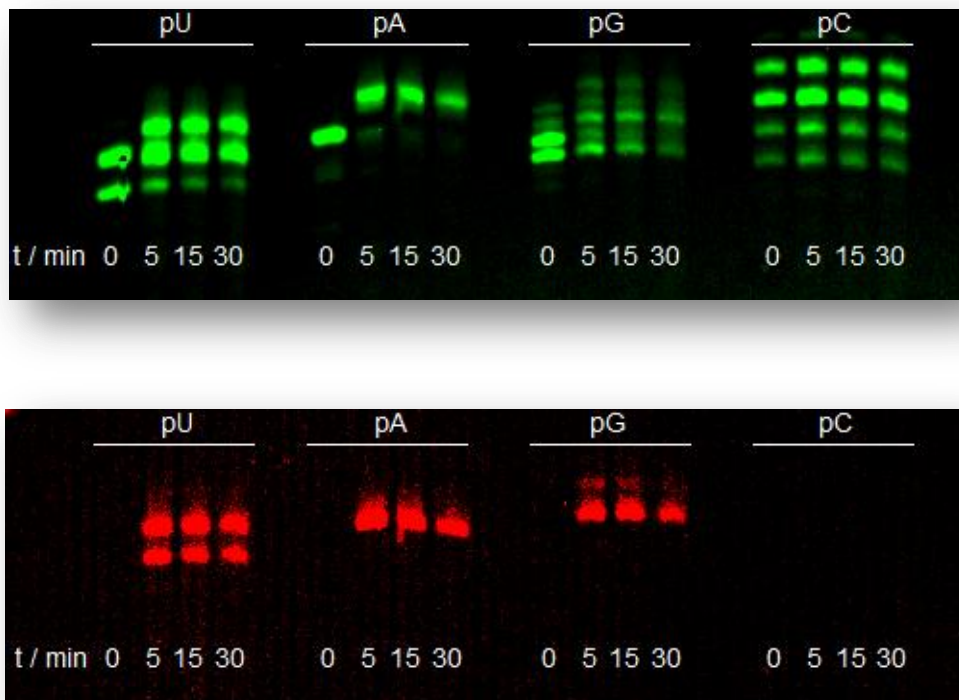


**Abb. 60:** Kupfer(I)-katalysierte Zyклоaddition zwischen 2'-O-propargylmodifizierter DNA und Nilrotazid **13**

Das Auslesen erfolgte über einen Fluoreszenzimager, wobei einmal blaue LEDs und der entsprechende Emissionsfilter verwendet wurden, um den Fluoreszeinmarker sichtbar zu machen, und dann rote Lichtquellen mit Filter für den angefügte Nilrotrest.

Als Nullproben (0 min) dienten Ansätze mit DNA und Fluorophor ohne Katalysator, um sicherzustellen, dass eine rote Emission auf dem Gel wirklich von einer kovalenten Verknüpfung der DNA mit Nilrot herrührt und nicht von einer anderen Wechselwirkung. Erwartungsgemäß zeigen die Banden bei 0 min nur die Fluoreszenz des Fluoreszeins (s. Abb. 61), genauso wie die Spur mit der DNA, die in Gegenwart von pCTP synthetisiert wurde. Das Ergebnis aus vorangegangenem Abschnitt wurde damit bestätigt, dass der Einbau von 2'-O-Propargylcytidin in Anwesenheit von anderen natürlichen Triphosphaten nicht erfolgreich war und es stattdessen zu einem Fehleinbau kam. Im Falle der drei anderen enzymatisch synthetisierten Nukleinsäuren lassen sich eindeutig beide Fluorophore nachweisen, was auf eine Insertion der Modifikationen schließen lässt. Das Edukt mit pU besteht aus zwei verschiedenen Oligonukleotiden, die sich nur um ein Nukleotid am 3'-Ende unterscheiden, wegen der templatlosen Verlängerung. Nach Zugabe des Katalysators entstanden zwei neue, langsamer laufende, rote Banden. Es ist zu beachten, dass die untere die gleiche Mobilität wie das längere Edukt aufweist. Das heißt beide Oligonukleotide enthielten die Modifikation und konnten eine Zyклоaddition mit Nilrot eingehen. Der Reaktionsverlauf lässt sich an der unteren Eduktbande beobachten. Nach 30 min ist nur noch wenig an nicht umgesetzter DNA vorhanden. Deutlicher lässt sich die Klickreaktion mit dem 2'-Propargyladenosinbaustein verfolgen. Die eine, ausschließlich grün leuchtende Eduktbande geht in eine höher laufende, dual emittierende über. Die Doppelbande der DNA mit 2'-Propargylguanosin führt nur zu einer Produktbande. Die untere verbleibt unverändert und zeigt keine Nilrotfluoreszenz. Der enzymatische

Einbau des artifiziellen Triphosphats war offensichtlich unvollständig und es wurden ebenfalls Oligonukleotide mit Fehleinbau gebildet.



**Abb. 61:** PAGE zur Analyse von postsynthetischer CuAAC mit 2'-O-propargylmodifizierter DNA und Nilrotazid (13); Oben: grüne Fluoreszenz des Fluoreszeinmarkers; Unten: Rote Fluoreszenz des Nilrotrests



## 4.3 5-Tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxyuridintriphosphat

### 4.3.1 Synthesestrategie für 5-tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxyuridintriphosphat

Die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition besitzt den erheblichen Nachteil der zelltoxischen Kupferionen.<sup>34</sup> Selbst eine mehrstufige Reinigung der modifizierten DNA mit Größenausschlusschromatographie und HPLC stellt nicht sicher, dass die Kationen vollständig entfernt sind. Die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf<sup>248-249</sup> stellt eine Alternative für die Biokonjugation dar.<sup>135,250-256</sup> Die Reaktion ist bioorthogonal, verläuft schnell bei Raumtemperatur, in wässrigem Medium und mit hohen Ausbeuten, benötigt keinen Katalysator, ist irreversibel, besitzt keine Nebenreaktionen und kann damit als Klickreaktion bezeichnet werden.<sup>117,257</sup> 1,2,4,5-Tetrazine haben sich dabei als Diene bewährt<sup>255</sup> und 4-(6-(Pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzoesäure ist ein Kompromiss aus Reaktivität und Stabilität gegenüber Nukleophilen,<sup>258</sup> sodass dieses Molekül ausgewählt wurde als Modifikation in DNA eingesetzt zu werden. Der Einbau über die Phosphoramiditmethode ist, wegen der großen Labilität gegenüber Basen, ausgeschlossen. Deshalb sollten wieder DNA Polymerasen Verwendung finden. Da der Rest für einen postsynthetischen Ansatz sehr groß ist, fiel die Wahl des Anknüpfungspunkts auf die 5-Position von 2'-Desoxyuridin. Enzyme akzeptieren dort solche Modifikationen (vgl. 4.1.4). Die Carbonsäurefunktion eignet sich für eine Kupplung mit einem primären Amin. Als Verbindung zur DNA-Base wurde, wegen der guten Erfahrungen mit dieser Art Linker in Primerverlängerungsexperimenten, eine Acetylenbrücke verwendet.

Als Modellfluorophor für eine postsynthetische Modifikation der enzymatisch synthetisierten DNA wurde ein Rhodamin 3G mit Monobenzocyclooctinrest als Dienophil gewählt. Das gespannte Cyclooctin, das von der Arbeitsgruppe *Kele* zur Verfügung gestellt wurde, hat sich bereits in einer kupferfreien Azid-Alkin-Zykloaddition bewährt.<sup>259</sup>



### 4.3.2 Synthese des 5-tetrazinmodifizierten 2'-Desoxyuridintriphosphats

Zuerst wurde Propargylamin mit einer Trifluoracetatschutzgruppe versehen (s. Abb. 62).<sup>260</sup> Die Amidkupplung mit Trifluoressigsäureethylester wurde in Methanol durchgeführt. Das Produkt **14** konnte durch anschließende Destillation als farblose Flüssigkeit in einer Ausbeute von 76 % gewonnen werden. Dieses geschützte Amin **14** wurde dann weiter mit 5-Iod-2'-desoxyuridin (IdU) in einer Sonogashira-Kupplung umgesetzt.<sup>261-262</sup> Die Reaktion wurde unter Argon in abs. DMF durchgeführt und Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator zugesetzt. Zur Entfernung von Triethylammoniumiodid wurde das Rohprodukt in THF gelöst, mit Kaliumcarbonat versetzt und die Salze nach 2 h abfiltriert. Durch eine säulenchromatographische Trennung konnte **15** mit einer Ausbeute von 88 % isoliert werden. Die anschließende Entschützung der Aminfunktion fand in wässrigem Ammoniak über Nacht statt.<sup>263-264</sup> Auf einen Reinigungsschritt wurde verzichtet, da das Molekül **16** sehr polar ist und damit schwer über eine Normalphasenkieselsäule zu reinigen ist, und die einzige Verunreinigung, die abgespaltene Schutzgruppe, für die folgende Amidkupplung kein Problem darstellt. Allerdings wurde zur möglichst vollständigen Entfernung des wässrigen Ammoniaks mehrere Male mit Methanol coevaporiert. Die Ausbeute an freiem Amin **16** konnte als quantitativ angenommen werden.

Das Tetrazin **17** wurde aus drei Komponenten in einer zweistufigen Reaktion hergestellt.<sup>258</sup> 2-Pyrimidincarbonitril, 4-Cyanbenzoesäure und Hydrazinhydrat (80 %ige Lsg. in Wasser) wurden in Ethanol zusammengegeben und 4 h unter Rückfluss gerührt. Das Verhältnis der verschiedenen Edukte (1:1:5) stellte sich dabei als sehr entscheidend für eine Bildung des Dihydotetrazins heraus. Als Nebenprodukte entstehen ebenfalls die symmetrischen Dihydotetrazine. Durch Auskochen des gebildeten Niederschlags mit Aceton geht das Nebenprodukt ohne Carbonsäure in Lösung und kann so entfernt werden. Die Oxidation zum Tetrazin erfolgte mit Natriumnitrit in Essigsäure. Die vormals gelbliche Farbe schlug mit Bildung des konjugierten Systems sofort in ein intensives Purpur um. Der entstandene Niederschlag wurde mit DMF ausgekocht, wobei das Produkt **17** in genügender Reinheit in Lösung ging, während die Dicarbonsäure zurück blieb. Das Tetrazin **17** konnte so mit geringen Resten an Lösungsmittel in einer Ausbeute von 29 % gewonnen werden.

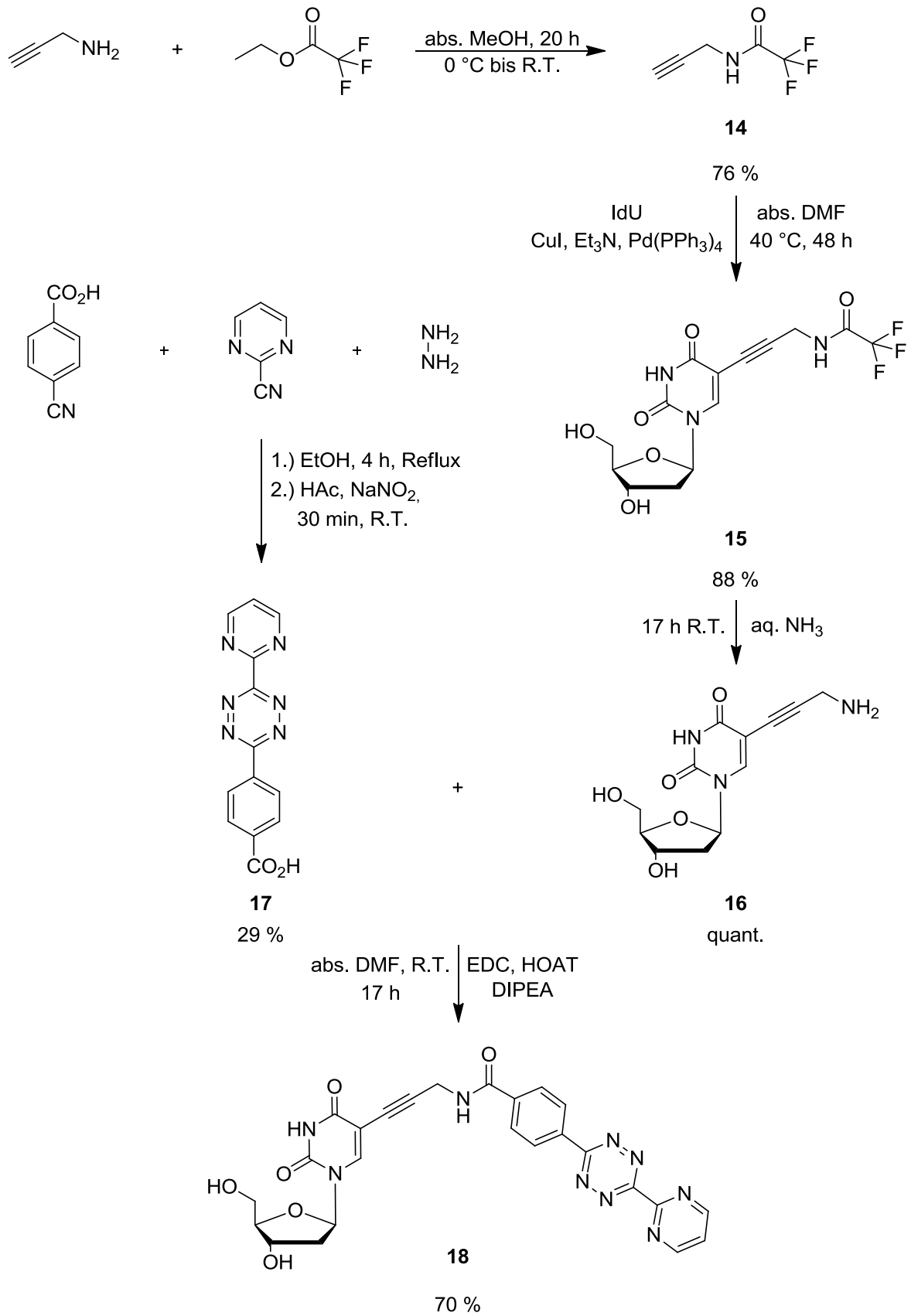


Abb. 62: Syntheschema von tU

Das fertige Nukleosid **18** (tU) konnte dann über eine klassische Amidkupplung in abs. DMF mit EDC und HOAT in 70 % Ausbeute gewonnen werden.<sup>265</sup> Die säulenchromatographische Trennung gestaltete sich, wegen der intensiven Purpurfärbung des Produkts, besonders einfach.

Das Triphosphat **19** wurde ebenfalls nach der Ludwig-Methode,<sup>201,203</sup> wie zuvor schon die 2'-O-Propargyltriphosphate, synthetisiert (vgl. 4.2.1). Der einzige Unterschied bestand in der Aufreinigung des Produkts. Der Tetrazinrest ist zu apolar für eine Ionentauschersäule mit TEAB-Puffer, sodass darauf verzichtet wurde und nur eine RP-18-Säule Verwendung fand, bevor die Triethylammoniumgegenionen durch Natriumkationen ausgetauscht wurden. Das 5-tetrazinmodifizierte 2'-Desoxyuridinribose **19** (tUTP) konnte mit einer Ausbeute von 3 % gewonnen werden. Diese Ausbeute war zwar gering, aber völlig normal für diese Synthesemethode<sup>27</sup> und ausreichend für die folgenden Primerverlängerungsexperimente.

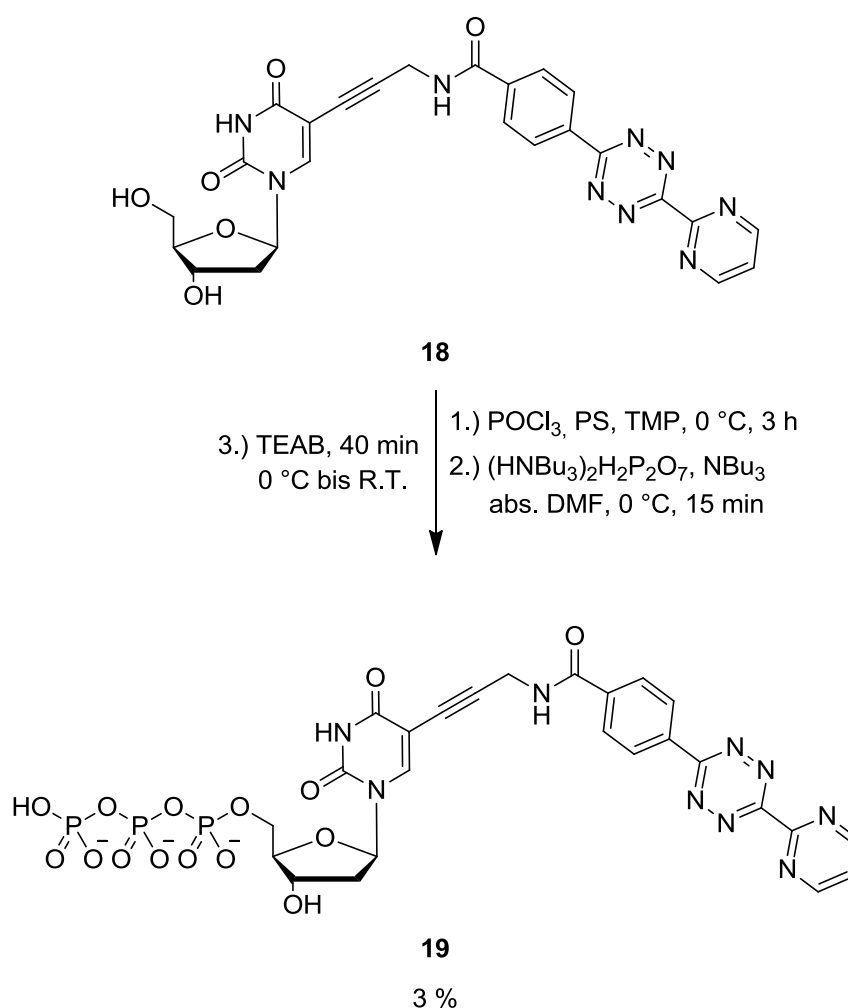


Abb. 63: Syntheschema von tUTP

### 4.3.3 Primerverlängerungsexperimente mit 5-tetrazinmodifiziertem 2'-Desoxyuridintriphosphat

Bei den Primerverlängerungsexperimenten mit tUTP ist zu beachten, dass das Tetrazin äußerst basenempfindlich ist. Die bevorzugten Puffer bestehen jedoch aus TRIS-HCl mit einem pH-Wert von 8,4 bei Raumtemperatur.<sup>266</sup> Das bedeutet nicht, dass die Primerverlängerung unter basischen Bedingungen stattfindet, vielmehr ist der pH-Wert von TRIS-Puffern temperaturabhängig und beträgt somit z.B. 7,2 bei 74 °C. Phosphatpuffer sind wenig geeignet, da sie Mg-Ionen komplexieren können und wahrscheinlich bei der Umsetzung der phosphorylierten Spezies störend wirken. Deshalb wurde wieder ein TRIS-HCl-Puffer verwendet, dessen pH-Wert 7,2 bei Raumtemperatur betrug.

Für die Primerverlängerungsexperimente wurden drei verschiedene Polymerasen verwendet. Die Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität<sup>267</sup> und ist eine genetisch veränderte Form einer Polymerase der B-Familie aus *Thermococcus litoralis*.<sup>268</sup> Die Deep Vent<sub>R</sub><sup>™</sup> (exo-) stammt dagegen von einem Enzym aus *Pyrococcus Spezies GB-D* ab.<sup>269</sup> Im Gegensatz zu den zwei anderen Enzymen gehört die Hemo KlenTaq<sup>™</sup> zu der A-Familie. Sie besitzt keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, anders als die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* YT-1.<sup>270</sup> Zuerst musste sichergestellt werden, dass die Polymerasen in dem Puffer mit verändertem pH-Wert arbeiten. Dies war der Fall mit natürlichen Triphosphaten, sodass tUTP auf seine Substrateigenschaften getestet werden konnte. Es wurde wieder der gleiche **Primer** mit dem **Templat 2**, das ein Adenosin und damit die Insertionsstelle an Position 27 trägt, verwendet (s. Abb. 64).

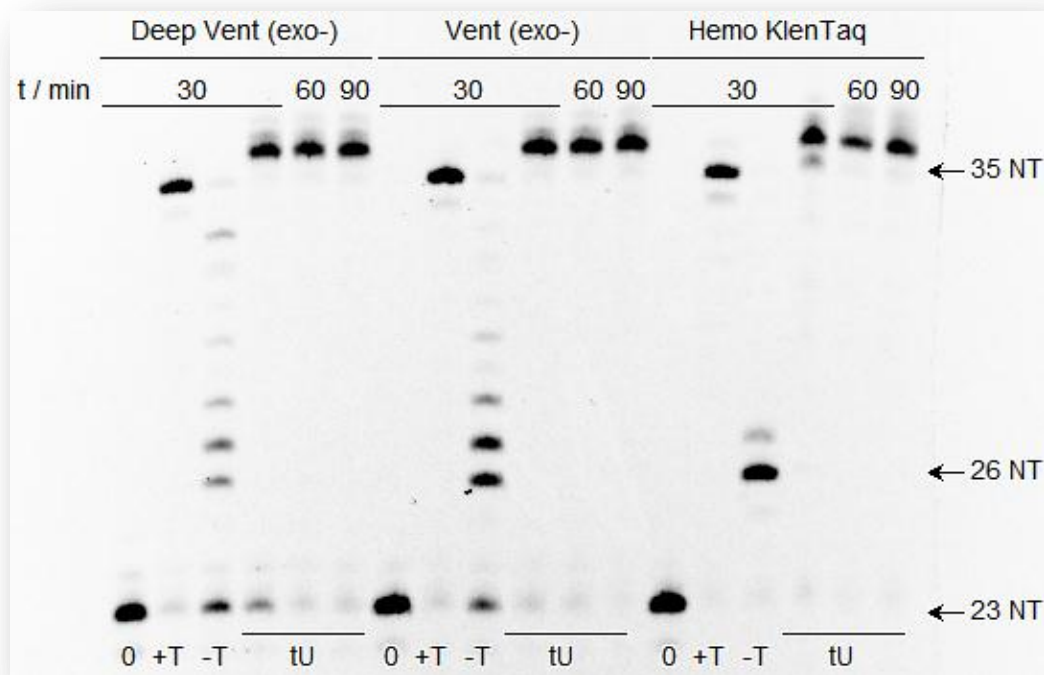
**Primer:** 5'—Fluo—GAC—CCA—CTC—CAT—CGA—GAT—TTC—TC—3'

**Templat 2:** 3'—CTG—GGT—GAG—GTA—GCT—CTA—AAG—AGG—GCA—CGG—TCG—CG—5'

**Abb. 64:** Sequenzen von **Primer** und **Templat 2** für Primerverlängerungsexperimente

Alle drei DNA-Polymerasen akzeptierten den künstlichen Baustein (s. Abb. 65). Nach 30 min zeigen sowohl die Referenzen mit den vier natürlichen Triphosphaten (+T) als auch die Ansätze mit tUTP statt TTP (tU) Vollängenprodukt (35 NT), während die Negativproben ohne TTP und tUTP (-T) dies nicht tun. Demnach resultiert das 35mer bei tU aus einer Umsetzung des artifiziellen Bausteins und nicht aus einem Fehleinbau der anderen natürlichen Triphosphate. Es ist auch eine deutliche Verschiebung der 35mer-Banden mit dem 5-tetrazinmodifiziertem 2'-Desoxyuridin im Gegensatz zu

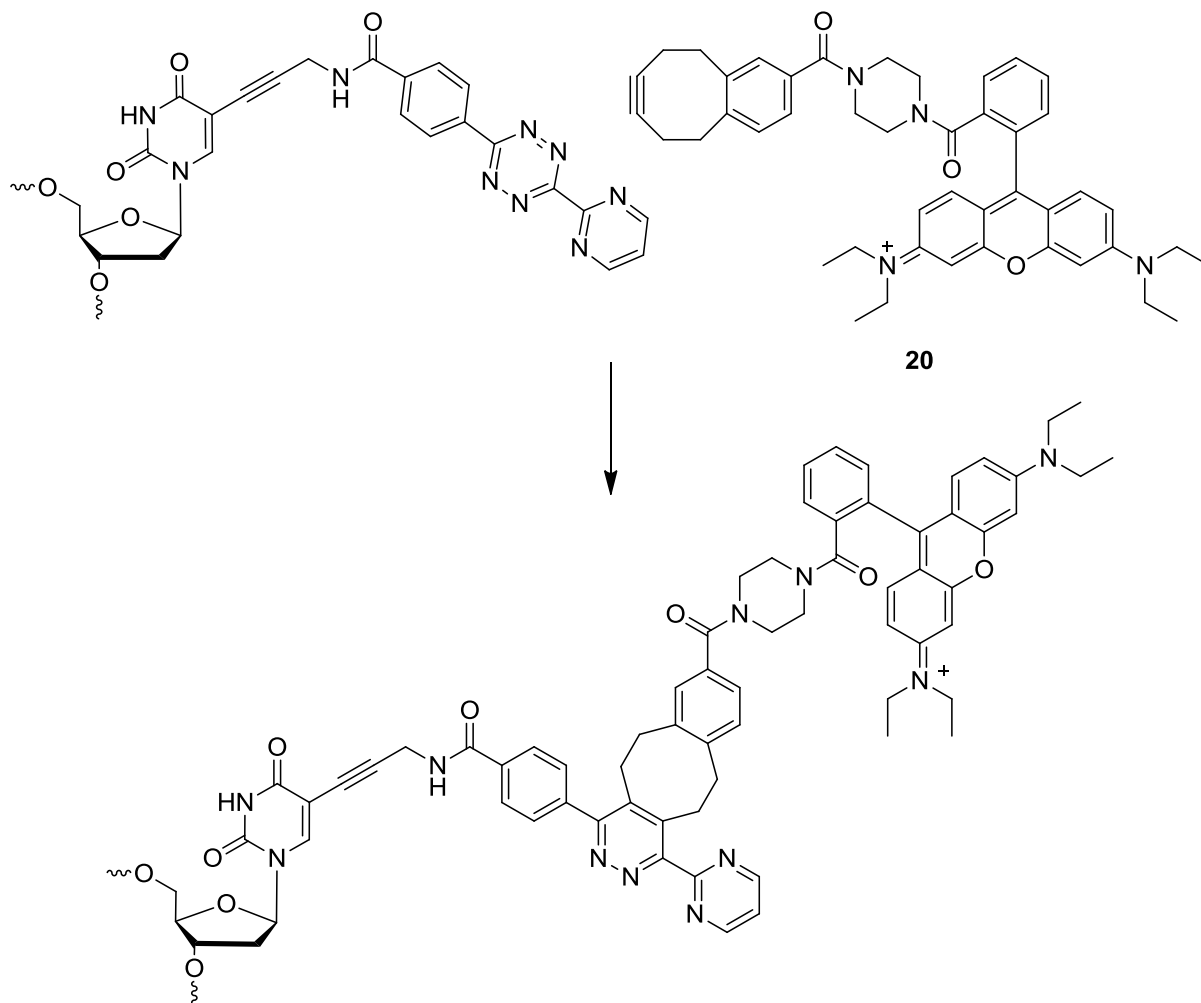
dem Volllängenprodukt mit Thymidin zu sehen. Dies rührt von der großen 5-Modifikation her. Es ist jedoch nicht sichergestellt, ob dies noch das intakte Tetrazin ist, weil das denaturierende Polyacrylamidgel unter basischen Bedingungen durchgeführt wurde. Da es jedoch nur zu analytischen Zwecken diente, stellt dies kein weiteres Problem dar.



**Abb. 65:** PAGE von Primerverlängerung mit Deep Vent (exo-), Vent (exo-) und Hemo KlenTaq; Primer: 750 nM; Templat: 900 nM; Polymerase: 0,5 U; dNTPs bzw. tUTP: 100  $\mu$ M; 72 °C für Deep Vent (exo-) und Vent (exo-), 64 °C für Hemo KlenTaq; 0: keine dNTPs; +T: alle vier natürlichen dNTPs, -T: dATP, dGTP, dCTP; tU: dATP, dGTP, dCTP, tUTP

#### 4.3.4 Postsynthetische Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

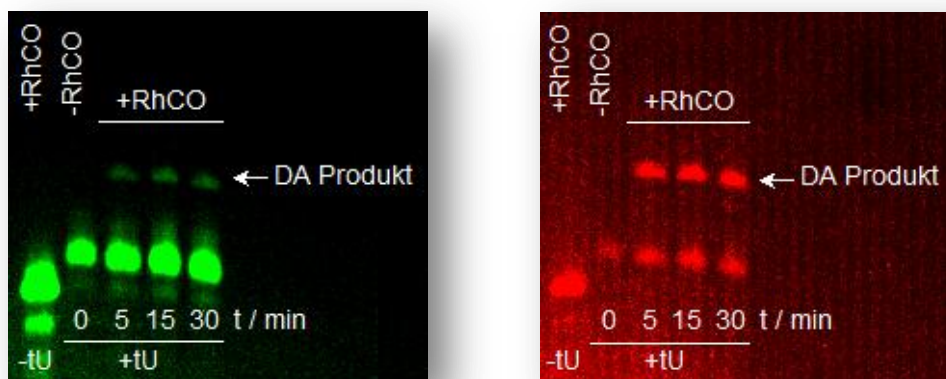
Für die postsynthetische inverse Diels-Alder-Reaktion (s. Abb. 66) musste die enzymatische DNA-Synthese im präparativen Maßstab durchgeführt werden. Als Polymerase wurde die Hemo KlenTaq verwendet und das Ansatzvolumen auf 1,3 mL vergrößert. Die Reaktionszeit betrug 90 min bei sonst gleichbleibenden Bedingungen. Nach abstoppen der Reaktion mit Phenol und Reinigung mit HPLC konnte mit den Versuchen zur postsynthetischen Modifikation begonnen werden. Dazu wurde eine Stammlösung der DNA unter der Annahme hergestellt, dass eine Ausbeute von 100 %, also 1,0 nmol erreicht wurde.



**Abb. 66:** Inverse Diels-Alder-Reaktion mit tU-modifizierter DNA und cyclooctinmodifiziertem Rhodamin 3G **20** (gezeigt ist eines der beiden möglichen Regioisomere)

Die modifizierte DNA (9,5  $\mu\text{M}$ ) und das Rhodamincyclooctin **20** (1 mM) wurden in DMSO/Wasser 20:1 vereinigt und insgesamt 30 min inkubiert. Nach 5, 15 und 30 min wurde jeweils eine Probe entnommen, in Beladungspuffer gegeben und eingefroren. Als Referenz für das analytische, denaturierende Polyacrylamidgel diente einmal ein DNA-Strang mit Thymin statt tetrazinmodifiziertem 2'-Desoxyuridin mit Rhodamin-derivat **20** und die enzymatisch synthetisierte DNA mit tUTP, aber ohne Cyclooctin. Anders als bei der vorangegangenen Postsynthese mit Nilrot ist hier keine differenzierte Anregung von Rhodamin 3G möglich, da diese mit grünen LEDs stattfindet. Das heißt, dass die Banden mit ausschließlich fluorezeinmodifiziertem Oligonukleotiden ebenfalls sichtbar werden. Die Spuren mit Rhodamincyclooctin (+RhCO) und modifizierter DNA (+tU) zeigen eine zweite langsamer laufende Bande. Da diese bei den Referenzen ohne Rhodamin oder Tetrazin nicht zu sehen ist und mit grünen LEDs stärker leuchtet als das Edukt, kann man diese dem Diels-Alder(DA)-Produkt zuordnen. Die Ausbeute ist aber äußerst gering. Da mit blauen LEDs keine Anregung

des Rhodamins erfolgt und ein Resonanzenergietransfer aufgrund der räumlichen Trennung beider Chromophore ausgeschlossen ist, kann hier über die Emission des Fluoreszeins eine Quantifizierung vorgenommen werden. Nach 5 min sind 5 % Produkt gebildet worden, das sich über die Zeit nicht vermehrt. Erhöhung der Temperatur auf 40 °C und/oder Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu 8 h haben keine Steigerung des Umsatzes ergeben, sodass davon ausgegangen werden muss, dass einer der Reaktionspartner zu einem großen Anteil nicht mehr intakt war. Da das Rhodamin in einem 100-fachen Überschuss eingesetzt wurde, muss sich höchstwahrscheinlich der Tetrazinrest zersetzt haben. Zu welchem Zeitpunkt dies geschah, ob bei vor oder während der [4+2]-Zykloaddition, ist unklar.



**Abb. 67:** PAGE zur Analyse von postsynthetischer inverser Diels-Alder-Reaktion mit tetrazinmodifizierter DNA und Rhodamincyclooctin **20**; Links: grüne Fluoreszenz des Fluoreszeinmarkers; Rechts: Rote Fluoreszenz des Rhodaminrests

## 4.4 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate und 5-tetrazimodifiziertes 2'-Desoxyuridintriphosphat

### 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate und Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition

Es wurden erfolgreich vier neue Triphosphate (**9-12**) mit der Ludwig-Methode in sehr guten Ausbeuten synthetisiert. Als Ausgangssubstanzen dienten dabei die kommerziell erhältlichen 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate mit den vier Basen, Adenin, Cytidin, Guanin oder Uracil. Durch verschiedene Primerverlängerungsexperimente wurde eine DNA-Polymerase gefunden, die fähig ist, die 2'-modifizierten Triphosphate als Substrate zu akzeptieren. Die Terminator III kann pU, pA und z.T. pG in der Anwesenheit natürlicher Nukleosidtriphosphate erfolgreich in DNA einbauen und diese auch weiter verlängern. Die hohe Enzymkonzentration und lange Reaktionszeit führen allerdings zu einer Primerverlängerung über das Templat hinaus.

Es gelang, Oligonukleotide mit den drei verschiedenen 2'-O-Propargylnukleoside enzymatisch in größerem Maßstab herzustellen und erfolgreich in einer postsynthetischen Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Zykloaddition mit einem Nilrotazid **13** umzusetzen.

2'-Modifikationen werden nur schwer von DNA-Polymerasen akzeptiert. Diese Position ermöglicht jedoch eine Wechselwirkung mit dem DNA-Basenstapel. Die erfolgreiche Insertion der Alkinfunktion ermöglicht es nun auch große Reste, ohne die Verwendung der Phosphoramiditmethode, an das Zuckerrückgrat der DNA zu binden. Dabei kann entweder die 2'-Position eines Nukleosids mit Pyrimidinbase (pU) oder mit Purinbase (pA, pG) verwendet werden.

### 5-Tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxyuridin und Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

Die unkatalysierte inverse Diels-Alder-Reaktion erwies sich als sinnvoll für die Bio-konjugationen, sodass ein neues 2'-Desoxynukleosid mit einer Tetrazinmodifikation an der 5-Position hergestellt wurde. Das Design des Bausteins wurde auf die Umsetzbarkeit durch DNA-Polymerasen ausgelegt. Für eine erfolgreiche enzymatische



Primerverlängerung war es nötig den pH-Wert anzupassen, um eine Zersetzung des basenempfindlichen Tetrazins zu verhindern. Mit dieser Änderung wurde das 5-tetrazinmodifizierte Desoxyuridin von den drei verwendeten Polymerasen, Deep Vent (exo-), Vent (exo-) und Hemo KlenTaq erfolgreich in DNA eingebaut. Für die präparative Synthese des artifiziiellen Oligonukleotids wurde letztere verwendet.

Die DNA wurde mit einem cyclooctinmodifiziertem Rhodamin 3G in einer inversen Diels-Alder-Reaktion umgesetzt. Es konnte Produkt nachgewiesen werden, jedoch nur in einer geringen Menge.

Das neue Nukleosid hat Potential für postsynthetische Modifizierungen, da es einfach in guten Ausbeuten zu synthetisieren ist und von DNA-Polymerasen als Substrat erkannt wird. Dazu ist jedoch die weitere Optimierung der Diels-Alder-Reaktion nötig.

## 5 Untersuchungen zum Ladungstransfer in Nukleinsäuren mit 2PydU als Elektronendonator

### 5.1 Theoretischer Hintergrund zu Ladungstransfer in Nukleinsäuren

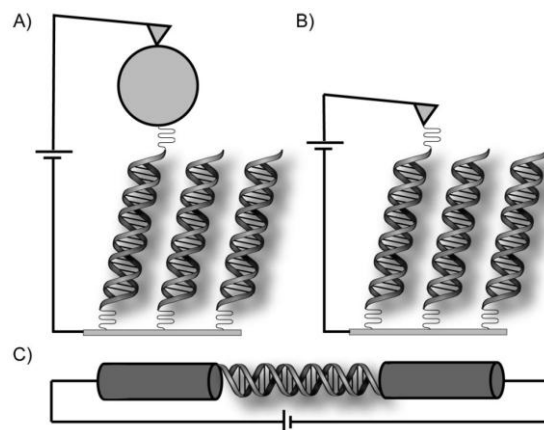
Molekularer Draht, Halbleiter oder Isolator. Alle diese Begriffe wurden schon im Zusammenhang mit der Leitfähigkeit von DNA genannt.<sup>271-273</sup> Seit der ersten Mutmaßung von Ladungswanderung durch die Basenstapel der DNA vor 60 Jahren,<sup>274</sup> bot dieser Sachverhalt viel Platz für Kontroverse. Aufgrund vieler verschiedener Untersuchungen an einer Vielzahl von Systemen zeichnet sich mittlerweile ein klareres Bild.<sup>275-278</sup> Es herrscht Einigkeit darüber, dass DNA ein ziemlich schlechter Elektronenleiter ist. Auch schienen zeitweilig zwei Mechanismen<sup>279</sup> – Superaustausch und Hopping – das Phänomen hinreichend zu beschreiben. Doch weitere Untersuchungen zeigten durchaus Schwachstellen in diesen Theorien und es wurden neue mechanistische Überlegungen angestellt.<sup>42,280-282</sup> Weitere ungeklärte Fragen liegen in Bereichen, wie konformationelle Einflüsse,<sup>41-42</sup> Richtungs-<sup>43-45</sup> und Sequenzabhängigkeit.<sup>46-48</sup> Der entscheidende Punkt aus Sicht eines synthetischen Chemikers ist es jedoch, wie es gelingen kann aus der Welt der Grundlagenforschung herauszukommen und eine wirkliche Anwendung für Elektronentransfer durch Nukleinsäuren zu finden. Dafür ist es entscheidend, die Leitfähigkeit zu verbessern. Ein einziger Ansatzpunkt wird hierfür nicht ausreichen, sondern nur ein Kombination aus mehreren Faktoren. Dazu ist es aber nötig, das System und das Zusammenspiel von Mechanismen, Konformation und elektronischen Effekten zu verstehen. Nur dies wird es vielleicht in der Zukunft ermöglichen, die vorteilhafte Eigenschaft der DNA, die spontane Selbstaggregation, in der Nanobiotechnologie zu nutzen.

### 5.1.1 Systeme zur Messung der Leitfähigkeit von Nukleinsäuren

Die Wahl des Systems ist einer der entscheidenden Punkte zur Untersuchung des Elektronentransfers durch die Basenstapel der DNA. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass dies einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse hat.<sup>276</sup> Doch bisher gelang es noch nicht, eine Anordnung zu finden, die es erlaubt, die Leitfähigkeit der DNA Helix unabhängig von der Elektronenquelle und völlig frei beweglich in wässrigem Medium zu betrachten.

#### Bestimmung der Leitfähigkeit durch (in)direkte Kontaktierung der DNA Helix

Wie man sich vorstellen kann, ist es nicht sehr einfach, eine einzelne DNA Doppelhelix direkt zu kontaktieren und somit klassisch die Leitfähigkeit zu messen. So wurde die Entwicklung sehr intelligent designer Messanordnungen notwendig.



**Abb. 68:** Anordnungen zur Messung der Leitfähigkeit von DNA<sup>283</sup>; **A:** Kontaktierung der Doppelhelix über einen Goldnanopartikel und eine AFM-Spitze, **B:** Kontaktierung der DNA über eine STM-Spitze, **C:** Überbrückung eines Loches in einem Kohlenstoffnanoröhrchen mit DNA

*Cohen* et al. brachten eine Einzelmolekülschicht von ssDNA auf eine Goldelektrode auf und hybridisierten mit dem Gegenstrang, der kovalent an einen Goldnanopartikel gebunden war. Sie schlossen den Stromkreis mit einer AFM-Spitze und konnten so ausschließlich die Leitfähigkeit des Doppelstrangs messen (s. Abb. 68, **A**).<sup>284</sup>

Einen ähnlichen Ansatz verfolgte die Gruppe um *Barton*. Sie benutzten jedoch STM und hatten so keinen direkten Kontakt zur DNA (s. Abb. 68, **B**).<sup>285</sup>

Ein neuer Aufbau benutzt Kohlenstoffnanoröhrchen (carbon nanotubes), um Einzelmoleküle zu kontaktieren. Eine oxidativ geschnittenes, einzelwandiges Röhrchen (single walled carbon nanotube, SWNT) wird mit einer aminmodifizierten Doppelhelix überbrückt (s. Abb. 68, **C**).<sup>286</sup>

Alle Systeme funktionieren in wässrigem Medium, jedoch sind die Moleküle kontaktiert und somit nicht mehr frei beweglich. Die kovalente Verknüpfung erfolgt über Al-

kyllinker, sodass diese selbst auf die Messergebnisse Einfluss nehmen. Um dies zu vermeiden, benutzten *Liu et al.* 5-thiolmodifizierte Thymidine zur Bestimmung der Leitfähigkeit von G-Quadruplexen mit einer mechanisch kontrollierbaren Goldbruchkontaktelektrode.<sup>287</sup> Aber die Messungen wurden, wie bei vergleichbaren Nanoelektroden,<sup>288-289</sup> im Vakuum durchgeführt.

Methoden zur Kontaktierung von DNA beschäftigen sich mit makroskopischen Größen, wie Leitfähigkeit, Stromstärke und Widerstand, während das Augenmerk im nächsten Abschnitt auf mikroskopischen Größen, wie der Geschwindigkeit des Elektronentransfers liegt.

### **Photoinduzierter Ladungstransfer in synthetischen DNA-Donor-Akzeptor-Systemen**

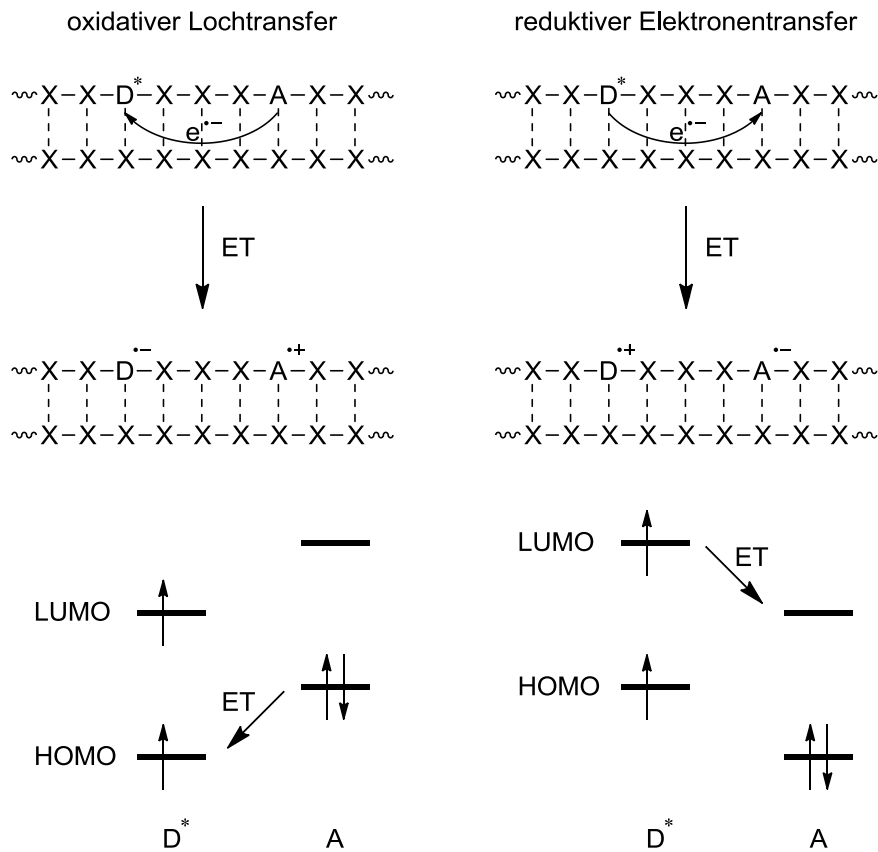
Hier werden synthetisch zwei Moleküle an spezifischen Stellen in die DNA eingebracht. Art und Weise wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (vgl. 3.1.3). Der Donor wird dabei mit Licht angeregt. Es kommt, je nach System, zu einem oxidativen Lochtransfer oder reduktiven Elektronentransfer zu einem Akzeptor (vgl. 5.1.2). Der Nachweis der Ladungsverschiebung kann spektroskopisch, elektrochemisch oder durch irreversible chemische Reaktionen verfolgt werden.<sup>37</sup>

Es zeigte sich, dass die Verknüpfung und Kopplung der Modifikationen mit dem Basenstapel die Ergebnisse entscheidend beeinflusst, da oft die Injektion der Ladung vom Donor in die DNA der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Des Weiteren spielen die Redoxpotentiale der Modifikationen bei diesen Anordnungen eine Rolle.

#### **5.1.2 Photoinduzierter oxidativer Lochtransfer und reduktiver Elektronentransfer in Nukleinsäuren**

Bei Ladungstransfervorgängen durch Nukleinsäuren unterscheidet man zwischen oxidativem Lochtransfer und reduktivem Elektronentransfer, je nachdem ob der Vorgang HOMO oder LUMO kontrolliert ist (s. Abb. 69).<sup>37</sup>

Der Donor (**D**) wird mit Licht angeregt und das so entstandene Loch im HOMO wird von einem Elektron aus dem HOMO des Akzeptors (**A**) gefüllt. Somit wurde dieser oxidiert und man spricht von oxidativem Lochtransfer. Erfolgt ein Elektronentransfer von dem angeregten Donor in das LUMO des Akzeptors erhält man reduktiven Elektronentransfer.



**Abb. 69:** Photoinduzierter Lochtransfer (HOMO-kontrolliert) oder Elektronentransfer(LUMO-kontrolliert) von einem Donor (D) zu einem Akzeptor (A) in DNA

Im Folgenden wird das Augenmerk auf dem reduktiven Elektronentransfer liegen, da dieser für Anwendungen in der Nanobiotechnologie geeigneter scheint: Lochtransfer verursacht oxidative Guaninschäden<sup>38</sup> und ist langsamer ( $10^4\text{-}10^{10}\text{ s}^{-1}$ )<sup>290</sup> als Elektronentransfer ( $4\cdot 10^{10}\text{ s}^{-1}$ )<sup>291</sup>.

### 5.1.3 DNA vermittelte Ladungstransfermechanismen

#### Superaustausch

Beim Superaustausch-Mechanismus tunnelt das Elektron in einem Schritt vom Donor zum Akzeptor. Es befindet sich zu keiner Zeit auf der DNA Brücke (s. Abb. 70).<sup>37,276,279</sup>

Der Ladungstransfer lässt sich mit der Marcus-Theorie für nicht adiabatischen Elektronentransfer beschreiben:<sup>292</sup>

$$k_{ET} = \frac{4\pi^2|V_{el}|^2}{h} \sqrt{\frac{1}{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(\frac{-\{\Delta G_{ET} + \lambda\}^2}{4\lambda k_B T}\right)$$

$k_{ET}$  Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers

$\Delta G_{ET}$  Triebkraft des Elektronentransfers

$V_{el}$	elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor
$\lambda$	Reorganisationsenergie
$h$	Planck'sches Wirkungsquantum
$k_B$	Boltzmannkonstante
$T$	Temperatur

Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers wird durch die elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor, der Triebkraft des Elektronentransfers und der Reorganisationsenergie beeinflusst. Die Distanzabhängigkeit ist exponentiell, da die elektronische Kopplung exponentiell mit der Distanz abnimmt:

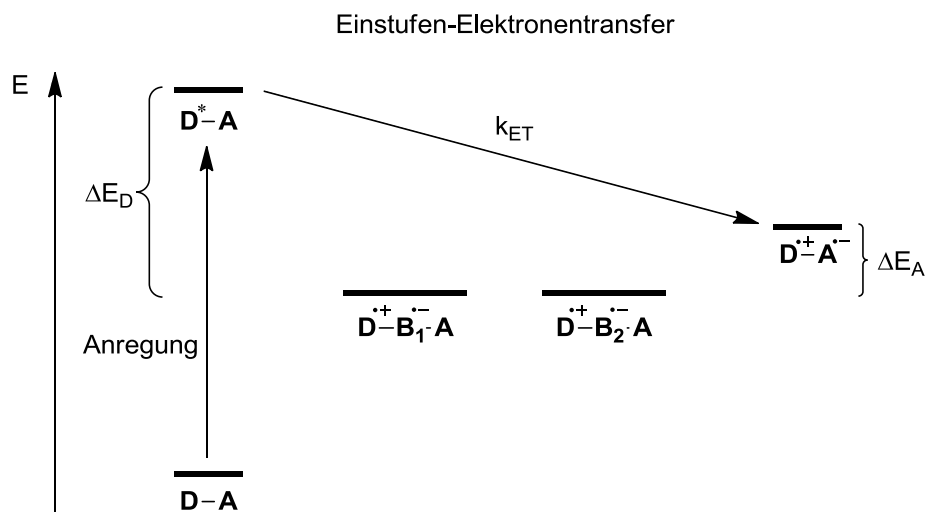
$$V_{el} = V_{el}^0 \cdot \exp(-\beta \cdot R)$$

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

$V_{el}$	elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor für einen Abstand von 0
$R$	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
$\beta$	Proportionalitätskonstante

$\beta$  ist eine Proportionalitätskonstante die das Maß für die Distanzabhängigkeit angibt.

Für Tunneln liegt  $\beta$  minimal bei  $0,2-0,3 \text{ \AA}^{-1}$ .<sup>293</sup>



**Abb. 70:** Schematische Darstellung des Elektronentransfers von einem Donor zu einem Akzeptor in DNA nach dem Superaustausch-Mechanismus

Es ist zu beachten, dass die Distanzabhängigkeit, die durch Experimente erhalten wird, nicht diesem  $\beta$  entspricht, da vor allem bei Ladungstransfer im kurzen Bereich sowohl  $\lambda$ , also auch  $\Delta G_{ET}$  distanzabhängig sind.<sup>294</sup>

Zusammengefasst ist der Superaustausch, der aufgrund seiner starken Distanzabhängigkeit auf maximal 10 Å (3 Basenpaare) begrenzt ist,<sup>295</sup> äußerst schnell und auf eine starke Kopplung zwischen Donor und Akzeptor angewiesen.<sup>276</sup>

Ladungstransferprozesse über 34 Å<sup>296</sup> können demnach nicht nach diesem Mechanismus ablaufen und es wurde ein weiterer für Ladungstransfer durch Nucleinsäuren entwickelt, das Hopping.

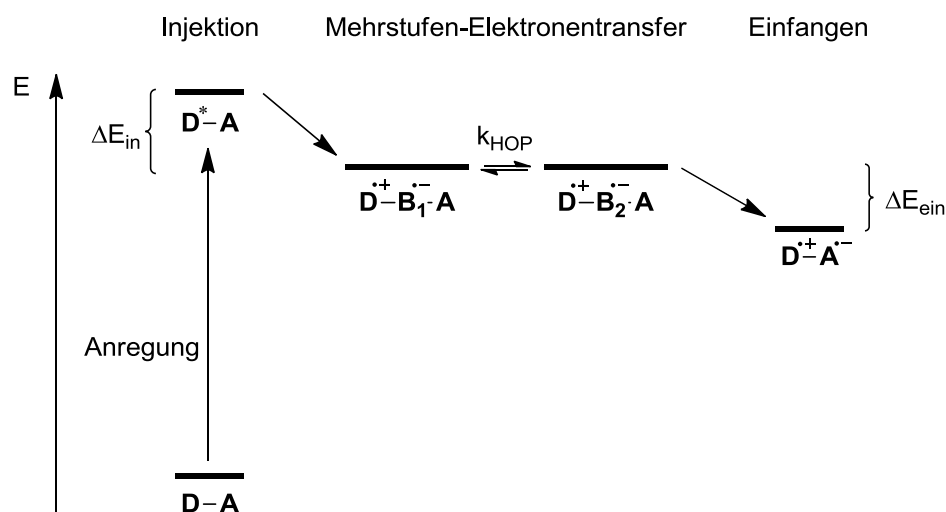
## Hopping

Beim Hopping-Modell erfolgt die Injektion des Elektrons in die DNA-Brücke (s. Abb. 71).<sup>37,279,297</sup> Die Ladung springt in Superaustauschprozessen vom Donor über einzelne Basen auf den Akzeptor. Der primäre Ladungsträger ist, die am leichtesten zu reduzierende Base, Thymin.<sup>46-47,298-299</sup> So ergibt sich eine starke Sequenz-, aber geringe Distanzabhängigkeit ( $0,11 \text{ \AA}^{-1}$ ).

Geht man davon aus, dass jeder Sprung über die gleiche Strecke erfolgt, hängt die Elektronentransfergeschwindigkeit nur von der Anzahl der Hopping-Schritte ( $N$ ) ab.

$$k_{ET} = N^{-\eta}$$

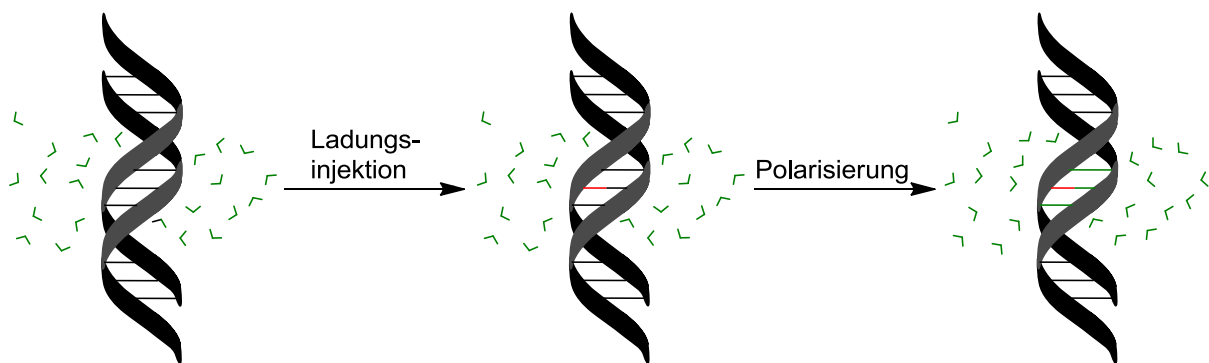
Der Wert von  $\eta$  liegt zwischen 1 und 2 und gibt den Einfluss des Mediums an. Des Weiteren zeichnet sich dieses Modell durch seine Temperaturabhängigkeit aus, da jeder einzelne Superaustausch durch thermische Energie induziert wird. Fraglich ist jedoch, ob man die geladenen Intermediate als isolierte Anionen betrachten kann, oder ob sich die Ladung nicht vielmehr über mehrere Basen delokalisiert, aufgrund ihrer Wechselwirkung untereinander. Diese Überlegung führte zu neuen delokalisierten Mechanismen.<sup>276</sup>



**Abb. 71:** Schematische Darstellung des Elektronentrfers von einem Donor zu einem Akzeptor in DNA nach dem Hopping-Mechanismus

### Polaron-Hopping

Wenn eine Ladung auf ein Molekül übertragen wird, kommt es ebenfalls zu einer Polarisierung der Umgebung, wodurch die Energie des Systems erniedrigt wird (s. Abb. 72).<sup>276,300</sup> Dieses Quasiteilchen nennt man Polaron. Ob die Polaronbildung den Ladungstransfer beeinflusst, hängt davon ab, auf welcher Zeitskala diese stattfindet und in wie weit sich die Energie vom Anfangszustand unterscheidet. Die Ausbildung eines relativ kleinen Polarons verlangsamt den Ladungstransfer, da die Erniedrigung der Energie zu einer erhöhten Aktivierungsenergie für jeden Sprung führt. Es sei denn, das Quasiteilchen kann sich über Driften bewegen. Hierbei überlappen sich die Orbitale des Donor- und Akzeptorzustands, wodurch es zu einer barrierefreien und schnellen Ladungswanderung kommt.



**Abb. 72:** Ladungsinjektion auf eine Base (rot) mit anschließender Polarisierung der angrenzenden Basen und Lösungsmittelmolekülen (grün)

### Delokalisation über Domänen

Nukleotide haben extrem kurze Fluoreszenzabklingzeiten und geringe Quantenausbeuten.<sup>301</sup> Sie haben sich evolutionär so entwickelt, da ein längerer angeregter Zustand zu DNA Schäden führen würde. Dies gilt auch für die meisten DNA-Sequenzen. Bei bestimmten Basenabfolgen stellte man aber eine Abweichung von diesem Sachverhalte fest. Man führt dies auf Exciton- oder Excimer-Zustände zurück,<sup>301-303</sup> die vorzugsweise zwischen drei oder vier benachbarten Adeninen auftreten. Dies erklärt warum diese Abschnitte (A-Tracts) Ladung besser leiten.<sup>276,304</sup>

Alle Mechanismen unterliegen immer noch reichlichen Diskussionen und man sollte sich davor hüten einen als der Weisheit letzten Schluss anzusehen. Vielmehr ist der Ladungstransfer durch Nukleinsäuren ein komplexer Vorgang, der noch von vielen anderen Faktoren bestimmt wird.



### 5.1.4 Einflussfaktoren des DNA-vermittelten Ladungstransfers

#### Kopplung des Ladungsdonors und -akzeptors zum DNA-Basenstapel

Die elektronische Kopplung zwischen DNA-Basenstapel und Donor (oder Akzeptor) hat besonders bei kurzen Brücken Einfluss auf die Ladungsleitung.<sup>305-306</sup> Dies erklärt die weite Spanne über mehrere Größenordnungen von gemessenen Lochtransfergeschwindigkeiten. Eine Interkalation des künstlichen Bausteins in den  $\pi$ -Stapel der Doppelhelix, oder zumindest eine Wechselwirkung über eine der Furchen mit den DNA-Basen ist essentiell für den DNA-vermittelten Ladungstransfer,<sup>276,307</sup> da der Duplex von isolierenden Zuckern und Phosphaten flankiert wird.

#### Globale strukturelle Integrität

Nukleinsäuren zeichnen sich durch ihre definierte Struktur aus. Zwei komplementäre Stränge finden sich zu einer Doppelhelix zusammen. Die Basen bilden dabei im Inneren durch  $\pi$ -Wechselwirkungen ein Medium für den Elektronentransfer. Die strukturelle Integrität dieses Basenstapels ist dafür die Voraussetzung.<sup>308</sup> Ein Einzelstrang unterstützt demzufolge keine Ladungswanderung,<sup>284,286,309</sup> sondern nur ein stabiler Doppelstrang, dessen Struktur auch von der Ionenstärke und der Feuchtigkeit in seiner Umgebung abhängt. Dadurch sind Messungen der Leitfähigkeit im Vakuum für Nukleinsäuren keine sinnvolle Methode.<sup>276</sup>

#### Lokale strukturelle Integrität

Wie schon erwähnt, ist die strukturelle Integrität des Basenstapels die Grundlage für Elektronenwanderung. So verwundert es nicht, dass auch lokale Störungen, wie Basenfehlpaarungen, destabilisierende Läsionen und abasische Stellen die Leitfähigkeit im Allgemeinen erniedrigen.<sup>310</sup> Es gibt jedoch andere Beispiele bei denen eine Basenfehlpaarung die Transfergeschwindigkeit erhöht, was jedoch auf konformationelles Gating zurückzuführen ist (siehe unten).<sup>311</sup> Veränderungen der DNA, die keinen Einfluss auf die Basen haben, wie eine Unterbrechung im Phosphatrückgrat, führen zu keinem messbaren Unterschied.<sup>312-313</sup>

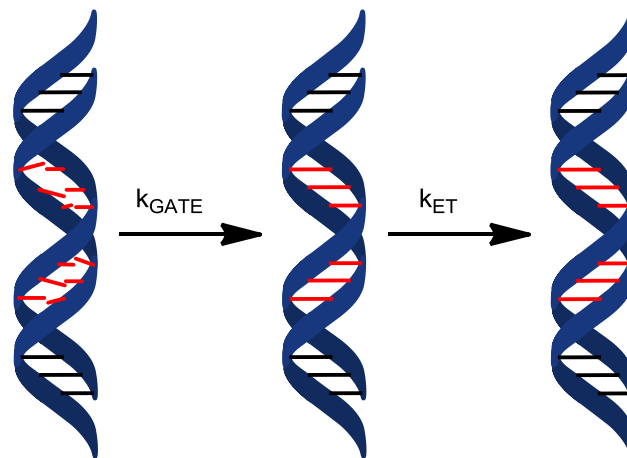
#### Konformationelles Gating

DNA ist ein komplexes Gebilde. Selbst relative kurze 15mere bestehen schon aus vielen hunderten Atomen. Die Doppelhelix unterliegt ständigen Fluktuationen, sodass nie die Leitfähigkeit einer Struktur betrachtet wird, sondern immer eine Mittelung über viele Konformationen. Je größer der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist, desto

größer ist auch die Anzahl dieser Konformationen. Also sollte eine Hinderung der Molekülbewegung durch Erniedrigung der Temperatur zu einer festeren homogeneren Struktur führen, die einen besseren Ladungstransfer ermöglicht. Bei DNA ist dies aber genau umgekehrt.<sup>314</sup> Demnach ist die Gleichgewichtskonformation nicht der aktive Zustand für Ladungstransfer über weitere Strecken (s. Abb. 73.) und eine höhere Flexibilität der Doppelhelix sollte den Elektronentransfer begünstigen.<sup>276</sup>

Der Effekt der Steigerung des Ladungstransfers mit der Temperatur ist größer bei einer ATAT-Brücke als bei einem AAAA-Abschnitt.<sup>42</sup> Alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenzen stapeln weniger stark als fortlaufende Purine, insbesondere Abschnitte mit Adeninen. Aus diesem Sachverhalt heraus liegt es nahe, dass die Änderung des Ladungstransfers mit der Temperatur auf Gating zurückzuführen ist.

Bei unterschiedlichen Sequenzen verändern sich aber auch die Redoxpotentiale, und Temperaturänderungen beeinflussen nicht nur die Flexibilität der Helix, sondern auch mechanistische Eigenschaften, sodass diese Herangehensweise nicht geeignet scheint, um reine konformationelle Einflüsse zu untersuchen.



**Abb. 73:** Die Gleichgewichtskonformation verhindert effizienten Elektronentransfer. Erst eine Umorientierung der Basen ( $k_{\text{GATE}}$ ) macht diesen möglich ( $k_{\text{ET}}$ ).

### Elektronenrücktransfer

Nach photoinduzierter Ladungstrennung ist die anschließende Rekombination oft unvermeidlich.<sup>276</sup> Wie schnell der Elektronenrücktransfer stattfindet hängt vom System selbst ab. Es ist natürlich wünschenswert bei der Betrachtung von Elektronentransfergeschwindigkeiten, dass der Elektronenrücktransfer möglichst keine Rolle spielt, also wesentlich langsamer abläuft als die Ladungstrennung. Dies ist aber besonders bei Ladungstransferprozessen über kurze Strecken nicht der Fall. Über längere Distanzen hat die Ladungsrekombination jedoch keinen Einfluss mehr, weil sie eine steilere Distanzabhängigkeit, als die Ladungstrennung, aufweist.<sup>315</sup> Wenn der

Elektronrücktransfer mit der Ladungstrennung konkurriert, ermöglicht das System keinen Ladungstransport über weite Strecken. Eine Möglichkeit dies zu verhindern ist die Coulombanziehung zu schwächen, indem man zweifach positiv geladene Elektronenakzeptoren, wie Methylviologen oder Diazapyrenium, verwendet. Nach dem Elektronentransfer ist dann sowohl Donor als auch Akzeptor einfach positiv geladen.

### **Energetik**

Die natürlichen Nucleoside sind relativ stabil gegenüber milder Oxidation und Reduktion, und die Radikalanionen bzw. -kationen unterliegen Sekundärreaktionen im Mikrosekundenbereich.<sup>276</sup>

Die Redoxpotentiale der Nucleoside sind nicht leicht zu bestimmen.<sup>316</sup> Aus Simulationen,<sup>317</sup> elektrochemischen Analysen,<sup>141,318-319</sup> Pulsradioanalyse<sup>320-321</sup> und Photooxidationsexperimenten<sup>322</sup> ergibt sich trotzdem ein einheitliches Bild hinsichtlich der Reihenfolge der Redoxpotentiale:  $G < A < C \approx T$ .

Sowohl Rechnungen, als auch Messungen ergaben, dass zwei Guanine nebeneinander ein kleineres Potential haben, als ein einzelnes G.<sup>323-324</sup> Bei drei erniedrigt es sich noch weiter. Dies ist wohl auf Stapel-effekte zurückzuführen.

### **Protonengekoppelter Elektronentransfer**

Die  $pK_a$ -Werte der am Elektronentransfer beteiligten Moleküle ändern sich oftmals je nach Oxidationsstufe, sodass der Ladungstransfer mit einem Protonentransfer verbunden ist. Auch wenn kein vollständiger Protonentransfer stattfindet, kann dieser doch geschwindigkeitsbestimmend sein.

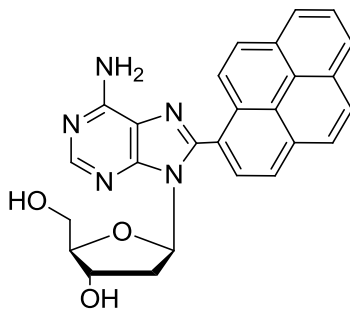
Jedes Nucleotid in der Doppelhelix ist Teil einer stabilen Bindung über Wasserstoffbrücken, sodass der Ladungstransfer protonengekoppelt sein sollte. Die übliche Untersuchung der pH-Abhängigkeit kann nicht verwendet werden, da die inneren Protonen der Basenpaare vom Lösungsmittel abgeschirmt sind. Über transiente Absorption<sup>325</sup> und EPR<sup>326</sup> wurde aber bei Ladungstransferexperimenten nicht nur das oxidierte Guaninradikalkation nachgewiesen, sondern auch das neutrale Guaninradikal, was einen Protonentransfer zum Cytidin nahelegt.<sup>276</sup>

### **5.1.5 Pyren als Ladungsdonor in Nucleinsäuren**

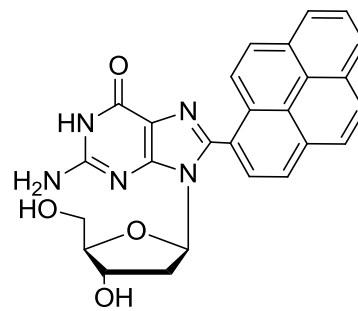
Seit *Netzel* und Mitarbeiter 1995 die Fluoreszenzlöschung von Pyren in Oligonucleotiden in Abhängigkeit von der Nachbarbase untersucht haben,<sup>327</sup> verbreitete sich das Pyren als Donor für Ladungstransferprozesse in DNA. Es wurde schon auf ver-

schiedenste Weisen kovalent an Nucleinsäuren geknüpft. Dabei fanden sowohl alle vier Basen<sup>328-329</sup>, als auch Anknüpfungen über Ribose<sup>330</sup> und Linkersysteme<sup>331</sup> Anwendung (s. Abb. 74).

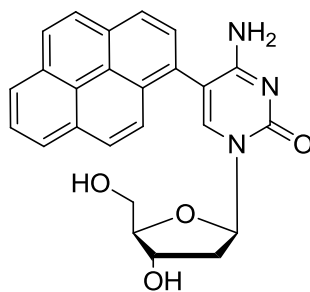
Pyren kann je nach Reaktionspartner photoaktivierten Lochtransfer oder Elektronentransfer eingehen.<sup>332</sup> Zur Steuerung dieser Eigenschaft wurde die Modifikation an die 5- bzw. 8-Position aller natürlichen Nucleoside gebunden. Im Fall von 5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin (1PydU) und -cytidin (PydC) ereignet sich nach Anregung ein intramolekularer Elektronentransfer vom Pyren zur Base ( $\text{Py}^+\text{dU}^-$  bzw.  $\text{Py}^+\text{dC}^-$ ). Aus den Experimenten ergab sich dafür eine Triebkraft ( $\Delta G$ ) von ungefähr 0 eV.<sup>333-334</sup>



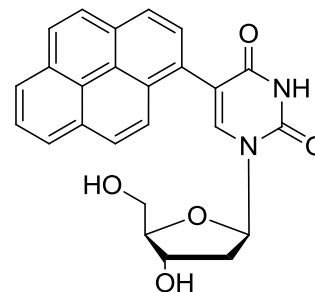
PydA, *Wagenknecht*



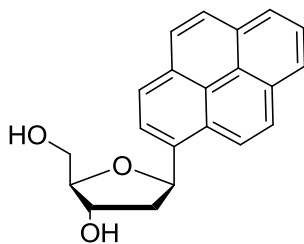
PydG, *Wagenknecht*



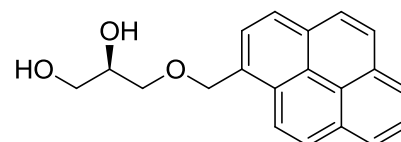
PydC, *Wagenknecht*



1PydU, *Netzel u. Wagenknecht*



*Kool*



*Pedersen*

**Abb. 74:** Bausteine zur Modifikation von Nucleinsäuren mit Pyren

Dies setzt aber ein Normalpotenzial von  $E(dU/dU^*) = E(C/C^*) = -1,8 \text{ V}$  voraus ( $E(\text{Py}^{\bullet+}/\text{Py}^*) = -1,8 \text{ V}^{335}$ ), das kleiner ist, als das von *Steenke* und Mitarbeitern bestimmte mit  $-1,1 \text{ V}^{299}$ . Dieser höhere Wert könnte die Folge eines protonengekoppeltem Elektronentransfers sein.<sup>334</sup>

Bei 8-(Pyrenyl-1-yl)-2'-desoxyguanosin (PydG) tritt jedoch ein photoinduzierter intramolekularer Lochtransfer ( $\text{Py}^{\bullet-}\text{dG}^{\bullet+}$ ) ein, der ebenfalls nur eine geringe Triebkraft von  $-0,05 \text{ eV}$  aufweist. Nach den Redoxpotentialen von 8-(Pyren-1-yl)-2'-deoxyadenosin (PydA)<sup>141,321</sup> sollte beides, Lochtransfer und Elektronentransfer, unvorteilhaft sein.

Betrachtet man die Fluoreszenzintensität der Pyrennukleotide in Wasser bei verschiedenen pH-Werten, kommt es bei PydC unter physiologischen Bedingungen zu einer Löschung<sup>47</sup> und das Radikalanion  $\text{dC}^{\bullet-}$  ist mit transientser Spektroskopie nicht nachweisbar.<sup>334</sup> Dies ist auf eine Protonierung des Radikalanions zurückzuführen, was die Ladungsübertragung auf die DNA-Basen behindern würde.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, dass 1PydU der vielversprechendste Kandidat für reduktive Elektronentransferprozesse in Nukleinsäuren sein sollte. Zur weiteren Festigung dieser Aussage wurde die zeitaufgelöste transiente Absorption des Nukleosids gemessen.<sup>336</sup>

Dies ergab, dass es in 1PydU zwar zu einer Ladungsübertragung vom Pyren auf die Base kommt, jedoch auch zu einem exciplexartigen Zustand  $(\text{Py}^{\delta+}\text{dU}^{\delta-})^*$ , indem die  $\pi$ -Systeme des Chromophors und der Base miteinander wechselwirken. Da dies eine Stabilisierung des ladungstrennten Zustandes bedeutet und die Ladungsübertragung auf die anderen Basen ebenfalls beeinflusst wird,<sup>336</sup> wurde der Anknüpfungspunkt an das Pyren verändert. Der reduktive Elektronentransfer ist LUMO bestimmt. Dieses Orbital ist bei 5-(Pyren-2-yl)-2'-deoxyuridin (2PydU) auf das Chromophor begrenzt, während bei 1PydU eine Wechselwirkung mit der Base vorhanden ist (s. Abb. 75).

Die Rechnungen wurden auch experimentell durch transiente Absorption des  $S_1$ -Zustands bestätigt, da fast kein intramolekularer Exciplex mehr nachzuweisen ist.<sup>49</sup> Die trotzdem noch sichtbare langwelligere Absorption ist auf einen gewissen Anteil von LUMO+1, das Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte an der 2-Position besitzt, an dem angeregten Zustand zurückzuführen.<sup>337</sup>

Demnach sollte 2PydU ein idealer Elektronendonator für Ladungstransferexperimente sein und so wurde dieses Molekül auch zur Untersuchung von konformationellen Einflüssen verwendet.

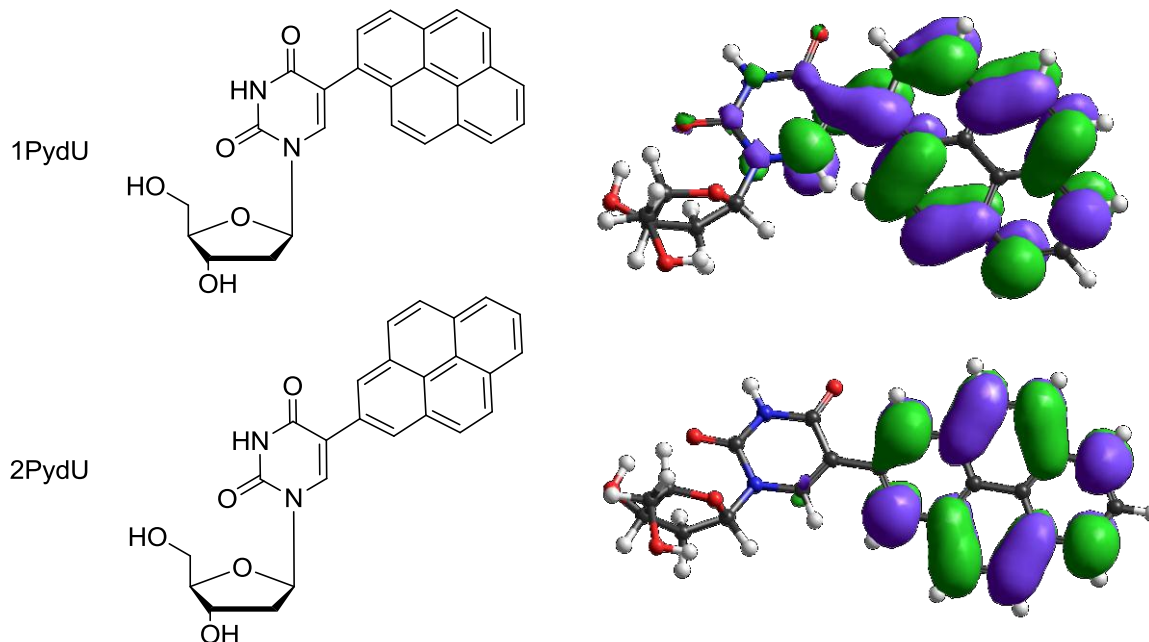


Abb. 75: Berechnete LUMOs von 1PydU (oben) und 2PydU (unten)<sup>50</sup>

### 5.1.6 Analyse des photoinduzierten Ladungstransfers

#### Fluoreszenzlöschung des Donors

Die Fluoreszenzquantenausbeute eines Moleküls hängt von den strahlungslosen Konkurrenzprozessen zur Emission ab. Findet ein Elektronentransfer zu einem Akzeptor statt, entsteht ein ladungstrennter Zustand und die Fluoreszenz des Ausgangszustands wird gelöscht (s. Abb. 76).

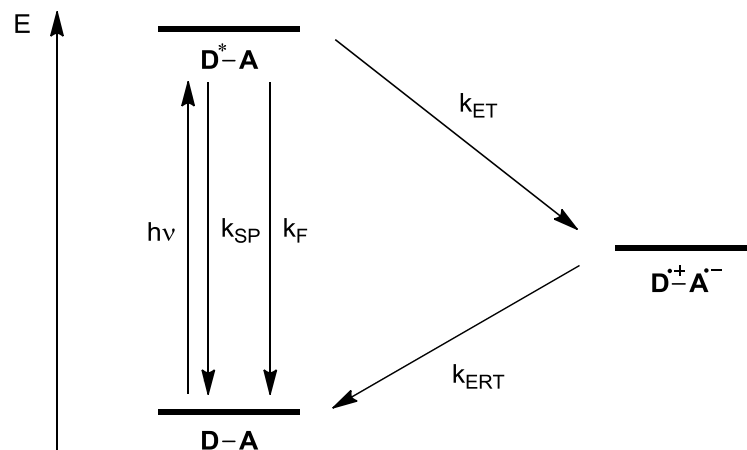
Geht man davon aus, dass die Geschwindigkeitskonstanten aller strahlungsloser Prozesse ( $k_{SP}$ ) und der Fluoreszenz ( $k_F$ ) unverändert bleiben, bei An- und Abwesenheit eines Akzeptors, kann die Abnahme der Fluoreszenz auf den Elektronentransfer zurückgeführt werden. Ein Maß für diese Löschung ist der  $F_q$ -Wert.

$$F_q = 1 - \frac{F}{F_0}$$

$F$  Fluoreszenzintensität mit Akzeptor

$F_0$  Fluoreszenzintensität ohne Akzeptor

Die Fluoreszenzintensität mit vorhandenem Akzeptor wird mit der Fluoreszenzintensität ohne Akzeptor ins Verhältnis gesetzt. Ein großer  $F_q$ -Wert spricht demnach für einen effizienten Elektronentransfer.

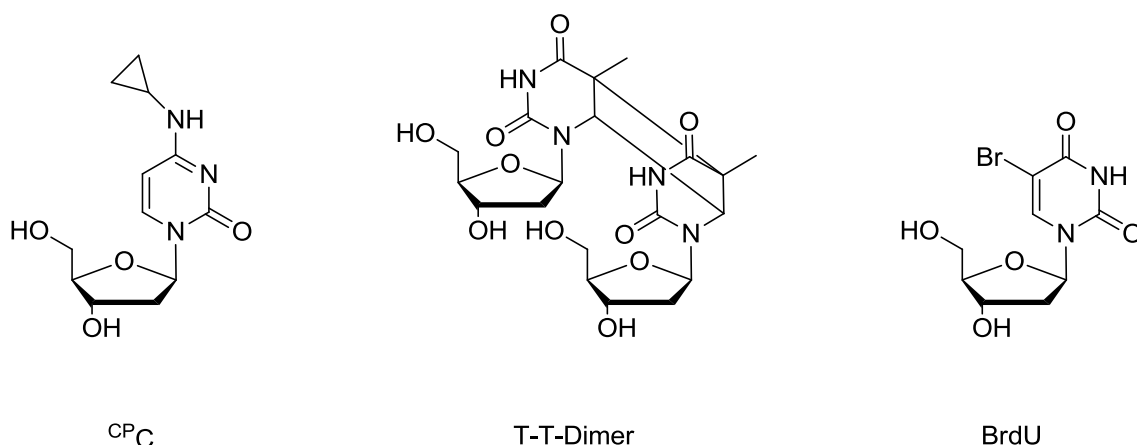


**Abb. 76:** Energieschema zur Löschung der Fluoreszenz eines Donors (**D**) durch Elektronentransfer zu einem Akzeptor (**A**);  $k_{SP}$ : Geschwindigkeitskonstante der Summe aller strahlungsloser Prozesse,  $k_F$ : Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz,  $k_{ET}$ : Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers,  $k_{ERT}$ : Geschwindigkeitskonstante des Elektronenrücktransfers

Die Methode ist jedoch sehr fehlerbehaftet, weil alle konkurrierenden Prozesse auch von anderen Faktoren, die nichts mit dem Ladungstransfer zu tun haben, abhängen können. Bewirkt z.B. der Akzeptor in der DNA eine Umorientierung des Donors ändert sich auch  $k_{SP}$ . Ist das verwendete System jedoch sehr gut untersucht, sodass solche Dinge ausgeschlossen werden können, wie z.B. im Falle des Lochdonors 2-Aminopurin<sup>338</sup> der Gruppe *Barton*, kann die Bestimmung der Fluoreszenzlöschung eine sehr einfache und schnelle Methode für die Untersuchung von Ladungstransfer sein.

### Irreversible chemische Reaktionen

Es gibt im Wesentlichen drei Modifikationen in Nukleinsäuren, die in Folge einer Elektronenaufnahme irreversible Reaktionen eingehen: *N*-4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin (<sup>CP</sup>C), das T-T-Dimer und 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) (s. Abb. 77).

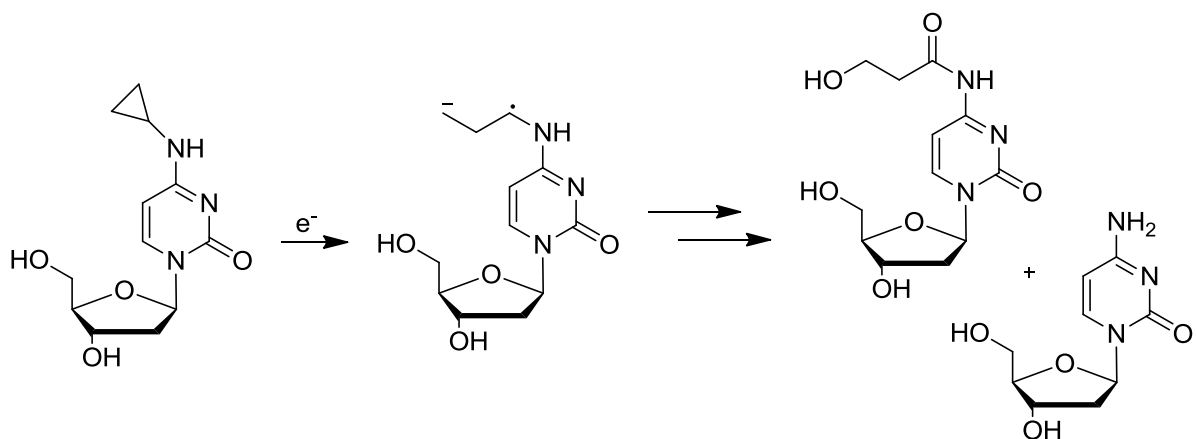


**Abb. 77:** Verschiedene Elektronenakzeptoren in Nukleinsäuren

Alle drei Moleküle unterscheiden sich in ihrem Reduktionspotential nicht wesentlich von dem ihrer verwandten natürlichen Nucleoside. Sie stellen vielmehr kinetische Fallen dar. Für die Betrachtung von Elektronentransferprozessen ist es entscheidend, dass die chemische Reaktion irreversibel und sehr schnell im Vergleich zum Elektronentransferprozess ist. Die Analyse der Reaktionsprodukte kann entweder nach piperidininduzierten Strangbrüchen, über HPLC<sup>44,339</sup> oder PAGE<sup>46,340</sup> erfolgen oder es wird ein enzymatischer Verdau durchgeführt und die Abnahme der entsprechenden Nucleotide ebenfalls mit HPLC verfolgt.<sup>43</sup>

<sup>CP</sup>C unterliegt einer schnellen Ringöffnung nach Reduktion. Wie mittels HPLC- und Massenanalyse nachgewiesen wurde, reagiert das intermediär gebildete Radikal weiter zum Cytidin und zu einem Amidderivat (s. Abb. 78).<sup>341</sup>

Das T-T-Dimer aus der Gruppe *Carell* stellt einen UV-Licht-induzierten DNA-Schaden dar, der von der DNA-Photolyse durch Injektion eines Elektrons repariert wird.<sup>342</sup> Verwendet man diese Läsion als Detektor für Ladungstransfer sind die Nucleotide nicht durch einen Phosphodiester verbunden, sodass eine Zykloreversion zu einem Strangbruch führt. Allerdings besitzt die Reaktion eine Geschwindigkeitskonstante zwischen  $10^6 \text{ s}^{-1}$  und  $10^9 \text{ s}^{-1}$ . Dies scheint für die Untersuchung von Hoppingprozessen, zumindest bei relativ kurzen Distanzen, zu langsam zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass  $k_{HOP}$  auf  $17 \text{ \AA} \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$  beträgt.<sup>343</sup>



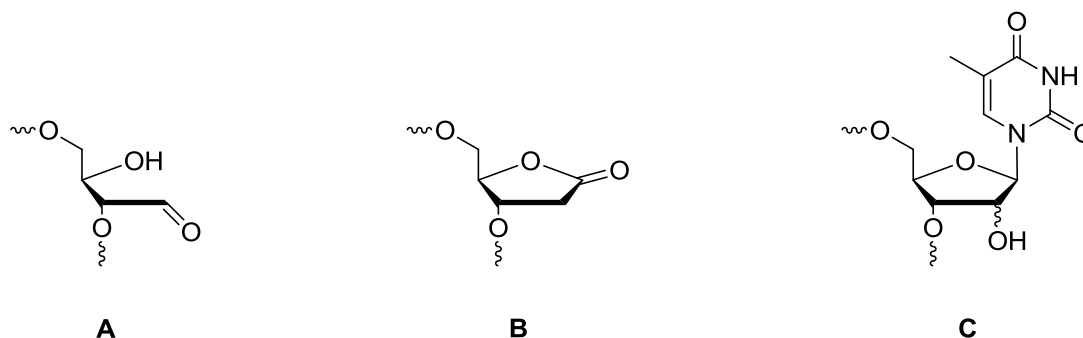
**Abb. 78:** Zersetzung von *N*-4-Cyclopropyl-2'-desoxycytidin nach Reduktion

Im direkten Vergleich erwies sich BrdU als sehr viel geeigneter Ladungstransferprozesse zu verfolgen, weil die Radikalbildung schneller abläuft.<sup>344</sup> Darüber hinaus ist es einfach zu synthetisieren und mittlerweile auch kommerziell erhältlich. Bestrahlt man BrdU-haltige-DNA direkt, erhält man einen Elektronentransfer vom Adenosin zum halogenierten 2'-Desoxyuridin, was zu einer Abspaltung des Bromidions führt und ein



Radikal in der Nucleinsäure entsteht. Über die anschließenden Reaktionen zu mit Piperidin spaltbaren Produkten gibt es viele Untersuchungen.<sup>345-350</sup>

*Sugiyama* verfolgte die Produktverteilung bei Elektronentransferexperimenten zwischen endständigem Pyren und BrdU in verschiedenen Abständen zueinander mittels HPLC und Massenspektrometrie.<sup>351</sup> Er konnte neben oxidiertem Pyren drei Hauptabbauprodukte von BrdU nachweisen (s. Abb. 79), deren Verhältnisse eine Distanzabhängigkeit von Donor und Akzeptor aufweisen.

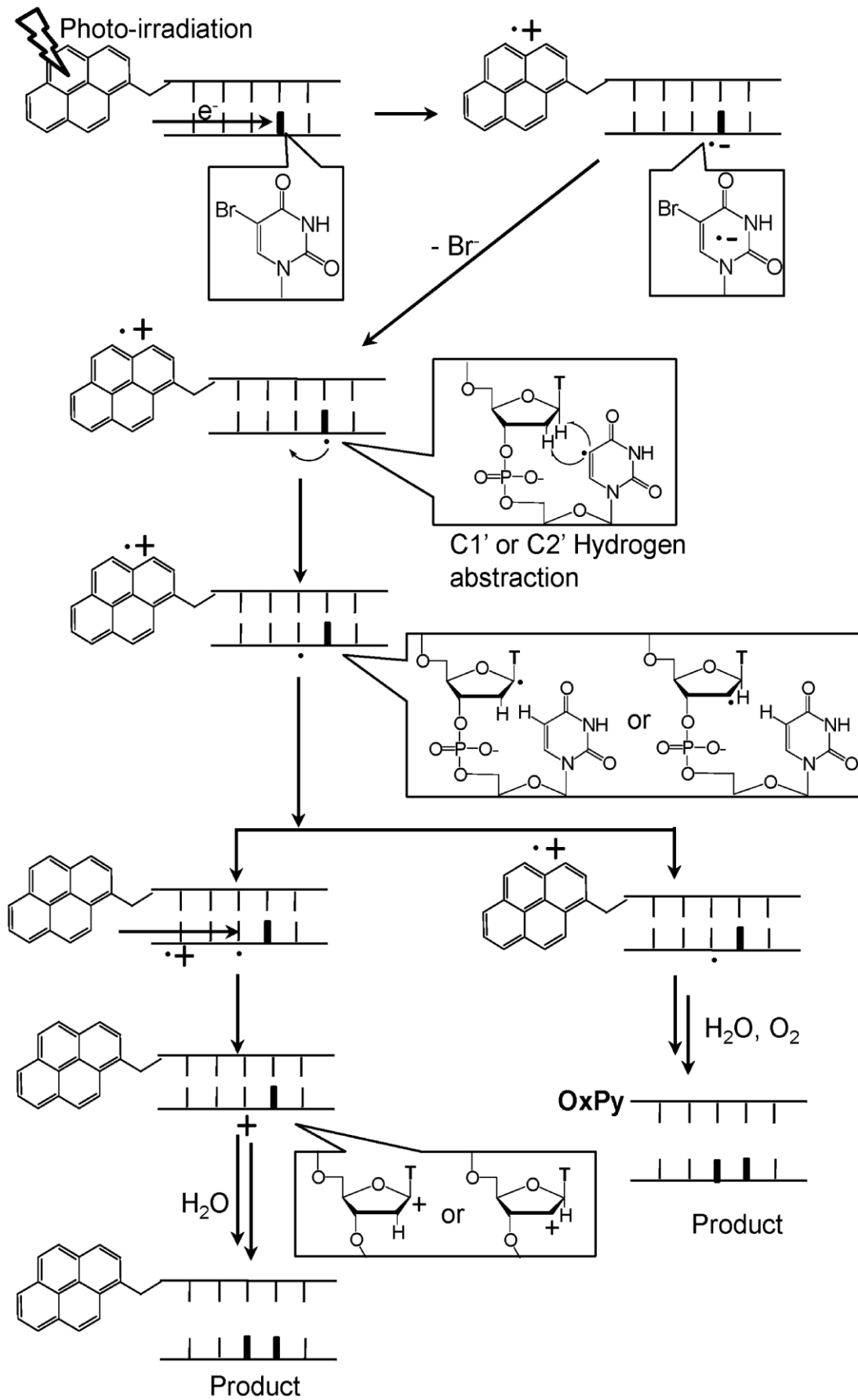


**Abb. 79:** Hauptabbauprodukte von BrdU nach induziertem Ladungstransfer

Die Entstehung von **C** ist weiterhin unklar, aber für die Bildung von **A** und **B** wurde folgender Mechanismus postuliert (s. Abb. 80):

Die Photoanregung des Pyrens führt zu einem Elektronentransfer zum BrdU. Dieses spaltet Bromid ab und das entstandene Radikal abstrahiert einen Wasserstoff von C1' oder C2' des benachbarten Nucleosids. Ist der Abstand groß zwischen Donor und Akzeptor, wird der Chromophor mittels Sauerstoff oxidiert. Ist die Distanz gering, schließt sich ein Lochtransfer an und man erhält wieder Pyren (s. Abb. 80, oben). Die Carbokationen reagieren weiter zu **B**. Ohne nochmaligen Ladungstransfer setzen sich die Radikale mit Sauerstoff um und es kann auch der Aldehyd **A** entstehen. Demnach sinkt die Bildung von oxidiertem Pyren und von Ester **B** mit wachsendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor, während die Entstehung von **A** abnimmt, da der Lochtransfer eine starke Distanzabhängigkeit aufweist.

Für die Untersuchung der Effizienz von reduktivem Ladungstransport über piperidin-induzierte Strangbrüche ist diese Produktverteilung irrelevant, da alle Produkte basenlabil sind.



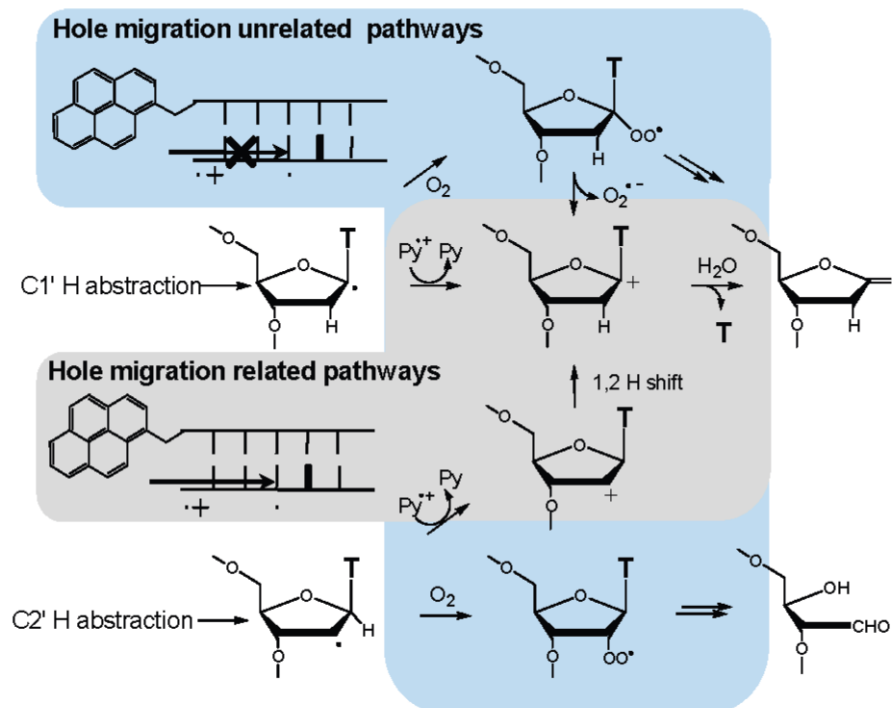


Abb. 80: Postulierter Mechanismus zur Produktverteilung in Ladungstransferexperimenten mit Pyren und BrdU in DNA<sup>352</sup>

## 5.1.7 Struktur von Nukleinsäuren

### Desoxyribonukleinsäure

Alle hier besprochenen Nukleinsäuren besitzen die vier natürlichen Basen, Thymin (bzw. Uracil), Adenin, Cytidin und Guanin. Sie bilden die Grundlage für eine stabile Doppelhelix. Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen sind dafür verantwortlich.

Desoxyribonukleinsäure kann die A-, B- und Z-Form annehmen, die sich zum Teil erheblich voneinander unterscheiden (s. Abb. 81).<sup>179</sup>

- Während A und B rechtsgängig sind und bei jeder Sequenz auftreten können, entsteht Z bei alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen, hauptsächlich GC, und ist linksgängig.
- A ist dick und kompakt, Z dünn und gestreckt und B ist intermediär.
- A-Form und Z-DNA besitzen in der Mitte der Helix ein Loch, weil die Basen von der Achse versetzt angeordnet sind. In der B-Form ist dies nicht der Fall (s. Abb. 81, oben).
- Die große weite und kleine schmale Furche der B-DNA sind ähnlich tief, wobei bei A die große Furche eng und tief ist und die kleine weit und flach. Anders verhält es sich bei der Z-Form: Hier ist die große Furche keine Furche, son-

dem konvex, die kleine Furche ist tief, schmal und wird vom Phosphatrückgrat flankiert.

- Der Hauptdrehwinkel in B-DNA ist  $36^\circ$ , was zu 10 Basenpaare pro Drehung führt. Die A-Form weist 11 Basenpaare pro Drehung auf (der Drehwinkel ist  $33^\circ$ ) Die Z-DNA besitzt 12 Basenpaare pro Drehung, was zu einem durchschnittlichen Drehwinkel von  $30^\circ$  führt. Die Wiederholungeinheit in der Helix umfasst aber zwei Basenpaare. Zwischen G-C ist der Drehwinkel  $50^\circ$ , aber  $10^\circ$  zwischen C-G.
- Die Zuckerkonformation in A ist C3'-endo (N-Typ) und in B C2'-endo (S-Typ). In Z ist die Konformation C2'-endo bei C und C3'-endo bei G (s. Abb. 82).
- Die glykosidische Bindung ist anti in A und B und wechselt zwischen syn (bei G) und anti (bei C) in Z-DNA.
- In B- und Z-DNA sind die Basenpaare senkrecht zur Helixachse, während sie bei A gekippt dazu sind.
- Z-DNA ist sehr viel steifer als A und B. B-DNA kann sich sogar relativ einfach biegen, was zu einem Zusammenbrechen der großen Furche führt.

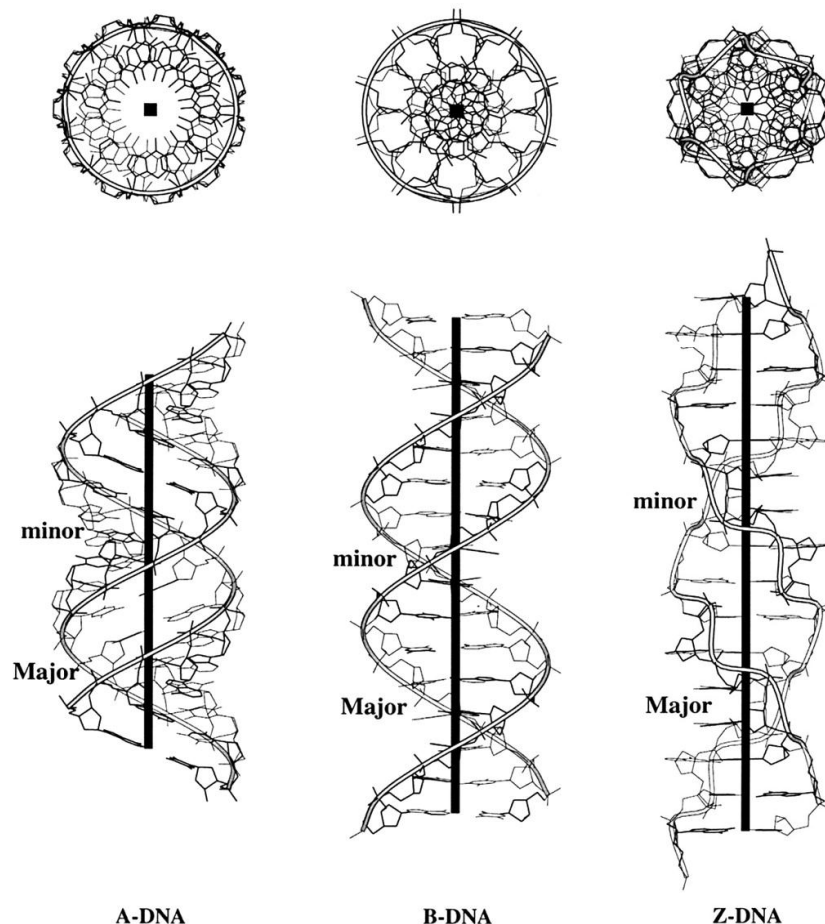
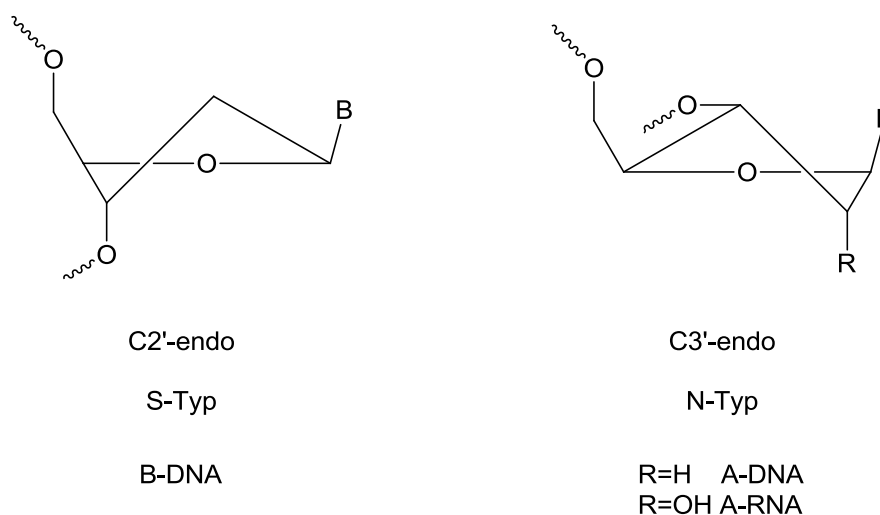


Abb. 81: Drei verschiedene DNA Formen: A-, B- und Z-DNA<sup>353</sup>



**Abb. 82:** Zuckerkonformationen in A- und B-Form von Nukleinsäuren

Die wichtigsten Eigenschaften der verschiedenen Tertiärstrukturen sind in folgender Tabelle aufgelistet (s. Tab. 3).

**Tab. 3:** Eigenschaften der verschiedenen DNA-Formen

	<b>A-Form</b>	<b>B-Form</b>	<b>Z-Form</b>
<b>Helikalität</b>	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
<b>Durchmesser</b>	26 Å	20 Å	18 Å
<b>Basenabstand (Rise)</b>	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
<b>Drehung/Basenpaar (Twist)</b>	33°	36°	30°
<b>Zuckerkonformation</b>	C3'-endo	C2'-endo	C3'-endo (Purine), C2'-endo (Pyrimidine)
<b>Glykosidische Bindung</b>	anti	anti	syn (Purine), anti (Pyrimidine)

Die natürliche Form der Desoxyribonukleinsäure ist die B-Form, durch Dehydratisierung kann diese in die A-Form überführt werden. Z-DNA tritt nur bei alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen, vor allem GC, und hoher Ionenstärke auf. Sie steht im Verdacht, in vivo bei der Transkription als Resultat von Drehspannung zu entstehen, während sich die Polymerase weiter bewegt, und sie könnte eine Rolle bei der Genregulation spielen.<sup>308</sup>

## Ribonukleinsäure

Die A-Form tritt aber auch bei Ribonukleinsäuren auf. Diese kann im Gegenteil zur Desoxyribonukleinsäure vielfältige Tertiärstrukturen annehmen (Schleifen, Verzweigungen, Helices, etc.). Die Zuckerkonformation ist aber immer C3'-endo, da sonst durch die Hydroxygruppe am C2' eine sterische Hinderung eintritt. In der Helix unterscheidet sie sich zur A-DNA nur wenig, sie besitzt aber zum Beispiel einen größeren Basenabstand (2,8 Å).<sup>354</sup>

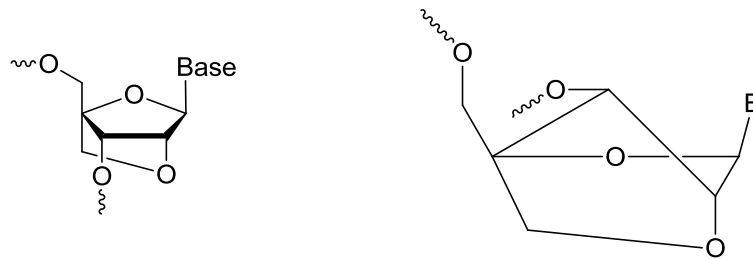
In einem DNA:RNA-Hybrid zeigt sich durch Untersuchungen in Lösung, dass die Konformation eine Mischung aus A und B ist. Besteht der DNA-Strang vorwiegend aus Pyrimidinen und der RNA-Strang aus Purinen, weist sie jedoch sehr viel mehr Ähnlichkeit zu A auf. Im Kristall wurde die Zugehörigkeit zur A Familie bestätigt und eine Drehung von 30,4° pro Basenpaar und ein Basenabstand von 2,9 Å ermittelt.<sup>354</sup>

Die Schmelztemperatur in Zufallssequenzen sinkt von RNA über DNA zu Hybriden, wobei hier ein steigender 2'-Desoxypyrimidingehalt stabilisierend wirkt. Dies ist auf die höhere Verformbarkeit dieser Nukleotide zurückzuführen, wodurch sie leichter die für die A-Form typische Konformation einnehmen können. Trotz der größeren thermodynamischen Stabilität, weist Ribonukleinsäure eine größere Flexibilität auf, was auch ihre Strukturevielfalt erklärt.<sup>355-357</sup>

Eine Ausnahme der oben genannten Fakten bilden Sequenzen mit längeren A- bzw. T-Abschnitten. A-Tracts stabilisieren DNA und destabilisieren RNA im Vergleich zu Duplexen mit gleicher Basenzusammensetzung, sodass die Reihenfolge der Schmelztemperaturen sich verändert: dAdT>rArU>rAdT>>dArU. CD-Spektren der Mischduplexe zeigen eine starke Ähnlichkeit zu RNA, obwohl sie gewisse Ungewöhnlichkeiten aufweisen.<sup>355</sup> AT-Bereiche besitzen eine spezielle Konformation. Die Doppelhelix ist zur kleinen Furche hin gebogen. Warum dieses Phänomen, auftritt ist noch nicht verstanden. Eine Möglichkeit sind gabelförmige Wasserstoffbrücken zwischen den Basen.<sup>180</sup>

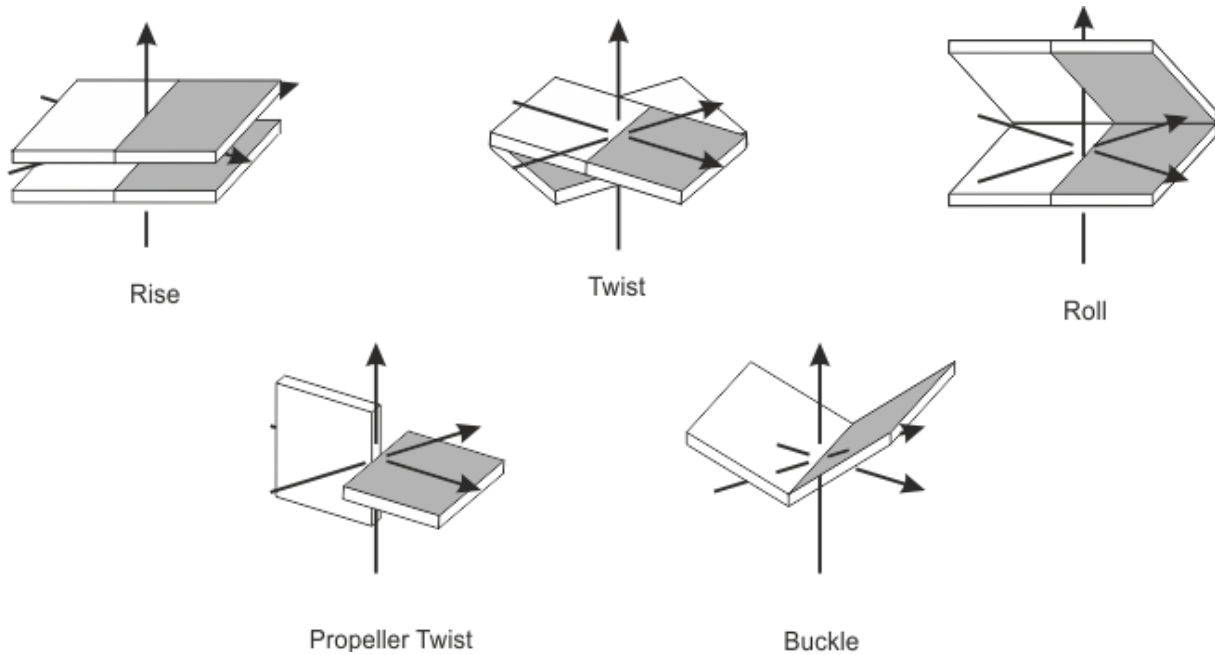
## LNA – Locked Nucleic Acid

Locked Nucleic Acid (LNA) ist eine zuckermodifizierte Nukleinsäure. *Takeshi Imanishi* und *Jesper Wengel*, sowie deren Mitarbeiter, entwickelten diese unabhängig voneinander in den späten 90er Jahren.<sup>358-359</sup> Sie führten eine Methylenbrücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff ein, wodurch die Ribose in einer RNA-ähnlichen C3'-endo Konformation fixiert wird (s. Abb. 83).



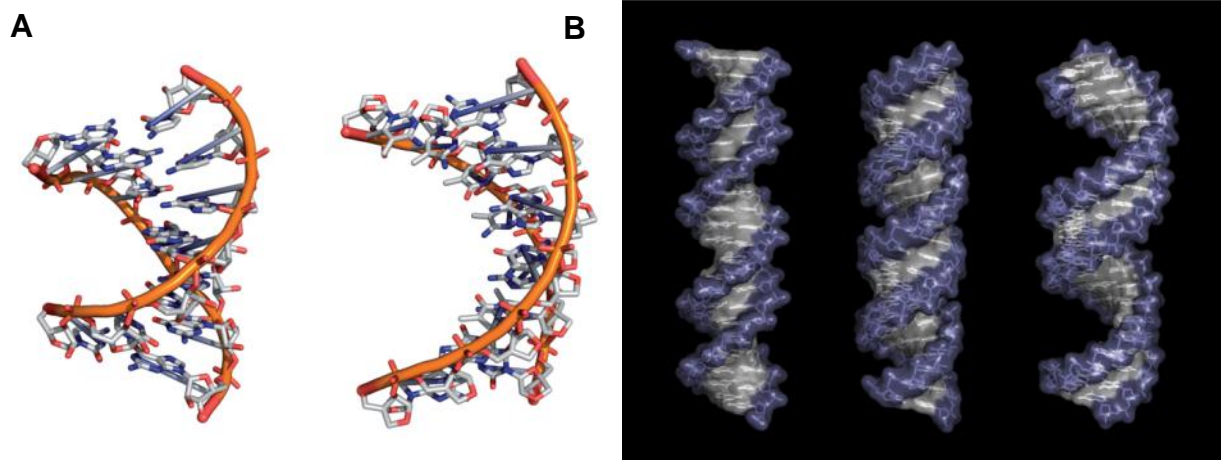
**Abb. 83:** Zwei verschiedene Ansichten eines LNA-Nukleosids

Die Nukleotide können über die Phosphoramiditmethode mit natürlichen Bausteinen kombiniert werden und sowohl teilweise als auch vollständig modifizierte Stränge bilden stabile antiparallele Doppelhelices über Watson-Crick-Basenpaarung mit LNA, DNA und RNA. Es kommt sogar zu einer erheblichen Steigerung der Schmelztemperatur zwischen 2 und 10 °C pro LNA-Einheit, wobei die Erhöhung mit wachsender Anzahl an überbrückten Zuckern geringer ausfällt. Für DNA beträgt der Schmelztemperaturunterschied 2 bis 5 °C und für RNA 4 bis 10 °C. LNA besitzt allgemein eine höhere Präferenz für Ribonukleinsäure, da diese ebenfalls C3'-endo Konformation besitzt und so der Duplex stabiler ist. Bereits ein 9mer aus reiner LNA lässt sich in Wasser nicht mehr dehybridisieren.<sup>360</sup> Diese thermodynamische Stabilität lässt sich auf zwei Effekte zurückführen: Bereits im Einzelstrang liegt bei LNA eine Präorganisation vor, da der Henkel das Phosphatrückgrat versteift, womit die Duplexbildung einen geringeren Entropieverlust zur Folge hat. Des Weiteren bedingt die Zuckerkonformation eine bessere Wechselwirkung der Basen, sodass es zu einem größeren Enthalpiegewinn kommt.<sup>361</sup> Eine Doppelhelix aus reiner LNA bildet eine neue Nukleinsäurekonformation, die sich sowohl von DNA (B-Typ) also auch von RNA (A-Typ) unterscheidet. Mit 24-25 Å ist die große Furche breiter (16 Å für RNA) und die kleine Furche mit 15 Å schmäler (19 Å für RNA) als bei RNA. Insgesamt ist der Duplex mit einer Verdrehung von 26 ° pro Basenpaar und 14 Basenpaaren pro Windung (Basenabstand: 2,8 Å) weniger stark gewunden. Diese Eigenschaft und ein reduzierter Roll und Propeller Twist bedingen die besseren Wechselwirkungen (s. Abb. 85).<sup>362</sup> Bei Hybriden aus einem DNA-Strang und einem DNA/LNA-Strang führt die festgelegte Zuckerkonformation der LNA-Nukleotide bei den DNA-Bausteinen ebenfalls zu einem höheren Gehalt an N-Typ-Zucker. Je mehr Modifikationen enthalten sind, desto mehr weicht die Helixkonformation von B-DNA ab und ähnelt zunehmend der A-Form. Bei Mischsträngen verändert sich die Zuckerkonformation der 2'-Desoxynukleotiden besonders bei den direkten Nachbarn der LNA in 3'-Richtung.<sup>363</sup>



**Abb. 84:** Bildliche Darstellung der wichtigsten geometrischen Parameter von Nukleinsäuren

In einem 10mer mit 40 % LNA-Gehalt liegt das Gleichgewicht des Zuckers bei allen Bausteinen schon bei C3'-endo. Der unmodifizierte Gegenstrang hingegen liegt noch überwiegend in der DNA-typischen Zuckerkonformation vor. Um die daraus entstehende Spannung in der Doppelhelix abzubauen, vergrößert sich Buckle und Propeller, der Basenabstand verkleinert sich auf durchschnittlich  $2,8 \text{ \AA}$  und die Helix ist mit einem Twist von  $32 \pm 1^\circ$  deutlich aufgewunden. Auch dies spricht wieder für eine bessere Stapelung der Basen.<sup>364</sup> In einem reinen DNA:LNA-Hybrid besitzen die DNA-Nukleotide nur noch zu 57 bis 80 % S-Typ-Zucker während in einem normalen DNA-Doppelstrang 80 % vorliegen.<sup>365</sup>



**Abb. 85:** Kristallstruktur eines 9mers (A) von RNA (links) und LNA (rechts) und Modell mit 46 Basenpaaren (B) von DNA (links), RNA (mitte) und LNA (rechts)<sup>362</sup>



## 5.1.8 Untersuchungen des Ladungstransfers abseits von B-DNA

### Ladungstransfer in RNA und Z-DNA

Die Gruppe um *Schuster* war die erste, die Ladungstransfer in DNA:RNA-Hybriden und Chimären untersuchte.<sup>41</sup> Sie benutzten ein Antraquinon-Derivat, das mit dem 5'-Terminus eines Stranges der Doppelhelix kovalent verbunden wurde und nur mit der letzten Base wechselwirkte, als Triplettdonor. Photoanregung dieser Modifikation führt zu einer Ein-Elektronen-Oxidation des benachbarten Nucleosids. Das Loch wandert weiter durch die Nucleinsäure und überführt ein Guanin von GG-Abschnitten mit Hilfe von Wasser in 8-Oxoguanin. Dieses ist mit Piperidin spaltbar, sodass man über die Quantifizierung der Spaltprodukte auf den Ladungstransfer rückschließen kann. Es zeigte sich eine sehr viel geringere Spalteffizienz in den Oligonucleotiden mit RNA-Gehalt. Dies wurde aber auf die größere Hydrophobizität der A-Helix zurückgeführt. Also das Guanin wird zwar oxidiert, es kommt aber aufgrund der Abwesenheit von Wasser zu keiner anschließenden chemischen Reaktion.

*Odom et al.* wählten einen ganz ähnlichen Versuchsaufbau, nur entschieden sie sich für den Interkalator Ethidium als Lochdonor.<sup>366</sup> Sie erhielten vergleichbare Strangbrucheffizienzen für DNA:RNA-Hybride und reine DNA.

Andere Versuchsaufbauten, um die Fähigkeit von RNA zur Ladungsleitung weiter zu untersuchen, wurden von *Barton* und Mitarbeitern benutzt. 2-Aminopurin ist ein fluoreszentes Basenanaloga zu Adenin, dessen Emission sensitiv auf Reduktion reagiert.<sup>338</sup> Indem sie den Lochakzeptor Guanin in den Referenzsträngen durch das strukturell ähnliche aber redoxinaktive Inosin ersetzten, konnten sie über die Fluoreszenzlöschung auf die Effizienz des Ladungstransfers schließen und dabei andere Einflussfaktoren so gut wie möglich ausschließen. Dies ergab bei bis zu drei dazwischenliegenden A-T-Basenpaaren eine schwächere Distanzabhängigkeit bei DNA:RNA-Hybriden als bei DNA und somit effizienteren Ladungstransfer über weitere Distanzen, was der größeren Flexibilität von RNA zugeschrieben wurde.

Zu dem gleichen Ergebnis kam die Gruppe auch bei elektrochemischen Untersuchungen.<sup>308</sup> Auf einer Goldelektrode wurden thiolmodifizierte Oligonucleotide aufgebracht, in die das redoxaktive Methylenblau interkalierte. Über die Elektrode und damit zwangsläufig durch die Doppelhelix wurde dieses reduziert. Auf diese Weise konnten die Leitfähigkeiten von B-DNA, DNA:RNA-Hybriden, des A-Typs und Z-DNA miteinander verglichen werden. Die Z-Form stellte das schlechteste Medium für Elektronentransfer da. Aufgrund der Struktur stapeln die Basen dieses Typs äußerst

schlecht, was dieses Ergebnis plausibel macht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Interkalator nicht mit der langgestreckten Doppelhelix wechselwirkt. Auch hier sind die Hybride die besten Leiter, vermeintlich Dank ihrer strukturellen Beweglichkeit.

In neuerer Zeit hat die Gruppe von Yamana Pyren für reduktiven Elektrontransfer durch reine RNA benutzt.<sup>367</sup> Sie modifizierte jeweils Uridin in der 2'-Position mit Pyren als Elektronendonator bzw. Nitrobenzol als Elektronenakzeptor und variierte ihren Abstand (bis zu 28 Å). Als Maß für Elektronenwanderung diente die Fluoreszenzlöschung des Polyaromaten. Sie erhielt eine duale Distanzabhängigkeit, eine steile für kurze Distanzen (< 10 Å) und eine flachere für lange (> 10 Å). Dies wurde auf einen Wechsel des Mechanismus von Superaustausch zu Hopping zurückgeführt. Ein Vergleich mit DNA hinsichtlich der Effektivität des Ladungstransfers blieb aber aus.<sup>367</sup>

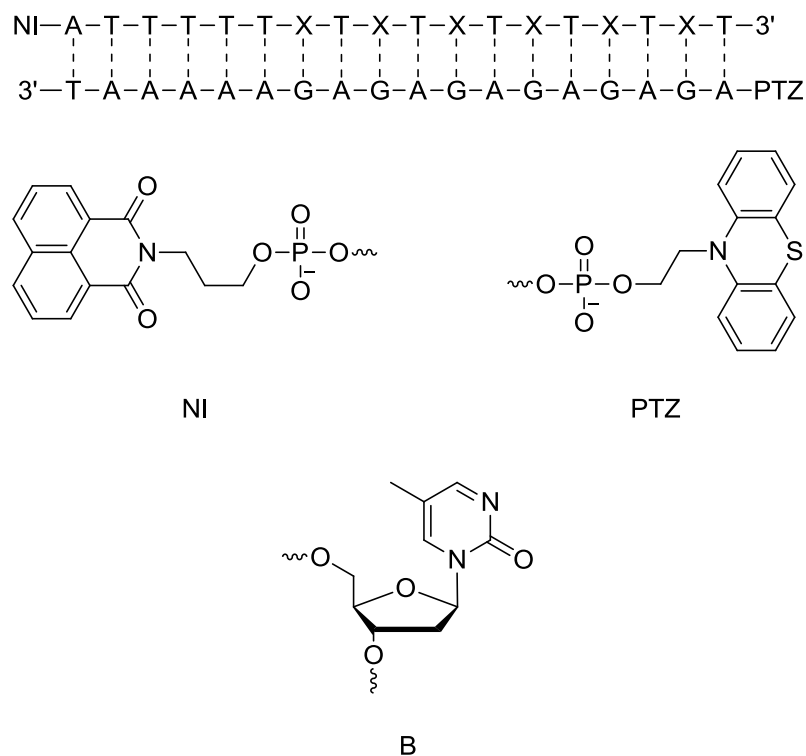
Dies folgte anhand der Kombination von Pyren mit BrdU.<sup>368</sup> Die Ergebnisse für RNA waren mit der vorangegangenen Arbeit vergleichbar. DNA wies für kurze Abstände eine größere Distanzabhängigkeit auf, aber ab vier dazwischenliegenden Basenpaaren ließ sich fast keine BrdU-Spaltung mehr nachweisen. Die Autoren machen dafür die Interkalation des Pyrens verantwortlich, die in Ribonukleinsäure nicht erfolgt. Der photooxidierte Donor bildet mit einem angrenzendem Pyrimidin ein Kontaktionpaar, was dazu führt, dass das Elektron nicht in den Basenstapel injiziert wird, sondern es zu einer sehr schnellen Ladungsrekombination kommt.

### Ladungstransfer in LNA

Die erste Verwendung von zu mindestens einem LNA-Nukleotid in einer DNA Doppelhelix zu Ladungstransferzwecken fand in dem elektrochemischen Versuchsaufbau (s. vorangegangener Abschnitt) von Barton statt.<sup>369</sup> Das modifizierte DNA-Oligonukleotid leitete den Strom schlechter, als der Referenzstrang. Die daraus gefolgerte Störung im Basenstapel bewegte sich in der Größenordnung wie sie von Basenfehlpaarungen hervorgerufen wird. Boon et al. gehen davon aus, dass das LNA-Nukleotid eine Kreuzung zwischen B-DNA und A-DNA hervorruft und die Basenstapelung behindert. Um dies zu bestätigen, führten sie das gleiche Experiment in DNA:RNA-Hybriden, die schon vorwiegend in der A-Konformation vorliegen, durch. Wie erwartet, ergab sich hier kein Abfall der Leitfähigkeit und somit auch keine Störung im Basenstapel.

Kawai et al. untersuchten erst kürzlich Lochtransfargeschwindigkeiten mit transienter Absorption in LNA-modifizierter DNA.<sup>370</sup> Sie benutzten einen Photosensitizer (NI, s.

Abb. 86) und Phenotiazin (PTZ) als Akzeptor. Das Loch wandert schneller durch sich wiederholende G-A-Sequenzen als durch G-T-Einheiten, was die Gruppe auf ähnliche HOMO-Lagen von G und A, als von G und T zurückführt. Sie erhielten in allen Duplexen mit LNA geringere Transfargeschwindigkeiten. Bei vollständiger Verwendung von LNA in der G-T- bzw. G-A-Region wird der Ladungstransfer gänzlich unterbrochen. Dies führten sie auf die Versteifung des Rückgrats zurück, da die Gleichgewichtskonformation der DNA nicht die optimale für Ladungstransfer ist. Zur Untermauerung dieser These verwendeten sie auch noch das Cytidinanalogon 5-Methyl-2'-desoxyzebularin (B), das nur zwei Wasserstoffbrücken zu Guanosin ausbildet und so zu einer flexibleren Doppelhelix führt. Die erhöhte Lochtransfargeschwindigkeit bestätigte die Vermutung, dass die Beweglichkeit des DNA-Doppelstrangs den Ladungstransport erheblich beeinflusst.



**Abb. 86:** Photosensitizer NI, Lochakzeptor PTZ, 5-Methyl-2'-desoxyzebularin B und exemplarische DNA-Sequenz; X = B oder LNA-Nukleotid

## 5.2 2PydU als artifizielles Nukleotid in DNA

### 5.2.1 Synthese des 2PydU Bausteins

2PydU wurde prinzipiell nach einer Vorschrift von *Claudia Wanninger-Weiß* synthetisiert.<sup>49</sup> Die Verknüpfung des Pyrens mit dem Nukleosid erfolgte über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung. Der Schlüsselschritt dabei ist die Borierung des Aromaten an der 2-Position. Diese erfolgte nach einer Vorschrift von *Miyaura*<sup>371-372</sup> und *Perutz*<sup>373</sup> mit einem Iridium(I)/2,2'-Bipyridin-Komplex.

Zur Aktivierung des Pyrens erfolgte die Borierung mit Bispinacolatdiboran ( $B_2pin_2$ ) und dem bereits erwähnten Iridium(I)/2,2'-Bipyridin-Komplex. Als Iridium(I)-Quelle dient hier Bis(1,5-cyclooctadien)diiridium(I)dimethanolat ( $[Ir(OMe)COD]_2$ ) und das Additiv bestand aus 4,4'-Di-*tert*-butyl-2,2'-dipyridyl (dtbpy). Trotz zahlreicher Variationen von Temperatur und Katalysatormenge gelang es nicht, die Ausbeute an Borolan **21** über 28 % zu steigern. Dies liegt zum einen am sehr reaktionsträgen Edukt als auch an der Bildung eines doppelt borierten Nebenprodukts.

Das kommerziell erhältliche 5-Iod-2'-Desoxyuridin (IdU) wurde zuerst, anders als bei der zitierten Vorgehensweise, an der 5'-Position mit der für die DNA-Synthese gebräulichen 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe versehen. Durch die Verwendung von nur 1,1 eq. 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) erfolgte die Reaktion selektiv an der 5'-Position des Zuckers und man erhielt 89 % des Nukleosids **22**.

Die Suzuki-Kupplung erfolgte in Dimethylethylenglykol (DME), mit Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphin)ferrocen]palladium(II)dichlormethanaddukt ( $Pd(dppf)_2Cl_2$ ) als Katalysator und Natriumhydroxid als Base. Aufgrund der geschützten 5'-OH-Gruppe ließ sich das Uridinderivat **23** viel besser säulenchromatographisch reinigen als mit freier Hydroxygruppe, sodass eine Ausbeute von 55 % erzielt werden konnte.

Um das Nukleosid in der automatisierten DNA-Synthese nach der Phosphoramiditmethode<sup>96</sup> verwenden zu können, musste die 3'-OH-Gruppe mit 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (CED-Cl) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) aktiviert werden. Dies gelang mit einer sehr guten Ausbeute von 91 %.

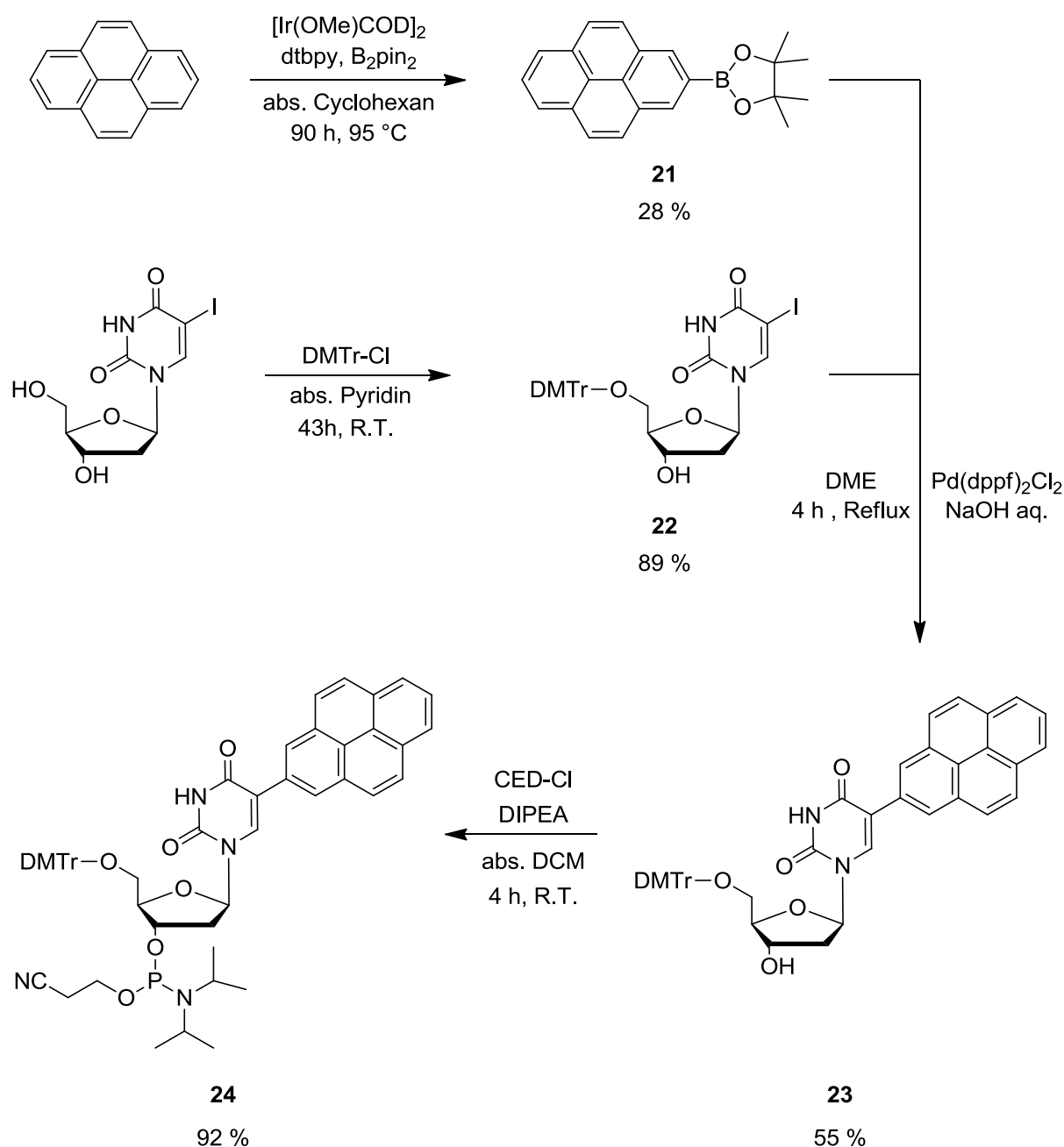


Abb. 87: Syntheschema von des 2PydU-DNA-Bausteins **24**

### 5.2.2 Synthese von 2PydU-modifizierter DNA

Die Synthese von Oligonukleotiden verschiedener Sequenzen erfolgte nach der Phosphoramiditmethode (vgl. 3.1.4).<sup>96</sup> Artificielle Nukleoside mit 5-Modifikation erwiesen sich dabei als sehr gute Substrate, sodass dass lediglich die Konzentration des 2PydU in Acetonitril auf 0,1 M erhöht wurde und das Kupplungsprotokoll für Thymin verwendet wurde. Die Einbaueffizienz war ausgezeichnet, wie der Tritylmonitor zeigte.

### 5.2.3 Charakterisierung von 2PydU in DNA

Um die Eigenschaften von Oligonukleotiden mit 2PydU als Modifikation genauer zu beleuchten, wurden folgende DNA-Stränge synthetisiert (s. Abb. 88):

2PydU befindet sich in der Mitte von vier 17meren, die sich jeweils in den Nachbarbasen unterscheiden. Diese Oligonukleotide wurden jeweils mit vier Gegensträngen hybridisiert, um den Einfluss der gegenüberliegenden Base zu untersuchen.

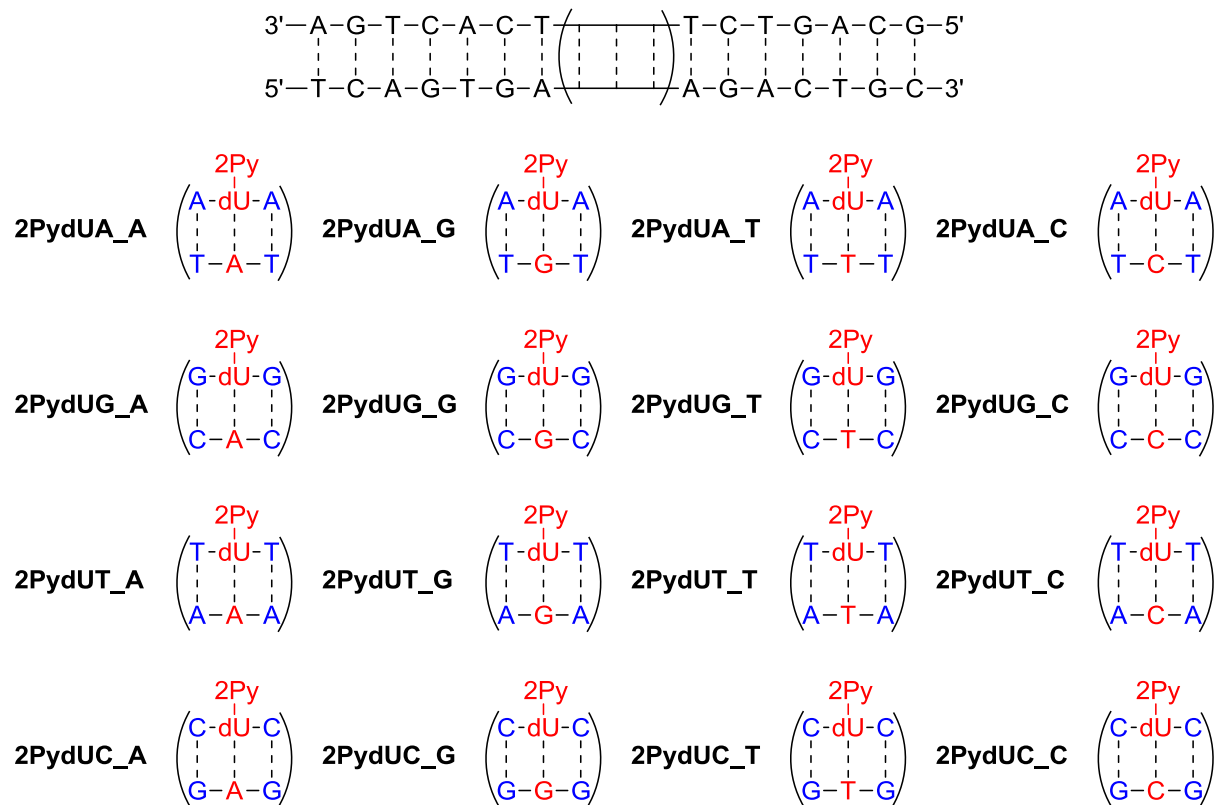


Abb. 88: DNA-Sequenzen mit verschiedenen Nachbar- und Gegenbasen zu 2PydU

### Schmelztemperaturanalyse

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Pyren an der 5-Position des 2'-Desoxyuridin auf die Stabilität der verschiedenen Doppelstränge hat, wurden Schmelztemperaturen gemessen. Die Referenz bilden dabei Stränge mit der gleichen Sequenz und einem Thymidin anstelle des artifizielles Nukleotids.

Wie erwartet, besitzen die DNA-Duplexe mit G oder C als Nachbarbase die höheren Schmelztemperaturen, aufgrund des höheren G-C-Gehalts (s. Tab. 4). Es lässt sich jedoch keine Präferenz für A als Gegenbase feststellen. 2PydU destabilisiert die richtig gepaarten Oligonukleotide bis zu  $-6^\circ\text{C}$ , ein normaler Wert für solch große Modifikationen an der 5-Position, während insbesondere die Fehlpaarungen mit T und C im Vergleich zu den Referenzsträngen stabilisiert werden. Es ist denkbar, dass sich das Nukleosid in syn-Position dreht und somit das Pyren den Duplex durch eine Wech-

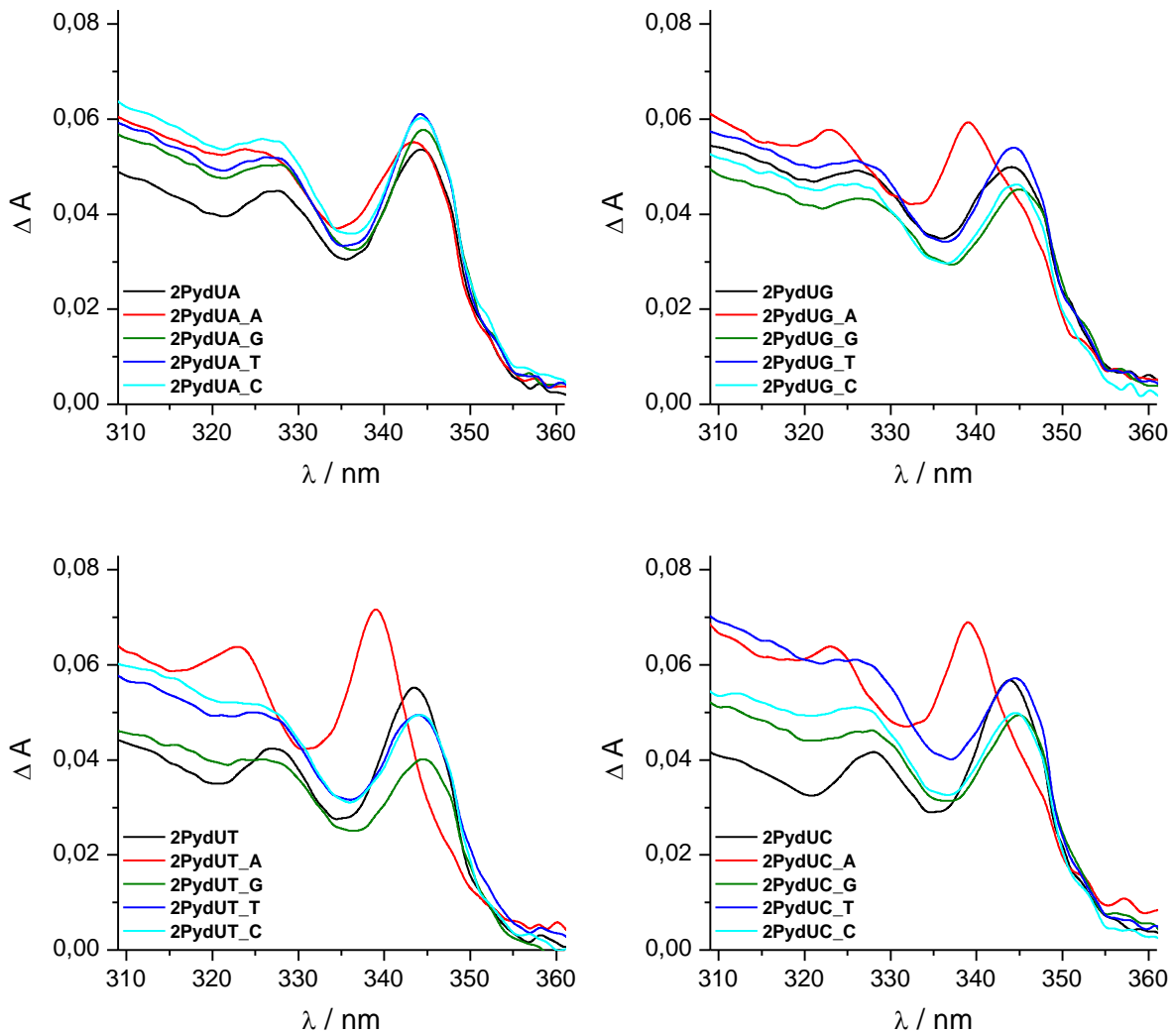
selwirkung mit den Basen stabilisiert. Dies könnte bei diesen Sequenzen energetisch vorteilhafter sein, weil sich weder die passenden Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können noch die Größenkomplementarität gegeben ist. Diese Hypothese wurde durch UV/Vis-Absorptionsspektroskopie genauer untersucht

**Tab. 4:** Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) von **2PydUX<sub>2</sub>Y** (X, Y = A, G, T, C);  $\Delta T_m$ : Unterschied der Schmelztemperaturen von Probe und Referenz (2,5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, 250 mM NaCl); n. b. nicht bestimmt

Duplex	$T_m /$ °C	Referenz- $T_m /$ °C	$\Delta T_m /$ °C	Duplex	$T_m /$ °C	Referenz- $T_m /$ °C	$\Delta T_m /$ °C
<b>2PydUA_A</b>	57,5	61,0	-3,5	<b>2PydUG_A</b>	64,3	68,0	-3,7
<b>2PydUA_G</b>	57,7	n. b.		<b>2PydUG_G</b>	61,2	63,8	-2,6
<b>2PydUA_T</b>	58,3	n. b.		<b>2PydUG_T</b>	61,8	60,3	+1,5
<b>2PydUA_C</b>	59,2	n. b.		<b>2PydUG_C</b>	64,3	58,3	+6,0
<b>2PydUT_A</b>	56,9	62,5	-5,6	<b>2PydUC_A</b>	60,3	66,0	-5,7
<b>2PydUT_G</b>	55,3	55,0	+0,3	<b>2PydUC_G</b>	61,3	n. b.	
<b>2PydUT_T</b>	56,2	53,2	+3,0	<b>2PydUC_T</b>	62,6	n. b.	
<b>2PydUT_C</b>	58,1	52,8	+5,3	<b>2PydUC_C</b>	61,8	n. b.	

### UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

In den Spektren (s. Abb. 89) ist nur der Bereich der langwelligen Pyrenabsorption dargestellt. Alle untersuchten Oligonukleotide besitzen ein nicht gezeigtes absolutes Maximum bei 260 nm, das durch die Absorption der natürlichen Basen dominiert wird. 2PydU besitzt in allen Doppel- und Einzelsträngen eine typische pyrenähnliche Feinstruktur mit zwei lokalen Maxima.<sup>50</sup> Dies ist der  $S_2 \leftarrow S_0$ -Übergang, der von HOMO und LUMO, die keine Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte an der 2-Position des Polyaromaten besitzen, bestimmt wird. Dies bedingt die starke Ähnlichkeit der Absorption hinsichtlich energetischer Lage und Struktur zu unsubstituiertem Pyren. Der energetisch niedriger liegende  $S_1 \leftarrow S_0$ -Übergang ist symmetrieverboten und weist daher nur einen sehr geringen Extinktionskoeffizient auf.<sup>337</sup> Auffällig ist die hypsochrome Verschiebung von **2PydUG\_A**, **2PydUT\_A**, **2PydUC\_A** und auch bei **2PydUA\_A** ist sie noch sehr leicht vorhanden. Während das langwelligste Maximum bei den anderen Proben bei 344 und 345 nm liegt, befindet es sich hier bei 339 nm bzw. 343 nm (s. Tab. 5).



**Abb. 89:** Absorptionsspektren von **2PydUX** und **2PydUX<sub>Y</sub>** (X, Y = A, G, T, C) (2,5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, 250 mM NaCl)

Um dies genauer zu betrachten, wurden alle Einzelstränge und richtig gepaarten Duplexe noch einmal zusammen in einem Diagramm aufgetragen (s. Abb. 90).

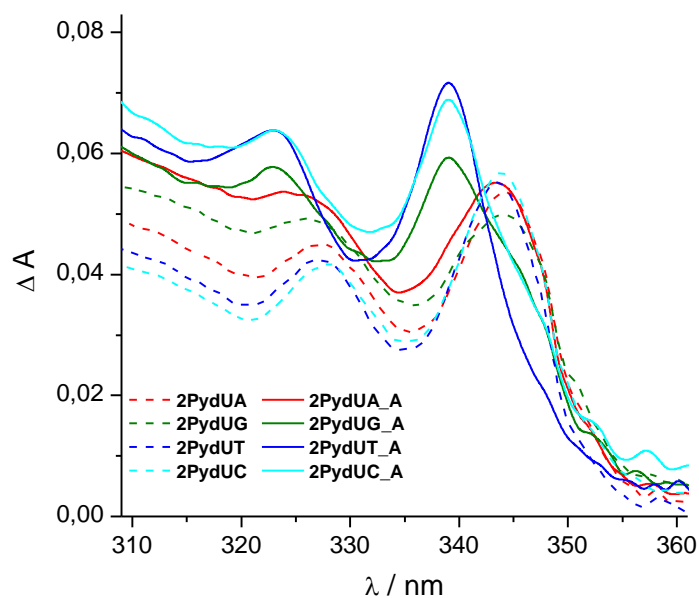
Während sich die Absorptionen der Einzelstränge so gut wie nicht unterscheiden, kann man eine stetig wachsende Blauverschiebung des  $S_2 \leftarrow S_0$ -Übergangs der Doppelstränge beobachten. **2PydUA<sub>A</sub>** hat nur eine kurzwelligere Schulter bekommen, aber bei den anderen drei Proben ist das Maximum schon deutlich hypsochrom verschoben. **2PydUG<sub>A</sub>** und **2PydUC<sub>A</sub>** zeigen auch eine Schulter, die jedoch bathochrom verschoben ist.

Die unterschiedlichen Absorptionen lassen auf unterschiedliche Wechselwirkungen des Pyrens mit seiner Umgebung schließen. Aufgrund der rigiden Anknüpfung an die DNA ist eine Umorientierung des Chromophors nur in sehr begrenztem Maße möglich.



**Tab. 5:** Wellenlängen ( $\lambda_{\max}$ ) des  $S_2 \leftarrow S_0$ -Übergangs von **2PydUX** und **2PydUX\_Y** (X, Y = A, G, T, C) (2,5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , 250 mM  $\text{NaCl}$ )

Duplex	$\lambda_{\max}$ / nm	Duplex	$\lambda_{\max}$ / nm
<b>2PydUA</b>	344	<b>2PydUG</b>	344
<b>2PydUA_A</b>	343	<b>2PydUG_A</b>	339
<b>2PydUA_G</b>	344	<b>2PydUG_G</b>	345
<b>2PydUA_T</b>	344	<b>2PydUG_T</b>	344
<b>2PydUA_C</b>	344	<b>2PydUG_C</b>	345
<b>2PydUT</b>	343	<b>2PydUC</b>	344
<b>2PydUT_A</b>	339	<b>2PydUC_A</b>	339
<b>2PydUT_G</b>	345	<b>2PydUC_G</b>	345
<b>2PydUT_T</b>	344	<b>2PydUC_T</b>	345
<b>2PydUT_C</b>	343	<b>2PydUC_C</b>	345



**Abb. 90:** Absorptionsspektren von **2PydUX** und **2PydUX\_A** (X = A, G, T, C) im Vergleich (2,5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , 250 mM  $\text{NaCl}$ )

Eine Änderung des Drehwinkels zwischen Pyren und Base hätte keinerlei Auswirkungen auf die Lage der Absorption, weil, wie schon erwähnt, die beiden Systeme entkoppelt sind. Also bleibt nur noch ein Kippen des Nukleosids, damit das Pyren mit den Nachbarbasen eine Wechselwirkung eingehen kann, oder die Drehung in die

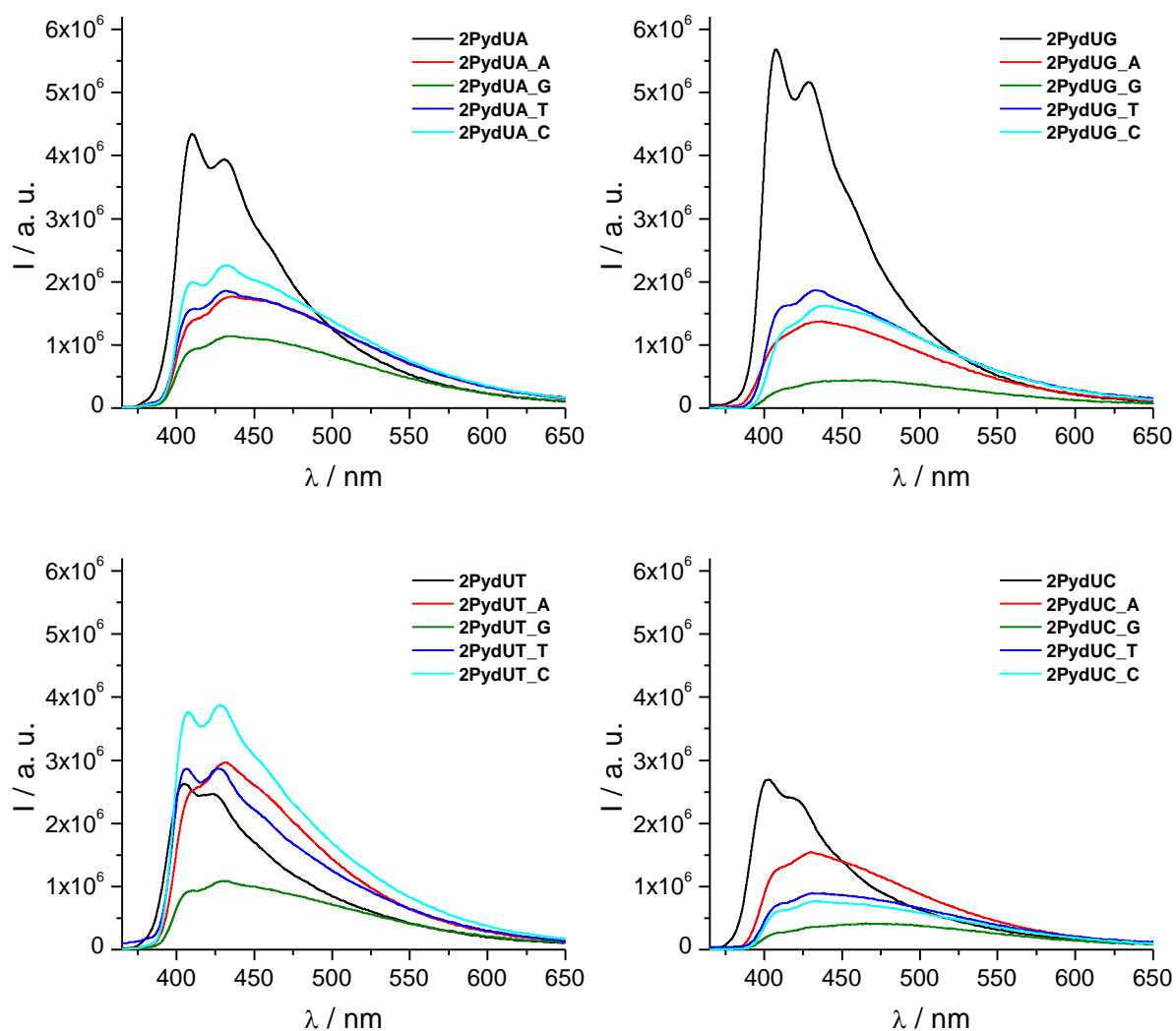
syn-Position. Das so ermöglichte Stapeln mit den Nachbarbasen stabilisiert die Fehlpaarung und bedingt das rotverschobene Absorptionsspektrum. Nur wenn die Möglichkeit zur Ausbildung der richtigen Watson-Crick-Paarung besteht, richtet sich das 2PydU wahrscheinlich so aus, dass das Pyren in die große Furche ragt und keine wesentliche Wechselwirkung direkt mit der DNA eingeht. **2PydA\_A** bildet mit seinem Verhalten eine Ausnahme. In diesem Duplex befindet sich die Modifikation in einem alternierenden A-T-Bereich, die dafür bekannt sind, in erhöhtem Maße Hoogsten-Paarungen auszubilden.<sup>180</sup> Es ist also denkbar, dass sich hier die Gegenbase in syn-Konfiguration befindet und die Wechselwirkung des Pyrens mit den Basen energetisch besser ist, also die Ausbildung des Hoogsten-Basenpaars.

### Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren (s. Abb. 91) wurden mit einer Anregungswellenlänge von 345 nm aufgenommen, da hier die Absorptionen am vergleichbarsten sind.

Zu sehen ist der  $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang, da nach der Anregung in den  $S_2$ -Zustand eine interne Konversion in den energetisch niedrigeren erfolgt. Während die Absorption von HOMO und LUMO bestimmt wird, setzt sich die Fluoreszenz aus einer Linearkombination der Übergänge  $LUMO+1 \rightarrow HOMO$  und  $LUMO \rightarrow HOMO-1$  zusammen, sodass die Emission nicht mehr als isoliertes Pyren betrachtet werden kann, da  $LUMO+1$  und  $HOMO-1$  an der 2-Position Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte besitzen.<sup>337</sup> Dies geht auch deutlich aus den Fluoreszenzspektren hervor, da sie im Vergleich zu freiem Pyren deutlich rotverschoben und unstrukturierter sind.<sup>50</sup>

Die weitere Interpretation der Daten gestaltet sich äußerst schwierig, weil keine systematischen Trends zu erkennen sind, außer, dass Guanin als Gegenbase die Emission löscht. Dies könnte auf einen oxidativen Lochtransfer vom Pyren auf die am leichtesten oxidierbare Base zurückzuführen sein. Eigentlich sollte dies bei PydU nicht möglich sein (vgl. 5.1.5), aber da davon ausgegangen wird, dass das Pyren direkt mit dem Basenstapel wechselwirkt, erscheint es doch plausibel.



**Abb. 91:** Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$ ) von **2PydUX** und **2PydUX<sub>Y</sub>** (X, Y = A, G, T, C) (2,5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaPi}$ , 250 mM  $\text{NaCl}$ )

Weitere Mutmaßungen erscheinen sinnlos, da die Fluoreszenzintensität offensichtlich nicht nur von Ladungstransferprozessen bestimmt wird. Wie schon erläutert, gibt es im  $S_1$ -Zustand eine Wechselwirkung zwischen Pyren und Thymidin, sodass die Fluoreszenzintensität sowohl von der Orientierung des Chromophors zu der Base als auch zu der Doppelhelix abhängt. So wird sich die Emission stets aus einem strukturierten Anteil des isolierten Pyrens und einem strukturlosen Anteil, der aus der Wechselwirkung des polyzyklischen Moleküls mit seiner Umgebung resultiert, zusammensetzen.

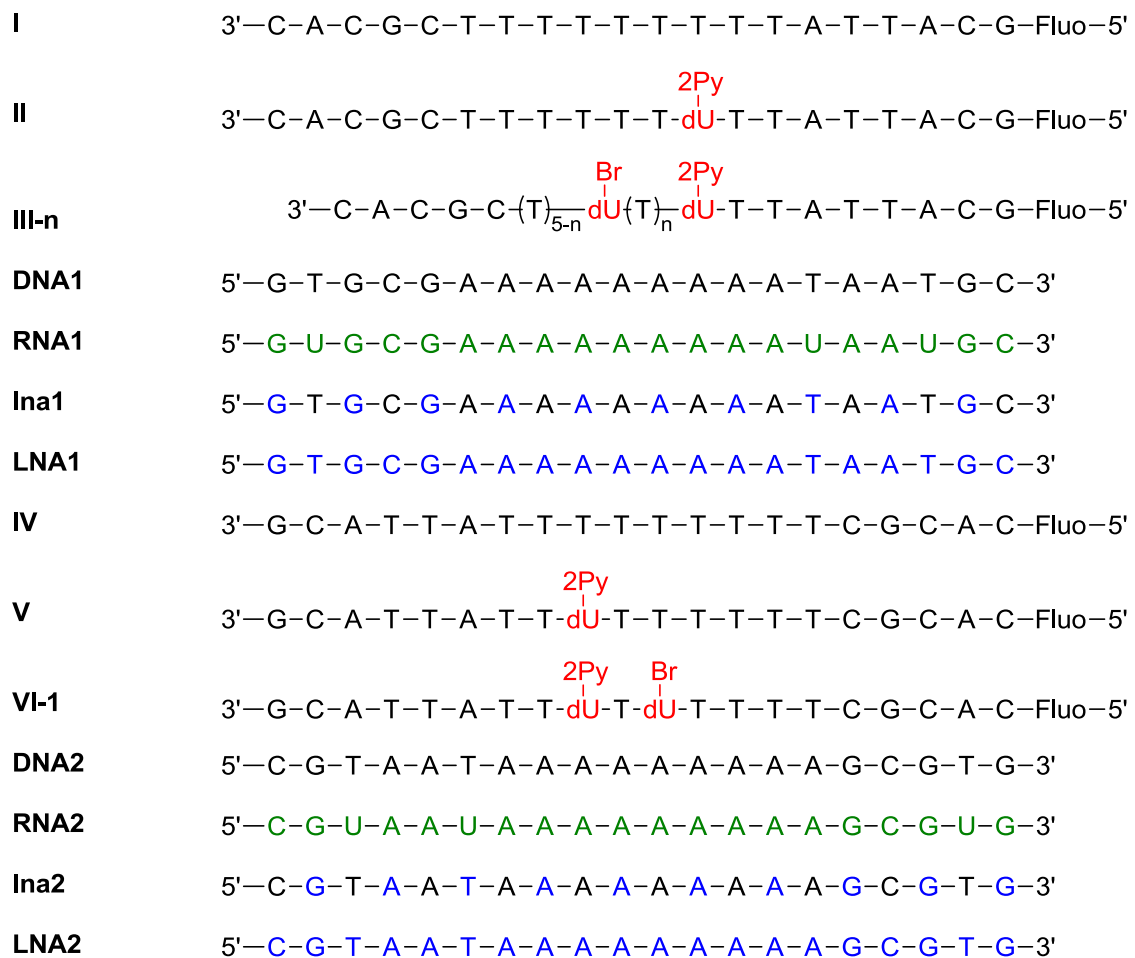
Die Sequenzvariationen haben deutlich gezeigt, dass Fluoreszenzlöschung im Falle von 2PydU kein Maß für Elektronentransfer ist, da zu erwarten gewesen wäre, dass vor allem Thymidin als am leichtesten zu reduzierende Base die Emission erniedrigt, aber das Gegenteil war der Fall.

#### 5.2.4 2PydU als Elektronendonator in verschiedenen Nukleinsäuren

Wie schon erläutert, wurde in neueren Untersuchungen gezeigt, dass RNA Elektronen besser leitet als DNA (vgl. 5.1.8). Ob dieses Verhalten wirklich nur auf die größere Beweglichkeit der Ribonukleinsäure zurückzuführen ist oder nicht doch die A-Konformation mit ihrer besseren Stapelung einen Anteil daran hat, ist fraglich, zudem frühere Experimente auch andere Resultate ergaben.

LNA:DNA-Hybride sind RNA:DNA-Hybriden strukturell sehr ähnlich, jedoch mit einem entscheidenden Unterschied: Durch den Henkel ist LNA rigider als DNA und RNA, sodass dies eine Untersuchung des Einflusses der A-Konformation auf Ladungstransferprozesse erlaubt. Der Vergleich des Elektronentransfers von DNA, RNA:DNA und LNA:DNA wird Rückschlüsse zulassen, inwiefern Flexibilität und Konformation der Doppelhelix diesen beeinflussen.

Wie aus den vorangegangenen Experimenten hervorgeht, ist 2PydU prinzipiell ein geeigneter Elektronendonator für die Untersuchung von Ladungstransfer in Nukleinsäuren, nur die Fluoreszenzlöschung ist als Maß für Elektronentransfer in diesem Fall völlig unzureichend. Transiente Absorption wäre die analytische Methode, um Elektronentransfergeschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Sie ist jedoch apparativ sehr aufwändig und sagt nichts über Transfereffizienzen aus, sodass die Detektion über eine irreversible chemische Reaktion gewählt wurde. BrdU ist mit einem Normalpotential von  $-1,8 \text{ V}^{374}$  als Elektronenakzeptor in Kombination mit Pyren geeignet ( $E(\text{Py}^{\bullet+}/\text{Py}^{\bullet}) = -1,9 \text{ V}$  gegen NHE). Die Spaltreaktion ist schnell genug, um Unterschiede in der Elektronentransfereffizienz aufzulösen<sup>344</sup> und das Phosphoramidit dieses Bausteins ist kommerziell erhältlich, weshalb es als Elektronenakzeptor ausgewählt wurde. Da Thymin als primäre Ladungsträger beim reduktivem Elektronentransfer fungieren,<sup>46-47,375</sup> wurden vier verschiedene DNA-Stränge (**III-n**;  $n = 0-4$ ) mit 0 bis vier Ts zwischen Donor und Akzeptor synthetisiert (s. Abb. 92), um die Distanzabhängigkeit in 5'-3'-Richtung zu bestimmen. Zusätzlich wurde noch ein weiterer zur Untersuchung der Richtungsabhängigkeit (**VI-1**) hergestellt. Die Gesamtlänge der Oligonukleotide wurde dabei nicht verändert, um die Schmelztemperaturen besser vergleichen zu können. Als Referenzstränge dienten zwei nur mit 2PydU modifizierte Stränge (**II** und **V**) und zwei ohne Donor und Akzeptor (**I** und **IV**). Fluoreszein (vgl. 7.3.2) am 5'-Ende diente als fluoreszenter Marker für die Quantifizierung auf dem Polyacrylamidgel.



**Abb. 92:** Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung des Ladungstrfers in verschiedenen Nukleinsäuren; n = 0-4; Schwarz: DNA; Blau: RNA; Grün: LNA; Fluo: Fluoreszeinmarker

Wie schon erläutert (vgl. 5.1.6), führt die Elektronenaufnahme bei BrdU zu einem Strangbruch. Die DNA-Stücke können mit Hilfe eines Fluoreszenzimagers auf einem Polyacrylamidgel quantifiziert und mit dem Elektronentransfer in Korrelation gesetzt werden. Diese DNA-Stränge (**I**, **III**, **III-n**, **IV**, **V**, **VI-1**) wurden jeweils mit vier unterschiedlichen Gegensträngen, bestehend aus DNA (**DNA1** und **DNA2**), RNA (**RNA1** und **RNA2**), 50 % LNA (**Ina1** und **Ina2**) und reiner LNA (**LNA1** und **LNA2**) hybridisiert.

### Schmelztemperaturanalyse

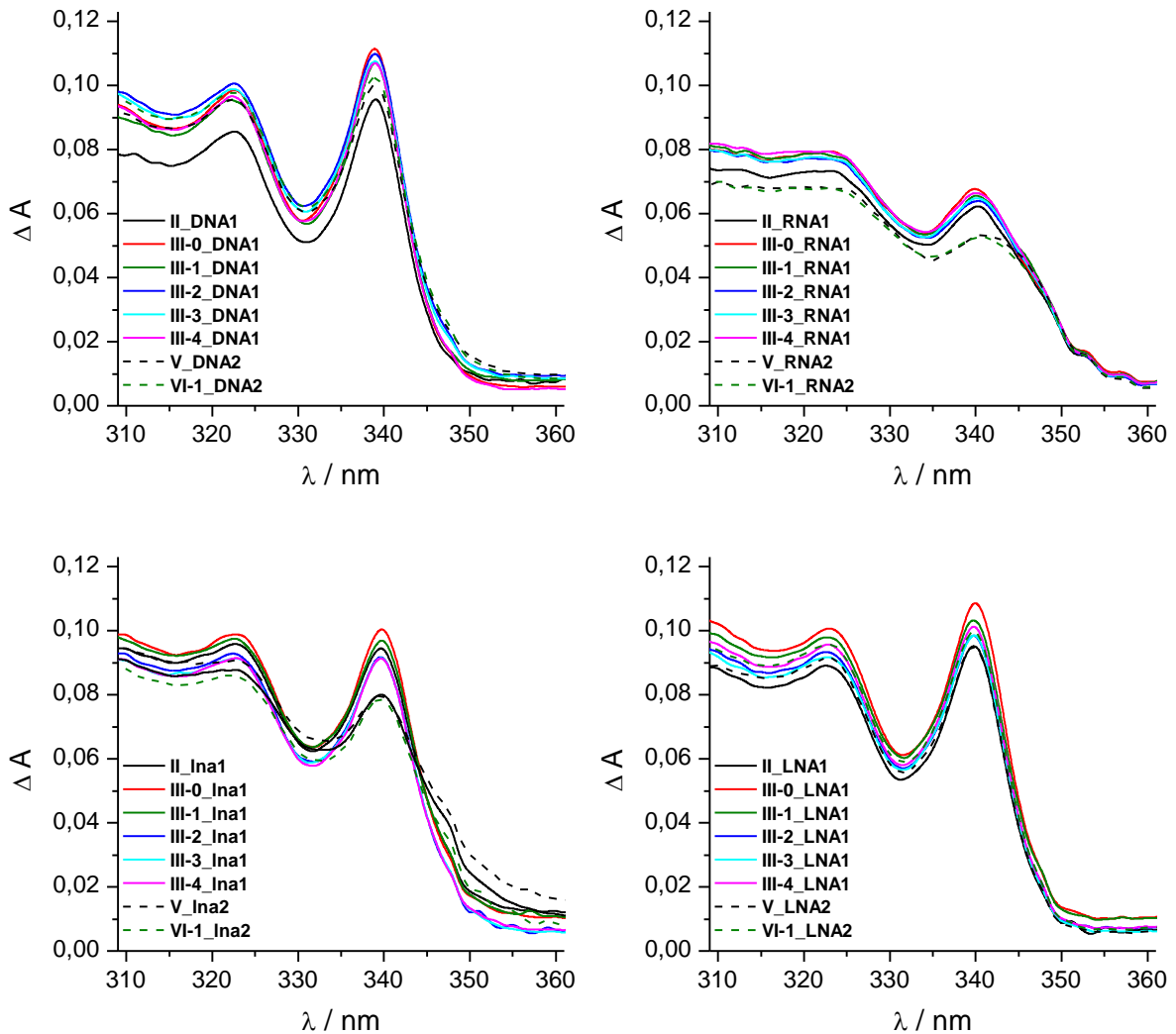
Zuerst wurden die Schmelztemperaturen der Duplexe bestimmt (s. Tab. 6).

**Tab. 6:** Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) von **I** bis **VI** mit den unterschiedlichen Gegensträngen (**DNA**, **RNA** und **Ina**) (2,5  $\mu$ M, 10 mM NaP<sub>i</sub>, 250 mM NaCl)

Duplex	$T_m / ^\circ\text{C}$	Duplex	$T_m / ^\circ\text{C}$	Duplex	$T_m / ^\circ\text{C}$
<b>I_DNA1</b>	62,9	<b>I_RNA1</b>	58,3	<b>I_Ina1</b>	75,4
<b>II_DNA1</b>	58,1	<b>II_RNA1</b>	52,8	<b>II_Ina1</b>	70,9
<b>III-0_DNA1</b>	59,2	<b>III-0_RNA1</b>	53,8	<b>III-0_Ina1</b>	71,2
<b>III-1_DNA1</b>	58,7	<b>III-1_RNA1</b>	53,5	<b>III-1_Ina1</b>	72,2
<b>III-2_DNA1</b>	58,9	<b>III-2_RNA1</b>	53,6	<b>III-2_Ina1</b>	71,0
<b>III-3_DNA1</b>	58,7	<b>III-3_RNA1</b>	53,7	<b>III-3_Ina1</b>	71,1
<b>III-4_DNA1</b>	58,8	<b>III-4_RNA1</b>	53,9	<b>III-4_Ina1</b>	72,0
<b>IV_DNA2</b>	61,4	<b>IV_RNA2</b>	56,5	<b>IV_Ina2</b>	75,9
<b>V_DNA2</b>	56,5	<b>V_RNA2</b>	50,6	<b>V_Ina2</b>	70,8
<b>VI-1_DNA2</b>	57,3	<b>VI-1_RNA2</b>	51,9	<b>VI-1_Ina2</b>	71,9

Die Werte steigen, wie erwartet, von DNA:RNA-Hybriden über DNA zu DNA:LNA-Hybriden (vgl. 5.1.7). Bei Verwendung der Gegenstränge bestehend aus 100 % LNA ist eine Dehybridisierung in Wasser nicht mehr möglich. Die Einführung des Donors verursacht in allen Doppelsträngen eine Destabilisierung von ungefähr 5 °C (**I** vs. **II** und **IV** vs. **V**). Dies steht im Einklang mit den vorangegangenen Ergebnissen (vgl. 5.2.3). BrdU hat keine weitere Erniedrigung der Schmelztemperatur zur Folge (**II** vs. **III-n** und **V** vs. **VI-1**). Die  $T_m$ -Werte aller zweifach modifizierter Duplexe bewegen sich in einem engen Temperaturbereich (57-59 °C für **DNA**; 52-57 °C für **RNA**; 71-72 °C für **Ina**), der sicherstellt, dass bei den folgenden Elektronentransferexperimenten bei Raumtemperatur ein stabiler Doppelstrang vorliegt.

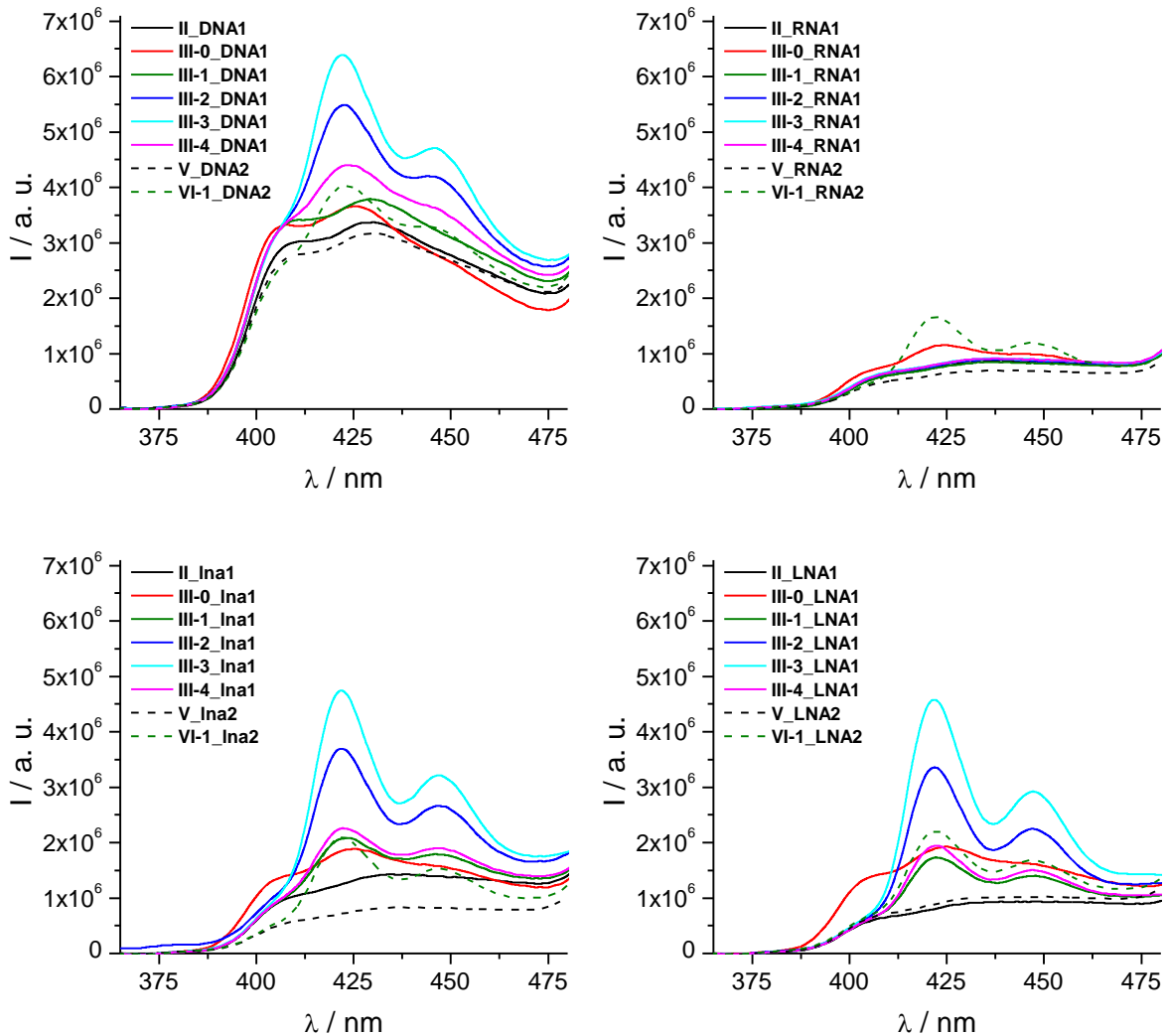
## Absorptionsspektroskopie



**Abb. 93:** Absorptionsspektren von II bis VI (2,5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , 250 mM  $\text{NaCl}$ )

Die Wellenlängen ( $\lambda_{\text{max}}$ ) des energetisch niedrigsten Maximum liegen bei allen Nukleinsäuren bei ungefähr 340 nm, sodass davon ausgegangen wird, dass sich das Pyren vorwiegend außerhalb des Basenstapels befindet und eine reguläre Watson-Crick-Basenpaarung vorliegt. Die Extinktionskoeffizienten der DNA:RNA-Hybride unterscheiden sich von den übrigen. Lediglich **V-Ina2** und **VI-1\_Ina2** zeigen dieses Verhalten ebenfalls. Auch lässt sich hier eine rotverschobene Schulter feststellen. Es scheint wohl eine erhöhte Wechselwirkung des Pyrens mit den angrenzenden Basen zu bestehen, die von der etwas lockereren RNA-Doppelhelix begünstigt wird.

## Fluoreszenzspektroskopie



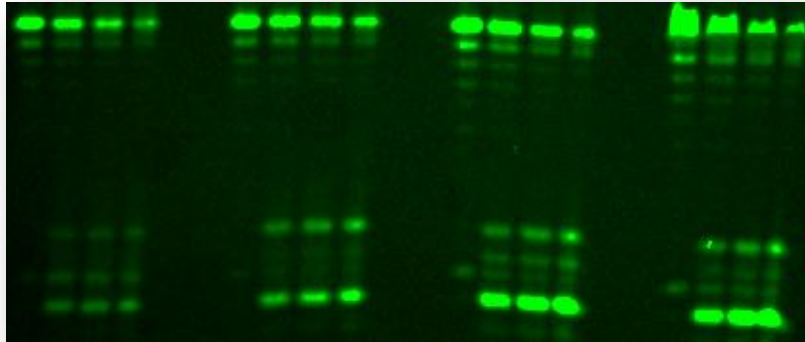
**Abb. 94** Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ) von **II** bis **VI** ( $2,5 \mu\text{M}$ ,  $10 \text{ mM NaP}_i$ ,  $250 \text{ mM NaCl}$ )

Die Ergebnisse, dass über die Fluoreszenzintensität keine Rückschlüsse auf Elektronentransfereffizienz gezogen werden können, werden hier bestätigt (s. Abb. 94). Es besteht keinerlei Zusammenhang zwischen Quantenausbeute und Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Auffällig ist auch hier das abweichende Verhalten von RNA mit der stark gelöschten Fluoreszenz des 2PydU, was sich wiederum durch eine stärkere Wechselwirkung mit den benachbarten Basen begründen lässt. Die Einführung von BrdU in direkter Nachbarschaft zu dem Donor (**III-0**) führt zu einer hypsochromen Verschiebung der Emission. Ob dies nur auf eine Umorientierung des Donors oder eine Wechselwirkung der beiden Modifikationen im angeregten Zustand (Grundzustandswechselwirkung ist aufgrund der Absorptionen auszuschließen) zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden.



### Strangbruchexperimente zur Untersuchung des Ladungstransfers

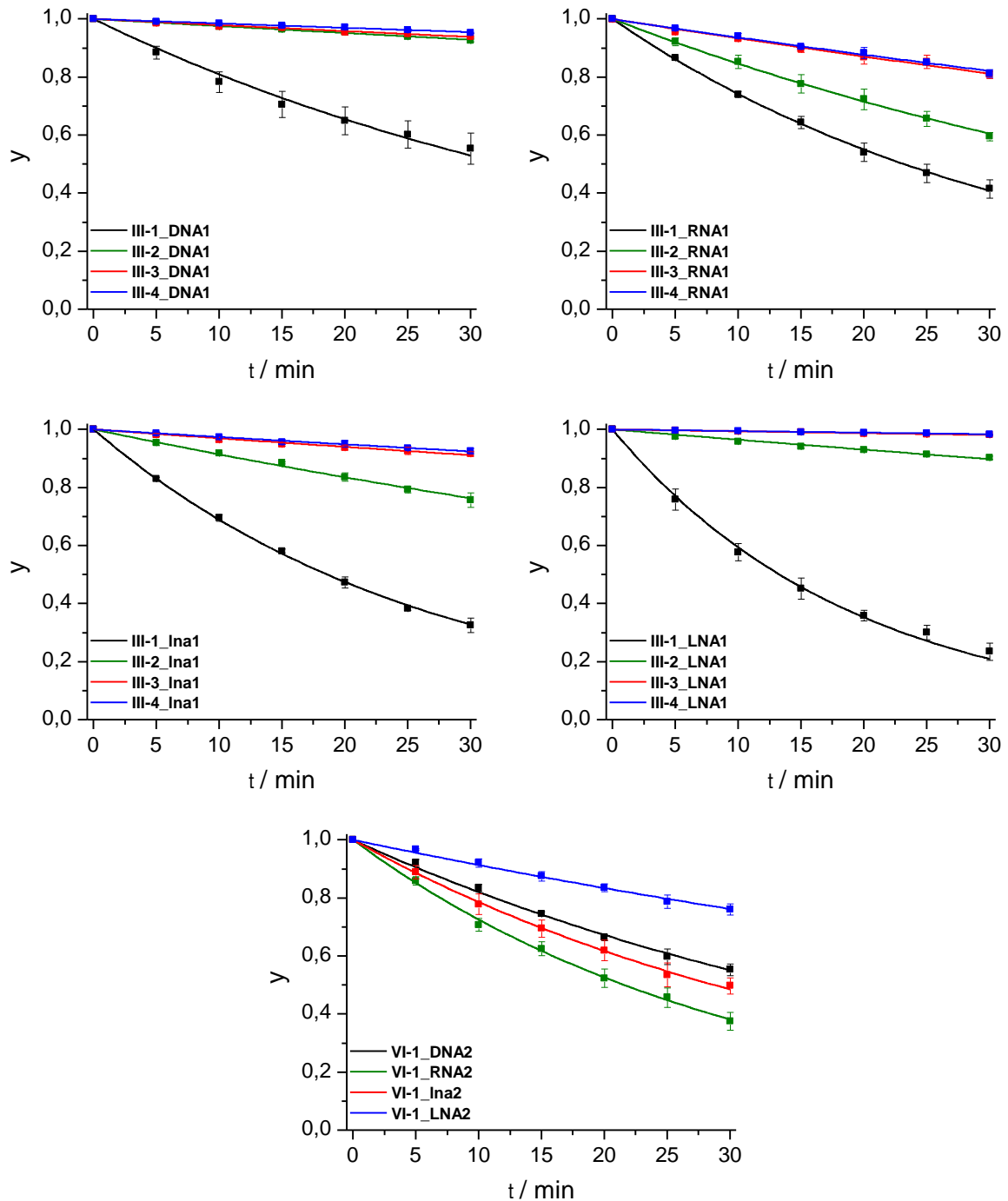
Zur Untersuchung des Ladungstransfers in den verschiedenen Doppelsträngen wurde die jeweilige Nukleotidlösung mit einer 200 W Hg/Xe-Lampe über 30 min bestrahlt. Ein 320 nm Cutoff-Filter stellte sicher, dass keine direkte Belichtung der Basen und des BrdUs erfolgte. Alle 5 min wurden Aliquoten entnommen, die nach Behandlung mit Piperidin z.T. auf ein Polyacrylamidgel gegeben wurden (s. Abb. 95).



**Abb. 95:** Polyacrylamidgel von **III-1\_DNA1**, **III-1\_RNA1**, **III-1\_Ina1**, **III-1\_LNA1** (von links nach rechts) nach jeweils 0, 10, 20 und 30 min

Mit einem Fluoreszenzimagers konnte der Anteil der Bruchstücke bestimmt werden. Alle Experimente wurden zur Erhöhung der statistischen Genauigkeit drei Mal durchgeführt, die erlangten Mittelwerte mit Standardabweichungen in Diagrammen zusammengeführt und monoexponentiell gefittet (s. Abb. 96).

Wie schon erläutert, stellt die Strangbrucheffizienz ein Maß für den Elektronentransfer zwischen 2PydU und BrdU da. Die Doppelstränge mit direkt benachbartem Donor und Akzeptor (**III-0**) zeigen keinen Strangbruch als Folge der Belichtung. Dies deutet auf einen schnellen Elektronenrücktransfer hin, der trotz kurzzeitiger lichtinduzierter Ladungstrennung eine Spaltreaktion verhindert. Dies wird durch die Fluoreszenzspektren bestätigt, da im angeregten Zustand Pyren mit BrdU eine Wechselwirkung einzugehen scheint. Sonst verhalten sich die Duplexe mit Ladungstransfer in 5'-3'-Richtung wie erwartet. Die Strangbrucheffizienz (s. Tab. 7) und damit der Ladungstransport nimmt mit größer werdendem Abstand zwischen den beiden Modifikationen ab (von **III-1** nach **III-4**). Betrachtet man den Elektronentransfer über längere Distanzen (**III-4**), zeigt nur der DNA:RNA-Hybrid mit nahezu 20 % noch eine größere Menge an Strangbruch, gefolgt von **III-4\_Ina1** mit 7 %, 5 % für reine DNA und 2 % für DNA:LNA-Hybride.



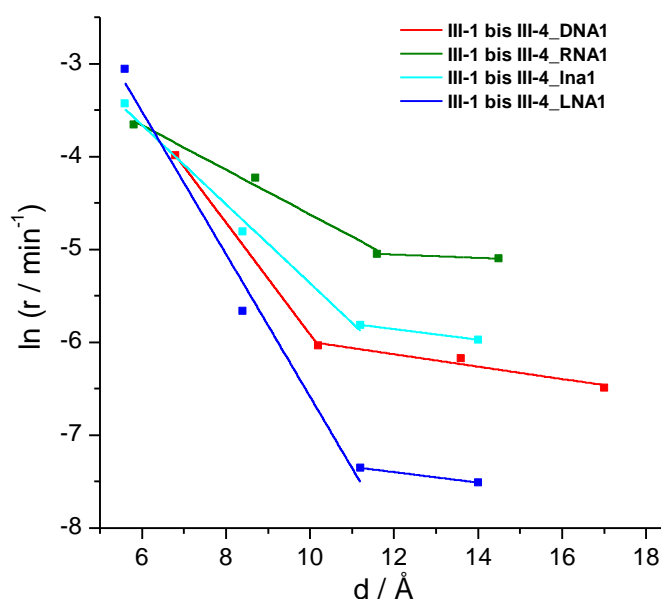
**Abb. 96:** Strangbrüche als Maß für Elektronentransfer in **III** und **VI** (1,0  $\mu$ M, 10 mM NaP<sub>i</sub>, 250 mM NaCl); y: Anteil an intaktem modifiziertem DNA-Strang

**Tab. 7:** Relative Strangbruchmenge von **III-1** bis **III-4** nach 30 min Bestrahlung

<b>Strangbruch / %</b>				
<b>Gegenstrang</b>	<b>III-1</b>	<b>III-2</b>	<b>III-3</b>	<b>III-4</b>
<b>DNA1</b>	45 $\pm$ 5	7,3 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,3
<b>RNA1</b>	58 $\pm$ 3	40 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1
<b>Lna1</b>	67 $\pm$ 3	24 $\pm$ 3	8,3 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 0,9
<b>LNA1</b>	77 $\pm$ 3	9,7 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2

Um die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers in den verschiedenen Nukleinsäuren genauer zu beleuchten, wurden Strangbruchgeschwindigkeiten  $r$  ermittelt. Dazu dienten die anfangs noch als Gerade approximierbaren exponentiellen Kurven der Belichtungsexperimente (s. Abb. 96). Die Steigungen dieser Geraden spiegeln den Elektronentransfer besser wider, als die Koeffizienten der Exponentialfunktion, weil hier der Verbrauch des 2PydU als Elektronendonator noch keine nennenswerte Rolle spielt. Trägt man diese Geschwindigkeiten logarithmisch gegen den Abstand  $d$  zwischen Donor und Akzeptor auf, erhält man ein klares Bild der Distanzabhängigkeit (s. Abb. 97).

Für reine DNA wurde ein Basenabstand von 3,4 Å angenommen, während in den Hybriden der A-Form ein deutlich kleinerer vorliegt. Die LNA-enthaltenden Oligonukleotide besitzen einen Abstand von 2,8 Å und die DNA:RNA-Hybride von 2,9 Å (vgl. 5.1.7).

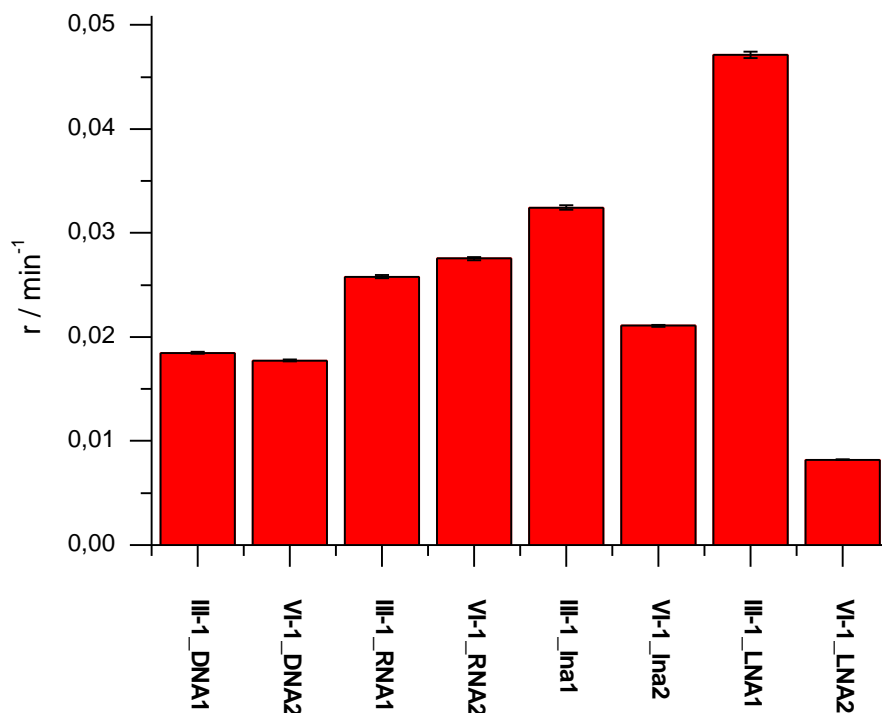


**Abb. 97:** Logarithmische Abstandsabhängigkeit der Strangbruchgeschwindigkeit  $r$  in den verschiedenen Nukleinsäuren;  $d$ : Donor-Akzeptor-Abstand

Alle Kurven zeigen eine deutliche Änderung der Steigung über 10 Å. Dieses Verhalten wurde sowohl bei oxidativem Lochtransfer,<sup>376-377</sup> als auch bei reduktivem Elektronentransfer<sup>378</sup> schon beobachtet. Es ist klar, dass dies auf einen Wechsel des Mechanismus hindeutet: Von einem sehr distanzabhängigen auf kurzen Distanzen zu einem mit flacher Distanzabhängigkeit, der bei längeren Abständen dominiert. Die Steigungen aller Kurven für größere Abstände sind sehr ähnlich. Die Unterschiede in der Elektronentransfereffizienz der verschiedenen Nukleinsäuren gehen auf die un-

terschiedlichen Distanzabhängigkeiten bei geringen Donor-Akzeptor-Abständen zurück. Wie erwartet, zeigt DNA:RNA die flachste und DNA:LNA die steilste Gerade. Dies ist größtenteils auf die unterschiedliche Beweglichkeit der Doppelhelices zurückzuführen. Wie an anderer Stelle bereits erläutert (vgl. 5.1.4), ist die Gleichgewichtskonformation von Nukleinsäuren nicht die optimale für die Ladungsleitung, sodass eine Versteifung wie in LNA den Ladungstransfer hemmt. Das erstaunliche ist aber, dass DNA:LNA-Hybride mit nur 50 % an LNA-Nukleotiden (**III-n\_Ina1**) Elektronen besser leiten als reine DNA, obwohl sie eindeutig starrer sind. Also kann die strukturelle Flexibilität nicht der einzige Grund für das Verhalten von **III-n\_RNA1** und **III-n\_Ina1** sein. Es muss auch die bessere Stapelung der Basen, wegen dem kleineren Abstand und der geringeren Verdrehung der Helix, in der A-Form dafür verantwortlich sein.

Neben der Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers in 5'-3'-Richtung wurde auch noch die Richtungsabhängigkeit untersucht. Dazu wurden die Strangbruchgeschwindigkeiten von **VI-1** mit den unterschiedlichen Gegensträngen bestimmt (s. Abb. 98)



**Abb. 98:** Strangbruchgeschwindigkeit  $r$  für **III-1** und **VI-1**

Während reine DNA und DNA:RNA-Hybride nahezu keine Richtungspräferenz aufweisen, zeigt sich bei der Beteiligung von LNA-Nukleotiden ganz deutlich eine Bevorzugung der 5'-3'-Richtung. Nukleinsäurebasen sind nicht symmetrisch, insofern ist es nicht verwunderlich, dass die Wechselwirkung des 2PydU mit seinen Nachbarba-

sen unterschiedlich ist. Diese Eigenschaft tritt natürlich bei der rigiden Struktur von LNA stärker zu Tage als in den anderen beiden Duplexen, da die Bewegung der Basen gegeneinander deutlich gehindert ist.

### 5.3 LNA – Vielversprechender Kandidat für Ladungstransfer

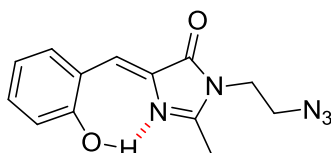
2PydU wurde als neuer photoanregbarer Elektronendonator in DNA charakterisiert. Die große Modifikation an der 5'-Position ruft zwar eine leichte Destabilisierung der Doppelhelix hervor, es wird jedoch davon ausgegangen, dass mit Adenin eine Watson-Crick-Basenpaarung vorliegt, mit Ausnahme in einer bekanntlich instabilen alternierenden A-T-Umgebung. Die Emission des Pyrens ist für die Verfolgung von Elektronentransferprozessen unbrauchbar, da sie noch von weiteren Faktoren wie Konformation beeinflusst wird. In Kombination mit BrdU als Elektronenakzeptor, der Strangbrüche induziert, ist 2PydU jedoch sehr gut zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen geeignet.

Bei der Untersuchung der Elektronentransfereffizienz in verschiedenen Nucleinsäuren zeigte sich, dass die besser stapelnde A-Helix ein geeigneteres Medium für die Leitung von Elektronen ist, als die B-Form. Eine zu starke Versteifung der Doppelhelix wirkt sich aber negativ aus. DNA:LNA-Hybride mit 50 % LNA-Nucleotide leiten Elektronen über längere Distanzen besser als DNA. Demnach könnten gezielt eingesetzte LNA-Nucleotide, in Kombination mit metallhaltigen Basensurrogaten und Chromophoren den Elektronentransfer über lange Distanzen stark verbessern. Zusammen mit dieser Eigenschaft und ihrer ausgezeichneten chemischen Stabilität, im Gegensatz zu RNA, ist LNA ein vielversprechender Kandidat für nucleinsäurebasierte Architekturen in der molekularen Nanoelektronik.

## 6 Zusammenfassung

### Fluoreszente Sonde auf Basis des GFP-Chromophors

In dieser Arbeit konnte erfolgreich eine neue azidfunktionalisierte fluoreszente Sonde für Nukleinsäuren auf der Basis des GFP-Chromophors (**1**, oGFP) (s. Abb. 99) in einer vierstufigen Synthese dargestellt werden. Die Anbindung an DNA erfolgte post-synthetisch durch eine Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition mit einem kommerziell erhältlichen 2'-O-Propargyluridin, das zuvor über die Phosphoramiditmethode in Oligonukleotide eingebracht wurde.

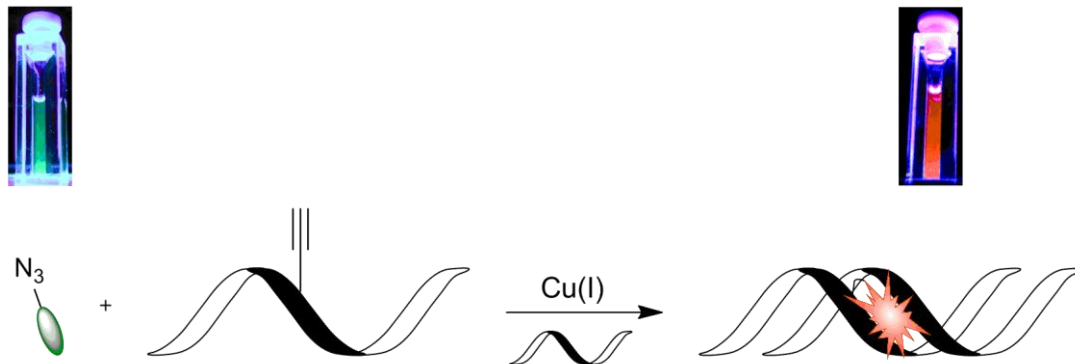


**1**

**Abb. 99:** Azidfunktionalisierte Sonde für Nukleinsäuren auf Basis des GFP-Chromophors (oGFP)

Die ortho-Position der Hydroxygruppe in Chromophor **1** ermöglicht die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zum N2 des Imidazolrings. Im angeregten Zustand kommt es zu einem intramolekularen Protonentransfer (ESIPT), der zu einer rotverschobenen Fluoreszenz führt. In Wasser wird die Wasserstoffbrücke zum Teil unterbrochen und eine duale Emission der zwei Tautomere resultiert. Nach dem Einbau des Moleküls in DNA als 2'-Modifikation wurden die Fluoreszenzspektren aller Einzel- und Doppelstränge von der bathochromen Bande dominiert. Die Wechselwirkung mit dem hydrophoben Basenstapel der DNA schirmt oGFP von der wässrigen Umgebung ab. Es resultiert eine sehr große apparente Stokes-Verschiebung von ca. 215 nm ( $9000\text{ cm}^{-1}$ ). Des Weiteren kommt es zu einer maximalen Steigerung der Emission um den Faktor 35, da der Fluorophor in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt wird. Die Fluoreszenzquantenausbeute liegt aber immer noch unter 1 % und ist damit für eine analytische Anwendung zu niedrig. Es wurde jedoch erfolgreich gezeigt, dass das Konzept eines DNA-kontrollierten ESIPT-Prozesses in einem Chromophor funktioniert. Die Kombination einer rotverschobenen Fluoreszenz mit

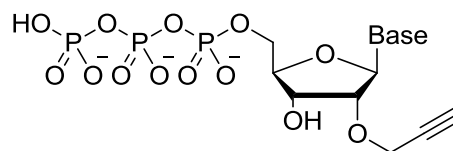
großer apparenten Stokes-Verschiebung und einer Intensitätssteigerung (s. Abb. 100) ist analytisch sehr wertvoll und könnte sich für das Design neuer fluoreszenter Nukleinsäuresonden als äußerst nützlich erweisen.



**Abb. 100:** Neues Konzept für fluoreszente Sonden: DNA-kontrollierte ES IPT-Prozesse

### 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate

Für die erfolgreiche Synthese von vier neuen bioorthogonalen Triphosphaten (s. Abb. 101) zur postsynthetischen Modifizierung von DNA dienten die kommerziell erhältlichen 2'-O-Propargylnukleoside (pNs) der natürlichen Basen. Die Ludwig-Methode lieferte dabei sehr gute Ausbeuten.



Base:     U = 22 % **9**    G = 35 % **10**  
            A = 14 % **11**    C = 20 % **12**

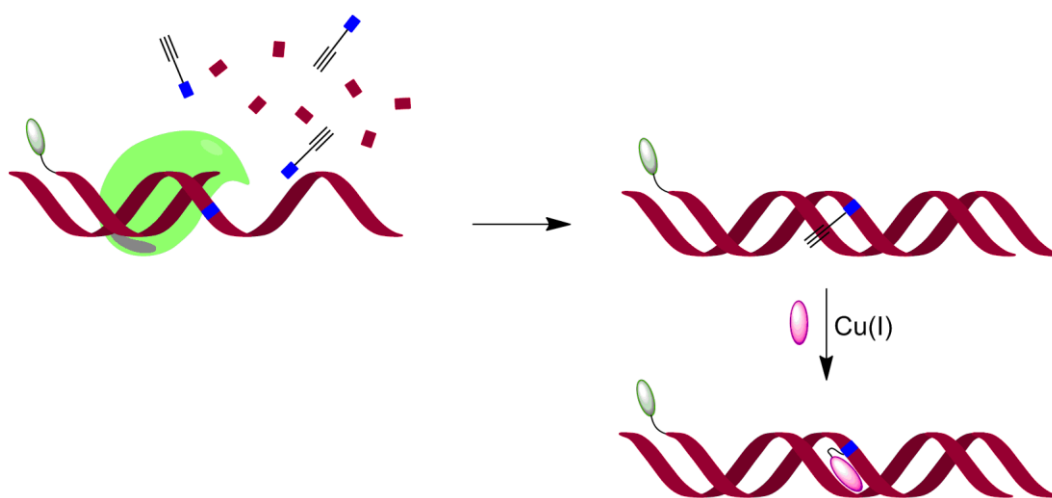
**Abb. 101:** Neue bioorthogonale Triphosphate: 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate

2'-modifizierte Nukleosidtriphosphate werden nur schwer von DNA-Polymerasen als Substrate akzeptiert, weil die meisten Enzyme ein sterisches Tor besitzen, um die Umsetzung von RNA-Bausteinen zu verhindern. Es gelang trotzdem in Primerverlängerungsexperimenten eine geeignete Polymerase zu finden. Hohe Konzentrationen an Terminator III und lange Reaktionszeiten ermöglichen den Einbau von pU, pA und z.T. pG in DNA und die anschließende Verlängerung des Primers mit natürlichen Triphosphaten. Allerdings ist unter diesen Bedingungen das Anfügen weiterer Nucleotide an den Primer über die Länge des Templates hinaus nicht zu vermeiden.



Die enzymatisch hergestellten 2'-propargylmodifizierten Oligonukleotide wurden erfolgreich mit dem Nilrotazid **13** in einer Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Zykloaddition umgesetzt (s. Abb. 102).

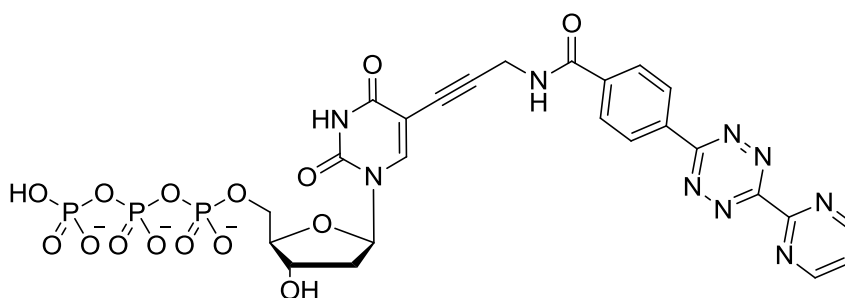
Diese neuen bioorthogonalen Triphosphate erlauben es nun auch große Reste an das Zuckerrückgrat von langer DNA zu binden. Die 2'-Position erlaubt, anders als z.B. die 5-Position an 2'-Desoxyuridin, eine Wechselwirkung zwischen Modifikation und Basen und war bisher in DNA nur über die Phosphoramiditmethode, die auf ca. 100 Nukleotide beschränkt ist, für größere Moleküle zugänglich.



**Abb. 102:** Enzymatische DNA Synthese mit 2'-O-Propargylnucleosidtriphosphat und anschließende CuAAC mit Nilrotazid **13**

### 5-Tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxyuridin

Es ist in dieser Arbeit gelungen ein neues bioorthogonales Triphosphat für die unkatalsierte Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf zu entwickeln und zu synthetisieren (s. Abb. 103). Das als Dien fungierende 1,2,4,5-Tetrazin wurde an die 5-Position von 2'-Desoxyuridin gebunden, um bei der späteren Umsetzung durch DNA-Polymerasen möglichst nicht zu stören. Die anschließende Triphosphatsynthese erfolgte nach der Ludwig-Methode.



**19**

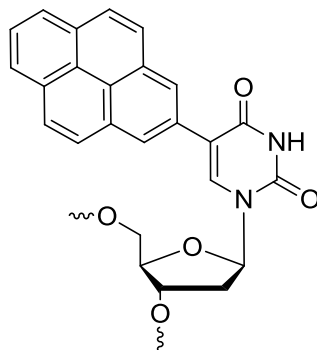
**Abb. 103:** 5-tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxyuridintriphosphat

Da der Tetrazinrest des modifizierten Nucleosids basenempfindlich ist, war es nötig den pH-Wert bei den Primerverlängerungsexperimenten zu ändern. Alle drei verwendeten Enzyme, Deep Vent (exo-), Vent (exo-) und Hemo KlenTaq waren fähig das Triphosphat als Substrat zu erkennen und in DNA einzubauen. Für die präparative Synthese eines artifiziellen Oligonucleotids wurde die Hemo KlenTaq verwendet. Es erfolgte eine Umsetzung mit dem cyclooctinmodifiziertem Rhodamin 3G **20** in einer inversen Diels-Alder-Reaktion, nach der nur wenig Produkt nachgewiesen werden konnte. Eine Verlängerung der Reaktionszeit und eine Erhöhung der Cyclooctinkonzentration brachten keine Verbesserung. Wahrscheinlich hat sich das Tetrazin vor oder während der [4+2]-Zykloaddition zersetzt.

Trotz der Schwierigkeiten bei der Diels-Alder-Reaktion, hat das neue Nucleosid Potential für die postsynthetische Modifizierung von DNA. Es ist einfach in guten Ausbeuten zu synthetisieren und wird als Substrat von DNA-Polymerasen erkannt.

### 2PydU als Elektronendonator in verschiedenen Nucleinsäuren

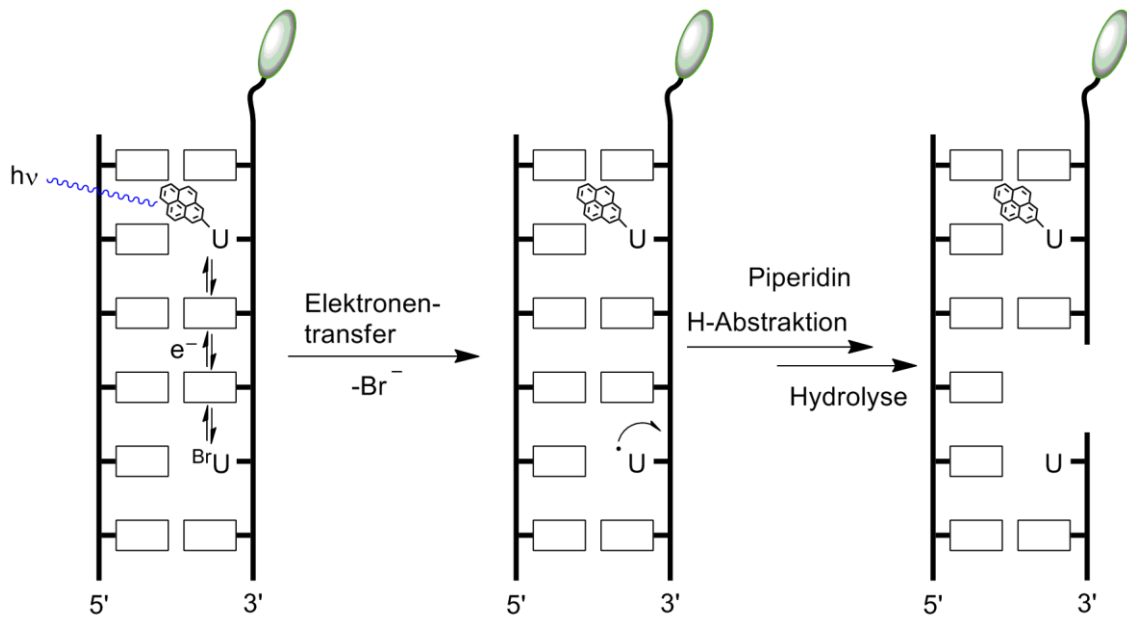
Bevor 2PydU (s. Abb. 104) als Donor in Elektronentransferexperimenten verwendet wurde, fand eine Charakterisierung des Bausteins in DNA statt.



**Abb. 104:** Elektronendonator 2PydU für den photoinduzierten reduktiven Elektronentransfer in Nucleinsäuren

Trotz einer leichten Destabilisierung der Doppelhelix durch die Modifikation an der 5-Position, kann von einer Watson-Crick-Basenpaarung mit Adenin ausgegangen werden, ausgenommen in einer bekanntlich instabilen alternierenden A-T-Umgebung.

Die Emission des Pyrens ist für die Verfolgung von Elektronentransferprozessen unbrauchbar, da sie noch von weiteren Faktoren wie Konformation beeinflusst wird. In Kombination mit BrdU als Elektronenakzeptor, der Strangbrüche induziert, zeigte sich 2PydU jedoch als sehr gut geeignet zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen (s. Abb. 105).



**Abb. 105:** Schematische Darstellung des Elektronentransfers von 2PydU zu BrdU mit anschließender Abspaltung von Bromid und piperidininduziertem Strangbruch

Der Vergleich von verschiedenen Nucleinsäuren hinsichtlich ihrer Elektronentransfereffizienz, ergab eindeutig, dass die A-Helix mit ihrer besseren  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung ein geeigneteres Medium für die Leitung von Elektronen darstellt, als die B-Form. Gleichzeitig wirkt sich aber eine zu starke Versteifung der Doppelhelix negativ aus. Der gezielte Einsatz von LNA-Nucleotiden hatte aber einen positiven Effekt auf die Ladungstransfereigenschaft der DNA. Dies könnte z.B. in Kombination mit metallhaltigen Basensurrogaten und Chromophoren der Schlüssel zu effizienterem Elektronentransfer über lange Distanzen sein. Des Weiteren besitzt LNA eine ausgezeichnete chemische Stabilität, im Gegensatz zu RNA, was sie zu einem vielversprechenden Kandidat für nucleinsäurebasierte Architekturen in der molekularen Nanoelektronik macht.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Materialien und Geräte

#### Reagenzien

Die bei der Synthese und den Experimenten verwendeten Reagenzien und Edukte wurden von den Firmen *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck*, *Riedel-de Haën*, *ABCR*, *Carl Roth*, *VWR*, *ChemGenes*, *Glen Research* und *Sigma Aldrich* bezogen.

#### Lösungsmittel

Bei Synthesen verwendete Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe p.A. (pro analysi). Für die Säulenchromatographie fanden technische Lösungsmittel Anwendung. Bei der HPLC kamen hochreine organische Lösungsmittel (LiChrosolv, Merck) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore* Entsalzungsanlage zum Einsatz.

#### Inertgas

Reaktionen mit Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden unter Stickstoffatmosphäre (Reinigung über BTS-Katalysator, Sicapent und Orangegel) bzw. unter Argonatmosphäre (Argon 5.0) durchgeführt.

#### Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* verwendet. Die Beschichtung bestand aus 60 F<sub>254</sub> Kieselgel mit einer Schichtdicke von 0,25 mm. Visuelle Auswertung erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei  $\lambda = 254$  nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei  $\lambda = 366$  nm. Chemische Auswertung erfolgte bei DMTr-geschützten Substanzen durch Anfärben mit Schwefelsäure (3%) in Methanol. Für Amine wurde Ninhydrin-Reagenz nach Stahl und für Triphosphate Anisaldehydlösung verwendet. Zum Erwärmen diente ein Heißluftfön.

- Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als stationäre Phase diente meist Kieselgel 60 Å der Firma *Sigma Aldrich* mit einer Korngröße von 35-70 µm. Die Säulen wurden nass gepackt und nach dem von *Still* beschriebenen Verfahren<sup>379</sup> mit einem Überdruck von 0,5 bar betrieben. Die zu reinigende Substanz wurde entweder im Laufmittel gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert aufgetragen.

- Automatisierte Flash-Säulenchromatographie

Die automatisierte Säulenchromatographie wurde an einem *IntelliFlash 310* System der Firma *Varian* durchgeführt.

Die Ionentauschersäule mit DEAE Sephadex A-25 als stationäre Phase wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL/min betrieben. Als Laufmittel diente ein Gradient von 0,1 M Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (TEAB) bis 1,0 M TEAB pH 7,5. Die RP-18-Säule (*Lobar 310-25 LiChroprep* RP-18 40-63 µm) wurde mit einem Gradienten aus 50 mM Triethylammoniumacetatpuffer (TEAA) pH 7,0 und Acetonitril betrieben (10 mL/min).

- Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Es wurde ein HPLC-System von *Shimadzu* mit einer analytischen *Supelcosil LC-318* Säule (25 cm x 4,6 mm, *Supelco*) zur Trennung von bis zu 5 nmol DNA und einer semipräparativen *Supelcosil LC-318* Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm, *Supelco*) zur Trennung von größeren Mengen verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten aus 50 mM Ammoniumacetat pH 6,5 (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) innerhalb von 45 min. Für **2PydUX** und die enzymatisch synthetisierte DNA betrug der Gradient 0-15 % B, bei allen anderen Oligonukleotiden 0-20 % B. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 1,0 mL/min in der 4,6 mm Säule und 2,5 mL/min in der 10 mm Säule eingestellt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 290 nm für alle DNA-Stränge. Zusätzlich wurden noch die Wellenlängen der Absorptionsmaxima der verschiedenen Modifikationen verwendet: 378 nm für oGFP und MeoGFP, 490 nm für Fluoreszein und 340 nm für 2PydU.

### Lyophilisation

Wässrige Lösungen wurden an der Gefriertrocknungsanlage *Alpha 1- 2 LD Plus* von *Christ* nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff oder in einem Vakuumkonzentrator (*Christ Alpha RVC*) getrocknet.

### DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese erfolgte an einem *Expedite Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems*. Das Gerät wurde mit Argon als Schutzgas betrieben. Als Träger dienten CPGs mit 1  $\mu\text{mol}$  Belegung (500 Å) von *Proligo Reagents*. Weitere Chemikalien für die Festphasensynthese stammten ebenfalls von *Proligo Reagents*.

### Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren der Substanzen des 1. Kapitels und der DNA-Stränge **2PydUX** wurden durch die Zentrale Analytik der *Universität Regensburg* mit folgenden Geräten aufgenommen:

- ESI-MS: *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000*
- CI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*.

Die Massenspektren der anderen DNA-Oligonukleotide wurden an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* mit der Matrix 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (0,3 M in EtOH) und Diammoniumcitrat (0,1 M in H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 2:1 gemessen.

Die Massen der Substanzen aus Kapitel 2 wurden an diesen Spektrometern bestimmt:

- ESI-MS: *Agilent 6230 TOF LC/MS*
- ESI-MS: *Varian MS 1200-L*.

Die Angaben erfolgen in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks.

### NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln mit 5 mm Probenröhrchen gemessen. Die Spektren von **1-6** wurden an den Spektrometern

- *Bruker Avance 300* und
- *Avance 400*

durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik der *Universität Regensburg* aufgenommen. Alle anderen Messungen wurden in der NMR-Abteilung des *Instituts für Organische Chemie* am *KIT* durchgeführt mit folgenden Geräten:

- *Bruker AC 250*
- *Bruker Avance 300*
- *Bruker Avance 400*
- *Bruker Avance DRX 500*.

Chemische Verschiebungen  $\delta$  werden in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz dient das Signal des unvollständig deutierten Lösungsmittels. Kopplungskonstanten  $J$  werden in Hz angegeben.

### Optische Spektroskopie

Alle Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, in Quarzglasküvetten (Starna) mit einer Dicke von 1 cm, bei einer Temperatur von 20 °C und ständiger Spülung des Probenraums mit Stickstoff oder Druckluft.

- Absorption

UV/Vis-Spektren wurden in einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit Temperatureinheit gemessen. Die Spektren wurden gegen die Absorption des Lösungsmittels hintergrundkorrigiert.

Folgende Messparameter wurden verwendet: SBW: 2,0 nm, Average time: 0,1 s, Data interval: 1,0, Light source change over 350 nm.

Schmelztemperaturmessungen erfolgten analog über einen Temperaturbereich von 20-90 °C. Die Temperatur am Start- bzw. Endpunkt wurde jeweils 5 min konstant gehalten. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0,7 °C/min.

Die photometrische Konzentrationsbestimmungen der unverdünnten Stammlösungen wurden an einem *NanoDrop 1000* durchgeführt.

- Fluoreszenz

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem *Fluoromax-3* Fluorimeter von *Jobin-Yvon* mit einem Peltier-Element *LFI-3751* zur Temperatursteuerung von *Wavelength Electronics* durchgeführt. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung hintergrundkorrigiert.

Die Quantenausbeuten der Chromophore **1** und **2** wurden mit Perylen als Standard bestimmt. Die Intensität des Anregungslichtes bei Perylen wurde mit einem Neutralglasfilter auf 0,1 % reduziert. Im Falle der modifizierten DNA wurde Zink(II)-5,10,15,20-tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphyrinat als Standard verwendet und die Intensität des Anregungslichtes auf 26,4 % reduziert.

Folgende Messparameter wurden verwendet: Increment: 1,0 nm, Increment time: 0,2 s, Slit: An die jeweilige Probe angepasst, sodass  $10 \cdot 10^6$  counts nicht überschritten wurden.

### **Thermo-Cycler**

Die Primerverlängerungsexperimente wurden in einem *TGradient Thermal Cycler* mit einem Silberblock für 96 0,2 mL Reaktionsgefäße von *Biometra* durchgeführt

### **Gelektrophorese**

Die hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgele wurden in einer *Sequi-Gen GT Sequencing Cell* (38×50 cm) mit einem *PowerPac HV* von *Bio-Rad* bei 50 °C und 120 W durchgeführt. Die Gele enthielten 12 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 8,3 M Harnstoff, 2 mM EDTA pH 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure. Als Puffer diente TBE (8,3 M Harnstoff, 2 mM EDTA, pH 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure).

### **Fluoreszenzimager**

Die Polyacrylamidgele wurden mit einem *Stella 8300* Fluoreszenzimager von *Raytest* ausgelesen. Die Anregung von Fluoreszein, Rhodamin 3G oder Nilrot erfolgte von oben mit verschiedenen LEDs und Anregungsfiltern: 470±20 nm, 540±10 nm oder 630±10 nm. Die Emission wurde mit einer auf -20 °C gekühlten CCD-Kamera detektiert, wobei entsprechende Emissionsfilter (535±20 nm, 605±10 nm, 700±17,5 nm) verwendet wurden.

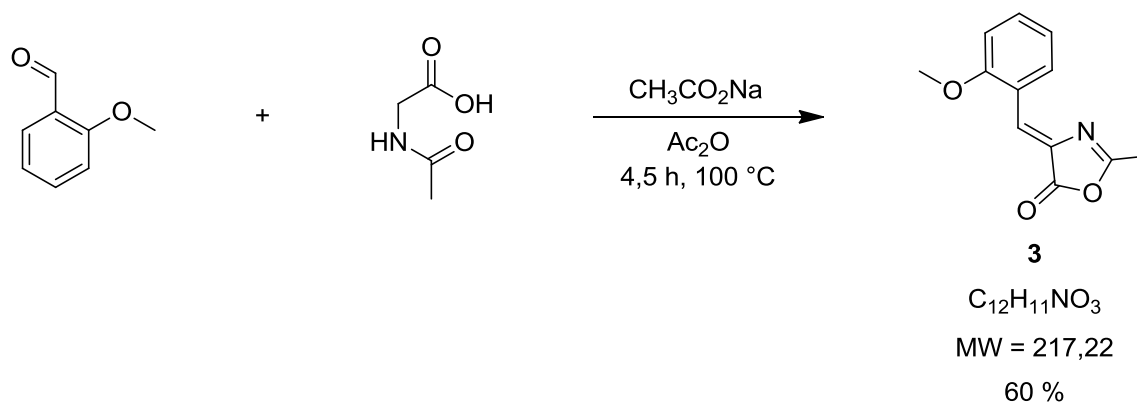
Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der *Aida Image Analyzer v.450* Auswertesoftware von *Raytest*. Für die Quantifizierung wurde der *1D Multi Labeling* Modus verwendet.



## 7.2 Synthesevorschriften

### 7.2.1 oGFP-Chromophore

#### 4-(2-Methoxybenzyliden)-2-methyloxazol-5(4H)-on (**3**)



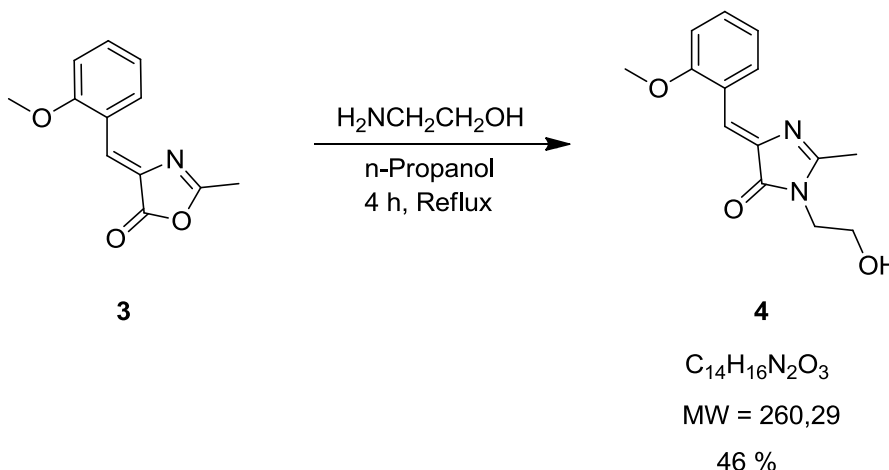
*o*-Anisaldehyd (14,0 mL, 15,8 g, 116 mmol, 1,00 eq.), *N*-Acetylglycin (14,0 g, 120 mmol, 1,03 eq.) und wasserfreies Natriumacetat (10,7 g, 130 mmol, 1,12 eq.) in Essig-säureanhydrid (47 mL, 51,0 g, 500 mmol) wurden 4,5 h bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Mischung auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 50 mL Eiswasser. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Auf diese Weise konnten 15,2 g (70 mmol, 60 %) des Azlactons **3** gewonnen werden.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2,35 (s, 3 H,  $CH_3C$ ), 3,85 (s, 3 H,  $CH_3O$ ), 6,87 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1 H, ArH), 6,99 (t,  $J$  = 7,6 Hz, 1 H, ArH), 7,32–7,38 (m, 1 H, ArH), 7,71 (s, 1 H,  $HC=C$ ), 8,56–8,60 (m, 1 H, ArH).

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 15,6 ( $CH_3C$ ), 55,6 ( $CH_3O$ ), 110,7 (ArCH), 120,9 (ArCH), 122,2 (ArCC), 125,7 ( $HC=C$ ), 131,8 ( $HC=C$ ), 132,5 (ArCH), 132,8 (ArCH), 159,1 (C–O), 165,5 (C=N), 168,0 (C=O).

CI-MS:  $m/z$  (%) = 217,1 (29) [ $M^{+}$ ].

HRMS (EI-MS):  $m/z$  [ $M^{+}$ ] berechnet für  $C_{12}H_{11}NO_3$ : 217,0739; gefunden: 217,0740.

**1-(2-Hydroxyethyl)-4-(2-methoxybenzyliden)-2-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-on (4)**


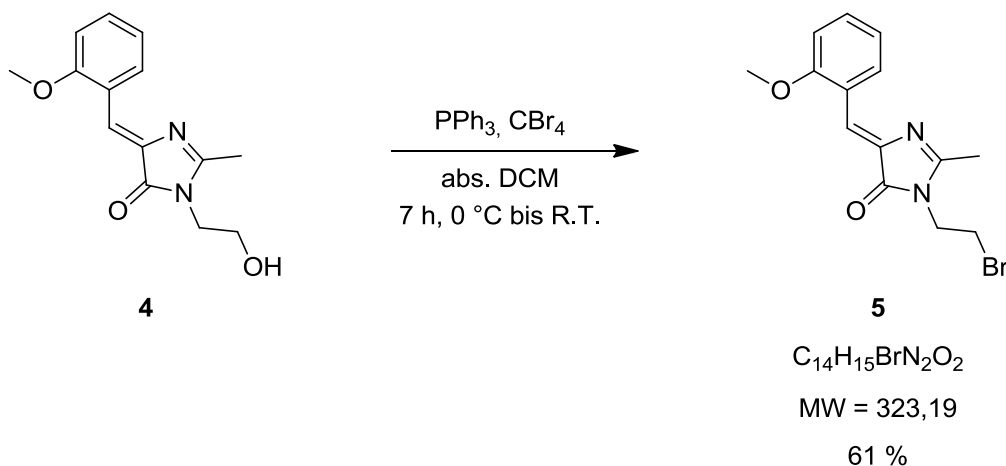
Zu einer Lösung des Azlactons **3** (5,00 g, 23 mmol, 1,00 eq.) in abs. n-Propanol (23 mL) wurden 1,52 mL (1,55 g, 25 mmol, 1,10 eq.) Ethanolamin gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 h unter Reflux gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Pentanol und Diethylether umkristallisiert. 2,78 g (10 mmol) des gelben Imidazolons **4** ergaben 46 % Ausbeute.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 2,44 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3,69–3,78 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ ), 3,91 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 6,98–7,04 (m, 2 H, ArH), 7,36–7,42 (m, 1 H, ArH), 7,57 (s, 1 H,  $\text{HC}=\text{C}$ ), 8,55–8,58 (m, 1 H, ArH).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 15,8 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 44,4 ( $\text{CH}_2$ ), 56,3( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 60,7 ( $\text{CH}_2$ ), 111,9 (ArCH), 121,7 (ArCH), 122,3 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 124,0 (ArCC), 133,3 (ArCH), 133,9 (ArCH), 139,0 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 160,6 (C–O), 165,5 (C=N), 172,4 (C=O).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 261,0 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

HRMS (EI-MS):  $m/z$   $[\text{M}^{++}]$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ : 260,1161; gefunden: 260,1161.

**1-(2-Bromethyl)-4-(2-methoxybenzyliden)-2-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-on (5)**

Der Alkohol **4** (600 mg, 2,3 mmol, 1,00 eq.) wurde in 23 mL abs. DCM unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre gelöst. Nachdem der Ansatz auf 0 °C gekühlt wurde, versetzte man mit  $\text{PPh}_3$  (670 mg, 2,5 mmol, 1,10 eq.) und nach 10 min mit  $\text{CBr}_4$  (920 mg, 2,8 mmol, 1,20 eq.) Nach 7 h Rühren bei R.T. wurden weitere 670 mg (2,5 mmol, 1,20 eq.)  $\text{PPh}_3$  und 920 mg (2,8 mmol, 1,2 eq.)  $\text{CBr}_4$  zugegeben. Nach weiteren 1,5 h entfernte man das Lösungsmittel unter vermindertem Druck und reinigte den Rückstand über Flash-Chromatographie mit DCM/Aceton 5:1. Man erhielt 460 mg (1,4 mmol, 61%) des orangenen Feststoffs **5**.

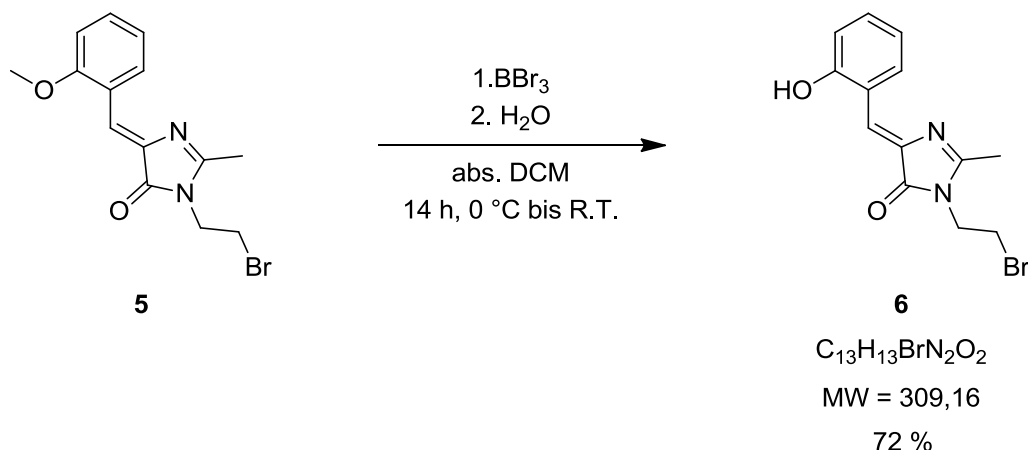
$R_f(\text{DCM/Aceton } 10:1) = 0,86$ .

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2,41$ , (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3,56 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3,84 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3,97 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 6,85 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1 H, ArH), 6,99 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1 H, ArH), 7,28-7,34 (m, 1 H, ArH), 7,66 (s, 1 H,  $\text{HC}=\text{C}$ ), 8,67-8,70 (m, 1 H, ArH).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 16,0$  ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 29,0 ( $\text{CH}_2$ ), 42,6 ( $\text{CH}_2$ ), 55,6 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 110,6 (ArCH), 120,9 (ArCH), 122,2 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 123,0 (ArCC), 132,0 (ArCH), 132,9 (ArCH), 137,4 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 159,2 (C-O), 161,0 (C=N), 170,5 (C=O).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 324,9 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

HRMS (EI-MS):  $m/z$   $[\text{M}^+]$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrN}_2\text{O}_2$ : 322,0317; gefunden: 322,0316.

**1-(2-Bromomethyl)-4-(2-hydroxybenzyliden)-2-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-on (6)**


Das Bromid **5** (170 mg, 0,51 mmol, 1,00 eq.) wurde in 5 mL abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Zugabe von 0,54 mL einer  $\text{BBr}_3$ -Lsg. (1,0 M Lsg. in DCM; 0,054 mmol, 1,05 eq.) erfolgte tropfenweise über 15 min. Nach einer Nacht Rühren bei R.T. wurde mit 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und weitere 30 min gerührt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, bevor das Lösungsmittel verdampft wurde. Die Reinigung des Feststoffs mittels Flash-Chromatographie mit DCM/Aceton 50:1 ergab 110 mg (0,36 mmol, 71 %) des gelben Produkts **6**.

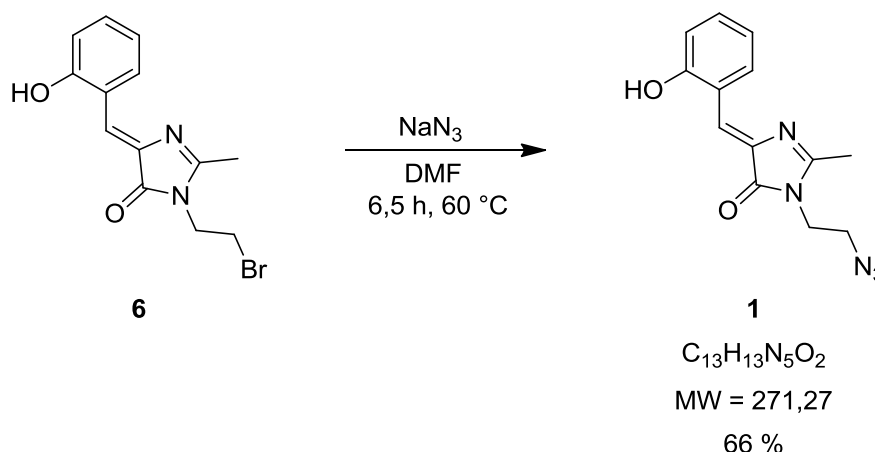
$R_f(\text{DCM/Aceton } 50:1) = 0,68$ .

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2,44$  (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3,60 (t,  $J = 6,1$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 4,02 (t,  $J = 6,1$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 6,80-6,85 (m, 1 H, ArH), 6,96 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H, ArH), 7,15 (s, 1 H,  $\text{HC}=\text{C}$ ), 7,24-7,35 (m, 2 H, ArH).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 15,6$  ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 29,8 ( $\text{CH}_2$ ), 43,7 ( $\text{CH}_2$ ), 119,2 (ArCH), 120,7 (ArCH), 121,1 (ArCC), 129,2 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 134,9 (ArCH), 135,0 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 136,8 (ArCH), 159,6 ( $\text{C}=\text{N}$ ), 160,9 ( $\text{C}-\text{O}$ ), 170,11 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 308,8 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

HRMS (EI-MS):  $m/z$   $[\text{M}^+]$  berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_2$ : 308,0161; gefunden: 308,0163.

**1-(2-Azidethyl)-4-(2-hydroxybenzyliden)-2-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-on (1)**

Das ungeschützte Bromid **6** (40 mg, 0,14 mmol, 1,00 eq.) wurde in 1,4 mL DMF gelöst und mit 90 mg  $\text{NaN}_3$  (1,42 mmol, 10,00 eq.) versetzt. Nach 3 h Röhren bei 60 °C, versetzte man mit 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  und extrahierte dreimal mit 2 mL DCM. Die organischen Phasen wurden zweimal mit ges. NaCl-Lsg. ausgeschüttelt und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, bevor das Lösungsmittel verdampft wurde. Man erhielt 25 mg (0,09 mmol, 66%) an hellgelbem Produkt **1** nach einer Flash-Chromatographie mit DCM/Aceton 50:1.

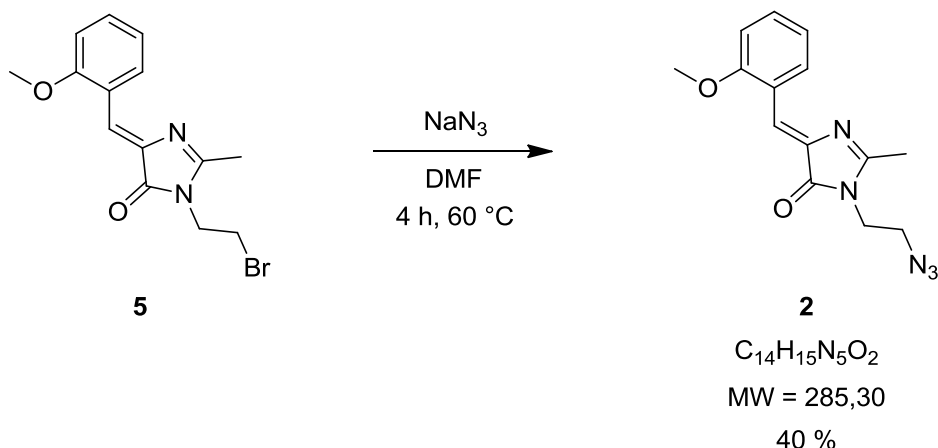
$R_f(\text{DCM/Aceton } 50:1) = 0,60$ .

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2,41$ , (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3,60-3,64 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3,72-3,77 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 6,80-6,85 (m, 1 H, ArH), 6,92 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H, ArH), 7,15 (s, 1 H,  $\text{HC}=\text{C}$ ), 7,24-7,35 (m, 2 H, ArH), 13,67 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 15,4$  ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 40,5 ( $\text{CH}_2$ ), 49,6 ( $\text{CH}_2$ ), 119,3 (ArCH), 119,5 (ArCH, ArCC), 130,9 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 132,2 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 134,4 (ArCH), 136,5 (ArCH) 157,0 (C=N), 158,7 (C-O), 167,9 (C=O).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 271,9 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

HRMS (EI-MS):  $m/z$   $[\text{M}^{++}]$  berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$ : 271,1069; gefunden: 271,1069

**1-(2-Azidethyl)-4-(2-methoxybenzyliden)-2-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-on (2)**


Das Imidazolone **5** (100 mg, 0,30 mmol, 1,00 eq.) und  $\text{NaN}_3$  (200 mg, 3,10 mmol, 10,00 eq.) wurden in 3 mL DMF suspendiert und 3 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Zufügen von 4 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , wurde dreimal mit 3 mL DCM ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen dreimal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und dann über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit DCM/Aceton 400:1 mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Man erhielt 35 mg (0,12 mmol, 40 %) des gelben Feststoffs **2**.

$R_f$  (DCM/Aceton 50:1) = 0,52.

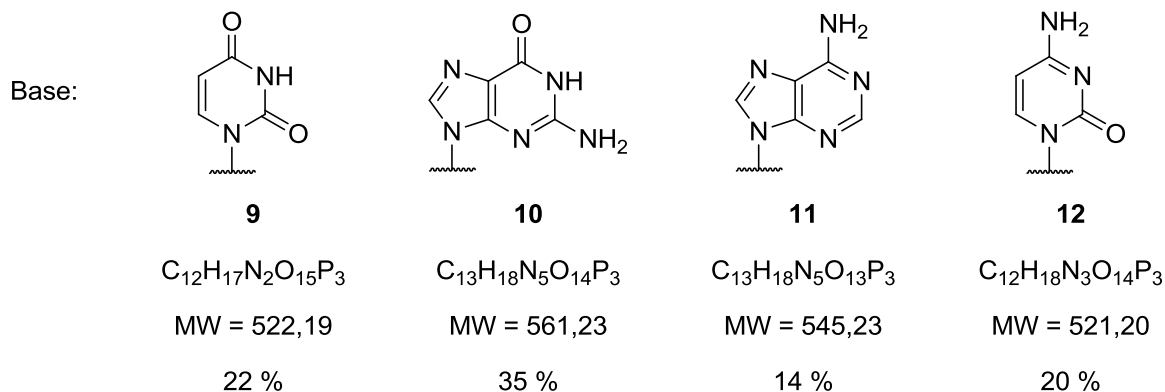
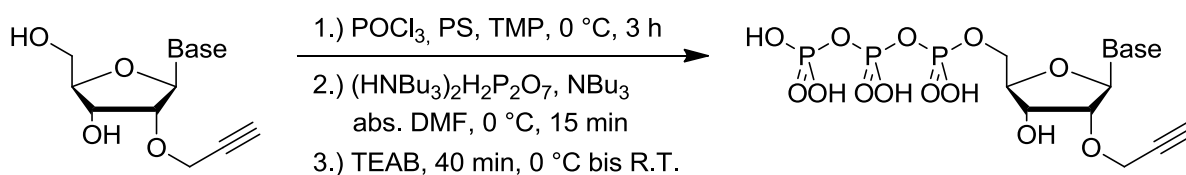
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 2,42, (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3,61 (t,  $J$  = 5,5 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3,74 (t,  $J$  = 5,5 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3,88 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 6,89 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1 H, ArH), 7,03 (t,  $J$  = 7,6 Hz, 1 H, ArH), 7,32-7,38 (m, 1 H, ArH), 7,69 (s, 1 H,  $\text{HC}=\text{C}$ ), 8,71-8,74 (m, 1 H, ArH).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 14,8 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 39,1 ( $\text{CH}_2$ ), 48,8 ( $\text{CH}_2$ ), 54,3 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 109,6 (ArCH), 119,9 (ArCH), 121,0 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 122,0 (ArCC), 130,9 (ArCH), 131,9 (ArCH), 136,5 ( $\text{HC}=\text{C}$ ), 158,1 (C-O), 160,3 (C=N), 169,6 (C=O).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 286,0 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

HRMS (EI-MS):  $m/z$   $[\text{M}^{++}]$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2$ : 285,1226; gefunden: 285,1223.

## 7.2.2 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate (9-12)



Herstellung von Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat:

Der Ionentauscher Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ -Form) wurde zuerst mit MeOH gewaschen, bis das Eluat keine Rotfärbung mehr zeigte, bevor mit  $\text{H}_2\text{O}$  bis zu einem pH-Wert von 5 gespült werden konnte. Tetranatriumpyrophosphat (8,92 g, 20 mmol) wurde in 75 mL Wasser gelöst, auf den Ionentauscher gegeben und das Eluat langsam in eine eisgekühlte, gerührten Lösung von 9,54 mL (7,42 g, 40 mmol) Tri-n-butylamin in 40 mL Ethanol getropft. Man eluierte das Pyrophosphat mit  $\text{H}_2\text{O}$ , bis sich wieder ein pH-Wert von 5 eingestellt hatte. Am Ende musste die Lösung des Produkts klar sein. Die Alkohol-Wasser-Mischung wurde im Vakuum bei maximal 30 °C eingedunstet, bevor noch zweimal mit Ethanol und dreimal mit abs. DMF coevaporiert wurde. Das gelbliche Öl konnte in 20 mL abs. DMF aufgenommen werden und über 4 Å Molsieb im Kühlschrank gelagert werden. Daraus resultierte eine etwa 0,4 M Lösung von Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat in abs. DMF.

Exemplarische Synthesevorschrift für 2'-O-Propargylnukleosidtriphosphate:

2'-O-Propargyluridin (20 mg, 0,07 mmol, 1,00 eq.) wurde zusammen mit Protonenschwamm (PS, 20 mg, 0,11 mmol, 1,50 eq.) unter Argonatmosphäre in 0,5 mL TMP gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt, bevor 7,8  $\mu\text{L}$  (10 mg, 0,09 mmol, 1,20 eq.)  $\text{POCl}_3$  langsam zu getropft wurden. Nach 1,5 h Rühren unter Eiskühlung gab man

noch einmal 0,5 eq. PS und  $\text{POCl}_3$  zu und nach weiteren 1,5 h eine Lösung aus 84  $\mu\text{L}$  (70 mg, 0,35 mmol, 5,00 eq.)  $\text{Bu}_3\text{N}$  und 0,89 mL (0,4 M Lsg. in abs. DMF, 0,35 mmol, 5,00 eq.)  $(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{P}_2\text{O}_7$  in DMF. Die Reaktion wurde mit 3,7 mL 0,1 M TEAB (pH 7,5) nach 15 min abgestoppt. Weitere 10 min bei 0 °C und 30 min bei R.T. vervollständigten die Reaktion. Es wurde mit tert-Butylmethylether ausgeschüttelt, eine Ionenauschromatographie (DEAE Sephadex A-25) mit einem Gradienten von 0,1 M TEAB bis 1,0 M TEAB und eine RP-18-Säule mit TEAA (50 mM, pH 7) und Acetonitril durchgeführt. Nach mehrmaliger Lyophilisation und Austausch der Ammoniumgegenionen mit einem Dowex 50WX8 gegen  $\text{Na}^+$  stellte man mit dem Produkt **9** eine wässrige Stammlösung her. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt.

Die Extinktionskoeffizienten für die jeweiligen Maxima wurden von *Chemgenes* übernommen und als gleich für Edukt und Produkt angenommen.

### 9:

$$\epsilon_{\text{max}}(260 \text{ nm}) = 9800 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}.$$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 2,75$  (t,  $J = 2,1$  Hz, 1 H,  $\text{C}\equiv\text{C-H}$ ), 4,15 (m, 3 H,  $\text{H5}'$ ,  $\text{H5}''$ ,  $\text{H4}'$ ), 4,27 (m, 3 H;  $\text{H3}'$ ,  $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$ ), 4,43 (t;  $J = 4,6$  Hz, 1 H,  $\text{H2}'$ ), 5,87 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H,  $\text{H5}$ ), 5,95 (d,  $J = 4,6$  Hz, 1 H,  $\text{H1}'$ ), 7,88 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H,  $\text{H6}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -21,8$  (t,  $J = 20,6$  Hz,  $\text{P}_\beta$ ),  $-10,7$  (d,  $J = 19,8$  Hz,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-5,6$  (d,  $J = 21,0$  Hz,  $\text{P}_\alpha$ ).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 520,7 (100)  $[\text{M-H}]^-$ .

HRMS (ESI-MS):  $m/z$   $[\text{M-H}]^-$  berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{P}_3^-$ : 520,9769; gefunden: 520,9813.

### 10:

$$\epsilon_{\text{max}}(257 \text{ nm}) = 12214 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}.$$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 2,60$  (t,  $J = 2,3$  Hz, 1 H,  $\text{C}\equiv\text{C-H}$ ), 4,06-4,29 (m, 5 H,  $\text{H5}'$ ,  $\text{H5}''$ ,  $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$ ,  $\text{H2}'$ ), 4,57-4,69 (m, 2 H,  $\text{H3}'$ ,  $\text{H4}'$ ), 5,89 (d,  $J = 6,1$  Hz, 1 H,  $\text{H1}'$ ), 8,01 (s, 1 H,  $\text{H8}$ ).



$^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -23,4$  (t,  $J = 19,8$  Hz,  $\text{P}_\beta$ ),  $-12,0$  (d,  $J = 19,6$  Hz,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-9,5$  (d,  $J = 19,8$  Hz,  $\text{P}_\alpha$ ).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 559,9 (100)  $[\text{M-H}]^-$ .

HRMS (ESI-MS):  $m/z$   $[\text{M-H}]^-$  berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3^-$ : 599,9990; gefunden: 599,9969.

## 11:

$\epsilon_{\text{max}}$  (260 nm) =  $13910 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 2,47$ - $2,53$  (m, 1 H,  $\text{C}\equiv\text{C-H}$ ),  $4,37$ - $4,04$  (m, 5 H,  $\text{H5}'$ ,  $\text{H5}''$ ,  $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$ ,  $\text{H2}'$ ),  $4,61$ - $4,68$  (m, 2 H;  $\text{H3}'$ ,  $\text{H4}'$ ),  $6,12$  (d;  $J = 5,8$  Hz, 1 H,  $\text{H1}'$ ),  $8,15$  (s, 1 H,  $\text{H2}$ ),  $8,44$  (s, 1 H,  $\text{H8}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -22,3$  (t,  $J = 19,9$  Hz,  $\text{P}_\beta$ ),  $-10,7$  (d,  $J = 19,8$  Hz,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-9,4$  (d,  $J = 20,0$  Hz,  $\text{P}_\alpha$ ).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 543,8 (100)  $[\text{M-H}]^-$ .

HRMS (ESI-MS):  $m/z$   $[\text{M-H}]^-$  berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3^-$ : 544,0041; gefunden: 544,0032.

## 12:

$\epsilon_{\text{max}}$  (273 nm) =  $9322 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ .

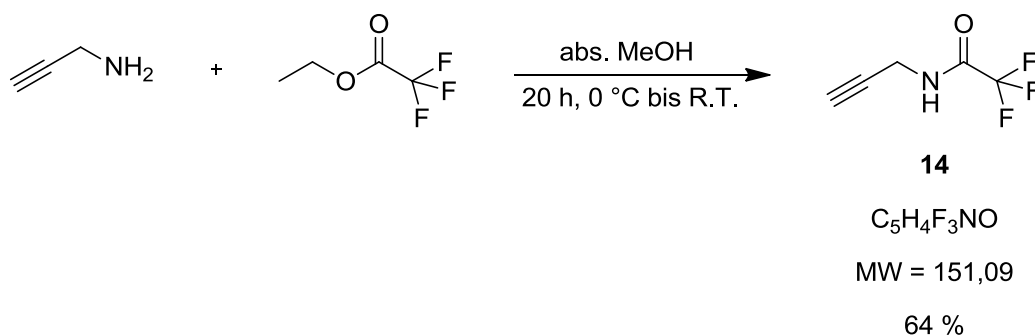
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 2,71$  (m, 1 H,  $\text{C}\equiv\text{C-H}$ ),  $3,86$  (m, 1 H,  $\text{H5}'$ ),  $3,96$  (m, 1 H;  $\text{H5}''$ ),  $4,12$  (m, 1 H,  $\text{H4}'$ ),  $4,22$  (t,  $J = 4,8$  Hz, 1 H,  $\text{H3}'$ ),  $4,30$  (d,  $J = 2,2$  Hz, 2 H,  $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$ ),  $4,34$  (t,  $J = 5,3$  Hz, 1 H,  $\text{H2}'$ ),  $5,97$  (d,  $J = 4,2$  Hz, 1 H,  $\text{H1}'$ ),  $6,03$  (d,  $J = 4,5$  Hz, 1 H,  $\text{H5}$ ),  $8,01$  (d,  $J = 7,6$  Hz, 1 H,  $\text{H6}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -21,9$  (t,  $J = 20,1$  Hz,  $\text{P}_\beta$ ),  $-10,6$  (d,  $J = 20,3$  Hz,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-6,3$  (d,  $J = 20,8$  Hz,  $\text{P}_\alpha$ ).

ESI-MS:  $m/z$  (%) = 519,8 (100)  $[\text{M-H}]^-$ .

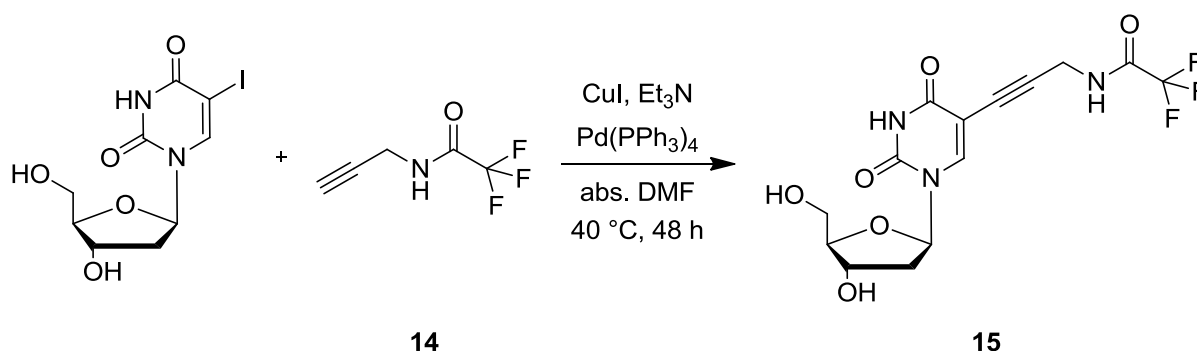
HRMS (ESI-MS):  $m/z$   $[\text{M-H}]^-$  berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_3^-$ : 519,9928; gefunden: 520,9925.

## 7.2.3 5-Tetrazinmodifiziertes 2'-Desoxuridintriphosphat

2-Trifluor-*N*-(propyn-1-yl)acetamid (**14**)

Trifluoressigsäureethylester (4,5 mL, 5,33 g, 38 mmol, 1,20 eq.) wurde langsam unter Argon in eine eisgekühlte Lösung von Propargylamin (2,0 mL, 1,72 g, 31 mmol, 1,00 eq.) in 30 mL abs. MeOH getropft. Nach 30 min Rühren bei 0 °C, erfolgte die weitere Reaktion über 24 h bei R.T.. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL DCM aufgenommen. Darauf folgte Ausschütteln mit 100 mL Natriumhydrogencarbonatlsg.. Die wässrige Phase wurde mit 25 mL DCM gewaschen und dann die vereinigten org. Phasen mit 50 mL H<sub>2</sub>O, das wiederum mit 25 mL DCM ausgeschüttelt wurde. Die Trocknung der org. Lösung erfolgte über Natriumsulfat, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Der Rückstand wurde bei vermindertem Druck destilliert, sodass man **14** als farblose Flüssigkeit (3,54 g, 23 mmol) in 76 % Ausbeute gewinnen konnte.

Die analytischen Daten stimmten vollständig mit den veröffentlichten überein.<sup>380</sup>

**5-(3-Trifluoracetamidpropyn-1-yl)-2'-desoxyuridin (15)** $C_{14}H_{14}F_3N_3O_6$ 

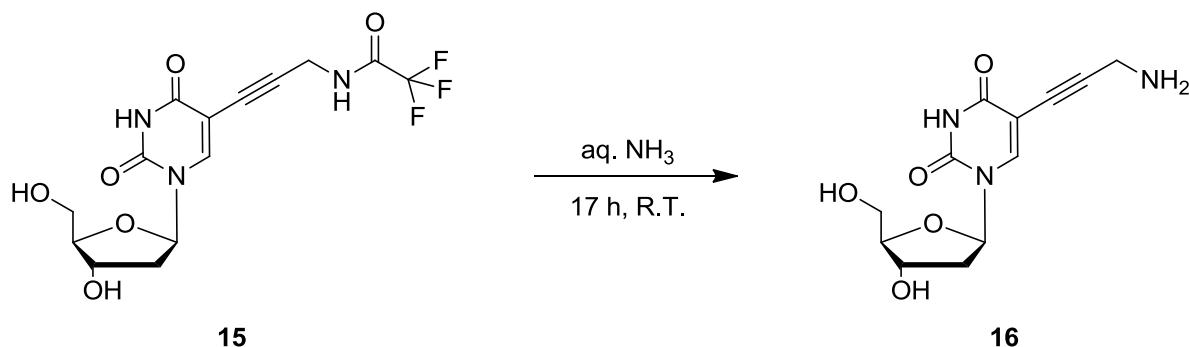
MW = 377,27

88 %

Zuerst erfolgte die Suspension von 1,00 g (2,8 mmol, 1,00 eq.) IdU und 110 mg (0,6 mmol, 0,22 eq.) CuI unter Argon in 15 mL abs. DMF. Nach 30 min Rühren unter Lichtschutz wurden 0,8 mL (0,58 g, 5,8 mmol, 2,00 eq.) Et<sub>3</sub>N, 1,30 g (8,6 mmol, 3,00 eq.) **14** und 330 mg (0,3 mmol, 0,10 eq.) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> zugegeben und 8 h bei R.T. gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Rohprodukt in 20 mL THF gelöst und mit 2 g KCO<sub>3</sub> versetzt. Nach 2 h Rühren bei R.T. erhielt man nach abfiltrieren der Salze und Entfernung des Lösungsmittels einen Feststoff, den man mittels Flash-Chromatographie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1 reinigte. 880 mg (2,3 mmol, 88 %) an Nukleosid **15** wurden erhalten.

 $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 8,25:1,75) = 0,54.$ 

Die analytischen Daten stimmten vollständig mit den veröffentlichten überein.<sup>262</sup>

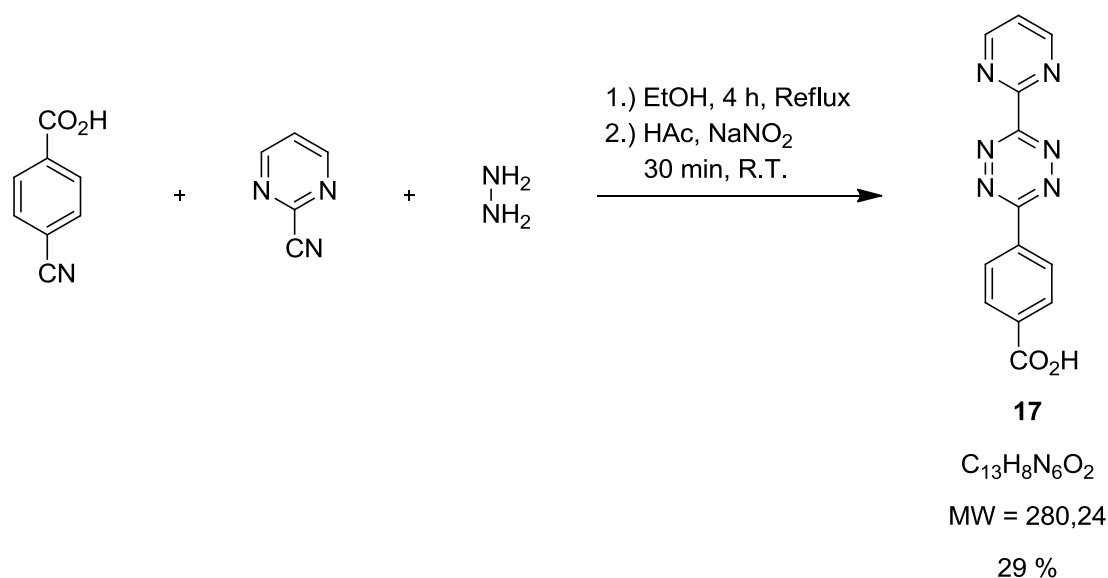
**5-(3-Aminopropyn-1-yl)-2'-desoxyuridin (16)** $C_{12}H_{15}N_3O_5$ 

MW = 281,26

quant.

Die Entschützung von **15** (300 mg, 0,8 mmol) erfolgte mit 20 mL konzentrierter Ammoniaklsg. Nach 17 h Rühren bei R.T., wurde die wässrige Lösung im Vakuum entfernt und dreimal mit Ethanol coevaporiert. Eine weitere Reinigung erfolgte nicht und die Ausbeute wurde als quantitativ angenommen.

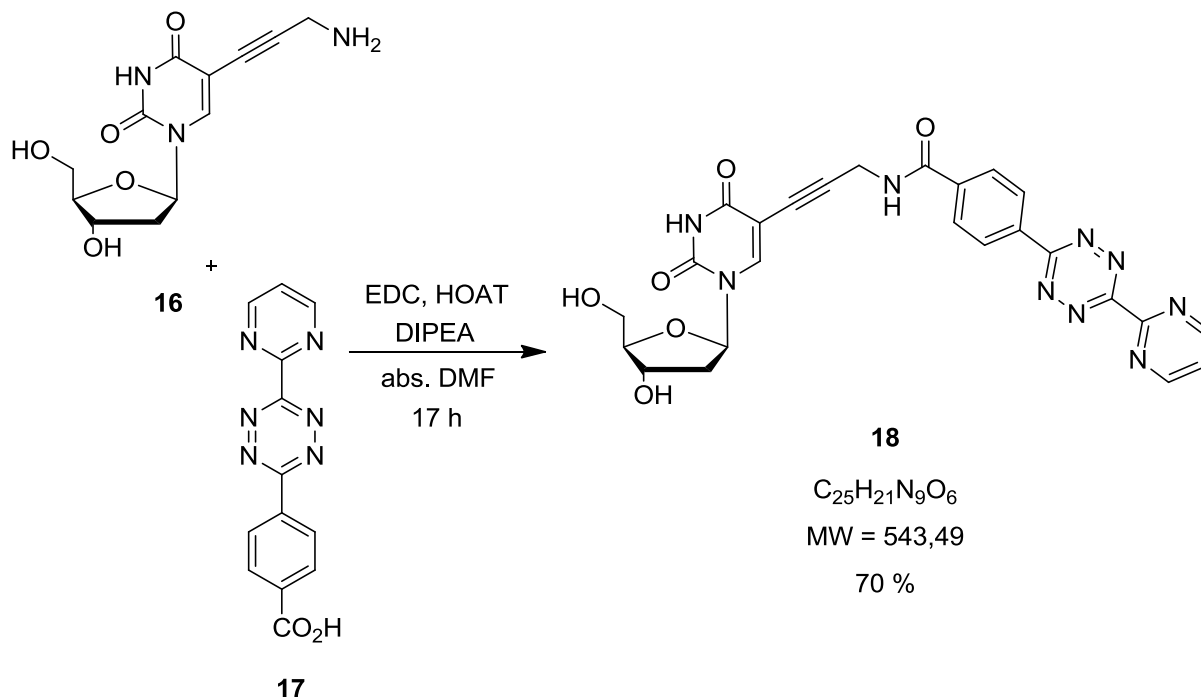
Die analytischen Daten stimmten vollständig mit den veröffentlichten überein.<sup>263</sup>

**4-[6-(Pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl]benzoesäure (17)**

2-Pyrimidincarboxitril (1,05 g, 10 mmol, 1,00 eq.) und 4-Cyanbenzoesäure (1,47 g, 10 mmol, 1,00 eq.) wurden zusammen mit 3,13 mL Hydrazinhydrat (80 %ige Lsg. in H<sub>2</sub>O, 2,50 g, 50 mmol, 5,00 eq.) unter Rückfluss gekocht. Während der Reaktion fiel das Zwischenprodukt, das immer wieder mit Ethanol (~13 mL) in Lösung gebracht wurde, als gelblicher Feststoff aus. Das Abkühlen nach 4 h führte wieder zu einem Niederschlag, der abgesaugt werden konnte. Dieser wurde anschließend mit Aceton ausgekocht und der Rückstand als Suspension in Eisessig mit Natriumnitrit (1,38 g, 20 mmol, 2,00 eq.), das als wässrige Lösung zugetropft wurde, oxidiert. Dies führte zu einem intensiv purpurnem Niederschlag. Nach 30 min konnte dieser abgesaugt und mit Wasser gewaschen werden. Das Produkt **17** ging durch kochen mit DMF in Lösung und nachdem heiß abfiltriert wurde, erhielt man 29 % (820 mg, 2,9 mmol) an Tetrazin **17**.

Die analytischen Daten stimmten vollständig mit den veröffentlichten überein.<sup>257</sup>

**5-[3-(4-(6-(Pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamidyl)-(propyn-1yl)]-2'-desoxyuridin (**18**)**



Zu einer Lösung aus freiem Amin **16** (50 mg, 0,2 mmol, 1,00 eq.) in 2 mL abs. DMF wurden unter Argon nacheinander 38  $\mu$ L (30 mg, 0,2 mmol, 1,20 eq.) EDC, 0,21 mL (1,0 M Lsg. in abs. DMF, 0,2 mmol, 1,20 eq.) HOAT, 61  $\mu$ L (50 mg, 0,4 mmol, 2,00 eq.) DIPEA und 100 mg (0,3 mmol, 1,50 eq.) Tetrazin **17** zugegeben. Nach 19 h Rühren bei R.T. erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 10 mL MeOH. Innerhalb weiterer 30 min wurde die Reaktion vervollständigt. Die Reinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie und DCM/MeOH 10:1. Das purpurfarbene Nukleosid **18** konnte mit einer Ausbeute von 70 % (70 mg, 0,1 mmol) dargestellt werden.

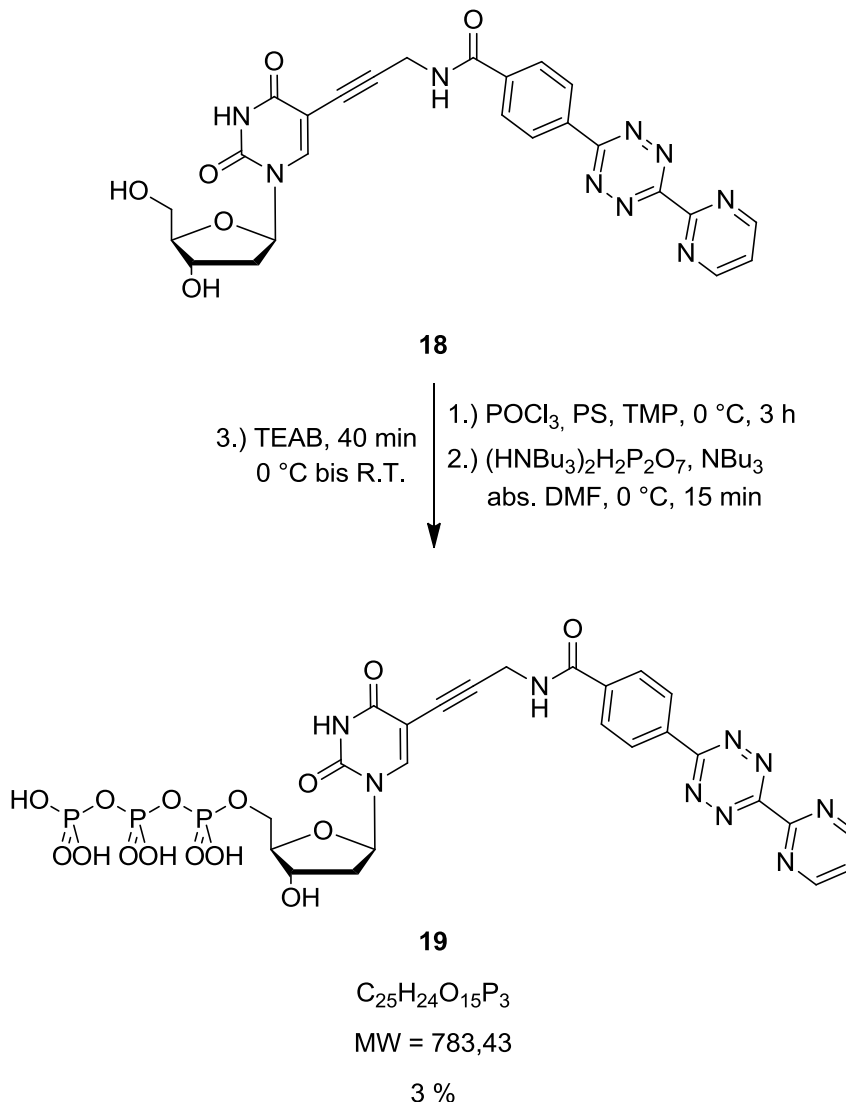
$R_f$ (DCM/MeOH 8:1) = 0,30.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 2,12 (t,  $J$  = 6,5 Hz, 2 H, H2'), 3,49-3,69 (m, 2 H, H5'), 3,80 (q,  $J$  = 3,3 Hz, 1 H, H3'), 4,22 (q,  $J$  = 4,1 Hz, 1 H, H4'), 4,36 (d,  $J$  = 5,5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5,12 (t,  $J$  = 5,0 Hz, 1 H, 5'-OH), 5,25 (d,  $J$  = 4,2 Hz, 1 H, 3'-OH), 6,12 (t,  $J$  = 6,7 Hz, 1 H, H1'), 7,85 (t,  $J$  = 4,9 Hz, 1 H, ArH), 8,15-8,26 (m, 3 H, ArH, H6 (U)), 8,69 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 2 H, ArH), 9,21 (d,  $J$  = 4,9 Hz, 2 H, ArH), 9,33 (t,  $J$  = 5,4 Hz, 1 H, NH), 11,65 (s, 1H, NH(U)).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 29,4, 45,6, 61,0, 70,2, 74,4, 84,7, 87,6, 89,5, 98,1, 123,0, 128,2, 128,4, 134,1, 137,5, 143,8, 149,4, 158,5, 159,1, 161,6, 162,9, 163,2, 165,1.

HRMS (ESI-MS):  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  berechnet für  $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_9\text{O}_6^-$ : 542,1542; gefunden: 542,1535.

**5-[3-(4-(6-(Pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamidyl)-(propyn-1yl)]-2'-desoxyuridintriphosphat (19)**



Herstellung von Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat: s. 7.2.2

Das Nucleosid **18** (20 mg, 0,04 mmol, 1,00 eq.) wurde zusammen mit Protonenschwamm (12 mg, 0,05 mmol, 1,50 eq.) unter Argonatmosphäre in 0,7 mL TMP gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt, bevor 4,0 µL (7 mg, 0,04 mmol, 1,20 eq.) POCl<sub>3</sub> langsam zu getropft wurden. Nach 1,5 h Rühren unter Eiskühlung gab man noch einmal 0,5 eq. PS und POCl<sub>3</sub> zu und nach weiteren 1,5 h eine Lösung aus 43 µL (34 mg, 0,18 mmol, 5,00 eq.) Bu<sub>3</sub>N und 0,45 mL (0,4 M Lsg. in abs. DMF, 0,18 mmol, 5,00 eq.) (Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> in DMF. Die Reaktion wurde mit 2,0 mL 0,1 M TEAB (pH 7,5) nach 15 min abgestoppt. Weitere 10 min bei 0 °C und 30 min bei R.T. vervollständigten die Reaktion. Es wurde eine Ionenauschromatographie mit (DEAE Sephadex



A-25) einem Gradienten von 0,1 M TEAB bis 1,0 M TEAB und eine RP-18-Säule mit TEAA (50 mM; pH 7) und Acetonitril durchgeführt. Nach mehrmaliger Lyophilisation und Austausch der Ammoniumgegenionen mit einem Dowex 50WX8 gegen Na<sup>+</sup> stellte man mit dem Produkt **19** eine wässrige Stammlösung her. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt. So konnte das Triphosphat **19** mit 3 % (0,001 mmol) Ausbeute dargestellt werden.

$$\varepsilon_{\max} (536 \text{ nm}) = 375 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}.$$

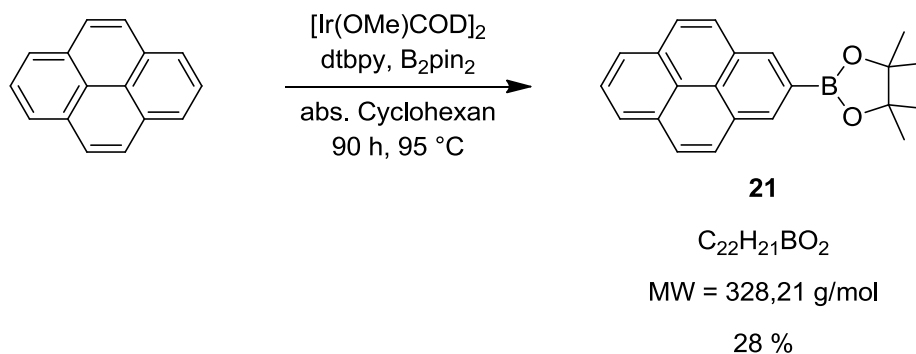
<sup>31</sup>P NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = -20,2$  (P <sub>$\beta$</sub> ),  $-10,5$  (P <sub>$\gamma$</sub> ),  $-4,6$  (P <sub>$\alpha$</sub> ).

ESI-MS: m/z (%) = 781,6 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

HRMS (ESI-MS): m/z [M-H]<sup>-</sup> berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>9</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub><sup>-</sup>: 782,0531; gefunden: 782,0516.

## 7.2.4 2PydU

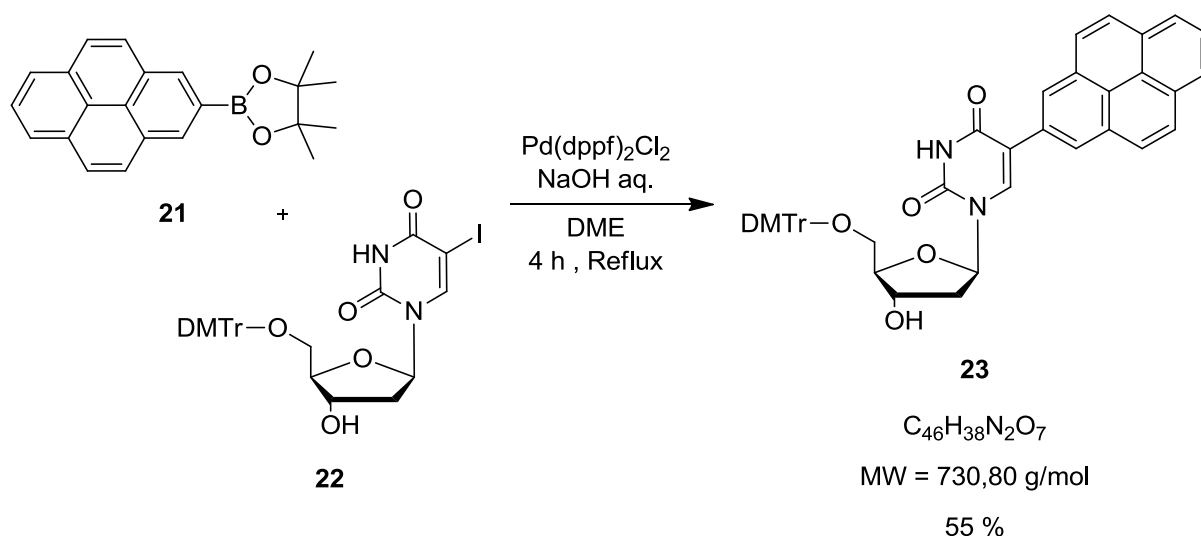
### 4,4,5,5-Tetramethyl-2-(pyren-2-yl)-1,3,2-dioxaborolan (21)



Nachdem man 1,58 g (7,80 mmol, 1,00 eq.) Pyren in zuvor entgastem abs. Cyclohexan (30 mL) löste, wurde unter Stickstoffatmosphäre Bispinacolatdiboran (2,18 g, 8,60 mmol, 1,10 eq.), 4,4'-Di-*tert*-butyl-2,2'-dipyridyl (210 mg, 0,78 mmol, 0,10 eq.) und Bis(1,5-cyclooctadien)diiridium(I)dimethanolat (260 mg, 0,39 mmol, 0,05 eq.) zugegeben. Nach 24 h Rühren bei 95 °C kamen weitere 0,03 eq. (0,23 mmol) Katalysator hinzu. Nach weiteren 66 h bei 95 °C wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte über Flash-Chromatographie mit Hexan/DCM 1:1. So erhielt man 710 mg (2,2 mmol, 28 %) des ockerfarbenen Produkts **21**.

$R_f(\text{Hexan/DCM 1:1}) = 0,38$ .

Die analytischen Daten stimmten vollständig mit den veröffentlichten überein.<sup>50</sup>

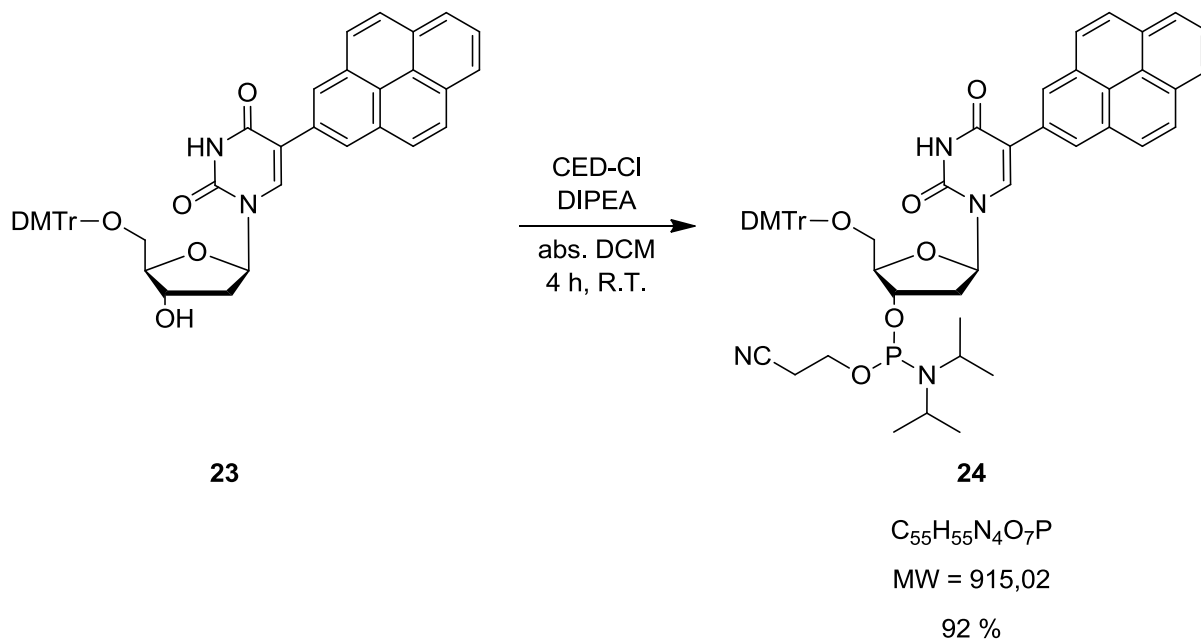
**5'-O-Dimethoxytrityl-5-(pyren-2-yl)-2'-desoxyuridin (23)**

Das Borolan **21** (490 mg, 1,49 mmol, 1,10 eq.) wurde in 10 mL DME gelöst und zusammen mit der Natriumhydroxidlg. (2M Lsg. in  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,04 mL, 4,07 mmol, 3,00 eq.) entgast. Nachdem unter Stickstoffatmosphäre DMTr-geschütztes IdU und das Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphin)ferrocen]palladium(II)dichlormethanaddukt (120 mg, 0,15 mmol, 0,11 eq.) zugegeben wurden, refluxierte man 4 h. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand mit Wasser und DCM wieder aufgenommen. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit DCM ausgeschüttelt, bevor die organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen wurden. Man trocknete den organischen Rest über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Die Reinigung erfolgte über Flash-Chromatographie mit EE/PE/DCM 8:1:1 + 0,1%  $\text{Et}_3\text{N}$ . So erhielt man 550 mg (0,75 mmol, 55 %) des gelblichen Nucleosids **23**.

$R_f$  (EE/PE/DCM 8:1:1) = 0,54.

Die analytischen Daten stimmten vollständig mit den veröffentlichten überein.<sup>50</sup>

**3'-O-[(2-Cyanethyl)-*N,N*-diisopropylphosphanyl]-5'-O-Dimethoxytrityl-5-(pyren-2-yl)-2'-desoxyuridin (**24**)**



Das pyrenmodifizierte Nucleosid **23** (350 mg, 0,45 mmol, 1,00 eq.) wurde unter Argon in 5 mL abs. DCM gelöst und mit 300 µL DIPEA (220 mg, 1,72 mmol, 3,60 eq.) und 214 µL CED-Cl (230 mg, 0,96 mmol, 2,00 eq.) versetzt. Nach 4 h Rühren bei R.T. entfernte man das Lösungsmittel und reinigte das Rohprodukt über Flash-Chromatographie mit DCM/Aceton 10:1 + 0,1 % Et<sub>3</sub>N. Zur vollständigen Trocknung wurde das Produkt aus Benzol lyophilisiert und man erhielt 380 mg (0,41 mmol; 92 %) weißen Feststoff **24**

$R_f$  (DCM/Aceton 10:1 + 0,1 % Et<sub>3</sub>N) = 0,46 (Doppelspot).

Die analytischen Daten stimmten vollständig mit den veröffentlichten überein.<sup>50</sup>

## 7.3 DNA-Synthese

Unmodifizierte DNA- und RNA-Stränge, sowie der fluoreszenzmarkierte Primer wurden von *Metabion* erworben. Die LNA-Oligonukleotide wurden von der Arbeitsgruppe *Wengel* zur Verfügung gestellt.

### 7.3.1 DNA-Synthese nach der Phosphoramiditmethode

#### Automatisierte DNA-Synthese

Die DNA-Synthese wurde automatisiert in einem *Expedite Synthesizer* von *ABI* durchgeführt. Dieser fördert Flüssigkeiten aus Reservoirs in Pulsen von je 16  $\mu\text{L}$  durch die CPG-Säulen. Er folgt dabei einem zuvor festgelegten Kupplungsprotokoll, das aus Einzelschritten besteht, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer (in Sekunden) des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet ein schnellstmögliches Durchlaufen des Einzelschrittes.

Die dabei verwendeten Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt:

Dblk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan

Wsh: Acetonitril

Act: 0,45 M Tetrazol in Acetonitril

Caps: Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und *N*-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B)

Ox: Iod in Wasser/THF/Pyridin

Der artifizielle Baustein **24** wurden in Acetonitril (amidite diluent) aufgenommen und als 0,1 M Lösung in den Syntheseautomaten gesetzt. Der Einbau verlief über ein, im Vergleich zu den natürlichen Basen, unverändertes Kupplungsprotokoll (s. Tab. 8). Die DNA-Synthese mit den anderen kommerziell erhältlichen Phosphoramiditen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Bei allen Oligonukleotiden wurde am Schluss die 5'-terminale DMTr-Schutzgruppe, soweit diese vorhanden war, von der Hydroxygruppe entfernt (trityl-off Synthese).

**Tab. 8:** Kupplungsprotokoll für 2PydU (**24**), wobei sich der Baustein auf Position 5 des Synthesizers befand

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit /Arg2
\$Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trytl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trytl 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
22	5 + Act	PULSE	6	0
22	5 + Act	PULSE	1	16
2	Act	PULSE	4	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

### Aufarbeitung und Reinigung

Die vollständige Entschützung und Abspaltung der DNA vom CPG erfolgte mit 700 µL 25 %igem Ammoniak bei R.T. über 24 h. Es wurde die Lösung von der festen Phase abfiltriert und zweimal mit 300 µL Wasser nachgewaschen. Die Entfernung des Lösungsmittels geschah in einem Vakuumkonzentrator. Für die postsynthetische Modifizierung vorgesehene Oligonukleotide wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Mit den anderen Strängen erfolgte eine HPLC-Trennung.

### 7.3.2 Enzymatische DNA-Synthese

#### Primerverlängerungsexperimente

Templat und Primer wurden in Puffer 5 min bei 90 °C inkubiert und dann innerhalb 1 h auf R.T. abgekühlt. Nach Zugabe der Polymerase und der dNTPs erfolgte die Primerverlängerung in einem Gesamtvolumen von 20 µL bei einer bestimmten Temperatur im Thermo-Cycler. Der Reaktionsansatz wurde mit 10 µL EDTA-haltigem Beladungspuffer (20 mM EDTA, pH 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 12 % Ficoll, 0,01 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylen Cyanol FF, 7 M Harnstoff) abgestoppt, 10 min bei 95 °C dehybridisiert und 5 µL der Lösung mit einem 12 %igem denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte über einen Fluoreszenz-imager mit Anregungslicht von 470±20 nm und einem Emissionsfilter mit 535±20 nm Bandpass zur Sichtbarmachung des fluoreszeinmarkierten Primers (s. Abb. 106). Zeit, Temperatur, verwendete Polymerase, Polymerasen-, Templat-, Primer- und dNTP-Konzentration sind den jeweiligen Bildunterschriften der Gele zu entnehmen, die Zusammensetzung der Puffer folgender Tabelle:

**Tab. 9:** Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung bei Primerverlängerungsexperimenten

Polymerase	Puffer	Zusammensetzung 1 × Puffer
Therminator	ThermoPol Reaction Buffer	20 mM TRIS-HCl, 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 mM KCl, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,1 % Triton <sup>®</sup> X-100, pH 8,8 @ 25 °C
Therminator II	ThermoPol Reaction Buffer	
Therminator III	ThermoPol Reaction Buffer	
9°N <sub>m</sub>	ThermoPol Reaction Buffer	
Therminator γ	Therminator γ Reaction Buffer	20 mM TRIS-HCl, 5 mM MgSO <sub>4</sub> , 50 mM KCl, 0,02 % IGEPAL <sup>®</sup> X-100, pH 9,2 @ 25 °C
Vent (exo-)		20 mM TRIS-HCl, 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 mM KCl, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,2 @ 25 °C
Deep Vent (exo-)		analog Vent (exo-)
Hemo KlenTaq		analog Vent (exo-)

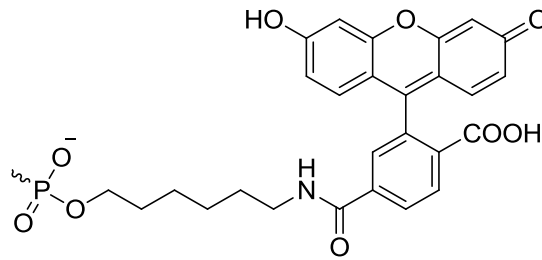


Abb. 106: Fluoreszeinmodifikation (Fluo) am 5'-Ende des Primers

### Präparative DNA-Synthese

Für die präparative DNA-Synthese mit Polymerasen wurden die Bedingungen im Vergleich zu den vorangegangenen Primerverlängerungsexperimenten beibehalten, jedoch wurde das Volumen auf 1334  $\mu\text{L}$  vergrößert, um 1,0 nmol modifiziertes Oligonukleotid zu erhalten und die Reaktion in einem Heizblock in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Polymerase mit einem Teil Roti<sup>®</sup>-Phenol entfernt und der Reaktionsansatz noch zweimal mit einem Teil Chloroform behandelt. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wurde erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC, wobei die Fraktionen vereinigt wurden, die bei 490 nm durch den Fluoreszeinmarker absorbierten. Nach Lyophilisation konnten wässrige Stammlösungen hergestellt werden.

### 7.3.3 Postsynthetische Modifizierung

#### CuAAC mit GFP-Chromophoren 1 und 2

Die lyophilisierten DNA-Stränge wurden mit 114  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Azidlsg. (10 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1), 25  $\mu\text{L}$  Natriumascobatlg. (400 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ), 34  $\mu\text{L}$  TBTA-Lsg. (100 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1) und 17  $\mu\text{L}$  Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)hexafluorophosphat-Lsg. (10 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1, frisch hergestellt) versetzt und 17 h bei R.T. geschüttelt. Nach Entfernung des Lösungsmittels in einem Vakuumkonzentrator konnte die DNA in 100  $\mu\text{L}$  Natriumacetatlg. (0,3 M in  $\text{H}_2\text{O}$ ) aufgenommen werden und mit 1 mL Ethanol in 30 min auf Trockeneis ausgefällt werden. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine Größenausschlusschromatographie mit einer NAP-5-Säule (*GE Healthcare*), bevor eine HPLC-Trennung durchgeführt wurde.



### **CuAAC mit Nilrot 13**

Zu 1  $\mu\text{L}$  DNA-Lsg. (250  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurden 2  $\mu\text{L}$  Nilrotlsg. (10 mM in DMSO/*t*-BuOH 3:1), 0,5  $\mu\text{L}$  DMSO/*t*-BuOH-Lsg. (3:1) und 0,5  $\mu\text{L}$  Natriumascorbatlsg. (400 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gegeben. Dazu kamen 0,6  $\mu\text{L}$  einer 1:2-Lösung aus frisch gelöstem Tetraakis(acetonitril)kupfer(I)hexafluorphosphat (0,1 M in DMSO/*t*-BuOH 3:1) und TBTA (0,1 M in DMSO/*t*-BuOH 3:1). Nach 5, 15 und 30 min Schütteln bei R.T. wurden jeweils 0,6  $\mu\text{L}$  in 15  $\mu\text{L}$  EDTA-haltigen Beladungspuffer (20 mM EDTA, pH 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 12 % Ficoll, 0,01 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylen Cyanol FF, 7 M Harnstoff) gegeben. Zur Analyse erfolgte ein 12 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel mit 5  $\mu\text{L}$  der Lösungen. Das Auslesen erfolgte sowohl mit den blauen LEDs für Fluoreszein ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 20 \text{ nm}$ ), als auch mit den roten für Nilrot ( $\lambda_{\text{exc}} = 630 \pm 10 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 17,5 \text{ nm}$ ).

### **Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf**

0,5  $\mu\text{L}$  DNA-Lsg. (200  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurden mit 10  $\mu\text{L}$  Rhodamincycloooktinlsg. (1 mM in DMSO) versetzt und bei R.T. geschüttelt. Es folgte eine Entnahme von 3  $\mu\text{L}$  nach 5, 15 und 30 min. Die Aliquote wurden umgehend mit 15  $\mu\text{L}$  Beladungspuffer (20 mM EDTA, pH 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 12 % Ficoll, 0,01 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylen Cyanol FF, 7 M Harnstoff) versetzt und eingefroren. Zur Analyse erfolgte ein 12 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel mit 5  $\mu\text{L}$  der Lösungen. Das Auslesen erfolgte sowohl mit den blauen LEDs für Fluoreszein ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 20 \text{ nm}$ ), als auch mit den grünen für Rhodamin 3G ( $\lambda_{\text{exc}} = 540 \pm 10 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 10 \text{ nm}$ ).

## **7.3.4 Charakterisierung der Oligonukleotide**

### **Enzymatisch synthetisierte Oligonukleotide**

Bei allen enzymatisch synthetisierten Oligonukleotiden erfolgte die Charakterisierung über die Wanderungstrecke auf einem 12 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel im Vergleich zu einem unmodifizierten Standard gleicher Länge, sowohl vor, als auch nach der Postsynthese. Die Primerverlängerungen wurden als quantitativ angesehen.

### **An der festen Phase synthetisierte Oligonukleotide**

Nach der präparativen Trennung der Oligonukleotide, wurden ihre Massen bestimmt. Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden photometrisch mit Hilfe des Lam-

bert-Beerschen-Gesetzes bestimmt. Hierzu wurde die Absorption bei  $\lambda = 260$  nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient der DNA ließ sich nach folgender Gleichung berechnen.

$$\varepsilon = (A \cdot \varepsilon_A + T \cdot \varepsilon_T + G \cdot \varepsilon_G + C \cdot \varepsilon_C) \cdot 0,9$$

A:	Anzahl der Adeninbasen
T:	Anzahl der Thyminbasen
G:	Anzahl der Guaninbasen
C:	Anzahl der Cytosinbasen
$\varepsilon_A$ :	$15400 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ <sup>381</sup>
$\varepsilon_T$ :	$8800 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$
$\varepsilon_G$ :	$11700 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$
$\varepsilon_C$ :	$7300 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$

Die Extinktionskoeffizienten der artifiziellen Bausteine bei 260 nm wurden ebenfalls wegen excitonischen Wechselwirkungen mit 0,9 multipliziert und zu dem Extinktionskoeffizient der DNA addiert. Da im Falle des Fluoreszeinmarkers von einer geringen Wechselwirkung mit den Nukleinsäurebasen ausgegangen wurde, fand keine Korrektur statt. Die  $\varepsilon$ -Werte von oGFP und MeoGFP wurden selbst mit den entsprechenden Aziden in Wasser bestimmt.

$\varepsilon_{\text{oGFP}}$ :	$2400 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$
$\varepsilon_{\text{MeoGFP}}$ :	$3800 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$
$\varepsilon_{\text{pU}}$ :	$9800 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ ( <i>ChemGenes</i> )
$\varepsilon_{2\text{PydU}}$ :	$18600 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ <sup>50</sup>
$\varepsilon_{\text{BrdU}}$ :	$5100 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ ( <i>Glen Research</i> )
$\varepsilon_{\text{Fluo}}$ :	$20900 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ ( <i>Glen Research</i> )

**Tab. 10:** Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide

Oligo-nukleotid	$\varepsilon$ (260 nm) / $\text{L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$	Summenformel	berech. Masse / Da	gef. Masse / m/z
<b>oGFPA</b>	169900	$\text{C}_{181}\text{H}_{223}\text{N}_{67}\text{O}_{103}\text{P}_{16}$	5478,0	1369,4 [M-4H] <sup>4-</sup> 1826,3 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>oGFPG</b>	163200	$\text{C}_{181}\text{H}_{223}\text{N}_{67}\text{O}_{105}\text{P}_{16}$	5510,0	1377,3 [M-4H] <sup>4-</sup> 1837,2 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>oGFPT</b>	158000	$\text{C}_{181}\text{H}_{225}\text{N}_{61}\text{O}_{107}\text{P}_{16}$	5460,0	1365,0 [M-4H] <sup>4-</sup> 1820,3 [M-3H] <sup>3-</sup>

Oligo-nukleotid	$\epsilon$ (260 nm) / L(mol·cm) <sup>-1</sup>	Summenformel	berech. Masse / Da	gef. Masse / m/z
<b>oGFPC</b>	155300	C <sub>179</sub> H <sub>223</sub> N <sub>63</sub> O <sub>105</sub> P <sub>16</sub>	5430,0	1357,5 [M-4H] <sup>4-</sup> 1810,3 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>MeoGFPT</b>	160600	C <sub>182</sub> H <sub>227</sub> N <sub>61</sub> O <sub>107</sub> P <sub>16</sub>	5474,0	1368,4 [M-4H] <sup>4-</sup> 1825,0 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>2PydUA</b>	175600	C <sub>181</sub> H <sub>216</sub> N <sub>62</sub> O <sub>100</sub> P <sub>16</sub>	5353,0	1338,1 [M-4H] <sup>4-</sup> 1784,4 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>2PydUG</b>	168900	C <sub>181</sub> H <sub>216</sub> N <sub>62</sub> O <sub>102</sub> P <sub>16</sub>	5385,0	1346,1 [M-4H] <sup>4-</sup> 1795,1 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>2PydUT</b>	163700	C <sub>181</sub> H <sub>218</sub> N <sub>56</sub> O <sub>104</sub> P <sub>16</sub>	5334,9	1338,1 [M-4H] <sup>4-</sup> 1795,1 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>2PydUC</b>	161000	C <sub>179</sub> H <sub>216</sub> N <sub>58</sub> O <sub>102</sub> P <sub>16</sub>	5304,9	1325,9 [M-4H] <sup>4-</sup> 1768,4 [M-3H] <sup>3-</sup>
<b>II</b>	205740	C <sub>238</sub> H <sub>285</sub> H <sub>60</sub> O <sub>135</sub> P <sub>20</sub>	6762,2	3379,0 [M-2H] <sup>2-</sup> 6764,5 [M-H] <sup>-</sup>
<b>III-0</b>	216330	C <sub>237</sub> H <sub>282</sub> N <sub>60</sub> O <sub>135</sub> BrP <sub>20</sub>	6826,1	3412,9 [M-2H] <sup>2-</sup> 6826,5 [M-H] <sup>-</sup>
<b>III-1</b>	216330	C <sub>237</sub> H <sub>282</sub> N <sub>60</sub> O <sub>135</sub> BrP <sub>20</sub>	6826,1	3411,9 [M-2H] <sup>2-</sup> 6825,9 [M-H] <sup>-</sup>
<b>III-2</b>	216330	C <sub>237</sub> H <sub>282</sub> N <sub>60</sub> O <sub>135</sub> BrP <sub>20</sub>	6826,1	3413,1 [M-2H] <sup>2-</sup> 6826,8 [M-H] <sup>-</sup>
<b>III-3</b>	216330	C <sub>237</sub> H <sub>282</sub> N <sub>60</sub> O <sub>135</sub> BrP <sub>20</sub>	6826,1	3414,4 [M-2H] <sup>2-</sup> 6827,4 [M-H] <sup>-</sup>
<b>III-4</b>	216330	C <sub>237</sub> H <sub>282</sub> N <sub>60</sub> O <sub>135</sub> BrP <sub>20</sub>	6826,1	3413,6 [M-2H] <sup>2-</sup> 6826,7 [M-H] <sup>-</sup>
<b>V</b>	205740	C <sub>238</sub> H <sub>285</sub> H <sub>60</sub> O <sub>135</sub> P <sub>20</sub>	6762,2	3379,7 [M-2H] <sup>2-</sup> 6763,0 [M-H] <sup>-</sup>
<b>VI-1</b>	216330	C <sub>237</sub> H <sub>282</sub> N <sub>60</sub> O <sub>135</sub> BrP <sub>20</sub>	6826,1	3413,3 [M-2H] <sup>2-</sup> 6826,9 [M-H] <sup>-</sup>

### 7.3.5 Hybridisierung

1,0 eq. an modifiziertem DNA-Strang wurde mit 1,2 eq. Gegenstrang in 250 mM NaCl und 10 mM NaP<sub>i</sub> 10 min auf 90 °C aufgeheizt und dann langsam auf R.T. abgekühlt.

## 7.4 Belichtungsexperimente

500  $\mu\text{L}$  der Oligonukleotidlg. (1,0  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , 250 mM  $\text{NaCl}$ ) wurden durch eine 200 W Hg/Xe Lampe (*Oriel Instruments*) mit einem luftgekühltem 320 nm Cutoff-Filter (WG 320, 3,0 mm, *Schott*) bestrahlt. Über 30 min erfolgte alle 5 min eine Entnahme von 20  $\mu\text{L}$ , die mit 20  $\mu\text{L}$  Piperidinlg. (20 % in  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt 30 min bei 90 °C inkubiert wurden. Nach der Entfernung des Lösungsmittels in einem Vakuumkonzentrator wurde die Probe in 12  $\mu\text{L}$  Beladungspuffer (80 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,02 % Xylen Cyanol FF) gelöst und 5  $\mu\text{L}$  auf ein 12 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel gegeben. Die Analyse der Gele geschah mit einem Fluoreszenz-imager ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 20$  nm) und die Quantifizierung der Banden erfolgte über die Fluoreszenzintensität des Fluoreszeinmarkers relativ zu der gesamten Intensität. Die bei 0 min erlangten Werte dienten zur Hintergrundkorrektur. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt, um Mittelwerte ( $m$ ) mit Standardabweichungen ( $\sigma$ ) zu bekommen.

**Tab. 11:** Mittelwerte  $m$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der vorhandenen Menge an intaktem modifiziertem DNA-Strang bei Belichtungsexperimenten

t / min	III-1_DNA1		III-2_DNA1		III-3_DNA1		III-4_DNA1	
	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$
0	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
5	0,885	0,022	0,989	0,004	0,985	0,005	0,992	0,004
10	0,784	0,036	0,974	0,001	0,975	0,004	0,985	0,004
15	0,706	0,046	0,964	0,004	0,969	0,006	0,978	0,007
20	0,649	0,048	0,954	0,005	0,957	0,011	0,973	0,008
25	0,602	0,047	0,939	0,003	0,950	0,007	0,962	0,004
30	0,554	0,054	0,927	0,005	0,939	0,002	0,953	0,003
t / min	III-1_RNA1		III-2_RNA1		III-3_RNA1		III-4_RNA1	
	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$
0	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,001	1,000	0,000
5	0,866	0,003	0,922	0,014	0,954	0,002	0,968	0,006
10	0,740	0,011	0,854	0,023	0,932	0,006	0,942	0,009
15	0,644	0,022	0,777	0,032	0,897	0,011	0,904	0,006
20	0,541	0,031	0,724	0,036	0,868	0,022	0,883	0,020
25	0,469	0,031	0,657	0,026	0,854	0,023	0,852	0,004
30	0,416	0,031	0,595	0,014	0,808	0,013	0,813	0,013

t / min	III-1_Ina1		III-2_Ina1		III-3_Ina1		III-4_Ina1	
	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$
0	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
5	0,830	0,006	0,955	0,009	0,982	0,006	0,987	0,004
10	0,696	0,012	0,919	0,003	0,964	0,006	0,974	0,005
15	0,582	0,007	0,886	0,004	0,949	0,006	0,958	0,009
20	0,473	0,019	0,837	0,014	0,938	0,008	0,951	0,012
25	0,384	0,006	0,794	0,011	0,927	0,012	0,935	0,007
30	0,326	0,025	0,758	0,025	0,917	0,008	0,926	0,009
t / min	III-1_LNA1		III-2_LNA1		III-3_LNA1		III-4_LNA1	
	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$
0	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
5	0,760	0,036	0,976	0,006	0,997	0,002	0,998	0,002
10	0,577	0,030	0,959	0,002	0,994	0,002	0,994	0,001
15	0,452	0,037	0,942	0,006	0,991	0,002	0,992	0,002
20	0,359	0,018	0,930	0,004	0,986	0,001	0,990	0,001
25	0,301	0,025	0,915	0,006	0,984	0,001	0,987	0,002
30	0,235	0,030	0,903	0,005	0,981	0,002	0,983	0,002
t / min	VI-1_DNA2		VI-1_RNA2		VI-1_Ina2		VI-1_LNA2	
	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$	m	$\sigma$
0	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
5	0,922	0,012	0,860	0,015	0,889	0,023	0,967	0,002
10	0,836	0,012	0,708	0,022	0,779	0,035	0,921	0,015
15	0,746	0,008	0,626	0,025	0,696	0,030	0,875	0,016
20	0,665	0,010	0,524	0,031	0,620	0,035	0,836	0,014
25	0,598	0,028	0,457	0,034	0,535	0,041	0,788	0,023
30	0,553	0,020	0,376	0,031	0,498	0,028	0,762	0,019

Die Daten wurden monoexponentiell gefittet:  $y = e^{-k/t}$

**Tab. 12:** Monoexponentieller Fit der Abnahme an intaktem modifiziertem DNA-Strang

Duplex	k	Fehler	COD R <sup>2</sup>
III-1_DNA1	2,117E-02	6,46E-04	0,986
III-2_DNA1	2,470E-03	3,42E-05	0,997
III-3_DNA1	2,130E-03	6,10E-05	0,983
III-4_DNA1	1,540E-03	3,44E-05	0,991
III-1_RNA1	2,988E-02	2,43E-04	0,999
III-2_RNA1	1,673E-02	1,98E-04	0,998
III-3_RNA1	6,930E-03	1,89E-04	0,986
III-4_RNA1	6,560E-03	1,25E-04	0,994
III-1_Ina1	3,724E-02	3,07E-04	0,999
III-2_Ina1	9,000E-03	1,62E-04	0,995
III-3_Ina1	3,100E-03	9,44E-05	0,981
III-4_Ina1	2,630E-03	4,14E-05	0,995
III-1_LNA1	5,214E-02	1,16E-03	0,996
III-2_LNA1	3,600E-03	1,08E-04	0,981
III-3_LNA1	6,460E-04	1,75E-05	0,987
III-4_LNA1	5,509E-04	1,21E-05	0,991
VI-1_DNA2	1,983E-02	3,61E-04	0,996
VI-1_RNA2	3,211E-02	4,15E-04	0,998
VI-1_Ina2	2,411E-02	2,82E-04	0,998
VI-1_LNA2	9,070E-03	1,84E-04	0,994

Die Strangbruchgeschwindigkeiten  $r$  wurden aus den Anfangsphasen der Auftragungen durch linearen Fit gewonnen.

**Tab. 13:** Linearer Fit der Anfangsphase von  $y$  in Abhängigkeit von  $t$

Duplex	$r / \text{min}^{-1}$	Fehler	COD $R^2$	$\ln(r / \text{min}^{-1})$
III-1_DNA1	1,85E-02	8,58E-05	1,00	-3,99
III-2_DNA1	2,41E-03	1,74E-06	1,00	-6,03
III-3_DNA1	2,08E-03	1,30E-06	1,00	-6,18
III-4_DNA1	1,52E-03	6,84E-07	1,00	-6,49
III-1_RNA1	2,58E-02	1,47E-04	1,00	-3,66
III-2_RNA1	1,46E-02	6,03E-05	1,00	-4,23
III-3_RNA1	6,42E-03	1,29E-05	1,00	-5,05
III-4_RNA1	6,10E-03	1,16E-05	1,00	-5,10
III-1_Ina1	3,25E-02	2,01E-04	1,00	-3,43
III-2_Ina1	8,15E-03	2,11E-05	1,00	-4,81
III-3_Ina1	2,99E-03	2,70E-06	1,00	-5,81
III-4_Ina1	2,55E-03	1,95E-06	1,00	-5,97
III-1_LNA1	4,71E-02	2,99E-04	1,00	-3,06
III-2_LNA1	3,46E-03	3,63E-06	1,00	-5,67
III-3_LNA1	6,41E-04	1,21E-07	1,00	-7,35
III-4_LNA1	5,47E-04	8,84E-08	1,00	-7,51
VI-1_DNA2	1,78E-02	7,22E-05	1,00	-4,03
VI-1_RNA2	2,75E-02	1,67E-04	1,00	-3,59
VI-1_Ina2	2,11E-02	1,04E-04	1,00	-3,86
VI-1_LNA2	8,20E-03	2,14E-05	1,00	-4,80



## Literaturverzeichnis

- 1 I. Hirao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 622-627.
- 2 J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- 3 A. Abbott, *Nature* **2010**, *464*, 668-669.
- 4 *Nature* **2001**, *409*, 813-964.
- 5 *Science* **2001**, *291*, 1218-1351.
- 6 *Nature* **2010**, *464*, 649-650.
- 7 *Nature* **2011**, *470*, 140-140.
- 8 E. S. Lander, *Nature* **2011**, *470*, 187-197.
- 9 M. Selbach, B. Schwanhausser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, N. Rajewsky, *Nature* **2008**, *455*, 58-63.
- 10 M. Ingman, H. Kaessmann, S. Paabo, U. Gyllensten, *Nature* **2000**, *408*, 708-713.
- 11 A. Khobta, B. Epe, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutag.* **2012**, *736*, 5-14.
- 12 E. V. Bichenkova, Z. Lang, X. Yu, C. Rogert, K. T. Douglas, *BBA - Gene Regul. Mech.* **2011**, *1809*, 1-23.
- 13 D. R. Bentley, S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow, G. P. Smith, J. Milton, C. G. Brown, K. P. Hall, D. J. Evers, C. L. Barnes, H. R. Bignell, J. M. Boutell, J. Bryant, R. J. Carter, R. Keira Cheetham, A. J. Cox, D. J. Ellis, M. R. Flatbush, N. A. Gormley, S. J. Humphray, L. J. Irving, M. S. Karbelashvili, S. M. Kirk, H. Li, X. Liu, K. S. Maisinger, L. J. Murray, B. Obradovic, T. Ost, M. L. Parkinson, M. R. Pratt, I. M. J. Rasolonjatovo, M. T. Reed, R. Rigatti, C. Rodighiero, M. T. Ross, A. Sabot, S. V. Sankar, A. Scally, G. P. Schroth, M. E. Smith, V. P. Smith, A. Spiridou, P. E. Torrance, S. S. Tzonev, E. H. Vermaas, K. Walter, X. Wu, L. Zhang, M. D. Alam, C. Anastasi, I. C. Aniebo, D. M. D. Bailey, I. R. Bancarz, S. Banerjee, S. G. Barbour, P. A. Baybayan, V. A. Benoit, K. F. Benson, C. Bevis, P. J. Black, A. Boodhun, J. S. Brennan, J. A. Bridgham, R. C. Brown, A. A. Brown, D. H. Buermann, A. A. Bundu, J. C. Burrows, N. P. Carter, N. Castillo, M. Chiara E. Catenazzi, S. Chang, R. Neil Cooley, N. R. Crake, O. O. Dada, K. D. Diakoumakos, B. Dominguez-Fernandez, D. J. Earnshaw, U. C. Egbujor, D. W. Elmore, S. S. Etchin, M. R. Ewan, M. Fedurco, L. J. Fraser, K. V. Fuentes Fajardo, W. Scott Furey, D. George, K. J. Gietzen, C. P. Goddard, G. S. Golda, P. A. Granieri, D. E. Green, D. L. Gustafson, N. F. Hansen, K. Harnish, C. D. Haudenschild, N. I. Heyer, M. M. Hims, J. T. Ho, A. M. Horgan, et al., *Nature* **2008**, *456*, 53-59.
- 14 J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. deWinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D.

- Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach, S. Turner, *Science* **2009**, 323, 133-138.
- 15 R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 5487-5502.
- 16 R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3717-3735.
- 17 T. Stafforst, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 899-911.
- 18 K.-Y. Chen, Y.-M. Cheng, C.-H. Lai, C.-C. Hsu, M.-L. Ho, G.-H. Lee, P.-T. Chou, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4534-4535.
- 19 H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, F. I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 13617-13622.
- 20 K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormö, S. J. Remington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 2306-2311.
- 21 S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223-2311.
- 22 R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, 230, 1350-1354.
- 23 G. H. McGall, in *Nucleoside Triphosphates and their Analogs - Chemistry, Biotechnology, and Biological Applications* (Ed.: M. Vaghefi, M.), Taylor & Francis Group, New York, **2005**, 269-328.
- 24 S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1993**, 49, 6123-6194.
- 25 S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- 26 S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3337-3340.
- 27 P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, J. Gierlich, T. Carell, *Org. Lett.* **2008**, 10, 249-251.
- 28 M. Vaghefi, *Nucleoside Triphosphates and their Analogs : Chemistry, Biotechnology, and Biological Applications*, Marcel Dekker, New York, NY, USA, **2005**.
- 29 M. Grotli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, 54, 5899-5914.
- 30 V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- 31 C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- 32 S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 558-564.
- 33 V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9879-9883.
- 34 F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Lutge, H. Andersson, I. Vermes, A. van den Berg, *Electrophoresis* **2006**, 27, 5073-5080.
- 35 J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8846-8847.
- 36 H.-A. Wagenknecht, in *Functional Organic Materials - Syntheses, Strategies and Applications* (Eds.: U. F. Bunz, T. J. J. Müller), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, 441-464.
- 37 H.-A. Wagenknecht, in *Charge Transfer in DNA* (Ed.: H.-A. Wagenknecht), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, 1-25.
- 38 S. Kanvah, J. Joseph, G. B. Schuster, R. N. Barnett, C. L. Cleveland, U. Landman, *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 280-287.
- 39 E. Stulz, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 4456-4469.
- 40 H.-A. Wagenknecht, in *NanoBioTechnology: Bioinspired Devices and Materials of the Future* (Eds.: O. Shoseyov, I. Levy), Humana Press, Totowa, **2007**, 89-106.
- 41 V. Sartor, P. T. Henderson, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11027-11033.

- 42 M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11471-11483.
- 43 M. Tanaka, B. Elias, J. K. Barton, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2423-2428.
- 44 P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1637-1639.
- 45 C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1842-1844.
- 46 T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839-1842.
- 47 R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878-1879.
- 48 A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 318-321.
- 49 C. Wanninger-Weiß, Dissertation, Regensburg **2008**.
- 50 C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64-71.
- 51 K. B. Mullis, *Sci. Am.* **1990**, *262*, 56-65.
- 52 L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.
- 53 B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- 54 G. A. Crosby, J. N. Demas, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-1024.
- 55 M. Kasha, *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55-70.
- 56 M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- 57 I. Tinoco, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4785-4790.
- 58 U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7026-7030.
- 59 R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- 60 J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2088-2090.
- 61 S. M. Langenegger, R. Häner, *Chem. Commun.* **2004**, 2792-2793.
- 62 H. Kashida, H. Asanuma, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7196-7204.
- 63 F. Seela, S. A. Ingale, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 284-295.
- 64 R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9307-9310.
- 65 N. Bouquin, V. L. Malinovskii, R. Häner, *Chem. Commun.* **2008**, 1974-1976.
- 66 M. Adamczyk, C. M. Chan, J. R. Fino, P. G. Mattingly, *J. Org. Chem.* **1999**, *65*, 596-601.
- 67 M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269-282.
- 68 A. N. Glazer, H. S. Rye, *Nature* **1992**, *359*, 859-861.
- 69 H. R. Mahler, P. S. Perlman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *148*, 115-129.
- 70 C. Prunkl, M. Pichlmaier, R. Winter, V. Kharlanov, W. Rettig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3392-3402.
- 71 N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1845-1847.
- 72 R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.
- 73 T. Ehrenschwender, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2008**, 3657-3662.
- 74 T. Ehrenschwender, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2301-2304.
- 75 A. Granzhan, H. Ihmels, G. Viola, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1254-1267.
- 76 H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum, *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32*, e103.
- 77 J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, *46*, 39-51.
- 78 C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239-1248.
- 79 C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268-7272.
- 80 C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.

- 81 A. Fegan, P. S. Shirude, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2008**, 2004-2006.
- 82 C. Wanninger-Weiß, F. D. Pasquale, T. Ehrenschwender, A. Marx, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2008**, 1443-1445.
- 83 H. Cahova, R. Pohl, L. Bednarova, K. Novakova, J. Cvacka, M. Hocek, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3657-3660.
- 84 F. Seela, M. Zulauf, M. Sauer, M. Deimel, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 910-927.
- 85 R. Varghese, P. K. Gajula, T. K. Chakraborty, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2009**, 3253-3257.
- 86 M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. C. Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 389-400.
- 87 M. Weinberger, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2012**, 648-652.
- 88 J. Barbaric, C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 364-370.
- 89 J. Stambasky, M. Hocek, P. Kocovsky, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764.
- 90 H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 39-44.
- 91 C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- 92 F. Menacher, M. Rubner, S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4263-4266.
- 93 M. Aigner, M. Hartl, K. Fauster, J. Steger, K. Bister, R. Micura, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 47-51.
- 94 U. Wenge, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2011**, 502-508.
- 95 S. M. M. Conron, A. K. Thazhathveetil, M. R. Wasielewski, A. L. Burin, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14388-14390.
- 96 S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- 97 C. B. Reese, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868.
- 98 J. Gierlich, K. Gutschiedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486-9494.
- 99 S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2007**, 1828-1830.
- 100 M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2498-2504.
- 101 J. D. Kahl, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 597-604.
- 102 T. Ehrenschwender, B. R. Varga, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1761-1764.
- 103 M. M. Masud, A. Ozaki-Nakamura, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 584-588.
- 104 C. Wojczewski, K. Stolze, J. W. Engels, *Synlett* **1999**, 1667-1678.
- 105 Glen Research, User Guide to DNA modification.
- 106 F. F. Chehab, Y. W. Kan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 9178-9182.
- 107 K. Trebesius, D. Harmsen, A. Rakin, J. Schmelz, J. Heesemann, *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 2557-2564.
- 108 L. M. Smith, R. J. Kaiser, J. Z. Sanders, L. E. Hood, in *Methods in Enzymology*, Vol. 155 (Ed.: W. Ray), Academic Press, **1987**, 260-301.
- 109 S. C. Tyagi, F. Y. Wu, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10684-10688.
- 110 J. B. Randolph, A. S. Waggoner, *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 2923-2929.
- 111 H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- 112 E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- 113 C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, S. Bräse, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4840-4871.
- 114 R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *2*, 565-598.

- 115 Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- 116 A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388-1405.
- 117 H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- 118 J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- 119 F. Seela, V. Sirivolu, P. Chittepudi, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 211-224.
- 120 P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- 121 G. P. Miller, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2404-2410.
- 122 K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 581-589.
- 123 P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- 124 N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- 125 C. Dai, L. Sheng, H. Peng, A. B. Draganov, Z. Huang, B. Wang, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3598-3600.
- 126 M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6257-6259.
- 127 O. Diels, K. Alder, *Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98-122.
- 128 B. Seelig, A. Jäschke, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7729-7732.
- 129 K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352-5358.
- 130 L. Fruk, A. Grondin, W. E. Smith, D. Graham, *Chem. Commun.* **2002**, 2100-2101.
- 131 V. Borsenberger, S. Howorka, *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, 1477-1485.
- 132 A. Okamoto, T. Taiji, K. Tainaka, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1895-1896.
- 133 M. Wiessler, P. Lorenz, H. Fleischhacker, C. Kliem, A. Jäschke, J. Schoch, **2011**, WO/2011/095336.
- 134 J. Schoch, S. Ameta, A. Jäschke, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12536-12537.
- 135 J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jäschke, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1382-1386.
- 136 Abdruck genehmigt von J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. deWinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach, S. Turner, *Science* **2009**, *323*, 133-138. Copyright 2009 The American Association for the Advancement of Science.
- 137 S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- 138 J. R. Grunwell, J. L. Glass, T. D. Lacoste, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4295-4303.
- 139 G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 6171-6176.

- 140 J.-P. Knemeyer, N. Marmé, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3717-3724.
- 141 C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.
- 142 N. R. Conley, A. K. Pomerantz, H. Wang, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7929-7931.
- 143 R. L. Nolan, H. Cai, J. P. Nolan, P. M. Goodwin, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6236-6243.
- 144 L. A. Neely, S. Patel, J. Garver, M. Gallo, M. Hackett, S. McLaughlin, M. Nadel, J. Harris, S. Gullans, J. Rooke, *Nat. Meth.* **2006**, *3*, 41-46.
- 145 Z. Földes-Papp, M. Kinjo, M. Tamura, E. Birch-Hirschfeld, U. Demel, G. P. Tilz, *Exp. Mol. Pathol.* **2005**, *78*, 177-189.
- 146 M. B. Wabuyele, H. Farquar, W. Stryjewski, R. P. Hammer, S. A. Soper, Y.-W. Cheng, F. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6937-6945.
- 147 Abdruck genehmigt von M. B. Wabuyele, H. Farquar, W. Stryjewski, R. P. Hammer, S. A. Soper, Y.-W. Cheng, F. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6937-6945. Copyright 2003 American Chemical Society.
- 148 C.-Y. Zhang, H.-C. Yeh, M. T. Kuroki, T.-H. Wang, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 826-831.
- 149 Abdruck genehmigt von C.-Y. Zhang, H.-C. Yeh, M. T. Kuroki, T.-H. Wang, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 826-831. Copyright 2005 Nature Publishing Group.
- 150 D. Davenport, J. A. C. Nicol, *Proc. R. Soc. London, B* **1955**, *144*, 399-411.
- 151 O. Shimomura, B. Musicki, Y. Kishi, *Biochem. J.* **1988**, *251*, 405-410.
- 152 O. Shimomura, *Biol. Bull.* **1995**, *189*, 1-5.
- 153 J. G. Morin, J. W. Hastings, *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 313-318.
- 154 M. Zimmer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759-781.
- 155 O. Shimomura, *FEBS Letters* **1979**, *104*, 220-222.
- 156 S. J. Remington, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 714-721.
- 157 H. Mizuno, T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura, A. Miyawaki, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1051-1058.
- 158 A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 448-455.
- 159 R. Heim, D. C. Prashier, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 12501-12504.
- 160 H. Hosoi, H. Mizuno, A. Miyawaki, T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 22853-22860.
- 161 D. Stoner-Ma, A. A. Jaye, P. Matousek, M. Towrie, S. R. Meech, P. J. Tonge, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2864-2865.
- 162 D. Stoner-Ma, E. H. Melief, J. Nappa, K. L. Ronayne, P. J. Tonge, S. R. Meech, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 22009-22018.
- 163 Y. You, Y. He, P. E. Burrows, S. R. Forrest, N. A. Petasis, M. E. Thompson, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1678-1681.
- 164 B. Prüger, T. Bach, *Synthesis* **2007**, 1103-1106.
- 165 J. Conyard, M. Kondo, I. A. Heisler, G. Jones, A. Baldrige, L. M. Tolbert, K. M. Solntsev, S. R. Meech, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1571-1577.
- 166 S. Kojima, H. Ohkawa, T. Hirano, S. Maki, H. Niaw, M. Ohashi, S. Inouye, F. I. Tsuji, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5239-5242.
- 167 F. McCapra, Z. Razavi, A. P. Neary, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 790-791.
- 168 J. Dong, F. Abulwerdi, A. Baldrige, J. Kowalik, K. M. Solntsev, L. M. Tolbert, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14096-14098.
- 169 L. Wu, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4089-4096.

- 170 A. Baldrige, K. M. Solntsev, C. Song, T. Tanioka, J. Kowalik, K. Hardcastle, L. M. Tolbert, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5686-5688.
- 171 A. Baldrige, S. R. Samanta, N. Jayaraj, V. Ramamurthy, L. M. Tolbert, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1498-1499.
- 172 J. S. Paige, K. Y. Wu, S. R. Jaffrey, *Science* **2011**, 333, 642-646.
- 173 L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 114-125.
- 174 J. Kang, G. Zhao, J. Xu, W. Yang, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2868-2870.
- 175 P. P. Haasbroek, D. W. Oliver, A. J. M. Carpy, *J. Mol. Struct.* **2003**, 648, 61-67.
- 176 P. M. Shafi, P. A. M. Basheer, L. Jirovitz, *Asian J. Chem.* **2006**, 18, 3188.
- 177 S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5188-5240.
- 178 R. Appel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, 14, 801-811.
- 179 V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, J. I. Tinoco, *Nucleic Acids - Structures, Properties, and Functions*, University Science Books, Sausalito, California, **2000**.
- 180 S. Neidle, *Nucleic Acid Structure and Recognition*, Elsevier, Amsterdam, **2002**.
- 181 S. A. Benner, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 784-797.
- 182 H. Asanuma, T. Fujii, T. Kato, H. Kashida, *J. Photochem. Photobiol., C* **2012**, 13, 124-135.
- 183 H. Porumb, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1979**, 34, 175-195.
- 184 D. Dziuba, V. Y. Postupalenko, M. Spadafora, A. S. Klymchenko, V. Guérineau, Y. Mély, R. Benhida, A. Burger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 10209-10213.
- 185 R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, H. Erlich, *Science* **1988**, 239, 487-491.
- 186 M. McPherson, S. Møller, *PCR (2nd Edition)*, Taylor & Francis, Independence, KY, USA, **2006**.
- 187 S. G. Gregory, K. F. Barlow, K. E. McLay, R. Kaul, D. Swarbreck, A. Dunham, C. E. Scott, K. L. Howe, K. Woodfine, C. C. A. Spencer, M. C. Jones, C. Gillson, S. Searle, Y. Zhou, F. Kokocinski, L. McDonald, R. Evans, K. Phillips, A. Atkinson, R. Cooper, C. Jones, R. E. Hall, T. D. Andrews, C. Lloyd, R. Ainscough, J. P. Almeida, K. D. Ambrose, F. Anderson, R. W. Andrew, R. I. S. Ashwell, K. Aubin, A. K. Babbage, C. L. Bagguley, J. Bailey, H. Beasley, G. Bethel, C. P. Bird, S. Bray-Allen, J. Y. Brown, A. J. Brown, D. Buckley, J. Burton, J. Bye, C. Carder, J. C. Chapman, S. Y. Clark, G. Clarke, C. Clee, V. Copley, R. E. Collier, N. Corby, G. J. Coville, J. Davies, R. Deadman, M. Dunn, M. Earthrowl, A. G. Ellington, H. Errington, A. Frankish, J. Frankland, L. French, P. Garner, J. Garnett, L. Gay, M. R. J. Ghorri, R. Gibson, L. M. Gilby, W. Gillett, R. J. Glithero, D. V. Grafham, C. Griffiths, S. Griffiths-Jones, R. Grocock, S. Hammond, E. S. I. Harrison, E. Hart, E. Haugen, P. D. Heath, S. Holmes, K. Holt, P. J. Howden, A. R. Hunt, S. E. Hunt, G. Hunter, J. Isherwood, R. James, C. Johnson, D. Johnson, A. Joy, M. Kay, J. K. Kershaw, M. Kibukawa, A. M. Kimberley, A. King, A. J. Knights, H. Lad, G. Laird, S. Lawlor, D. A. Leongamornlert, D. M. Lloyd, et al., *Nature* **2006**, 441, 315-321.
- 188 I. Hirao, M. Kimoto, R. Yamashige, *Acc Chem Res* **2012**, 45, 347-360.
- 189 D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2005**.
- 190 R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *New J. Chem.* **2010**, 34, 877-879.

- 191 L. H. Lauridsen, J. A. Rothnagel, R. N. Veedu, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 19-25.
- 192 J. C. Chaput, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9274-9275.
- 193 J. Baddiley, A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1949**, 582-586.
- 194 M. Vaghefi, M., in *Nucleoside Triphosphates and their Analogs - Chemistry, Biotechnology, and Biological Applications* (Ed.: M. Vaghefi, M.), Taylor & Francis Group, New York, **2005**, 1-23.
- 195 R. H. Hall, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5056-5060.
- 196 M. Smith, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1141-1145.
- 197 L. Goldman, J. W. Marsico, G. W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2969-2970.
- 198 M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065-5068.
- 199 K. Burgess, D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047-2060.
- 200 F. Cramer, M. Winter, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 989-996.
- 201 J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131-133.
- 202 J. L. Ruth, Y.-C. Cheng, *Mol. Pharmacol.* **1981**, *20*, 415-422.
- 203 T. Kovács, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525-4528.
- 204 J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635.
- 205 V. S. Bogachev, P. A. Ulanov, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2003**, *29*, 56-65.
- 206 Q. Sun, J. P. Edathil, R. Wu, E. D. Smidansky, C. E. Cameron, B. R. Peterson, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1703-1706.
- 207 J. A. Brown, Z. Suo, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1135-1142.
- 208 A. A. Johnson, K. A. Fiala, Z. Suo, in *Nucleoside Triphosphates and their Analogs - Chemistry, Biotechnology, and Biological Applications* (Ed.: M. Vaghefi, M.), Taylor & Francis Group, New York, **2005**, 133-168.
- 209 C. Kauk, M. Müller, M. Wagner, S. Schneider, T. Carell, *Nature Chem.* **2011**, *3*, 794-800.
- 210 K. Betz, F. Streckenbach, A. Schnur, T. Exner, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5181-5184.
- 211 M. Hocek, M. Fojta, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2233-2241.
- 212 H. Sawai, A. Ozaki-Nakamura, M. Mine, H. Ozaki, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 309-316.
- 213 H. Sawai, J. Nagashima, M. Kuwahara, R. Kitagata, T. Tamura, I. Matsui, *Chem. Biodiv.* **2007**, *4*, 1979-1995.
- 214 O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990-3993.
- 215 S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071-15082.
- 216 G. Gebeyehu, P. Y. Rao, P. SooChan, D. A. Simms, L. Klevan, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 4513-4534.
- 217 G. T. Pauly, E. V. Bobst, D. Bruckman, A. M. Bobst, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 110-116.
- 218 T. S. Godovikova, D. M. Kolpashchikov, T. N. Orlova, V. A. Richter, T. M. Ivanova, S. L. Grochovsky, T. V. Nasedkina, L. S. Victorova, A. I. Poletaev, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 529-537.
- 219 S. E. Lee, A. Sidorov, T. Goullain, N. Mignet, S. J. Thorpe, John A. Brazier, M. J. Dickman, D. P. Hornby, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2001**, *29*, 1565-1573.
- 220 T. Goullain, A. Sidorov, N. Mignet, S. J. Thorpe, S. E. Lee, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2001**, *29*, 1898-1905.
- 221 S. Obeid, M. Yulikov, G. Jeschke, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6782-6785.



- 222 S. Brakmann, S. Löbermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1427-1429.
- 223 L. H. Thoresen, G.-S. Jiao, W. C. Haaland, M. L. Metzker, K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4603-4610.
- 224 N. Staiger, A. Marx, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1963-1966.
- 225 A. F. Gardner, W. E. Jack, *Nucl. Acids Res.* **1999**, *27*, 2545-2553.
- 226 T. Ono, M. Scalf, L. M. Smith, *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 4581-4588.
- 227 F. C. Richardson, R. D. Kuchta, A. Mazurkiewicz, K. A. Richardson, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1045-1052.
- 228 C. G. Peng, M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5310-5311.
- 229 R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1207-1210.
- 230 R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 490-492.
- 231 R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8124-8125.
- 232 M. Kuwahara, S. Obika, J.-i. Nagashima, Y. Ohta, Y. Suto, H. Ozaki, H. Sawai, T. Imanishi, *Nucl. Acids Res.* **2008**, *36*, 4257-4265.
- 233 R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1404-1409.
- 234 T. Ogino, K. Sato, A. Matsuda, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2597-2605.
- 235 Y. Zhou, G. Achanta, H. Pelicano, V. Gandhi, W. Plunkett, P. Huang, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 222-229.
- 236 N. Inoue, A. Shionoya, N. Minakawa, A. Kawakami, N. Ogawa, A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15424-15425.
- 237 A. T. Horhota, J. W. Szostak, L. W. McLaughlin, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5345-5347.
- 238 J. K. Ichida, K. Zou, A. Horhota, B. Yu, L. W. McLaughlin, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2802-2803.
- 239 A. Horhota, K. Zou, J. K. Ichida, B. Yu, L. W. McLaughlin, J. W. Szostak, J. C. Chaput, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7427-7434.
- 240 H. Jannasch, Woods Hole Oceanographic Institute, **1991**.
- 241 A. C. Rodriguez, H.-W. Park, C. Mao, L. S. Beese, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 447-462.
- 242 M. W. Southworth, H. Kong, R. B. Kucera, J. Ware, H. W. Jannasch, F. B. Perler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 5281-5285.
- 243 J. M. Clark, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *16*, 9677-9686.
- 244 S. Obeid, N. Blatter, R. Kranaster, A. Schnur, K. Diederichs, W. Welte, A. Marx, *EMBO J.* **2010**, *29*, 1738-1747.
- 245 K. A. Fiala, J. A. Brown, H. Ling, A. K. Kshetry, J. Zhang, J.-S. Taylor, W. Yang, Z. Suo, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 590-602.
- 246 M. S. J. Briggs, I. Bruce, J. N. Miller, C. J. Moody, A. C. Simmonds, E. Swann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1051-1058.
- 247 G. Ghini, L. Lascialfari, C. Vinattieri, S. Cicchi, A. Brandi, D. Berti, F. Betti, P. Baglioni, M. Mannini, *Soft Matter* **2009**, *5*, 1863-1869.
- 248 R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.
- 249 J. Sauer, H. Wiest, A. Mielert, *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 3183-3207.
- 250 T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166-4170.
- 251 R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vulderson, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375-3378.
- 252 M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- 253 N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869-2872.

- 254 N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013-7016.
- 255 M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2263-2270.
- 256 R. Pipkorn, W. Waldeck, B. Didinger, M. Koch, G. Mueller, M. Wiessler, K. Braun, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 235-241.
- 257 M. Wiessler, W. Waldeck, C. Kliem, R. Pipkorn, K. Braun, *Int. J. Med. Sci.* **2010**, *7*, 19-28.
- 258 M. Wiessler, E. Müller, P. Lorenz, **2007**, WO/2007/144200.
- 259 B. R. Varga, M. Kallay, K. Hegyi, S. Beni, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 822-828.
- 260 H. Pedersen, A. H. Gouilaev, T. Franch, C. K. Sams, E. K. Olsen, F. A. Slok, G. N. Husemoen, F. J., L. Hyltoft, M. Norregaard-Madsen, M. A. Godskesen, S. S. Glad, T. Thisted, P.-O. Freskgard, A. Holtmann, **2004**, US 2004/0049008 A1.
- 261 K. A. Cruickshank, D. L. Stockwell, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5221-5224.
- 262 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.
- 263 J. A. Brazier, T. Shibata, J. Townsley, B. F. Taylor, E. Frary, N. H. Williams, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 1362-1371.
- 264 M. Nuzzolo, A. Grabulosa, A. M. Z. Slawin, N. J. Meeuwenoord, G. A. van der Marel, P. C. J. Kamer, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3229-3236.
- 265 E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
- 266 E. Pelt-Verkuil, A. van Belkum, J. P. Hays, *Principles and Technical Aspects of PCR Amplifikation*, Springer Science + Business Media B. V., Dordrecht, **2008**.
- 267 H. Kong, R. B. Kucera, W. E. Jack, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1965-1975.
- 268 F. B. Perler, D. G. Comb, W. E. Jack, L. S. Moran, B. Qiang, R. B. Kucera, J. Benner, B. E. Slatko, D. O. Nwankwo, S. K. Hempstead, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5577-5581.
- 269 H. W. Jannasch, C. O. Wirsén, S. J. Molyneaux, T. A. Langworthy, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 3472-3481.
- 270 M. B. Kermekchiev, L. I. Kirilova, E. E. Vail, W. M. Barnes, *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, e40.
- 271 S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17678-17682.
- 272 N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 201-209.
- 273 Y. A. Berlin, A. L. Burin, M. A. Ratner, *Superlattice Microst.* **2000**, *28*, 241-252.
- 274 D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411-415.
- 275 H.-A. Wagenknecht, *Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- 276 J. Genereux, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1642-1662.
- 277 B. Giese, A. Biland, *Chem. Commun.* **2002**, 667-672.
- 278 M. Fujitsuka, T. Majima, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 11234-11244.
- 279 J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12759-12765.
- 280 G. B. Schuster, U. Landman, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, 139-161.
- 281 D. Segal, A. Nitzan, W. B. Davis, M. R. Wasielewski, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3817-3829.

- 282 T. Kubar, U. Kleinekathöfer, M. Elstner, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 13107-13117.
- 283 Abdruck genehmigt von J. Genereux, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1642-1662. Copyright 2010 American Chemical Society.
- 284 H. Cohen, C. Nogues, R. Naaman, D. Porath, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 11589-11593.
- 285 D. M. Ceres, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14964-14965.
- 286 X. Guo, A. A. Gorodetsky, J. Hone, J. K. Barton, C. Nuckolls, *Nature Nanotechnol.* **2008**, *3*, 163-167.
- 287 S.-P. Liu, S. H. Weisbrod, Z. Tang, A. Marx, E. Scheer, A. Erbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3313-3316.
- 288 D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635-638.
- 289 H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407-410.
- 290 H.-A. Wagenknecht, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 974-1006.
- 291 M. J. Park, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15320-15323.
- 292 R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322.
- 293 Y. A. Berlin, I. V. Kurnikov, D. Beratan, M. A. Ratner, A. L. Burin, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *237*, 1-136.
- 294 W. B. Davis, S. Hess, I. Naydenova, R. Haselsberger, A. Ogrodnik, M. D. Newton, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2422-2423.
- 295 K. Fukui, K. Tanaka, M. Fujitsuka, A. Watanabe, O. Ito, *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *50*, 18-27.
- 296 J. D. Slinker, N. B. Muren, S. E. Renfrew, J. K. Barton, *Nature Chem.* **2011**, *3*, 228-233.
- 297 B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 612-618.
- 298 B. Giese, S. Wessely, M. Spormann, U. Lindemann, E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 996-998.
- 299 S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701-4709.
- 300 A. M. Kuznetsov, *Charge Transfer in Physics, Chemistry and Biology: Physical Mechanisms of Elementary Processes and an Introduction to the Theory*, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, **1995**.
- 301 C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernández, B. Kohler, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217-239.
- 302 N. K. Schwalb, F. Temps, *Science* **2008**, *322*, 243-245.
- 303 C. E. Crespo-Hernandez, K. d. L. Harpe, B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10844-10845.
- 304 K. E. Augustyn, J. C. Genereux, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5731-5733.
- 305 F. Chen, J. Hihath, Z. Huang, X. Li, N. J. Tao, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 535-564.
- 306 K. H. Müller, *Phys. Rev. B* **2006**, *73*, 045403-045406.
- 307 A. A. Gorodetsky, O. Green, E. Yavin, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1434-1441.
- 308 E. M. Boon, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1140-1147.
- 309 M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5896-5900.
- 310 A. K. Boal, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 312-321.
- 311 L. Valis, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 36-38.

- 312 Y. Osakada, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *Chem. Commun.* **2008**, 2656-2658.
- 313 T. Liu, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10160-10161.
- 314 M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13234-13235.
- 315 F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673-676.
- 316 F. Boussicault, M. Robert, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2622-2645.
- 317 C. E. Crespo-Hernández, D. M. Close, L. Gorb, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 5386-5395.
- 318 T. Caruso, M. Carotenuto, E. Vasca, A. Peluso, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15040-15041.
- 319 C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6439-6442.
- 320 S. S. Shinde, A. Maroz, M. P. Hay, R. F. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5203-5207.
- 321 S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.
- 322 T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781-788.
- 323 M. F. Sistare, S. J. Codden, G. Heimlich, H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4742-4749.
- 324 F. Lewis, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12037-12038.
- 325 E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3868-3874.
- 326 O. Schiemann, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7214-7220.
- 327 M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461-17472.
- 328 N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691.
- 329 E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.
- 330 E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990-1009.
- 331 U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30*, 4918-4925.
- 332 H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, in *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application* (Ed.: H.-A. Wagenknecht), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, 197-224.
- 333 N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2978-2980.
- 334 M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 706-712.
- 335 T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865-3877.
- 336 A. Trifonov, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *409*, 277-280.
- 337 A. G. Crawford, A. D. Dwyer, Z. Liu, A. Steffen, A. Beeby, L.-O. Plasson, D. J. Tozer, T. B. Marder, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13349-13362.
- 338 M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13053-13066.
- 339 C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871-1876.
- 340 T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480-11481.
- 341 W. Lu, D. A. Vicic, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7970-7980.
- 342 A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237.
- 343 S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1302-1303.
- 344 D. Fazio, C. Trindler, K. Heil, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 206-212.

- 345 Z. A. Doddridge, J. L. Warner, P. M. Cullis, G. D. D. Jones, *Chem. Commun.* **1998**, 1997-1998.
- 346 H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6720-6721.
- 347 G. P. Cook, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10025-10030.
- 348 Y. Xu, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1354-1362.
- 349 H. Sugiyama, K. Fujimoto, I. Saito, E. Kawashima, T. Sekine, Y. Ishido, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1805-1808.
- 350 T. Chen, G. P. Cook, A. T. Koppisch, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3861-3866.
- 351 R. Tashiro, A. Ohtsuki, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14361-14363.
- 352 Abdruck genehmigt von R. Tashiro, A. Ohtsuki, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14361-14363. Copyright 2010 American Chemical Society.
- 353 Abdruck genehmigt von X. J. Lu, W. K. Olson, *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31*, 5108-5121. Copyright 2003 Oxford University Press.
- 354 G. L. Conn, T. Brown, G. A. Leonard, *Nucl. Acids Res.* **1999**, *27*, 555-561.
- 355 L. Ratmeyer, R. Vinayak, Y. Y. Zhong, G. Zon, W. D. Wilson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5298-5304.
- 356 E. A. Lesnik, S. M. Freier, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10807-10815.
- 357 J. I. Gyi, G. L. Conn, A. N. Lane, T. Brown, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12538-12548.
- 358 S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735-8738.
- 359 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.
- 360 M. A. Campbell, J. Wengel, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680-5689.
- 361 M. Petersen, C. B. Nielsen, K. E. Nielsen, G. A. Jensen, K. Bondensgaard, S. K. Singh, V. K. Rajwanshi, A. A. Koshkin, B. M. Dahl, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 44-53.
- 362 Abdruck genehmigt von A. Eichert, K. Behling, C. Betzel, V. A. Erdmann, J. P. Fürste, C. Förster, *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38*, 6729-6736. Copyright 2010 Oxford University Press.
- 363 G. A. Jensen, S. K. Singh, R. Kumar, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1224-1232.
- 364 K. E. Nielsen, S. K. Singh, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 228-238.
- 365 K. E. Nielsen, J. Rasmussen, R. Kumar, J. Wengel, J. P. Jacobsen, M. Petersen, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 449-457.
- 366 D. T. Odom, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8727-8737.
- 367 K. Maie, K. Miyagi, T. Takada, M. Nakamura, K. Yamana, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13188-13189.
- 368 T. Takada, Y. Otsuka, M. Nakamura, K. Yamana, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6881-6884.
- 369 E. M. Boon, J. K. Barton, P. I. Pradeepkumar, J. Isaksson, C. Petit, J. Chattopadhyaya, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3402-3404.
- 370 K. Kawai, M. Hayashi, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9406-9409.
- 371 T. Ishiyama, J. Takagi, J. F. Hartwig, N. Miyaura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3056-3058.
- 372 T. Ishiyama, Y. Nobuta, J. F. Hartwig, N. Miyaura, *Chem. Commun.* **2003**, 2924-2925.

- 373 D. N. Coventry, A. S. Batsanov, A. E. Goeta, J. A. K. Howard, T. B. Marder, R. N. Perutz, *Chem. Commun.* **2005**, 2172-2174.
- 374 V. P. Kadysh, L. N. Kaminskii, V. L. Rummyantseva, V. L. Efimova, J. P. Strandish, *Khim. Geterotsykl. Soedin.* **1992**, 10, 1404-1408.
- 375 B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 51-70.
- 376 B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, 412, 318-320.
- 377 F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, B. Cohen, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7982-7985.
- 378 F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 791-800.
- 379 W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.
- 380 Y. Saito, K. Matsumoto, S. S. Bag, S. Ogasawara, K. Fujimoto, K. Hanawa, I. Saito, *Tetrahedron* **2008**, 64, 3578-3588.
- 381 J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, 180, 304-325.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des *KIT* zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Karlsruhe, den 05.09.12

Ulrike Wenge