

Detektion von Nukleinsäuren durch postsynthetisch modifizierte Fluoreszenzsonden auf Basis photostabiler Cyaninfarbstoffe

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

Dipl.-Chem. Peggy Bohländer

aus Bautzen, Sachsen

KARLSRUHE 2015

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Korreferent: Prof. Dr. Anne Ulrich
Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2015

Meinen Liebsten.

*„Setze Deine Ziele
groß genug, und
die Umstände
werden sich nach
Deinen Zielen
richten.“*

Mahatma Gandhi

Danksagung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von November 2011 bis Mai 2015 im Arbeitskreis von Professor Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Karlsruher Institut für Technologie angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden von Januar 2014 bis April 2014 in der Arbeitsgruppe von Professor Tirayut Vilaivan an der Chulalongkorn University in Bangkok durchgeführt.

Ich bedanke mich besonders herzlich bei meinem Doktorvater, Professor Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die sehr interessante und anwendungsorientierte Themenstellung, den großen wissenschaftlichen Freiraum und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Professor Wagenknecht für die Möglichkeit bedanken, als Wissenschaftler stets zu wachsen und Neues dazu zu lernen. Zudem bin ich dankbar für die große Unterstützung und Förderung meines Bangkok-Aufenthalts, was mir erlaubte über den „Tellerrand“ hinaus zu schauen.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

Professor Dr. Tirayut Vilaivan der Chulalongkorn Universität in Bangkok für die gute Zusammenarbeit und die allumfassende Unterstützung während und nach meiner Zeit in seinem Labor, P'Gung für die Expertise und Hilfe beim Erlernen der Pyrrolidinyll-PNA-Synthese, und seiner gesamten Gruppe für die wundervolle und unvergessliche Zeit im und außerhalb des Labors.

KHYS (Karlsruher House of Young Scientists) für die finanzielle Förderung des Auslandsaufenthalts in Thailand.

Dr. Olga Oleksiuk und Dr. Mohammed Abba für die gute Kooperation in Bezug auf die miRNA-Detektion.

Dr. Andreas Rapp und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung am KIT für die Messung meiner NMR-Proben.

Angelika Kernert, Ingrid Roßnagel und Dr. Norbert Foitzik für die sehr gute, motivierte Zusammenarbeit und die vielen Massenproben, die stets zuverlässig gemessen wurden.

Professor Dr. Manfred Kappes, PD Dr. Artur Böttcher, Professor Dr. Anne Ulrich sowie Dr. Moritz Biskup für die Möglichkeit als wissenschaftliche Hilfskraft über die gesamte Studienzeit hinweg angestellt zu sein. Zudem bin ich dankbar für die so geschaffene Möglichkeit stets neue Einblicke in die unterschiedlichsten Forschungsgebiete erhalten zu haben.

Annette Hochgesand für ihre große Motivation beim Messen unzähliger MALDI-Proben und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Suche nach diversen Bestellnummern sowie der Auskundschaftung über den Verbleib „super dringender“ Bestellungen.

Claudia Sommer für ihre sehr große Hilfsbereitschaft bei jeglichen organisatorischen sowie verwaltungstechnischen Angelegenheiten. Ihre freundliche warmherzige Art und ihre Eigenschaft auch „hinter die Kulissen“ zu schauen.

Meinen Kollegen Dr. Sebastian Barrois, Dr. Effi Bätzner, Dr. Michael Weinberger, Dr. Wolfgang Schmucker, Dr. Moritz Rubner, Dr. Sabrina Sezi, Barbara Reiß, Dr. Christian Wellner, Dr. Claudia Stubinitzky, Dr. Alexander Penner, Heidi Walter, Stefanie Arndt, Andreas Dittmer, Martin Weiser, Krisana Peewasan, Marcus Merkel, Damian Ploschik, Sergej Hermann, David Rombach, Robert Hofsäß, Benjamin Lehmann, Tamina Schneider, Christian Schwechheimer, Nadine Gaß, Dr. Thomas Ehrenschwender, Dr. Carolin Holzhauser, Philipp Ensslen, Benjamin Chaoui, Jeannine Steinmeyer für die gute Zusammenarbeit und die schönen Jahre im AKW.

Carsten, mit dem ich auch über Copepoden oder *Brachionus plicatilis* reden konnte, und dessen großes Herz ich sehr bewundere.

Damian für die gemeinsame und unvergessliche Laborzeit während seiner Forschung für die Bachelorarbeit.

Celine Geiges, deren stets zuverlässiges, sauberes Arbeiten mir die zwei Jahre als Ausbilderin leicht gemacht haben sowie ihrer tatkräftigen Unterstützung bei unzähligen Titrationen, Photostabilitäten und Farbstoffsynthesen. Weiterhin dafür, dass sie mich mit Stolz erfüllt und demnächst ihre Weiterbildung zur Chemietechnikerin abschließt.

Meinen Bachelorstudenten Ruben Garrecht für das Durchhaltevermögen bei der TO-CN-Synthese und Christian Schwechheimer für die motivierte Zusammenarbeit und, dass er mir beibrachte, was man so alles mit einer Mikrowelle machen kann.

Meinen Vertiefenstudenten David Rombach für seine pausenlose und nicht zu bremsende Begeisterungsfähigkeit und seine warmherzige Art. Benjamin Lehmann für das fleißige „on bead Clicken“ der vielen MBs sowie dem Support in Anbetracht Olgas umwerfender Sprechgeschwindigkeit.

Meinen Hiwis Johannes Becherer, der mich lehrte, dass man auch 100 mg Substanz mit einer 5 cm Fritte absaugen kann und trotzdem keine Ausbeuteverluste hat, und Christian Schwechheimer für seine unglaublich große Hilfe in der Bangkok-Vorbereitungsphase und für sein wundervoll ansteckendes Lachen.

Andreas Dittmer für die stets sonnige und offene Art sowie die Versorgung mit dem leckersten Honig der Welt.

Meinen Laborkollegen Heidi, die mir zeigte, dass man auch zwei Phosphoramidite gleichzeitig herstellen kann ohne die Nerven dabei zu verlieren, und Robert, dessen ruhiger Geist sich stets positiv bemerkbar macht.

Marcus und Dave, die das Herz am rechten Fleck tragen.

Michael für den guten wissenschaftlichen Austausch, die tolle gemeinsame Zeit in 203, und dass er das „Cruizen“ sowie „Barringer-Effinger-Pegginger“ in meine Welt gebracht hat.

Barry, der mir bei jeglichen wissenschaftlichen Überlegungen zuhörte und weiterhalf, und der sich geduldig auch die 20. Cyanin-Synthesestrategie anhörte, die „ganz sicher das erste ET-Paar liefern sollte“, sowie für seine herzliche und wundervolle Art.

Meinen Studienkollegen Steffi für ihr warmherziges und fürsorgliches Wesen und dafür, dass sie jederzeit für einen da ist, und Eric, dem ich meinen ersten Safran-Gin und das schärfste Messer in meiner Küche verdanke. Ulrike, die jede Vorlesung unterhaltsamer machte. Besonders Matthias, der die Gabe besitzt, komplexe Zusammenhänge in einen einzigen, kurzen, leicht verständlichen Satz zu verwandeln.

Effi für die belebenden Gespräche und das Gefühl, verstanden zu werden.

Christian, Heidi und Doris für das Korrekturlesen meiner Dissertation, und besonders Doris, die mir zugleich geholfen hat, jegliche Kommaregeln aufzufrischen.

Timo, als leuchtendem Vorbild meiner gesamten Studien- und Promotionszeit, für unzählige stundenlange Telefonate sowie dem Dauer-Abonnement beim Inder, für seine stete Hilfsbereitschaft, und für die gemeinsame Zeit als begeisterte Wirbellosen-Züchter.

Steffen, der zusammen mit mir einigen OC-Vorlesungen lauschte und stets den Kontakt aufrecht hält.

Melanie, die auch nach Jahren gehäufter Party-Absagen niemals zu fragen aufgehört hat, und die mich über die kulinarischen „hot spots“ von Durlach aufklären kann, für kraftspende Lernpausen und für das Rezept der legendären Erdbeerbowle.

Oktavian und Alex, die eine unglaubliche positive und beruhigende Art ausstrahlen und stets offenherzig sind.

Romana, deren freundliche, offene Art mich immer begeistert hat, für dreistündige Telefonate, die wie im Flug vergehen, und für die Jahre anhaltender Unterstützung und tiefer Freundschaft.

Meiner Ausbilderin Heike, von der ich jegliche praktischen Kniffs und Tricks erlernte, die noch heute von meinen Studenten zitiert werden „Heike hat gesagt...“ Und ohne ihren außergewöhnlichen, warmherzigen Einsatz ich heute nicht diese Zeilen schreiben könnte. Danke!

Meinen liebsten Jungs Jens, Steven und Martin, mit denen ich unendlich lange intensive Gespräche führen kann, deren einzigartige Persönlichkeiten in mir ein heimatliches Gefühl auslösen, denen ich das Wissen um Tanote Bay und meinen ersten travel-Urlaub verdanke.

Lui, für den 20 jährigen Aufbau unserer „eigenen Welt“, und dafür, dass ich mit ihm kommunizieren kann ohne ein Wort zu verlieren.

Gandalf, der mich die Bedeutung einer wahren „Kämpfernatur“ lehrte, und dessen Kampfgeist und Stärke mir ein Leben lang als Vorbild dienen werden.

My closest Thai friends Ef, Mai and Michael for your overwhelming kindness, support and awesome personalities. Ef who spends most of the time with me when I'm around Bangkok. Mai and Michael who showed me Shi mi Shabu and always take care of me. All three of you will be in my heart forever.

Meinen geliebten Großeltern, die mein Leben lang für mich da waren und immer ein großes Vorbild sein werden. Meinem lieben Opi, von dem ich das naturwissenschaftliche Wesen geerbt habe, und meiner lieben Großi, die mir beibrachte: „Wer schnell redet, denkt auch schnell.“

Meiner lieben Doris und meinem lieben Bernhard, für die ich noch heute das „Peggy-Kind“ bin, und die immer für mich da sind sowie stets ein offenes Ohr haben. Ich bin unglaublich dankbar, dass es euch gibt!

Meinem Schwesterherz für ihre BS-Eigenschaften, die mich stets aufs Neue erfreuen, und für den familiären Rückhalt sowie ihrer Stärke und ihrem Organisationstalent, das ich stets bewundert habe.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Themenstellung	5
3.	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer	7
3.2	Postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren	19
3.3	Die Fluoreszenzfarbstoffe TO, TR und CyIQ	25
3.4	Photostabilität von Cyaninfarbstoffen	31
3.5	Peptid-Nukleinsäuren (PNA)	39
4.	Entwicklung und Evaluation photostabiler Cyaninfarbstoffe	43
4.1	Synthesestrategien	43
4.2	Untersuchung der Photostabilität	57
4.3	Fluoreszenztitration mit dsDNA	71
4.4	Fluoreszenz-Quantenausbeute in Gegenwart von dsDNA	87
4.5	Evaluation aller Daten und Auswahl der Cyanine für die postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren	89
5.	„Click“-modifizierte DNA	95
5.1	Azid-Synthese und „Click“-Modifikation von DNA	95
5.2	Spektroskopische Untersuchung und Charakterisierung der einfach modifizierten DNA	101
5.3	Spektroskopische Untersuchung und Charakterisierung der zweifach modifizierten DNA	113

6.	Anwendung als Nukleinsäuresonden	131
6.1	miRNA-Detektion mit " <i>Molecular Beacons</i> "	131
6.2	Strang austausch mit "Click"-modifizierten acpcPNA-Sonden	155
6.3	Duplex-Invasion mit " <i>Click</i> "-modifizierten acpcPNA-Sonden	171
7.	Zusammenfassung	181
8.	Experimenteller Teil	185
8.1	Verbrauchsmaterialien, Methoden und Geräte	185
8.3	Oligonukleotidsynthese	189
8.4	Synthesevorschriften	199
8.4	Charakterisierung der Cyaninfarbstoffe Charakterisierung einfach modifizierter DNA	327
8.5	Charakterisierung einfach modifizierter DNA	377
8.6	Charakterisierung zweifach modifizierter DNA	387
8.7	<i>Daten der "Molecular Beacon"</i>	403
8.8	Strang austausch mit acpcPNA-Sonden	405
8.9	Duplex-Invasion mit acpcPNA	421
9.	Literaturverzeichnis	445
10.	Appendix	459
10.1	Publikationsliste	459
10.2	Beiträge zu Konferenzen	460
10.3	Lehre	461

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin	CBr ₄	Tetrabrommethan
Å	Angström	CCA	α-Cyano-4-hydroxymzimtsäure
A _(λ)	Absorbanz eines Stoffes bei der Wellenlänge λ	CD	Circulardichroismus
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
acpcPNA	Pyrrolidinyl-PNA	CHARMM	semi-empirisches Kraftfeld, generell bei Biomolekülen eingesetzt
A-DNA	doppelsträngige Form der DNA-Helix, primär bei niedriger Feuchtigkeit	<i>click A</i>	2'-O-Propargyladenin
Ak	Akzeptor	<i>click U</i>	2'-O-Propargyluridin
AM1	semi-empir. Methode zum Modellieren von Molekülen	CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
AMBER	semi-empirisches Kraftfeld (<i>molecular modeling</i>), wird bei Biomolekülen verwendet	Cu(I)	Kupfer(I), Kupfer in der Oxidationsstufe +1
APC	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3-Aminopyrrolidin-4-carbonsäure-Einheit	CuAAC	kupfer(I)katalysierte "Click"-Reaktion
APC-Spacer	kovalent verbundene (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3-Aminopyrrolidin-4-carbonsäure-Einheit als Abstandshalter	Cy3, Cy5	<i>Cyanine 3, Cyanine 5</i>
B	Helligkeit, <i>brightness</i>	CyIQ	<i>Cyanine Indole Quinoline</i>
B-DNA	doppelsträngige Form der DNA-Helix, unter physiologischen Bedingungen bevorzugt	d	<i>days</i> , Tage, Dublett, Schichtdicke
Br	Bromidrest, atomares Brom	D	Donor
bzw.	beziehungsweise	dA	2'-Desoxyadenosin
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin	DAD	<i>Diode Array Detector</i>
ca.	circa	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
		DC	Dünnschicht-Chromatographie

Abkürzungsverzeichnis

DCM	Dichlormethan	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
dG	2`-Deoxyguanosin	HO·	Hydroxyl-Radikal
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum	HO ₂ ·	Hydroperoxyl-Radikal
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid	HOMO	höchstes besetztes Molekül-orbital
DMSO	Dimethylsulfoxid	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HR-MS	Hochauflösende Massenspektroskopie
Do	Donor	Hz	Hertz
dsDNA	doppelsträngige DNA	I	Iodidrest, atomares Iod, Fluoreszenzintensität
dU	2'-Desoxyuridin	I ₀	Startwert der Emissionsintensität (I ₀)
E _(r)	Energietransfer-Effizienz	IR	Infrarotspektrometrie
EE	Ethylacetat	J _(λ)	Spektrales Überlappungsintegral
EI	Elektrische Ionisation	J	Kopplungskonstante
em	Emission	K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
eq	Äquivalente	κ ²	Dipol-Dipol- Orientierungsfaktor
eq, Äquiv.	Äquivalente	K	Kelvin
ESI	Elektrosprayionisation	KHYS	Karlsruhe House of Young Scientists
ET	Energietransfer	LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
EtOH	Ethanol	m	Multiplett, Meter
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>	M	molar, mol/L, Molmasse
FRET	Fluoreszenzresonanz- Energietransfer	MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
g	Gramm	<i>MB</i>	<i>„Molecular Beacons“</i>
G	Guanosin, Guanin	mbar	Millibar
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein	MeI	Methyliodid
h	Stunde	MeOH	Methanol
H ₂ O	Wasser	mg	Milligramm
MHz	Megahertz	nmol	Nanomol

Abkürzungsverzeichnis

min	Minute	NMR	Kernspinmagnetresonanz
miRNA	Mikro-RNA, reguliert unter anderem die Genexpression	$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
mL	Milliliter	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxid-Radikal-Anion, Hyperoxidradikal-Anion
mM	millimolar	OLEDs	<i>organic light-emitting diodes</i>
mm	Millimeter	PALM	<i>Photo Activated Localisation Microscopy</i>
MM ⁺	semi-empirisches Kraftfeld-der Molekül-Mechanik	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
mmol	Millimol	pH	pH-Wert
MS	Massenspektrometrie	PNA	Peptide Nucleic Acid
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung	PPh_3	Triphenylphosphin
N_3	Azidfunktion	ppm	<i>parts per million</i>
Na_2EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Di-Natriumsalz	r	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
Na_2SO_4	Natriumsulfat	R_0	Förster-Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz)
Na-Ascorbat	Natriumascorbat	R_f	Retentionsfaktor der DC
NaBH_3CN	Natriumcyanoborhydrid	RNA	Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ,
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat	RP	<i>Reversed Phase</i>
NaI	Natriumiodid	RT	Raumtemperatur
NaN_3	Natriumazid	s	Singulett, Sekunde
NaOH	Natronlauge	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
N_{Av}	Avogadro Konstante	ssDNA	einzelsträngige DNA
NEt_3	Triethylamin	STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
ns	Nanosekunden	T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
NaP_i	Natriumphosphatpuffer	t	Triplett
nm	Nanometer	τ	Fluoreszenzlebenszeit eines Fluorophors.
$t_{1/2}$	Halbwertszeit der Fluorophore bei Belichtung	δ	chemische Verschiebung

TBTA	Tris-[(1-Benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]amin	ΔI	Differenz der Emissionsintensität am Titrationsende und dem Startwert (I_0) eines Fluorophors
t-BuOH	tertiär-Butanol, 2-Methylpropan-2-ol	$\Delta\lambda$	bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums vom Fluorophor als Folge der DNA-Anlagerung
TCSPC	<i>time-correlated single photon counting</i>	$\epsilon(\lambda)$	molarer Extinktionskoeffizient
TFA	Trifluoressigsäure	η	Brechungsindex eines Mediums
TMS	Trimethylsilyl-gruppe	$\lambda_{\text{abs.max.}}$	Absorptionsmaximum
TO	Thiazolorange	$\lambda_{\text{em.max.}}$	Fluoreszenzmaximum
TO-CN	cyanid-modifiziertes TO	$\lambda_{\text{exc.}}$	Anregungswellenlänge
TR	Thiazolrot	λ_{Stokes}	<i>Stokes</i> -Verschiebung
TR-CN	cyanid-modifiziertes TR	ϕ_F	Fluoreszenz-Quantenausbeute
TSQ	<i>Triplet-state quencher</i>	μL	Mikroliter
U	Uridin	$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
UV/Vis	Ultraviolettes- und sichtbares Lichtspektrum		

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

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

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

1. Einleitung

„Just keep the molecules quiet and let only a few speak up“.^[1] Mit diesen Worten beschrieb *Stefan W. Hell* im Dezember 2014 bei der Verleihung des Chemie-Nobelpreises seine grundlegende Idee zur Entwicklung der STED-Mikroskopie (STED = *Stimulated Emission Depletion*). Seine Forschungsergebnisse gemeinsam mit denen von *William E. Moerner* und von *Eric Betzig* zur Einzelmolekülspektroskopie führten zu den heutigen Methoden der superaufgelösten Mikroskopie. Die erbrachte Leistung der drei Forscher wurde 2014 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

1873 beschrieb *Abbe* eine bei der Lichtmikroskopie maximal erreichbare Auflösung von einer halben Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes ($\lambda/2$).^[2,3] Diese Auflösungsgrenze bedeutet zum einen, dass Objekte, die sich näher als $\lambda/2$ zueinander befinden, nicht mehr getrennt voneinander dargestellt werden können. Zum anderen ist eine Fokussierung des Laserstrahls unterhalb von $\lambda/2$ nicht realisierbar. Dies hatte zur Folge, dass z. B. bei Aufnahmen des Zellinneren zwischen einzelnen Proteinen oder Molekülen nicht unterschieden werden konnte.

Hell gelang erstmals die Unterschreitung der *Abbe'schen* Auflösungsgrenze und damit ein entscheidender Durchbruch im Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie. Er etablierte die STED-Technik, bei der parallel zwei Laserstrahlen das zu untersuchende Objekt beleuchten.^[4-6] Der erste Laserstrahl dient der Anregung der Fluorophore bei ihrer gängigen Anregungswellenlänge und definiert einen Bereich, der der Auflösung nach *Abbe* folgt. Ein zweiter Laserstrahl, dessen Wellenlänge der Fluorophoremmission entspricht, sorgt dafür, dass angeregte Moleküle rasch in ihren Grundzustand zurück fallen (stimulierte Emission) und folglich nicht mehr fluoreszieren. Dabei kann das Belichtungsgebiet des zweiten Strahls derart gewählt werden, dass nur ein Bruchteil der angeregten Fluorophore zur Emittierung eines Photons fähig bleibt und somit eine deutlich gesteigerte Fokussierung erreicht wird (Abbildung 1).

Die Beiträge von *Moerner* und *Betzig* zur superaufgelösten Mikroskopie setzen an einer anderen Stelle an. Dem Wissenschaftler *Moerner* war es 1989 gelungen, die Fluoreszenz eines einzigen Moleküls sichtbar zu machen.^[7] Damit legte er den Grundstein für die heutige Einzelmolekülspektroskopie. Weiterhin entdeckte *Moerner* erstmalig eine spezielle Variante des grünfluoreszierenden Proteins (*GFP*), dessen

Fluoreszenz durch Bestrahlung mit Licht definierter Wellenlängen an- bzw. ausgeschaltet werden konnte.^[8,9]

Betzig verwendete dieses photoaktivierbare GFP als Basis für die Entwicklung der sogenannten *PALM-Mikroskopie* (*PALM = Photo Activated Localisation Microscopy*).^[10] Bei der *PALM-Mikroskopie* werden die zu beobachteten Strukturen mit photoaktivierbaren Fluorophoren (*blinkenden Farbstoffen* oder photoaktivierbaren Proteinen) markiert und mit einem Lichtblitz geringer Intensität angeregt, sodass nur wenige Moleküle zur Emission gebracht werden. Aufgrund der beliebigen Verteilung der einzelnen Fluorophore werden diese deutlich höher aufgelöst, als es die Vorgaben der *Abbe'schen* Grenze erlauben. Die ausgelöste Fluoreszenz wird mittels steter Bildaufnahme solange verfolgt, bis das eintretende Photobleichen die Fluorophore dauerhaft erlöschen lässt. Eine mehrfache Wiederholung der zufälligen Anregung von vereinzelt Fluorophoren und die Verfolgung ihrer Emission ergeben eine große Anzahl an Einzelbildern, die in einem computerunterstützten finalen Schritt zu einem einzigen supraaufgelösten Bild vereinigt werden.

2

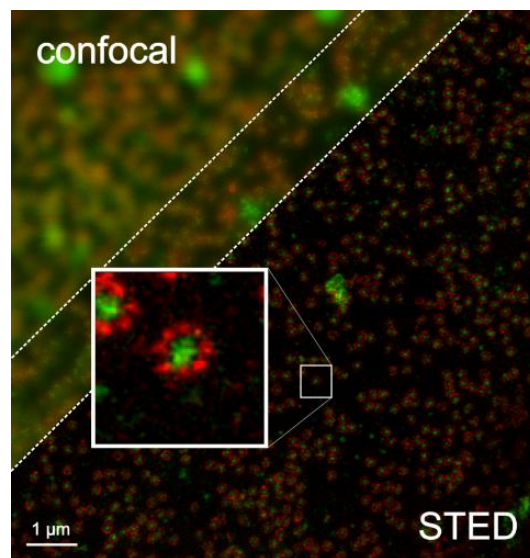


Abbildung 1: Vergleich von Konfokaler- (links) und STED-Fluoreszenzmikroskopie (rechts). Gezeigt sind Proteinuntereinheiten amphibischer Kernporenkomplexe.^[11,12]

Die beschriebenen Innovationen auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen tiefere Einblicke in biochemische Prozesse, die innerhalb von Zellen ablaufen und vergrößern das Verständnis der chemisch-biologischen

Zusammenhänge. Die fluoreszente Bildgebung von Nukleinsäuren stellt dabei eine bedeutende Methodik im Bereich der Fluoreszenzbioanalytik sowie bei biochemischen Anwendungen dar.^[13,14]

Folglich steigt die Nachfrage an neuen Fluoreszenzfarbstoffen für Nukleinsäuresonden mit optimierten und anwendungsgerechten Eigenschaften stetig an. Besonders für Forschungen auf Basis der Einzelmolekülspektroskopie werden Fluorophore mit großer Photostabilität und optimalen spektroskopischen Eigenschaften benötigt.^[15-23] An diesem Punkt setzt die vorliegende Dissertation an.

Nukleinsäuresonden, die bei fluoreszenter Bildgebung mit zellulärer oder gar molekularer Auflösung eingesetzt werden, sollten mit leistungsstarken Fluoreszenzfarbstoffen ausgestattet sein. Die Fluorophore müssen sich verschiedenen Anforderungen stellen, um als geeignete Chromophore für die gewünschten Sonden dienen zu können.^[13,24-31] Ihre Emission sollte eine starke Helligkeit sowie eine große *Stokes*-Verschiebung aufweisen, und möglichst bei Wellenlängen des sichtbaren Bereichs (größer 400 nm) angeregt werden können. Eine beachtlich hohe Photostabilität der Fluoreszenzfarbstoffe ist vor allem in Hinblick auf die Einzelmolekülspektroskopie von enormer Bedeutung. Photolabile Fluorophore würden die Anzahl der Fluoreszenzaufnahmen bzw. die Länge der mikroskopischen Beobachtungszeit stark reduzieren und dadurch weniger aussagekräftige Resultate liefern.

Bei der Nukleinsäuredetektion gelten die sogenannten wellenlängenverschiebenden Sonden als besonders elegante Reportermoleküle. Sie zeigen die Bindung der Zielsequenz durch Änderung der Fluoreszenzfarbe an. Dieser Fluoreszenzfarbwechsel ist aufgrund eines Energietransfers zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff möglich. Der Einsatz derartiger Sonden minimiert fehlerhafte Ergebnisse, die beim Auslesen einzelner Wellenlängen auftreten können. Zeichnet sich das verknüpfte Energietransferpaar zusätzlich durch einen hohen Kontrast der beiden Emissionen bei Bindung des Zielmoleküls aus, so kann die resultierende Fluoreszenzsonde einem breiten Feld chemisch-biologischer Anwendungen nützlich sein. Ein auf diese Weise doppelt modifiziertes Oligonukleotid wurde in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht et al.* im Zuge des Konzeptes „*DNA Traffic Lights*“ erfolgreich etabliert.^[32-35] Bei diesem Konzept wurden die Fluoreszenzfarbstoffe

Thiazolorange (**TO**) und Thiazolrot (**TR**) als Basensurrogate in DNA eingebaut. Durch den effektiven Energietransfer des Donors (**TO**) auf den Akzeptor (**TR**) konnte die sequenzspezifische Hybridisierung von Nukleinsäuren *in vitro* als auch *in vivo* visualisiert werden.

Darüber hinaus wurde das Konzept der „*DNA Traffic Lights*“ erfolgreich auf RNA übertragen, wobei man die Aufnahme und Integrität von siRNA in lebenden CHO-K1-Zellen mit herausragendem Kontrast sichtbar machen konnte.^[35,36] Jedoch ließen sich Untersuchungen mit der Einzelmolekülspektroskopie und dem Energietransferpaar **TO/TR** nicht verwirklichen, da beide Fluorophore eine sehr geringe Photostabilität aufweisen. Die Erhöhung der Photostabilität und die Entwicklung verbesserter Fluoreszenzfarbstoffe bilden die Basis der Forschungsaufgabe dieser Dissertation.

2. Themenstellung

Zu Beginn bestand das Forschungsziel darin, neue Cyaninfarbstoffe zu synthetisieren, die im Vergleich zu **TO/TR** eine signifikant gesteigerte Photostabilität zeigen. Dabei sollten die spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe erhalten oder, wenn möglich durch gezielte synthetische Modifikationen verbessert werden. Eine Variation der Emissionswellenlängen mit dem Ziel, neue Energietransferpaare zu bilden, stellte eine zusätzliche synthetische Herausforderung in der Entwicklung der Strukturen dar. Die synthetisierten Cyaninfarbstoffe sollten in Bezug auf ihre Photostabilität und spektroskopischen Eigenschaften untersucht und untereinander verglichen werden. Abbildung 2 zeigt exemplarisch drei Strukturen der 29 im Verlauf der Arbeit diskutierten Fluorophore.

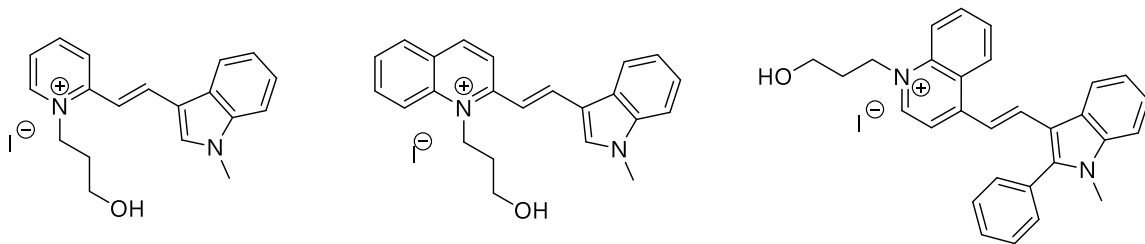


Abbildung 2: Strukturen einer Auswahl von drei Cyaninfarbstoffen, die im Zuge der Arbeit synthetisiert wurden.

Aus dieser Evaluation hervorstechende Fluorophore sollten im zweiten Teil der Dissertation auf postsynthetischem Weg kovalent an DNA geknüpft und zu Energietransferpaaren kombiniert werden. Im Anschluss galt es, geeignete Donor- und Akzeptorfarbstoffe bzw. deren optimale Zusammenstellung anhand von Energietransfer-Effizienzen (ET-Effizienzen) und spektroskopischen Daten herauszufinden. Bestimmungen der Fluoreszenzlebenszeiten und Quantenausbeuten der Energietransferpaare sollte den Zugang zu den ET-Effizienzen liefern.

Der finale Teil der Forschungsarbeit sollte den Einsatz explizit ausgewählter Cyaninfarbstoffe als Energietransferpaare in fluoreszenten Nukleinsäuresonden umfassen. Im Rahmen einer Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) galt es, doppelt modifizierte „*Molecular Beacons*“ zur Detektion von Mikro-RNA (miRNA) herzustellen. Dafür sollten die Sonden derart mit Fluorophoren ausgestattet

werden, dass eine parallele Detektion zwei verschiedener miRNA-Sequenzen möglich wird (Abbildung 3).

Die Zusammenarbeit mit einem weiteren Kooperationspartner, *Prof. Dr. T. Vilaivan*, umschloss die Synthese und Postmodifikation von Pyrrolidinyl-PNA-Sonden, die im Zuge eines von KHYS unterstützten dreimonatigen Auslandsaufenthalts an der Chulalongkorn Universität in Bangkok hergestellt werden sollten (Abbildung 3). Diese fluoreszenten PNA-Sonden sollten im Anschluss in Strangaustauschexperimenten sowie auf ihre Fähigkeit zur Duplexinvasion in doppelsträngige DNA untersucht werden.

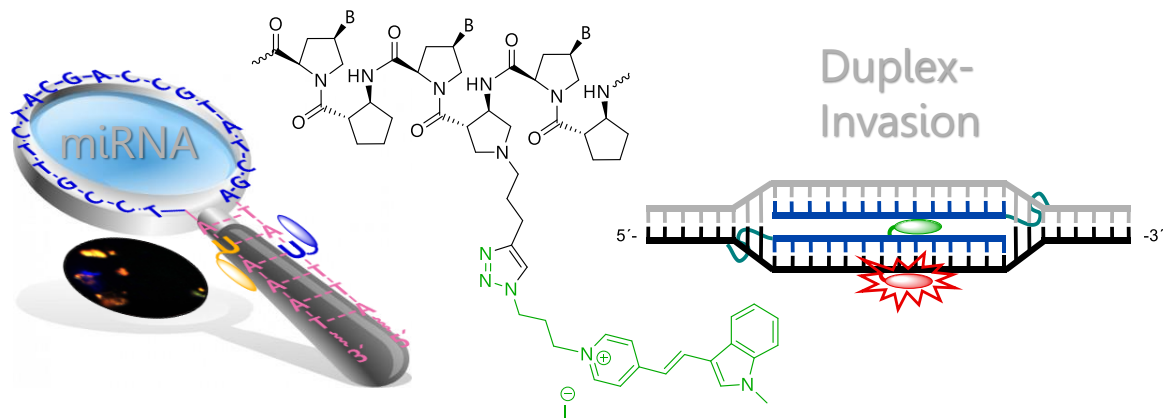


Abbildung 3: Illustration der Anwendungen, in denen die neuen Cyaninfarbstoffe zum Einsatz gelangen sollten. Links: Design und Synthese von „Molecular Beacons“ zur parallelen Detektion von miRNA-21 und miRNA-31. Mitte: Struktur der Pyrrolidinyl-PNA, die mittels kupferkatalysierter „Click“-Reaktion mit einem grünen Emitter modifiziert wurde. Rechts: Schematische Darstellung der Invasion zweier PNA-Sonden in doppelsträngige DNA.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer

Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

1931 führte der polnische Physiker *Alexander Jablonski* das nach ihm benannte *Jablonski-Diagramm* ein.^[37] Mithilfe dieser Darstellung lassen sich die bei der Absorption bzw. Emission von Licht ablaufenden Prozesse verdeutlichen (Abbildung 4).

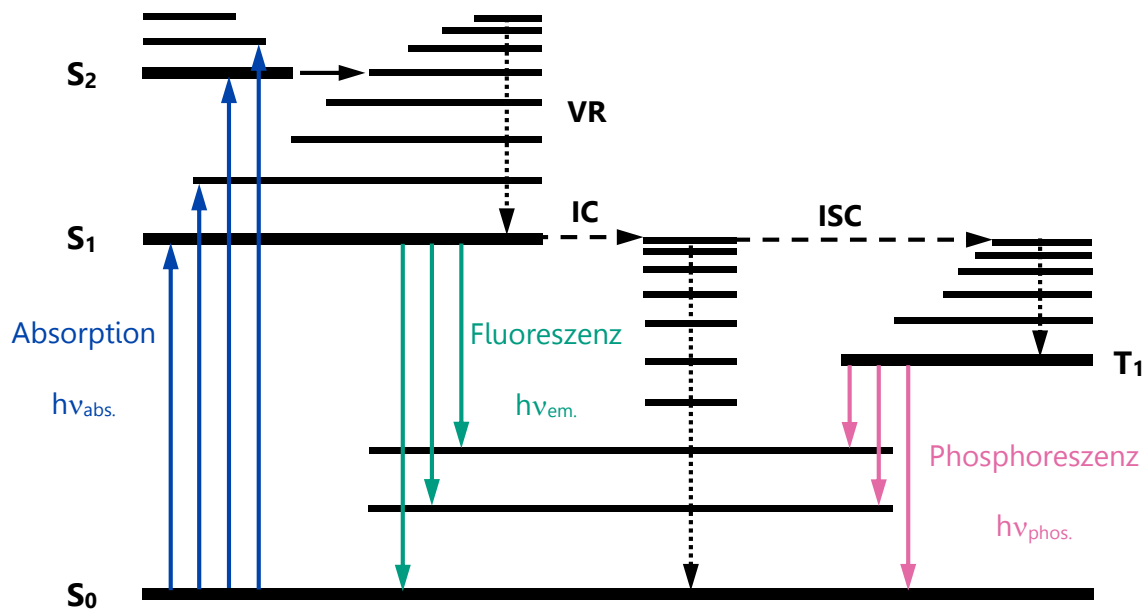


Abbildung 4: *Jablonski-Diagramm*. VR = Schwingungsrelaxation, ISC = *Intersystem Crossing* (Singulett-Triplett-Übergang), IC = *Internal Conversion*, S = Singulett-Zustand, T = Triplet-Zustand. Elektronische Zustände sind durch dicke Linien und ihre vibronischen Zustände anhand dünner Linien dargestellt.

Ein Elektron, das sich im Grundzustand S_0 eines Moleküls befindet, kann durch Absorption von Licht in einen höheren Zustand (S_1 oder höher) angeregt werden. Es gelangt anschließend über strahlende und nicht-strahlende Prozesse wieder in den Grundzustand zurück. Beim Rückgang in den energetisch niedrigsten Zustand von S_1 gibt das angeregte Elektron durch Schwingungsrelaxation (VR) einen Teil der Energie innerhalb von einigen Pikosekunden an die Umgebung ab. Der darauffolgende Übergang in den Grundzustand S_0 ist bei gleichbleibender Spinmultiplizität auf der

einen Seite strahlend, in Form von Fluoreszenz (Nanosekunden), oder andererseits durch strahlungslose Schwingungsrelaxation bei innerer Umwandlung (IC = *Internal Conversion*) möglich. Die Interkombination (ISC = *Intersystem Crossing*) umfasst den Übergang in einen Triplettzustand, der einen quantenmechanisch verbotenen Übergang darstellt. Bei dem Übergang von S_1 nach T_1 muss sich die Spinmultiplizität ändern, was durch Spin-Bahn-Kopplung und Interaktion mit der Umgebung ermöglicht wird. Die Relaxation des Elektrons vom Triplettzustand T_1 in den Grundzustand S_0 , in Form einer Photon-Aussendung geschieht aufgrund der Spinumkehr eher langsam, das heißt im Mikrosekunden- bis Sekundenbereich. Dieser Prozess wird als Phosphoreszenz bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit ist der strahlende Übergang in Form von Fluoreszenz besonders wichtig. *Kasha* beobachtete, dass die Wellenlänge der Fluoreszenz unabhängig von der Absorptionswellenlänge ist.^[37,38] Diese Tatsache beruht auf einer innerhalb von Pikosekunden ablaufenden Dissipation der überschüssigen Energie des schwingungs- und elektronisch angeregten Farbstoffmoleküls, sodass es in den Schwingungsgrundzustand seines elektronischen Zustandes gelangt. Folglich sind Fluoreszenzspektren unabhängig von der Anregungswellenlänge.

8

Im Gegensatz dazu kann die Anregung von jedem besetzten Schwingungszustand des Grundzustands stattfinden. Die Besetzung der verschiedenen Schwingungszustände ist von der Temperatur abhängig und kann mithilfe der *Boltzman*-Verteilung beschrieben werden.

Eine weitere wichtige spektroskopische Eigenschaft von Fluoreszenzfarbstoffen ist die *Stokes*-Verschiebung. Die Basis der *Stokes*-Verschiebung ist, dass die Wellenlänge eines ausgestrahlten Photons stets größer als die Anregungswellenlänge ist.^[37,39] Dieser Sachverhalt lässt sich anhand der Energieerhaltung erklären. Ein angeregtes Molekül gibt über Stoßprozesse einen Teil der Anregungsenergie an seine Umgebung ab. Es sendet folglich ein Photon mit erniedrigter Energie $E = h\nu$ und damit größerer Wellenlänge aus. Die *Stokes*-Verschiebung spielt besonders bei Fluorophoren für bioanalytische Zwecke eine tragende Rolle. Sie ermöglicht es, emittierte Strahlung einer Probe vom Anregungslicht zu separieren. Dies hat zur Folge, dass bei sehr kleiner *Stokes*-Verschiebung häufiger Fehler beim Auslesen der Fluoreszenzintensität auftreten können. Deshalb stellt eine große *Stokes*-Verschiebung eine der

entscheidenden Anforderungskriterien dar, die an anwendungsgerechte Fluoreszenzfarbstoffe gestellt werden.

Zwei der bedeutendsten Parameter zur Charakterisierung von Fluorophoren sind die Fluoreszenzlebenszeit τ und die Fluoreszenz-Quantenausbeute ϕ_F . Dabei ist die Quantenausbeute als die Zahl emittierter Photonen im Verhältnis zur Zahl der absorbierten Photonen definiert.^[37] Die Anzahl der absorbierten Photonen lässt sich auch als Summe der Geschwindigkeitskonstanten von strahlenden und nicht-strahlenden Prozessen ausdrücken:

$$\phi_F = \frac{k_{em.}}{k_{em.} + k_{ns.}} \quad (3.1)$$

- ϕ_F : Fluoreszenz-Quantenausbeute
- $k_{em.}$: Geschwindigkeitskonstante emittierter Photonen
- $k_{ns.}$: Geschwindigkeitskonstante nicht-strahlender Relaxation nach S_0

Die Fluoreszenzlebenszeit τ stellt den Zeitraum dar, den ein Elektron in einem angeregten Zustand verbringt. Die große Bedeutung der Fluoreszenzlebenszeit liegt darin, dass ein Fluorophor innerhalb dieser Zeit mit seiner Umgebung in Wechselwirkung tritt. Demnach können aus den gemessenen Zeiten Informationen dieser Wechselwirkungen gezogen werden. Auch die Fluoreszenzlebenszeit τ kann mithilfe der oben beschriebenen Geschwindigkeitskonstanten ausgedrückt werden:

$$\tau = \frac{1}{k_{em.} + k_{ns.}} \quad (3.2)$$

Meistens wird zur Bewertung der Leuchtkraft eines Fluoreszenzfarbstoffes die sogenannte Helligkeit B verwendet. Es handelt sich dabei um das Produkt aus dem Extinktionskoeffizient $\epsilon_{(\lambda)}$ und der Fluoreszenz-Quantenausbeute ϕ_F des Fluorophors.

$$B = \epsilon_{(\lambda)} \cdot \phi_F \quad (3.3)$$

- B: Helligkeit
- $\epsilon_{(\lambda)}$: molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [L/mol·cm]

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) beschreibt die Energieübertragung von einem angeregten Fluorophor, dem Donor, auf ein Akzeptormolekül im Grundzustand. Anders als der Name vermuten lässt, handelt es sich hierbei um einen strahlungslosen Energietransfer. Bereits im Jahre 1948 berichtete *Theodor Förster* von seinen theoretischen Überlegungen.^[40] Die Vorgänge während des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers lassen sich am besten anhand eines vereinfachten Jablonski-Diagramms erläutern (Abbildung 5).

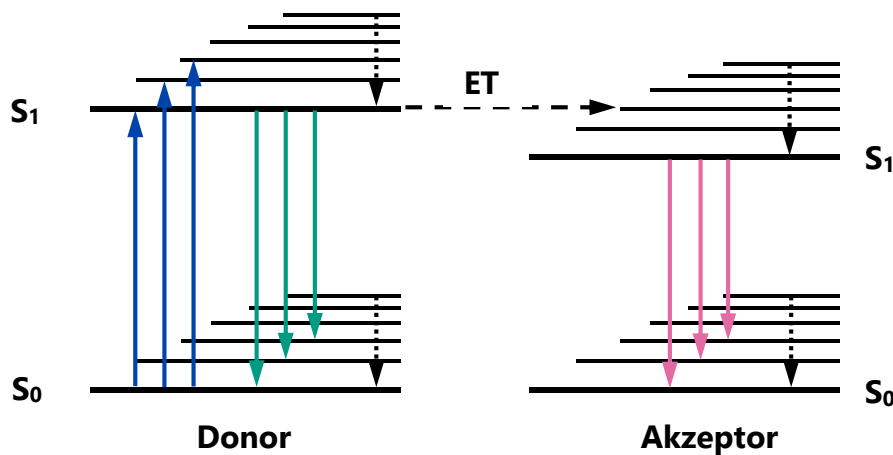


Abbildung 5: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Verdeutlichung der Prozesse, die beim Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) stattfinden.

Der Donor wird mit Licht geeigneter Wellenlänge in den ersten angeregten, elektronischen Zustand überführt. Befindet sich ein Akzeptor in räumlicher Nähe, kann die Anregungsenergie strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden. Das Akzeptormolekül befindet sich nun seinerseits in dem angeregten Zustand S_1 und relaxiert entweder strahlungslos (Fluoreszenz-Löschung) oder durch Emission eines Photons in den elektronischen Grundzustand. *Förster* vermutete eine starke Abstandsabhängigkeit (r^{-6}) dieses Prozesses.^[40] Seine theoretische Annahme wurde 1967 von *Stryer* und *Haugland* bestätigt, die die Abhängigkeit der Transferrate k_{FRET} vom Abstand r der Fluorophore zueinander in fluoreszenzmarkierten Polyprolinen untersuchten.^[41]

Die Energietransfergeschwindigkeitskonstante k_{FRET} gibt an, wie viele Übergänge vom Donor auf den Akzeptor pro Zeiteinheit stattfinden und ist durch die folgende Gleichung gegeben:

$$k_{\text{FRET}} = \frac{1}{\tau_{\text{Do}}} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (3.4)$$

mit:

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln(10) \cdot \kappa^2 \cdot \phi_{\text{Do}} \cdot J_{(\lambda)}}{128 \pi^5 \cdot \eta^4 \cdot N_{\text{Av}}} \quad (3.5)$$

τ_{Do} :	Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
R_0 :	Förster-Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz)
r :	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
κ^2 :	Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor
ϕ_{Do} :	Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$J_{(\lambda)}$:	Spektrales Überlappungsintegral
η :	Brechungsindex des Mediums zwischen den Fluorophoren (hier 1.5)
N_{Av} :	Avogadro Konstante ($6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

Der Förster-Radius R_0 wurde nach dem Entdecker dieses ET-Prozesses, *Theodor Förster*, benannt. R_0 entspricht exakt der Distanz zwischen Donor- und Akzeptormolekül, bei der die Energietransfer-Effizienz bei 50 % liegt. Das heißt, dass bei diesem Abstand der Fluoreszenzfarbstoffe genau die Hälfte aller Anregungen des Donors auf den Akzeptor übertragen werden.^[37,42] Der Zusammenhang von R_0 und der ET-Effizienz wird in Kapitel 5 genauer gezeigt.

Überdies hinaus gibt es weitere Faktoren, die auf die Transfargeschwindigkeit k_{FRET} einen Einfluss ausüben können und die im Folgenden kurz erläutert werden sollen. Damit ein FRET stattfinden kann, darf das Überlappungsintegral $J_{(\lambda)}$ nicht gleich Null sein. Genauer bedeutet dies, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen muss, damit die Übergangsdipolmomente der beiden Fluoreszenzfarbstoffe miteinander in Wechselwirkung treten können. Diese Überlappung ist in Abbildung 6 beispielhaft

anhand eines Energietransferpaares der neu entworfenen Farbstoffe verdeutlicht. Die grau eingefärbte Fläche zeigt die spektrale Überlappung, deren Betrag mittels beider auf eins normierter Spektren berechnet werden kann.

$$J_{(\lambda)} = \int_0^{\infty} I_{Do(\lambda)} \cdot \epsilon_{Ak(\lambda)} \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (3.6)$$

- $J_{(\lambda)}$: Spektrales Überlappungsintegral
 $I_{Do(\lambda)}$: Fluoreszenzintensität des Donors bei der Wellenlänge λ
 $\epsilon_{Ak(\lambda)}$: Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei der Wellenlänge λ
 λ : Wellenlänge [nm]

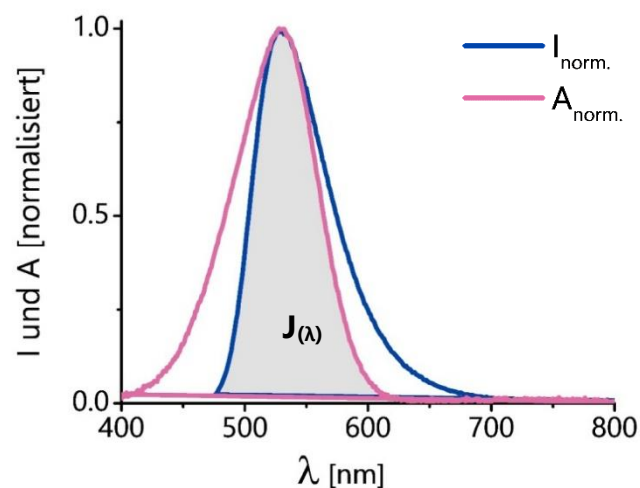


Abbildung 6: Fluoreszenzspektrum des Donors (blau) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (rosa). Beide Spektren wurden auf eins normiert. Ihr Überlappungsbereich ist grau eingefärbt.

Die FRET-Effizienz ist demnach von der Größe des Überlappungsintegrals abhängig.

Von immenser Bedeutung für die ET-Effizienz $E_{(r)}$ ist der sogenannte Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor κ^2 . Dieser Faktor gibt das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen zwei Übergangsdipolmomenten in Abhängigkeit von deren Orientierung zueinander wieder (Abbildung 7 und Gleichungen 3.7 und 3.8).^[42,43]

Der Wert des Orientierungsfaktors κ^2 kann, je nach Lage der beiden beteiligten Übergangsdipolmomente, zwischen 0 und 4 liegen (Abbildung 7, rechts). Der höchste Wert von κ^2 wird dann erreicht, wenn die beiden Dipolmomente kollinear angeordnet

sind ($\kappa^2 = 4$). Stehen die Dipole der beiden Farbstoffe senkrecht zueinander ($\kappa^2 = 0$) findet kein ET statt.

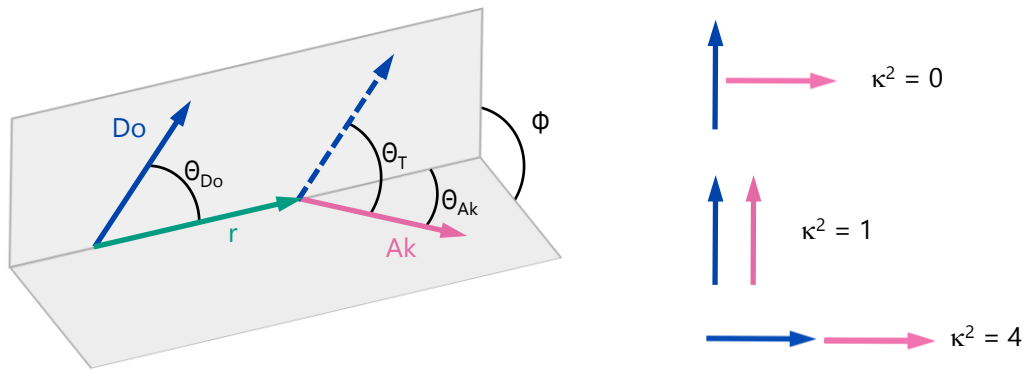


Abbildung 7: Links: Schematische Darstellung der relativen Orientierung des Donor- und Akzeptor-Übergangsdipolmomentes zueinander sowie des resultierenden Abstandsvektors r . Definition der Winkel siehe Gleichungen 3.7 und 3.8. Rechts: Der Wert von κ^2 in Abhängigkeit der Dipolorientierung beider Fluorophore, gezeigt sind drei Grenzfälle des Orientierungsfaktors.

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_{Do} \cdot \cos \theta_{Ak})^2 \quad (3.7)$$

$$\cos \theta_T = \sin \theta_{Do} \cdot \sin \theta_{Ak} \cdot \cos \Phi + \cos \theta_{Do} \cdot \cos \theta_{Ak} \quad (3.8)$$

- κ^2 : Orientierungsfaktor
- θ_T : Winkel zwischen dem Dipolmoment des Donors und des Akzeptors
- θ_{Do} : Winkel zwischen dem Dipolmoment des Donors und dem Vektor r
- θ_{Ak} : Winkel zwischen dem Dipolmoment des Akzeptors und dem Vektor r
- Φ : Winkel zwischen den Dipolebenen

Generell geht man davon aus, dass sich die Fluorophormoleküle in Lösung frei bewegen und somit vor dem Energietransfer vollkommen neu orientieren können. Für diesen Fall wird für κ^2 ein dynamischer Mittelwert von $2/3$ angenommen.^[43] Bei der Markierung von Nukleinsäuren sind die Farbstoffe an mehr oder weniger flexible Linker gebunden. Je nach Wahl der Verknüpfungsmethode können sowohl die Flexibilität als

auch die Länge der Verbindungsstücke einen sehr großen Einfluss auf die Orientierung der Chromophore ausüben.

Trägt der Fluorophor darüber hinaus eine z. B. positive Ladung, so kommen zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen zum Tragen. Diese Interaktionen können nicht nur die Position und Orientierung, sondern auch die photophysikalischen Eigenschaften des Farbstoffes verändern. Um die Flexibilität der Bindung zum Chromophor zu unterdrücken, machte sich *Asanuma* einerseits die Interkalationsfähigkeit von Pyren und Perylen und auf der anderen Seite die rigide Verknüpfung beider Substanzen in Form von Basensurrogaten zunutze.^[44] Auf diese Weise erreichte er eine definierte Orientierung beider Fluorophore. Zusätzlich sorgte die natürliche Struktur der DNA-Helix für einen exakt bestimmbar Abstand von Pyren und Perylen. *Asanuma* variierte diesen Abstand durch Insertion von 1 bis 21 Basenpaaren und konnte mit FRET-Experimenten eindrucksvoll den entscheidenden Beitrag des Orientierungsfaktors zur FRET-Effizienz nachweisen.

14

Ebenfalls sehr aussagekräftige Untersuchungen zur Abstands- und Orientierungsabhängigkeit der FRET-Effizienz steuerten unter anderem auch die Arbeitskreise von *Wilhelmsson*^[45] sowie *Müller* und *Seidel* bei.^[46] In Kapitel 5 der vorliegenden Dissertation wird das Zusammenspiel von Orientierungsfaktor und Abstand kovalent gebundener Fluoreszenzmarker in Nukleinsäuresonden im Detail betrachtet und gemeinsam mit den erhaltenen Daten der neuen ET-Paare diskutiert.

Von experimenteller Seite ist die Energietransfer-Effizienz über die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten des Donorfarbstoffes in Anwesenheit ($\tau_{\text{Do+Ak}}$) sowie in Abwesenheit (τ_{Do}) des Akzeptors zugänglich:

$$E_{(r)} = 1 - \frac{\tau_{\text{Do+Ak}}}{\tau_{\text{Do}}} \quad (3.9)$$

$E_{(r)}$: Energietransfer-Effizienz des FRET

$\tau_{\text{Do+Ak}}$: Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

τ_{Do} : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

Neben dem Förster-Radius R_0 liefert die Kenntnis der ET-Effizienz den zweiten entscheidenden Faktor zur Abstandsbestimmung zwischen zwei

Fluoreszenzfarbstoffen. Mathematisch ist dieser Sachverhalt in Gleichung 3.10 wiedergegeben.

$$r = R_0 \cdot \sqrt{\frac{1 - E_{(r)}}{E_{(r)}}} \quad (3.10)$$

Im Bereich der Strukturaufklärung biologischer Systeme sind Abstandsmessungen in Biomolekülen von großem Wert. Mithilfe des FRET lassen sich inter- und intramolekulare Distanzen von ungefähr 1 bis 10 nm ausmessen. Infolgedessen wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer häufig als „spektroskopisches Lineal“ verwendet.^[41,45] Auf Basis der erhaltenen Daten können Aussagen über konformelle Änderungen in Nukleinsäure- und Proteinstrukturen getroffen werden. Aus dem Blickwinkel der Nukleinsäureforschung gelten Abstandsmessungen zwischen 1 und 5 nm als besonders wünschenswert. Zum Beispiel beträgt der Durchmesser einer B-DNA-Helix nur circa 2 nm. Derart kleine Distanzen lassen sich ausschließlich mit Fluoreszenzfarbstoffen bestimmen, die optimale spektroskopische und strukturelle Eigenschaften besitzen. Ausschlaggebend bei FRET-abhängigen Distanzbestimmungen ist außerdem eine hohe Empfindlichkeit der ET-Effizienz auf die strukturellen Gegebenheiten der Umgebung. Als allgemeiner Anhaltspunkt für derartige Untersuchungen gilt, dass optimale Donor-Akzeptor-Abstände in einem Bereich zwischen $0.5 \cdot R_0$ und $1.0 \cdot R_0$ liegen sollten. Innerhalb dieses Intervalls verursachen bereits sehr geringfügige Variationen des Fluorophorabstandes eine signifikante Änderung der ET-Effizienz, wodurch präzise Aussagen über die Struktur des untersuchten Biomoleküls abgeleitet werden können. Anwendung findet diese Methode unter anderem bei der Beobachtung von Faltungsgleichgewichten^[47,48] sowie bei der Erforschung von Wechselwirkungen, die innerhalb von Proteinstrukturen auftreten.^[49,50]

Dexter Energie Transfer

Beim Dexter-ET geschieht der Energietransfer nach einem Elektronen-Austauschmechanismus, weshalb er auch unter der Bezeichnung „Dexter Elektronen-Transfer“ geläufig ist. Im Gegensatz zum FRET können die auftretenden Wechselwirkungen des Dexter-ET ausschließlich quantenmechanisch beschrieben werden.^[42,51] Deshalb wurde er für lange Zeit als rein fundamentales Phänomen der Photochemie beschrieben. Seit der Entwicklung von OLEDs (*organic light-emitting diodes*)^[52] bekam der Dexter-ET eine größere Aufmerksamkeit von den Forschern.

Einer der entscheidenden Unterschiede zum FRET ist, dass der Elektronen-Austausch nach Dexter nur bei sehr kurzen Molekülabständen, die kleiner als 1 nm sind, stattfinden kann. Ein Austausch der Elektronen wird nur dann ablaufen, wenn neben der spektralen Überlappung von Donor und Akzeptor auch deren Orbitale überlappen. Zusätzlich muss sich die Wellenfunktion des angeregten Donors energetisch ähnlich der des Grundzustandsniveaus des Akzeptors sein, damit eine Überlappung beider Wellenfunktionen vorliegt. Die einzelnen Prozesse des Dexter-ETs sind in Abbildung 8 verdeutlicht.

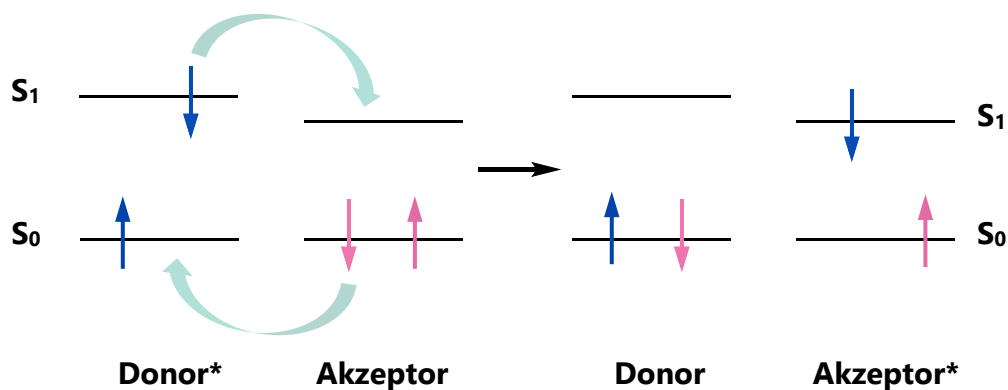


Abbildung 8: Darstellung der Prozesse des Dexter Energietransfers.

Ein Elektron des Donors absorbiert ein Photon und wird dadurch in den angeregten Zustand gebracht. Anschließend findet ein Elektronentransfer zum S_1 -Niveau des Akzeptors statt, der nun seinerseits ein Elektron aus S_0 an den Donor zurück transferiert.

Die helikale Struktur der DNA sorgt dafür, dass sich zwei kovalent gebundene Farbstoffmoleküle in geringem Abstand zueinander befinden. Obwohl dieser Donor-Akzeptor-Abstand größer ist als es der Dexter-Elektronen-Austausch vorgibt, kann er zu gewissen Anteilen zum Energietransfer zwischen den Farbstoffen beitragen.

3.2 Postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren

Die kovalente Verknüpfung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Oligonukleotiden ist im Allgemeinen durch zwei unterschiedliche Strategien realisierbar. Auf der einen Seite ist eine Markierung vor der DNA-Synthese möglich, bei der ein farbstoffmodifizierter Phosphoramidit-Baustein hergestellt und direkt bei der Nukleinsäuresynthese eingesetzt wird.^[53,54] Die Phosphoramidit-Methode wurde unter anderem bei dem Energietransferpaar **TO/TR** verwendet, um beide Farbstoffe als Basensurrogate über einen (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker mit dem Oligonukleotid zu verbinden.^[34,55,56] Obwohl diese Art der Markierung gut ausgearbeitet wurde und gute Resultate lieferte, birgt sie einige Nachteile im Vergleich zur postsynthetischen Modifikation. Die Notwendigkeit der Synthese eines phosphoramidithaltigen Bausteins für jeden einzelnen Fluorophor ist nicht nur zeit-, sondern auch kostenintensiv. Sie eignet sich daher kaum für die Untersuchung und den Vergleich einer großen Anzahl neuer Fluoreszenzfarbstoffe. Zusätzlich kann, je nach Grundstruktur des zu koppelnden Fluoreszenzmarkers, ein Einbau als Basenersatz zu Störungen der Basenpaarung und damit zur Destabilisierung des Duplexes führen. Diese destabilisierenden Effekte würden besonders deutlich bei kürzeren Oligonukleotiden zum Tragen kommen und den Anwendungsbereich der Sonden begrenzen. Die größten Einschränkungen der Phosphoramidit-Methode stellen die harschen chemischen Bedingungen im Zuge der Nukleinsäuresynthese dar. Speziell die finale ammoniakalische Entschützung der Amine an den Basen bedeutet für zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe eine unumgängliche Zersetzung. Basenlabile Modifikationen sind also mittels der Phosphoramidit-Methode nicht realisierbar, was die Fluorophorauswahl stark einschränkt. Diese genannten Nachteile führten zur Etablierung neuartiger postsynthetischer Kopplungsvarianten und zu deren Optimierung.^[57] In dieser Dissertation besprochene Farbstoffe wurden ausschließlich mit der kupferkatalysierten „Click“-Reaktion an Nukleinsäuren gebunden.^[58-60] Der folgende Abschnitt beleuchtet die Grundlagen dieser innovativen Modifikationsmethodik, die innerhalb der letzten Jahre intensiv erforscht und weiterentwickelt wurde.

Kupferkatalysierte „Click“-Reaktion

Die Grundzüge der vielseitig einsetzbaren „Click“-Chemie basieren auf der Forschungsarbeit von *Huisgen*.^[61,62] Er beschrieb die unkatalsierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Azid und einem terminalen Alkin zu 1,2,3-Triazolen. Diese Reaktion verläuft jedoch nur bei sehr hohen Temperaturen und mit moderaten Ausbeuten. Diese rauen Bedingungen waren allerdings für die kovalente Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an Biomoleküle kaum geeignet.

Sharpless und *Meldal* gelang es, mittels Kupfer(I)-Katalyse diesen Nachteil zu umgehen.^[62,63] Darüber hinaus erreichte ihre Variation der kupferkatalysierten „Click“-Reaktion (CuAAC) einen deutlich schnelleren Umsatz in wässriger Lösung bei gleichzeitiger Erhöhung der Regioselektivität. Die Kupfer(I)-Katalyse bewirkte zwar einerseits eine Beschleunigung der Reaktion, führte jedoch gleichzeitig zu Strangbrüchen und starken Oxidationsschäden an den Oligonukleotiden. Diese Nebenreaktionen ließen sich durch Verwendung von kupfer(I)-chelatisierenden Liganden, wie z. B. TBTA (Tris-[(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]amin), fast vollständig unterbinden.^[64,65] Infolgedessen eröffnete die kupferkatalysierte „Click“-Reaktion eine Möglichkeit, Nukleinsäuren chemoselektiv, vielseitig und unter milden Bedingungen mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren (Abbildung 9).^[66-68]

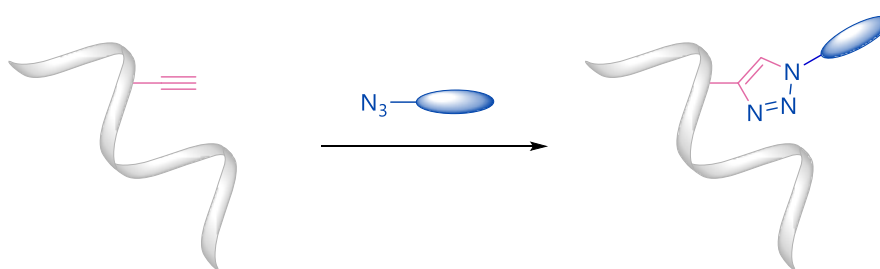


Abbildung 9: Schematische Darstellung der kupferkatalysierten „Click“-Reaktion zwischen einem alkinmodifizierten Oligonukleotid und dem Azid eines Fluoreszenzfarbstoffes.

Bei der CuAAC werden ein Alkin und ein Azid zur Reaktion gebracht. Die beiden verwendeten funktionellen Gruppen Alkin und Azid sind bioorthogonal. Sie verhalten sich also gegenüber allen natürlich vorkommenden chemischen Funktionalitäten in Biomolekülen und ganzen lebenden Organismen nahezu inert.^[69] Diese positiven

Eigenschaften der CuAAC unterstützten die Entwicklung vielfältig modifizierter Nucleoside, deren wichtigste Vertreter im Folgenden kurz vorgestellt werden. Besonders hervorzuheben sind dabei Nucleoside, die eine Alkinfunktion an der 2'-Position der Riboseinheit tragen. Abbildung 10 zeigt beispielhaft das 2'-*O*-Propargyluridin **1**.^[70,71] Derartig synthetisch veränderte Phosphoramidite aller natürlich vorkommenden Basen sind inzwischen kommerziell erhältlich und erleichtern dementsprechend die Fluoreszenzmarkierung von Nucleinsäuren enorm. Die 2'-alkinmodifizierten Bausteine dienen unter anderem auch der kovalenten Bindung der Cyaninfarbstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden.^[58-60]

Die Arbeitsgruppe von *Carell* führte die gewünschte Alkinfunktionalität anhand von Propargyl- oder 1,7-Octadiinyl-Linker direkt an der 5-Position der Pyrimidinbasen Uridin und Cytosin ein. Nach erfolgter Umsetzung zum Phosphoramidit, wurden diese Bausteine in DNA inkorporiert.^[72] In ähnlicher Weise beschäftigte sich *Seela* mit den Purinbasen und deren Alkinausstattung an der Position 7.^[73-75] Dazu musste jedoch der Stickstoff, der sich in den natürlich vorkommenden Basen dG oder dA an der 7-Position befindet, zu Position 8 verschoben und durch ein Kohlenstoff ersetzt werden. Abbildung 10 zeigt ebenfalls die Strukturen von 5-modifiziertem 2'-Desoxycytidin **2** bzw. 7-modifiziertem 2'-Desoxy-7-deazaguanosin **3**, die jeweils mit einem 1,7-Octadiinyl-Linker versehen wurden.

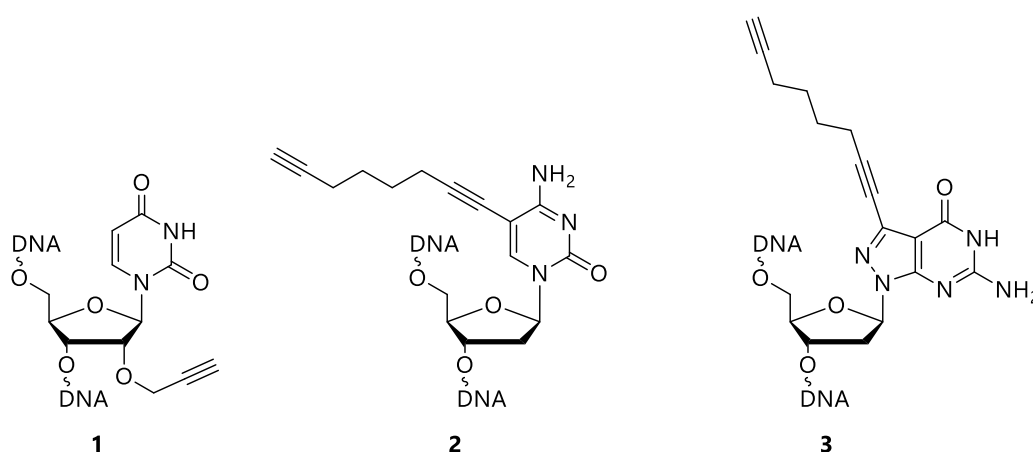


Abbildung 10: Struktur ausgewählter Beispiele von alkinmodifizierten Basen: 2'-*O*-Propargyluridin-DNA **1**; 5-Octa-1,7-diinyl-2'-desoxycytosin **2** und 8-Aza-7-deaza-7-octa-1,7-diinyl-2'-desoxyguanosin **3**.

Die stetig neuen Herausforderungen im Bereich der Fluoreszenz-Bioanalytik verlangen nach neuen Nukleinsäure-Fluoreszenzsonden mit optimierten photophysikalischen und anwendungsgerechten Eigenschaften. Dazu gehören vor allem die wellenlängenverschiebenden Sonden, die mit zwei oder mehreren Fluorophoren ausgestattet sind.^[32-36,76-78]

Eines der Ziele dieser Dissertation beinhaltete die Herstellung doppelt modifizierter „*Molecular Beacon*“ (MB). Diese wellenlängenverschiebenden Sonden sollten anschließend optimiert und im Rahmen eines gemeinsamen Projektes mit dem DKFZ die parallele Detektion von miRNA-21 bzw. miRNA-31 in verschiedenen Krebszellkulturen ermöglichen. Die Realisierung dieser mehrfachen „*Click*“-Modifikation von „*Molecular Beacon*“ wird in Kapitel 6.1 im Detail diskutiert und mit den Markierungsmethoden von *Carell*^[79] und *Wengel*^[70] verglichen.

Als Alternative zu den Nukleosidbausteinen wurden, analog der oben erwähnten acyclischen Linkereinheit von **TO/TR**, alkinmodifizierte (*S*)- bzw. (*R*)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker hergestellt und die Auswirkungen der gewählten Stereoselektivitäten evaluiert.^[80,81] Ferner konnten die Basen- bzw. Fluorophor-Modifikationen der CuAAC auch entgegengesetzt funktionalisiert werden. Bei dieser Variation trägt der Farbstoff die Alkinfunktion und wurde mit einem Nukleosidbaustein zur Reaktion gebracht, der als reaktive Gruppe ein Azid aufweist.^[82,83] Zudem wurde vor Kurzem berichtet, dass sich die beiden Funktionalitäten Azid und Phosphoramidit in einem einzigen Baustein vereinen lassen, ohne dass störende Nebenreaktionen auftreten.^[84]

Gegenwärtig repräsentiert die CuAAC eine der fundamentalen Strategien, die bei der postsynthetischen Modifikation von Biomolekülen angewandt werden. Sie ist sehr vielseitig einsetzbar, stellt jedoch keine universelle Lösung dar. Das stark zelltoxische Kupfer(I)-Kation setzt diesem postsynthetischen Ansatz klare Grenzen. Bereits Spuren an Kupferionen können die Resultate von Untersuchungen am lebenden Gewebe maßgeblich beeinflussen. Zwar ist es möglich, durch geschickte Aufarbeitung das Kupfer(I) restlos von den Fluoreszenzsonden abzutrennen, eine Markierung unter Kupferkatalyse innerhalb lebender Zellen ist allerdings auf diesem Wege nicht möglich. Lösungen dieser Problematik liefern im Wesentlichen vier innovative Ansätze.

In erster Linie ist ein Verzicht auf Kupfer(I)-Katalyse naheliegend. Die kupferfreie Variante der „Click“-Reaktion wurde erstmals von *Blomquist* und *Liu* beschrieben^[85] und hauptsächlich von *Bertozzi* weiterentwickelt.^[86-95] Sie beruht auf der Entlastung von Ringspannung in Cyclooctinen und nutzt diese, um die Umsetzung der Edukte voran zu treiben.

Die Reversibilität der Diels-Alder-Reaktion (mit normalem Elektronenbedarf) war der entscheidende Faktor, der nach einer Überarbeitung dieses Konzeptes verlangte. Durch eine geschickte Wahl der Reaktionsteilnehmer konnte man den Nachteil sehr einfach umgehen. Die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf umfasst die Umsetzung von Tetrazinen mit gespannten Alkenen.^[96-101] Diese Reaktion läuft mit gewählter Kombination der Edukte unter Stickstoffentweichung ab und verhindert entsprechend die Rückreaktion.

Eine äußerst vielversprechende Alternative bietet die sogenannte „*Photoclick*“-Reaktion. Es handelt sich dabei um eine lichtinduzierte Cycloaddition zwischen Tetrazolen und aktivierten Alkenen.^[102-112] Die „*Photoclick*“-Reaktion verknüpft einen photochemischen Prozess mit der raschen und selektiven Umsetzung der CuAAC, was ihr eine gesonderte Stellung unter den postsynthetischen Methoden verschafft.

Die Basis der vierten Strategie beruht auf der biochemischen Oligonukleotidgewinnung durch den Einsatz von Polymerasen und modifizierten Triphosphaten, mit Hilfe der Methodik der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).^[68,113-115] Der große Vorteil dieses Verfahrens ist, dass sich damit auch sehr lange Sequenzen synthetisieren lassen, die mittels der gängigen Festphasensynthese nicht gelingen.^[116]

3.3 Die Fluoreszenzfarbstoffe TO, TR und CyIQ

Das chemische Grundgerüst der neuen Fluorophore basiert primär auf den Strukturen der Cyaninfarbstoffe **CyIQ** (*Cyanine Indole Quinoline*) und Thiazolrot (**TR**). Diese beiden Fluorophore wurden zusammen mit Thiazolorange (**TO**) im Arbeitskreis *Wagenknecht et al.* erfolgreich in verschiedenen Bereichen der Nukleinsäure-Bioanalytik eingesetzt^[36] (Abbildung 11). Einige dieser Ergebnisse werden im Folgenden gezeigt.

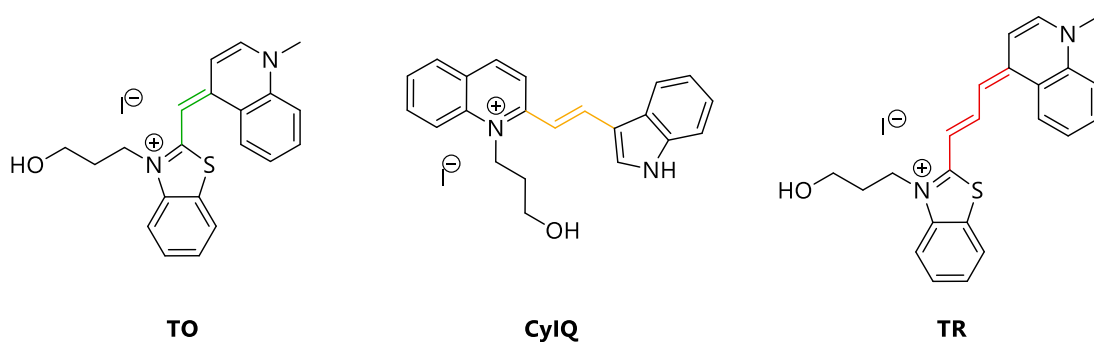


Abbildung 11: Strukturen der Fluoreszenzfarbstoffe **TO**, **CyIQ** und **TR**.

Das Energietransferpaar TO/TR^[36]

Die Bildgebung von Nukleinsäuren anhand fluoreszenter Sonden stellt ein wichtiges Werkzeug dar, mit dem sich zelluläre Funktionen und Prozesse erforschen lassen. Klassische Fluoreszenzsonden sind neben einem Fluoreszenzlöcher mit lediglich einem einzigen Farbstoff ausgestattet. Derartige Sonden erhöhen die Risiken zur Fehlinterpretation von Messergebnissen, da bei Bindung der Zielsequenz das Auslesen auf eine Wellenlänge beschränkt ist. Zusätzlich lässt sich das Signal teilweise oder nur schwer vom Hintergrundrauschen der Probe unterscheiden. Diese starken Einschränkungen führten zur Entwicklung wellenlängenverschiebender Sonden. Diese sind mit zwei Fluorophoren versehen und gestatten so eine Auswertung bei zwei weit voneinander getrennten Emissionswellenlängen.

Die Forschung der Arbeitsgruppe *Wagenknecht et al.* umfasste ebenfalls die Herstellung solch zweifach modifizierter Nukleinsäuresonden. Die beiden Cyaninfarbstoffe **TO** und **TR** wurden jeweils als fluoreszente Basensurrogate mit einzelsträngiger DNA so verbunden, dass sie im Duplex in räumliche Nähe zueinander kamen und ein Energietransfer erfolgen konnte.^[34] Dies gestattete, die sequenzspezifische Hybridisierung durch den Wechsel der Emissionsfarben von Rot nach Grün anzuzeigen. Diese charakteristische Änderung der Emissionsfarbe gab dem Konzept den zutreffenden Namen „DNA Traffic Lights“.^[32] Die Anordnung der Fluorophore konnte weiter optimiert werden und führte zu einem Farbkontrast bis 1:20. Der große Kontrast bestätigte den exzellenten Energietransfer zwischen **TO** und **TR**.

In einer besonders eindrucksvollen Arbeit galt es, die gesuchte Zielsequenz mittels wellenlängenverschiebendem „Molecular Beacon“ nachzuweisen.^[76] Die erhaltenen Daten wurden mit einem kommerziell erhältlichen „Molecular Beacon“ verglichen (Abbildung 12). Eine Evaluation der Ergebnisse wurde auf Basis des Kontrastfaktors f durchgeführt. Dieser Faktor gibt die Änderung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse von der Duplex- zur Haarnadelform an. Die kommerziell erworbene Sonde zeigte hierbei nur einen mäßigen Anstieg des Kontrastfaktors f auf einen finalen Wert von ungefähr 4. Unterdessen fiel die Resonanz auf die Zielsequenz beim „Traffic Lights-MB“ um fast eine Größenordnung stärker aus ($f = 34$) und bestätigte eindeutig den großen Nutzen des Energietransferpaares **TO/TR** in der Fluoreszenz-Bioanalytik.

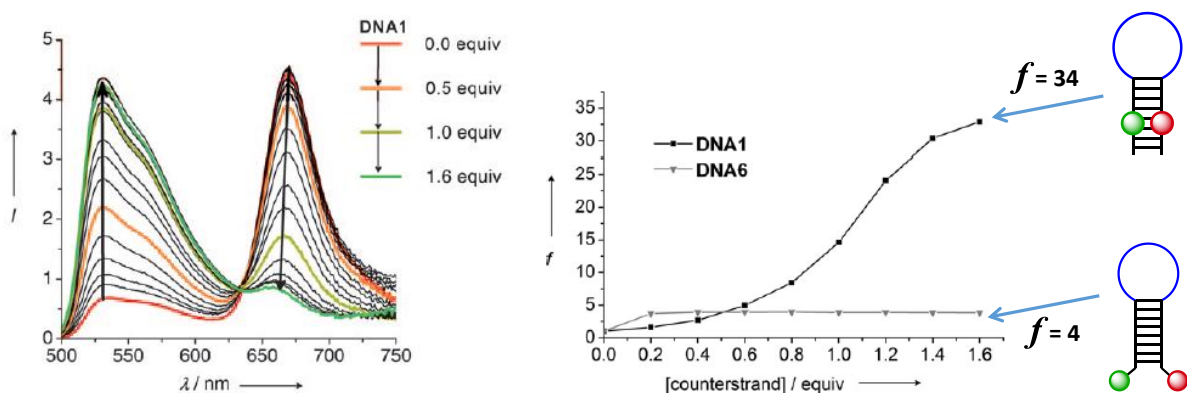


Abbildung 12: Links: Fluoreszenzspektren der Titrationsschritte des **TO/TR**-modifizierten „Molecular Beacon“ mit der Zielsequenz. Rechts: Anstieg des Kontrastfaktors f durch Zugabe der Zielsequenz. Gezeigt ist der Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen „Molecular Beacon“.^[76]

Über dies hinaus konnten die „*DNA Traffic Lights*“ in biologisch relevanten Strangaustausch-Experimenten^[33] sowie in einem Aptasensor^[32] für den Nachweis von Adenosin beitragen. Nach Mikroinjektion **TO/TR**-markierter Fluoreszenzsonden in CHO-K1-Zellen war es möglich, mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie den Fluoreszenzfarbwechsel des ET-Paares ebenfalls *in vivo* zu beobachten.^[34]

Die vielversprechenden Resultate erweiterten den Einsatz der „*Traffic Lights*“ auf das Gebiet der RNA-Detektion.^[35] Der hohe Farbkontrast **TO/TR**-modifizierter Sonden gestattete, die Aufnahme und Integrität von siRNA in lebenden CHO-K1-Zellen sichtbar zu machen. Der Transport in die Zellen erfolgte dabei mit Lipofectamin. Es konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass der siRNA-Sensor trotz Modifikation mit einem Fluoreszenzfarbstoff seine Fähigkeit zur Gen-Stillegung weitestgehend beibehält.

Das Interesse an fluoreszenten Oligonukleotidsonden mit ausreichend photostabilen Fluorophoren stieg in den Jahren seit Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie rasant an. Die Untersuchungen bei länger anhaltender Belichtung der Cyaninfarbstoffe **TO** und **TR** ließ deren Grenzen deutlich hervortreten.^[58] Im Gegensatz dazu zeigte der Farbstoff **CyIQ** nicht nur ausgezeichnete optische Eigenschaften sondern eine überragend hohe Photostabilität. Im folgenden Abschnitt werden die erhaltenen Resultate genauer gezeigt.

Styryl-Farbstoffe

Die kombinatorische Chemie ist in den vergangenen Jahren zu einem der einflussreichsten Werkzeuge bei der Entdeckung neuer Wirkstoffe für die Pharmaindustrie oder anderen industriell nutzbaren Materialien herangewachsen. Stets werden innovative Methoden entworfen, mit denen sich nicht nur auf schnellerem Wege viele Substanzen gewinnen lassen, sondern diese ebenfalls mit hohem Durchsatz analysiert und charakterisiert werden können. Im Zuge eines derartigen Großprojektes wurde man auch erstmals auf den Farbstoff **CyIQ** aufmerksam.^[117-122]

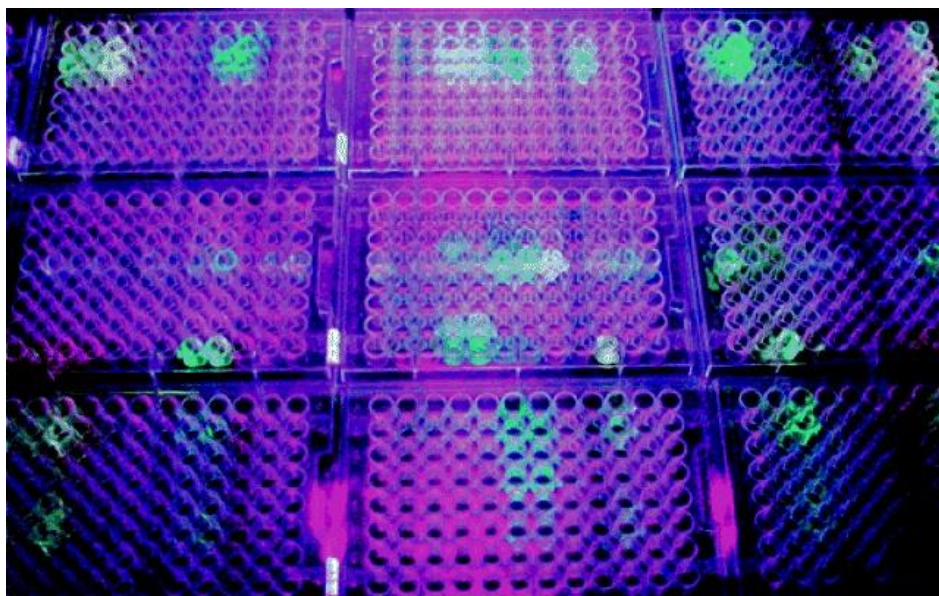


Abbildung 13: 96-well-Platten aus der Styryl-Farbstoff-Bibliothek von *Chang* und *Rosania*.^[117]

Chang und *Rosania* erstellten eine Styryl-Farbstoff-Bibliothek unter Verwendung von über 200 verschiedenen Aldehyden und 14 Pyridinium-Derivaten.^[117-122] Dabei machte man sich die unkomplizierte und unter chemisch milden Bedingungen ablaufende Kupplung der beiden Bausteine zum fertigen Chromophor zunutze. In 96-Well-Platten wurden die Edukte unter Einstrahlung von Mikrowellen zur Reaktion gebracht. Man erstellte auf diese Art recht zügig eine Styryl-Bibliothek, die mehr als 1300 Farbstoffe umfasste. Diese Substanzen wurden nach LC/MS-Charakterisierung ohne weitere Aufarbeitung mit menschlichen Melanom-Zellen inkubiert und mikroskopisch analysiert. Im darauffolgenden sekundären Screening identifizierte man **CylQ** als potentiellen Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung von Nukleinsäuren, wobei seine Spezifität für RNA zum Vorschein trat.^[118-122]

Trotz der Geschwindigkeit und des hohen Durchsatzes können solche Methoden auch so manchen „Schatz“ unentdeckt lassen, da synthesebedingte Verunreinigungen einen starken Einfluss auf die Bildgebung von Zellen ausüben können. Kleinere synthetische Veränderungen, die optische und andere spezifische Merkmale der Fluorophore verbessern könnten, sind im Bulk-Maßstab nicht realisierbar. Hier ist das Feingefühl eines Forschers gefragt, der angesichts aller Variationen und Richtungen genau derjenigen Intuition folgt, die zum besten Resultat führen wird.

Wagenknecht et al. modifizierte **CyIQ** mit einem 3-Hydroxypropyl-Linker und konnte den Farbstoff nach weiteren Syntheseschritten kovalent mit DNA verknüpfen. Bald darauf wurde gezeigt, dass die hohe Photostabilität dieses Fluoreszenzfarbstoffes mit seinen kommerziell erhältlichen Gegenspielern nicht nur mithalten, sondern diese größtenteils auch übertreffen konnte.^[58] Abbildung 15 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzintensitätsabnahmen bei Belichtung. Die Fluorophore **BODIPY**, **TO**, **TR** sowie **Fluorescein** sind deutlich labiler als **CyIQ**. Lediglich der Cyaninfarbstoff **Cy3** zeigte eine, im Vergleich zu **CyIQ**, höhere Stabilität. Die verschiedenen Faktoren, die einen Einfluss auf die Photostabilität von Cyaninfarbstoffen ausüben können, werden in Kapitel 3.4 detaillierter herausgearbeitet.

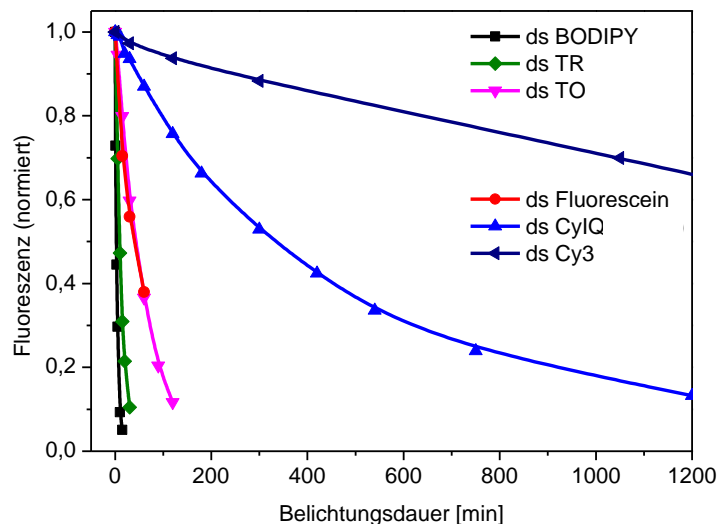


Abbildung 14: Vergleich der Photostabilität von **CyIQ**, **TO**, **TR**, **BODIPY**, **Fluorescein** und **Cy3**. Gezeigt sind die Fluoreszenzintensitätsabnahmen in Relation zur Belichtungszeit.^[58]

Styryl-Farbstoffe finden auch in unzähligen anderen Bereichen der modernen Industrie eine Anwendung.^[123] Sie dienen z. B. als Sensibilisatoren, als optisches Medium für *laser disks* oder als Laser-Farbstoffe und werden zudem in OLEDs (*organic light-emitting diodes*) eingesetzt.

3.4 Photostabilität von Cyaninfarbstoffen

Wenn ein Fluorophor aufgrund von Lichteinstrahlung dauerhaft erlischt, also seine Fähigkeit zu fluoreszieren verliert, so spricht man von Photobleichen. Das Ausbleichen von Farbstoffen unter anhaltender Belichtung stellt heutzutage einen der gravierendsten Faktoren dar, die in der fluoreszenten Bildgebung sowie der Einzelmolekülspektroskopie dafür verantwortlich sind, dass nur eingeschränkte Daten erhalten oder zeitlich begrenzte Beobachtungen gemacht werden können. Die fatale Auswirkung auf Untersuchungen, die mit rasch verblassenden Farbstoffen vorgenommen werden, wird bei genauer Betrachtung der Einzelbilder in Abbildung 15 deutlich.^[124]

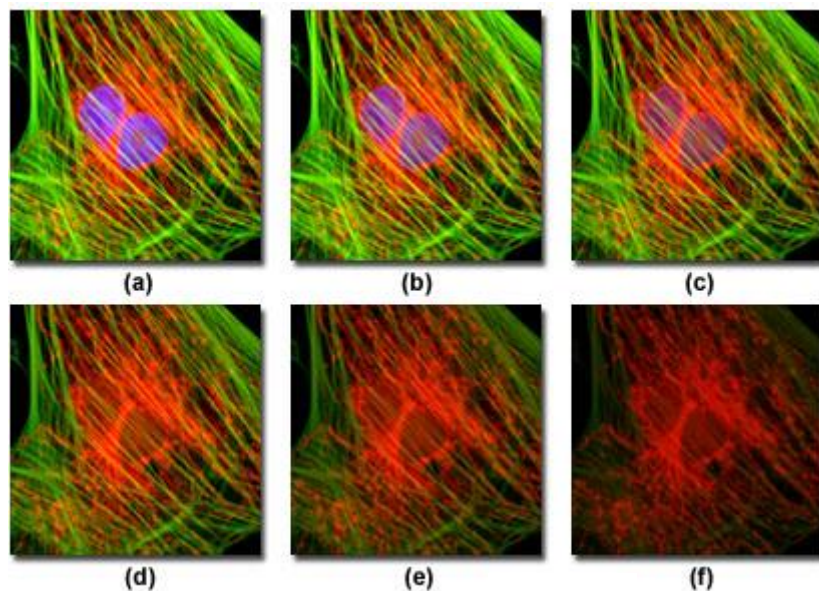


Abbildung 15: Photobleichen. Gezeigt sind Aufnahmen von Fibroblasten der Lederhaut des Muntjakhirsches in Abständen von jeweils 2 Minuten Belichtung. Die Zellen wurden mit mehreren Fluorophoren angefärbt. Zellkerne: DAPI mit blauer Emissionsfarbe, Mitochondrien: MitoTracker Rot mit roter Fluoreszenz sowie Actinfilamente des Cytoskeletts: Alexa Fluor 488 mit grüner Fluoreszenzfarbe.^[124]

Abbildung 15 zeigt die Aufnahmen von angefärbten Fibroblasten der Lederhaut des Muntjakhirsches in Abständen von jeweils zwei Minuten Belichtung. Die Anfärbung der Zellen erfolgte dabei mit drei verschiedenen Fluorophoren, die standardgemäß zur Fluoreszenzmarkierung einzelner Zellbestandteile eingesetzt werden. Zellkerne werden meist mit DAPI (blauer Emission), Mitochondrien mit MitoTracker Rot

(rote Fluoreszenz) sowie die Actinfilamente des Cytoskeletts anhand von Alexa Fluor 488 (grüne Fluoreszenzfarbe) visualisiert. Alle drei Fluoreszenzfarbstoffe wurden gleichzeitig angeregt und in zweiminütigem Takt die digitalen Bilder (a) bis (f) aufgezeichnet. Zu Beginn ist die Emission aller Marker mit hoher Intensität zu beobachten. Doch schon nach zwei Minuten ist eine starke Abnahme der blauen DAPI-Fluoreszenz erkennbar, die nach Ablauf von sechs Minuten vollständig erloschen ist. Obwohl die beiden anderen Färbereagenzien eine ausgeprägtere Stabilität zeigen, ist ihr zeitabhängiges Verblässen ebenfalls deutlich zu erkennen.

Das Ausmaß, dem Fluoreszenzmarker dem Photobleichen unterliegen, hängt primär von der strukturellen Herkunft der Moleküle ab. Derzeit werden verschiedene Strategien verfolgt, die zur Stabilisierung von Fluorophoren beitragen können. Einige dieser Ansätze sollen im weiteren Verlauf dieses Kapitels vorgestellt werden.

Allgemeine Methoden zur Erhöhung der Photostabilität von Fluorophoren

Die Hauptrolle bei bleichenden Photoprozessen und bei der Entstehung von Phototoxizität, also der photoinduzierten Toxizität von Fluorophoren, spielt der Singulett-Sauerstoff.^[125-129] Diese hochreaktive Sauerstoffspezies ist an zwei möglichen Reaktionen mit einem angeregten Fluoreszenzfarbstoff beteiligt. Zum einen kann ein Energietransfer vom im Triplett-Zustand befindlichen Fluorophor auf molekularen Sauerstoff stattfinden, der infolgedessen zum energetisch angeregten Singulett-Sauerstoff umgewandelt wird. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit eines Elektronentransfers vom Triplett-Fluorophor auf molekularen Sauerstoff, wobei ein Superoxid-Radikalanion gebildet wird, das wiederum Oxidationsreaktionen auslösen kann. Das Superoxid-Radikalanion wird gemeinsam mit Singulett-Sauerstoff und weiteren oxidierenden Intermediaten als reaktive Sauerstoffspezies (ROS (*Reactive Oxygen Species*): $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , HO^{\cdot} , HO_2^{\cdot} und H_2O_2) zusammengefasst, die in vereinter Wirkung über das „Wohl oder Übel“ eines Fluorophors entscheiden.^[129-131] Dabei tragen diese ROS neben der Zersetzung von Fluoreszenzmarkern auch über

verschiedene Wege zur Zerstörung von Biomolekülen bei.^[132-134] Bis zum heutigen Tag sind die Abläufe beim Photobleichen durch die einzelnen ROS noch nicht vollständig verstanden.

Eine naheliegende Methodik zur Reduktion derart auftretender reaktiver Sauerstoffintermediate beruht auf der Entfernung von Sauerstoff aus den Untersuchungslösungen. Dies lässt sich durch Entgasen der verwendeten Lösungen und anschließender Sättigung mit sauerstofffreien Gasen bewerkstelligen.^[23] Dieser Lösungsansatz ist jedoch bei der Bildgebung von lebenden Zellen und Geweben nicht anwendbar. In jüngster Zeit wurde vom Einsatz sauerstoffabfangender Enzyme, wie z. B. der Glucose-Oxidase oder Glucose-Katalase berichtet.^[23,135] Derartige Systeme sind derzeit noch unvollständig charakterisiert und bedürfen weitaus tiefergehender Erforschung, bevor man sie standardmäßig verwenden kann.

Als besonders vielversprechend gilt die Verwendung von triplettlöschenden Additiven, den sogenannten „*Triplet-state quencher*“ (TSQ).^[136,137] Hierzu gehören vor allem Cycloocta-1,3,5,7-tetraen (COT), 4-Nitrobenzylalkohol (NBA) sowie Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tertramethylchroman-2-carbonsäure). Diese schützenden Additive löschen den Tripletzustand des Fluoreszenzfarbstoffes, sodass dessen Grundzustand S_0 sehr rasch wiederhergestellt wird. Man fand heraus, dass TSQs über einen kollisionsbasierten Mechanismus wirken, und eine Kombination mehrerer TSQs zu den besten Resultaten führen kann. Trotz der bemerkenswerten Verbesserungen, die durch schützende Additive erzielt wurden, ist ihr Einsatz nur stark begrenzt möglich. Die stabilisierenden Effekte der TSQ sind vorrangig von der Kollisionshäufigkeit mit den Fluorophoren und somit von der TSQ-Konzentration abhängig. Aus diesem Grund sind gewöhnlich TSQ-Konzentrationen im millimolaren Bereich notwendig, um eine Stabilisierung des Markers zu erreichen. Werden diese Substanzen in solch hohen Konzentrationen zugesetzt, steigt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sie selbst eine biologische Aktivität hervorrufen. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass COT, NBA und Trolox mit biologischen Membranen interagieren und zugleich die Funktion integraler Membranproteine verändern können.

Die kovalente Verknüpfung zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Additiv überwindet den negativen Aspekt der erforderlichen Konzentration auf besonders elegante Weise. Dieses Vorgehen wird am Ende des Kapitels genauer erklärt.^[23,127,128,136]

Stabilitätsunterschiede aufgrund der Fluorophorstruktur

Die Natur eines Heterocyclus, der in einem Fluoreszenzfarbstoff integriert ist, kann signifikante Änderungen der Photostabilität hervorrufen. Es konnte beobachtet werden, dass sich aus Benzothiazol aufgebaute Fluorophore verstärkt photolabil verhalten im direkten Vergleich zu indolhaltigen Farbstoffen.^[129,138] Diese Tatsache konnte durch die, in Kapitel 3.3 gezeigten Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchung von **TO**, **TR** und **CyIQ** bzw. **Cy3** bekräftigt werden.^[58] Sowohl **TO** als auch **TR** beinhalten den Heterocyclus Benzothiazol, bei dem der enthaltene Schwefel die Hauptursache der Instabilität darstellt. Die Anwesenheit von Indol innerhalb des Farbstoffgerüsts von **CyIQ** macht sich durch eine erstaunlich größere Stabilität bei Belichtung bemerkbar. Dieser Effekt tritt noch auffallender bei **Cy3** zum Vorschein, das aus zwei 3,3-Dimethylindolbausteinen zusammengesetzt ist (Abbildung 16). Generell zeigen **Cy3** und seine strukturverwandten Cyaninfarbstoffe eine relativ hohe Photostabilität, weshalb sie sehr häufig in der Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt werden.^[139]

34

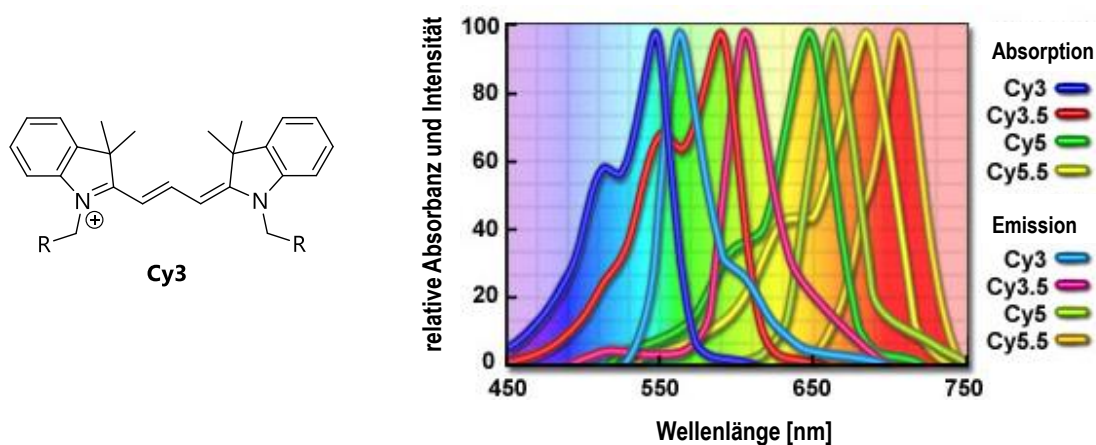


Abbildung 16: Links: Struktur des Cyaninfarbstoffes **Cy3**. Rechts: Absorptions- und Emissionsspektren von **Cy3** und den strukturell verwandten Fluorophoren **Cy3.5**, **Cy5** und **Cy5.5**.^[124]

Allerdings zeigen **Cy3** und analog aufgebaute Cyanine entscheidende Defizite in ihren optischen Eigenschaften, weshalb sie den strengen Anforderungen an leistungsstarke Fluoreszenzfarbstoffe nicht entsprechen. Sie weisen nur eine sehr kleine *Stokes*-Verschiebung von lediglich 20 nm auf. Infolgedessen kann eine Störung durch das Anregungslicht deutlich stärker ins Gewicht fallen und gestattet außerdem nur die

Aufzeichnung eines sehr kleinen, beschränkten Emissionsbereiches. In der Praxis findet man zahlreiche Beispiele, bei denen die beiden Cyanine **Cy3** und **Cy5** als Energietransferpaar kombiniert werden. Bei genauerer Betrachtung der Absorptionsspektren^[124] von **Cy3** bzw. **Cy5** wird deutlich, dass sich die Absorptionsbanden beider Farbstoffe sehr stark überlagern. Eine gezielte Anregung nur eines der beiden Fluorophore ist damit nahezu unmöglich. Folglich sind bei einem Energietransfer (ET) zwischen den beiden Cyaninen nur schlechte Fluoreszenzverhältnisse und damit mäßige Farbkontraste detektierbar. Obendrein ist eine saubere Separierung der mittels ET erzeugten Akzeptoremission und der Emission durch ungewollte direkte Anregung des Akzeptors nicht vollständig zu erreichen. Präzise Resultate lassen sich unter diesen Gegebenheiten nur schwer erzielen. Aus diesen Gründen steigt die Nachfrage nach neuen und besser geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen stetig an.^[15]

Erhöhung der Photostabilität durch elektronenziehende Substituenten

Bereits 1975 beschäftigte sich *Byers et al.* mit der 1,2-Addition von Singulett-Sauerstoff an das α -Kohlenstoffatom der Polymethinbrücke von Cyaninen. Er zeigte, dass diese Photooxidationsreaktionen zur primären Bildung von Carbonylkomponenten führen.^[140] Ca. 20 Jahre später erforschte *Chen et al.* die Photooxidation von benzothiazolhaltigen Cyaninen und die dabei zugrundeliegenden Mechanismen.^[131] *Chen* konnte die photoinduzierte Entstehung aldehyd- und ketonfunktionalisierter Abbauprodukte bestätigen.

Mit der Absicht, die Photostabilität von Merocyaninen zu erhöhen, untersuchte *Hahn et al.* den durch photogenerierten Singulett-Sauerstoff ausgelösten Abbauprozess dieser Farbstoffe sowie entstehende Abbauprodukte im Detail.^[138] *Hahn et al.* konnten die Bildung von Benzothiazolon **7** eindeutig anhand von LC-MS-Messungen nachweisen. Der initiale Singulett-Sauerstoff-Angriff am nucleophilsten α -Kohlenstoff

der Polymethinbrücke des Cyanins **4** führt zur Generierung des Carbonyls **7** (siehe Abbildung 17).

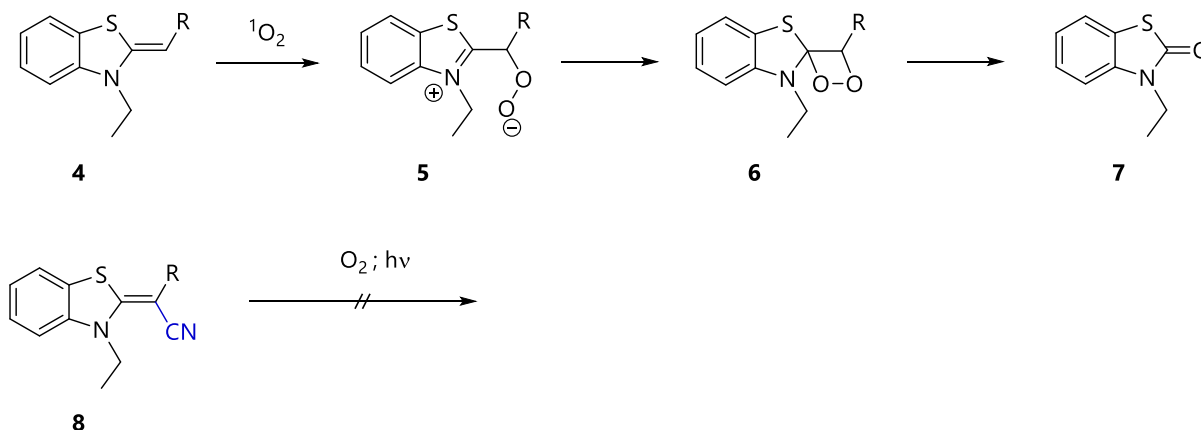


Abbildung 17: Postulierter Photoabbauweg nach *Hahn et al.*

Im Zuge eines Angriffs durch Singulett-Sauerstoff bildet sich zuerst das zwitterionische Intermediat **5**, welches anschließend zum Dioxetan **6** umgewandelt wird. Die Zersetzung von **6** resultiert schließlich in der Bildung des stabilen Benzothiazolons **7**. *Hahn et al.* fanden zudem heraus, dass dieser Abbauprozess verhindert werden kann, indem man den α -Kohlenstoff mit einer elektronenziehenden Gruppe modifiziert. Infolgedessen wird Elektronendichte von diesem Atom abgezogen und somit der Singulett-Sauerstoff-Angriff merklich reduziert. Eine elektronenziehende Modifikation in Form eines Cyanid-Substituenten ist besonders günstig. Die Cyanid-Funktion besitzt nicht nur eine stark elektronenziehende Wirkung, sondern ist zudem auch sehr klein und gewährleistet dadurch die Erhaltung der Planarität des Farbstoffmoleküls. *Hahns* cyanidmodifizierter Merocyaninfarbstoff **8** wies eine enorm gesteigerte Stabilität im Vergleich zum unmodifizierten Derivat auf.

Analog der Beobachtungen von *Hahn* kann man gleiche Rückschlüsse auf die Photoabbauprozesse der hier besprochenen Farbstoffe ziehen. Aufgrund der Erkenntnisse sind unter anderem drei der Fluorophore dieser Dissertation mit einer Cyanid-Gruppe versehen worden.^[59]

Eine Strategie, die ebenfalls auf den Forschungsergebnissen von *Hahn* basiert, wurde von *Armitage et al.* verfolgt. *Armitage et al.* synthetisierten Cyanine, die einfach- oder

perfluorierte Aromaten für die Erzeugung des gewünschten Elektronenzugs enthielten, wie das in Abbildung 19 beispielhaft gezeigte **TO-4F**.^[141] In weiteren Arbeiten stellten *Armitage et al.* auch Fluorophore mit Cyanid-Modifikation an α -Position der Polymethinbrücke her. Darunter befand sich auch ein cyanidtragendes Thiazolorange-Derivat **TO-CN** (Abbildung 19).^[142] Das gleiche Molekül (mit 3-Hydroxypropyl-Linker anstelle der Methylgruppe am Benzothiazol) wurde ebenfalls zu Beginn der Dissertation synthetisiert und mit den anderen neuen Fluorophoren verglichen. Es stellte sich bald heraus, dass, trotz geringer Größe der Cyanid-Gruppe, ihre Anwesenheit an der Monomethinbrücke von **TO-CN** einen massiv störenden Effekt auf die Planarität des Moleküls ausübt. Folglich sanken die Quantenausbeute und damit die Fluoreszenzintensität des **TO-CN** im Vergleich zum unmodifizierten Derivat drastisch ab.

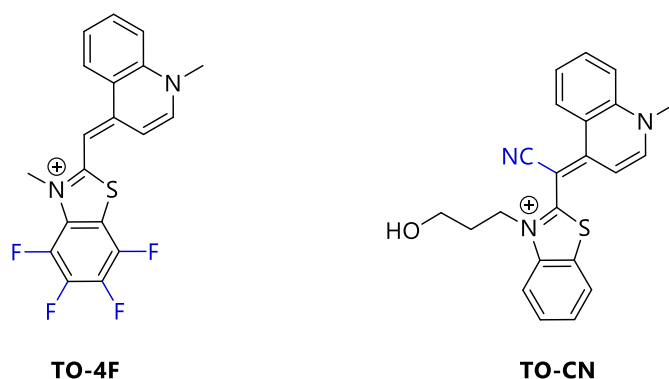


Abbildung 18: Struktur von **TO-4F** (links) und **TO-CN** (rechts).^[141,142]

In der Evaluation aller entworfenen Cyaninfarbstoffe wurde **TO-CN** schnell aufgrund seiner mangelhaften spektroskopischen Eigenschaften als eine weniger vielversprechende Verbindung aussortiert und deshalb nicht weitergehend erforscht. Dennoch gelangen *Armitage et al.* einige Zeit später die Publikation dieses Fluorophors in einer hochrangigen Fachzeitschrift.^[142]

Erhöhung der Photostabilität durch kovalent gebundene Triplet-Löcher

Angesichts der schlechten Löslichkeit von TSQ in wässrigen Medien sowie deren potentielle Toxizität bei sehr hohen, aber notwendigen Konzentrationen, ist der Einsatz dieser Additive nur bedingt in der Praxis realisierbar. Kürzlich entwickelte *Scott C. Blanchard* eine ausgesprochen effektive Strategie zur Erhöhung der Stabilität organischer Fluorophore. Durch kovalente Verknüpfung von Triplet-Löchern mit einem Cyaninfarbstoff erhielt er die höchste effektiv erreichbare TSQ-Konzentration im finalen Konjugat.^[23,127,128,136,143,144] *Blanchard et al.* konnten zeigen, dass die verschiedenen TSQ-Modifikationen unterschiedlichen Mechanismen beim Löschen der Cyanin-Triplettzustände folgen. Während auf der einen Seite die Tripletzustände von NBA- oder Trolox-modifizierten Fluorophorderivaten einem weniger kontrollierbaren Elektronentransfer-Mechanismus unterliegen, findet auf der anderen Seite das Löschen des angeregten Tripletzustandes eines Cyanins mit COT-Modifikation über einen Energietransfer auf COT statt. *Blanchard et al.* synthetisierten unter anderem ein **Cy5**-Derivat, das über einen Propyl-Linker mit COT versehen wurde. Anhand dieses Konjugates konnte die Lebenszeit des Tripletzustandes von **Cy5** von ungefähr 63 μs auf 1.1 μs verkürzt werden. Verweilt ein Chromophor sehr kurz in seinem angeregten Tripletzustand, werden ablaufende Nebenreaktionen mit den stark oxidierenden Sauerstoffspezies signifikant vermindert. Die Messungen bewiesen ferner eine Korrelation zwischen der Lebenszeitverkürzung des Tripletzustandes und der Photostabilitätserhöhung des Farbstoffes.

Auch in der Gruppe von *Wagenknecht* arbeitet man aktuell an der Synthese COT-modifizierter Cyaninfarbstoffe mit dem Ziel, die bereits außergewöhnlich großen Photostabilitäten der neuen Fluorophore noch weiter zu steigern.

3.5 Peptid-Nukleinsäuren (PNA)

Seit über 20 Jahren stellt die von *Nielsen et al.* eingeführte PNA (*peptide nucleic acid*) eines der wichtigsten Nukleinsäure-Analoga dar. PNA findet man heutzutage sehr häufig als Werkzeug in der chemisch-biologischen Forschung.^[145] In der *Nielsen*-PNA (**aegPNA**) wurde das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA durch das einfacher zu synthetisierende achirale 2-Aminoethyl-Glycin (**aeg**) ersetzt. Diese strukturelle Veränderung führte einerseits zu einer größeren konformationellen Flexibilität der PNA und andererseits zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Nukleasen und Proteasen (Abbildung 19). Besonders diese Resistenzerhöhung gegen abbauende Enzyme der Zelle ließ die **aegPNA** zu einer attraktiven Alternative in diagnostischen Anwendungen heranwachsen. Die **aegPNA** besitzt aufgrund ihrer Peptidstruktur ein ungeladenes Rückgrat. Dadurch erreichte man im Heteroduplex mit natürlichen Nukleinsäuren eine reduzierte Abstoßung zum negativ geladenen Phosphat-Rückgrat. Als direkte Folge der verminderten repulsiven elektrostatischen Kräfte durch **aegPNA** wird eine gesteigerte Affinität zu komplementärer DNA oder RNA im Vergleich zu dem jeweiligen Homoduplex erlangt. Im Zuge einer Optimierung ergänzte man den C-Terminus der **aegPNA** mit einem oder mehreren Lysinresten und verringerte so nicht nur die PNA-Selbstaggregation sondern erhielt gleichzeitig eine bessere Löslichkeit der PNA in Wasser.^[146,147]

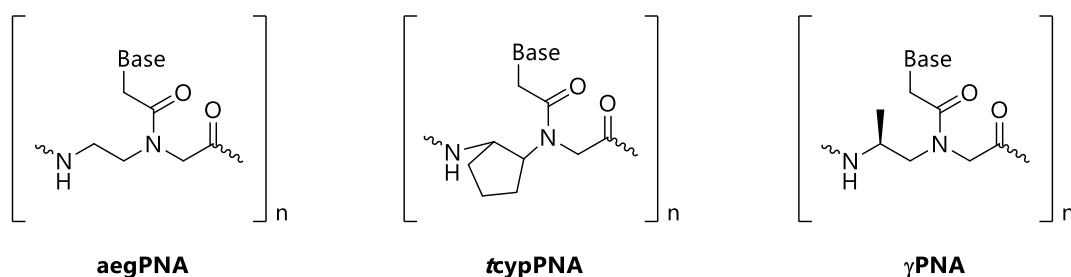


Abbildung 19: Strukturen der *Nielsen*-PNA (**aegPNA**) und ihre Derivate **ttypPNA** sowie **γPNA**, die durch eine strukturelle Weiterentwicklung die Eigenschaften der PNA verbesserten.

Die **aegPNA** besitzt die Fähigkeit, mit sich selbst zu PNA/PNA-Homodimeren zu hybridisieren. Eine weitere typische Eigenschaft der **aegPNA** ist die Ausbildung von *Watson-Crick-Hoogsteen*-(PNA)₂/DNA-Triplexen. Die Triplex-Formierung sowie die große Flexibilität und die dadurch gegebene Möglichkeit zur parallelen und auch antiparallelen Bindung an Nukleinsäuren schränken die Anwendungsauswahl der

aegPNA sehr stark ein.^[148] In der letzten Zeit wurden verschiedene Strategien verfolgt, welche die Unterdrückung der Selbstbindung zwischen den PNA-Einzelsträngen zum erklärten Ziel hatten.^[149] Darunter befand sich die Entwicklung einer pseudo-komplementären PNA, in der die Nukleobasen Adenin und Thymin der konventionellen **aegPNA** durch die modifizierten Basen 2,6-Diaminopurin und 2-Thiouracil ersetzt wurden.^[150,151] Es konnte daraufhin nachgewiesen werden, dass der Einbau von 2,6-Diaminopurin aufgrund der Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung eine Stabilisierung im PNA-DNA-Heteroduplex bewirkt. Andere synthetische Basensurrogate, wie ein bicyclisches Thymin-Analog oder das tricyclische, zu Guanosin komplementäre „*G-clamp*“-Derivat förderten die Heteroduplex-Stabilität durch verstärkte π - π -Wechselwirkungen in gebildeten Basenpaarungen.^[152-154] Allerdings reichte die Bindungsspezifität dieser Basenvariationen zur exakten Differenzierung zwischen DNA und RNA bei weitem nicht aus. Eine verbesserte Selektivität für komplementäre DNA konnte man erstmals durch eine Veränderung der Stereochemie im PNA-Grundgerüst erzielen. In diesem Fall wurde die γ -Position im PNA-Rückgrat mit einer Methylgruppe versehen (Abbildung 19).^[155,156] Auf diese Weise erhielt die sogenannte **γ PNA** eine Chiralität und brachte sie damit ihrem aus der Natur abstammendem DNA-Vorbild ein großes Stück näher. Als direkte Folge der eingeführten Chiralität verringerte sich die Flexibilität der PNA dermaßen, dass eine Selektivitätssteigerung für DNA möglich wurde.

Mehrere Ansätze zur Affinitäts- und Selektivitätserhöhung beruhten auf der Integrierung cyclischer Modifikationen in das PNA-Rückgrat.^[157] Der überwiegende Teil dieser cyclischen PNA-Variationen verschlechterte jedoch zugleich die Hybridisierungseigenschaften der PNA oder führte zu schwer abschätzbaren Sequenzabhängigkeiten.^[158] Unter allen cyclischen Derivaten verdienten sich die *trans*-Cyclopentan-PNA (**tcypPNA**) sowie die Pyrrolidinyl-PNA (**acpcPNA**) besondere Aufmerksamkeit. Die Pyrrolidinyl-PNA, als vielversprechende Innovation im Bereich der PNA-Strukturoptimierung, wird im folgenden Abschnitt im Detail erörtert. Bei der anderen konformationell stark eingeschränkten PNA-Variante, der **tcypPNA**, wurde der Ethylendiamin-Baustein aus der **aegPNA** durch eine oder mehrere (*S,S*)-*trans*-Cyclopentandiamin-Einheiten ersetzt (Abbildung 19).^[159] Dieser Austausch bewirkte eine deutliche Verringerung der konformellen Flexibilität von **aegPNA**. Damit erreichte

die **tcypPNA** einen signifikanten Affinitätsanstieg für DNA sowohl im Heteroduplex als auch in tripelhelikalen Strukturen.^[160,161]

Pyrrolidinyl-PNA (**acpcPNA**)

Die gravierenden Nachteile der *Nielsen*-PNA in Bezug auf Flexibilität, Selektivität sowie Spezifität konnte *Tirayut Vilaivan* durch Entwicklung der Pyrrolidinyl-PNA (**acpcPNA**) beseitigen. In der **acpcPNA** wurden zwei verschiedene cyclische Bausteine in das PNA-Rückgrat eingegliedert. Dabei wurde alternierend ein *D*-Prolin mit einer (1*S*,2*S*)-2-Amino-1-cyclopentancarbonsäure-Einheit (**acpc**), die als Abstandhalter dienen sollte, verbunden. Diese gut durchdachte Modifikation verlieh der resultierenden **acpcPNA**-Struktur eine Chiralität und eine cyclische, der DNA weitaus ähnlichere Form (Abbildung 20). Infolge der strukturellen Veränderung erniedrigte sich die Flexibilität des PNA-Gerüsts außerordentlich und ermöglichte zugleich eine ausschließlich antiparallel orientierte Bindung an DNA. Überdies hinaus gelang mit dem einzigartigen Design der **acpcPNA** eine signifikant bevorzugte Heteroduplex-Ausbildung mit DNA im Gegensatz zur Formierung eines **acpcPNA**-RNA-Hybrids. Diese äußerst geringe Affinität zu RNA unterscheidet die **acpcPNA** maßgeblich von allen anderen PNA-Modifikationen.^[162-165]

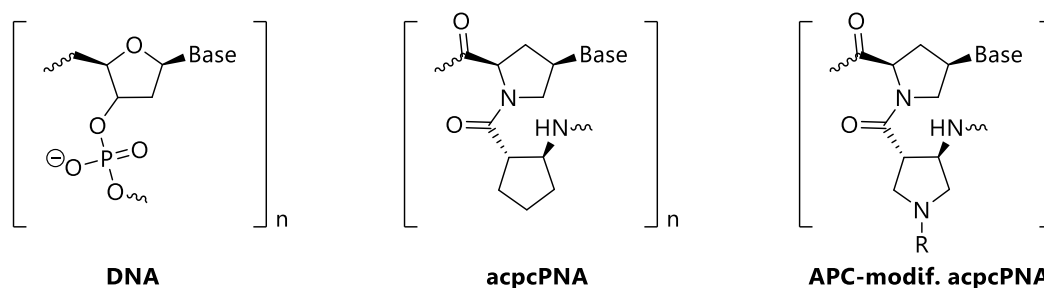


Abbildung 20: Strukturvergleich von **DNA**, **acpcPNA** und dem **APC**-modifizierten **acpcPNA**-Baustein, der die Fluoreszenzmarkierung der Pyrrolidinyl-PNA ermöglicht.

Weiterhin zeigte die Pyrrolidinyl-PNA keinerlei nachweisbare Bildung von PNA/PNA-Doppelsträngen oder tripelhelikalen Strukturen, was die **acpcPNA** bis zum heutigen

Tag von konkurrierenden PNA-Gerüsten differenziert. Alle anderen entwickelten PNA-Varianten binden mit sich selbst in gleichem Maße oder sogar besser als mit den natürlichen Nukleinsäuren.^[149] Weitere Vorteile der **acpcPNA** im Vergleich zur *Nielsen*-PNA sind die exzellente Sequenzspezifität und Hybridisierungseffizienz sowie eine optimale Diskriminierung von Einzelbasenfehlpaarungen und der damit verknüpften außerordentlich hohen Schmelzpunktdifferenzen.^[166-168] Kürzlich gelang es, eine (*3R,4S*)-3-Aminopyrrolidin-4-carbonsäure-Einheit (*APC*) in die **acpcPNA**-Struktur einzubauen. Diese chemische Variation erlaubt die postsynthetische Verknüpfung der **acpcPNA** mit Fluoreszenzfarbstoffen, und demzufolge kann die hohe Sequenzselektivität spektroskopisch beobachtbar gemacht werden (Abbildung 20). Mittels reduktiver Alkylierung verknüpfte man die *APC*-Einheit mit verschiedenen azid- oder alkinfunktionalisierten Linkern und konnte anschließend anhand der kupferkatalysierten „Click“-Reaktion verschiedene Fluorophore an die PNA-Sonde binden.^[169-172] Ein Charakteristikum, das die Pyrrolidinyl-PNA ebenfalls deutlich von allen bisherigen PNA-Variationen unterscheidet, ist eine stärkere Heteroduplex-Stabilisierung durch A·T-Basenpaare anstelle der gewöhnlich auftretenden Stabilitätserhöhung durch die Paarung von Guanin mit Cytosin. Ergänzend konnte man in einer aktuellen Arbeit erneut die außergewöhnlich feste Bindung innerhalb von **acpcPNA**-DNA-Hybriden nachweisen. Als Folge sehr starker Wechselwirkungen zwischen den Basen und einiger Chromophore kann in den gebildeten Hybriden eine signifikante Minderung der Fluoreszenzintensität des Chromophors auftreten. Durch die Insertion einer überschüssigen Base in die PNA-Sequenz wurde die Fluorophor-Basen-Wechselwirkung gemindert. Folglich konnte man die Emissionsintensität der Fluoreszenzfarbstoffe vollständig wiederherstellen.^[172]

Die genannten positiven Eigenschaften der **acpcPNA** wurden auch im Rahmen dieser Dissertation zur hochempfindlichen DNA-Detektion bei Strangaustauschexperimenten (Kapitel 6.2) ausgenutzt. In Kapitel 6.3 werden weitere Vorteile der Pyrrolidinyl-PNA anhand der durchgeführten Untersuchungen zur PNA-Invasion in doppelsträngige DNA herausgearbeitet. Die besonderen Eigenschaften der **acpcPNA** machen ihren außerordentlichen Wert bei antigenen Forschungsvorhaben deutlich. Auch bei solchen Antigen-Strategien ist die herkömmliche *Nielsen*-PNA aufgrund mangelnder Spezifität keine ernstzunehmende Konkurrenz für die einzigartige **acpcPNA**.

4. Entwicklung und Evaluation photostabiler Cyaninfarbstoffe

Dieses Kapitel ist dem ersten Teil der Dissertationsthematik gewidmet und in vier Teilbereiche gegliedert. Zu Beginn werden die verwendeten Synthesestrategien näher vorgestellt, die bei der Entwicklung der neuen Fluoreszenzfarbstoffe zielführend waren. Die Charakterisierung der synthetisierten Farbstoffe wird im Anschluss innerhalb der drei verbleibenden Bereiche des Kapitels vorgenommen. Dabei werden die Teilbereiche jeweils einer spezifischen Untersuchung zugeordnet, die einen maßgebenden Parameter leistungsstarker Fluorophore repräsentiert. Der Vergleich erhaltener Daten aus Fluoreszenztitration, Halbwertszeit- sowie Quantenausbeute-Bestimmung gewährt schließlich die Bewertung der gewünschten Eigenschaften der verschiedenen Cyaninfarbstoffe.

Zur einfacheren Unterscheidung der 29 diskutierten Fluorophore der vorliegenden Arbeit wurden die vollständig synthetisierten Farbstoffe nach ihrer Emissionsfarbe benannt. Ausnahmen hierbei bilden die Cyanine, deren Abkürzungen bereits seit geraumer Zeit durch diverse Publikationen „etabliert“ wurden. Hierzu zählen: **CyIQ**, **TR**, **TO** sowie deren cyanidmodifizierte Derivate **TR-CN** und **TO-CN**.

Im Experimentaltail (Kapitel 8.3, Tabelle 11) ist eine Übersicht zu finden, die eine Aufstellung aller Farbstoffe und ihrer entsprechenden Edukte zeigt. Weiterhin sind dort die Gesamtausbeuten über alle Synthesestufen aufgelistet.

4.1 Synthesestrategien

Mit der Absicht, durch gezielte synthetische Variationen die Photostabilität von Fluorophoren zu erhöhen, wurden primär zwei Vorgehensweisen bei der Synthese der Cyaninfarbstoffe berücksichtigt. Im Folgenden werden diese beiden Syntheserouten zur Farbstoffherstellung vorgestellt.

Einführung elektronenziehender Substituenten

Hahn et al. konnten aufgrund der Untersuchungen von Merocyaninen eindeutige Rückschlüsse auf ihren primären Abbauprozess ziehen, der bei längerer Belichtung stattfindet.^[138] Das Hauptprodukt photolytisch degradierter Cyanine entsteht als Folge einer Oxidation des nukleophilsten Kohlenstoffatoms der Methinbrücke. *Hahn et al.* konnten weiterhin zeigen, dass sich dieser photoinduzierte Abbauweg durch Einführung einer Cyanidfunktion am α -Kohlenstoff unterbinden lässt.

Der Trimethin-Cyaninfarbstoff Thiazolrot (**TR**) wurde im Arbeitskreis *Wagenknecht* erfolgreich zur Markierung von Oligonukleotiden eingesetzt.^[36] **TR** zeichnet sich zwar durch eine hohe Emissionsintensität aus, jedoch weist es eine niedrige Stabilität bei intensiver Belichtung auf.^[58] Deshalb galt es, in Anlehnung an die Erkenntnisse *Hahns*, **TR** mit einer Cyanid-Gruppe am nukleophilen α -Kohlenstoff zu versehen (Abbildung 21). Im Anschluss sollte die Bestimmung der Halbwertszeiten von **TR** sowie des modifizierten Derivates **TR-CN** den stabilisierenden Effekt der Cyanid-Modifikation widerspiegeln.

44

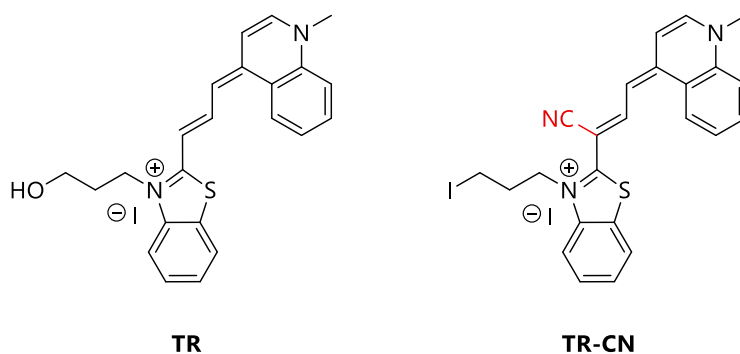


Abbildung 21: Strukturen der Cyaninfarbstoffe **TR** und **TR-CN**.

Die Grundstruktur von **TR-CN** lässt sich in die jeweils alkylierten Heterocyclen von Chinolin und Benzothiazol-2-acetonitril einteilen. Der initiale Schritt bei der Synthese des Vorgängers **TR**, basierte auf der Alkylierung von 2-Methylbenzothiazol mit 3-Iodpropanol. Analog zur **TR**-Darstellung wurden mehrere Versuche zur Alkylierung von Benzothiazol-2-acetonitril **9** mit 3-Iodpropanol vorgenommen. Allerdings fand unter diesen Bedingungen keine Umsetzung zum gewünschten Produkt **9a** statt (Abbildung 22).

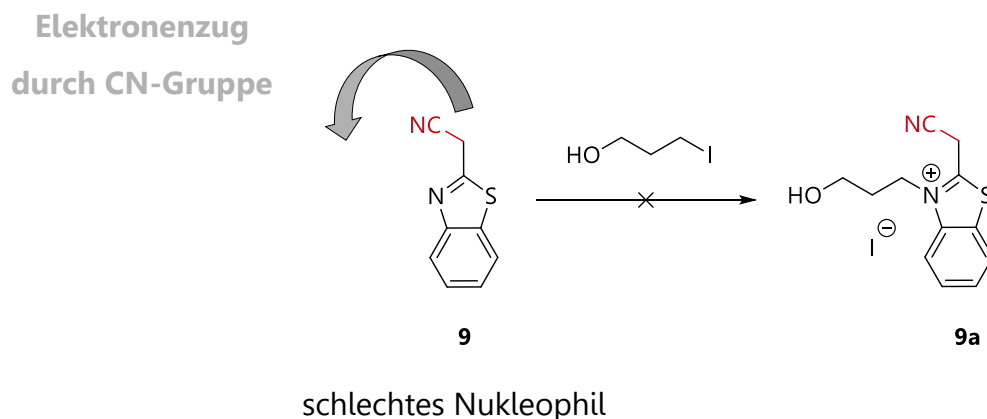


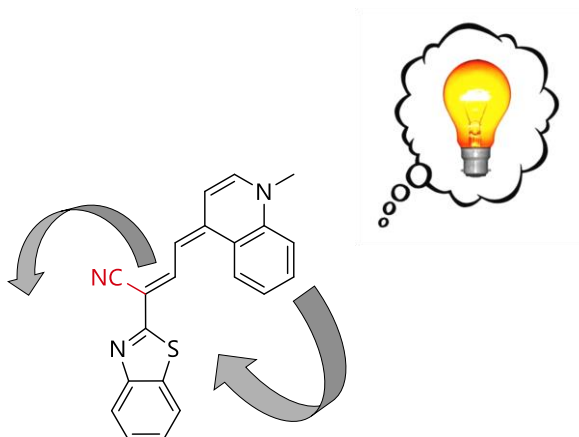
Abbildung 22: Umsetzung von Benzothiazol-2-acetonitril **9** mit 3-Iodpropanol zum Produkt **9a**.

Variationen der Reaktionstemperatur, des eingesetzten Lösungsmittels, eine vorherige Schützung der Hydroxyfunktion des 3-Iodpropanols sowie der Austausch des Nukleophils gegen 1,3-Diodpropan führten ebenfalls nicht zum Alkylierungsprodukt. Die Ursache dafür, dass sich die nukleophile Substitution mit **9** nicht bewerkstelligen lässt, ist im starken Elektronenzug der Cyanid-Gruppe zu finden. Als Folge dieses wirksamen -M-Effektes sind die nukleophilen Eigenschaften von **9** äußerst gering (Abbildung 22).

Im Allgemeinen lassen sich Alkylierungsreaktionen anhand zwei prinzipiell denkbarer Wege beeinflussen. Einerseits besteht die Option, das Elektrophil in der Substitutionsreaktion durch ein elektrophileres Molekül zu ersetzen, womit die Umsetzung zum Alkylierungsprodukt gefördert werden kann. Die Propyl-Einheit sollte als Linker-Einheit zur Verknüpfung des Farbstoffes mit der DNA dienen. Eine Erhöhung der Elektrophilie mittels verkürztem Linker ist theoretisch möglich. Beispielsweise alkylierte *Hahn* Verbindung **9** mit Iodethan.^[138] Die Elektrophiliesteigerung durch Veränderung der verknüpfenden Einheit ist im vorliegenden Fall jedoch nicht ratsam. Anhand dieser Propyl-Gruppe kann ein definierter Anstand zum Oligonukleotid eingehalten werden. Zu kurze Verbindungsstücke können zu großen π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Cyanin und der Nukleobasen führen und dementsprechend eine ungewollte Fluoreszenzlöschung verursachen.^[72]

Die zweite Option zur Verbesserung der Alkylierungsreaktion ist die Generierung eines reaktiveren Nukleophils. Genauer gesagt soll eine geschickte chemische Veränderung

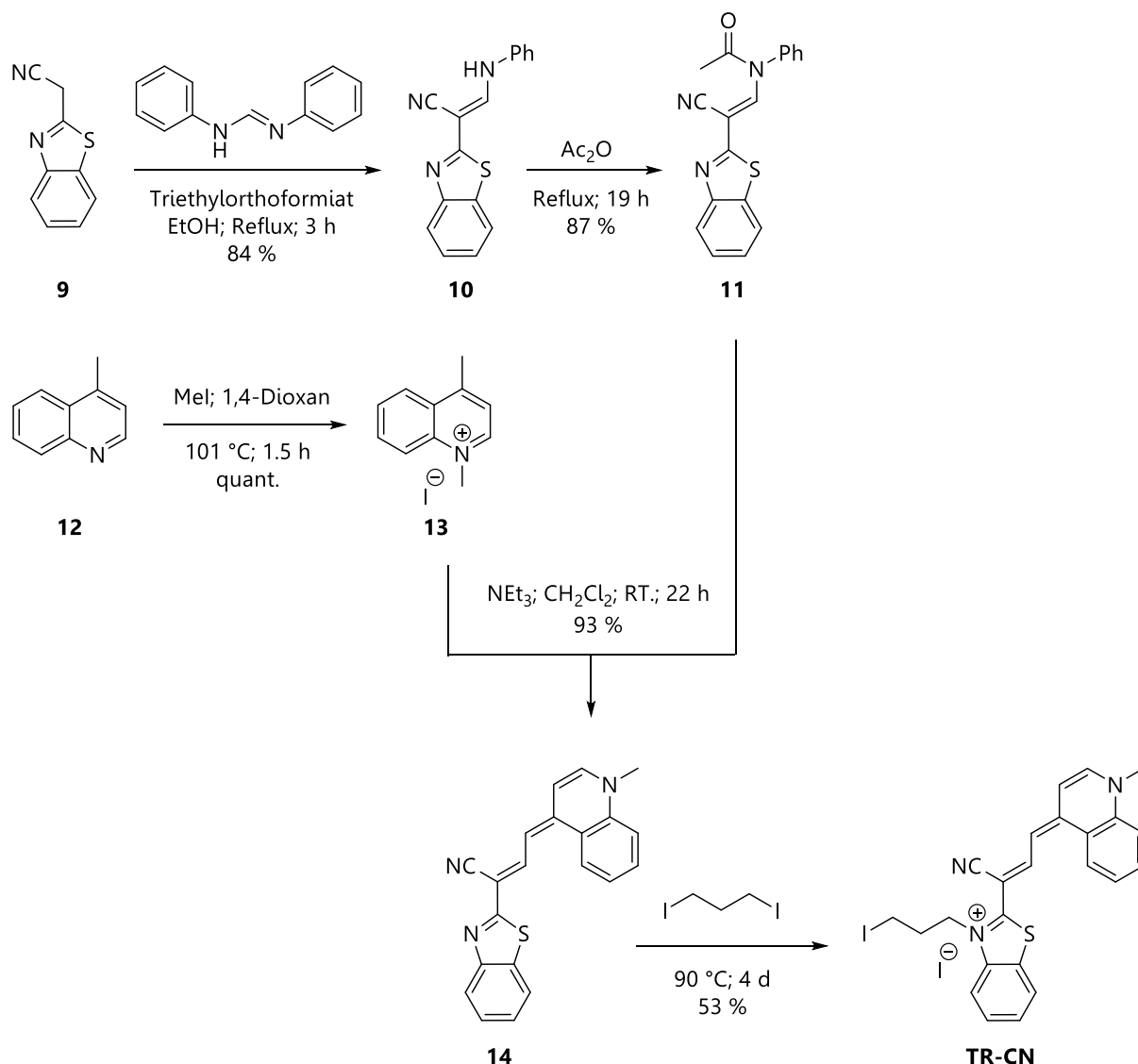
die Elektronendichte in Molekül **9** erhöhen. Dies lässt sich beispielsweise durch eine konjugierte Bindung aromatischer Reste an das Edukt **9** verwirklichen. Das heteroaromatische Chinolin sowie das konjugierte Rückgrat von **TR-CN** sind für diesen Zweck optimal geeignet und können die Elektronendichte signifikant erhöhen (Abbildung 23).



1. Assemblierung des Rückgrats
2. Alkylierung am Ende der Synthese

Abbildung 23: Entscheidender Gedankengang zur erfolgreichen Synthesestrategie von **TR-CN**. Ausgleich des Elektronenzugs der Cyanid-Gruppe an **9** durch den +M-Effekt des konjugierten Methylchinolins.

Im Hinblick auf diese Strategie wurde die Alkylierung abweichend von der **TR**-Syntheseroute nicht zu Beginn, sondern erst am Ende der **TR-CN**-Darstellung durchgeführt. Diese Vorgehensweise führte letztendlich erfolgreich zum gewünschten Produkt.^[59] Abbildung 24 zeigt die Einzelschritte der Synthese von **TR-CN**.

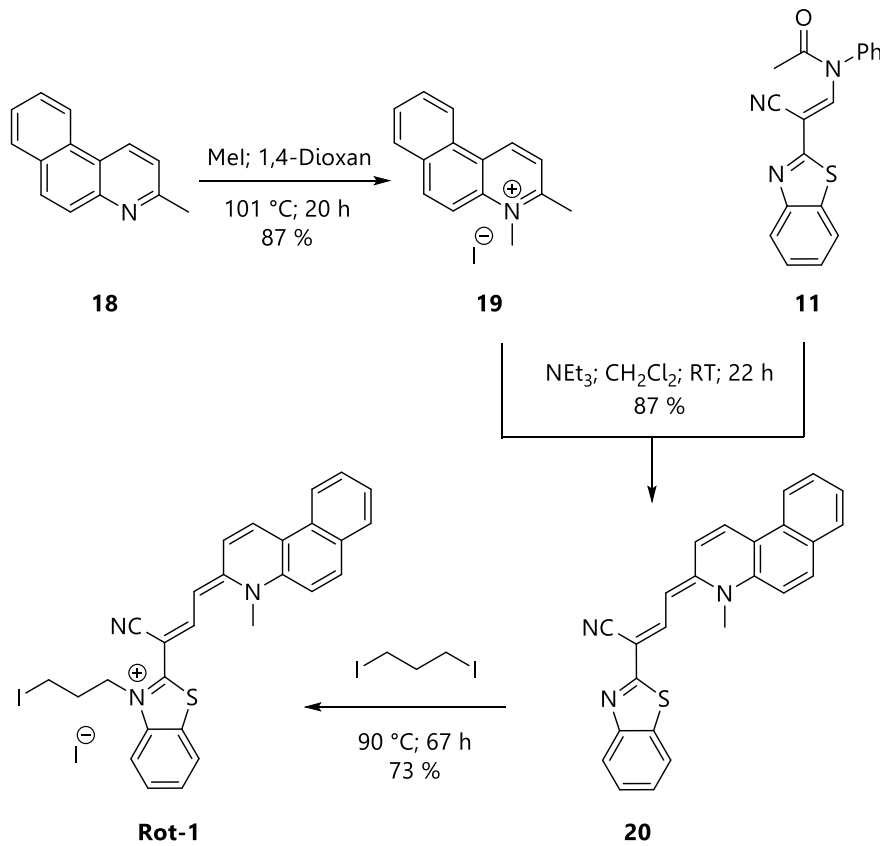

 Abbildung 24: Syntheseschritte zur Darstellung von **TR-CN**.

Im ersten Schritt wird Benzothiazol-2-acetonitril (**9**) mit der Polyen-Vorstufe („*polyene-chain precursor*“^[173]) *N,N*-Diphenylformamidin in Anwesenheit von Triethylorthoformiat in siedendem Ethanol zum Hemicyanin **10** umgesetzt. Das Hemicyanin-Derivat **10** ist bei Raumtemperatur eher reaktionsträge und muss, damit die folgenden Reaktionen ablaufen können, aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt über elektronenziehende Substituenten am Anilin-Stickstoff. Aus diesem Grund wurde Verbindung **10** mittels Acetylierung in das Hemicyanin **11** umgewandelt, womit gleichzeitig eine bessere Abgangsgruppe geschaffen wurde. Wahlweise kann man auch **9** direkt mit *N,N*-Diphenylformamidin und Essigsäureanhydrid bei 139 °C zur Reaktion bringen und folglich das Intermediat **10** umgehen. Allerdings zeigte sich bei

der Ansatzaufarbeitung, dass diese direkte Reaktion zu schwer separierbaren Nebenprodukten führte, die nur säulenchromatographisch abzutrennen waren. Im Gegensatz dazu zeigte der zweistufige Syntheseweg über die intermediäre Verbindung **10** zum Hemicyanin **11** einige Vorteile. Beide Stufen konnten sehr sauber mittels Kristallisation erhalten werden. Zudem verlief die zweistufige Route mit höherer Gesamtausbeute.

Der Zugang zum zweiten heteroaromatischen Teil des Farbstoffes, dem quartären 1,4-Dimethylquinolin-1-iumiodid (**13**), wurde durch nukleophile Substitution zwischen 4-Methylchinolin (**12**) und Iodmethan erreicht. Anschließend erfolgte die Kupplung der beiden Bausteine **11** und **13** unter Basenkatalyse zum Cyanin **14**. Die geplante abschließende Alkylierung von **14** gelang ausschließlich unter lösungsmittelfreien Bedingungen in reinem 1,3-Diiodpropan. Selbst nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen unter den harschen Bedingungen wurden lediglich moderate Ausbeuten um 53 % an **TR-CN** erhalten. Diese Tatsache zeigt, dass trotz der gesteigerten Nukleophilie das resultierende Molekül **14** nur über mäßige nukleophile Eigenschaften verfügt. Dies konnte anhand analoger Reaktionen mit elektronisch variierenden Systemen, wie z. B. dem Intermediat **20** von **Rot-1** (Abbildung 25) bestätigt werden.

Der initiale Aufbau des Farbstoffrückgrates erwies sich als eine gut funktionierende Strategie und wurde infolgedessen bei weiteren cyanidtragenden Fluoreszenzfarbstoffen erfolgreich angewandt. Die Darstellung des Cyanin-Derivates **Rot-1** fand ebenfalls anhand der oben beschriebenen Syntheseroute statt. In **Rot-1** wurde der Chinolinrest des **TR-CN** durch einen Benzochinolinrest (**19**) ausgetauscht, wodurch eine Vergrößerung des π -Systems bewirkt wurde. Folglich stieg auch die Nukleophilie des Intermediates **20** von **Rot-1** im Vergleich zu der von Verbindung **14** aus **TR-CN**. Der größere nukleophile Charakter von **20** bestätigte sich in einer signifikant verminderten Reaktionszeit der finalen Alkylierungsreaktion bei gleichzeitiger Erhöhung der Ausbeute. Abbildung 25 zeigt das Reaktionsschema sowie den cyanidmodifizierten Farbstoff **Rot-1**.


 Abbildung 25: Syntheseschritte zur Darstellung von **Rot-1**.

Die Fluorophore **TR-CN** und **Rot-1** repräsentieren die beiden einzigen Trimethin-Farbstoffe, die innerhalb der Arbeit genauer besprochen werden. Wie sich im Verlauf des Kapitels 4.3 zeigen wird, fallen die durchschnittlichen Halbwertszeiten der Cyanin-Styryl-Fluorophore im Vergleich zu den Trimethin-Farbstoffen um mindestens eine Größenordnung höher aus. In Anbetracht dieses enormen Stabilitätsunterschiedes wurde bei der Synthesearbeit das Hauptaugenmerk auf Farbstoffderivate mit Styryl-Grundstruktur gelenkt.

Cyanin-Styryl-Farbstoffe

In Kapitel 3.3 wurde das strukturelle Vorbild des Großteils aller hier vorgestellten Fluorophore gezeigt. Es handelt sich dabei um den Styryl-Fluoreszenzfarbstoff **CyIQ** (*Cyanine Indole Quinoline*). Die Bezeichnung von **CyIQ** als „Styryl-Farbstoff“ ist streng genommen nicht korrekt. Ursprünglich wurden lediglich Chromophore unter diesem Begriff zusammengefasst, die eine Styryl-Einheit in ihrem Grundgerüst vorweisen konnten.^[123] Heutzutage ist das gemeinsame Charakteristikum der Styryl-Farbstoffe die Anwesenheit eines Arylvinyl- bzw. Hetarylvinyl-Fragmentes innerhalb des konjugierten Systems.

Aufgrund der hervorragenden Photostabilität distanziert sich **CyIQ** deutlich von den klassischen Cyaninfarbstoffen.^[58] Vor allem diese gewünschte photophysikalische Eigenschaft gab die primäre synthetische Richtung vor, die bei den neuen Fluorophoren angestrebt wurde.

CyIQ ist aus den beiden Heterocyclen 2-Methylchinolin bzw. Indol aufgebaut (Abbildung 26). Der Indol-Komponente verdankt **CyIQ** seine außerordentliche Beständigkeit bei Belichtung.^[129,138]

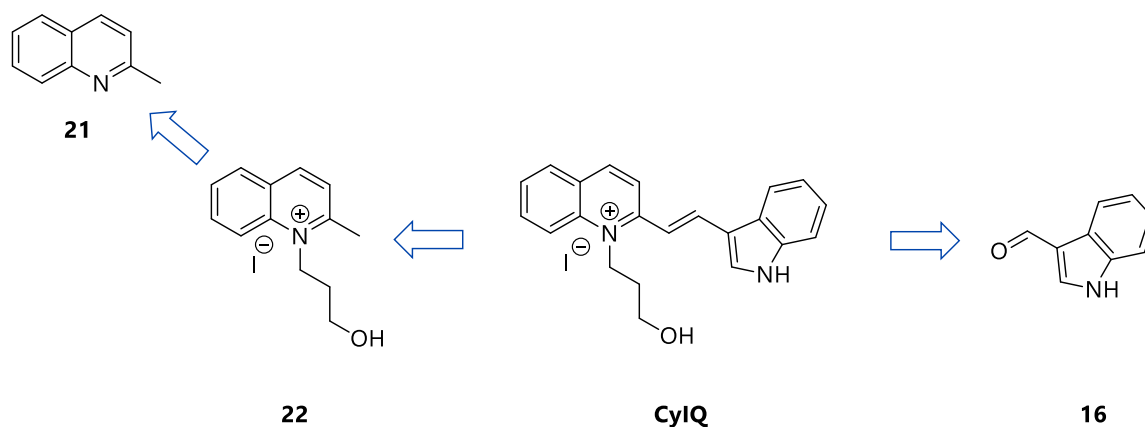


Abbildung 26: Struktur von **CyIQ**. Synthetisch wird **CyIQ** aus 2-Methylchinolin (**21**) und Indol-3-arbaldehyd (**16**) hergestellt.

Zur Darstellung von **CyIQ** werden die beiden Fragmente Indol-3-carbaldehyd (**16**) und 1-(3-Hydroxypropyl)-2-methylchinolin-1-iumiodid (**22**) in Gegenwart von Piperidin kondensiert. **22** kann zuvor durch nukleophile Substitution von 2-Methylchinolin (**21**)

mit 3-Iodpropanol gewonnen werden. Die gute Zugänglichkeit der Styryl-Cyanine nutzten unter anderem *Chang* und *Rosania* bei der Erstellung ihrer umfangreichen Styryl-Farbstoff-Bibliothek aus (Abschnitt 3.3).^[117-122] Um eine große Farbstoff-Vielfalt zu erhalten, kombinierten sie 14 Pyridinium- und Chinolinium-Derivate mit 208 verschiedenen Aldehyden zu insgesamt 1336 Styryl-Derivaten. Im darauffolgenden Fluoreszenz-Screening in lebenden Zellen identifizierte man offenkundige Favoriten und untersuchte diese anschließend genauer.

Im Gegensatz zu solch kombinatorischen Ansätzen steht eine sukzessive Farbstoff-Synthese mit anschließender Charakterisierung des neuen Fluorophors. Auf diesem Weg erfasste Daten werden beim schrittweisen Vorgehen erneut als Gedankengrundlage für weitere synthetische Ideen genutzt, und der angedeutete Kreislauf beginnt von vorn. Dies mag leicht überspitzt dargestellt sein, soll jedoch lediglich dazu dienen, diese beiden verschiedenen wissenschaftlichen Herangehensweisen deutlich zu machen.

Mit großer Wahrscheinlichkeit haben beide Forschungsmethoden ihre Vorteile und mehr oder weniger gravierende Nachteile. Der Nutzen kombinatorischer Chemie liegt klar auf der Hand. Ein breites Spektrum an Substanzen kann in kürzester Zeit untersucht und miteinander verglichen werden, sodass zügig die besten Farbstoff-Modifikationen identifiziert werden können. Solch umfassende Strategien lassen jedoch keine präzisen synthetischen Veränderungen zu, die die gewünschten Eigenschaften einzelner Moleküle verbessern können.

Mit Berücksichtigung beider gezeigter Verfahren wurden 23 auf **CyIQ** basierende Cyanine entwickelt. Hierbei wurde die Balance zwischen zielorientierter struktureller Variation und optimaler Ausarbeitung von Synthesemethoden gehalten. Die Darstellung der Fluorophore beruht ebenfalls auf der Kondensation eines Indol-Aldehyds mit einem Derivat eines Chinolinium- oder Pyridinium-Heteroaromaten. Es kamen insgesamt 9 verschiedene Aldehyde und 7 unterschiedliche Chinolinium-/Pyridinium-Bausteine zum Einsatz. Die Strukturen der einzelnen Edukte kann man dem Kapitel 8.3 Abbildung 132 und Abbildung 133 entnehmen. Eine repräsentative Farbstoffsynthese wird am Beispiel von **Rot-4m** gezeigt (Abbildung 27). Der initiale Schritt ist die Alkylierung von 4-Methylchinolin (**12**) mit 3-Iodpropanol zum Chinolinium **15**, das den Propyl-Linker mit terminaler Hydroxy-Funktion für die spätere

Oligonukleotid-Bindung bereitstellt. **15** unterscheidet sich von **CylQ** in der Position der Methyl-Gruppe und damit gleichzeitig in der Verknüpfungsposition der Dimethinbrücke des entstehenden Styryl-Farbstoffes. Im Zuge der Änderung von 2- auf 4-Verknüpfung des Chinolinium-Bausteins ging ebenfalls ein Wechsel der Emissionsfarbe von gelb (**CylQ**) nach rot (**Rot-4m**) des entstandenen Fluorophors einher. Der zweite strukturelle Unterschied zu **CylQ** ist durch eine Methylgruppe am Indol-Stickstoff gegeben, die mittels Dimethylcarbonat angefügt werden konnte. Anhand der hier gewählten Fluorophor-Benennung erhalten alle Derivate mit einem methylierten Indol-Stickstoff den Zusatz „m“. Wie sich später noch zeigen wird, haben diese beiden minimalen Variationen, *N*-Methylindol und die Brücken-Anbindung an der 4-Position des Chinolinium-Bestandteils, enorme Auswirkungen auf die Stabilität des Cyanins bei Belichtung und zugleich auf die Helligkeit seiner Fluoreszenz.

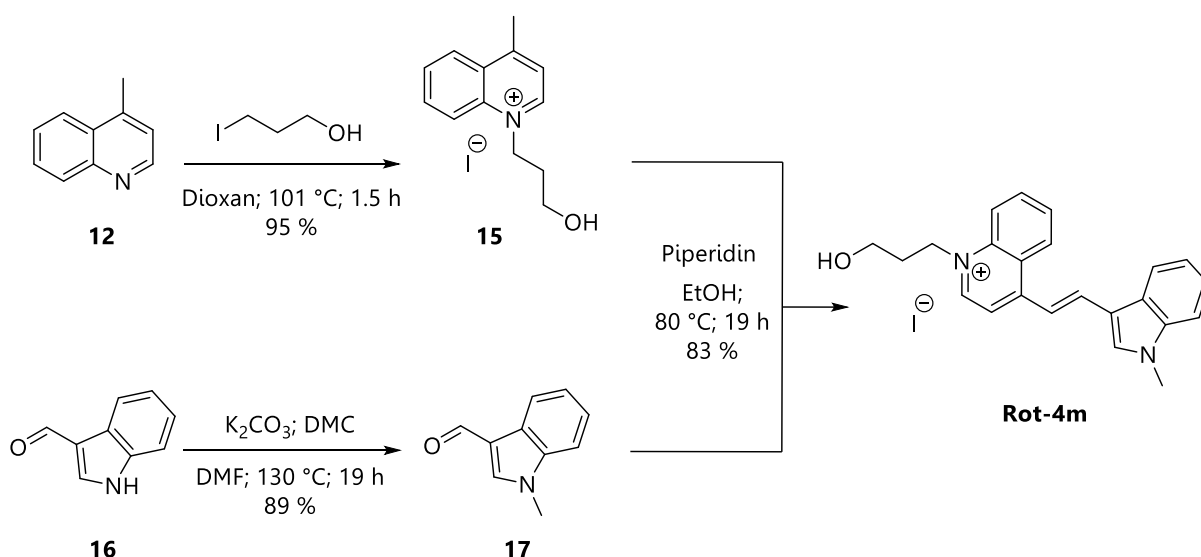


Abbildung 27: Syntheseschritte zur Darstellung des Styryl-Farbstoffes **Rot-4m**.

Ähnlich der Generierung beider Bausteine läuft auch deren Kupplung zum fertigen Styryl-Farbstoff mit einer sehr hohen Produktausbeute ab. Das Fluorophor-Derivat **Rot-4m** weist eine weitaus polarere Natur im Vergleich zu Edukt **17** auf, wohingegen das quartäre 4-Methylchinolinium-Kation **15** zu dem Farbstoff analoge hoch polare Eigenschaften besitzt. Es sollte aus diesem Grund darauf geachtet werden, dass Aldehyd **17** im Überschuss zu **15** eingesetzt wird. Bei der Produktisolierung durch Kristallisation / Ausfällung würde sich andernfalls verbliebenes Chinoliniumiodid **15**

nur sehr schwer vom Farbstoff **Rot-4m** abtrennen lassen. Einem entsprechenden Reaktionsweg folgten auch die anderen Styryl-Farbstoffe. Als direkte Folge der strukturellen Unterschiede zeigten sich auch Auswirkungen auf die Polarität und Kristallisierbarkeit der Substanzen. Dementsprechend lag die chemische Herausforderung bei der Cyanin-Styryl-Herstellung besonders in der sorgfältigen Optimierung ihrer Kristallisations- und Fällungsbedingungen.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass trotz großer Anzahl an Cyaninfarbstoffen und damit bedingter Mehrzahl synthetischer Ansätze bei der Aufarbeitung der Reaktionen stets zur Kristallisation (bei Iodiden und Aziden bzw. Fällung bei Bausteinen und der OH-Stufe) des Produktes gegriffen wurde. Auf säulenchromatographische Reinigung wurde bei geladenen sowie ungeladenen Produkten vollkommen verzichtet.

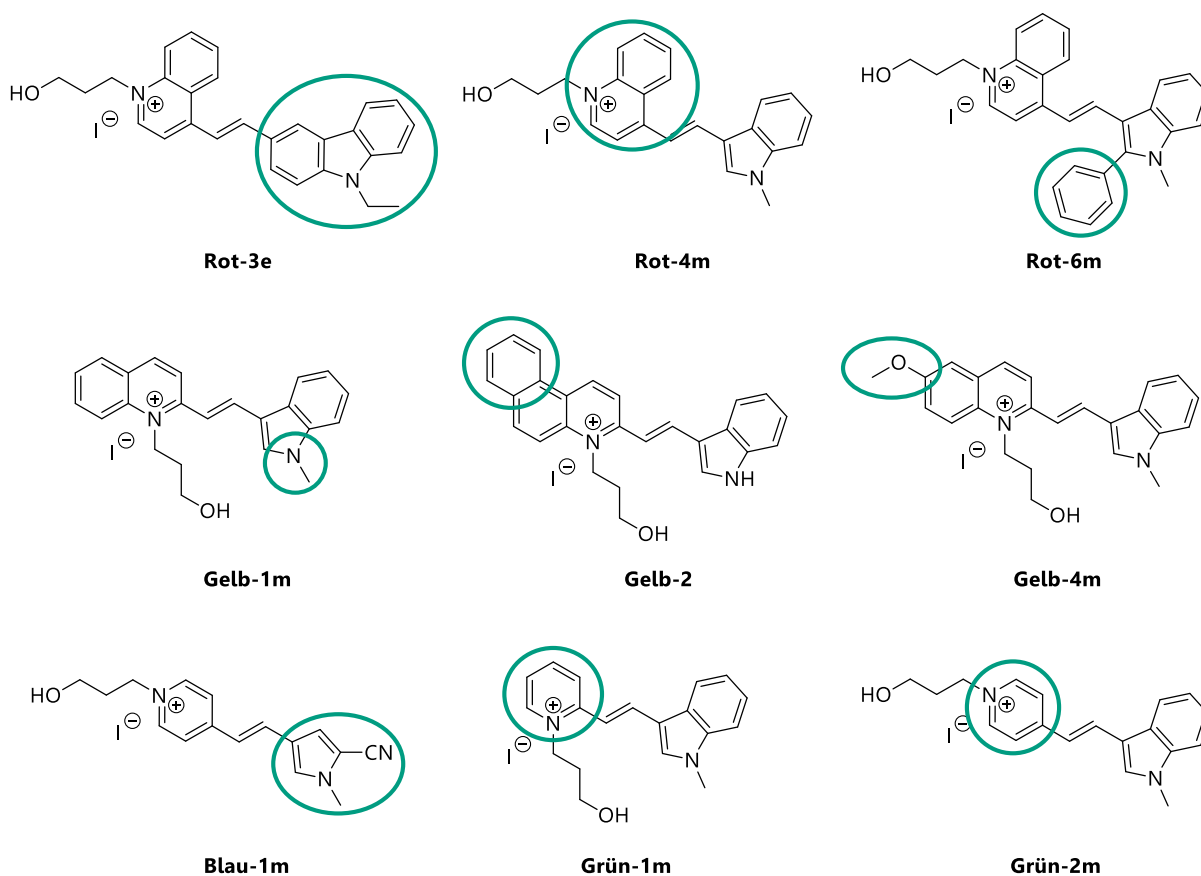


Abbildung 28: Gezeigt sind exemplarisch 9 synthetisierte Styryl-Farbstoffe. Die entscheidenden Strukturvariationen in Bezug auf **CyIQ** sind markiert. Dargestellte Farbstoffe und deren Modifikationen: **Rot-3e** – Ethylcarbazol und **15, Rot-4m** – **17** und **15, Rot-6m** – Phenylindol (methyliert) und **15, Gelb-1m** – **17, Gelb-2** – Benzochinolin, **Gelb-4m** – Methoxychinolin und **15, Blau-1m** – Cyanomethylpyrrol und 4-Methylpyridin, **Grün-1m** – **17** und 2-Methylpyridin, **Grün-2m** – **17** und 4-Methylpyridin.

In Abbildung 28 sind 9 Vertreter der charakterisierten Cyanin-Styryl-Derivate dargestellt. Entscheidende Strukturmerkmale, die den jeweiligen Fluorophor von **CyIQ** unterscheiden, sind an den aufgeführten Beispielen gekennzeichnet. Sämtliche Strukturen der neuen Cyanine sind in Kapitel 8.3 zusammengetragen.

Anhand der oben gezeigten Farbstoffe lässt sich bereits die große Farbvielfalt der Emissionen erahnen, welche sich über alle Farben des sichtbaren Lichtspektrums erstreckt. Mit der Absicht die neuen Fluoreszenzfarbstoffe zu Energietransfer-Paaren zu kombinieren, sind weit voneinander getrennte Absorptionsmaxima des Donor- und des Akzeptor-Chromophors von essentieller Bedeutung. Nur auf diese Weise ist eine gezielte Anregung nur eines der beiden Fluorophore zu bewerkstelligen. An diesem Punkt stellt sich die Frage, welche Möglichkeiten einem organischen Chemiker zur Verfügung stehen, um die gewünschten Farbvariationen zu verwirklichen.

Grundsätzlich bewirkt die Umgestaltung der Ausdehnung eines konjugierten π -Systems eine Änderung der Emissionsfarbe. Bei Cyaninen greift man gewöhnlich von synthetischer Seite zu einer Längenvariation der Polymethinbrücke, wie sie von **TO** nach **CyIQ** zu **TR** zu vorhanden ist (Abbildung 11, Kapitel 3.3).^[129,174-176] Sehr häufig findet man bei Cyaninen eine starke Korrelation zwischen steigender Brückenlänge und sinkender Photostabilität. Bei dem Paar **TO** und **TR** konnte dieser Verlauf ebenfalls nachgewiesen werden.^[58] Wie zuvor unter Punkt 3.4 veranschaulicht wurde, gibt es durchaus noch andere Aspekte, die sich negativ auf die Stabilität von Farbstoffen bei langanhaltender Belichtung auswirken können.^[23,127-129,136-139,141,143,177-179] Fazit ist jedoch, dass **CyIQ** aufgrund seiner strukturellen Gegebenheiten deutlich stabilisiert wird. Da eine Verlängerung der Dimethinbrücke um nur eine einzige Methineinheit fatale Auswirkungen auf die photophysikalischen Eigenschaften des Styryl-Farbstoffes haben könnte, wurde vollständig von Modulationen dieser Art abgesehen. Stattdessen wurde die Ausdehnung des π -Systems variiert, indem beispielsweise der bicyclische Heteroaromat Chinolin durch das kleinere Pyridin ersetzt wurde.

Diese Herangehensweise hat noch einen weiteren Vorteil, der auf den ersten Blick nicht sofort ersichtlich ist. Alle Farbstoffderivate gleicher Brückenverknüpfung stimmen obgleich elektronischer Umgestaltung ihres π -Systems in ihren Abmessungen von einem zum anderen Ende der Polymethinkette, genauer gesagt von einem heteroaromatischen Stickstoff zum anderen, überein. Farbstoffe ähnlicher Ausmaße

tendieren bei kovalenter Verknüpfung mit einem Biomolekül wahrscheinlich dazu, sich in identischen Bereichen des Makromoleküls anzulagern. Solch bevorzugte Anlagerungsbereiche werden beispielsweise durch Taschen oder Furchen repräsentiert. In einem hochsymmetrischen biomolekularen Konstrukt, wie z. B. einer DNA-Doppelhelix, wäre aufgrund identischer Anlagerungsareale ein äußerst definierter Abstand zweier Farbstoffe zueinander möglich und würde folglich hervorragende ET-Effizienzen neben exzellenten Emissions-Farbkontrasten mit sich bringen. Diese Thematik wird in späteren Kapiteln der Arbeit noch intensiver diskutiert. Vor ab zeigt die folgende Abbildung drei Cyanine, die sich in ihrer π -System-Ausdehnung stark voneinander unterscheiden, jedoch in dem Abstand vom Chinolin- oder Pyridinstickstoff zum Indolstickstoff durchweg vergleichbar sind. Die zugehörigen Distanzen wurden gerechneter, geometrisch optimierter Strukturen entnommen (hier nicht gezeigt). Die Modelle wurden mit der Software *Hyperchem 8* anhand molekularmechanischer Kraftfeldkalkulationen auf Basis der Parameter von *MM+* berechnet.

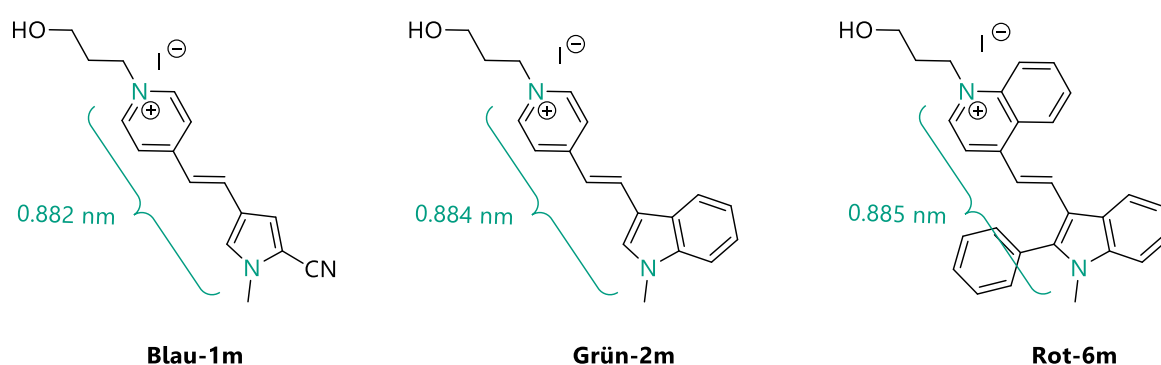


Abbildung 29: Berechneter Abstand zwischen den heteroaromatischen Stickstoffen der Styryl-Farbstoffe **Blau-1m** (0.882 nm), **Grün-2m** (0.884 nm) und **Rot-6m** (0.885 nm).

Mit Beginn des folgenden Abschnittes werden die spektroskopischen Untersuchungen näher gezeigt, deren Resultate letztendlich zur Fluorophor-Auswahl führte, die im Anschluss zur postsynthetischen Markierung von Oligonukleotiden verwendet wurden.

4.2 Untersuchung der Photostabilität

Parallel zur Synthese der Cyaninfarbstoffe wurde mit der Bestimmung ihrer Stabilität bei Belichtung begonnen. Ziel der Bestimmung war es, durch spektroskopische Verfolgung des Photozerfalls der Fluorophore einen Zugang zu ihren entsprechenden Halbwertszeiten zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität einer Farbstofflösung aufgezeichnet, die über einen längeren Zeitraum belichtet wurde. Die Proben enthielten neben dem Fluorophor auch doppelsträngige DNA (10 μM Farbstoff, 2.5 μM **DNA0** (Kapitel 8.4, Abbildung 135), 10 mM NaP_i (pH = 7), 250 mM NaCl und 5 % Ethanol). Der Zusatz von Ethanol ist durch die Herstellung der Farbstoffstammlösung bedingt. Die Cyanine sind in reinem Wasser eher schlecht löslich. Deshalb wurde der abgewogene Farbstoff in einem 50 mL Messkolben mit 10 mL Ethanol versetzt und bis zur vollständigen Lösung im Ultraschallbad behandelt. Abschließend wurde mit Wasser bis zu der 50 mL-Marke verdünnt. Die Anwesenheit von DNA ist bei dieser Untersuchung sehr wichtig. Zum einen gestattet sie, den Photoabbau anhand der Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes zu verfolgen (Kapitel 4.3). Zugleich kann die Gegenwart von Oligonukleotiden einen signifikanten Einfluss auf den Photozerfallsprozess eines Fluorophors haben und ihn katalysieren oder vermindern. Die tatsächlichen Auswirkungen der Gegenwart von DNA müssen empirisch erfasst werden und hängen von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Nukleinsäuresequenz ab. Da die untersuchten Farbstoffe als kovalent gebundene Chromophore für Oligonukleotide dienen sollen, ist eine große Stabilität in Anwesenheit von DNA ausschlaggebend. Die Lösungen wurden mit einer 75 W Xenon-Lampe belichtet. Ein 305 nm Vorfilter gewährleistete, dass DNA-Bestandteile nicht angeregt wurden und verhinderte dadurch Photoschäden am Oligonukleotid. Die prozentuale Abnahme der Emissionsintensität in Relation zur Belichtungszeit wurde exponentiell auf Basis von Gleichung (4.1) ausgewertet. Anhand der Steigung ließ sich die Halbwertszeit $t_{1/2}$ berechnen.

$$I_{(t)} = I_0 \cdot e^{(-kx)} \quad (4.1)$$

- $I_{(t)}$: Fluoreszenzintensität zu der Zeit t
- I_0 : Fluoreszenzintensität vor Belichtung ($t = 0$)
- k : Geschwindigkeitskonstante

In Abbildung 30 ist exemplarisch die Photodegradation des cyanidmodifizierten Fluorophors **TR-CN** gezeigt. Die Probe wurde so lang belichtet bis lediglich 10 - 20 % der anfänglichen Fluoreszenzintensität verblieben waren. Rechts in Abbildung 30 sind der exponentielle Zerfall von **TR-CN** und **TR** in Abhängigkeit von der Belichtungszeit dargestellt. Es ist sofort ersichtlich, dass der elektronenziehende Cyanidsubstituent deutlich zur Stabilisierung von **TR-CN** beiträgt. Die Modifikation bewirkt eine Erhöhung der Halbwertszeit um Faktor 10 (**TR** = 7 Minuten vs. **TR-CN** = 66 Minuten) und bestätigt somit die Beobachtungen von *Hahn*.

Die Fluoreszenzspektren sowie die Zerfallskurven aller untersuchten Cyaninfarbstoffe sind im Kapitel 8.4 abgebildet. Die jeweiligen Halbwertszeiten sind in der Tabelle 12 zusammengefasst und anhand der entsprechenden Abbildungen graphisch veranschaulicht.

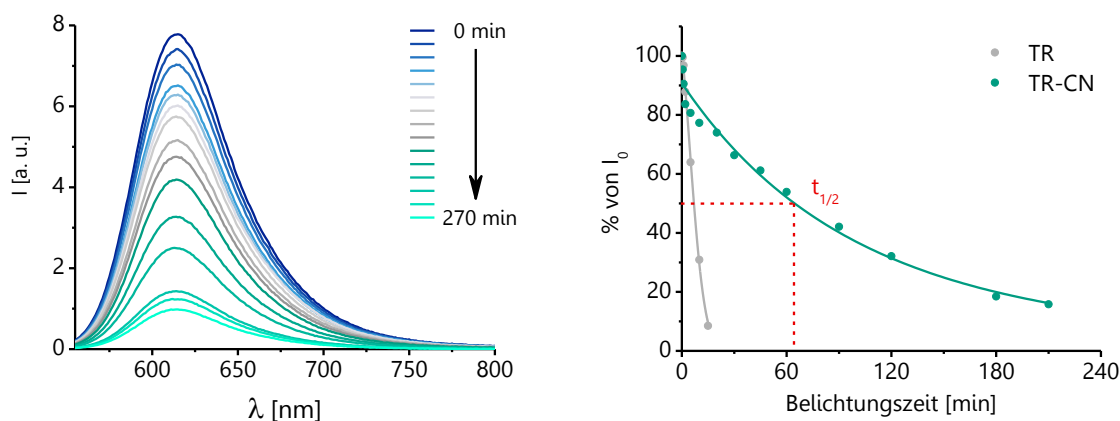


Abbildung 30: Photostabilitätsuntersuchung von **TR-CN**. Links: Fluoreszenzspektren der Degradation von **TR-CN** ($\lambda_{exc.} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 614 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Rechts: Abnahme der Fluoreszenzintensität im Verlauf der Photostabilitätsbestimmung von **TR-CN** ($t_{1/2} = 66 \text{ min}$). Die graue Linie stellt den Photozerfall von **TR** ($t_{1/2} = 7 \text{ min}$) dar und dient dem Vergleich.

Im Folgenden soll an wenigen Farbstoffen beispielhaft die enorm gesteigerte Photostabilität der neuen Styryl-Derivate gezeigt und mit den vergleichsweise labilen Vorgängern **TO**, **TR** und **CyIQ** verglichen werden. Jeweils drei neue Farbstoffe wurden repräsentativ mit dem Modellfluorophor gleicher Emissionsfarbe verglichen. Die Gegenüberstellung der Photozerfallskurven sowie der ermittelten Halbwertszeiten spiegeln die außerordentlich verbesserte Belichtungsstabilität der entwickelten Emitter wider.

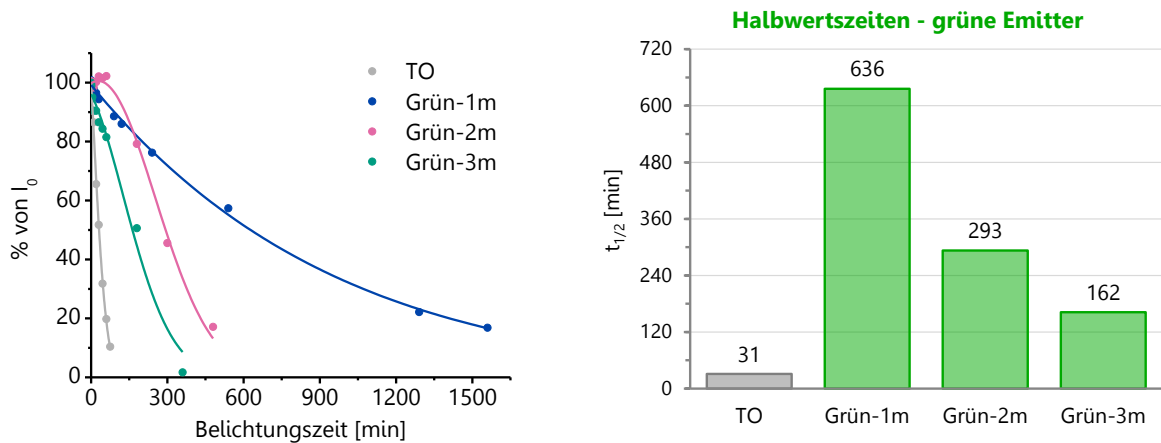


Abbildung 31: Gegenüberstellung der Photostabilitätsuntersuchung exemplarischer grün-fluoreszierender Cyaninfarbstoffe. Links: Fluoreszenzintensitätsabnahmen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Rechts: Vergleich der entsprechenden Halbwertszeiten.

Die Photostabilitäten der abgebildeten grün-fluoreszierenden Styryl-Farbstoffe übertreffen **TO** um das 5- bis 20-fache, wobei **Grün-1m** ($t_{1/2} = 636$ Minuten) die größte Haltbarkeit bei Belichtung aller untersuchten Cyanine aufweist.

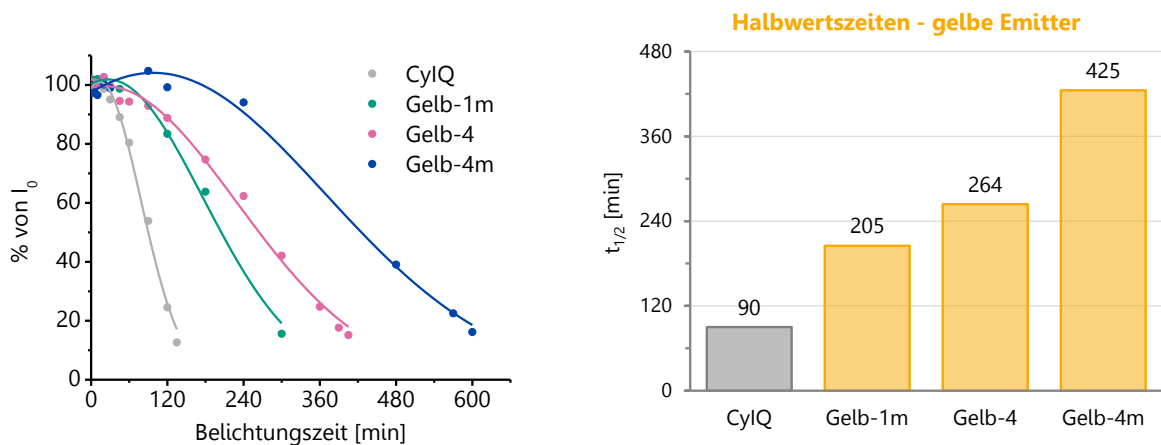


Abbildung 32: Gegenüberstellung der Photostabilitätsuntersuchung exemplarischer gelb-fluoreszierender Cyaninfarbstoffe. Links: Fluoreszenzintensitätsabnahmen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Rechts: Vergleich der entsprechenden Halbwertszeiten.

Obwohl **CylQ** seine überlegene Stabilität im Vergleich zu **TR** und **TO** deutlich unter Beweis stellte, wird es von seinen strukturellen Verwandten und deren erheblich gesteigerten Halbwertszeiten bei Weitem „übertrumpft“.

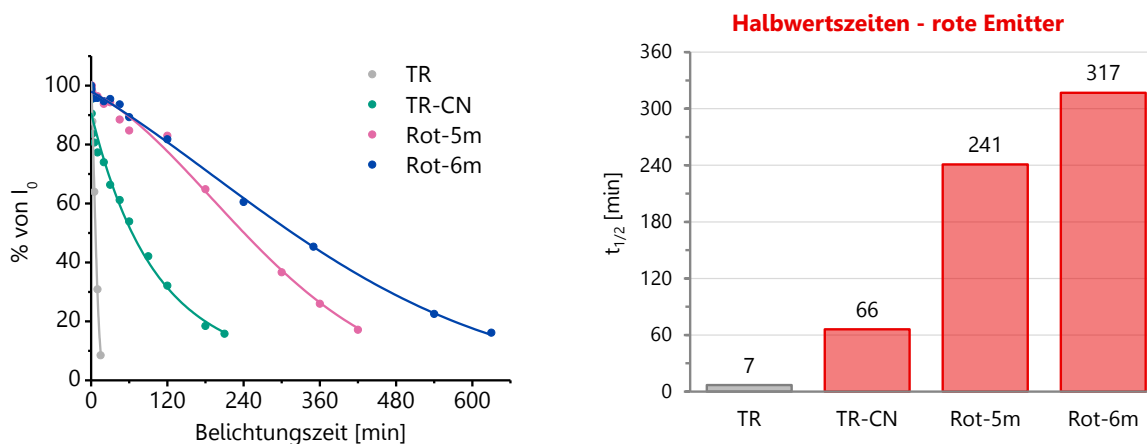


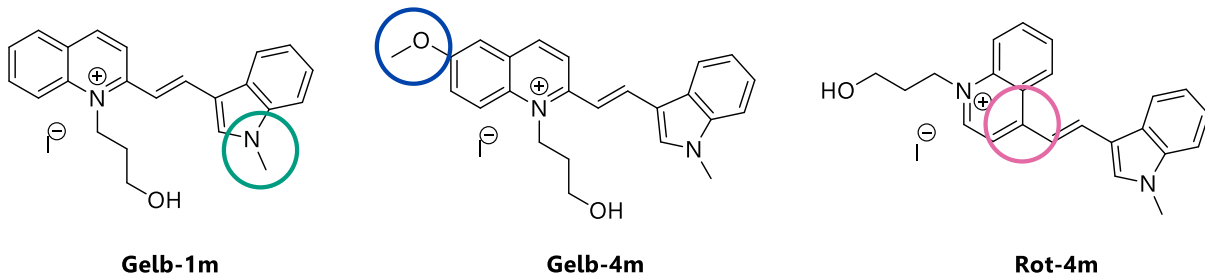
Abbildung 33: Gegenüberstellung der Photostabilitätsuntersuchung exemplarischer rot-fluoreszierender Cyaninfarbstoffe. Links: Fluoreszenzintensitätsabnahmen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Rechts: Vergleich der entsprechenden Halbwertszeiten.

Besonders beeindruckend ist jedoch der Stabilitätsunterschied der Cyanine mit roter Emissionsfarbe. **TR-CN** zeigte bereits im direkten Vergleich der Halbwertszeiten mit **TR** eine Steigerung um eine ganze Größenordnung. Nichtsdestotrotz kann das Styryl-Derivat **Rot-6m** diesen Wert um Faktor 5 überragen und zeigt eine rund 50-fach größere Halbwertszeit als der rote Emitter **TR**.

Welche exakten strukturellen Variationen den außerordentlich stabilisierten Fluoreszenzfarbstoffen zugrunde liegen, wird anschaulich in Abbildung 34 beschrieben. Das Styryl-Derivat **Gelb-1m** zeigt aufgrund der Methylgruppe am Indolstickstoff eine mehr als doppelt so große Haltbarkeit bei Belichtung als sein direkter Vorläufer **CylQ**. Interessanterweise wird durch den elektronenschiebenden Methoxysubstituent am Chinolinteil von **Gelb-4m** die Halbwertszeit nochmals um den Faktor 2 im Vergleich zu **Gelb-1m** gesteigert. Die Stabilisierung des Styryl-Farbstoffes **Rot-4m** wird einerseits infolge des methylierten Indolstickstoffes positiv beeinflusst. Zuzüglich wird eine Photostabilitätssteigerung um 50 % durch die 4-Vernüpfung mit der Dimethinbrücke erzielt. Mit der Absicht, diesen Struktur-Stabilitäts-Korrelationen genauer auf den Grund zu gehen, wurden die Photoabbauprodukte gewählter Fluorophore intensiver erforscht. Die erhaltenen Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt im Detail erläutert.

Lediglich die drei Cyanine **Gelb-2**, **Gelb-3** sowie **Rot-1** wiesen kleinere bzw. vergleichbare Halbwertszeiten zum entsprechenden Referenzfluorophor auf. Bei

Gelb-2 und **Rot-1** verursacht der Benzochinolinrest eine deutliche Destabilisierung. Erstaunlicherweise reduziert die elektronenziehende Fluorgruppe am Chinolin die Halbwertszeit von **Gelb-3**.



Stabilitätsanstieg und Strukturmerkmale

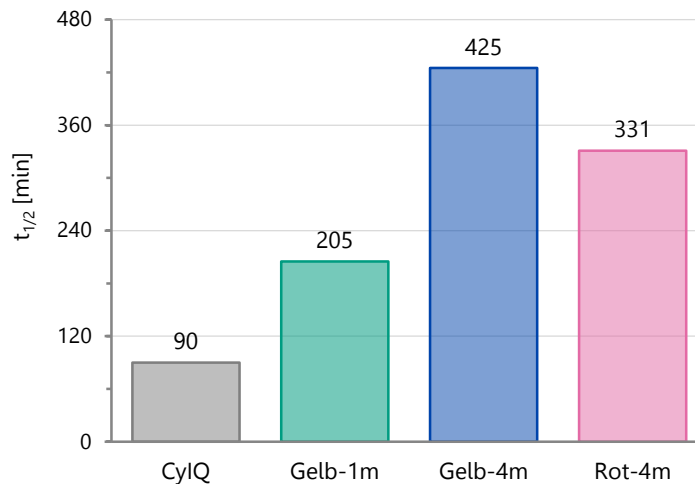


Abbildung 34: Korrelation der Photostabilität mit der Fluorophorstruktur. Strukturelle Merkmale, die von dem Styryl-Vorbild **CylQ** abweichen sind gekennzeichnet.

Die Herausforderung, neue Fluoreszenzfarbstoffe mit erhöhter Photostabilität zu entwickeln, wurde mit herausragendem Erfolg „gemeistert“. Die zweite essentielle Eigenschaft leistungsstarker Fluorophore bildet die sogenannte Fluoreszenz-Quantenausbeute. Im Abschnitt 4.3 und 4.4 wird neben weiteren spektroskopischen Parametern auch die Quantenausbeute bestimmt.

Bestimmung der Photo-Abbauprodukte

Mit dem Ziel, Hinweise auf die Struktur der primären Photo-Abbauprodukte von Styryl-Farbstoffen zu erhalten, wurden die Proben analog der Photostabilitätsbestimmung belichtet. Im Anschluss wurden die belichteten Proben mittels HPLC in ihre Hauptbestandteile aufgetrennt und zugleich das Absorptionsspektrum eines jeden Bestandteils aufgezeichnet. Die gesammelten Fraktionen dieser HPLC-Trennungen wurden daraufhin mittels Nano-ESI-MS-Messungen analysiert. Im weiteren Verlauf dieses Abschnittes wird hauptsächlich auf die Abbauprodukte von **CylQ**, **Rot-4** und **Gelb-4** eingegangen.

Vom photochemischen Standpunkt aus gesehen gibt es zwei mögliche Mechanismen, nach denen eine Wechselwirkung des angeregten Farbstoffes mit molekularem Sauerstoff stattfinden kann.^[131]

- 1) Durch einen Energietransfer (ET), der zur Bildung von energetisch angeregtem Singulett-Sauerstoff führt.
- 2) Durch einen Elektronentransfer vom energetisch angeregten Farbstoff auf molekularem Sauerstoff, was die Bildung des Superoxid-Radikalanions $O_2^{\cdot-}$ und eines Farbstoff-Radikalkations zur Folge hat.

Im Zuge der Belichtung entstehen aus $O_2^{\cdot-}$ und 1O_2 weitere nachgeordnete Sauerstoffradikale, die das Farbstoffmolekül angreifen, oxidieren und letztendlich seine fluoreszente Eigenschaft zerstören können.

Analyse des primären Photo-Abbauproduktes von CylQ

Im DAD-Spektrum (Abbildung 35) der belichteten **CylQ**-Probelösung ist deutlich ein Hauptabbauprodukt (**CylQ^{ox}**) zu erkennen. **CylQ^{ox}** weist mit 519 nm eindeutig ein zu höheren Wellenlängen verschobenes Absorptionsmaximum als **CylQ** (468 nm) auf. Es lässt sich dadurch auf eine Struktur schließen, bei der die Konjugation zwar noch erhalten ist, die aber ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz verloren hat. Vergleichbare spektroskopische Änderungen konnten im Rahmen der Deprotonierung von **CylQ** mit

Natronlauge nachgewiesen werden. Bei diesem Versuch zeigte das entstehende deprotonierte Molekül (**43**) ebenfalls ein deutlich rotverschobenes Absorptionsmaximum (535 nm) im Vergleich zu **CyIQ** (468 nm) und gleichermaßen keine fluoreszente Eigenschaft mehr (Abbildung 36).

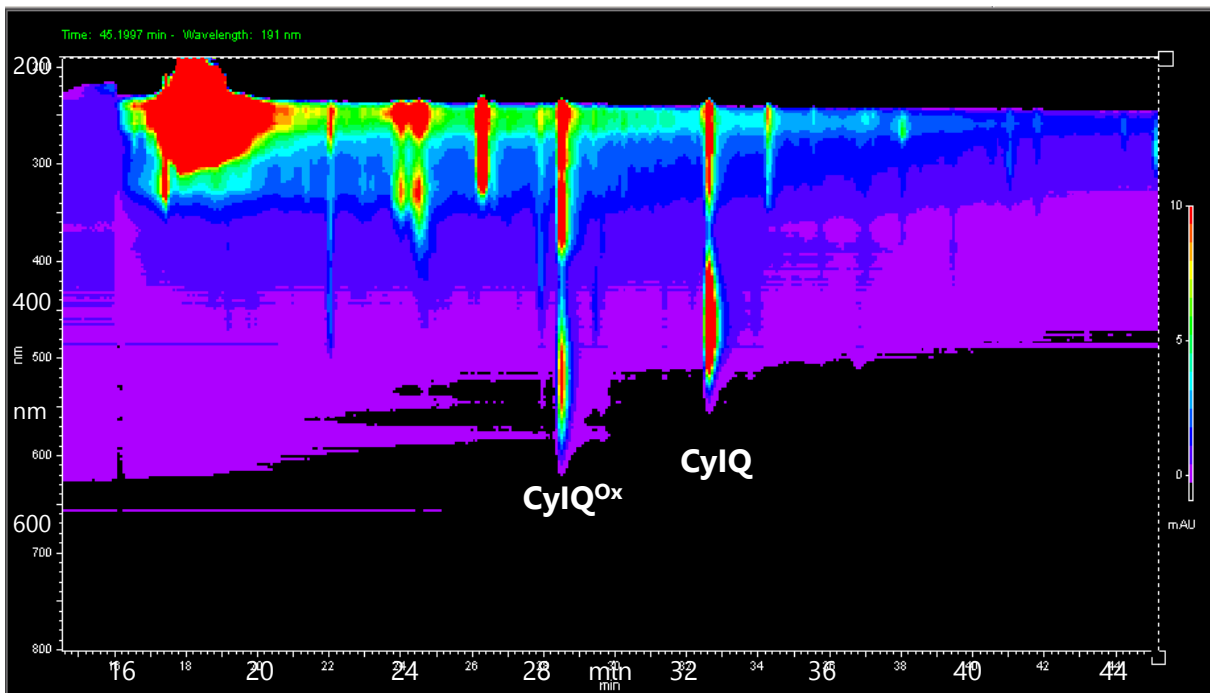


Abbildung 35: DAD-Spektrum der HPLC-Trennung der belichteten **CyIQ**-Probeflösung.

Die entsprechende Intensitätsabnahme der Fluoreszenz im Verlauf der Deprotonierung ist im Kapitel 8.4 zu sehen. Dort sind auch die Chromatogramme der HPLC-Trennung von der belichteten **CyIQ**-Probeflösung bei dem erfassten Maximum des primär gebildeten Zersetzungsproduktes und dem von **CyIQ** gezeigt. Zudem ist das ESI-MS-Spektrum des Abbauproduktes **CyIQ^{ox}** aufgeführt.

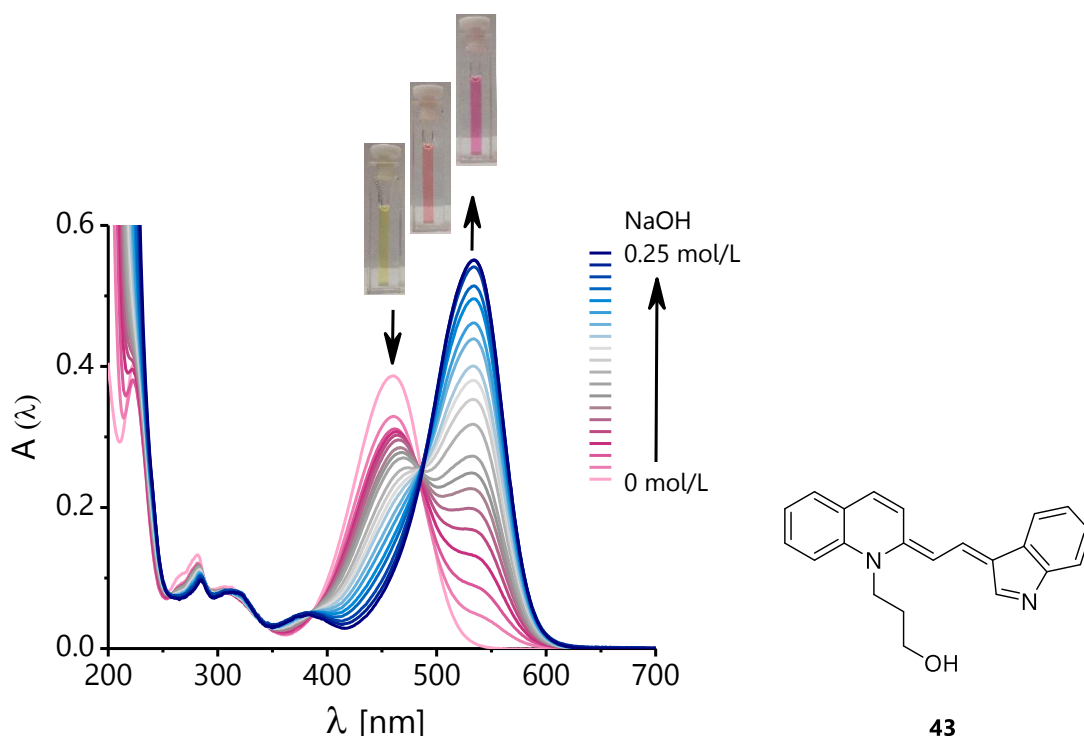


Abbildung 36: Links: Absorptionsspektren der Deprotonierung von **CyIQ** mit NaOH. Die ausgeprägte Verschiebung des Maximums ist ebenfalls anhand der Probelösung deutlich sichtbar. Rechts: Im Zuge der Deprotonierung generierte ungeladene und nicht-fluoreszente Verbindung **43**.

64

Die anhand der Absorptionsspektren und der erhaltenen ESI-Masse hergeleitete Struktur des Hauptabbauproduktes von **CyIQ^{ox}** ist in Abbildung 37 (links) dargestellt.^[179]

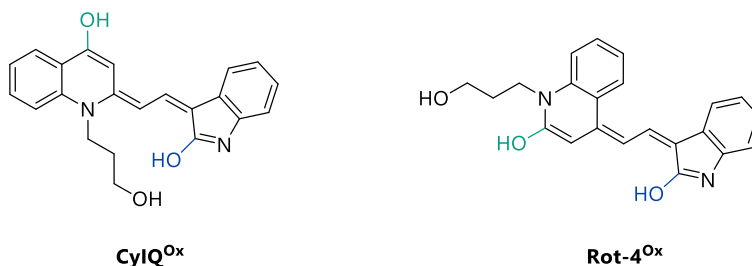


Abbildung 37: Strukturen der primären Photo-Abbauprodukte **CyIQ^{ox}** und **Rot-4^{ox}**.

Eine vermutlich initiale Oxidation von Indol in 2-Position war die primäre Annahme, die letztendlich auf die genaue Struktur des Photooxidationsproduktes von **CyIQ** hinwies. Allgemein wird davon ausgegangen, dass Photooxidationen an Position 2 des Indols dann bevorzugt ablaufen, wenn die 3-Position verknüpft vorliegt, wie es bei

allen hier besprochenen Styryl-Farbstoffen der Fall ist.^[180] Der daraufhin postulierte Mechanismus zur Photooxidation des unmethylierten Indolrestes der Styryl-Farbstoffe ist in der Abbildung 38 wiedergegeben. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass analoge Oxidationen am Indol ausschließlich bei Styryl-Derivaten beobachtet werden konnte, deren Amingruppe am Indol nicht methyliert vorlag.^[179] Bei den *N*-methylierten Farbstoffvariationen führte Photooxidation zu Hauptabbauprodukten mit geöffneter Ringstruktur. Dies ereignete sich allerdings erst nach erheblich längeren Belichtungszeiten. Offensichtlich wird die Hydroxylierung des Indols als primär ablaufende Photodegradation durch die *N*-Methyl-Gruppe verhindert und erklärt damit die gesteigerte Photostabilität dieser Fluorophorderivate.

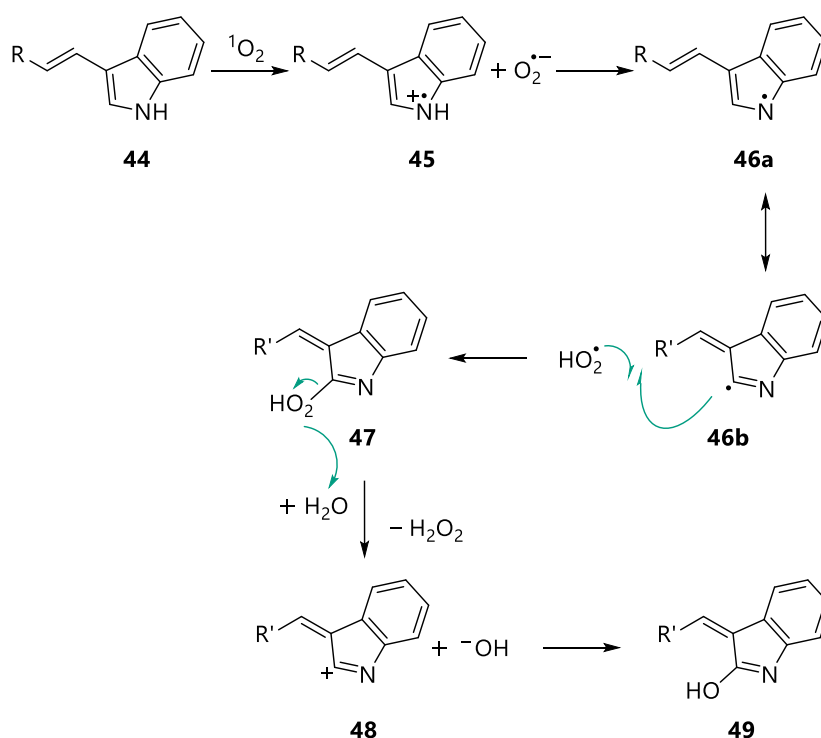


Abbildung 38: Postulierter Mechanismus der Photooxidation des unmethylierten Indolrestes der Styryl-Cyanine.

Des Weiteren sind Oxidationsreaktionen an Position 2 und 4 des Chinolinteils durch das Radikal $\text{O}_2^{\cdot-}$ möglich.^[181] $\text{O}_2^{\cdot-}$ greift bevorzugt an Stellen mit geringer Elektronendichte an. Im vorliegenden Fall bedeutet das, dass anhand von $\text{O}_2^{\cdot-}$ stattfindende Radikalangriffe weitaus favorisierter an dem Pyridiniumring der Styryl-Farbstoffe auftreten, da diese Stelle einen Bereich kleinerer Elektronendichte

repräsentiert. Zudem konnte bewiesen werden, dass die 4-Position der Chinolinreste bei $O_2^{\cdot-}$ -Oxidationen wesentlich stärker im Vergleich zur 2-Position attackiert wird.^[181]

Hingegen besitzt der benzolartige Teil der aromatischen Bicyclen eine vergleichsweise hohe Elektronendichte. Deshalb werden diese Bereiche primär von OH^{\cdot} -Radikalen angegriffen, welche sich relativ elektrophil verhalten. Allerdings treten solche OH^{\cdot} -Radikal-Angriffe nachweislich viel seltener auf, als die oben beschriebenen photooxidativen Angriffe des $O_2^{\cdot-}$ -Radikals.^[181] Die genannten Tatsachen veranlassten in der postulierten Struktur des **CylQ^{ox}** von einer Hydroxylierung an der Position 4 des Chinolinrestes auszugehen. Zusätzlich führten die gemachten Erkenntnisse zu einer schlüssigen Erklärung der hohen Haltbarkeit von 4-verknüpften Styryl-Derivaten im Vergleich zu ihren 2-verknüpften Analoga.

Analyse des primären Photo-Abbauproduktes von Rot-4

Die erfolgten Untersuchungen zur Photodegradation von Cyanin **Rot-4** zeigten ebenfalls eine ungeladene konjugierte Form des primären Zersetzungsproduktes. Dieser Sachverhalt erlaubte eine mit **CylQ** vergleichbare Annahme des Oxidationsprozesses des Indolteils in **Rot-4**. Der wesentliche Unterschied von Abbauprodukt **Rot-4^{ox}** zum oben beschriebenen **CylQ^{ox}** ist in der hydroxylierten Position des Chinolins zu finden (Abbildung 37). Wie bereits erwähnt wurde, findet bevorzugt die Photooxidation an der 4-Position des Chinolins statt. Diese ist jedoch bei **Rot-4** durch eine Verbindung mit der Polymethinbrücke geschützt. Zwar wurde im Photoprodukt **Rot-4^{ox}** ein 2-oxidiertes Chinolin erhalten, allerdings erst nach erheblich längerer Lichteinstrahlung auf die entsprechende Farbstofflösung.

In Kapitel 8.4 befinden sich ebenfalls sämtliche Spektren und das HPLC-Chromatogramm des Abbauproduktes **Rot-4^{ox}**.

Analyse des primären Photo-Abbauproduktes von Gelb-4

Die bisher vorgestellten Aspekte, die zu einer gesteigerten Photostabilität der Styryl-Farbstoffe führen, genügen dagegen nicht zur Erklärung der bemerkenswert hohen Stabilisierung bei methoxysubstituierten Fluorophoren. Indes ließen die bis dahin erfolgten Beobachtungen von *Armitage et al.* ein gegenteiliges Resultat erwarten.^[141,142,182] Er bewies anhand verschiedener Cyaninderivate, deren aromatische Systeme ein- oder mehrfach fluoriert sowie cyanidmodifiziert waren, den stabilisierenden Effekt von elektronenziehenden Substituenten. Interessanterweise ist bei den beiden **CyIQ**-Abkömmlingen **Gelb-3** und **Gelb-4** ein entgegengesetztes Verhalten zu beobachten.^[179] Das mit Fluor substituierte Derivat **Gelb-3** zeigte bei Belichtung eine ausgeprägte Labilität verglichen mit dem Referenzmolekül. Dagegen bewirkt die elektronenschiebende Modifikation in Form einer Methoxy-Gruppe eine signifikante Verbesserung der Haltbarkeit und wird durch eine um Faktor 3 größere Halbwertszeit im Vergleich zu **CyIQ** deutlich. Die bekannte photochemisch ausgelöste Hydroxylierung von Chinolin wurde im Verlauf des Kapitels schon intensiv diskutiert.^[181] Ein derartig oxidiertes Zersetzungsprodukt konnte in der Probelösung von **Gelb-4** nicht detektiert werden. Stattdessen wurde in der belichteten Fluorophorlösung ein **Gelb-4**-Intermediat nachgewiesen, das anstelle der Methoxy-Gruppe eine Hydroxyfunktion trug (Abbildung 39).

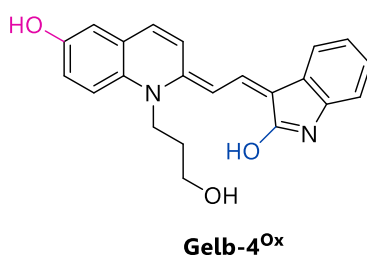


Abbildung 39: Struktur des primären Photo-Abbauproduktes **Gelb-4^{ox}**.

Die Bildung von **Gelb-4^{ox}** lässt zwei Vermutungen zu. Einmal sorgt eine belichtungsbedingte Demethylierung für eine Stabilisierung des Cyanins, wie an dem in Abbildung 40 ausgearbeiteten Mechanismus illustriert wird.

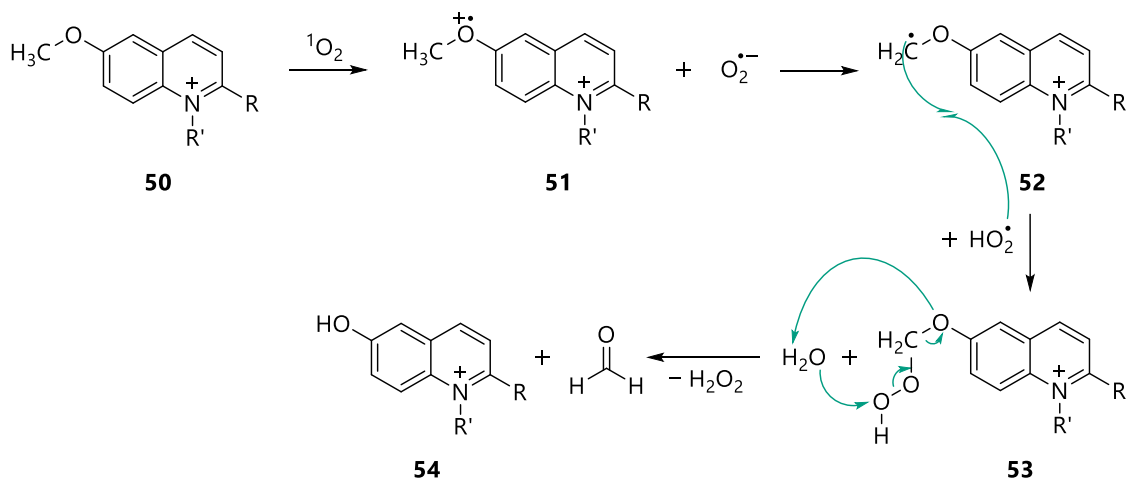


Abbildung 40: Postulierter Mechanismus der Demethylierung in **Gelb-4** als Folge der Oxidationsreaktion mit photoinduziertem $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikal.

Eine weitere Begründung für die erhöhte Photostabilität von **Gelb-4** und zugleich eine Erklärung der in **Gelb-3** auftretenden Destabilisierung ist in dem bevorzugten $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Angriff an Stellen mit geringer Elektronendichte gegeben. Der Methoxy-Substituent erhöht die vorherrschende Elektronendichte im Chinoliniumteil des Farbstoffes und reduziert somit gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Oxidation. Die Fluor-Modifikation in **Gelb-3** hingegen repräsentiert den gegenteiligen Effekt auf den Chinoliniumteil und damit auf die Wahrscheinlichkeit eines $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikalangriffes. Die Daten zum Photo-Abbauprodukt **Gelb-4^{ox}** sind ebenfalls in Kapitel 8.4 aufgeführt.

Photostabilität der Styryl-Farbstoffe mit anderen synthetischen Veränderungen

Tendenziell ist bei allen Styryl-Fluorophoren die stabilisierende Wirkung durch den *N*-Methyl-Substituenten am Indol nachweisbar. Weniger ausgeprägt ist dieser Effekt allerdings bei den Derivaten, die anstelle des Chinolins einen Pyridinring tragen oder deren Indol zusätzlich mit einem Phenylsubstituent ausgestattet ist. Vor allem die letztgenannte Modifikation in Form des 2-Phenylindols bewirkt eher eine Destabilisierung der Farbstoffe bei Belichtungsexperimenten.^[183] Mit der Absicht, diese Tatsache genauer zu ergründen, wurde die Verteilung der Elektronendichte im jeweiligen LUMO (LUMO = *lowest unoccupied molecular orbital*) der

Fluoreszenzfarbstoffe **Grün-1m** und dem phenylsubstituierten **Grün-3m** berechnet (siehe Abbildung 41).

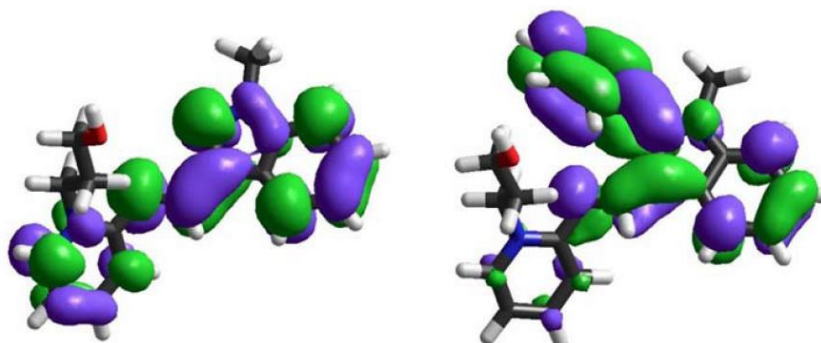


Abbildung 41: Berechnete Verteilung der Elektronendichte im LUMO des Styryl-Derivates **Grün-1m** (links) und **Grün-3m** (rechts).

Die Kalkulation der Elektronendichteverteilung fand mittels semi-empirischer AM1-Methode (AM1 = *Austin Model 1*) nach vollständiger Geometrieoptimierung (AMBER Kraftfeld) statt. Im Fall von **Grün-1m** ist das LUMO über das ganze Molekül delokalisiert. Die *N*-Methylgruppe am Indol bewirkt hier eine Erniedrigung der Elektronendichte und somit eine verminderte Oxidationsanfälligkeit im Vergleich zu **Grün-1**, dem diese Methylgruppe fehlt. Die Elektronendichte in den LUMOs der beiden phenylsubstituierten Cyanine **Grün-3** und **Grün-3m** zeigte eine eindeutig andere Verteilung. Aufgrund der helikalen Verdrehung des 2-Phenylindolteils zu dem Pyridinring ergibt sich eine ungleiche Verteilung der Elektronendichte in den beiden Bereichen. Wie anhand der Berechnungen zur Abbildung 41 deutlich zu erkennen ist, ist die Elektronendichte fast vollständig im Indolteil lokalisiert und konzentriert sich primär in dem Bereich des Phenylsubstituenten. Infolgedessen erzeugt die *N*-Methylierung des Indols bei dem Fluorophor **Grün-3m** lediglich eine geringe Photostabilitätserhöhung.

Konträres Verhalten im Vergleich zu den oben beschriebenen Photostabilitäten kann man an den grün-emittierenden Fluorophoren feststellen, deren gemeinsamer Unterschied zu **CyIQ** in dem Austausch von Chinolin zu Pyridin zu finden ist.^[183] Bei den Pyridin-Indol-Variationen führt die 4-Verknüpfung mit der Dimethinbrücke der Farbstoffe zu kleineren Halbwertszeiten als ihre 2-verbrückten Analoga vorweisen können.

4.3 Fluoreszenztitration mit dsDNA

Alle Cyaninfarbstoffe, bei denen die Möglichkeit einer Drehbarkeit um eine Sigmabindung innerhalb ihrer Polymethinbrücke vorhanden ist, zeigen in Lösung kaum eine nennenswerte Fluoreszenzintensität (Abbildung 42). Die Verhältnisse ändern sich schlagartig, wenn der Farbstofflösung DNA zugesetzt wird.^[129,174,184-186] Allgemein weisen Cyanine eine hohe Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren auf und lagern sich folglich bevorzugt in den Furchen der DNA-Doppelhelix an oder interkalieren zwischen ihre Basenpaarstapel. Als direkte Konsequenz der Anlagerung oder Interkalation wird die Rotationsfreiheit um die Einfachbindungen stark eingeschränkt. Zugleich bewirkt diese Einschränkung der Rotation einen signifikanten Anstieg der Emissionsintensität des Fluorophors, wobei der Grad an verringerter Drehbarkeit mit der Intensitätszunahme korreliert.

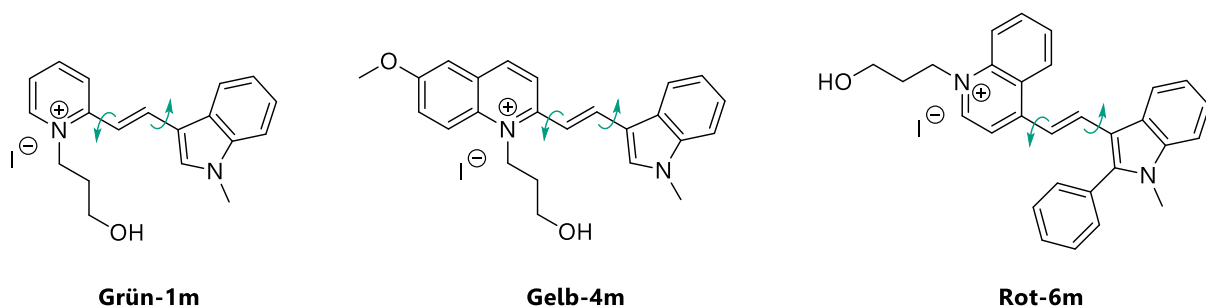


Abbildung 42: Illustration der freien Drehbarkeit um die Sigmabindungen der Polymethinbrücke. Hervorgehoben sind strukturelle Aspekte, die das Ausmaß der Rotationseinschränkung beeinflussen können. Dargestellt sind die Styryl-Derivate **Grün-1m**, **Gelb-4m** und **Rot-6m**, deren Titrationsergebnisse vertretend für alle neuen Cyanine diskutiert werden.

Prinzipiell liegen Cyaninfarbstoffe im Grundzustand in ihrer thermodynamisch stabileren *all-trans*-Konformation vor. Befinden sich die Farbstoffe hingegen in dem ersten elektronisch angeregten Zustand kann dieser strahlungslos anhand einer *cis/trans*-Isomerisierung deaktiviert werden (*dark state*).^[175,187-191] Die oben beschriebene Einschränkung der freien Drehbarkeit unterbindet diese Photoisomerisierung des Fluorophors, und es kommt zum Anstieg der Fluoreszenzintensität. Anhand des Cyanins **Cy5** wurden erstmals grundlegende Erkenntnisse dieser photoinduzierten Isomerisierung und Rück-Isomerisierung

gewonnen.^[188,189] Später konnte bewiesen werden, dass diese Isomerisierungsreaktionen verstärkter bei Cyaninfarbstoffen mit kurzen Polymethinbrücken auftreten, verglichen mit der Wahrscheinlichkeit einer *cis/trans*-Isomerisierung ihrer längerkettigen Analoga.^[192] Infolgedessen reagieren Cyanine mit kleinerer Anzahl an Methingruppen wesentlich empfindlicher auf Änderungen, die in ihrer unmittelbaren Umgebung stattfinden. Aufgrund dieser Sensibilität können kürzere Cyanine bereits minimal variierende Konformationen in Biomolekülen preisgeben, an denen sie kovalent gebunden sind. Die innerhalb der Polymethinbrücke auftretende *cis/trans*-Isomerisierung erfolgt aus dem ersten angeregten elektronischen Zustand. Daher konkurriert sie direkt mit der Fluoreszenzeigenschaft des angeregten Moleküls und wird demnach in den Werten seiner Fluoreszenz-Quantenausbeute sowie Fluoreszenz-Lebenszeit wiedergespiegelt.^[187] Den ausgeprägten Anstieg der Emissionsintensität im Zuge einer Farbstoffanlagerung an doppelsträngige DNA nutzt man in der fluoreszenten Nukleinsäuredetektion etlicher bioanalytischer Studien aus. Auch dem Titrationsexperiment, das in diesem Abschnitt beschrieben wird, kommt diese Intensitätssteigerung zugute.

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren, Änderungen der Absorbanz sowie der Fluoreszenzintensität im Verlauf der Titration eines jeden Cyaninfarbstoffes sind in Kapitel 8.4 abgebildet. Zusätzlich fungiert Tabelle 13 (ebenfalls in Kapitel 8.4) der Aufstellung von ermittelten Titrationsparametern.

Mit dem Bestreben, diese Ergebnisse übersichtlich zu halten, werden im vorliegenden Abschnitt exemplarische Titrationskurven der drei in Abbildung 42 präsentierten Styryl-Derivate einander gegenübergestellt und fundamentale Unterschiede besprochen.

Zunächst wird eine kurze Einführung der zwei wichtigsten Parameter vorstellen, die aus den Fluoreszenztitrationskurven gewonnen werden können. In Anlehnung an die evaluierten Titrationsdaten werden im Anschluss allgemeine Tendenzen und vergleichbare Ergebnisse präsentiert. Zugleich werden signifikante Abweichungen individueller Resultate kurz diskutiert.

Bedeutende Parameter der Fluoreszenztitration

Gewiss können aus der Fluoreszenztitration eines Cyanins wesentlich mehr als zwei Kenngrößen gewonnen werden. Im Folgenden wird zu Gunsten der Anschaulichkeit einzig auf die beiden charakteristischen Faktoren eingegangen, die im weiteren Verlauf der Evaluation im Hinblick auf das Forschungsziel optimale Fluorophore herausdeuten können.

Diese beiden essentiellen Parameter sind die *Stokes*-Verschiebung und der Intensitätsanstieg ΔI der Fluoreszenz, der durch die Anwesenheit von Nukleinsäuren bewirkt werden kann. Um die letztgenannte Intensitätszunahme zu ermitteln, wird der Differenzbetrag (ΔI) aus der Fluoreszenzintensität am Titrationsende (I) und dem Startwert der Emissionsintensität (I_0) berechnet.

Die *Stokes*-Verschiebung beschreibt die spektrale Distanz zwischen dem Absorptions- und dem Emissionsmaximum eines Fluoreszenzfarbstoffes. Die große Bedeutung der *Stokes*-Verschiebung liegt in der Separierung emittierter Strahlung einer Fluoreszenzsonde von ihrem Anregungslicht. Um den Anforderungen der heutigen Fluoreszenz-Bioanalytik zu genügen, sollte die *Stokes*-Verschiebung mindestens 50 nm betragen. Dass die neuen Cyaninfarbstoffe ausnahmslos dieser Anforderung gerecht werden, gibt der folgende Abschnitt eindrucksvoll wieder.

Allgemeine Tendenzen und Resultate der Fluoreszenztitrationen

Eine anschauliche Gegenüberstellung der erhaltenen *Stokes*-Verschiebungen der Chromophore ist anhand der folgenden zwei Diagramme gegeben. Der Wertebereich, in dem sich die charakterisierten Cyaninfarbstoffe in Abhängigkeit ihrer Emissionsfarbe bewegen, wird in Abbildung 43 gezeigt. Die ermittelten *Stokes*-Verschiebungen aller Cyanine übertrafen bei weitem die Werte der Referenz-Fluorophore **TR** und **TO**. Diese haben vergleichsweise kleine *Stokes*-Verschiebungen von lediglich 22 bzw. 20 nm und liegen damit eindeutig weit außerhalb der spektroskopisch wünschenswerten Distanz leistungsstarker Fluorophore.

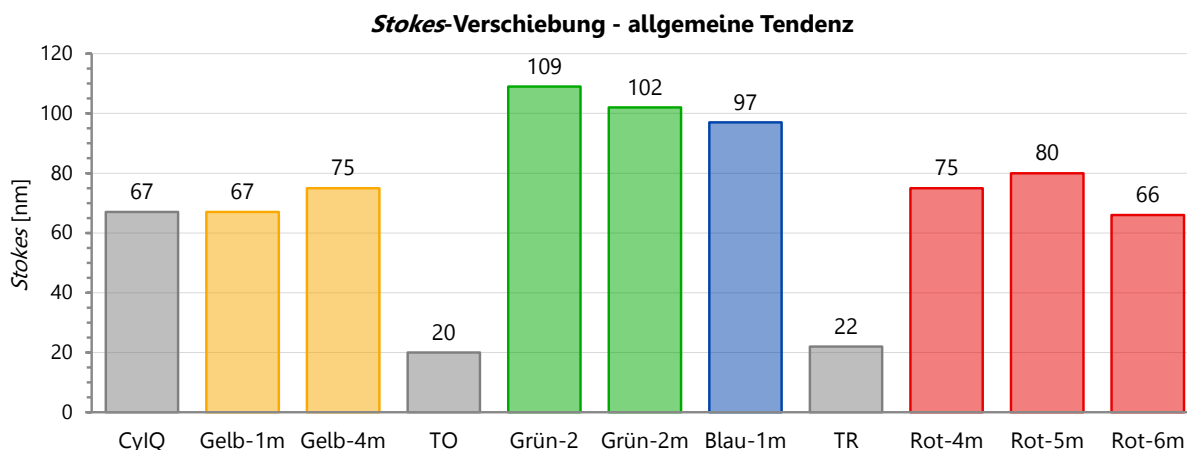


Abbildung 43: Stokes-Verschiebungen von Fluorophoren aller Emissionsfarben mit allgemeiner Tendenz.

Die Stokes-Verschiebungen der Cyanine mit gelber und roter Fluoreszenzfarbe lagen in einem Bereich von 70 bis 80 nm, wohingegen die grün-fluoreszierenden Derivate etwas größere Werte von ungefähr 100 nm aufwiesen. Zugleich zeichnete sich bei den grün-fluoreszierenden Styryl-Chromophoren eine Differenz von ca. 10 nm zwischen den Indol- und *N*-Methyl-Indol-tragenden Farbstoffen ab. Bei den Strukturen anderer Emissionsfarben konnte dieser Trend nicht nachgewiesen werden.

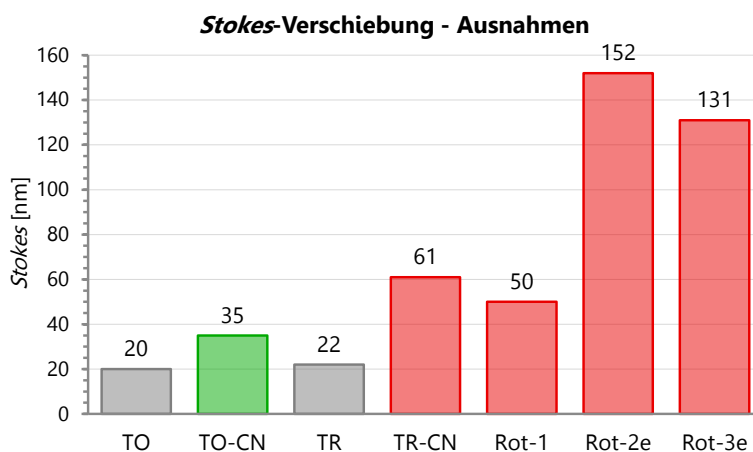


Abbildung 44: Stokes-Verschiebungen von Ausnahme-Fällen aller Fluorophore.

Die Graphik der Abbildung 44 präsentiert die Fluorophore, deren Stokes-Verschiebungen deutlich von dem allgemeinen Trend abweichen. Der niedrigste Stokes-Wert von 35 nm wurde beim cyanidmodifizierten **TO**-Derivat **TO-CN**

gemessen, wobei zu erwähnen ist, dass die Erforschung dieses Derivates nach der Titration eingestellt wurde. Ebenfalls etwas niedrigere *Stokes*-Verschiebungen im Vergleich mit den Styryl-Derivaten zeigten die beiden roten cyanidmodifizierten Trimethincyanine **TR-CN** und **Rot-1** mit 61 nm bzw. 50 nm. Diese beiden *Stokes*-Werte sind zwar kleiner als die aller Dimethincyanine, liegen jedoch durchaus in dem optimalen Bereich und sind deutlich größer als die *Stokes*-Werte des Modellfluorophors **TR**. Auffallend war zudem die außerordentlich große *Stokes*-Verschiebung der beiden carbazolmodifizierten Styryl-Derivate **Rot-2e** und **Rot-3e**. Ihre *Stokes*-Verschiebung beläuft sich auf bemerkenswerte 152 nm bzw. 131 nm. In den letzten Jahren wurde für Fluorophore mit *Stokes*-Werten größer als 150 nm der Begriff des „*Mega-Stokes-Dyes*“ eingeführt.^[193,194] Die beiden Carbazol-Derivate entgehen nur sehr knapp dieser innovativen Worterfindung.

Bevor die Diskussion zu dem zweiten wichtigen Parameter, dem Fluoreszenzintensitätsanstieg ΔI übergeht, sollen die Spektren der exemplarischen Titrations gezeigt und im Verlauf von Titrationsexperimenten gängige Beobachtungen beschrieben werden.

In Abbildung 45 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Titration von **Gelb-4m** als Beispiel eines Styryl-Farbstoffes mit gelber Fluoreszenzfarbe gezeigt. Abbildung 46 (links) gibt die Änderung der Absorbanz im Verlauf der Titration beim Absorptionsmaximum des ungebundenen ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}}$) sowie beim Maximum des angelagerten Farbstoffes ($\lambda_{\text{abs.max.mit}}$) wieder.

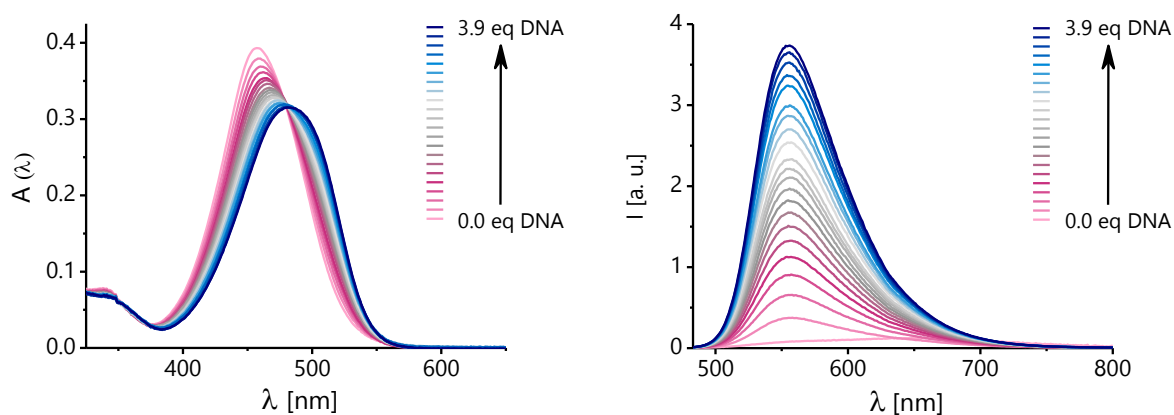


Abbildung 45: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 457 \text{ nm} - 481 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 24 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 556 \text{ nm}$) der Titration von **Gelb-4m** mit **DNA0**.

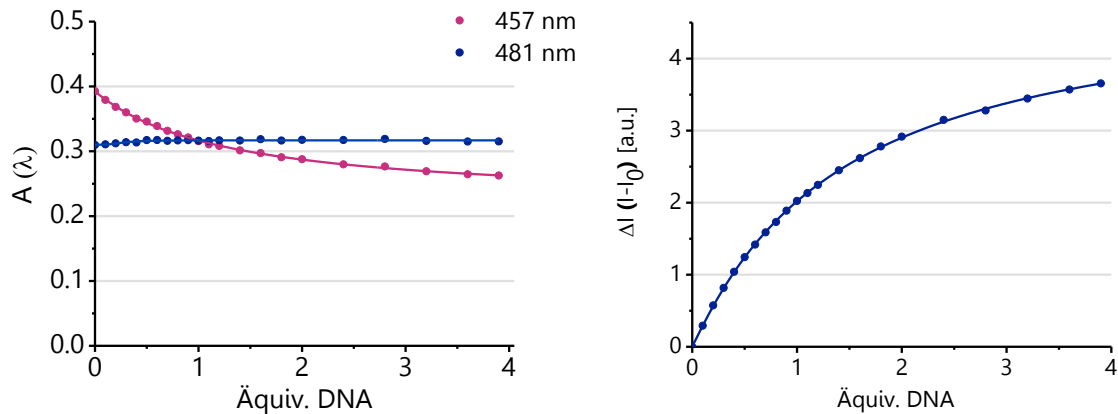


Abbildung 46: Titrationsverlauf von **Gelb-4m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 457$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 481$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 556$ nm).

In dieser Abbildung ist auf der rechten Seite die Zunahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Titrationsfortschrittes an ($\Delta I = I - I_0$) dargestellt. Analoge Graphiken sind nachfolgend für die Styryl-Farbstoffe **Rot-6m** und **Grün-1m** aufgeführt. Gewöhnlich bewirkt die DNA-Zugabe eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums eines Cyanins. Eine derartige Änderung des Absorptionsmaximums ist ein charakteristisches Merkmal, das bei Anlagerung von Fluorophoren an DNA beobachtet werden kann. Zusätzlich lässt sich die typische Abnahme der Extinktion (Hypochromie) in den Absorptionsspektren erkennen. Allgemein werden Hypochromie und bathochrome Verschiebung folgenden Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem Oligonukleotid zugesprochen:

- Auflösung von Farbstoffaggregaten durch Farbstoff-Anlagerung an DNA
- Geometrische Änderung der Farbstoffstruktur (z. B. Planarisierung des Moleküls)
- Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der DNA-Basen mit dem Fluoreszenzfarbstoff
- Wechsel der unmittelbaren Farbstoffumgebung bei DNA-Bindung (z. B. Polarität in DNA-Bindungstaschen)

Infolge der DNA-Zugabe sinkt laut dem letztgenannten Punkt die Polarität in der Umgebung des Fluorophors merklich ab. Die lokal geminderte Polarität wirkt sich wiederum auf die Stabilisierung der verschiedenen Energieniveaus des Farbstoffes aus,

und zwar in derart, dass der sich energetische Abstand zwischen dem HOMO und dem LUMO verringert.^[195] Aus diesem Grund kann man die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums im Zuge der steigenden DNA-Konzentration beobachten (Abbildung 47).

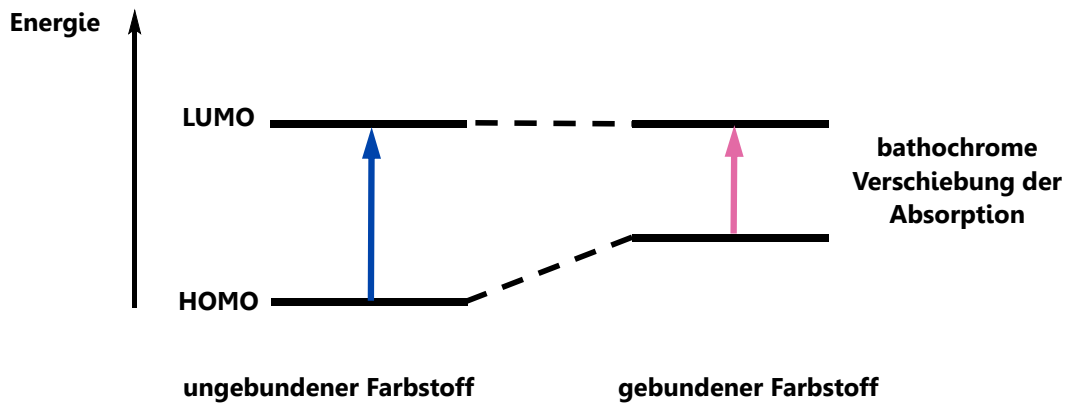


Abbildung 47: Das Energieniveaudiagramm erklärt das rotverschobene Absorptionsmaximum eines Cyanins bei zunehmender DNA-Konzentration.

Das Fehlen eines isosbestischen Punktes in den aufgezeichneten Absorptionsspektren weist auf zwei Gegebenheiten hin. Einmal deutet es auf mehr als einen auftretenden Bindungsmechanismus zwischen dem Chromophor und dem Oligonukleotid hin. Zusätzlich wird ein Hinweis darauf gegeben, dass sich der Cyaninfarbstoff bevorzugt in den Furchen der DNA anlagert. Interkalationen in die Doppelhelix werden meist von solch starken Chromophor-DNA-Wechselwirkungen hervorgerufen, dass man neben einer weitaus ausgeprägteren Bathochromie einen isosbestischen Punkt vorfinden kann.

Die Änderung der Fluoreszenzintensität im Verlauf der Fluoreszenztitration wurde beim entsprechenden Emissionsmaximum der Fluorophore aufgenommen. Bei einer Zugabe von rund 4.0 Äquivalenten DNA wird ein Plateau erreicht, das eine Sättigung gebundener Fluorophore am Oligonukleotid anzeigt.

Fluoreszenztitration mit dsDNA

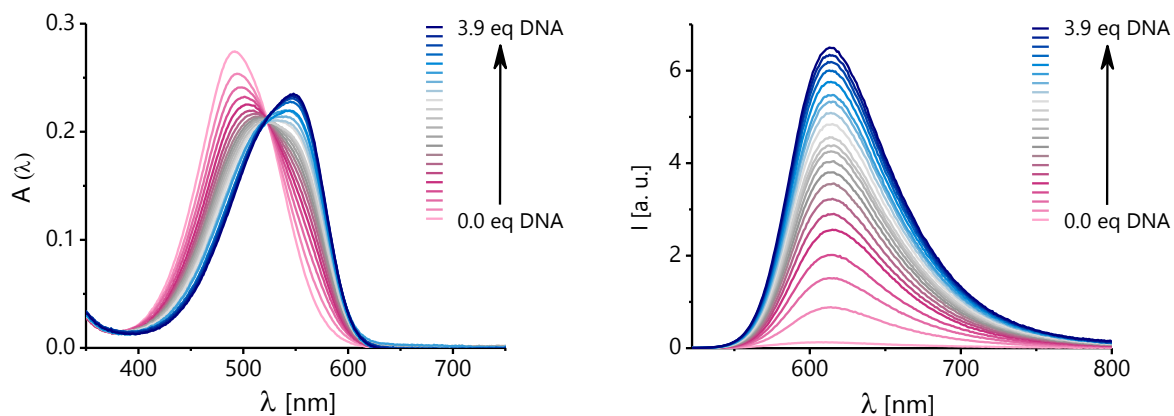


Abbildung 48: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 492 \text{ nm} - 548 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 56 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 507 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 614 \text{ nm}$) der Titration von **Rot-6m** mit **DNA0**.

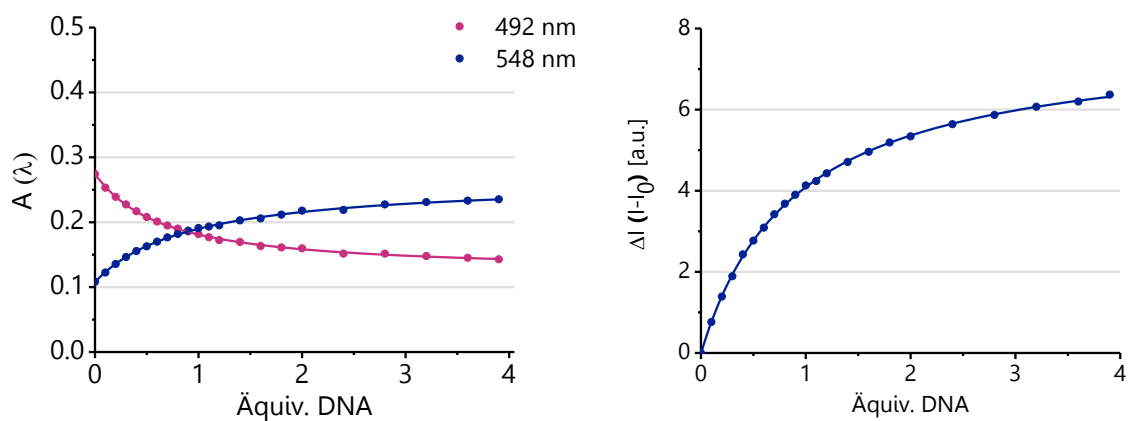


Abbildung 49: Titrationsverlauf von **Rot-6m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 492 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 548 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 614 \text{ nm}$).

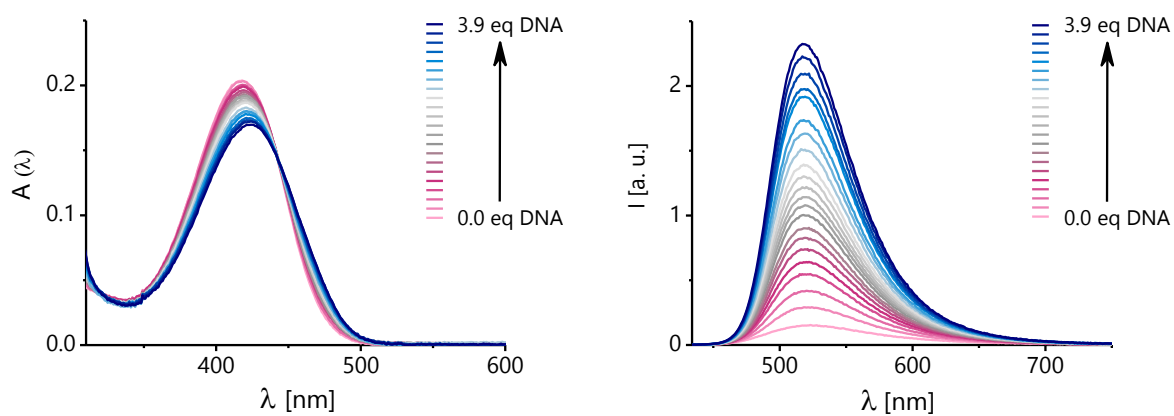


Abbildung 50: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 418 \text{ nm} - 426 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 8 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 419 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 518 \text{ nm}$) der Titration von **Grün-1m** mit **DNA0**.

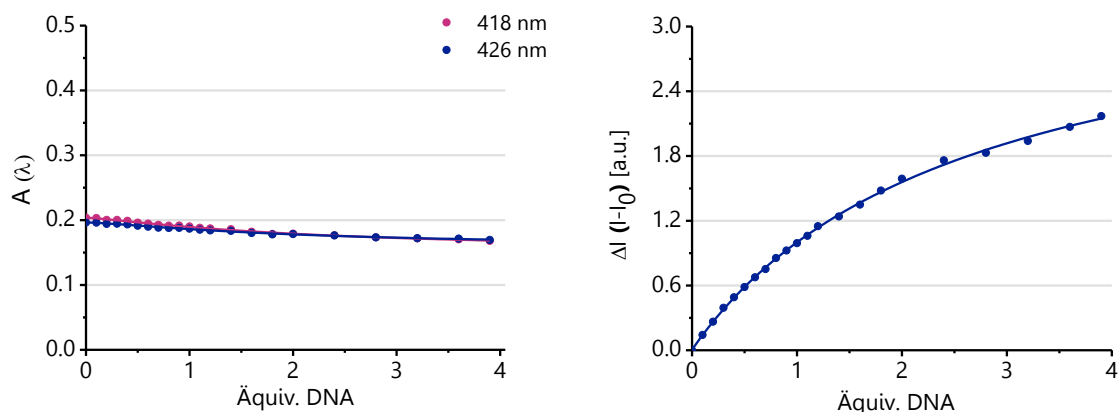
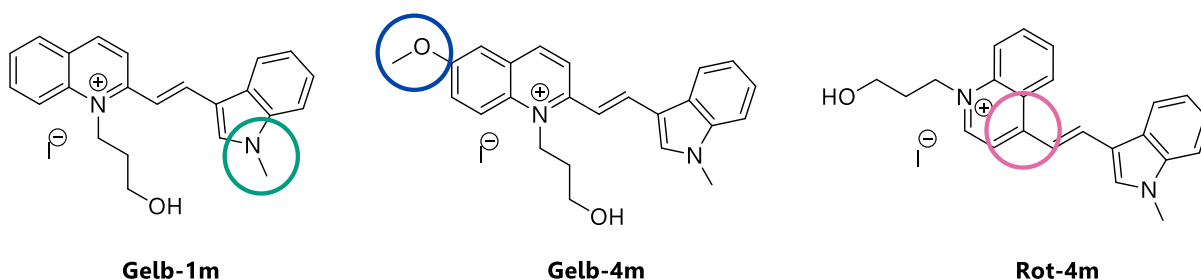


Abbildung 51: Titrationsverlauf von **Grün-1m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 418$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 426$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 518$ nm).

Bei dem Vergleich der Halbwertszeiten in Kapitel 4.2 konnte die eindeutige Korrelation zwischen der Struktur des Fluorophors und seiner Photostabilität nachgewiesen werden. Dabei sorgten jeweils ein *N*-methylierter Indolrest, der Methoxysubstituent und die Brückenverknüpfung mit der 4-Position des Chinolins für eine außerordentliche Verbesserung der Photostabilität.

Interessanterweise lassen sich zwischen dem Anstieg der Emissionsintensität und der Fluorophorstruktur ebenfalls Parallelen ziehen. Der Zusammenhang zwischen dem Fluorophorgerüst und dem Grad an Intensitätssteigerung beruht auf zwei strukturellen Variationen, die zugleich zwei chemischen Modifikationen entsprechen, die ebenso für eine Erhöhung der Photostabilität verantwortlich waren.

Tendenziell bewirkte ein *N*-methyliertes Indol in der Fluorophorstruktur eine Verdoppelung der Intensität des jeweiligen Fluorophors, wie am Beispiel von **CyIQ** und **Gelb-1m** in Abbildung 52 illustriert ist. Überdies hinaus konnte eine zuzügliche Intensitätssteigerung um Faktor 2 durch die 4-Verknüpfung der Dimethinbrücke mit dem Chinolinrest erzielt werden (**Gelb-1m** und **Rot-4**). Die simultane Steigerung der Emissionskraft und der Haltbarkeit bei Belichtung als Folge ein und derselben Strukturvariation ist ein hervorragendes Resultat im Hinblick auf die Fluorophoroptimierung. Mit zwei minimalen synthetischen Eingriffen in das Farbstoffgrundgerüst lassen sich nachweislich beide angestrebten Eigenschaften des Farbstoffes signifikant verbessern.



Fluoreszenzanstieg und Strukturmerkmale

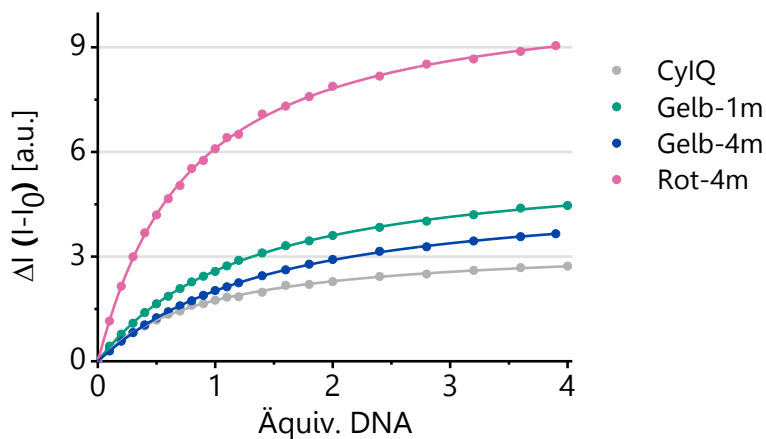


Abbildung 52: Korrelation des Fluoreszenzintensitätsanstiegs mit der Fluorophorstruktur. Strukturelle Merkmale, die vom Referenzfarbstoff **CylQ** abweichen sind gekennzeichnet.

Die Ausstattung des Chinolins mit einer Methoxy-Gruppe zeigte hingegen keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Vielmehr stellen die beiden methoxymodifizierten Derivate **Gelb-4** und **Gelb-4m** eine Ausnahme im Verhalten der Paare mit und ohne *N*-Methyl-Indol dar. Trotz Einführung eines *N*-methylierten Indolrestes in **Gelb-4m** wurde keine Steigerung der Intensität zum unmodifizierten Gegenstück **Gelb-4** verzeichnet. Bei sämtlichen analogen Kombinationen sorgt die Methylfunktion am Indolstickstoff für die besagte Verdopplung der Intensität ungeachtet ihrer Emissionsfarbe. Unter den **Gelb**-Varianten hatte einzig der fluormodifizierte Fluoreszenzfarbstoff **Gelb-3** eine kleinere Emissionsintensität als **CylQ**, vermutlich aufgrund der elektronenziehenden Eigenschaften des Fluorsubstituenten. Die höchste erreichte Fluoreszenzintensität wurde bei dem Benzochinolin-Derivat **Gelb-2** beobachtet, wobei höchstwahrscheinlich das ausgedehntere π -System die Steigerung der Intensität hervorrief.

Besonders beeindruckende Titrationsergebnisse wurden bei den rot-fluoreszierenden Styryl-Derivaten erreicht (Abbildung 49 und Abbildung 50). Ihre intensive

Wechselwirkung mit dem Oligonukleotid führte zu herausragenden Fluoreszenzanstiegen neben den optimalen *Stokes*-Verschiebungen. Der Farbstoff **Rot-6m** dient als repräsentativer roter Emitter. Die besonders intensive Interaktion der rot-emittierenden Cyanine mit dem Oligonukleotid wird durch die ausgeprägten hypochromen sowie bathochromen Verschiebungen der Absorption des Beispiels **Rot-6m** optimal vertreten. Die hohe Intensitätszunahme der Fluoreszenz bestätigt die starken Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren und der Nukleinsäure. Darüber hinaus sind bis auf **Rot-2e** alle **Rot**-Modifikationen mit der 4-Position an der Dimethinbrücke verankert, was wie oben schon bewiesen, zu enorm gesteigerten Intensitäten der Fluoreszenz beiträgt. Der intensivste Fluoreszenzanstieg wird durch den rot-fluoreszierenden Trimethinfarbstoff **Rot-1** repräsentiert und ist höchstwahrscheinlich der π -Systemvergrößerung in der Farbstoffstruktur durch sein integriertes Benzochinolin zuzuschreiben. Die folgende Graphik veranschaulicht die Intensitätszunahmen in Abhängigkeit des Titrationsfortschrittes der besten roten Emitter (Abbildung 53).

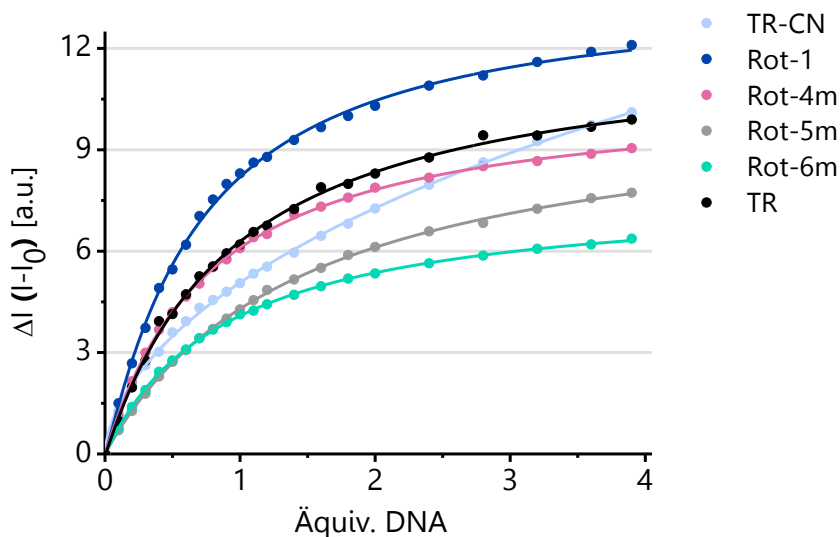


Abbildung 53: Darstellung der Intensitätszunahmen ΔI in Abhängigkeit des Titrationsfortschrittes einiger rot-fluoreszierender Fluorophore.

Die Emissionsintensitäten der Cyanine **Rot-1**, **TR-CN** und **Rot-4m** bewegen sich in der Größenordnung der Intensität des Modellfluorophors **TR**. **Rot-5m** und **Rot-6m** liegen nur knapp darunter. Es sei hier nochmals festzuhalten, dass die Intensitätssteigerung enorm von den Wechselwirkungen des Fluorophors mit dem Oligonukleotid abhängig

ist. Das bedeutet, dass die genaue Reihenfolge von der intensivsten bis zur geringsten Fluoreszenzintensität nach kovalenter Verknüpfung von Chromophor und Nucleinsäure von den Titrationsergebnissen abweichen kann. Die erfassten Intensitäten als Folge einer Fluorophor-Anlagerung können jedoch wichtige Hinweise geben.

Der große Einfluss der Fluorophor-DNA-Interaktion lässt sich am besten bei Vergleich der Messungen von rot- oder gelb-fluoreszenten mit den grün emittierenden Farbstoffen erkennen. An den Absorptionsspektren (Abbildung 50) sowie dem Verlauf der Absorbanzänderung (Abbildung 51) des repräsentativ gezeigten grünen Emitters **Grün-1m** sind erhebliche Unterschiede zum Verhalten der andersfarbigen Fluorophore feststellbar. Ausschließlich die grün-emittierenden Styryl-Farbstoffe verfügen nur über minimale bathochrome Absorbansänderungen (rund 10 nm). Dies zeugt entweder von sehr schwachen Interaktionen mit der DNA oder rührt von dem geringeren Übergangsdipolmoment der kleineren Chromophore her. Dieser Sachverhalt kann einerseits durch ihr geringeres Molekylvolumen erklärt werden. Lagern sich diese kleinen Fluorophore an das Oligonukleotid an, wird ihrer Rotationsfreiheit in weitaus geringerem Umfang Einhalt geboten als ihren strukturell ausladender gestalteten Verwandten anderer Emissionsfarbe, da sie deutlich besser in die Furchen der DNA-Helix „reinpasse“. Unterstützt wird diese Annahme unter anderem auch bei Betrachtung der phenylsubstituierten Grün-Variationen **Grün-3(m)** und **Grün-4(m)** in dem folgenden Intensitätsvergleich (Abbildung 54).

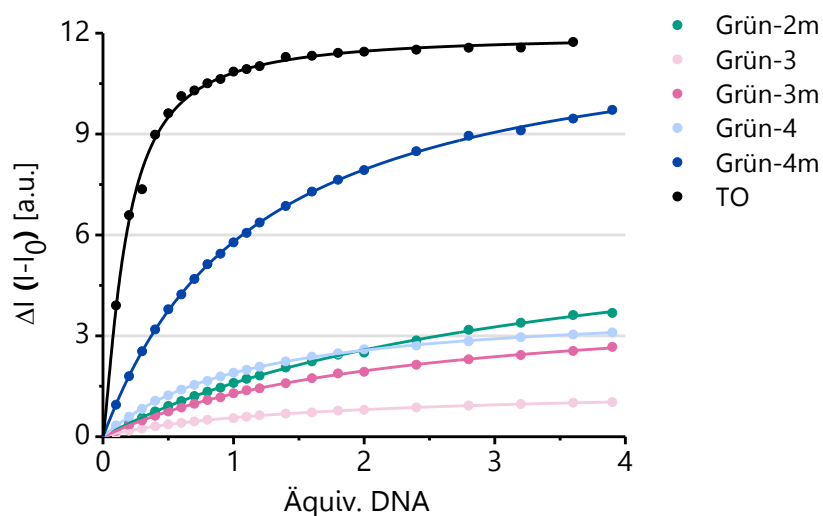


Abbildung 54: Vergleich der Intensitätszunahmen ΔI mit Titrationsfortschritt einiger grüner Fluorophore.

Einzig die strukturellen Gegebenheiten von **Grün-4m** zeigen eine auffällig große Emissionsintensität verglichen mit allen weiteren grün-fluoreszierenden Cyaninen. Die beiden Farbstoffe **Grün-3** und **Grün-4** sind mit einem Phenylsubstituent am Indolbaustein ausgestattet und unterscheiden sich lediglich in der Verknüfungsposition der Dimethinbrücke. Der geräumige Substituent am Indol und die 4-Verknüpfung allein reichen jedoch nicht aus, um dem Fluorophor eine optimale Wechselwirkung mit dem Oligonukleotid zu ermöglichen. Dieser Sachverhalt ändert sich deutlich bei dem Chromophor **Grün-4m**, dessen zusätzliche Methylgruppe am Indolstickstoff genau die Strukturänderung repräsentiert, die eine enorm intensivere Wechselwirkung von Cyanin und DNA mit sich bringt. Die Methylierung des ebenfalls phenylmodifizierten **Grün-3m** bewirkt im Vergleich zu der unmethylierten Struktur **Grün-3** nur die allgemein beobachtbare Verdopplung der Intensität. Daraus kann man schließen, dass eine Inkorporation des kleineren Pyridinrings die konformelle Flexibilität des Fluorophors so stark erhöht, dass seine große Rotationsfreiheit erst bei gleichzeitiger Anwesenheit aller drei Strukturvariationen kompensiert. Das Ausmaß der Wechselwirkungen zwischen den Pyridin-Farbstoffen und der doppelsträngigen DNA erreicht ausschließlich durch die vereinte Wirkung der drei Modifikationen *N*-Methylindol, 4-Anbindung der Polymethinbrücke sowie der Anwesenheit von 2-Phenylindol ungefähr die Größenordnung gelb- oder rotfluoreszierender Chromophore.

Zuzüglich können die strukturellen Veränderungen der pyridinhaltigen Cyanine eine stark variierende *cis/trans*-Isomerisierungswahrscheinlichkeit innerhalb der Farbstoffbrücke hervorrufen. Dementsprechend lässt sich ein gewisser Einfluss der Isomerisierung auf die gemessene Fluoreszenzintensität nicht auszuschließen.

Ergänzend wurde in einer Arbeit von *Chakravorti et al.* nachgewiesen, dass Anlagerungen von Styryl-Farbstoffen an DNA sehr stark mit der vorherrschenden Ionenkonzentration der Probelösung korrelieren.^[195,196] *Chakravorti et al.* konnten zeigen, dass der Styryl-Farbstoff **DASPMI**, der ebenfalls einen Pyridinrest trägt, durch eine steigende NaCl-Konzentrationen zunehmend von dem DNA-Doppelstrang abgelöst werden kann. Bei den hier dargestellten Titrationen wurden den Probelösungen 250 mM NaCl zugesetzt, was laut *Chakravortis* Studien lediglich 35 % der Farbstoffmoleküle gestattet am Oligonukleotid gebunden zu verbleiben.

Ein Zusatz von Natriumchlorid ist hingegen für die stabile Ausbildung einer Doppelhelix von großer Bedeutung. Dementsprechend ist eine vollständig salzfreie Titrationslösung nicht zu empfehlen, wenn man beabsichtigt, Bindungsgleichgewichte von Chromophoren an doppelsträngige DNA zu untersuchen. Die charakteristische Konzentrationsabhängigkeit der Farbstoffanlagerung im Hinblick auf die enthaltenen Ionen sollte jedoch bei der Interpretation der Titrationsdaten stets im Hinterkopf behalten werden.

Zusammengefasst zeigen die pyridinhaltigen Systeme nichtdestotrotz optimale Eigenschaften in Bezug auf die entscheidenden Parameter des Titrationsexperimentes. Die absolute Fluoreszenzintensität grüner Fluorophore reicht im Durchschnitt zu rund 70 % an diejenige der voluminöseren Styryl-Derivate heran. Zudem zeigt sich bei den grünen Emitttern ebenfalls eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität als direkte Folge der *N*-Methyl-Substitution des Indols im Farbstoffgerüst.

Ein direkter Vergleich zum grün-fluoreszierenden Referenzmolekül **TO** sollte jedoch nicht vorgenommen werden. Bei genauer Betrachtung der Fluoreszenzintensität im Titrationsverlauf wird deutlich, dass **TO** einem offensichtlich vollkommen anderen Bindungsmechanismus folgt als alle anderen 28 Fluorophore (Abbildung 54). Die Bestätigung der stark andersartigen Wechselwirkung von **TO** mit dem Oligonukleotid wird später beim Vergleich der Quantenausbeuten erneut deutlich, der die Messwerte angelagerter und kovalent gebundener Fluorophore wiedergibt.

Abschließend zeigt die folgende Tabelle eine Übersicht der Daten von den drei hier im Detail gezeigten Titrationen sowie den Vergleich zu ihren entsprechenden Modellfluorophoren.


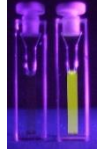
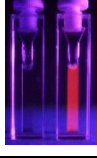
Farbstoff	ohne DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.ohne}}$ [nm]	mit 4 eq DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.mit}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.max.}}$ [nm]	λ_{Stokes} [nm]	ΔI	Probelösung ohne / mit 4 eq DNA0
Grün-1m	418	426	518	92	2.2	
Gelb-4m	457	481	556	75	3.7	
Rot-6m	492	548	614	66	6.4	
TO	502	510	530	20	11.7	-
CylQ	455	489	556	67	2.7	-
TR	621	633	655	22	9.9	-

Tabelle 1: Vergleich spektroskopischer Daten aus den aus den Fluoreszenz-Titrationen exemplarischer Cyanin-Farbstoffe. Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine Lösung mit 10 μM Farbstoff, 40 μM **DNA0**, 10 mM NaP_i (pH = 7), 250 mM NaCl und 2 % Ethanol.

4.4 Fluoreszenz-Quantenausbeute in Gegenwart von dsDNA

Für die spektroskopische Charakterisierung der Cyanine wurde unter anderem auch deren Quantenausbeute in Anwesenheit von 4.0 Äquivalenten **DNA0** bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Anregungswellenlänge mit Bezug auf die Fluoreszenztitration an das Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffes bei DNA-Sättigung angepasst. Die nachfolgende graphische Darstellung gibt die allgemeine Tendenz bzw. Größenordnung der gemessenen Quantenausbeuten wieder. Die erhaltenen Werte aller Farbstoffe sind in der Tabelle 14, Kapitel 8.4 zusammengetragen.

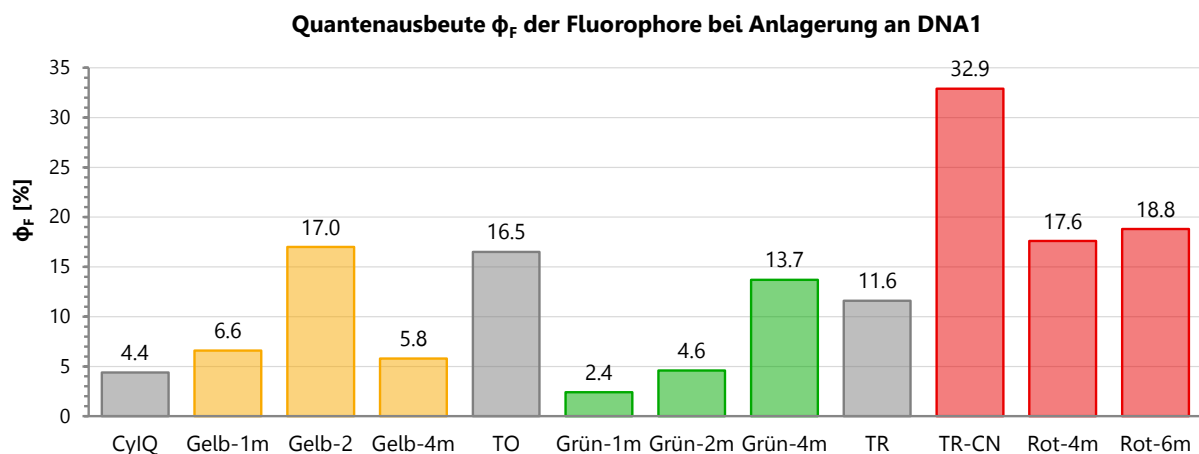


Abbildung 55: Beispiele der Fluoreszenz-Quantenausbeuten von Fluorophoren aller Emissionsfarben die bei Anlagerung an DNA bestimmt wurden.

Der generelle Trend bei den Fluoreszenz-Quantenausbeuten, die von den Farbstoffen bei Anlagerung an DNA bestimmt wurden, entspricht weitestgehend den Tendenzen des Fluoreszenzintensitätsanstiegs bei den Fluoreszenztitrationen. D. h., dass die höchsten Werte der Fluoreszenz-Quantenausbeute bei 4-Chinolin-Anbindung der Farbstoffbrücke und *N*-methyliertem Indol zu finden sind. Eine gehobenere Quantenausbeute zeigten ebenso **Grün-4m**, das einen phenylsubstituierten Indolrest enthält sowie die Benzochinolin-Derivate **Gelb-2** und **Rot-1** aufgrund ihres ausgeweiteten π -Systems. Analog zu den Intensitätsanstiegen der Titrationsexperimente ist zu beachten, dass die erhaltenen Quantenausbeuten lediglich als Richtwerte gelten und zum Vergleich der Fluorophore untereinander

dienen sollen. Wie sich im Verlauf der Arbeit noch zeigen wird, konnte bei allen Farbstoffen, die kovalent an Nukleinsäuren geknüpft wurden, ein Anstieg der Fluoreszenz-Quantenausbeute um das 2- bis 8-fache der hier gezeigten Werte verzeichnet werden. Der Ursprung einer derart signifikanten Quantenausbeuten-Erhöhung beruht einerseits auf der bereits beschriebenen deutlich eingeschränkteren Rotationsfreiheit eines Farbstoffmoleküls bei kovalenter Anbindung an ein Oligonukleotid, und zusätzlich auf dem immensen Einfluss der NaCl-Konzentration in den Untersuchungslösungen. Die konformelle Flexibilität, die bei Anlagerungsgleichgewichten zugegen ist, wirkt sich ebenfalls auf die Wahrscheinlichkeit einer *cis/trans*-Isomerisierung und damit auf die gemessenen Werte der Fluoreszenz-Quantenausbeute aus.

4.5 Evaluation aller Daten und Auswahl der Cyanine für die postsynthetische Modifikation von Nukleinsäuren

Im Verlauf der vorangegangenen Abschnitte dieses Kapitels wurden die neuen Cyaninfarbstoffe verschiedenen Untersuchungen unterworfen, die einen finalen Vergleich der wichtigsten photophysikalischen Eigenschaften gewähren. Auf der nächsten Seite sind in Tabelle 2 alle entscheidenden Parameter zusammengefasst. Aus der Fluoreszenz-Quantenausbeute und dem Extinktionskoeffizient wurde die Helligkeit B der Chromophore berechnet. Dabei ist für die Referenzfluorophore **TR** und **TO** ein mittlerer Wert des Extinktionskoeffizienten angegeben, der anhand von ermittelten Werten aus kovalent verknüpften DNA-Strängen unterschiedlicher Sequenzen vorhergehender Forschungen abgeschätzt wurde.^[197] Der Betrag eines Extinktionskoeffizienten ist auch stark von den enthaltenen chemischen Gruppen eines Fluoreszenzfarbstoffes abhängig. Allgemein ist bekannt, dass Substituenten in Form schwerer Atome eine mindernde Wirkung auf den Extinktionskoeffizient ausüben. Prinzipiell tragen alle diskutierten Farbstoffe an ihrem Propyl-Linker eine endständige Hydroxyfunktion. Die beiden Trimethincyanine **TR-CN** und **Rot-1** bilden dabei eine Ausnahme. Bei ihnen wurde synthesebedingt eine Iodgruppe anstelle der Hydroxyfunktion an der Propyl-Einheit angebracht. Als unmittelbare Folge zeigt sich besonders bei **TR-CN** ein vergleichsweise niedriger Extinktionskoeffizient von $13000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Der immense Einfluss der Iodgruppe wird besonders deutlich, wenn man den Vergleich von **TR-CN** mit Verbindung **55** betrachtet (Abbildung 56).

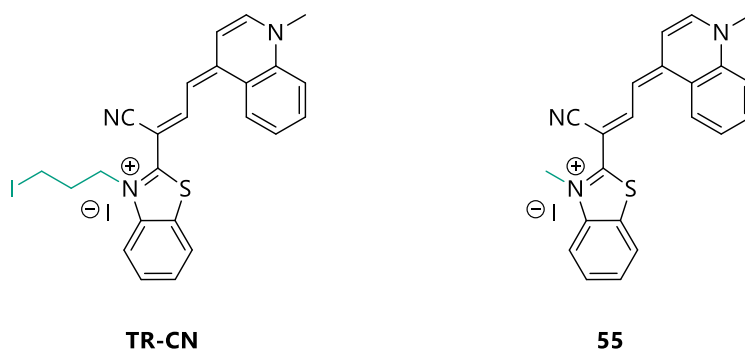


Abbildung 56: Gegenüberstellung der Strukturen von **TR-CN** und Molekül **55**.

Farbstoff	$t_{1/2}$ [min]	λ_{Stokes} [nm]	$\epsilon(\lambda)$ [L/mol*cm]	$\Phi_{\text{F.angel.}}$ [%]	B [L/mol*cm]	Evaluations- faktor
TO	32	20	27000	16.5	4455	143
Grün-1	187	108	19400	1.2	233	44
Grün-1m	225	92	28400	2.4	682	153
Grün-2	636	109	24800	1.9	471	300
Grün-2m	293	102	30000	4.6	1380	404
Grün-3	146	100	16400	2.3	377	55
Grün-3m	78	93	28600	4.1	1173	91
Grün-4	162	98	16600	5.8	963	156
Grün-4m	49	91	30100	13.7	4124	202
Blau-1m	658	97	19200	1.0	192	126
CylQ	90	67	42400	4.4	1866	168
Gelb-1m	205	67	42700	6.6	2818	578
Gelb-2	13	68	37700	17.0	6409	83
Gelb-3	50	82	38000	1.5	570	29
Gelb-4	264	78	39400	5.7	2246	593
Gelb-4m	425	75	39300	5.8	2279	969
TR	7	22	15000	11.6	1740	12
TR-CN	66	61	13000	32.9	4277	282
Rot-1	11	50	38400	35.5	13632	150
Rot-2e	130	152	35700	6.1	2178	283
Rot-3e	134	131	26100	12.5	3263	437
Rot-4	186	81	30800	12.8	3942	733
Rot-4m	331	75	30800	17.6	5421	1794
Rot-5	67	83	27500	12.7	3493	234
Rot-5m	241	80	35700	15.3	5462	1316
Rot-6	101	81	27600	5.2	1435	145
Rot-6m	317	66	31100	18.8	5847	1853
Rot-7m	269	87	32300	3.6	1163	313

Tabelle 2: Übersicht der wichtigsten photophysikalischen Eigenschaften der neu entwickelten Cyaninfarbstoffe.

55 repräsentiert ein analog zu **TR-CN** aufgebautes Trimethincyanin. Der entscheidende Unterschied ist in dem Austausch des Iodpropylrestes bei **TR-CN** gegen den Methylrest im Molekül **55** gegeben. Stellt man die jeweiligen Extinktionskoeffizienten beider Verbindungen einander gegenüber, so stellt man fest, dass **55** einen rund dreifach höheren Extinktionskoeffizienten von $36600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ aufweist, was den großen Einfluss des schweren Iodatomes in **TR-CN** widerspiegelt. Dieser Effekt sollte deshalb bei der folgenden Evaluation von **TR-CN** und allen anderen Cyaninen berücksichtigt werden.

Für die Auswahl der besten Fluorophore sollte neben der Helligkeit natürlich auch die Photostabilität berücksichtigt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Evaluationsfaktor berechnet, der sich aus dem Produkt der Helligkeit und der Halbwertszeit sowie der Konstante 0,001 zusammensetzt. Dieser Evaluationsfaktor deutet dementsprechend jene Fluoreszenzfarbstoffe heraus, die eine optimale Helligkeit neben einer hohen Photostabilität aufweisen. In den nachkommenden drei Abbildungen wurden Evaluationsfaktoren von Fluorophoren je einer Emissionsfarbe graphisch dargestellt und erleichtern somit die Identifizierung herausstechender Farbstoffe.

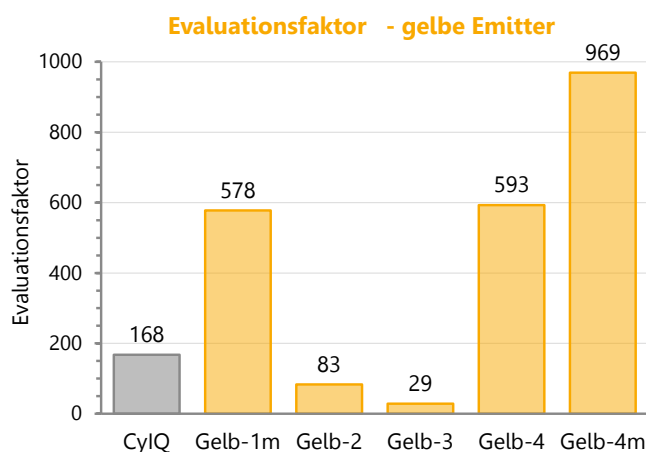


Abbildung 57: Gegenüberstellung des Evaluationsfaktors der Fluorophore mit gelber Emissionsfarbe.

Unter allen gelben Emittern wurden **Gelb-1m** und **Gelb-4m** anhand ihrer guten photophysikalischen Eigenschaften für die spätere kovalente Verknüpfung mit Oligonukleotiden ausgewählt. Die Variation **Gelb-4** besticht ebenfalls angesichts ihres

Evaluationsfaktors, wird jedoch durch das methylierte Gegenstück **Gelb-4m** übertrumpft und deshalb nicht tiefgründiger erforscht.

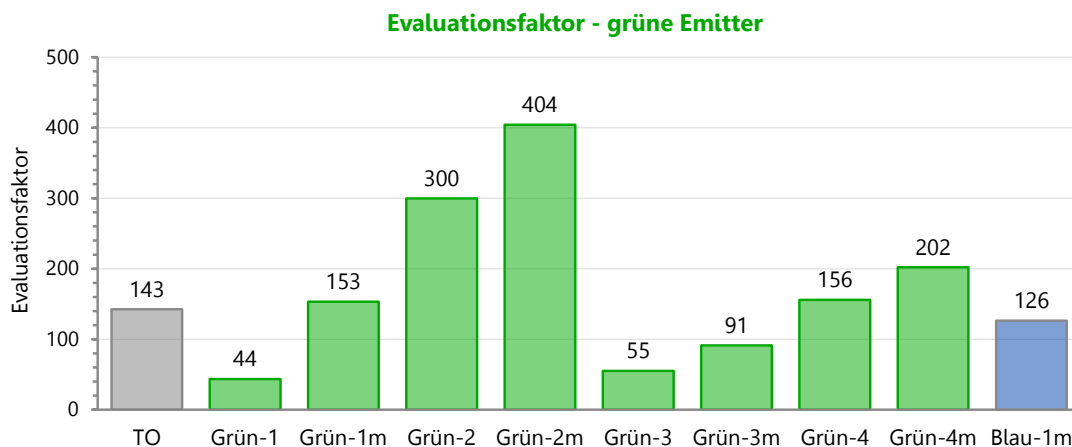


Abbildung 58: Gegenüberstellung des Evaluationsfaktors der Fluorophore mit grüner (und blauer) Emissionsfarbe.

92

Bei den grün-fluoreszierenden Cyaninderivaten fiel die Entscheidung zu Gunsten von **Grün-1m**, **Grün-2m**, **Grün-3m** und **Blau-1m** aus. Obwohl der Farbstoff **Blau-1m** eine sehr geringe Helligkeit besitzt, wurde einer Intuition folgend seine Erforschung als kovalent gebundenes Chromophor beschlossen. Trotz der enorm großen Helligkeit von **Grün-4m** kam dieser Styryl-Farbstoff wegen mangelnder Photostabilität nicht in die engere Auswahl der besten grünen Emitter.

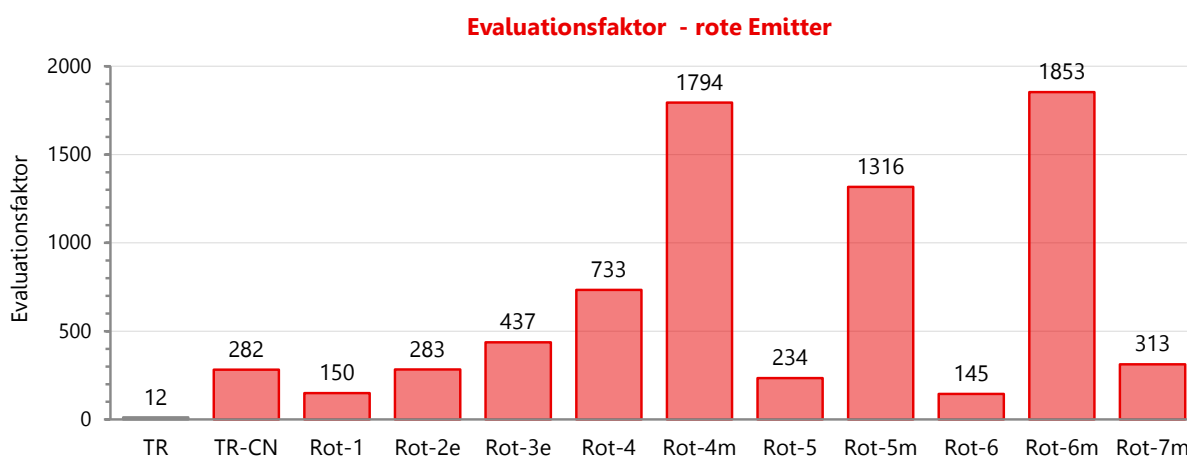


Abbildung 59: Gegenüberstellung des Evaluationsfaktors der Fluorophore mit roter Emissionsfarbe.

Zur postsynthetischen Modifikation unter den Cyaninfarbstoffen mit roter Emissionsfarbe wurden **TR-CN**, **Rot-3e**, **Rot-4m**, **Rot-5m** und **Rot-6m** gewählt.

Bei genauer Betrachtung aller Ergebnisse kann man feststellen, dass der groß angelegten kombinatorischen Forschung von *Chang* und *Rosania* die gesteigerte Fluoreszenzintensität phenylindoltragender Fluorophore entgangen ist. Ebenfalls zeigte ihre Evaluation der Haltbarkeiten bei längerer Belichtung nicht die eindeutige Überlegenheit der 4-verbrückten Styryl-Derivate oder Farbstoffe mit Methoxychinolin-Substituent an. Die Styryl-Bibliothek der Forscher *Chang* und *Rosania* sortierte letztendlich lediglich 8 von 1336 Fluorophoren als besonders qualifiziert zur Nukleinsäuredetektion aus. Fehlerhafte Charakterisierung einzelner Farbstoffe, und im schlimmsten Fall diese zu „übersehen“, ist ein Preis, den man beim Substanz-Screening mit großem Durchsatz gegebenenfalls bezahlen muss.

5. „Click“-modifizierte DNA

Die photophysikalischen Eigenschaften der ausgewählten neu entwickelten Fluorophore sollten nun in kovalenter Bindung an Oligonukleotide intensiver untersucht werden. Die Ausstattung des DNA-Einzelstranges mit einem Farbstoff sollte anhand der kupfer(I)katalysierten „Click“-Reaktion (CuAAC) auf postsynthetischem Wege erfolgen. Für diesen Zweck wurde eine Azidfunktion an den Propyl-Linker der Cyaninfarbstoffe angebracht. Der kommende Abschnitt erläutert die Darstellung der Farbstoffazide und die anschließende CuAAC im methodischen Detail.

5.1 Azid-Synthese und „Click“-Modifikation von DNA

Bei dem Trimethincyanin **TR-CN** erfolgte die Herstellung des korrespondierenden Azides **TR-CN-N₃** anhand einer Iod-Azid-Austauschreaktion (Abbildung 60) mit sehr guten Ausbeuten. Die hierbei verwendeten Reaktionsbedingungen entsprechen denen, die im Zuge der Methodenoptimierung für die iodierten Spezies der Styryl-Farbstoffe sorgfältig ausgearbeitet wurden.

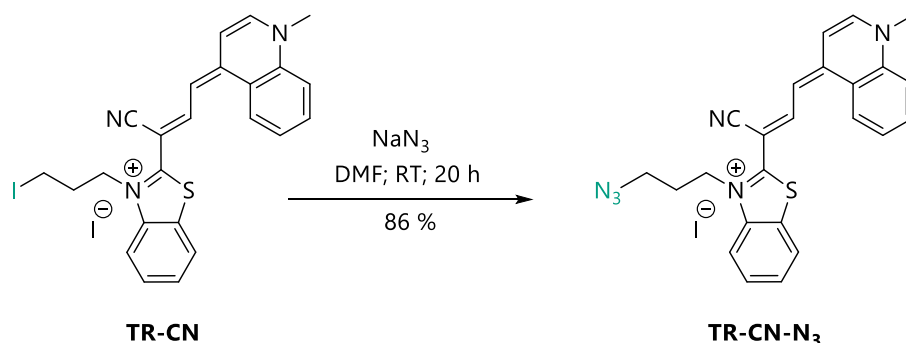


Abbildung 60: Darstellung des korrespondierenden Azides vom Trimethincyanin **TR-CN**.

Die Struktur der Styryl-Cyanine weist am quartären Chinolin-Stickstoff einen 3-Hydroxypropylrest auf. Zu Beginn wurden verschiedene Methoden angestrebt, welche die Hydroxyfunktion mithilfe einer einstufigen Reaktion in eine Azidgruppe

umsetzen sollten. Primär wurde dabei die *Mitsunobu*-Reaktion verwendet. Trotz großzügiger Variation der Reaktionsbedingungen war diese Strategie erfolglos und führte lediglich zu einer hohen Zahl an Nebenprodukten.

Im Gegensatz dazu zeichnete sich eine zweistufige Azid-Synthese als optimale Methode für alle Styryl-Strukturen gleichermaßen bei sehr hohen Umsätzen aus. Bei dieser Synthesestrategie wurde über eine initiale *Appel*-Reaktion mit direkt angeschlossener *Finkelstein*-Reaktion die iodidierte Spezies des jeweiligen Farbstoffes gewonnen. Anschließend erfolgte ein Iod-Azid-Austausch zur gewünschten azidfunktionalisierten Verbindung. Abbildung 61 veranschaulicht die verwendeten Reaktionsbedingungen dieser Reaktionsfolge.

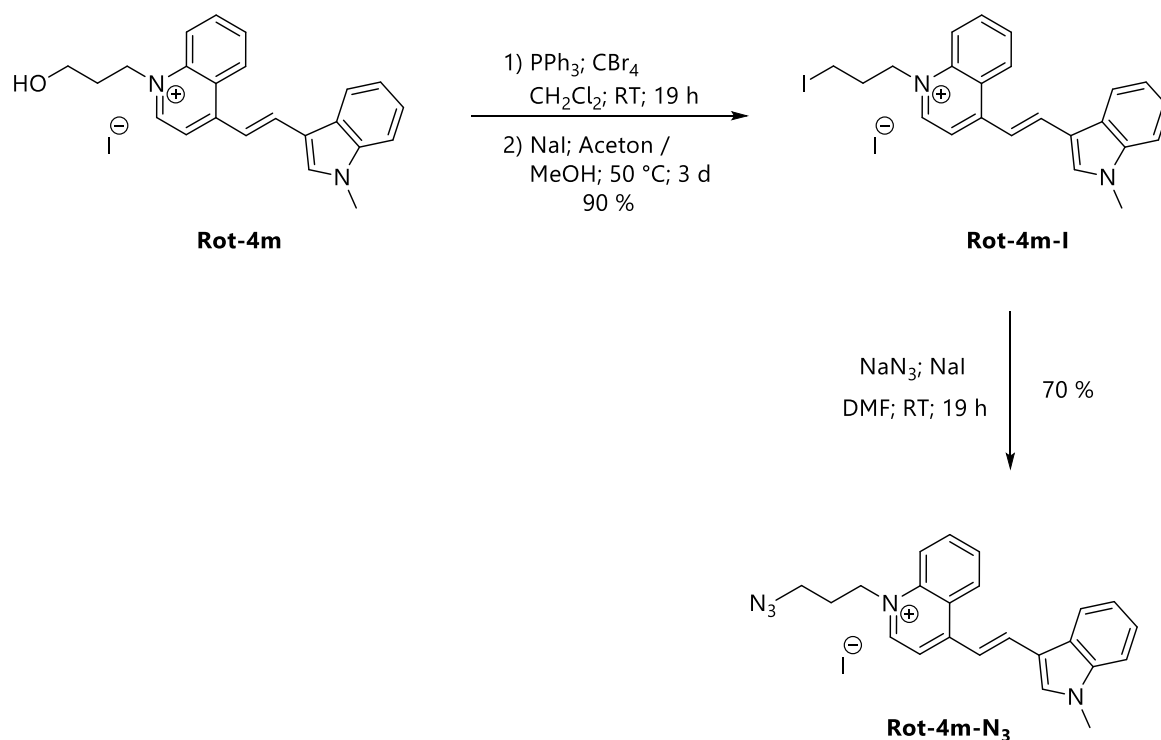


Abbildung 61: Zweistufige Azid-Synthese der Styryl-Farbstoffe am Beispiel von **Rot-4m**.

Auch bei diesen Syntheseschritten fokussierte sich die primäre Entwicklungsarbeit auf die Entschlüsselung optimaler Kristallisationsbedingungen der Farbstoffstufen. Beispielsweise war es möglich bei den roten und gelben Emittoren auf eine *Finkelstein*-Reaktion zu verzichten, welche die bromierte Spezies der *Appel*-Reaktion in das korrespondierende Iodid überführt. Die vergleichsweise unpolaren bromierten

Farbstoffe kristallisierten sauber aus methanolischen Lösungen aus und gestatteten so eine vollständige Abtrennung des Triphenylphosphinoxids, das im Zuge der *Appel*-Reaktion gebildet wird. Anders verhielten sich die „kleineren“ grün-fluoreszierenden Styryl-Derivate. Das bromierte Produkt der Pyridin-Styryle wies eine deutlich höhere Polarität auf als die Farbstoffe, die mit einem Chinolin ausgestattet waren. Infolgedessen ließen sich die grün emittierenden Bromidintermediate nicht aus Methanol kristallisieren. Lösungsmittelmischungen ergaben meist einen Einschluss von Triphenylphosphinoxid im Cyaninkristallinat und konnten nur unter erheblichen Ausbeuteeinbußen sauber gewonnen werden. Der Austausch der Bromidgruppe zu dem entsprechenden Iodid unter Verwendung einer *Finkelstein*-Reaktion löste diese Problematik auf geschickte Art und Weise. Die iodierte Spezies der grünen Emitter zeigte im Vergleich zur bromierten Form einen signifikant unpolaren Charakter und ließ sich problemlos in reinem Methanol kristallisieren.

Bei den Styryl-Farbstoffen mit Chinolinrest konnten bromierte als auch iodierte Substanzen bei vergleichbaren Ausbeuten isoliert werden. Das in Abbildung 61 gezeigte Beispiel **Rot-4m** lieferte rund 90 % iodiertes oder 96 % bromiertes Produkt.

Gewöhnlich wird eine Iod-Azid-Austauschreaktion unter leichter Erwärmung bei ungefähr 60 °C vorgenommen. Jegliches Erwärmen führte bei den Styryl-Farbstoffen zur Bildung verschiedener Nebenprodukte. Die Reaktionsführung bei Raumtemperatur wurde nur noch von einer dünn-schichtchromatographisch sichtbaren Nebenreaktion begleitet, die sich durch einen Zusatz von NaI vollkommen unterbinden ließ. Folglich konnte das Azid ebenfalls bequem mittels Kristallisation erhalten werden.

Postsynthetische Modifikation von DNA mit der kupfer(I)katalysierten „Click“-Reaktion

Die geplante kupfer(I)katalysierte „Click“-Reaktion sollte zwischen dem jeweiligen azidmodifizierten Cyaninfarbstoff und dem kommerziell erhältlichen Baustein „click U“, der die Alkinfunktionalität an der 2'-Position bereitstellt, stattfinden. Das Phosphoramidit der modifizierten Base „click U“ kann unter den identischen Konditionen wie die natürlichen Basen bei der DNA-Synthese in das wachsende Oligonukleotid inkorporiert werden. Die Alkingruppe erlaubt die postsynthetische Verknüpfung mit einem azidfunktionalisierten Fluorophor unter den milden Reaktionsbedingungen der kupfer(I)katalysierten „Click“-Reaktion (Abbildung 62).

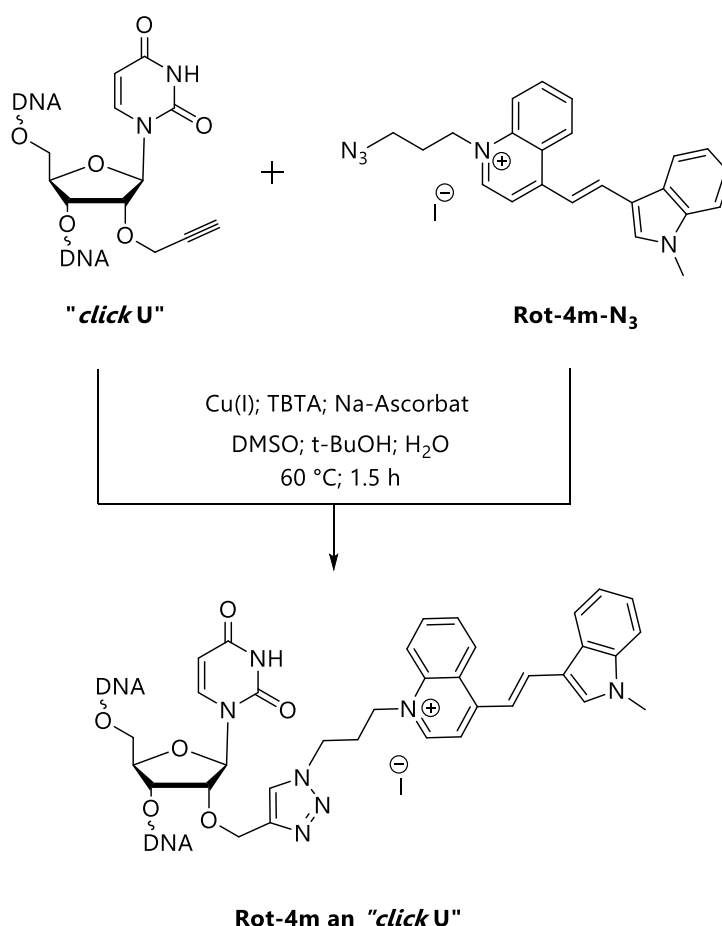
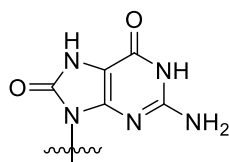


Abbildung 62: Exemplarische „Click“-Konjugation von **Rot-4m-N₃** an einzelsträngige DNA, die mit einem alkinfunktionalisierten „click U“ ausgestattet ist.

Nach einer konventionell verwendeten Methodenvorschrift der Arbeitsgruppe *Wagenknecht et al.* wurde anfangs die „Click“-Modifikation am Oligonukleotid bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. 15 Stunden durchgeführt.^[58] Obwohl diese „Click“-Konditionen zu der gewünschten Fluorophormarkierung führten, konnte bei sorgfältiger Betrachtung von MALDI-Massenspektren modifizierter, mittels HPLC-aufgereinigter DNA-Stränge die geringe Bildung eines oxidierten Produktstranges festgestellt werden. Obwohl der kupfer(I)katalysierten „Click“-Reaktion der kupfer(I)-chelatisierende Ligand TBTA (Tris-[(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]amin) in ausreichenden Mengen zugesetzt wurde, schien sich ein Oxidationsschaden in Form von 7,8-Dihydro-8-oxoguanosin am Oligonukleotid jedoch nicht vollständig unterbinden zu lassen (Abbildung 63).



7,8-Dihydro-8-oxoguanosin

Abbildung 63: Struktur des Oxidationsproduktes der Base Guanin.

Wie an den entsprechenden MALDI-Massenspektren in Kapitel 8.5 zu sehen ist, gelang die saubere Abtrennung des oxidierten Produktstranges durch HPLC-Trennung mit einem flacheren Gradienten (mit einem Anstieg auf 9 % statt 20 % Acetonitril in 45 Minuten). Nichtsdestotrotz wurde die Vorschrift der kupfer(I)katalysierten „Click“-Reaktion einer Methodenoptimierung unterworfen, deren Resultat eine Methode hervorbrachte, die eine Bildung von oxidiertem Oligonukleotid vollständig verhinderte. Diese Verbesserung ließ sich durch Variation der Reaktionstemperatur erreichen. Die optimierte CuAAC wird bei 60 °C durchgeführt wobei eine Reaktionszeit von 1.5 Stunden für einen kompletten Umsatz genügt (Abbildung 62). Aufgrund der zeitlich verkürzten Gegenwart des hochreaktiven Kupfer(I)salzes wurden folglich keine Oxidationsschäden mehr detektiert. Die zur Modifikation verwendeten DNA-Sequenzen werden im folgenden Abschnitt gezeigt.

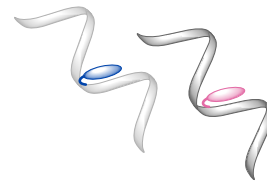
5.2 Spektroskopische Untersuchung und Charakterisierung der einfach modifizierten DNA

Die ausgewählten Cyanine lassen sich anhand der Emissionsfarben in zwei unterschiedliche Kategorien einteilen, den Donor- (Grün und Blau) und den Akzeptorfarbstoffen (Gelb und Rot). Demzufolge wurden sie an zwei verschiedene DNA-Einzelstränge gebunden, die ein späteres diagonales Arrangement zweier Farbstoffe zum Energietransferpaar erlauben. Abbildung 64 veranschaulicht die entsprechenden Nukleinsäure-Sequenzen der zueinander komplementären DNA-Einzelstränge **DNA1** und **DNA2** sowie der einfach modifizierten doppelsträngigen **DNA3** und **DNA4**.

DNA-Einzelstränge:

DNA1 3'– GCG-CTC-AA**X**-ATA-ATT-ATC-GG – 5'

DNA2 5'– CGC-GAG-TTA-**Y**AT-TAA-TAG-CC – 3'



DNA-Doppelstränge:

DNA 3'– GCG-CTC-AA [] –TA-ATT-ATC-GG – 5'
5'– CGC-GAG-TT [] –AT-TAA-TAG-CC – 3'

DNA3 [-**X**-A-]
[-A-T-]

DNA4 [-T-A-]
[-A-**Y**-]

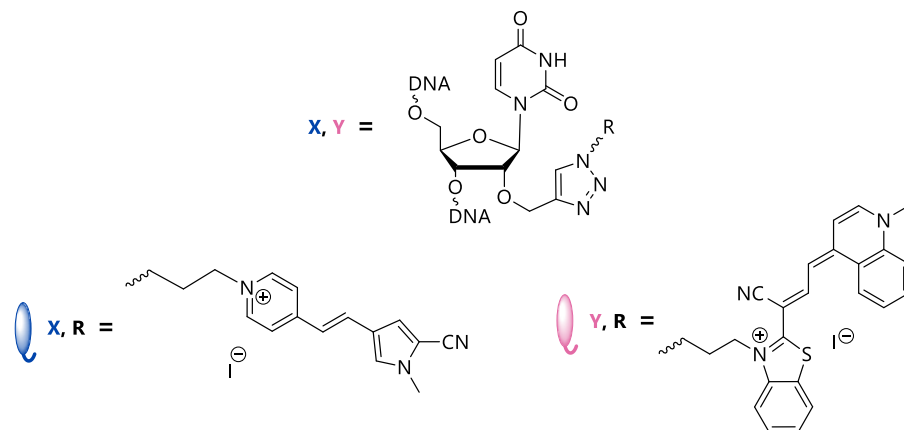


Abbildung 64: Sequenzen von **DNA1** bis **DNA4**. **X** repräsentiert Donor- und **Y** Akzeptorfarbstoffe. Exemplarisch ist die Verknüpfung des Donors **Blau-1m** bzw. des Akzeptors **TR-CN** gezeigt.

Neben den 11 neu entwickelten Cyaninfarbstoffen wurde auch **CyIQ** kovalent an DNA gebunden und parallel zu Vergleichszwecken ebenfalls untersucht.

Der Einzelstrang **DNA1** wurde ausschließlich kovalent mit Donorfärbstoffen modifiziert, dementsprechend wurden die Akzeptorfärbstoffe postsynthetisch an **DNA2** gebunden. Bei der im Folgenden verwendeten Notation werden die verbundenen Cyanine anhand ihrer tiefgestellten Bezeichnung dem jeweiligen Oligonukleotid zugeordnet. Beispielsweise entspricht **DNA1_{Blau-1m}** dem DNA-Einzelstrang **DNA1** mit der Modifikation des Donorfärbstoffes **Blau-1m**.

Absorptions- und Fluoreszenzspektren

In diesem Teilabschnitt werden vergleichbare photophysikalische Eigenschaften der Fluorophore anhand der entsprechenden Absorptions- sowie Emissionsspektren einzelsträngiger (ssDNA) als auch doppelsträngiger DNA (dsDNA) herausgearbeitet. Bei dieser Gegenüberstellung wird die gesonderte Position von **TR-CN** als einzigem kovalent verknüpften Trimethincyanin überaus deutlich. Im Hinblick auf eine prägnante Darstellung spektroskopischer Fakten wird die Diskussion auf einige Beispiele beschränkt. Sämtliche Spektren sind selbstverständlich Kapitel 8.5 entnehmbar.

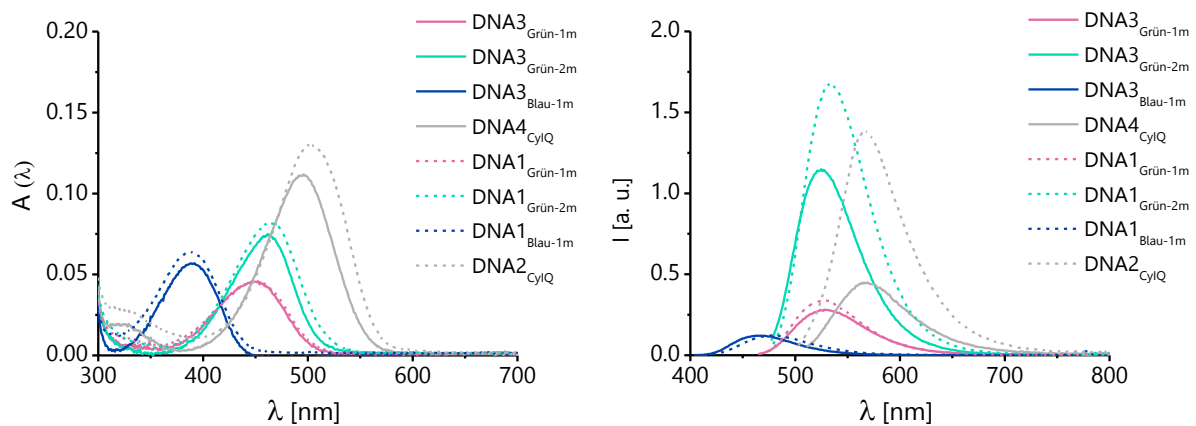


Abbildung 65: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA1**) und DNA-Doppelstränge (**DNA3**) der Donorfärbstoffe **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Blau-1m** sowie der Vergleich zum Referenzfluorophor **CyIQ** (**DNA2** und **DNA4**).

Die Spektren in Abbildung 65 wurden von den Oligonukleotiden **DNA1** und **DNA3** aufgezeichnet, die eine Fluorophorausstattung mit einem der Donorfarbstoffe **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Blau-1m** besitzen. Überdies hinaus ist das Spektrum des kovalent an **DNA2** bzw. **DNA4** gebundenen Referenzfluorophors **CylQ** gezeigt und dient in den Darstellungen als das Bezugschromophor. Allgemein zeigen alle Styryl-Farbstoffe eine Abnahme ihrer Extinktion und auch der Emissionsintensität von der entsprechenden ssDNA zum einfach modifizierten Duplex. Dieser löschende Effekt ist bei Styrylcyaninen sehr häufig zu beobachten und basiert auf der verstärkten Interaktion zwischen dem Fluorophor und den Nukleobasen der doppelsträngigen DNA. Der Farbstoff vermag in der ssDNA diesen Wechselwirkungen effektiver zu entgehen, da ein DNA-Einzelstrang keiner definierten übergeordneten Struktur folgt. Diese flexible Konformation ist im helikalen Konstrukt der dsDNA nicht gegeben und bewirkt folglich eine Steigerung intermolekularer Wechselwirkungen, die letztendlich in geminderten Werten der Extinktion sowie der Fluoreszenzintensität münden. Aus photophysikalischer Sicht lässt sich dieser Sachverhalt bei genauerer Betrachtung eventuell stattfindender Abläufe erläutern. In der DNA-Doppelhelix ist es möglich, dass aufgrund der konformellen Einschränkungen ein gebundenes Chromophor weitaus häufiger den auftretenden intermolekularen Kollisionen ausgesetzt ist als in der beliebigen Anordnung eines Einzelstranges. Eventuell könnten derartige Konfrontationen mit benachbarten Moleküleinheiten bei einem Fluorophor im angeregten Zustand dafür sorgen, dass es seine Energie abgibt, und es damit auf diesem Wege rasch zurück in seinen Grundzustand gelangt. Da solch fluoreszenzlöschende Molekülstöße in ssDNA deutlich seltener auftreten, resultiert die gemessene Fluoreszenzintensität in einem signifikant höheren Wert. Eine Möglichkeit, diese verstärkten molekularen Konfrontationen zu mindern, besteht aus synthetischem Blickwinkel in der Variation der verknüpfenden Linkereinheit sowie in der Natur des verbundenen Zuckerrestes. Derart unterschiedliche Auswirkungen der strukturellen Fluorophorumgebung gestatten beispielsweise eine RNA- oder DNA-Spezifität mancher Chromophore. Wenn man zugleich die Spektren der folgenden beiden Abbildungen hinzuzieht, fallen zwei Tatsachen ins Auge. Einmal tritt der löschende Effekt einzig im strukturell stark abweichenden **TR-CN** nicht auf. Zweitens ist die Intensitätsminderung bei den gelben Styryl-Farbstoffen, also den Cyaninstrukturen mit 2-verknüpfter Brücke, besonders ausgeprägt. In der Literatur wird für CylQ eine

Intensitätsverringering um den Faktor 2.4 beschrieben.^[123] Interessanterweise zeigen die rot- oder grün-fluoreszierenden Styryl-Derivate geringere Intensitätsverluste. Im Kapitel 8.5 ist eine Übersicht aller spektroskopisch ermittelten Daten der ssDNA und dsDNA in Form von Tabelle 16 gegeben. Darunter befindet sich auch ein Parameter, der die Fluoreszenzintensität doppelsträngiger DNA als prozentualen Anteil der Intensität vom Einzelstrang angibt. Der Trend der Intensitätsverringering lässt sich am besten anhand der Abbildung 68 erkennen.

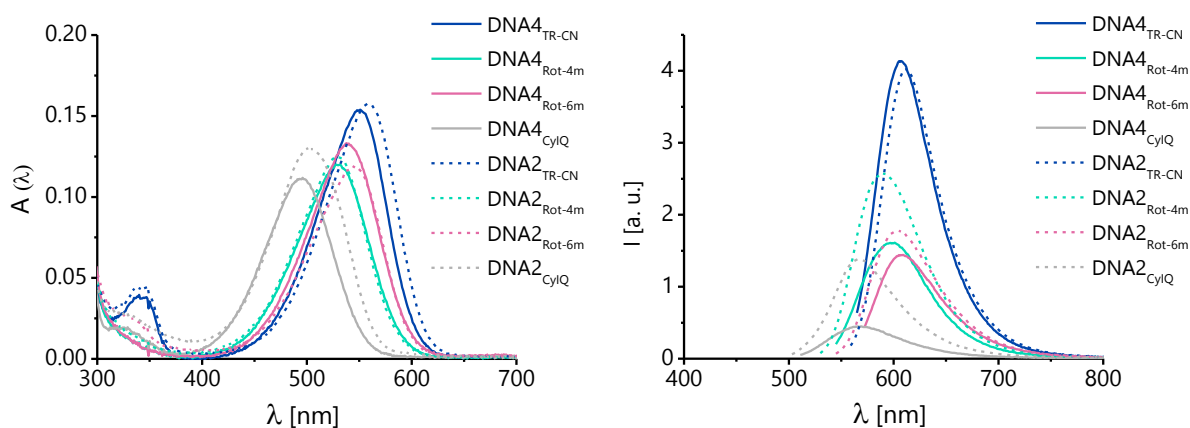


Abbildung 66: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA2**) und DNA-Doppelstränge (**DNA4**) der Akzeptorfarbstoffe **TR-CN**, **Rot-4m** und **Rot-6m** sowie der Vergleich zum Referenzfluorophor **CylQ**.

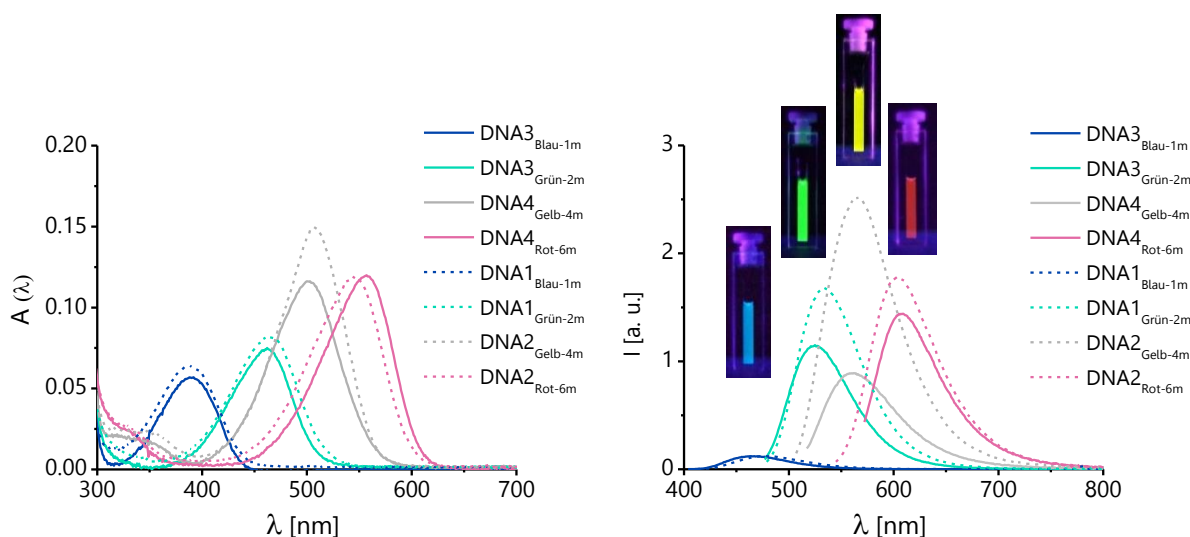


Abbildung 67: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA1** und **DNA2**) und DNA-Doppelstränge (**DNA3** und **DNA4**) der exemplarischen Donor- (**Blau-1m**, **Grün-2m**) und Akzeptorfarbstoffe (**Gelb-4m**, **Rot-6m**).

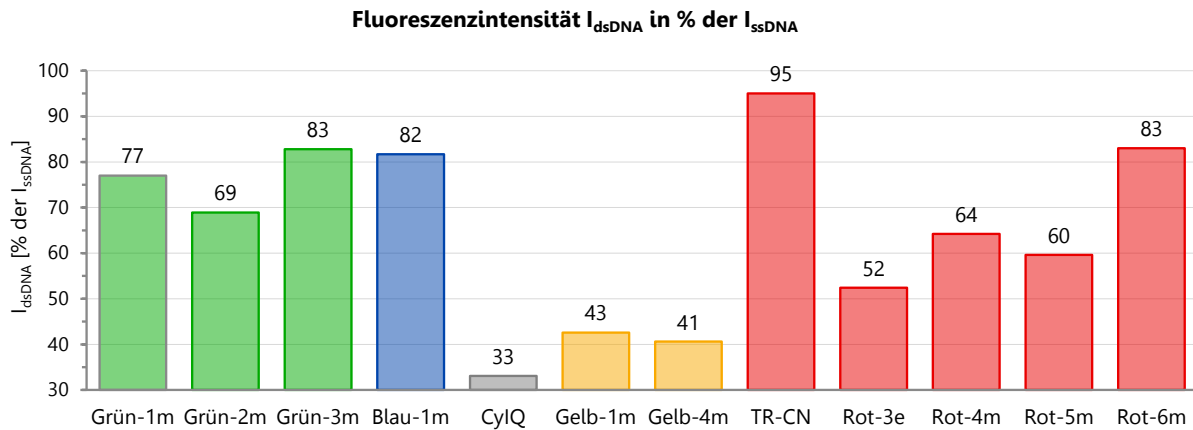


Abbildung 68: Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensität doppelsträngiger DNA als prozentualer Anteil der Intensität vom Einzelstrang.

Bei Betrachtung der graphischen Gegenüberstellung (Abbildung 68) wird ersichtlich, dass kleinere (**Blau-1m** sowie die grünen Emitter) und zugleich besonders voluminöse (**Rot-6m**) Fluorophorderivate der Intensitätsabschwächung zum größten Teil entgehen können. Die Erklärung bei den kleineren Cyaninen, wie z. B. **Blau-1m** liegt in ihrer geringen räumlichen Ausdehnung und folglich höherer Bewegungsfreiheit am helikalen Gerüst der dsDNA, was **Blau-1m** gestattet intensiveren WW mit den Basen aus dem Weg zu gehen. Bei dem voluminösen **Rot-6m** lässt sich die gemessene Intensität dadurch erklären, dass seine Molekülausdehnung vergleichsweise so groß ist, dass es in den engen Furchen der Helix bei weitem nicht so tief eindringen kann wie die anderen Styrylderivate und somit kaum an die Nukleobasen gelangt. Infolgedessen sind die Basen-Cyanin-Interaktionen ebenfalls signifikant unterbunden. Die Brückenanbindungsstelle der gelben Styryl-Farbstoffe scheint eine strukturelle Gegebenheit zu repräsentieren, die löschende Interaktionen mit den Basen des Doppelstranges begünstigt. Im Gegensatz dazu zeigt die 4-Verknüpfung bereits einen um 20 % gedrosselten Intensitätsabfall.

Zusätzlich führt die bereits oben erwähnte Tabelle 16 die genauen Werte der Absorptions- und Emissionsmaxima, der Fluoreszenz-Quantenausbeute und der Schmelztemperaturen (T_m) von den einfach modifizierten Doppelsträngen auf. Die T_m von **DNA6** (siehe Abbildung 74), der einer vollkommen unmodifizierten dsDNA entspricht, liegt bei 64.5 °C. Die Schmelztemperaturen sämtlicher einfach modifizierten dsDNA variieren lediglich um 2 °C, was eher der Messungenauigkeit zuzuschreiben ist,

als einem Effekt, den die Farbstoffanbindung hervorruft. Dies ist ein ausgesprochen erfreuliches Ergebnis, da es bedeutet, dass eine kovalente Cyaninverknüpfung die Basenpaarungen im Oligonukleotid in keinsten Weise stört; eine anwendungsorientierte Eigenschaft, die innovative Nukleinsäure-Fluoreszenzsonden besonders attraktiv für die heutige chemisch-biologische Forschung macht.

Gegenüberstellung der Fluoreszenz-Quantenausbeuten

In der nachfolgenden tabellarischen Übersicht sind die Fluoreszenz-Quantenausbeuten der Cyaninfarbstoffe unter Anlagerung an **DNA0** denjenigen Quantenausbeuten gegenübergestellt, die in kovalent gebundenen Konjugaten fluorophor-markierter ssDNA sowie dsDNA bestimmt wurden (Tabelle 3). Zu Vergleichszwecken sind die Daten von **TO**- bzw. **TR**-modifizierten DNA-Strängen (mit abweichender Nukleinsäure-Sequenz) ebenfalls in der Tabelle 3 zu finden.

Der direkte Vergleich aller Styryl-Farbstoffe spiegelt die Abnahme der Emissionsintensität von ssDNA zum einfach modifizierten Doppelstrang anhand ihrer analog differierenden Quantenausbeuten wider. Im obigen Abschnitt wurde bereits ausführlich die Ursache dieses Unterschiedes der ermittelten Werte erläutert.

Im Folgenden soll sich die Aufmerksamkeit jedoch hauptsächlich der Gegenüberstellung von Quantenausbeuten durch Anlagerung an **DNA0** und denen der kovalent gebundenen Cyaninfarbstoffe in einfach modifizierter ssDNA widmen. Der allgemeine Trend weist hier auf eine enorme Quantenausbeuten-Erhöhung hin, die im Zuge der Verknüpfung des Chromophors mit dem Oligonukleotid erreicht wird. In welchem Ausmaß diese Steigerung erfolgt, ist maßgeblich von der Farbstoffstruktur abhängig. In Abbildung 69 wird die Zunahme der Werte von den Quantenausbeuten anschaulich an exemplarischen Farbstoffen gezeigt. In der Graphik sind die jeweiligen Erhöhungen anhand eines Anstiegsfaktors f verdeutlicht, der den Quotient aus ssDNA-Wert und dem korrespondierendem angelagerten Wert der Quantenausbeuten berechnet wurde.

Farbstoff	Fluoreszenz-Quantenausbeute ϕ_f [%]		
	Anlagerung an DNA0	ssDNA	dsDNA
Blau-1m	1.0	5.2	4.6
Grün-1	1.2	-	-
Grün-1m	2.4	9.8	9.4
Grün-2	1.9	-	-
Grün-2m	4.6	36.2	28.3
Grün-3	2.3	-	-
Grün-3m	4.1	10.2	8.9
Grün-4	5.8	-	-
Grün-4m	13.7	-	-
TO	16.5	16.8	
CylQ	4.4	25.5	10.9
Gelb-1m	6.6	40.4	20.4
Gelb-2	17.0	-	-
Gelb-3	1.5	-	-
Gelb-4	5.7	-	-
Gelb-4m	5.8	47.1	21.2
TR-CN	32.9	59.9	66.8
Rot-1	35.5	-	-
Rot-2e	6.1	-	-
Rot-3e	12.5	57.2	35.8
Rot-4	12.8	-	-
Rot-4m	17.6	51.2	33.2
Rot-5	12.7	-	-
Rot-5m	15.3	43.7	26.1
Rot-6	5.2	-	-
Rot-6m	18.8	39.0	31.9
Rot-7m	3.6	-	-
TR	11.6	26.2	-

Tabelle 3: Fluoreszenz-Quantenausbeuten der Cyaninfarbstoffe. Vergleich der Werte durch Anlagerung an **DNA0** und kovalent gebunden in einfach modifizierter ssDNA sowie dsDNA.

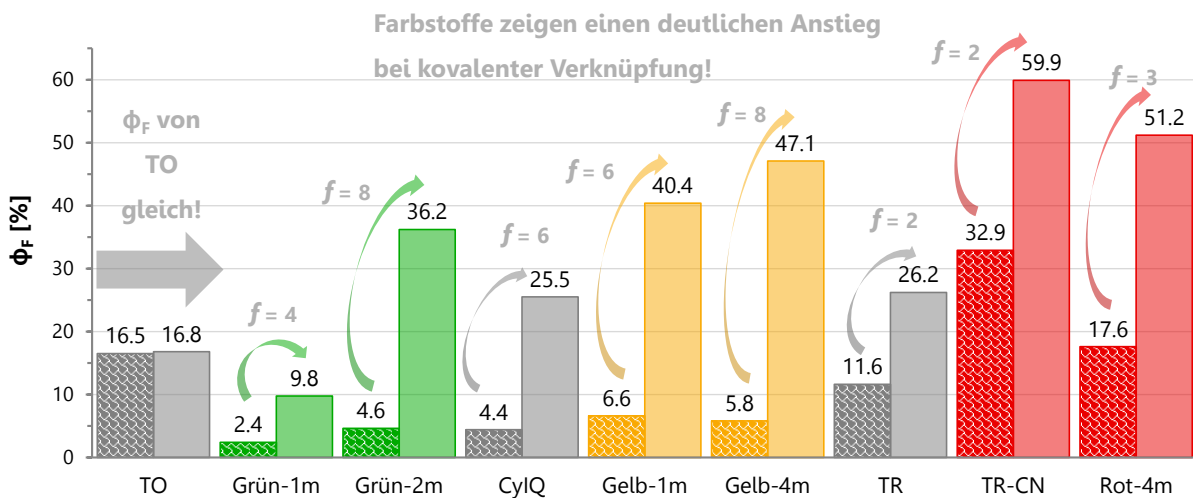
Gegenüberstellung der Quantenausbeute ϕ_F - Anlagerung vs. ssDNA

Abbildung 69: Graphische Analyse exemplarischer Quantenausbeuten von Chromophor-Anlagerung an **DNA0** und denen der kovalent gebundenen Cyaninfarbstoffe in einfach modifizierter ssDNA.

Die beiden Trimethincyanine **TR** und **TR-CN** weisen einen Anstiegsfaktor f von 2 auf. Die Quantenausbeute vom Styryl-Farbstoff **Rot-4m** steigt um das Dreifache an. Diese Quantenausbeuten-Erhöhungen sind bereits signifikant. Doch sie „verblasen“ angesichts der Anstiegsfaktoren von den Styryl-Farbstoffen mit gelber oder grüner Emissionsfarbe. Diese liegen im Mittel bei ungefähr 6 und „katapultieren“ demzufolge die Chromophor-Quantenausbeuten in außerordentlich hohe Wertebereiche.

Eine ganz spezielle Ausnahme stellt das Referenzfluorophor **TO** dar. Seine beiden Quantenausbeuten vor und bzw. nach Anbindung an DNA sind zueinander vollkommen äquivalent. Im Kapitel 4.3 bei den durchgeführten Fluoreszenztitrationen wurde schon auf einen vermutlich grundsätzlich verschiedenen Bindungsmechanismus des Monomethinfarbstoffes **TO** hingewiesen. Dieser Verdacht wird aufgrund des dargestellten Sachverhaltes einer unveränderten Quantenausbeute bei dem kovalent gebundenen **TO**-DNA-Konjugat eindeutig bestärkt.

Erst an diesem Punkt zeigt sich die „wahre“ Leuchtkraft der grünen Emittier im Vergleich zur Referenz **TO**. Zuvor schienen die grünen Styryl-Derivate das Modellfluorophor **TO** ausschließlich im Hinblick auf die Photostabilität zu übertrumpfen. Nun wird jedoch ihr tatsächliches fluoreszentes Potential erkennbar. Besonders der Cyaninfarbstoff **Grün-**

2m lässt den Wert der Quantenausbeute von **TO** verblässen und übersteigt diesen um mehr als das Doppelte.

Der Teil des vorliegenden Kapitels, der sich mit den spektroskopischen Eigenschaften der kovalent an DNA gebundenen Fluorophore beschäftigt, ist an dieser Stelle beendet. Abschließend präsentiert Abbildung 70 die eindrucksvollen Fluoreszenzfarben der 11 ausgewählten Cyaninfarbstoffe anhand von Photographien ihrer DNA-Einzelstränge.

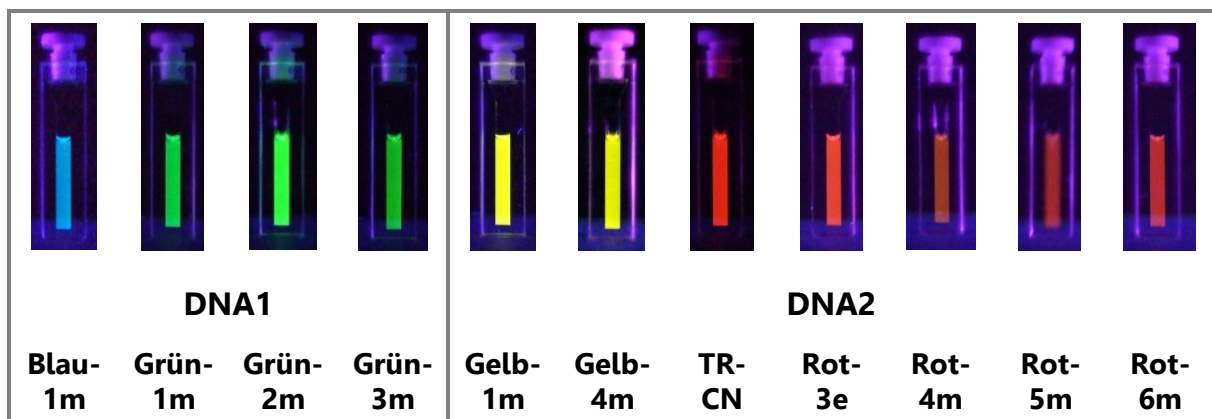


Abbildung 70: Emissionsfarben der DNA-Einzelstränge der 11 ausgewählten Cyaninfarbstoffe.

Energietransferpaare und Überlappungsintegrale

Mit der Intention, die neuen photostabilen Cyanine in wellenlängenverschiebenden Nukleinsäure-Sonden einzusetzen, ist eine gut durchdachte Zusammenstellung der Chromophore zu Energietransferpaaren ein besonders wichtiger Schritt. Zur Identifizierung der geeigneten Donor-Akzeptor-Kombinationen und zugleich zur Erfassung ihrer jeweiligen optimalen Anregungswellenlängen wurden anfangs die Absorptionsspektren der dsDNA der vier Donoren (an **DNA3**) mit denen aller Akzeptoren (an **DNA4**) paarweise einander gegenübergestellt und verglichen. Besonderes Augenmerk wurde bei den Absorptionsspektren kombinierter Paare auf die Bereiche gelegt, die eine Überschneidung der Extinktionen beider Chromophor-

Partner aufwiesen. An ET-Paare wird die Anforderung gestellt, dass jeder der beiden Farbstoffe unabhängig vom anderen angeregt werden kann. Nur anhand dieser Bedingung sind eindeutige Resultate in chemisch-biologischen Untersuchungen realisierbar. Würde man einen Chromophor mit einer Wellenlänge anregen, bei der der Partner-Farbstoff ebenfalls absorbiert, bekäme man schwer auswertbare Untersuchungsergebnisse. Der Hauptgrund hierfür liegt klar auf der Hand. Bei einer parallelen Fluorophoranregung tritt natürlich auch eine gleichzeitige Fluoreszenz der beiden verknüpften Chromophore auf. Im schlimmsten Fall kann dies zu einer gleichen Emissionsintensität beider Farbstoffe einer Fluoreszenz-Sonde führen und sie damit für bioanalytische Zwecke unbrauchbar machen. In der folgenden Abbildung sind beispielhaft die übereinandergelegten Absorptionsspektren des Donor-Akzeptor-Paares **Grün-1m** und **TR-CN** gezeigt.

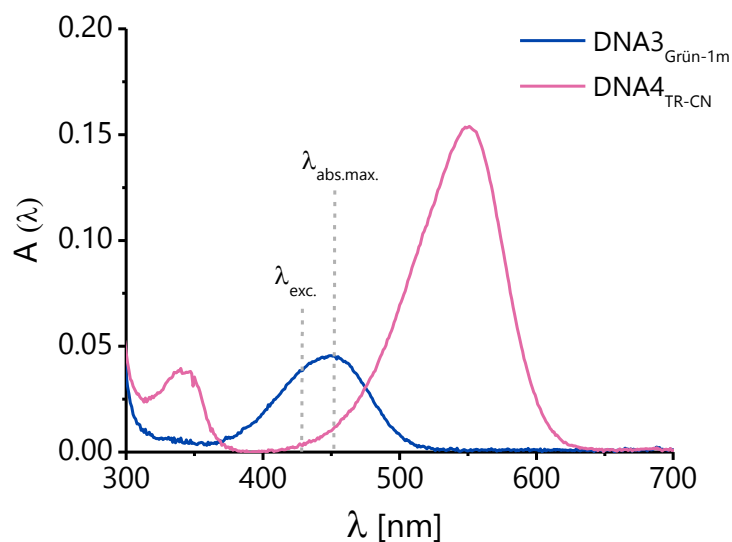


Abbildung 71: Absorptionsspektren des Donor-Akzeptor-Paares **Grün-1m** und **TR-CN**. Das Absorptionsmaximum des Donors sowie die verwendete Anregungswellenlänge in dieser Farbstoffkonstellation sind anhand der gestrichelten grauen Linien hervorgehoben.

Bei einer Anregung des Donors **Grün-1m** bei seinem Absorptionsmaximum (451 nm) in dem ET-Paar mit **TR-CN** würde gleichzeitig der Akzeptor zu gewissem Anteil ebenfalls angeregt werden. Um dies zu unterbinden, wurde bei spektroskopischen Messungen dieses Paares eine Anregungswellenlänge von 430 nm gewählt, da hier

kaum eine Absorption von **TR-CN** auftritt. Eine analoge Betrachtung wurde bei allen zusammengestellten ET-Paaren vorgenommen.

Aus biologischer Sicht befindet sich eine optimale Wellenlänge zur Farbstoffanregung zwischen 450 nm und 900 nm. Deutlich kleinere Wellenlängen als 450 nm (UV-Bereich) können nur oberflächlich in lebendes Gewebe eindringen, und bei diesen Wellenlängen tritt verstärkt die Autofluoreszenz der Zellbestandteile auf und würde bei Messungen stören. Eine solche Fluoreszenz-Sonde ermöglicht deshalb nur einen Bruchteil der angestrebten Nukleinsäureforschung. Ist hingegen die Wellenlänge zur Chromophoranregung in einem Bereich des Lichtspektrums, der weit über die 900 nm-Grenze hinaus geht (IR) kann dies für Forschungen auf biologischer Basis ebenfalls gewisse Folgen haben. IR-Strahlung, also die Strahlung des infraroten Lichtspektrums, sorgt bei steigender Wellenlänge simultan für eine wachsende Erwärmung des lebenden Gewebes. An diesem Punkt sei festzuhalten, dass eine Anregung aller entwickelten Cyaninfarbstoffe im sichtbaren Bereich des Lichtes bei 380 bis 780 nm stattfindet und sich deren Emission ebenfalls darin befindet. Es werden damit knapp die optimalen biologischen Bedingungen erreicht.

Im folgenden Abschnitt werden die spektroskopischen Eigenschaften aller gebildeten Energietransferpaare besprochen. Dabei wurden alle vier Donorfarbstoffe jeweils mit den Akzeptorfluorophoren **TR-CN**, **Rot-4m**, **Rot-5m** und **Rot-6m** kombiniert. Die spektralen Gegebenheiten des Donors **Blau-1m** erlauben darüber hinaus noch ein ET-Paarbildung mit **Rot-3e** und den beiden gelben Emittern **Gelb-1m** und **Gelb-4m**. Eine wichtige Größe zur Berechnung der ET-Effizienz der Paare stellt das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ dar. Es beschreibt die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Umso größer diese spektrale Überlappung ist, umso besser kann ein Energietransfer zwischen den beiden Chromophoren erfolgen. Der Betrag des Überlappungsintegrals eines ET-Paares kann mittels beider auf eins normierter Spektren berechnet werden. In Abbildung 72 ist exemplarisch das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ des Paares **Gelb-1m** und **Rot-5m** gezeigt. Die Überlappung wird durch die grau-gefärbte Fläche angezeigt. Alle weiteren Überlappungsintegrale sind in Kapitel 8.5 zusammengestellt. Die entsprechenden Beträge von $J(\lambda)$ werden in der Übersichtstabelle des nächsten Kapitels wiedergegeben. An dieser Stelle soll das Diagramm aus Abbildung 73 genügen, dass die

Größenordnung der Überlappungsintegrale aller Paare einander gegenüberstellt. Zu Vergleichszwecken ist der Wert des Chromophorenpaars **TO/TR** ebenfalls dargestellt.

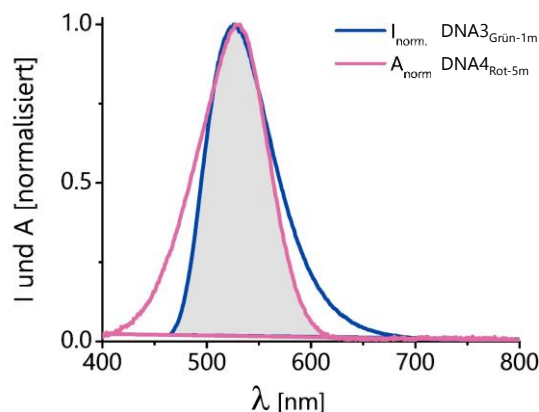


Abbildung 72: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrums der **DNA3Grün-1m** mit dem normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum in **DNA4Rot-5m**.

Überlappungsintegrale $J_{(\lambda)}$ der ET-Paare

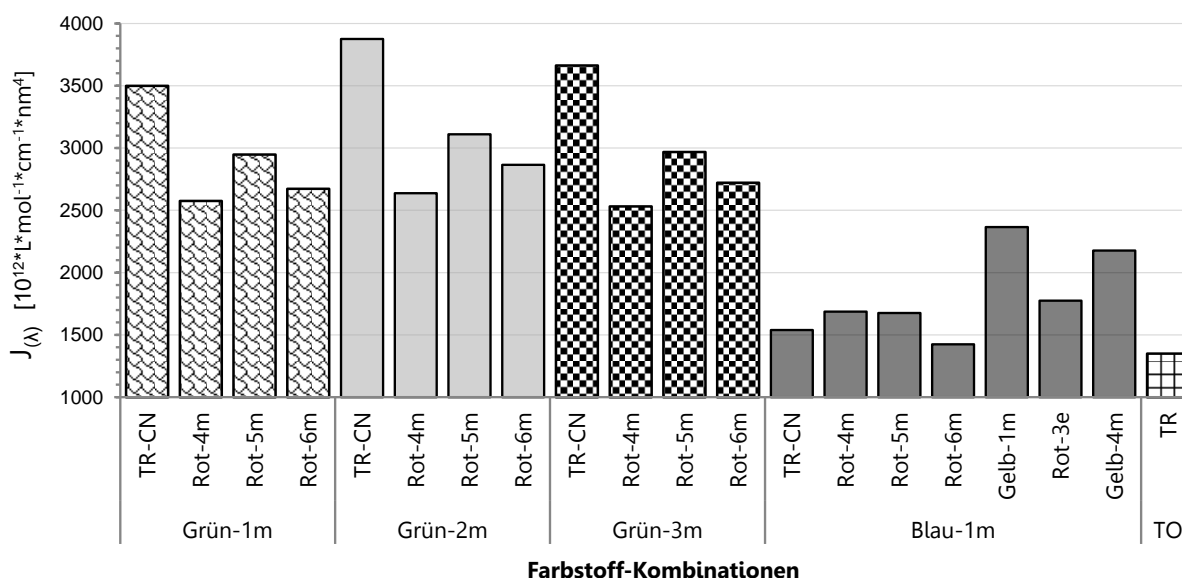


Abbildung 73: Gegenüberstellung der Überlappungsintegrale der gebildeten ET-Paare.

Man erkennt deutlich, dass die Beträge des Überlappungsintegrals der grün-rot-fluoreszierenden Paare das Referenzpaar **TO/TR** um mindestens Faktor 2 bis 3 überragen. Die blau-rot-Kombinationen bewegen sich im Bereich von **TO/TR** sind jedoch ebenfalls größer. Große Überlappungsintegrale in ET-Paaren gestatten einen entsprechend optimalen ET und damit auch ET-Effizienzen.

5.3 Spektroskopische Untersuchung und Charakterisierung der zweifach modifizierten DNA

Im vorangegangenen Abschnitt wurden die Cyaninfarbstoffe zu Energietransferpaaren zusammengestellt, deren spektroskopische Untersuchungen nachfolgend beschrieben werden. Bei der Hybridisierung von zwei zueinander komplementären DNA-Einzelsträngen wird eine chirale Doppelhelix gebildet. Die helikal angeordneten Nukleobasen führen zur Ausbildung von Furchen mit definierter Breite und Tiefe. Das Trimethincyanin **TR** sowie die meisten Styryl-Farbstoffe lagern sich bei kovalenter Verknüpfung mit einem Oligonukleotid bevorzugt in die kleine Furche der DNA-Helix an.^[195,196,198-200] Dies bezieht sich in erster Linie auf die rechtsgängige B-DNA, also der Form doppelsträngiger DNA, die überwiegend in lebenden Organismen vorliegt.^[201-206] Jedoch haben NMR-Studien mehrfach bewiesen, dass je nach Lösungsmittel, Ionenkonzentration oder der Anwesenheit von DNA-bindenden Molekülen wie z. B. Proteinen auch zu gewissem Anteil andere Konformationen der DNA-Helix unter physiologischen Bedingungen auftreten können. Dazu gehören vor allem die ebenfalls rechtshändige Form der A-DNA, die primär bei RNA-Strukturen nachgewiesen wurde,^[207-209] die linksgängige Z-DNA sowie die G-Quadruplexe humaner Telomere.^[210-213] Darüber hinaus kommen noch viele weitere strukturell dynamische DNA-Formen vor, die sich nach ihrer primären Ursache einteilen lassen. Bei derartigen Strukturodynamiken handelt es sich zum einen um spontane Fluktuationen, die sich durch leicht variierende Freie Enthalpien voneinander unterscheiden, oder um strukturelle Übergänge aufgrund von Wechselwirkungen mit DNA-bindenden Proteinen.^[211,214] In den letzten Jahren wurden im Zuge der DNA_Nanotechnologie noch zusätzliche zwei- und auch dreidimensionale DNA-Formen entwickelt, bei denen man sich die enorme Vielfältigkeit der möglichen Sequenzen sowie die Chiralität des Oligonukleotides zunutze macht.^[201,203,215-217]

Die spektroskopische Charakterisierung der Energietransferpaare erfolgte anhand **DNA5**, die den Duplex der beiden DNA-Einzelstränge **DNA1** und **DNA2** repräsentiert (Abbildung 74).

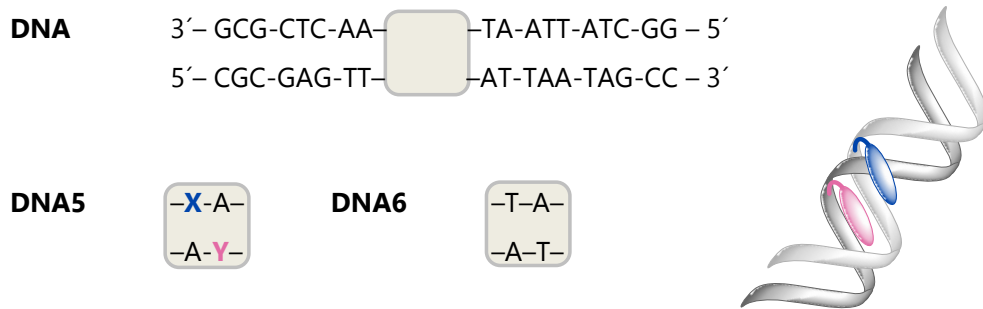


Abbildung 74: Sequenzen von **DNA5** und **DNA6**. **X** repräsentiert Donor- und **Y** Akzeptorfarbstoffe.

Aufgrund der helikalen Struktur von **DNA5** werden der Donor- und Akzeptorfarbstoff einander diagonal gegenüber angeordnet und gleichzeitig in räumliche Nähe zueinander gebracht. Durch die geringe Distanz zwischen den beiden Chromophoren wird ihnen die Möglichkeit zu einem Energietransfer (ET) eröffnet, der prinzipiell anhand von zwei verschiedenen Größen beurteilt werden kann. Es handelt sich dabei um die ET-Effizienz $E_{(r)}$ und den Kontrastfaktor f_{Kontrast} , der bei einem stattfindendem ET aus den Intensitäten der Donor- und Akzeptoremission berechnet werden kann. Mit der Absicht, diese Parameter zu erfassen, wurden von der doppelt modifizierten **DNA5** die Absorptions- und Fluoreszenzspektren aller zusammengestellten ET-Paare aufgezeichnet. Diese Spektren sind in ihrer Gesamtheit im Kapitel 8.6 dargestellt. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen exemplarisch die spektroskopischen Aufzeichnungen der drei Donorfarbstoffe **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Blau-1m** in ihrer Paarung mit dem Akzeptor **TR-CN** (Abbildung 75) und **Rot-6m** (Abbildung 76).

114

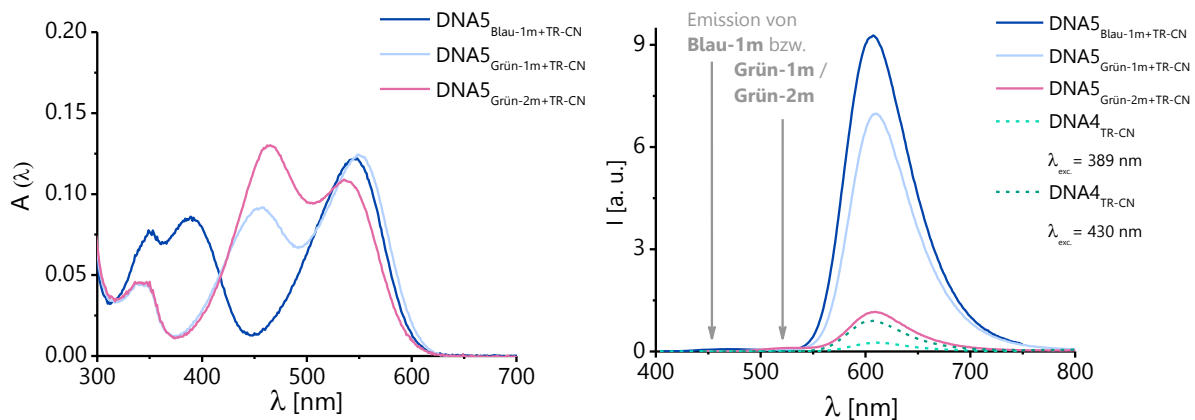


Abbildung 75: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der zweifach modifizierten **DNA5** mit dem Akzeptor **TR-CN** und den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Blau-1m**.

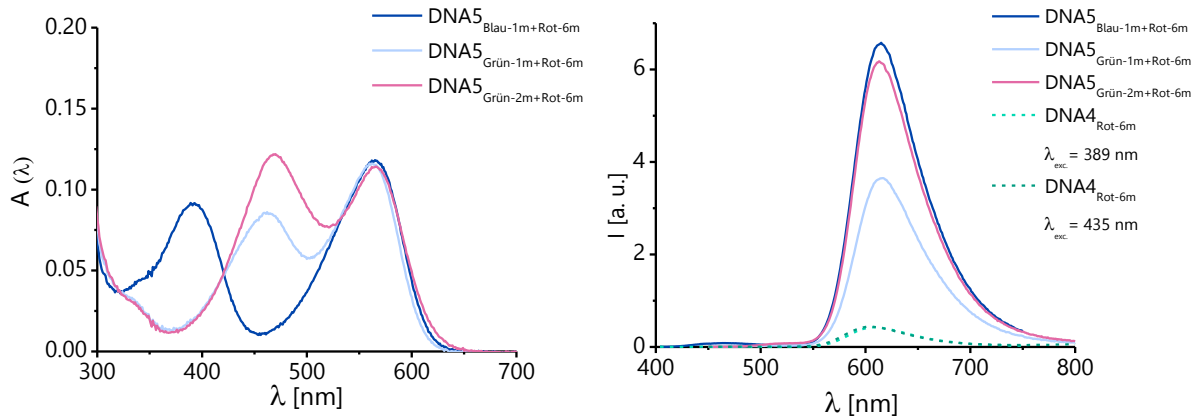


Abbildung 76: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der zweifach modifizierten **DNA5** mit dem Akzeptor **Rot-6m** und den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Blau-1m**.

Betrachtet man die Absorptionsspektren des Akzeptors **TR-CN** in Abbildung 75 genauer, wird auffällig, dass sein Absorptionsmaximum in der Paarung mit **Grün-2m** blauverschoben ist. Diese starke Abweichung von allen anderen Donor-**TR-CN**-Kombinationen gibt Anzeichen für besonders ausgeprägte excitonische Interaktionen zwischen den beiden Cyaninen **TR-CN** und **Grün-2m**, worauf an dieser Stelle kurz hingewiesen werden soll. Die gestrichelten Linien der Emissionsspektren repräsentieren den jeweiligen akzeptormodifizierten Doppelstrang **DNA4**, der bei der entsprechenden donorspezifischen Wellenlänge angeregt wurde. Dieser einfach modifizierte Duplex dient bei der Berechnung des Kontrastfaktor f_{Kontrast} der Korrektur des Faktors, um alle ET-Paare zu vergleichen. Der unkorrigierte Kontrastfaktor $f_{\text{Kontrast, uncorr.}}$ wird durch den Quotienten der Intensitäten der Donor- und Akzeptorfluoreszenz gebildet (Gleichung 5.1).

$f_{\text{Kontrast, uncorr.}}$:

$$f_{\text{Kontrast, uncorr.}} = \frac{I_{\text{Ak}}}{I_{\text{Do}}} \quad (5.1)$$

I_{Ak} : Fluoreszenzintensität des Akzeptors infolge des ETs vom angeregten Donor ($\lambda_{\text{exc.Do.}}$) im zweifach modifizierten Doppelstrang (**DNA5**)

I_{Do} : Fluoreszenzintensität des Donors im zweifach modifizierten Doppelstrang (**DNA5**) nach Anregung bei $\lambda_{\text{exc.Do.}}$.

Zur Berechnung des korrigierten Kontrastfaktors f_{Kontrast} gemäß dem folgenden Zusammenhang (Gleichung 5.2) wurde von dem Fluoreszenzintensitäts-Wert des Akzeptors im doppelt modifizierten **DNA5**-Duplex I_{Ak} die Fluoreszenzintensität abgezogen, die der Akzeptor im einfach modifizierten Duplex der **DNA4** bei Anregung mit der Donoranregungswellenlänge ($\lambda_{\text{exc.Do.}}$) aussendet (I_{DNA4}).

f_{Kontrast} :

$$f_{\text{Kontrast}} = \frac{(I_{\text{Ak}} - I_{\text{DNA4}})}{I_{\text{Do}}} \quad (5.2)$$

I_{DNA4} : Fluoreszenzintensität des Akzeptors im einfach modifizierten Doppelstrang (**DNA4**) infolge der Anregung bei der donorspezifischen Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{exc.Do.}}$).

Durch die Korrektur mittels I_{DNA4} erreicht man eine Vergleichbarkeit aller Kontrastfaktoren untereinander, unabhängig von der Kombination des Energietransferpaares. In erster Linie kann man anhand des korrigierten f_{Kontrast} zwischen der Fluoreszenzintensitätszunahme, die aus dem ET folgt und einer Intensitätssteigerung aufgrund gleichzeitiger Anregung von Donor und Akzeptor zuverlässig unterscheiden. Auf diese Weise berechnete Kontraste fallen in gewissem Maße kleiner aus als die Kontrastfaktoren unkorrigierter Berechnungen. Im alltäglichen Gebrauch der Fluoreszenzspektroskopie werden natürlich keinerlei Korrekturen vorgenommen, sondern das Kontrastverhältnis zwischen Donor- und Akzeptoremission direkt aus den jeweiligen aufgezeichneten Fluoreszenzintensitäten berechnet. Im Hinblick auf die Themenstellung dieser Arbeit steht jedoch eine Evaluation der neu entwickelten Energietransferpaare und verlangt somit nach dieser speziellen Auswertungsmethodik der spektroskopischen Daten. Wie man anhand der obigen Spektren sehen kann, werden durch den ET zwischen den Donor- und Akzeptorfarbstoffen außergewöhnliche hohe Farbkontraste erhalten. Die Emission der Donoren **Blau-1m** (bei 478 nm), **Grün-1m** und **Grün-2m** (jeweils bei 528 nm) sind innerhalb der Spektren kaum registrierbar.

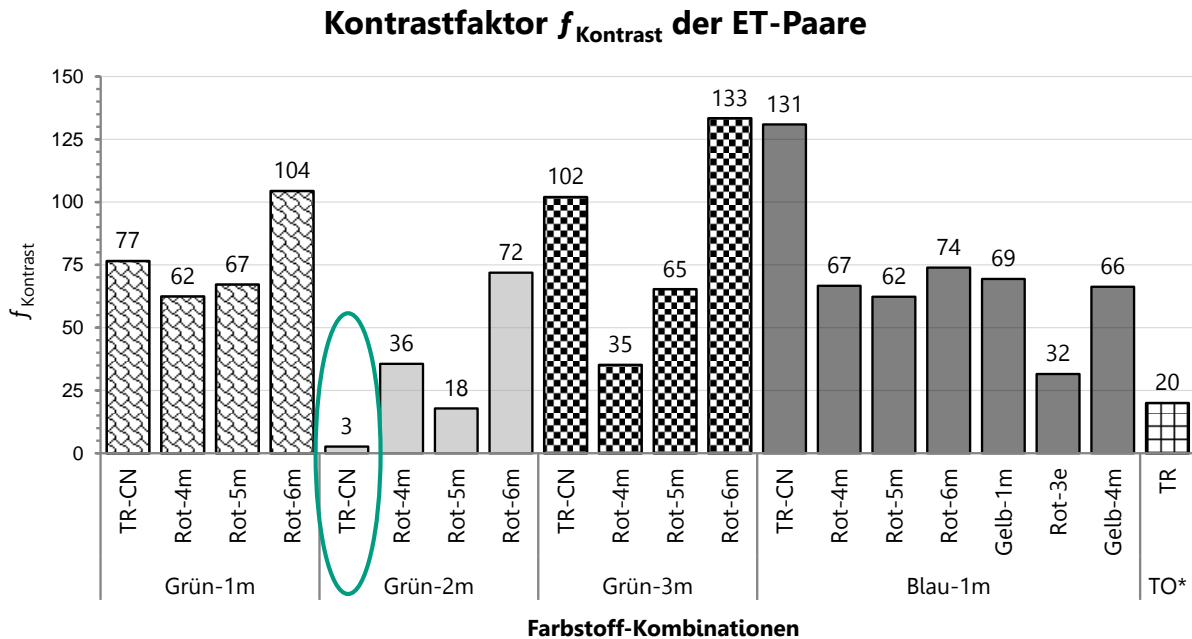


Abbildung 77: Gegenüberstellung der mittels Gleichung 5.2 erhaltenen Kontrastfaktoren f_{Kontrast} aus den Emissionsspektren der jeweilig doppelt modifizierten **DNA5**. Zum Vergleich ist das beste Kontrastverhältnis des Paares **TO*/TR** dargestellt. Der Zusatz „*“ symbolisiert, dass es sich bei dem Wert um einen unkorrigierten $f_{\text{Kontrast, unkor.}}$ handelt.

Die graphische Gegenüberstellung (Abbildung 77) aller zusammengestellten Paare spiegelt die hohen Kontrastverhältnisse wider. Die erhaltenen Kontrastfaktoren bewegen sich im Mittel zwischen 60 und 70. Einige Paare zeigen einen bemerkenswerten f_{Kontrast} von über 100. Zu Vergleichszwecken wurde das beste Kontrastverhältnis des Paares **TO*/TR** ebenfalls dargestellt. Die Notation „*“ des Paares symbolisiert, dass es sich bei dem Wert um einen unkorrigierten $f_{\text{Kontrast, unkor.}}$ handelt. Es wird deutlich, dass der Farbkontrast fast aller neuen ET-Paare den des Referenzpaares **TO*/TR** signifikant übertreffen. Eine auffällige Ausnahme bildet hierbei das ET-Paar aus **Grün-2m** und **TR-CN**, das einen Kontrastfaktor von 3 besitzt. Die Notwendigkeit der Korrektur des Kontrastes gestattet die genaue Betrachtung der Akzeptoremissionsintensität des Akzeptors **TR-CN** bei An- (**DNA5**) bzw. Abwesenheit des Donors (**DNA4**) **Grün-1m** bzw. **Grün-2m** (Abbildung 78).

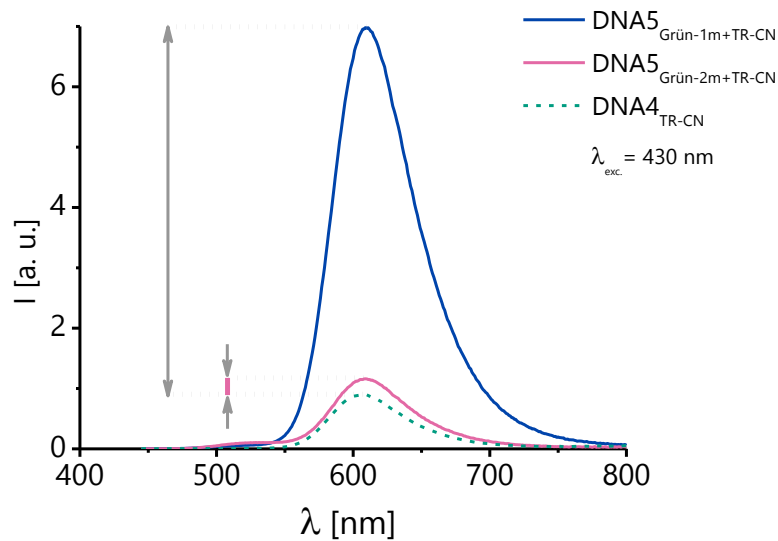


Abbildung 78: Fluoreszenzspektren des Akzeptors **TR-CN** bei An- (**DNA5**) bzw. Abwesenheit des Donors (**DNA4**) **Grün-1m** bzw. **Grün-2m**.

Im Zuge der Anregung des mit **TR-CN** einfach modifizierten Duplexes (**DNA4**) bei der donorspezifischen Wellenlänge von 430 nm ($\lambda_{\text{exc.Do.}}$) wird die Fluoreszenzintensität erhalten, die anhand der gestrichelten Linie gezeigt ist und entspricht bei der Kontrastfaktorberechnung der Komponente I_{DNA4} . Der effiziente Energietransfer von **Grün-1m** auf **TR-CN** ist in Abbildung 78 an der resultierenden großen Akzeptoremission deutlich sichtbar und besitzt einen Farbkontrast von 77. Hingegen erreicht die Fluoreszenzintensität von **TR-CN** in Kombination mit **Grün-2m** einen Wert, der nur geringfügig über der Intensität von **DNA4** liegt. Folglich wurde lediglich ein Kontrast von 3 gemessen. Würde man nun streng nach den Regeln einen unkorrigierten Kontrastfaktor berechnen, so erhielte man einen augenscheinlich Kontrastwert von $f_{\text{Kontrast, unkor.}} = 11$, der fast viermal größer ist und somit einen Wert repräsentiert, der zwar geringer als die anderen ist, aber sich dennoch in einem akzeptablen Rahmen bewegen würde. Der Farbkontrast von 3 gibt hingegen unmissverständlich wieder, dass ein Energietransfer vom Donor **Grün-2m** zum Akzeptor **TR-CN** im vorliegenden Fall definitiv keine wesentliche Steigerung der Emissionsintensität des Akzeptors hervorruft. Die gleichzeitig auftretende starke Fluoreszenzlösung des Donors **Grün-2m** ist ein Anzeichen für einen anderen energieübertragenden Prozess, der in dieser Konstellation der Fluorophore auftritt. Abgesehen von dem speziellen ET-Paar zeigen alle weiteren Kontrastfaktoren ein

äußerst positives Resultat im Hinblick auf die gestellte Aufgabe der vorliegenden Dissertation. In Kapitel 8.6 ist eine Übersichtstabelle aller spektroskopischen Daten zweifach modifizierter **DNA5** gezeigt. Die Tabelle auf der folgenden Seite gibt von dieser Übersicht einen repräsentativen Ausschnitt wieder. Von den doppelt modifizierten Duplexen wurden auch die Schmelztemperaturen (T_m) bestimmt, liegen in einem Intervall von 65 bis 67 °C und sind vergleichbar mit dem T_m -Wert des vollständig unmodifizierten Doppelstranges **DNA6**. Auf die Vorteile eines dermaßen geringen Einflusses der Farbstoffanbindung an das Oligonukleotid wurde bereits bei den einfach modifizierten Duplexen eingegangen. An dieser Stelle soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass einzig der Doppelstrang **DNA5_{Grün-2m+TR-CN}** einen merklich höheren T_m -Wert von 68.5 °C besitzt, was ein weiterer Indikator dafür ist, dass stärkere Wechselwirkungen in dieser Farbstoffzusammenstellung auftreten.

Die Größe λ_{appa} entspricht der augenscheinlichen (*apparent*) Stokes-Verschiebung einer Farbstoffkombination und bezieht sich auf die spektrale Distanz zwischen der Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{exc.Do}}$) des jeweiligen ET-Paares und der Emissionswellenlänge des entsprechenden Akzeptors ($\lambda_{\text{em.Ak}}$). Diese Wellenlängenverschiebung beläuft sich bei dem Modell-ET-Paar **TO / TR** auf 180 nm und stellt eines seiner herausragenden Attribute dar. Sämtliche Kombinationen der neuen ET-Paare zeigen ebenfalls einen Wert von λ_{appa} um die 180 nm und stehen somit den Referenzfluorophoren in nichts nach. Bei der Farbkombination Blau-Rot werden größere Distanzen im Bereich von λ_{appa} = 220 bis 250 nm erhalten.

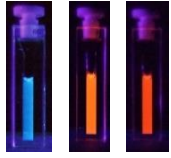
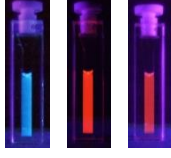
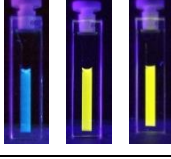
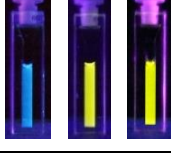
ET-Paar in DNA5	$\lambda_{\text{exc.Do.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.Ak.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{appa.}}$ [nm]	f_{Kontrast}	T_m [°C]	Do / Paar / Ak DNA3 / 5 / 4
Blau-1m +TR-CN	389	607	218	131 (135)	66.7	
Blau-1m +Rot-6m	389	615	226	74 (79)	65.6	
Blau-1m +Gelb-1m	391	572	181	69 (72)	65.3	
Blau-1m +Gelb-4m	391	566	175	66 (69)	65.3	

Tabelle 4: Repräsentative Übersicht der ermittelten spektroskopischen Daten der doppelt modifizierten **DNA5** mit dem Donor **Blau-1m** und den Akzeptoren **TR-CN**, **Rot-6m**, **Gelb-1m** und **Gelb-4m**. Zum Vergleich sind die unkorrigierten Kontrastfaktoren in Klammern hinter den korrigierten Werten angegeben.

Nachfolgend ist der Farbwechsel der Fluoreszenzfarben an dem Paar **Grün-1m** und **TR-CN** veranschaulicht, wobei am Startpunkt ausschließlich **DNA1_{Grün-1m}** vorliegt. Die sukzessive Zugabe von **DNA2_{TR-CN}** resultiert in der Bildung des Doppelstranges **DNA5**.

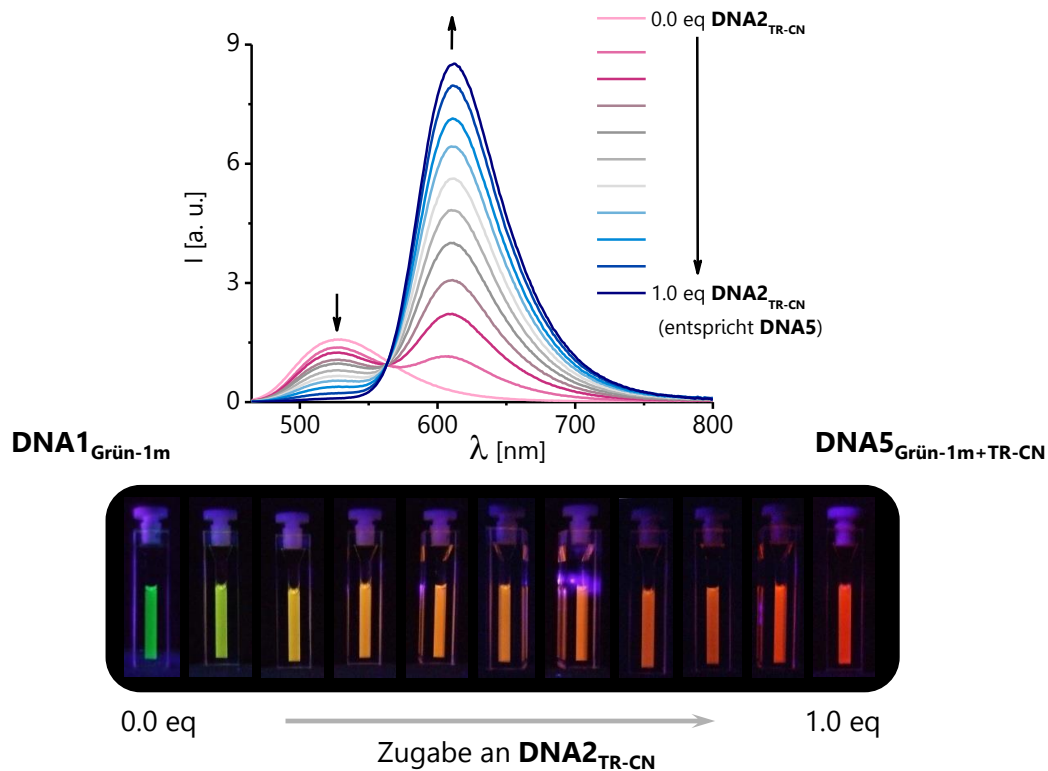


Abbildung 79: Änderung der Fluoreszenzfarbe von $\text{DNA1}_{\text{Grün-1m}}$ bei steigender der Zugabe von $\text{DNA2}_{\text{TR-CN}}$.

Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten und der Energietransfer-Effizienzen

Im diesen Abschnitt wird die Bestimmung der Energietransfer-Effizienzen erläutert, die den zweiten essentiellen Parameter von leistungsstarken ET-Paaren darstellt. Mit Hilfe der ET-Effizienz kann man Rückschlüsse auf den Chromophor-Abstand zwischen Donor und Akzeptor ziehen, eine Tatsache, die für Abstandsmessungen in dem Gebiet der biochemischen Forschung von ganz besonderer Bedeutung ist. Die Bestimmung der ET-Effizienz basiert auf den gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten des Donorfarbstoffes in Abwesenheit (**DNA3**) und in Anwesenheit des Akzeptorfluorophors (**DNA5**). Der rechnerische Zusammenhang von Fluoreszenzlebenszeit und Energietransfer-Effizienz wurde bereits anhand der Gleichung 3.9 (Kapitel 3.1) gezeigt. Gewöhnlich bewegt sich die Fluoreszenzlebenszeit eines kovalent an DNA gebundenen Cyaninfarbstoffes um 1 bis 8 ns.^[42,45,46,123,128,199,218-222] Die grün-fluoreszierenden Donoren der neuen Farbstoffe besitzen einen der Literatur entsprechenden Wert von 4.3 ns (**DNA3**). Der

Styryl-Farbstoff **Blau-1m** bildet auch hier mit einer kleineren Fluoreszenzlebenszeit von $\tau_{D0} = 2.5 \text{ ns}$ eine Ausnahme der Donoren. Enthält der DNA-Doppelstrang neben dem Donor- auch ein Akzeptorfluorophor, so kann ein erfolgter ET aufgrund einer signifikant verkürzten Fluoreszenzlebenszeit des Donors registriert werden. Bei Anwesenheit des Akzeptors wird dem elektronisch angeregten Donormolekül auf Basis eines Energietransfers eine zusätzliche Möglichkeit gegeben, in den Grundzustand zurückzukehren. Dementsprechend verkürzt sich dessen Fluoreszenzlebenszeit in einem Ausmaß, das von der Effizienz des erfolgten Energietransfers abhängig ist. Der gemessene Fluoreszenzabfall bei der Fluoreszenzlebenszeit-Bestimmung ist in der nächsten Abbildung anhand des Beispiels von **DNA5_{Grün-3m+Rot6m}** verdeutlicht. Die graue Kurve gibt das Signal der LED wieder (*Instrument Response Function*), die zur Anregung des Donors verwendet wurde. Die blaugefärbten Daten entsprechen der abklingenden Fluoreszenz der zweifach modifizierten **DNA5_{Grün-3m+Rot6m}**. Ist kein Akzeptorfarbstoff vorhanden wird mithilfe einer monoexponentiellen Anpassungsfunktion ausgewertet. Die Abklingkurve bei Anwesenheit des Akzeptors wird hingegen durch Verwendung einer biexponentiellen Funktion (rosa) angepasst (Kapitel 8.6). Wie bereits erwähnt, wurden die Lebenszeiten zur Kalkulation der ET-Effizienzen herangezogen.

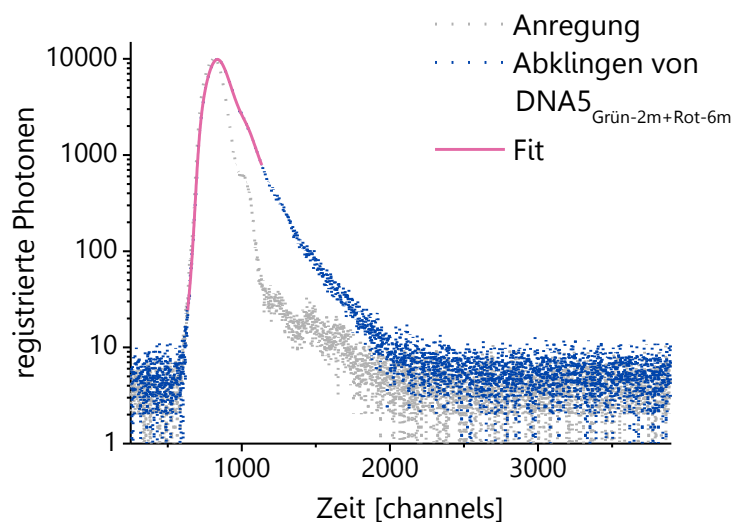


Abbildung 80: Repräsentative Abklingkurve der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5_{Grün-2m+Rot6m}**.

Die berechneten Effizienzwerte sind in Abbildung 81 einander gegenübergestellt. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardabweichungen der ET-Effizienz an und wurden aus den Abweichungen der Fluoreszenzlebenszeiten errechnet. In Kapitel 8.6

sind sämtliche Daten der Fluoreszenzlebenszeit-Messung und ET-Effizienzen in einer Übersichtstabelle zusammengefasst.

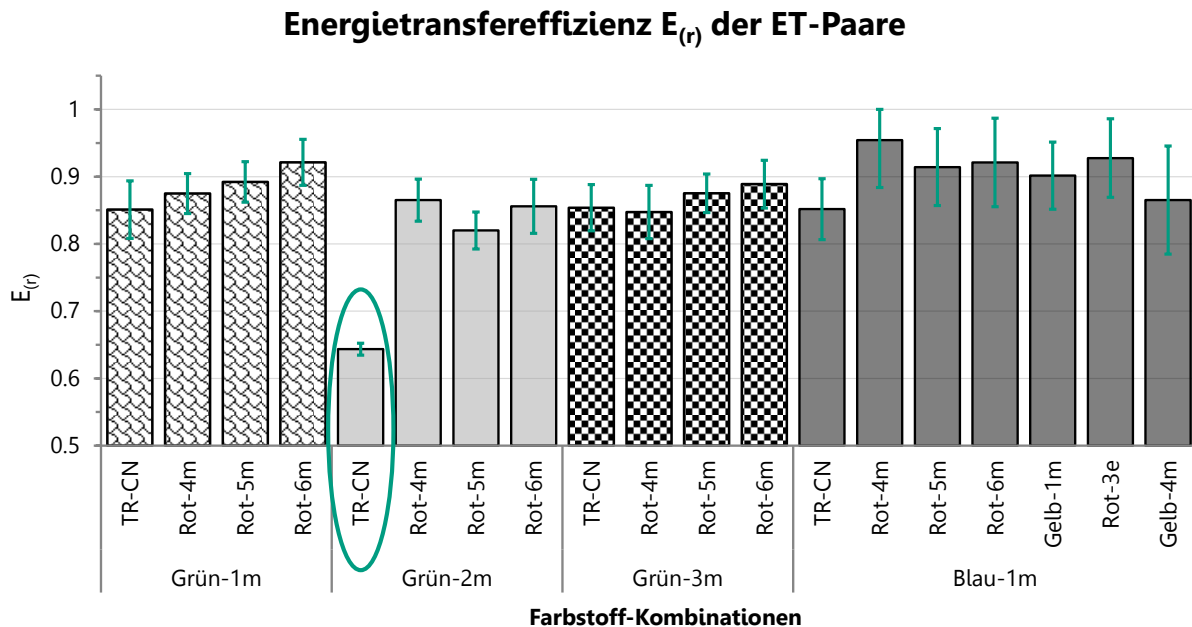


Abbildung 81: Gegenüberstellung der anhand der Fluoreszenzlebenszeiten ermittelten ET-Effizienzen aller Paarkombinationen.

Die ET-Effizienzen zeigen die gleichen hervorragenden Tendenzen wie die zuvor diskutierten Kontrastfaktoren. Die Paare besitzen im Durchschnitt eine sehr hohe Effizienz (0.88) des Energietransfers. Die Werte liegen in einem Bereich von 0.82 bis 0.95 und bestätigen den außergewöhnlich guten Energietransfer der neuen ET-Paare. Die erhaltene ET-Effizienz der kombinierten Fluorophore **Grün-2m** und **TR-CN** bildet analog zu den Resultaten der Farbkontraste die auffälligste Ausnahme mit einem Wert von lediglich 0.64. Auffallend ist zudem, dass alle Paarbildungen mit dem Donor **Blau-1m** die größten ET-Effizienzen vorweisen können. Die beiden beschriebenen Sachverhalte sind strukturellen Aspekten zuzuschreiben, die sich wiederum auf das resultierende Übergangsdipolmoment eines Moleküls auswirken können. Dementsprechend haben die Farbstoffstrukturen innerhalb von **DNA5** mehr oder weniger stark unterschiedliche Ausrichtungen ihrer Übergangsdipolmomente zueinander. Infolgedessen besitzen sie vermutlich auch variierende Werte des Orientierungsfaktors κ^2 , der einen hochgradig diskutierten Parameter bei Abstandsmessungen mittels FRET repräsentiert. Prinzipiell lassen sich die diversen

Studien rund um den Orientierungsfaktor κ^2 nach zwei verschiedenen Strategien einteilen, mit denen eine Begrenzung des Wertebereichs für κ^2 angestrebt wird.

In den Arbeiten von *Wilhelmsson et al.* und *Asanuma et al.* werden die Chromophore derart fest in das Oligonukleotid eingegliedert, sodass die Flexibilität zwischen dem Fluorophor und dem Anknüpfungspunkt vollständig unterbunden wird.^[29,44,45,220,223] Dadurch wird gewährleistet, dass die Orientierung zwischen dem Donor- und dem Akzeptormolekül ausschließlich durch die Architektur der Doppelhelix vorgegeben wird. *Wilhelmsson* ersetzt zu diesem Zweck natürliche Nukleobasen durch synthetische fluoreszente Basenpaare. *Asanuma et al.* verwendete die beiden Interkalatoren Pyren und Perylen um eine Fixierung des ET-Paares zu erreichen.

Eine entgegengesetzte Herangehensweise wird unter anderem von *Seidel et al.* verfolgt. *Seidel* verbindet die Chromophore über besonders lange und flexible Linkereinheiten mit den Oligonukleotiden und gestattet dementsprechend den Fluorophoren, dass sie sich völlig frei bewegen und damit zueinander ausrichten können.^[46] Ist Farbstoffen die Möglichkeit zur kompletten Umorientierung gegeben, kann ein Mittelwert von $2/3$ für den Orientierungsfaktors κ^2 angenommen werden. *Seidel et al.* verglichen kurze, rigide und lange, flexible Verbindungen des FRET-Paares **Alexa 488 / Cy5** zu DNA und RNA. *Seidel* bestätigte die Annahme des κ^2 -Wertes von $2/3$ für lange Linker. Jedoch sollte dies nicht als allgemeingültige Regel betrachtet werden. Denn im Gegenzug dazu konnten die Untersuchungen von *Krause et al.* anhand von **TMR** (Tetramethylrhodamin) und **Cy5** zeigen, dass die Verwendung längerer Verbindungen zum Oligonukleotid keineswegs eine Garantie der freien Beweglichkeit der Farbstoffe darstellt.^[224] *Krause et al.* konnten den erstaunlichen Nachweis erbringen, dass längere Linker dem Cyaninfarbstoff **Cy5** gestatten, in zwei verschiedenen geometrischen Anordnungen mit der DNA zu binden. Infolgedessen wurden stark variierende ET-Effizienzen und damit Distanzen zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfluorophor erhalten.

Darüber hinaus erforschte die Arbeitsgruppe von *Lilley* intensiv das Orientierungsverhalten und die Energietransfereffizienz von terminal an DNA gebundenem **Cy3 / Cy5**.^[221,222] Diese Cyanine haben die intrinsische Eigenschaft sich in definierter Orientierung am Helixende aufzustapeln. Es wurde ferner gezeigt, dass dieses charakteristische Verhalten von **Cy3 / Cy5** vollkommen unabhängig von der

Linkerlänge ist. Dabei wiesen die gemessenen ET-Effizienzen langer und kurzer Cyaninanbindungen eine unterschiedliche Winkelabhängigkeit auf. Die Liste zusätzlicher Publikationen mit der Thematik des Orientierungsfaktors κ^2 und dessen Diskussion ist äußerst umfangreich. Die bereits aufgeführten Beispiele sind an dieser Stelle ausreichend und dienen zur Verdeutlichung der primären Herausforderung bei Abstandsbestimmungen innerhalb nukleosidischer Systeme.

Im Folgenden werden anhand berechneter Strukturen Erklärungen für die gemessenen ET-Effizienzen gegeben. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich dabei in erster Linie um spekulative Annahmen handelt. Zwar liefern sie eine Begründung für das beobachtete Verhalten, sollten jedoch tiefgründiger erforscht werden um eventuelle Fehlinterpretationen zu vermeiden.

Im bisherigen Verlauf der vorliegenden Dissertation trat an mehreren Stellen der signifikante Einfluss einer unterschiedlichen Verknüpfung der Polymethinbrücke mit dem Chinolinteil der Styryl-Farbstoffe zu Tage. Die Vermutung liegt also nah, bei dem diagonalen Fluorophorarrangement in **DNA5** von einem nicht weniger großen Effekt der Brückenbindungsposition auf die Wechselwirkungen der Farbstoffe untereinander auszugehen. Die nachstehenden Strukturen aus molekülmechanischen Berechnungen von **DNA5** mit den verschiedenen ET-Paar-Kombinationen wurden mithilfe des Programms *Hyperchem 8* unter Verwendung des semi-empirischen CHARMM-Kraftfelds vorgenommen. Abbildung 82 zeigt links das berechnete Modell von **DNA5_{Grün-2m+TR-CN}** und rechts das Modell der kovalent mit **DNA5** verbundenen Farbstoffe **Grün-1m** und **TR-CN**. Die blauen Pfeile repräsentieren die vermutlichen Übergangsdipolmomente der Fluorophore und stützen sich auf Literaturdaten.^[29,223]

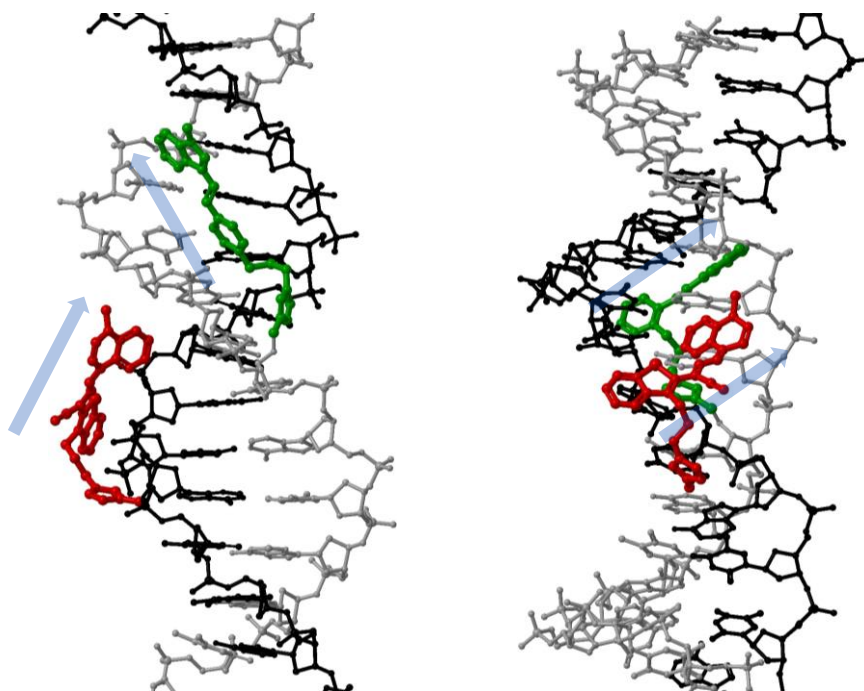


Abbildung 82: Berechnete Modelle von **DNA5_{Grün-2m}+TR-CN** (links) und **DNA5_{Grün-1m}+TR-CN** (rechts). Die blauen Pfeile stellen die Übergangsdipolmomente der Fluorophore dar.

In der Abbildung 82 sind die unterschiedlichen Farbstoffausrichtungen eindeutig zu erkennen. Offensichtlich führt die Kombination von **Grün-2m** / **TR-CN** zu einer fast senkrecht aufeinander stehenden Anordnung der Übergangsdipolmomente des ET-Paares und folglich zu einem Orientierungsfaktor κ^2 , der kleiner als $2/3$ sein muss. Die Verhältnisse ändern sich, wenn der Donor **Grün-1m** mit **TR-CN** zusammengebracht wird. Höchstwahrscheinlich bewirkt die Verknüpfung der Dimethinkette mit der 2-Position am Chinolin eine dementsprechend abweichende Orientierung der Chromophore zueinander. Infolgedessen stehen die Übergangsdipole in diesem ET-Paar weitestgehend parallel zueinander, was einem Wert von $\kappa^2 = 1$ entsprechen würde. Anhand der Abbildung 83 wird verdeutlicht, wie sich die Styryl-Cyanine **Grün-2m** und **Rot-6m** zueinander ausrichten. Augenscheinlich ermöglicht die Anwesenheit des Phenylsubstituenten am Indolrest den effizienten Energietransfer mit dem Donorfarbstoff **Grün-2m**. In Kapitel 4.1 wurde bereits die vergleichbare Moleküllänge der Styryl-Strukturen angesprochen. Abbildung 84 zeigt, dass **Rot-6m** nicht nur in der Distanz von einem heteroaromatischen Stickstoff zum anderen, sondern zugleich sein Phenylindolrest den identischen Abmessungen entspricht. Dies lässt die Vermutung zu, dass **Rot-6m** aufgrund dieser Substitution in

der Lage ist, einen effizienten Energietransfer mit 2- sowie auch 4-verknüpften Donoren zu gestatten.

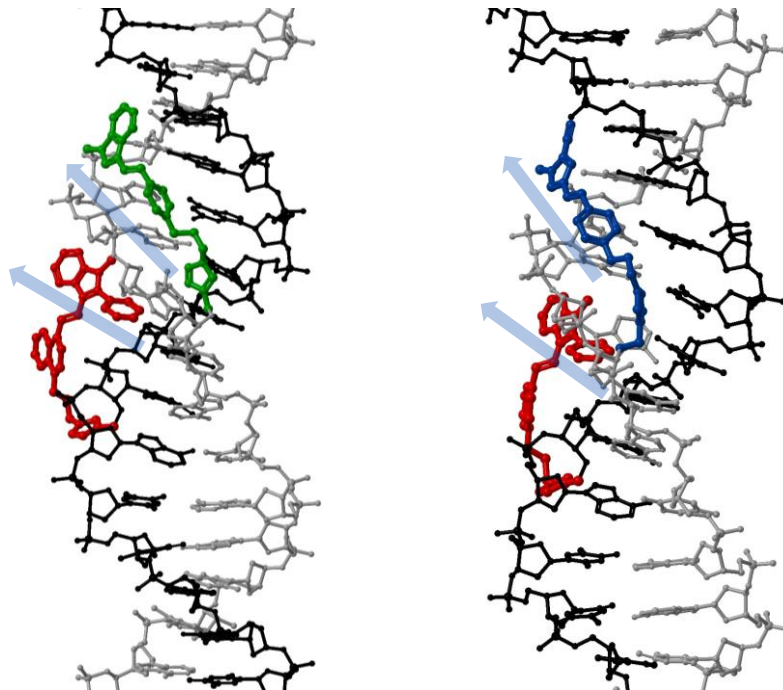


Abbildung 83: Berechnete Modelle von **DNA5_{Grün-2m+Rot-6m}** (links) und **DNA5_{Blau-1m+Rot-6m}** (rechts). Die blauen Pfeile stellen die Übergangsdipolmomente der Fluorophore dar.

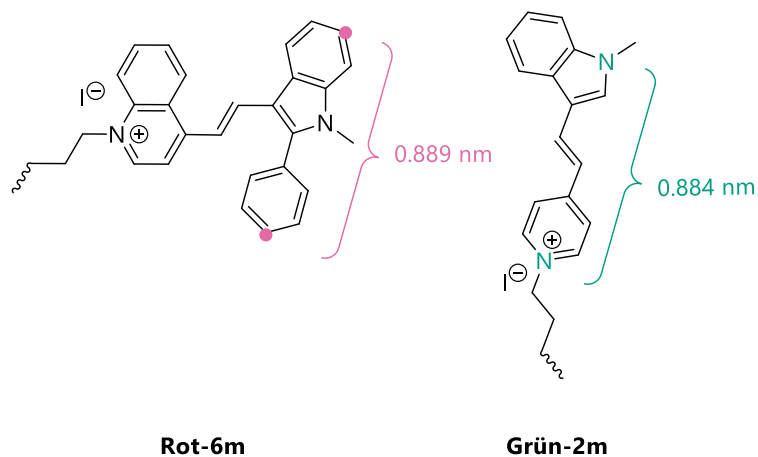


Abbildung 84: Vergleich der Längenausdehnung des Phenylindolrestes aus **Rot-6m** (links) und der Distanz zwischen den heteroaromatischen Stickstoffen in **Grün-2m**. Die Abstände wurden aus gerechneten Strukturen mit optimierter Geometrie gewonnen. Die Berechnungen erfolgten mit *Hyperchem 8* unter Verwendung des semiempirischen MM⁺-Kraftfeldes.

Bleibt letztendlich noch zu erörtern, weshalb der Donorfarbstoff **Blau-1m** bei allen Akzeptoren für die höchste Effizienz bei einem ET hervorruft. Die Begründung lässt sich ebenfalls in den strukturellen Gegebenheiten des Moleküls finden. Die räumliche Ausdehnung von **Blau-1m** ist vergleichsweise kleiner als alle weiteren Donoren. In Kapitel 4.3 zeigte sich, dass die geringe Molekülgröße eine eventuell ausgeprägtere Beweglichkeit des Donors bei Anlagerungen an doppelsträngige DNA zuließ. Genau diese verbleibende Flexibilität ermöglicht **Blau-1m** bei kovalenter Verknüpfung im Oligonukleotid eine gewisse Bewegungsfreiheit. Im Duplex **DNA5** kann sich **Blau-1m** als Folge der Wechselwirkungen mit dem Akzeptorfarbstoff derart umorientieren, dass ein effizienter ET zwischen beiden Chromophoren stattfinden kann. Dabei sorgt die Flexibilität von **Blau-1m** für eine akzeptorspezifische Ausrichtung seines Übergangsdipolmomentes und passt sich sprichwörtlich den entsprechenden Anforderungen eines jeden Akzeptors an. Diese spezielle Eigenschaft zeigt **Blau-1m** auch bei der Anwendung in **acpcPNA**-Sonden, die im Kapitel 6.2 besprochen werden.

Die Priorität bei der Charakterisierung der zusammengestellten ET-Paare lag vor allem in der Bestimmung der Effizienz. Nichtsdestotrotz wurden auf Basis des in Gleichung 3.10 angegebenen Zusammenhangs die Donor-Akzeptor-Abstände r berechnet und mit dem nach Gleichung 3.5 kalkulierten Förster-Radius R_0 ins Verhältnis gebracht (r/R_0). Im Weiteren sollen zur Übersichtlichkeit lediglich die Bereiche der Werte diskutiert werden. Die erhaltenen Einzelwerte kann man der Tabelle 20 in Kapitel 8.6 entnehmen. Die Abstände r zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff liegen sich zwischen 1.87 nm und 3.62 nm. Diese Distanzen bewegen eng um den Durchmesser einer B-DNA-Doppelhelix, der sich auf 2 nm beläuft. Die Abstände r spiegeln die diagonal gegenüberliegende Anbindung der Fluorophore am Nukleinsäure-Rückgrat wieder. Die Distanzen von rund 2-3 nm gestatten die Annahme, dass beide Chromophore ungefähr parallel zueinander in den Furchen der Doppelhelix zu liegen kommen. Natürlich zeigt der Donor **Blau-1m** die geringsten Werte von r . Seine geringe Größe ermöglicht ihm, besonders tief in Furchen vorzudringen und somit näher an den Akzeptor ranzureichen. Der Abstand des Paares **Grün-2m / TR-CN** ist erwartungsgemäß groß im Vergleich zu allen anderen Abständen und beträgt 4.38 nm.

Die angegebenen Werte von r (und von R_0 in Tabelle 20, Kapitel 8.6) beziehen sich auf eine Berechnung, in der ein Orientierungsfaktor κ^2 von $2/3$ festgelegt wurde. Da die resultierende Orientierung der Übergangsdipolmomente des ET-Paares nicht eindeutig geklärt ist, sind die Abstandswerte mit einer entsprechenden Unsicherheit behaftet. Demgegenüber steht der Quotient (r/R_0) aus dem Donor-Akzeptor-Abstand r und dem Förster-Radius R_0 . Dieses Verhältnis ist aufgrund seiner mathematischen Herkunft vollkommen unabhängig vom Orientierungsfaktor. Die nachfolgende Graphik (Abbildung 85) zeigt den Zusammenhang dieses Quotienten mit der Effizienz eines FRET. Die graue gestrichelte Linie repräsentiert die Bedingung von $r = R_0$, die laut Förster genau dann gegeben ist, wenn eine ET-Effizienz von 50 % vorliegt. Anhand der rosafarbenen gestrichelten Linie ist der durchschnittliche Quotient r/R_0 aller Cyanin-Paare von 0.7 eingezeichnet, wobei die jeweiligen Einzelwerte sich zwischen 0.6 und 0.78 bewegen (Ausnahme: **Grün-2m** / **TR-CN** mit $r/R_0 = 0.91$). Mit Bezug auf Abbildung 85 zeigt sich erneut, die außerordentlich hohe ET-Effizienz der entwickelten photostabilen Cyaninfarbstoffe.

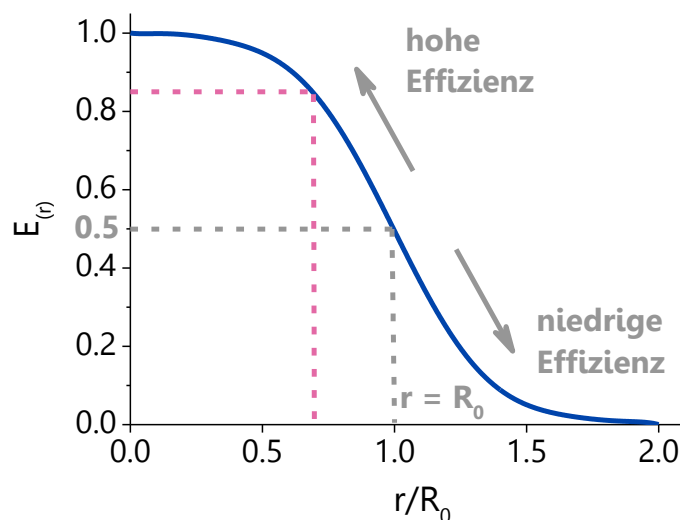


Abbildung 85: Graphisch dargestellter Zusammenhang des Quotienten r/R_0 und der FRET-Effizienz.

Die Charakterisierung der kombinierten ET-Paare ist nun abgeschlossen. Im nächsten Kapitel werden die Cyaninfarbstoffe in drei unterschiedlichen Anwendungen erprobt und sollen dabei ihre vielversprechenden Eigenschaften "zum Besten geben".

6. Anwendung als Nukleinsäuresonden

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die photophysikalischen Eigenschaften der entwickelten Cyaninfarbstoffe bestimmt und untereinander verglichen. Dabei wurden im Anschluss die Fluorophore mit den höchsten Photostabilitäten und den besten spektroskopischen Charakteristika kovalent an DNA-Oligonukleotide gebunden. Die Bestimmung der Farbkontraste sowie der Effizienzen bei einem stattfindenden Energietransfer „enthüllten“ die exzellentesten Kombinationen von Donor- und Akzeptorfarbstoffen zu ET-Paaren. Diese auserwählten Cyanine werden im Verlauf des vorliegenden Kapitels im Zuge von drei unterschiedlichen Anwendungen der Nukleinsäuredetektion zum Einsatz kommen. Die Farbstoffe bilden hierbei einen Bestandteil von wellenlängenverschiebenden Sonden auf der Basis von DNA und PNA. Dabei wird erneut die Leistungsfähigkeit der neuen Fluorophore auf den „Prüfstand“ gestellt.

6.1 miRNA-Detektion mit *"Molecular Beacons"*

Innerhalb einer Zelle werden verschiedene RNA-Variationen hervorgebracht, die sich in ihrer Größe, Funktion oder Basenmodifikation unterscheiden. Deshalb stellt die Detektion und fluoreszente Bildgebung von RNA in lebenden Zellen eine außerordentlich anspruchsvolle Aufgabe der heutigen Fluoreszenzbioanalytik von Nukleinsäuren dar.^[225-231] Insbesondere die Erforschung von RNA-Klassen, die nur in sehr geringer Konzentration in lebendem Gewebe zu finden sind, verlangt nach empfindlichen und hochspezifischen Detektionsmethoden. Zu diesen RNA-Variationen zählen unter anderem die siRNA (*small interfering RNA*) und die miRNA (*microRNA*), die viele zelluläre Prozesse regulieren und bei einigen Krankheiten vermehrt oder vermindert auftreten können.

In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) bestand die Intention, eine parallele Beobachtung von miRNA-21 und miRNA-31 in Krebszellen zu ermöglichen. Um dieser Aufgabe „Stand zu halten“, bedarf es Oligonukleotidsonden,

die eine hohe Spezifität für ihr Zielmolekül aufweisen und zugleich dessen Anwesenheit deutlich anzeigen. Für ein derartiges Vorhaben eignen sich in erster Linie wellenlängenverschiebende „*Molecular Beacons*“, die mit zwei Fluorophoren ausgestattet sind. Um eine gleichzeitige Detektion von zwei verschiedenen miRNAs zu bewerkstelligen, werden folglich vier spektral voneinander unterscheidbare Fluoreszenzmarker benötigt. Eine Herausforderung, deren Bewältigung im Folgenden behandelt wird.

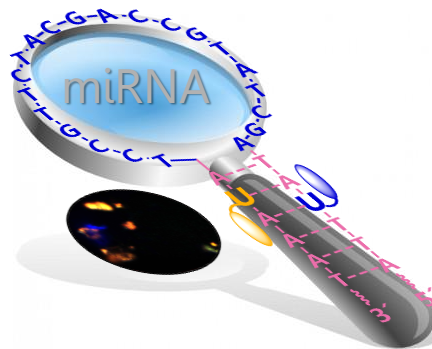


Abbildung 86: Illustration der Detektion von miRNA-21 und miRNA-31 anhand von wellenlängenverschiebenden „*Molecular Beacon*“.

Posttranskriptionale Regulation der TIAM1-Genexpression durch miRNA-21 und miRNA-31

Die nicht-codierenden miRNAs besitzen eine Länge von 20 bis 22 Nukleotiden und regeln die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene.^[232] Die Forschungen der letzten Jahre haben mehrmals den Beweis erbracht, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Krebs einnehmen. *Xu et al.* untersuchten das regulatorische Verhalten von miRNA-21 und miRNA-31. Sie konnten einerseits zeigen, dass beide miRNAs einen direkten regulierenden Einfluss auf die Zellbeweglichkeit und die Invasivität von Kolon-Karzinomzellen haben. Als Invasivität bezeichnet man das invasive Wachstum eines malignen Tumors. Zusätzlich wirken miRNA-21 und miRNA-31 als nachgeordnete Effektoren von TGF- β (*transforming growth factor*) und TNF- α (*tumor necrosis factor*), die ihrerseits Transkriptionsfaktoren aktivieren können.

Bei einer Überexpression dieser beiden miRNA binden sie an das TIAM1-Gen (*T-lymphoma invasion and metastasis-1*) und drosseln dessen Expression. Das TIAM1-Gen codiert für ein Protein, das auf die Migration sowie Invasion verschiedener Arten von Krebszellen eine regulierende Wirkung hat. Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden miRNA ist, dass miRNA-31 die Migration und Invasion von Brustkrebszellen zu unterdrücken vermag. Das Zusammenspiel von miRNA-21 und miRNA-31 in Bezug auf ihr Expressionsmuster in verschiedenen Krebszellkulturen repräsentiert ein überaus interessantes Forschungsgebiet, bei dem die synthetisierten „*Molecular Beacon*“ ein hilfreiches Werkzeug darstellen.

Doppelte „*Click*“-Modifikation von DNA an der festen Phase

Zu Beginn dieses Abschnittes werden kurz die Methoden zur zwei- oder dreifachen kupfer(I)katalysierten „*Click*“-Reaktion (CuAAC) der Arbeitsgruppen von *Carell* und *Wengel* beschrieben. Anschließend wird die zur zweifachen Modifizierung der „*Molecular Beacon*“ (MB) entwickelte CuAAC den oben genannten Herangehensweisen gegenübergestellt und positive sowie negative Aspekte in einer Tabelle zusammengestellt.

Carell et al. synthetisierten die Phosphoramidite alkinfunktionalisierter Pyrimidinbasen (Uridin und Cytosin), wobei die 5-Position der Basen mit einem 1,7-Octadiinyl-Linker versehen wurde (Kapitel 3.2). Zur Verknüpfung eines DNA-Stranges mit bis zu drei unterschiedlichen Fluorophoren verwendeten sie bei der DNA-Synthese das Phosphoramidit des ungeschützten Alkins (5-Octa-1,7-diynyl-2'-deoxycytosin), ein TMS-geschütztes und ein TIPS-geschütztes Derivat. Nach erfolgter Oligonukleotidsynthese wurde die freie Alkinfunktion noch auf der festen Phase mittels CuAAC mit dem ersten Fluorophorazid umgesetzt. Anschließend wurde das Harz mit 1 % Essigsäure gewaschen und zugleich die TMS-Schutzgruppe entfernt. Nach erfolgter 2. CuAAC (ebenfalls an der festen Phase) wurde die DNA in wässrig-ethanolischer Ammoniaklösung vom Harz abgespalten, mittels Ethanolfällung

gewonnen, die TIPS-geschützte Alkinfunktion mit TBAF frei gesetzt und die „*Click*“-Modifikation mit dem 3. Farbstoff vorgenommen.

In einer neueren Arbeit gelangen *Wengel et al.* die doppelte Modifikation von DNA, indem sie die von Hand durchgeführte CuAAC mit der automatisierten Oligonukleotidsynthese verknüpften. Sie verwendeten bei der DNA-Synthese das kommerziell erhältliche Phosphoramidit des 2'-*O*-Propargyluridins („*click U*“). Direkt nach dem Einbau von „*click U*“ erfolgt die 1. „*Click*“-Reaktion auf der festen Phase über zweimal je 4 Stunden. Das gewaschene und sorgfältig getrocknete Harz wird dann erneut der automatisierten Oligonukleotidsynthese unterworfen. Das nachträglich eingeführte „*click U*“ wird anschließend in einer 2. CuAAC mit dem Azid eines 2. Fluorophors zur Reaktion gebracht.

Für die DNA-Synthese der zweifach modifizierten „*Molecular Beacons*“ wurde aufgrund der Basenlabilität der Cyaninfarbstoffe bei der Oligonukleotid-Synthese die „*ultramild bases*“ verwendet. Die benötigten alkinmodifizierten Phosphoramidite 2'-*O*-Propargyl-Adenosin („*click A*“) und 2'-*O*-Propargyl-Uridin („*click U*“) sind kommerziell erhältlich. Die „*Click*“-Reaktion zur zweifachen Modifizierung der Oligonukleotide wurde an der festen Phase manuell vorgenommen und die Reaktionszeit betrug 1.5 h bei 60 °C. Nach Einbau von „*click U*“ (oder „*click A*“) wurden mindestens 3-4 weitere Basen angefügt, bevor die 1. CuAAC durchgeführt wurde. Nach Abkühlen auf RT wurde die feste Phase mit einer Abfolge von verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen (Acetonitril, Wasser, Na₂EDTA-Lsg. (zur Entfernung jeglicher Kupferionen), erneut Wasser, Ethanol und abschließend Acetonitril). Die Säulen wurden kurz im Hochvakuum getrocknet und der 2. Teil des Oligonukleotids vollständig synthetisiert. Darauf folgend wurde die Kupplung mit dem 2. Farbstoffazid vorgenommen.

Diskussion

Werden die Farbstoffmodifikationen direkt an der Base, also in Position 5 (oder 7 bei *Seela*) angebracht, kann das Chromophor die Stabilität des Duplexes herabsetzen. Im Gegenzug dazu können große Wechselwirkungen zwischen den Nukleobasen und dem Fluorophor auftreten und zu dessen Fluoreszenzlöschung führen. Der lange C₈-Linker sorgt für eine große Beweglichkeit und ermöglicht somit Rotationen um die

Polymethinbrücke von Cyaninen, was in einer verminderten Emissionsintensität münden kann.

Die Modifikationsmethode von *Wengel* basiert theoretisch auf einer zum Arbeitskreis Wagenknecht analogen Strategie. *Wengel et al.* führt jedoch die „Click“-Reaktion über 8 Stunden pro Modifikation durch. Wie bereits bei einer einzelnen Modifikation mithilfe der „Click“-Reaktion festgestellt wurde (Kapitel 5.1), können bei derart langen Reaktionszeiten Oxidationsschäden am Oligonukleotid entstehen, die nachgewiesen bei 1.5 Stunden und 60 °C nicht auftreten.

Es verbleibt an diesem Punkt noch kurz auf die Ausbeuten der jeweiligen Methoden einzugehen. Im Grunde genommen, ist ein Methodenvergleich im Hinblick auf die Gesamtausbeute nur unter Beachtung von drei wichtigen Punkten sinnvoll. Einmal gilt festzuhalten, dass alle drei Arbeitskreise mit strukturell stark unterschiedlichen Farbstoffen gearbeitet haben. Entsprechend schwierig ist es zudem den Umsatz der „Click“-Reaktion zu bewerten, wenn nicht alle Parteien am identischen Gerät das jeweilige Oligonukleotid synthetisiert haben, womit eine ungleiche Ausgangssituation geschaffen wird. Der entscheidendste Faktor ist hingegen die Länge der synthetisierten DNA-Sequenz. Beispielsweise hat *Carell* sehr gute „Click“-Ausbeuten von ca. 59 bis 74 % nach der Anknüpfung zweier Fluorophore, die aber lediglich an einem 15mer Oligonukleotid erfolgte. Auch der „Click“-Umsatz von *Wengel* sieht auf den ersten Blick hervorragend aus, denn ihm gelang es beide „Click“-Reaktionen an einem 21mer mit vergleichbaren Ausbeuten (66 bis 70 %) zu verwirklichen. Im Kontrast dazu hatten die synthetisierten MB-Sequenzen eine Länge von 40 bis 50 Nukleotiden und folglich eine durchschnittliche „Click“-Ausbeute von ca. 9 bis 14 %. Bei derart langen Sequenzen gelangt die Phosphoramidit-Synthese bereits an ihre Grenzen. Im Verlauf des MB-Projektes wurden ebenso 52 oder 55mere hergestellt, die nur noch rund 6 % doppelt modifiziertes Produkt lieferten. Die Ursache lag bei der Öffnung der CPG-Säule eines 55mers klar auf der Hand. Die Ausmaße der CPG-Säulen fassen ein Volumen, was ungefähr einem DNA-Strang von 50 Basen entsprach und das Harz des 55mers nur noch sehr fest „gestopft reinpasste“. Es war zudem auch möglich einen zügigen Abfall des Tritylsignals zu verzeichnen, wenn das Oligonukleotid bei der Synthese die kritische Länge von 50 Basen erreichte.

Arbeitsgruppe	Vorteile	Nachteile
Carell	<ul style="list-style-type: none"> - Drei verschiedene Modifikationen möglich. - DNA-Synthese erfolgt am Stück. 	<ul style="list-style-type: none"> - Drei verschiedene Phosphoramidite müssen synthetisiert werden (bis zu 12 für 4 Basen). - Abspaltung der Schutzgruppen. - Modifikationen von verfügbaren Schutzgruppen abhängig. - Keine Bindung basenlabiler Fluorophore möglich.
Wengel	<ul style="list-style-type: none"> - „click U“ ist kommerziell erhältlich. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pro Modifikation rund 8-10 Stunden (langsam). - Bisher nur 2 verschiedene Farbstoffe verknüpft.
Wagenknecht / Bohländer	<ul style="list-style-type: none"> - „click U“ ist kommerziell erhältlich. - CuAAC in 1.5 Stunden (sehr schnell). - Gestattet Bindung basenlabiler Fluorophore. 	<ul style="list-style-type: none"> - Bisher nur 2 verschiedene Farbstoffe verknüpft. - Verwendung der kostenintensiveren „ultramild bases“.

Tabelle 5: Übersicht der jeweiligen Vor- und Nachteile der angewendeten Methoden zur zweifachen Modifikation von DNA.

"Molecular Beacon"-Design und *in vitro* Untersuchungen

Hat man die Absicht, mithilfe von wellenlängenverschiebenden „Molecular Beacon“ simultan zwei Zielsequenzen in einer Zelle sichtbar und längere Zeit beobachtbar zu machen, so sind vier deutlich voneinander unterscheidbare Emissionsfarben erforderlich. Für die Detektion von miRNA-21 wurde das ET-Paar **Grün-2m** und **Rot-6m** „auserkoren“, da sowohl die Donor- als auch die Akzeptoremission eine sehr hohe Intensität in der Kombination der Chromophore als ET-Paar oder als Einzelmodifikation aufwies. Innerhalb der MB-Stammregion befinden sich beide Chromophore in räumlicher Nähe zueinander, sodass ein ET vom Donormolekül zum Akzeptor erfolgen kann (Abbildung 87).

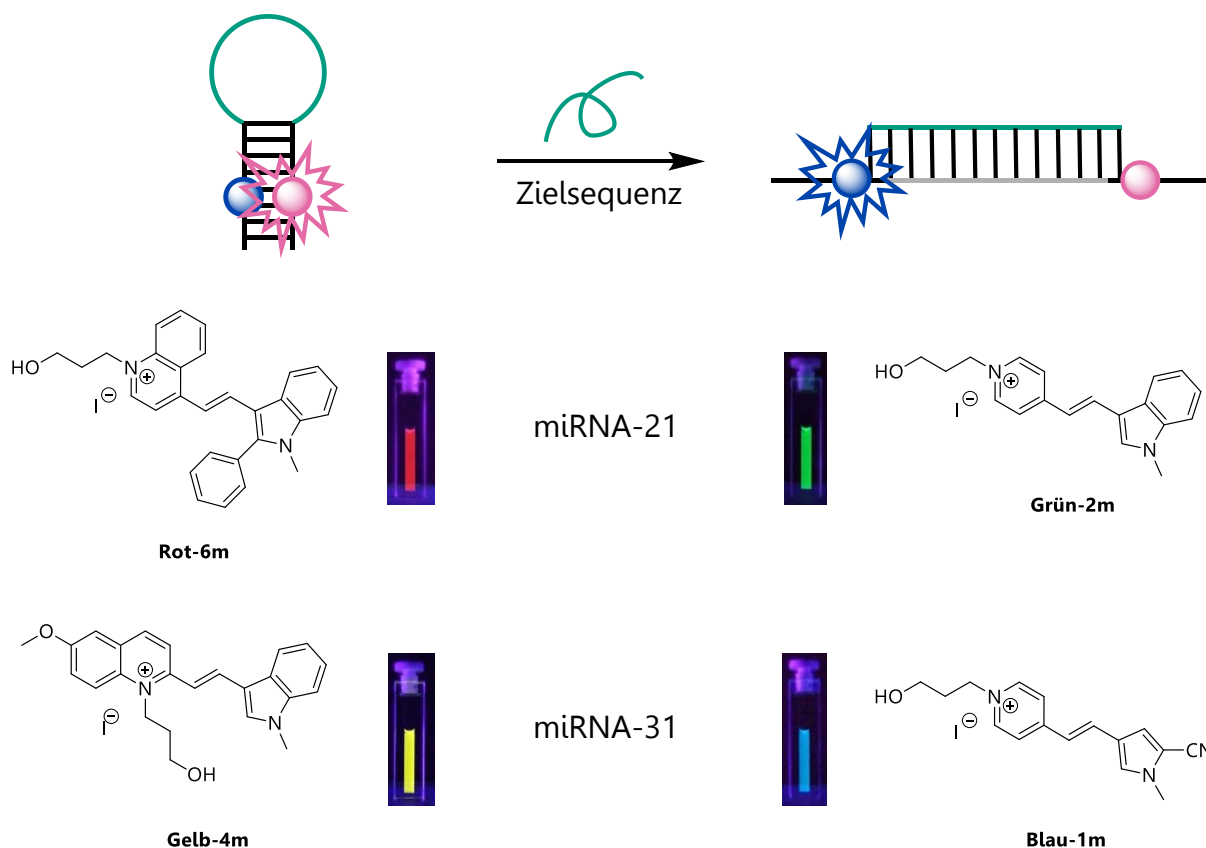


Abbildung 87: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines wellenlängenverschiebenden MB bei Ab- und Anwesenheit der Zielsequenz (oben). Unten sind die Cyaninstrukturen gezeigt, die als ET-Paare in dieser Anwendung zum Einsatz kommen.

Werden dementsprechend geschlossene MB in eine Zelle aufgenommen, so signalisieren sie die vorliegende Haarnadelstruktur anhand der energietransferbedingten roten Emission des Akzeptors. Bei Gegenwart der spezifischen Zielsequenz öffnet sich der MB infolge des Energiegewinns bei Bindung des Zielmoleküls. Liegt der MB in seiner geöffneten Form vor bewirkt der große Abstand der beiden Fluorophore, dass kein ET mehr zwischen ihnen erfolgen kann. Infolgedessen wird die Bindung der Zielsequenz durch die grüne Fluoreszenzfarbe des Donors angezeigt. Das blau-gelbe ET-Paar mit den Cyaninen **Blau-1m** und **Gelb-4m** wurde für die Visualisierung der miRNA-31 ausgewählt.

Damit sich ein MB bei Anwesenheit der Zielsequenz zügig öffnet, und zudem das Gleichgewicht dieses Prozesses signifikant in Richtung der geöffneten Struktur verschoben ist, sollte der Schmelzpunkt (T_m) der MB-Stammregion und der von dem gebildeten Duplex aus MB und Zielsequenz einen möglichst großen Unterschied aufweisen. Überdies hinaus sollte der T_m -Wert des MB-Stammes mindestens 40 °C betragenden, damit dieser auch in lebendem Gewebe bei 37 °C als Haarnadel vorliegt und somit keine fehlerhaften Messdaten erhalten werden. Im Verlauf des miRNA-Projektes wurden deutlich mehr MBs synthetisiert als im Folgenden beschrieben werden. Die Vielzahl der MB-Sequenzen und deren Daten würden jedoch an dieser Stelle auf Kosten der Übersichtlichkeit dargestellt werden. Stattdessen wird die erfolgte Forschung zielgerichtet anhand von drei Beispielen erläutert, deren Sequenzen in der nachstehenden Abbildung zusammengestellt sind.



Abbildung 88: Darstellung der Nukleinsäuresequenzen von **MB1** bis **MB3** und deren Zielsequenzen miRNA-21 und miRNA-31. Die zu den miRNAs komplementären Bereiche sind grau unterlegt.

Um genauere Informationen zu den Öffnungsgeschwindigkeiten der jeweiligen MBs bei Gegenwart des Zielmoleküls zu erhalten, wurde jeder MB mit 0.5 eq miRNA versetzt und dessen Fluoreszenzintensitätsverlauf mit der Zeit verfolgt bis keine merklichen Änderungen mehr zu detektieren waren. In Abbildung 89 sind die Intensitätsänderungen der Fluorophore von **MB1** und **MB2** gezeigt. In Kapitel 8.7 ist der Verlauf von **MB3** dargestellt.

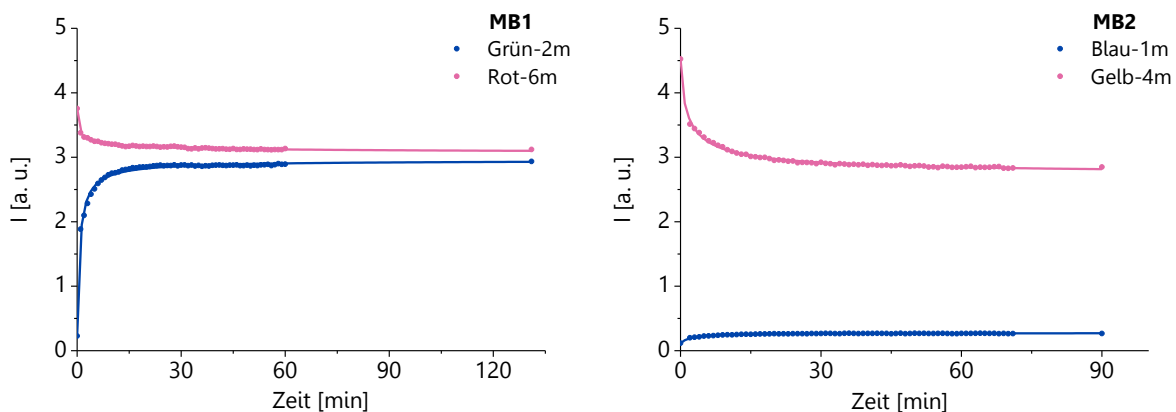


Abbildung 89: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität beider Chromophore eines MBs nach Zugabe von 0.5 eq miRNA. Links: **MB1** bei Anwesenheit von miRNA-21. Rechts: **MB2** bei Anwesenheit von miRNA-31.

Die Farbstoffe **Grün-2m** und **Rot-6m** des **MB1** antworten auf die Zugabe von miRNA-21 mit einer abrupten Intensitätsänderung ihrer Emission und erreichen das Gleichgewicht nach einer Zeitdauer von ca. 30 Minuten. Die Reaktion von **Gelb-4m** im **MB2** ist vergleichbar signifikant. Der Donor **Blau-1m** weist zwar eine steigende Intensität seiner Emission auf, diese ist hingegen bei weitem nicht so offensichtlich bzw. ausgeprägt wie bei den anderen drei Farbstoffen. **Blau-1m** weist als Einzelmodifikation eine geringe Fluoreszenzintensität auf, überzeugt hingegen umso mehr, wenn zwischen **Blau-1m** und einem Akzeptorfluorophor ein Energietransfer erfolgen kann. Das Gleichgewicht zwischen Haarnadelstruktur und gebundener Zielsequenz ist bei **MB2** ebenfalls innerhalb von 30 Minuten erreicht.

Im Anschluss wurden Titrationsexperimente durchgeführt, bei denen zwischen jedem Messpunkt und somit dem folgenden miRNA-Zugabeschritt mindestens 30 Minuten Zeitabstand gelegen haben. Damit wird die Einstellung des Gleichgewichtes gewährleistet. Alle MBs wurden zwei Titrationsversuche unterworfen, von denen bei der einen

ausschließlich die zur MB-Schlaufenregion komplementäre miRNA zugesetzt wurde. Das zweite Titrationsexperiment sollte erste Hinweise auf die Spezifität der MBs für ihre Ziel-miRNA geben. Deshalb wurden hier bei jedem Zugabeschritt die identische Menge beider miRNAs gleichzeitig zu der MB-Lösung gegeben. Die beiden nachfolgenden Abbildungen stellen die aufgezeichneten Spektren beider Titrationsexperimente von **MB1** und **MB2** einander gegenüber.

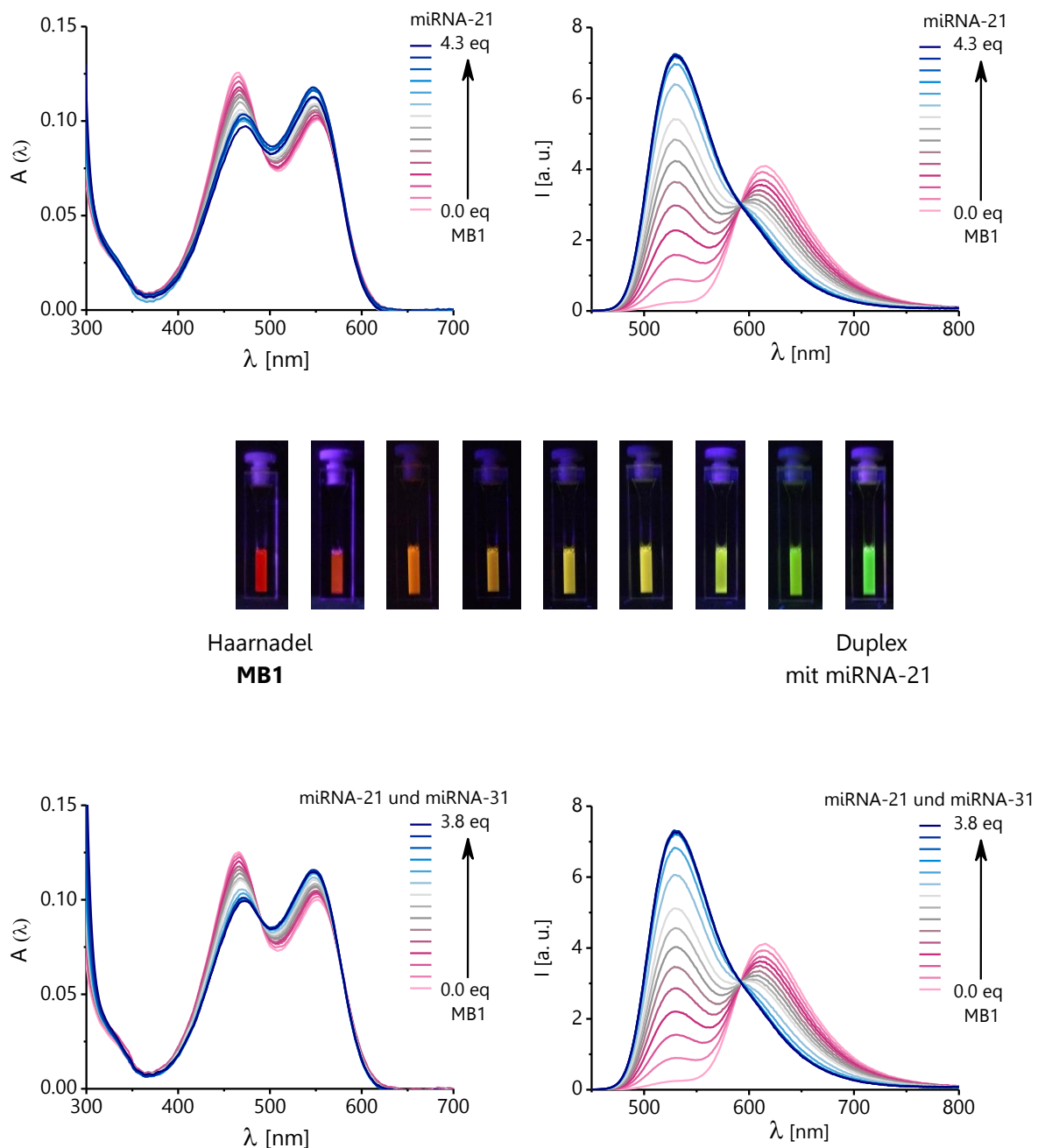


Abbildung 90: Titration des **MB1** mit miRNA. Oben: Zugabe der Zielsequenz miRNA-21. Mitte: Fluoreszenzfarbwechsel vom geschlossenen **MB1** (rot) zu der geöffneten Form (grün) infolge der Anwesenheit von miRNA-21. Unten: Zugabe beider miRNAs (miRNA-21 und miRNA-31).

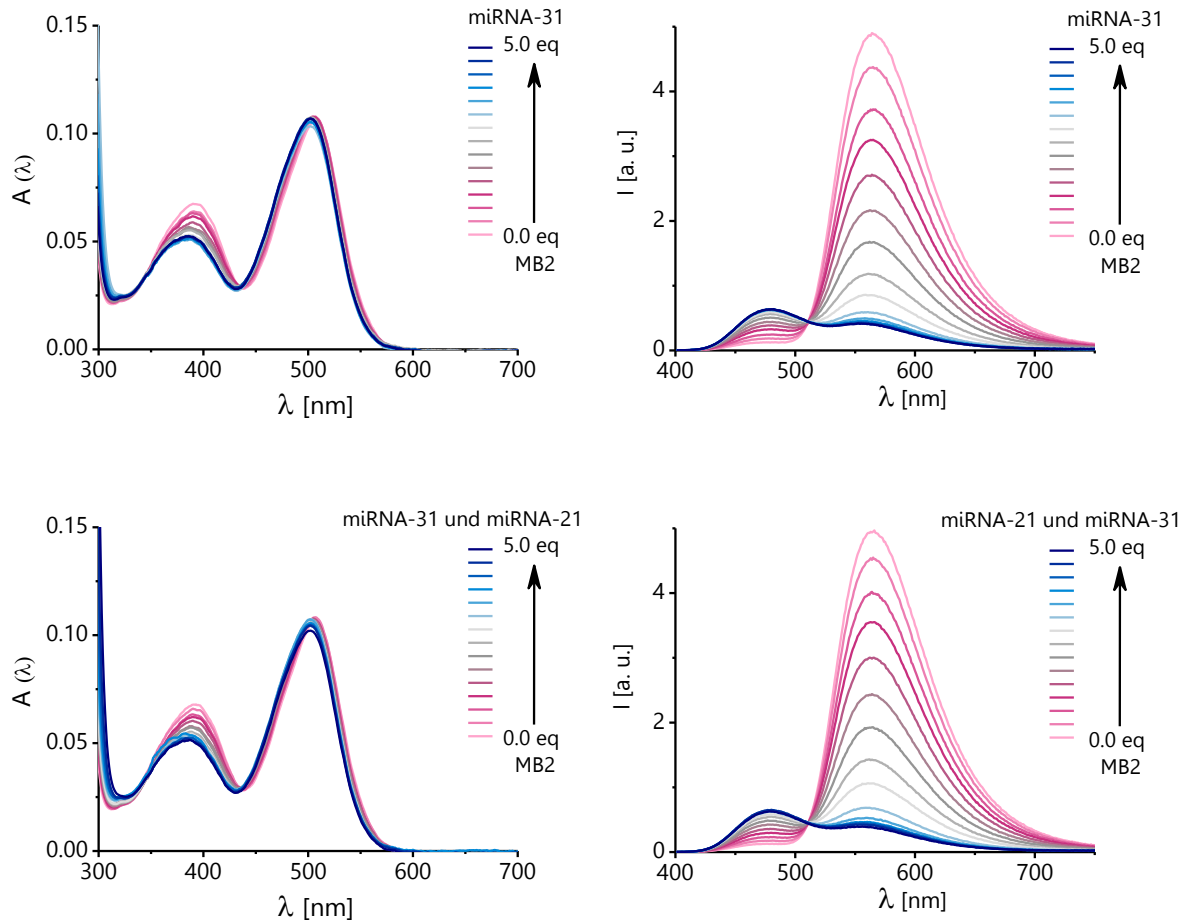


Abbildung 91: Titration des **MB2** mit miRNA. Oben: Zugabe der Zielsequenz miRNA-31. Unten: Zugabe beider miRNAs (miRNA-31 und miRNA-21).

In Kapitel 8.7 sind die beiden entsprechenden Titrationsexperimente von **MB3** dargelegt. Wie man den beiden obigen Abbildungen entnehmen kann, gleichen sich die Titrations mit einer oder beiden miRNAs in besonders hohem Maße. Dies deutet auf eine hervorragende Bindungsspezifität der synthetisierten MBs für ihre entsprechende miRNA hin.

Die große Spezifität der MBs wird zudem durch den gleichmäßigen Anstieg und den Verlauf der Kontrastfaktoren, der aus beiden Titrations ermittelt wurde, bestärkt. In Kapitel 3.3 wurde der enorm höhere Kontrastfaktor f von 34 des mit **TO** und **TR** modifizierten MBs im Vergleich zu einer kommerziell erhältlichen MB-Sonde angesprochen. Die finalen Kontrastfaktoren von **MB1** sowie **MB2** belaufen sich auf bemerkenswert große Werte von ungefähr 60 (Abbildung 92). **MB3** besitzt zwar einen geringeren Kontrastfaktor von rund 42, zeigt damit aber ebenfalls eine Erhöhung im direkten Vergleich zum Modell-ET-Paar. Es sei hier deutlich gemacht, dass sich der

Kontrastfaktor f der MB-Titration auf mathematischer Ebene von dem Farbkontrast f_{Kontrast} unterscheidet. In der nachfolgenden Gleichung ist der mathematische Zusammenhang des MB-Kontrastfaktors f gezeigt.

$$f = \frac{I_{\text{Do}}/I_{\text{Ak}} \text{ (Heteroduplex)}}{I_{\text{Do}}/I_{\text{Ak}} \text{ (Haarnadel)}} \quad (6.1)$$

In Kapitel 8.7 befinden sich die Kontrastfaktoren aller drei MBs im direkten Vergleich zueinander. Bei allen Titrationen wurde der Endpunkt bei einer Zugabe von 1.5 eq der miRNA erhalten und kann gleichfalls dem Kontrastfaktorverlauf der Titrationen entnommen werden (Abbildung 92).

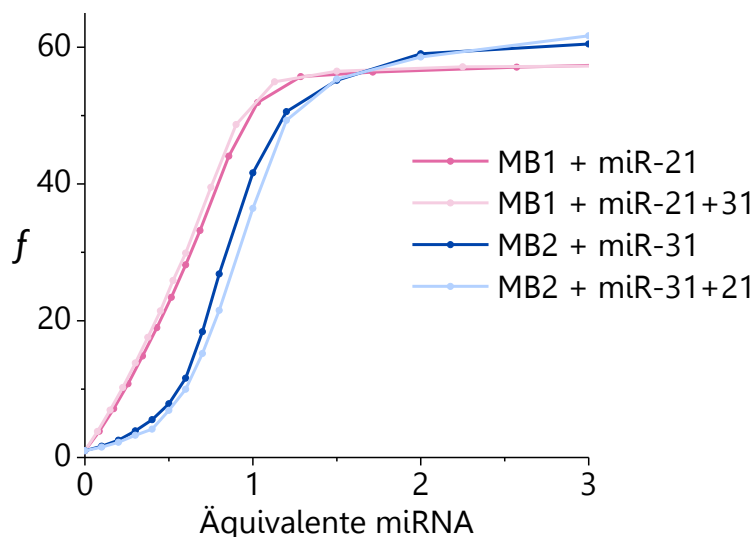


Abbildung 92: Verlauf des Kontrastfaktors f im Zuge der Titrationsexperimente von **MB1** und **MB2** bei Addition der komplementären sowie beider miRNAs.

Des Weiteren wurden Negativkontrollen der MBs **MB1** und **MB2** spektroskopisch vermessen. Die Fluoreszenzspektren der Abbildung 93 zeigen eine Gegenüberstellung des geschlossenen MB, des MB mit 1.5 eq der komplementären miRNA-Sequenz als Positivkontrolle und des MB mit 1.5 eq der „falschen“ miRNA, wobei diese Lösung einer Negativkontrolle entspricht. Anhand der Spektren bestätigt sich erneut die hohe Bindungsspezifität für das entsprechende Zielmolekül. Selbst bei sehr genauer

Betrachtung lässt sich kaum ein Unterschied zwischen der Negativprobe und dem allein vorliegenden MB ausmachen.

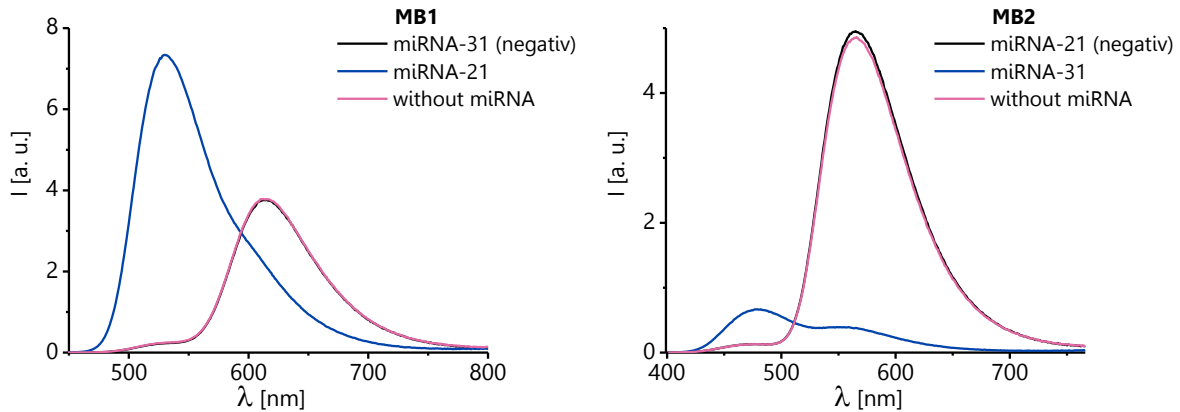


Abbildung 93: Gegenüberstellung der Emissionsspektren des geschlossenen MB, des MB mit 1.5 eq der komplementären miRNA und des MB mit 1.5 eq der „falschen“ miRNA, wobei diese Lösung einer Negativkontrolle entspricht.

MB	Zugabe der miRNA	$f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ (Haarnadel)	$1/f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ (Hybrid)
MB1	miRNA-21	16.8	3.45
	miRNA-21+ miRNA-31	16.7	3.44
MB2	miRNA-31	38.6	1.60
	miRNA-31+ miRNA-21	39.5	1.68
MB3	miRNA-31	20.4	2.07
	miRNA-31+ miRNA-21	20.2	2.07

Tabelle 6: Kontrastverhältnisse $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ und $1/f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ der Emissionsintensitäten der MBs in der Haarnadelstruktur und im gebildeten Hybrid mit der miRNA.

Die Tabelle 6 gibt die Kontrastfaktoren $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ bzw. $1/f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ der Emissionsintensitäten der MBs in ihrer geschlossenen Haarnadelform und im gebildeten Hybrid mit der miRNA wieder. Es fällt auf, dass die Werte von $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$

mit 17 (**MB1**), 40 (**MB2**) und 20 (**MB3**) relativ hoch sind, jedoch nicht die Ausmaße des entsprechenden Parameters in Kapitel 5.3 erreichen. Diese Beobachtung lässt sich aufgrund der strukturellen Gegebenheiten der Haarnadelstruktur erklären. Die Stammlängen erstrecken sich über 8 (**MB1**), 7 (**MB2**) und 8 (**MB3**) Basenpaare. Eine vollständige Windung innerhalb einer B-DNA-Doppelhelix ist durch 10 Basenpaare gegeben. Demzufolge repräsentieren die kurzen MB-Stammregionen eine labilere helikale Umgebung für das kovalent verknüpfte ET-Paar. Infolgedessen erhalten die Fluorophore eine höhere Rotationsfreiheit, damit einen geringeren Orientierungsfaktor κ^2 und folglich eine niedrigere ET-Effizienz als in dem zuvor diskutierten Duplex **DNA5**. Würde man die exakte Orientierung der Farbstoffe im Oligonukleotid kennen, ließen sich die MB Designe an die jeweiligen Bedürfnisse der Chromophore besser anpassen.

Das resultierende Kontrastverhältnis $1/f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ des gebildeten miRNA-MB-Hybrides ist bei allen MBs sehr gering und liegt zwischen 2 und 3. Auch dieser Sachverhalt kann erklärt werden. Die Begründung beruht auf der verbleibenden hohen Fluoreszenzintensität der Akzeptorfarbstoffe im Heteroduplex, die sich anhand von zwei primären Tatsachen veranschaulichen lässt. Einmal handelt es sich bei der Öffnung der Haarnadel um ein dynamisches Gleichgewicht, sodass stets neben dem miRNA/DNA-Hybrid auch einige MB in der geschlossenen Form vorliegen und einen ET hervorrufen, der die Emissionsintensität des Akzeptors stets auf einem angehobenen Gesamtwert des gemessenen Ensembles hält. Hinzu kommt, dass bei den geöffneten Strukturen die verbleibenden überhängenden Basen aus den MB-Stämmen in Form von sogenannten „klebrigen Enden“ auch bei gebundener Zielsequenz miteinander wechselwirken können und somit ebenfalls einen ET ermöglichen. Im Verlauf dieses MB-Projektes wurden auch mehrere MBs synthetisiert, die Teile der miRNA-Erkennungssequenz im Stamminneren besaßen. Dadurch wurden deutlich die Auswirkungen der „klebrigen Enden“ minimiert. Leider ist die Nukleinsäureabfolge der beiden miRNAs sehr reichhaltig mit der Base Guanin bestückt. Infolgedessen traten in den MB mit Zielsequenzbestandteilen in der Stammregion starke Fluoreszenzlöschungen auf und machten dieses MB-Design weniger geeignet. Interessanterweise konnte bei einigen dieser stark emissionsgelöschten MB ein signifikanter Fluoreszenzanstieg des Donors und des Akzeptors bei miRNA-Zugabe

verzeichnet werden. Dies lieferte den Hinweis, dass in dem gebildeten RNA/DNA-Hybrid die Fluoreszenzlösung aufgehoben wurde, was der gestauchteren A-Form der Hybridhelix zuzuschreiben ist. Offensichtlich bewirkt die strukturelle Änderung der Helix eine abweichende Ausrichtung der Fluorophore zu den löschenden Guanosinresten und gestattete damit den beobachteten Intensitätsanstieg. Man könnte dies nutzen, indem man ein oder beide Chromophore über einen anderen Zuckerbaustein innerhalb des MBs verknüpft. Für diesen Zweck wäre ein Nulkeotid auf Basis der Arabinose oder LNA (*locked nucleic acid*) geeignet, da so der Farbstoff eine veränderte Orientierung im Stamm des MB erhalten würde. Folglich könnten diese löschenden Effekte minimiert oder im besten Fall sogar vollständig unterbunden werden. Man würde so eine erhöhte Fluoreszenzintensität neben einer unterbundenen Wechselwirkung aufgrund „klebriger Enden“ erhalten.

Selbstverständlich wurden auch die T_m -Werte den MBs in An- und Abwesenheit der miRNA bestimmt. Eingangs der spektroskopischen MB-Charakterisierung wurden bereits grundlegende Anforderungen an die T_m -Werte vorgestellt. Die nachstehende Tabelle zeigt die gemessenen Schmelztemperaturen der MBs sowie die Temperaturdifferenz zwischen dem Hybrid und dem komplementären MB-Stamm.

MB	T_m [°C]		T_m -Differenz [°C]
	reiner MB	Hybrid	
MB1	47.5	63.6	16.1
MB2	40.3	75.9	35.6
MB3	47.7	76.9	29.2

Tabelle 7: Schmelztemperaturen der MBs und der T_m -Differenz (Hybrid - MB-Stamm).

Die T_m der Hybride mit miRNA-31 liegen aufgrund des größeren G-C-Anteils in ihrer Sequenz rund 13 °C höher als die der Heteroduplexe mit miRNA-21. Die Stammregionen schmelzen bei signifikant kleineren Temperaturen, wobei **MB2**

„haarscharf“ die geforderte 40 °C-Bedingung erfüllt. Aufgrund der sehr hohen T_m -Differenz sollte bei Anwesenheit des Zielmoleküls das Gleichgewicht stark zur geöffneten MB-Struktur verschoben sein.

Im Zuge der ersten durchgeführten Zellexperimente wurden **MB2** und weitere hier nicht genauer aufgeführte MBs auf ihre Transfektion mittels *Metafectene (Biontex)* in verschiedenen Zellkulturen untersucht. Es zeigte sich, dass **MB2** deutlich schlechter in die Zellen gelangte als andere MBs, die mit den Chromophoren **Blau-1m** und **Gelb-4m** ausgestattet waren. Bei der Frage nach der Ursache der geminderten Zelltransfektion wurde angenommen, dass die niedrige T_m des **MB2**-Stammes (40.3 °C) dafür verantwortlich ist. Vermutlich liegt bei physiologischen Temperaturen ein deutlicher Anteil der **MB2**-Moleküle in teilweise oder vollständig geöffneter Struktur vor, was die Transfektionsrate drosseln könnte. Dieser Intuition folgend, wurden entsprechende MB-Designänderungen vorgenommen, die unter anderem **MB3** hervorbrachten. Diese Sonde weist zwar einen nicht ganz so überragenden Kontrastfaktor f wie **MB2** auf, doch konnte anhand von **MB3** eine sehr gute Transfektion bei diversen karzinogenen Zelllinien erhalten werden. Diese Eigenschaft in Kombination mit den zuvor beschriebenen Charakteristika der entwickelten MB trieben das gemeinsame Forschungsprojekt einen weiteren Schritt voran, sodass die im nächsten Abschnitt beschriebenen Zellaufnahmen ermöglicht wurden.

Zellexperimente mithilfe der "Molecular Beacon" (DKFZ)

Die wissenschaftlichen Studien von *Prof. Allgayer* und ihrer Arbeitsgruppe basieren auf der Untersuchung von Invasion und Metastasierung disseminierter Tumorzellen sowie auf der Erforschung von krebsspezifisch exprimierten miRNAs und deren regulatorische Funktionen bei der Pathogenese. Im Verlauf der Zusammenarbeit wurden die hergestellten MB an die Forscher des DKFZ weitergereicht. Beide Kooperationspartner besprachen aktuelle Forschungsergebnisse und gestatteten ein entsprechendes Zusammenwirken der jeweiligen Expertisen. Zu Beginn dieses Jahres wurden die hochentwickelten Sonden **MB1** und **MB3** dem Arbeitskreis *Allgayer*

übergeben. Ein zugleich erfolgter wissenschaftlicher Austausch im Hinblick auf spektroskopische Anforderungen für den Einsatz von **MB1** und **MB3** wie beispielsweise die optimalen Wellenlängenbereiche zur Anregung bzw. dem Auslesen von den vier verschiedenen Fluorophoren. Die Aufnahmen der anhand von **MB1** und **MB3** erfolgten Zellexperimente wurden erst kürzlich erhalten und sollen im Folgenden kurz präsentiert werden.

Bei den durchgeführten Versuchen erfolgten die Zelltransfektionen ebenfalls mit *Metafectene*. Dabei kamen verschiedene kolorektale Krebszelllinien zum Einsatz, die ein unterschiedliches Expressionsmuster der beiden miRNA miRNA-21 und miRNA-31 zeigen. Die nachfolgende Tabelle stellt die verwendeten Zelllinien zusammen und weist soweit literaturbekannt auf eine Überexpression sowie auf eine zellspezifisch besonders niedrige Konzentration eines der miRNA-Zielmoleküle hin. Hierbei wird zur Kennzeichnung einer erhöhten Expression das „Pluszeichen“ und im Gegenzug bei einer lediglich geringen miRNA-Bildung ein „Minuszeichen“ verwendet.

Zelllinie	Untersuchung an miRNA-	Expression der miRNA-
Colo 206f	21 und 31	– 21 ^[233]
Colo 320	21	– 31 ^[234] und – 21 ^[235,236]
RKO	21 und 31	+ 21 ^[233] und ++ 31 ^[234]
HCT 116	21 und 31	+ 31 ^[234,237] und ++ 21 ^[233]
DLD 1	31	+ 31 ^[237-239] und + 21

Tabelle 8: Kolorektale Krebszelllinien, die bei der Untersuchung der MB am DKFZ verwendet wurden.

Die Bildgebungen der MB in den lebenden Zellen erfolgten mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie und wurden an einem *Leica TCS SP5//* System vorgenommen. Die Anregung des Donorfarbstoffes erfolgte bei der für den Fluorophor charakteristischen Wellenlänge statt. **MB1** (mit **Grün-2m** / **Rot-6m** mit $\lambda = 450$ nm) diente der Visualisierung von miRNA-21, wohingegen **MB3** (mit **Blau-1m** / **Gelb-4m** mit $\lambda = 405$ nm) die miRNA-31 sichtbar machen sollte. Im Falle beider Sonden konnten

infolge einer Anregung die Emissionen des Donors als auch des Akzeptors registriert werden (**MB1** bei 530 und 620 nm bzw. **MB3** bei 480 und 580 nm). Die aufgezeichneten Daten wurden anschließend durch mehrfach übereinander gelegte Einzelbilder (*hyperstack*) mithilfe der Software *Image J* ausgewertet. Die Bearbeitung brachte je vier unterscheidbare Bilder einer Momentaufnahme pro Zellexperiment hervor. Anhand der nachfolgenden Abbildungen werden die verschiedenen Darstellungsmöglichkeiten erklärt sowie die Versuchsergebnisse mit wenigen Worten interpretiert.

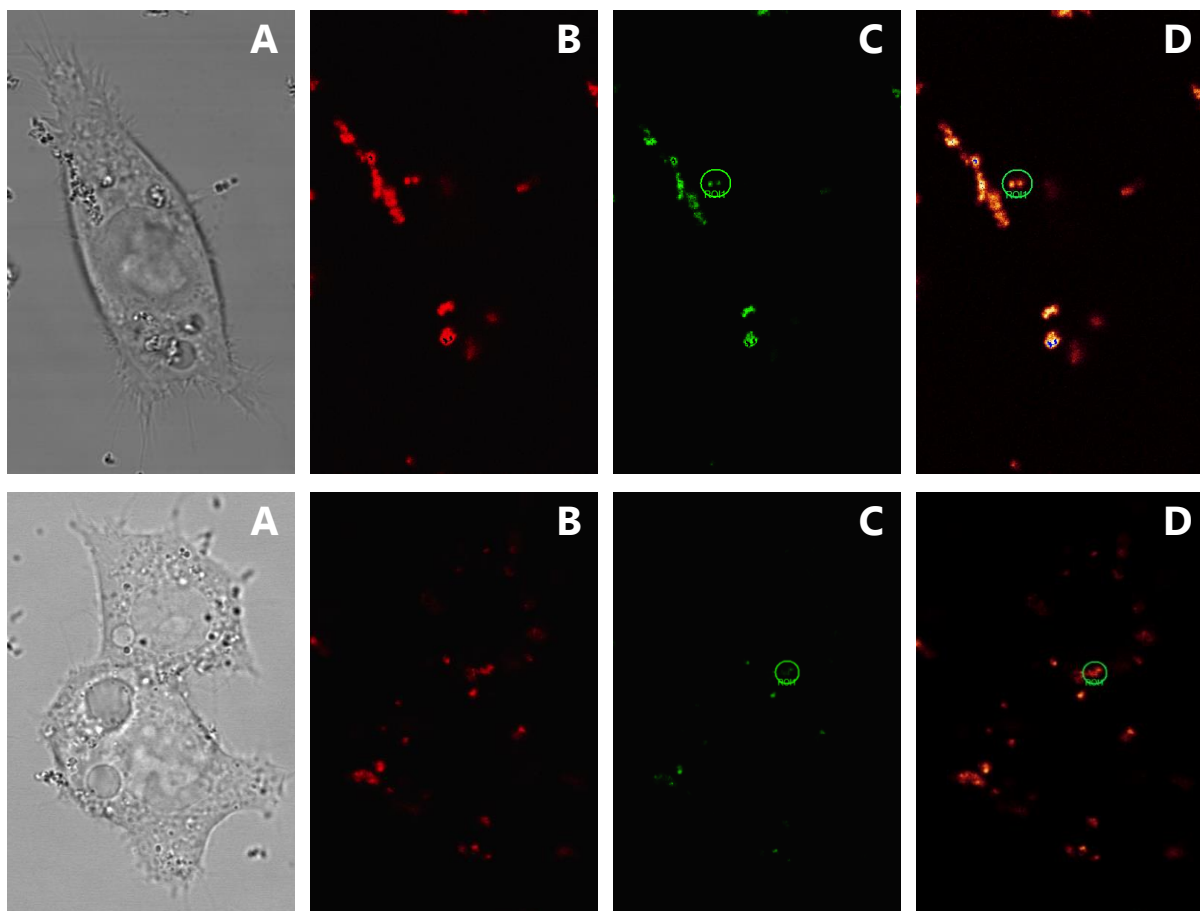


Abbildung 94: Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen mit der Zelllinie HTC 116 und **MB3** (oben) und **MB1** (unten). A = einfallendes Mikroskoplicht, B = Wellenlänge der Akzeptoremission, C = Wellenlänge der Donoremission und D = übereinandergelegte Bilder B und C.

Die Evaluation der Zellaufnahmen eines Experimentes erfolgt prinzipiell durch drei unterschiedlich gefärbte Einzelbilder einer beobachteten Zelle. Eine zusätzliche Aufnahme zeigt die Zelle bei dem einfallenden Licht des Mikroskops (A). Die rote Färbung in den Bildern zeigt die gemessene Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen

Emissionswellenlänge des Akzeptors an und entspricht somit dem geschlossenen MB (B). Die aufgezeichnete Fluoreszenzintensität der entsprechenden Emissionswellenlänge des Donors ist grün gefärbt und beschreibt die Bindung der entsprechenden miRNA anhand der geöffneten MB-Struktur (C). Die Überlagerung der beiden Aufnahmen B und C sind in den Bildern mit dem Buchstaben „D“ bezeichnet. Die eingezeichneten Kreise entsprechen dem Bereich, an dem der Wellenlängenscan durchgeführt wurde. Die Wellenlängenscans sind hier nicht aufgeführt.

Bei der Betrachtung der Aufnahmen von beiden MB innerhalb der Zelllinie HTC 116 (Abbildung 94) kann man die Donorfluoreszenz des **MB3** (oben) sehr deutlich erkennen. Bekräftigt wird die Bindung der korrespondierenden miRNA-31 aufgrund der Intensitätsunterschiede, die in dem überlagerten Bild (D) zu sehen sind. Mit Bezug auf Tabelle 8 ist eine Überexpression der miRNA-31 bei HTC 116 aber auch bei miRNA-21 bekannt. Die Bindung der miRNA-21 ist jedoch nur sehr schwach zu erkennen. Es sollte hier bemerkt werden, dass bisher zu dem jeweiligen Expressionsmuster der untersuchten Zelllinien von Seiten der Gruppe des DKFZ keine genauen Angaben gemacht worden sind. Die Literaturrecherche ergab die in der Tabelle zusammengefassten Daten. Es besteht die Möglichkeit, dass eventuell Mutationen am Wildtyp der Zelllinie vorgenommen wurden, die das Expressionsmuster verändern können. Im Anbetracht der großen Zahl entsprechender Fachliteratur war es nicht hundertprozentig möglich eine mutierte Zellkultur auszuschließen. Eine detaillierte Diskussion mit Kooperationspartner steht noch aus.

Auch die drei folgenden Abbildungen zeigen das Vorhandensein von gebundener miRNA sowie der geschlossenen Haarnadelstruktur. Die Angaben der Expressionsmuster in der Tabelle entsprechen weitestgehend den Ergebnissen, die aus den Zellexperimenten hervorgingen. Dies ist ein äußerst positives Resultat, dass jedoch noch von Seiten des DKFZ bekräftigt werden muss. Zudem ist auffällig, dass die gebundene Ziel-miRNA ebenfalls außerhalb der Zellen detektiert wurde. Eine Erklärung dafür ist auf Basis der Arbeiten von *Goel et al.* gegeben.^[240] Sie fanden heraus, dass miRNA-21 und auch miRNA-31 zu den sekretorischen miRNA gehören und aufgrund dessen zeitabhängig in das Kulturmedium gelangen. Bei den durchgeführten Zellexperimenten im DKFZ wurden die Zellen rund 8 Stunden mit den MB inkubiert, was einer vermutlich zur Sekretion der beiden miRNA führte.

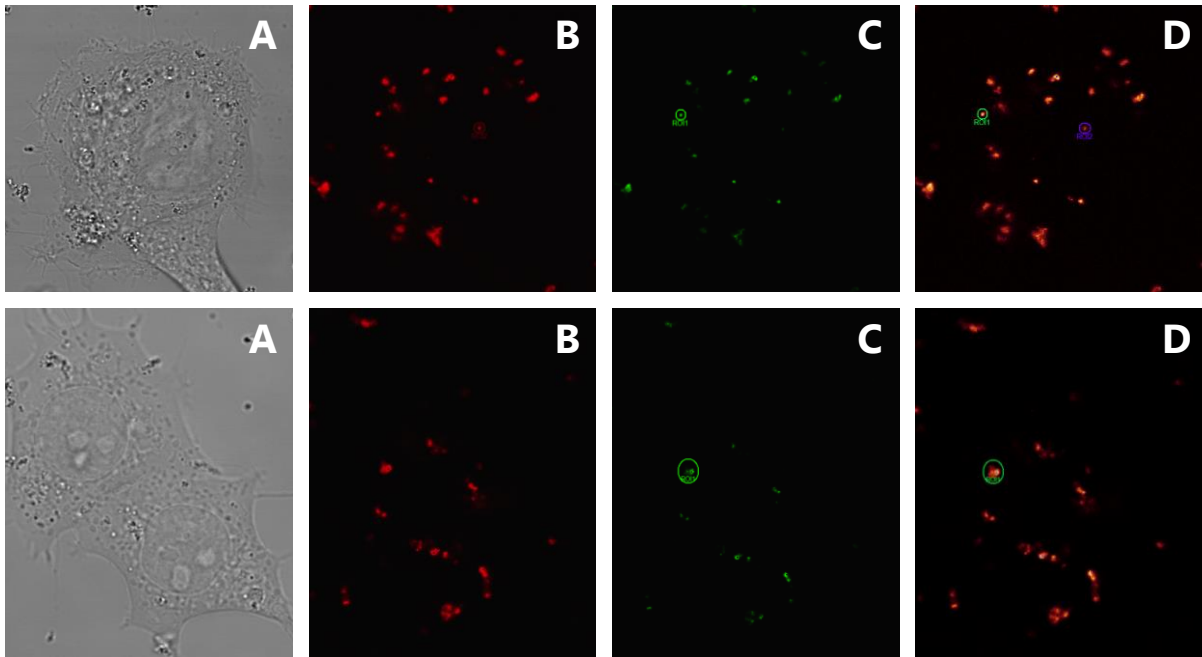


Abbildung 95: Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen mit der Zelllinie RKO und **MB3** (oben) und **MB1** (unten). A = einfallendes Mikroskoplicht, B = Wellenlänge der Akzeptoremission, C = Wellenlänge der Donoremission und D = übereinandergelagerte Bilder B und C.

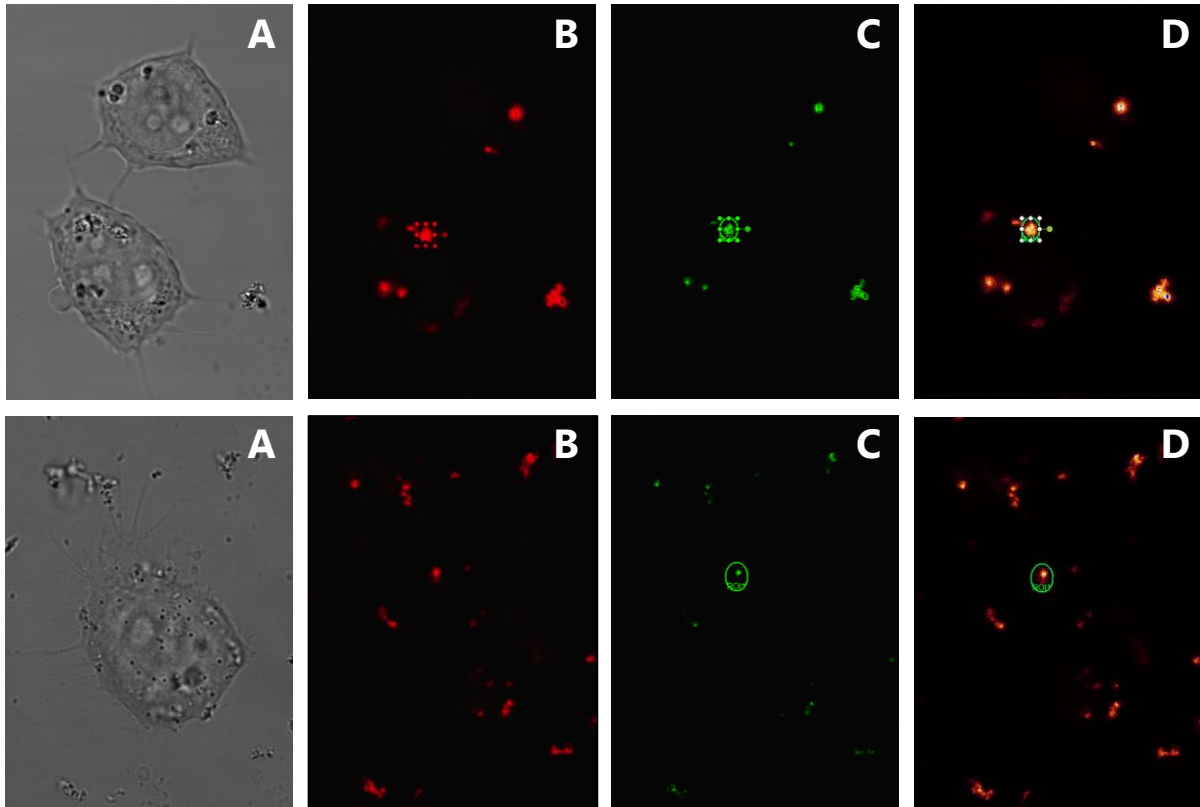


Abbildung 96: Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen mit der Zelllinie Colo 206f und **MB3** (oben) und **MB1** (unten). A = einfallendes Mikroskoplicht, B = Wellenlänge der Akzeptoremission, C = Wellenlänge der Donoremission und D = übereinandergelagerte Bilder B und C.

Beide miRNA werden in RKO-Zellen überexprimiert. Abbildung 95 gibt die entsprechenden Zellaufnahmen wieder. Einerseits lassen sich nur vereinzelte Areale detektierter miRNA ausmachen. Andererseits weisen diese jedoch eine beachtliche Intensität auf.

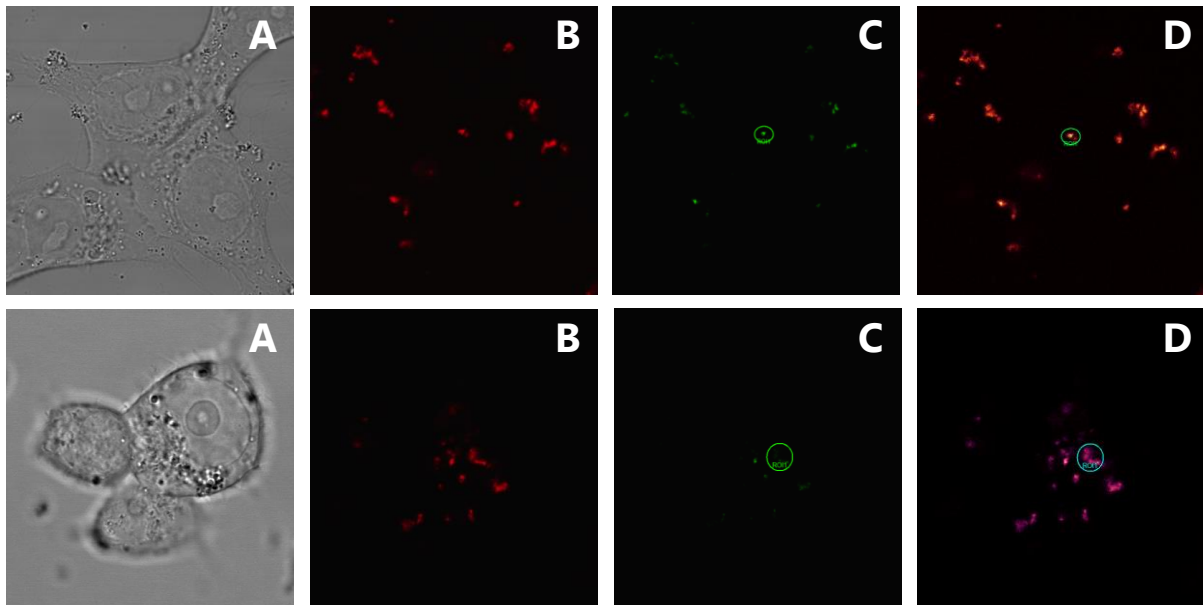


Abbildung 97: Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen mit den Zelllinien DLD 1 und **MB3** (oben) sowie mit Colo 320 und **MB1** (unten). A = einfallendes Mikroskoplicht, B = Wellenlänge der Akzeptoremission, C = Wellenlänge der Donoremission und D = übereinandergelegte Bilder B und C.

Da eindeutig die Bindung der beiden miRNA mit **MB1** und **MB3** nachgewiesen werden konnte, werden weitere Zellexperimente im Rahmen des Forschungsprojektes durchgeführt. Der nächste Schritt wird der parallelen Detektion von miRNA-21 und miRNA-31 innerhalb einer einzigen Zelle gewidmet.

Die erhaltenen Resultate dieses Projektes werden derzeit in einem Manuskript zusammengefasst und sollen zeitnah veröffentlicht werden.

Optimierung der Fluoreszenzintensität von Blau-1m

Es wurde im Verlauf der Dissertation mehrmals die Vermutung geäußert, dass eine verbleibende Rotationsfreiheit des Fluorophors **Blau-1m** bei Anbindung an DNA für seine geringe Emissionsintensität mit verantwortlich ist. In der Abbildung 98 sind die vier Strukturen **56** bis **59** gezeigt, die einer möglichen Weiterentwicklung des Chromophors Blau-1m entsprechen. Die Dimethinbrücke der Farbstoffe **56** bis **59** wurde durch cyclische Einheiten ersetzt, sodass keine Rotation um Einfachbindungen und somit *cis/trans*-Isomerisierung mehr auftreten kann. Derartige Strukturen würden zwar eine vergleichbare Fluoreszenz in Ab- und Anwesenheit von Oligonukleotiden zeigen, wären jedoch deutlich emissionsintensiver als der Vorgänger **Blau-1m**. Zur Unterdrückung der starken *cis/trans*-Isomerisierung von **Cy3** wurde ein ähnlicher Ansatz verfolgt und brachte den Cyaninfarbstoff **Cy3b** hervor.^[187]

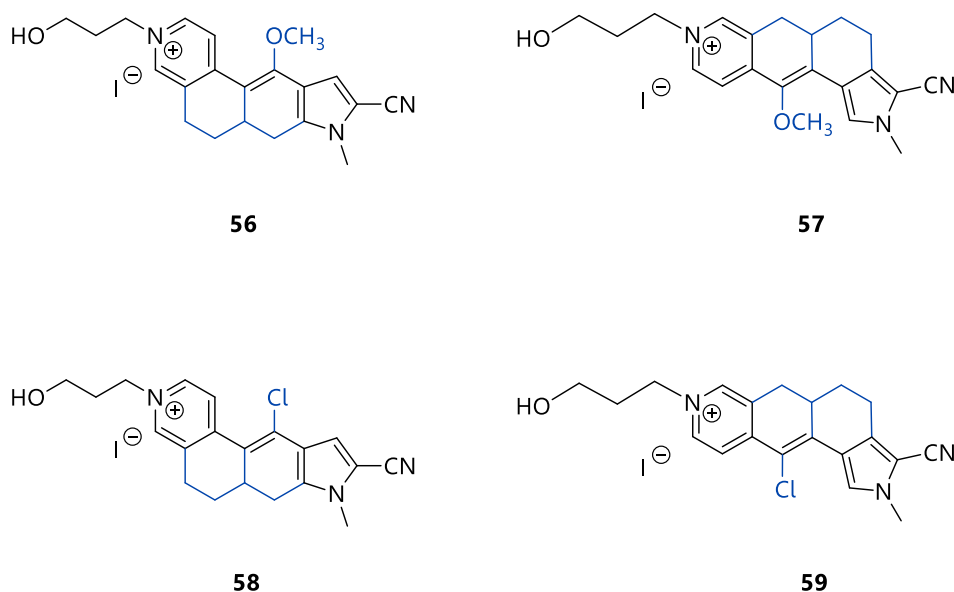


Abbildung 98: Strukturen möglicher weiterentwickelter Cyanine auf Basis von **Blau-1m**.

Weiterhin besitzen die Strukturen **56** bis **59** einen Methoxy- oder Chlorsubstituenten. Man konnte in verschiedenen Arbeiten zeigen, dass diese Substituenten eine Erhöhung der Photostabilität bewirken.^[241] Mit den hier gezeigten synthetischen Veränderungen des Farbstoffes **Blau-1m** ließen sich folglich die Photostabilität und die Fluoreszenzintensität enorm steigern.

Die Strategie eines anderen Lösungsansatzes basiert hingegen nicht auf dem Bestreben die schwache Fluoreszenz von **Blau-1m** zu verbessern, sondern verzichtet vollkommen auf die Verwendung des Farbstoffes **Blau-1m**. **Blau-1m** könnte demnach durch einen NIR-Farbstoff mit großer Emissionsintensität sowie hoher Photostabilität ersetzt werden. In einem solchen Fall wird das ET-Paar anhand von **Gelb-4m** und dem NIR-Farbstoff gebildet, bei dem **Gelb-4m** nun seinerseits als Donor und damit als Signal der Zielsequenzbindung fungiert. Eine derartige Fluorophorausstattung am Rückgrat des „*Molecular Beacon*“ würde dessen Anwendungsmöglichkeiten deutlich erweitern und beispielsweise eine Untersuchung tiefer liegender Gewebsschichten erlauben.

6.2 Strangaustausch mit *“Click”*-modifizierten **acpcPNA**-Sonden

In Kooperation mit *Prof. Dr. T. Vilaivan* sollten Pyrrolidinyl-PNA-Sonden (**acpcPNA**-Sonden) synthetisiert und anschließend postsynthetisch mithilfe der kupfer(I)katalysierten *„Click“*-Reaktion modifiziert werden. Im weiteren Verlauf der Zusammenarbeit wurde das Ziel verfolgt, die hergestellten Sonden bei der Fluoreszenzdetektion von DNA in zwei verschiedenen Anwendungen zu erproben. Die Synthese und Postmodifikation der **acpcPNA**-Sonden erfolgte dabei innerhalb eines von KHYS geförderten dreimonatigen Auslandsaufenthalts im Labor der Gruppe von *T. Vilaivan* an der Chulalongkorn Universität in Bangkok. An dieser Stelle soll nochmals ausdrücklich KHYS für die im Rahmen des Stipendiums bereitgestellten finanziellen Mittel gedankt werden, welche die Verwirklichung der beiden in Kapitel 6.2 und 6.3 beschriebenen Projekte unterstützten. Ebenso gilt der Dank *Prof. Dr. T. Vilaivan* für die Möglichkeit die **acpcPNA**-Synthese innerhalb seines Arbeitskreises zu erlernen und der freundlichen Unterstützung während des gesamten Auslandsaufenthalts.

Strangaustauschreaktionen zählen zu den biologisch relevanten und enzymatisch getriebenen Prozessen, die innerhalb von lebenden Zellen ablaufen.^[13,19,20,23,242-245] Zudem spielen diese Strangaustauschprozesse eine entscheidende Rolle im Forschungsgebiet der DNA-Nanotechnologie.^[246-249] Anhand aufeinanderfolgender Stranganlagerungs- und Austauschschritte konnte man die Selbstassemblierung von hochgradig geordneten DNA-Nanoarchitekturen dynamisch kontrollieren. Dazu gehören unter anderem DNA-Schalter,^[250-254] *DNA-walker*^[255-258] sowie auf DNA basierende logische Schaltungen.^[253,254,259-264]

Überdies hinaus konnte *Wagenknecht et al.* unter Verwendung der Cyaninfarbstoffe **TO** und **TR** DNA-Strangaustauschprozesse in Echtzeit beobachten, wobei das Kontrastverhältnis der Emissionsintensitäten zur Bestimmung der Effizienz des jeweilig erfolgten Strangaustausches herangezogen wurde.^[33] Das Ziel des nachfolgend erläuterten Kooperationsprojektes mit *Vilaivan* war, mittels Fluoreszenzspektroskopie den Strangaustausch von **acpcPNA/DNA**-Hybriden sichtbar zu machen. Zu diesem Zweck sollten die neu entwickelten Fluorophore postsynthetisch an **acpcPNA** sowie DNA geknüpft, anhand von ermittelten ET-Effizienzen sowie Farbkontrasten die Strangaustauschreaktionen untersucht werden.

Synthese und „Click“-Modifikation der acpcPNA-Fluoreszenzsonden

Die **acpcPNA** wurde an *Tentagel S-RAM* Harz aus den jeweiligen Fmoc-geschützten Monomeren von Hand synthetisiert. Die einzelnen Syntheseschritte erfolgten nach bereits publiziertem^[163,265] und etabliertem Verlauf, von Entschützung, Kupplung, *Capping*. In der **acpcPNA** bilden zwei alternierende cyclische Bausteine, die Aminosäure *D*-Prolin und (1*S*,2*S*)-2-Amino-1-cyclopentancarbonsäure (*Spacer*), das Rückgrat des Oligonukleotid-Analogs. An einer gewünschten Position innerhalb der Basenabfolge wurde anstelle des erwähnten Abstandshalters (*Spacer*) eine (3*R*,4*S*)-3-Aminopyrrolidin-4-carbonsäure-Einheit (*APC-Spacer*) mit der naszierenden **acpcPNA** verbunden (siehe Kapitel 3.5, Abbildung 20). Diese Modifikation erlaubt eine spätere kupfer(I)katalysierte „Click“-Reaktion (CuAAC) zwischen der **acpcPNA** und einem Fluorophor. Der *C*-Terminus der PNA-Stränge wurde mit fünf Lysin-Resten versehen, da diese Aminosäurereste allgemein die Wasserlöslichkeit von PNA steigern, und zudem deren Zellpermeabilität erhöhen können. Nach erfolgreicher PNA-Synthese wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt und die freie Aminofunktion acetyliert. Die Trifluoracetyl-Gruppe am *APC-Spacer* sowie die Seitenketten der Nucleobasen wurden anschließend mit einer Mischung aus Ammoniak und 1,4-Dioxan bei 60 °C entschützt (Abbildung 99). Bei der darauffolgenden reduktiven Alkylierung konnte der *APC-Spacer* mit der Verbindungseinheit (Linker) versehen werden, welche die terminale Alkinfunktion für die CuAAC mit dem Farbstoffazid bereitstellt. Die **acpcPNA** wurde dazu mit einer methanolischen Lösung aus dem Aldehyd 4-Pentin-1-al in Anwesenheit von Natriumcyanoborhydrid und konzentrierter Essigsäure bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht.^[171] Der Aldehyd wurde zuvor durch Oxidation von 4-Pentin-1-ol mit IBX (2-Iodoxybenzoesäure) gewonnen (Kapitel 8.3). Die kupfer(I)katalysierte „Click“-Reaktion zur Modifikation des *APC-Spacers* der **acpcPNA** wurde in Anlehnung an die in Kapitel 6.1 vorgestellte CuAAC an der festen Phase vorgenommen. Im Anschluss wurde die modifizierte **acpcPNA** mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten und mittels HPLC gereinigt. Abbildung 99 zeigt exemplarisch die Verknüpfung des Styryl-Cyanins **Blau-1m** mit dem alkinfunktionalisierten Linker am *APC-Spacer* der **acpcPNA**-Sonde.

Strangaustausch mit modifizierten acpc-PNA-Sonden

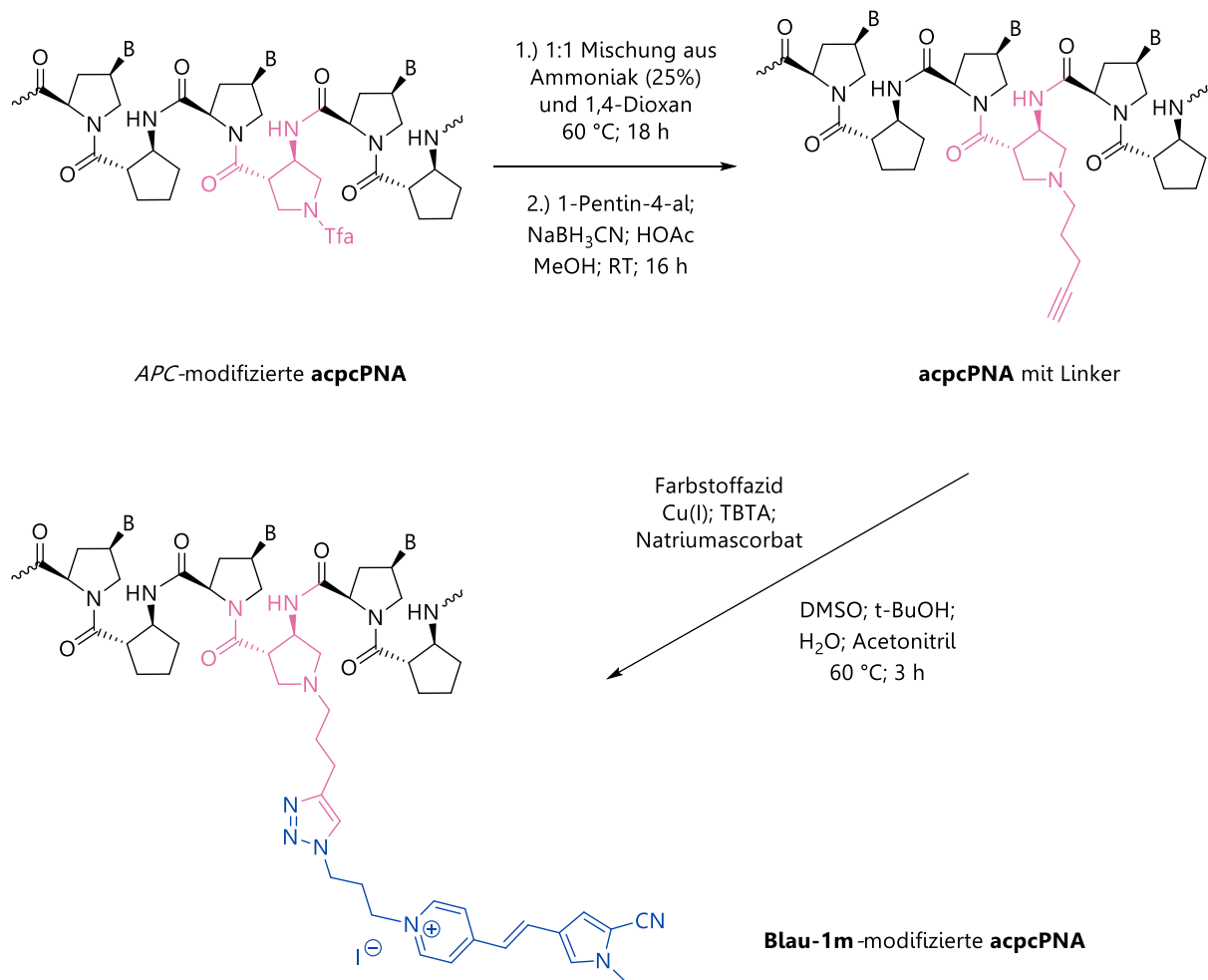


Abbildung 99: Gezeigt ist die Struktur der *APC*-modifizierten **acpcPNA**, das Reaktionsschema der reduktiven Alkylierung des *APC*-Spacers (rosa) und die CuAAC zwischen der **acpcPNA** und **Blau-1m**.

Strangaustausch mit acpcPNA

Vorerst soll kurz anhand von Abbildung 100 die Ausarbeitung der Strangaustauschexperimente nähergebracht werden. Mit dem Ziel, zwei aufeinanderfolgende Strangaustauschreaktionen mit der Fluoreszenzspektroskopie zu verfolgen, werden entsprechend zwei Emissionsfarbwechsel benötigt, die den jeweiligen Austausch anzeigen können. Die Basis der Versuchsanordnung bildet ein PNA-Strang, der aus 14 Basen aufgebaut und mit dem Farbstoff **Blau-1m** modifiziert ist. Dieses PNA-Oligonukleotid wird mit einem unmodifizierten DNA-7mer hybridisiert, wobei sich das PNA/DNA-**Hybrid1** bildet. Zu Beginn des Experimentes wird das

Hybrid1 vorgelegt. Durch Anregung dieses Duplexes bei einer für **Blau-1m** charakteristischen Wellenlänge kann man die Fluoreszenzintensität der blauen Emission detektieren. Im Zuge des ersten Strangaustausches wird ein **Gelb-4m**-modifizierter DNA-Strang zugegeben, der um drei Nukleotide länger als die unmodifizierte DNA ist und somit 10 Basen umfasst. Der initiale Strangaustausch wird durch einen Gewinn an freier Energie vorangetrieben, der durch Bindung des komplementären 10mers an die PNA-Sonde erhalten wird. Als direkte Folge des Austausches wird das **Hybrid2** gebildet, und somit die Distanz zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor verringert. Die räumliche Nähe der beiden Chromophore im Heteroduplex ermöglicht den Energietransfer (ET) vom angeregten Donor **Blau-1m** auf den Akzeptor **Gelb-4m** und resultiert in einem Intensitätsanstieg der gelben Akzeptoremission. Durch die Zugabe des 14mer-DNA-Stranges, der mit dem Cyanin **TR-CN** versehen ist, wird der zweite Strangaustausch realisiert. Infolgedessen wird der Abstand des blauen Donors zu **Gelb-4m** vergrößert. Hingegen gelangen **Blau-1m** und **TR-CN** bei Generierung des **Hybrids3** näher zueinander, wodurch ein Fluoreszenzfarbwechsel von gelb nach rot hervorgerufen wird (Abbildung 100).

158

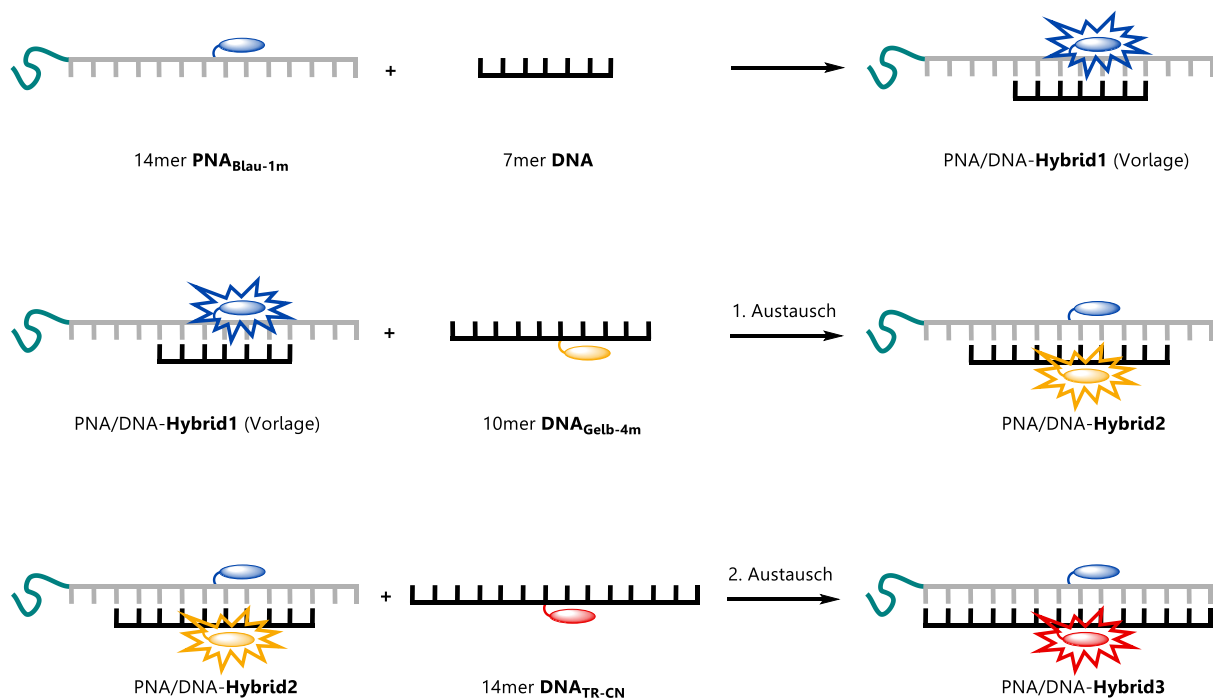


Abbildung 100: Schema zu den beabsichtigten Strangaustauschexperimenten.

Im Verlauf der vorangegangenen Kapitel dieser Dissertation wurden die Fluorophore der modifizierten Oligonukleotide ausschließlich mit der 2'-Position der Ribose verbunden. Im Gegensatz dazu besteht bei der Verknüpfung des Farbstoffes mit der **acpcPNA** die Möglichkeit, den zur Chromophoranbindung erforderlichen *APC-Spacer* entweder in Richtung *C*- oder *N*-Terminus der gewünschten Base einzuführen. Mit dem Ziel, in den DNA/PNA-Hybriden einen optimalen Donor-Akzeptor-Abstand und folglich effektiven Energietransfer zu erhalten, wurden zwei 14mer **acpcPNA**-Stränge für die Strangaustauschexperimente hergestellt, die sich durch die Position des *APC-Spacers* der zu modifizierenden Base unterscheiden (Abbildung 101).

PNA-Stränge:

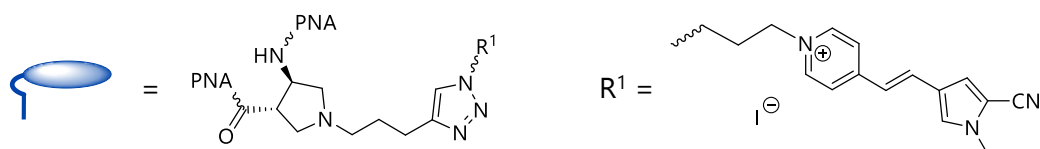
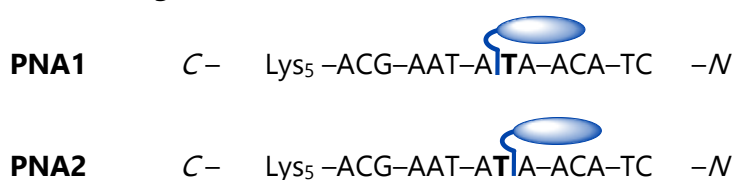



Abbildung 101: Sequenzen von **PNA1** und **PNA2**. Die Modifikation mit **Blau-1m** befindet sich an dem *C*- bzw. *N*-terminal zur mittleren Base **T** liegenden *APC-Spacer*.

Zudem erfolgte die Farbstoffverknüpfung mit den 2'-Riboseresten der 10mer- und 14mer-DNA ebenfalls an verschiedenen Nukleotiden, sodass eine zusätzliche Variation der Distanz zwischen Donor und Akzeptormolekül verwirklicht wurde. Besonderes Interesse galt der im Zuge der Strangaustauschreaktionen generierten Heteroduplexe. Diese gestatteten erste spektroskopische Daten doppelt modifizierter **acpcPNA/DNA**-Hybriden zu erfassen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden ausschließlich einfach modifizierte Hybride aus **acpcPNA** und **DNA** charakterisiert. Deshalb sollten die Auswirkungen der Abstandänderungen auf die erhaltenen ET-Effizienzen

besonders sorgfältig ermittelt und verglichen werden. In der nächsten Abbildung sind die Sequenzen der hier besprochenen DNA-Stränge dargestellt.

DNA-Stränge:

DNA7 5'– TA– TAT –TG – 3'

DNA 5'– C–TTA–  –TGT – 3'

DNA8  –UAT–

DNA9  –TAU–

DNA10  –TAT–

DNA 5'– TGC–TTA–  –TGT–AG – 3'

DNA11  –UAT–

DNA12  –TAU–

DNA13  –TAT–

DNA14 3'– ACG–AAT–ATA–ACA–TC – 5'

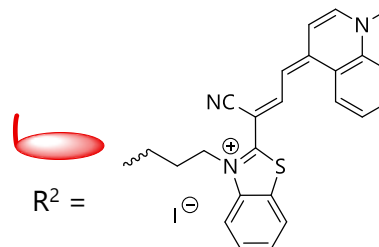
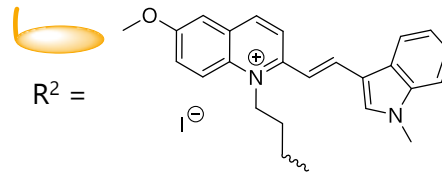
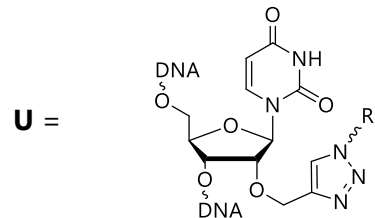


Abbildung 102: Sequenzen der verwendeten DNA-Stränge. 7mer **DNA7**, 10mere **DNA8** bis **DNA10** und 14mere **DNA11** bis **DNA13**. Die Modifikationen erfolgten mit **Gelb-4m** bzw. mit **TR-CN**. **DNA14** entspricht der Nukleinsäuresequenz der PNA-Stränge.

In Anlehnung an die in Abbildung 100 dargestellte Vorgehensweise wurden die entsprechenden Versuche zum Strangaustausch durchgeführt und die

spektroskopischen Daten aufgezeichnet. Im weiteren Verlauf des Kapitels werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert und verglichen.

Die **Blau-1m**-modifizierten Sonden **PNA1** und **PNA2** wurden mit Pufferlösung verdünnt (2.5 μM in 10 mM NaP_i -Puffer; pH = 7), mit genau 1.0 Äquivalent (2.5 μM) des unmodifizierten 7mer-DNA-Stranges **DNA7** versetzt und zum entsprechenden Heteroduplex **PNA1-DNA7** bzw. **PNA2-DNA7** hybridisiert. Auf den Zusatz von NaCl wurde gänzlich verzichtet, da hier nicht genauer gezeigte Vorversuche einen effizienteren ET unter NaCl-freien Bedingungen anzeigten. Wie zuvor bereits erwähnt, lieferte die DNA-Synthese jeweils zwei komplementäre DNA-10mere sowie 14mere und führte folglich zu vier getrennt voneinander untersuchten Proben.

Die **PNA1-DNA7** bzw. **PNA2-DNA7** Duplexlösungen dienten als Startpunkt des ersten Strangaustausches. Im Anschluss an die Aufzeichnung eines Absorptions- und Emissionsspektrums der entsprechenden Ausgangslösung wurden 1.0 Äquivalent des 10mer-Stranges **DNA8** oder **DNA9** zugegeben, gründlich gemischt und die Entwicklung der Fluoreszenzintensität auf Basis aneinander gereihter Messungen solange verfolgt, bis eine konstante Emissionsintensität erreicht wurde. Der Endpunkt des ersten Strangaustausches wird durch das Hybrid **PNA1-DNA8** repräsentiert (oder **PNA1-DNA9** bzw. **PNA2-DNA8** oder **PNA2-DNA9**) und bildet die Basis der Probe eingangs des zweiten Austauschprozesses. Bei dieser wurde 1.0 Äquivalent eines **TR-CN**-modifizierten 14mers zugesetzt und gleichfalls der Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit dokumentiert. Der Ersatz des kürzeren DNA-10mers durch das 14mer resultierte in der Bildung des finalen Heteroduplexes **PNA1-DNA11** (oder **PNA1-DNA12** sowie beide analoge Hybride mit **PNA2**).

Nachfolgend ist der Intensitätsverlauf der Fluoreszenz der zwei Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA8** und **DNA11** repräsentativ dargestellt. In Kapitel 8.8 sind die zeitlichen Entwicklungen der Emissionsintensität beider Austauschprozesse der anderen drei PNA/DNA-Kombinationen abgebildet. Zudem befindet sich in Kapitel 8.8 eine Übersicht (Tabelle 21), welche die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Messungen zusammenfasst. Ebenso enthält die Tabelle die Schmelztemperaturen (T_m) der Heteroduplexe. Die T_m -Bestimmungen der Hybride mit einem 10- oder 14mer DNA-Gegenstrang wurden von Probelösungen

aufgezeichnet, die kein 7mer enthielten, sondern wurden ausschließlich in einem Verhältnis 1:1 der PNA zu DNA gemessen.

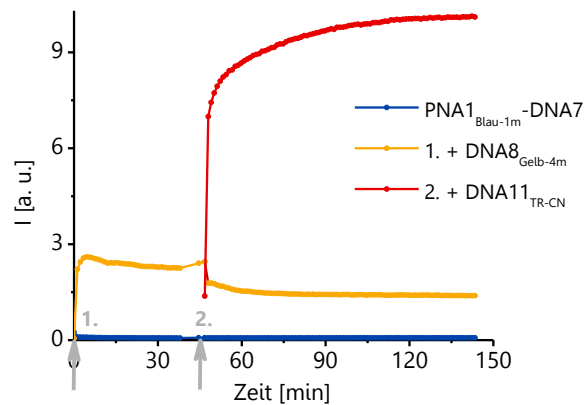


Abbildung 103: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität infolge der beiden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA8** (1.) und **DNA11** (2.).

Anhand des zeitlichen Verlaufs in Abbildung 103 kann man erkennen, dass der erste Strangaustausch innerhalb von wenigen Minuten erfolgt. Der zweite Austauschprozess von **PNA1-DNA8** mit **DNA11** verläuft deutlich langsamer, und das Gleichgewicht ist hier erst nach ca. 90 Minuten erreicht. Dies lässt sich durch die gesteigerte Bindungsaffinität des 10mer Hybrides im Vergleich zum 7mer erklären. Der 7mer-Heteroduplex besitzt eine T_m von 71.0 °C (Tabelle 21). Die längeren Hybride **PNA1-DNA8** und **PNA1-DNA11** schmelzen erst bei 78.2 °C bzw. bei einer Temperatur von über 90 °C. Unter denselben Bedingungen hat der 14mer-Homoduplex **DNA14-DNA11** eine T_m von lediglich 32.7 °C, was einer Temperaturdifferenz von über 55 °C entspricht. Diese Resultate bestätigen die außergewöhnlich hohe Bindungsstärke zwischen der **acpcPNA** und der DNA.

Bei genauer Betrachtung des Intensitätsverlaufs vom initialen Strangaustausch stellt man fest, dass die Fluoreszenz anfangs auf einen sehr hohen Wert ansteigt und anschließend leicht abfällt bis die finale Emissionsintensität erreicht ist. Dieses Verhalten wurde bei drei der vier PNA/DNA-Kombinationen beobachtet und ausschließlich beim Austauschprozess mit DNA-10meren, die mit dem Fluorophor **Gelb-4m** ausgestattet sind. Die vier Verlaufskurven sind in Abbildung 104 (links) vergrößert dargestellt.

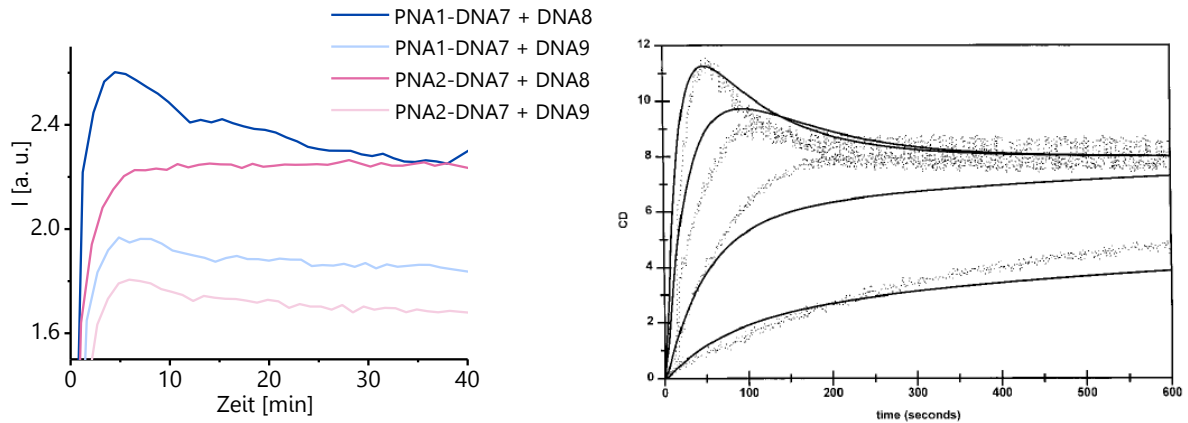


Abbildung 104: Links: Vergleich der Verlaufskurven des ersten Strangaustausches der vier PNA/DNA-Kombinationen. Rechts: CD-Spektren der Triplexinvasion von **aegPNA** in doppelsträngige DNA.^[266]

Auf Basis von Literaturrecherchen wurde herausgefunden, dass *Nielsen et al.* ähnliche Beobachtungen bei der Triplexinvasion von **aegPNA** in doppelsträngige DNA machte.^[266] Er verfolgte den Prozess mithilfe der CD-Spektroskopie (Abbildung 104, rechts) und erläuterte den Sachverhalt genauer. Es wurde angenommen, dass sich ein Intermediat bildet, welches sich aus dem DNA-Doppelstrang und mehreren PNA-Strängen zusammensetzt. Wie bereits in Kapitel 3.5 erwähnt wurde, findet zwischen den **acpcPNA**-Strängen keine Bindung statt, weshalb *Nielsens* Erklärung den Verlaufskurven der hier gezeigten Strangaustauschexperimente nicht vollkommen genügt. Stattdessen wird bei den gezeigten Daten von der Bildung einer oder mehrerer intermediärer Strukturen ausgegangen, die aus einem **acpcPNA**-Strang (A) und mehr als einem DNA-Strang (B) gebildet werden (Abbildung 105).

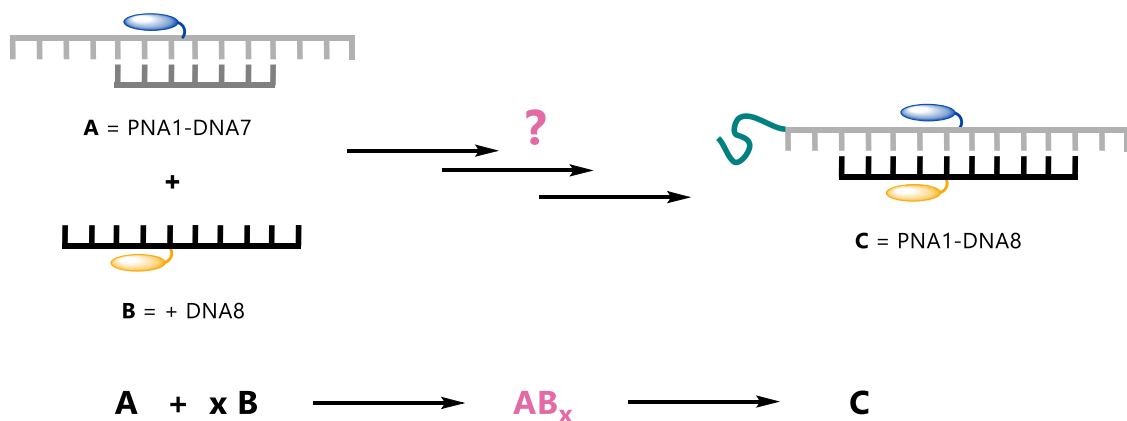
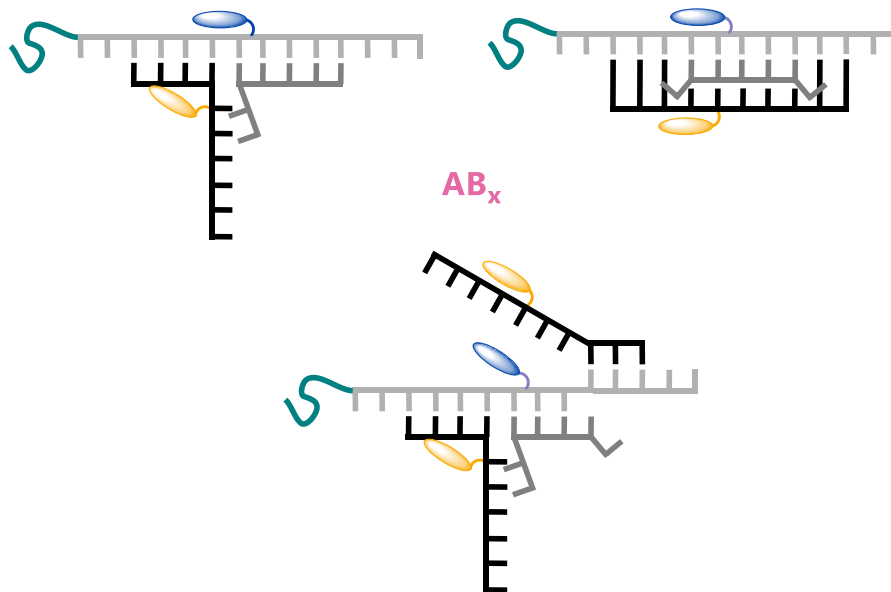


Abbildung 105: Illustration des ersten Strangaustausches am Beispiel von **PNA1-DNA7** mit **DNA8**.

Abbildung 106: Strukturen der vermutlich gebildeten Intermediate AB_x .

In Abbildung 106 sind die vermutlich entstehenden Intermediate (AB_x) veranschaulicht. Die beiden oben gezeigten intermediären AB_x -Strukturen beschreiben die Möglichkeit, dass sich initial Komplexe ausbilden, in denen der Abstand oder die Orientierung der Übergangsdipolmomente der Farbstoffe einen für Energietransfer des Paares günstiger ist verglichen mit dem Abstand oder Dipolmomentausrichtungen im finalen Hybrid. Im Falle des unten in Abbildung 106 gezeigten Intermediates wird davon ausgegangen, dass im anfänglichen Komplex zwei DNA-10mere ihre verknüpften Fluorophore **Gelb-4m** in räumliche Nähe zu dem Donorfarbstoff **Blau-1m** der PNA bringen können, und somit ein ET zu beiden Akzeptoren erfolgen kann. Da die Experimente im Strangverhältnis 1:1 durchgeführt wurden, sinkt die Fluoreszenzintensität infolge der Auflösung jeglicher intermediärer AB_x -Strukturen wieder.

Im der nächsten Abbildung sind beispielhaft die Absorptions- bzw. Emissionsspektren der beiden Strangaustauschreaktionen mit **PNA1-DNA7** durch **DNA8** und folgend durch **DNA11** dargestellt. In Kapitel 8.8 sind die Absorptions- bzw. Emissionsspektren der beiden Austauschprozesse der weiteren drei PNA/DNA-Kombinationen gezeigt.

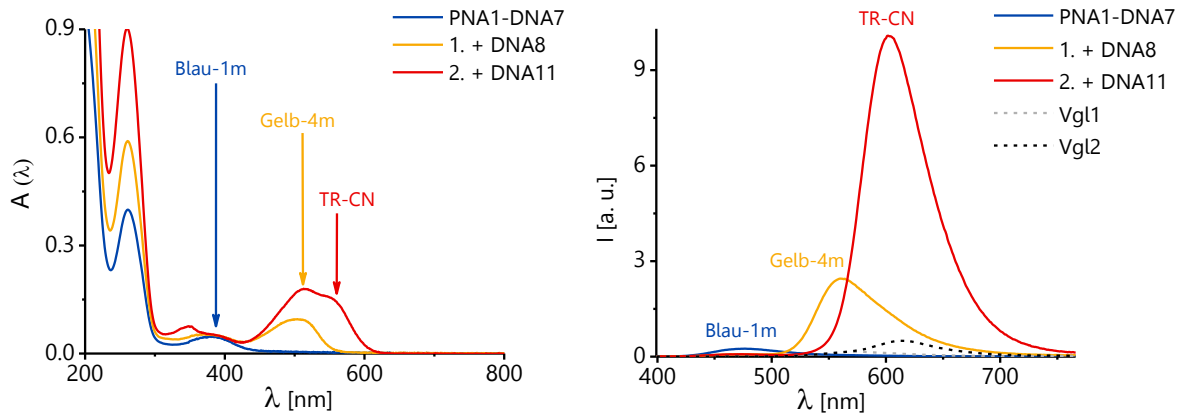


Abbildung 107: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA8** und anschließend mit **DNA11**. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA8** (Vgl1) und aus **DNA7-DNA8-DNA11** (Vgl2).

Zur Beurteilung des erfolgten Energietransfers wurde neben den Energietransfer-Effizienzen der Anstiegfaktor f_{Anstieg} und auch der Kontrastfaktor $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ ermittelt. Die Werte des Kontrastfaktors $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ wurden anhand der Gleichung 5.1 berechnet und sind in Abbildung 108 veranschaulicht.

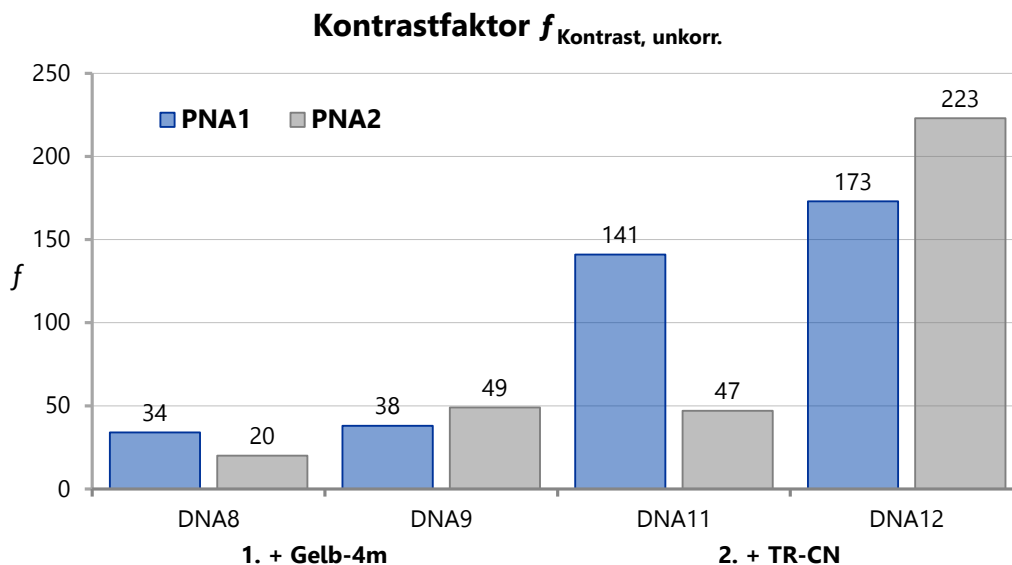


Abbildung 108: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung der Kontrastfaktoren $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ aus den Strangaustauschexperimenten.

Das Kontrastverhältnis der blau-gelben Kombinationen ist gut, erreicht jedoch nicht ganz die Werte entsprechender DNA/DNA-Homoduplexe (siehe Kapitel 5.3). Hingegen

wurden bei den Paaren mit dem Akzeptor **TR-CN** außerordentlich hohe Kontraste bis hin zu 1:223 erzielt und sind somit im Vergleich zu den DNA/DNA-Homoduplexen auffallend größer. Einzig die Kombination **PNA2-DNA11** zeigt einen $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$, der nur zu ungefähr 30 % an die Werte der anderen blau-roten Paare heranreicht. Zugleich besitzt **PNA2-DNA11** mit 82.7 °C (Tabelle 21) eine deutlich niedrigere T_m verglichen mit allen anderen 14mer-Hybriden, deren T_m größer als 90 °C ist. Es wird angenommen, dass sich im Heteroduplex **PNA2-DNA11** Donor- und der Akzeptorfarbstoff nicht optimal zueinander ausrichten können, was sich in dem ineffizienteren ET widerspiegelt.

Wie schon weiter oben erwähnt, wurde ein Anstiegsfaktor ermittelt. Der Anstiegsfaktor f_{Anstieg} gibt das Vielfache der Emissionsintensität einer Vergleichslösung an, die den gestrichelten Linien des Fluoreszenzspektrums entsprechen. Die beiden Vergleichslösungen bestehen aus allen Komponenten der Probelösung, wobei einzig die donormodifizierte PNA nicht zugegen ist. Vergleichslösung 1 (**DNA7-DNA8**, Vgl1) und Vergleichslösung 2 (**DNA7-DNA8-DNA11**, Vgl2) wurden bei der Anregungswellenlänge des Donors angeregt und die Emissionsintensität bei den entsprechenden Akzeptorfluoreszenzmaxima bestimmt (I_{Vgl1} bzw. I_{Vgl2}). Dieser Wert wird bei der Berechnung des Parameters f_{Anstieg} verwendet (Gleichung 6.2).

$$f_{\text{Anstieg}} = \frac{I_{\text{Ak}}}{I_{\text{Vgl}}} \quad (6.2)$$

- I_{Ak} : Fluoreszenzintensität des Akzeptors infolge des ETs vom angeregten Donor ($\lambda_{\text{exc.Do.}}$) im zweifach modifizierten PNA/DNA-Hybrid
- I_{Vgl} : Fluoreszenzintensität des Akzeptors der entsprechenden Vergleichslösung infolge der Anregung bei der Anregungswellenlänge des Donors ($\lambda_{\text{exc.Do.}}$).

Die ermittelten Anstiegsfaktoren sind in Abbildung 109 einander gegenüber gestellt und bewegen sich ungefähr zwischen 10 und 20.

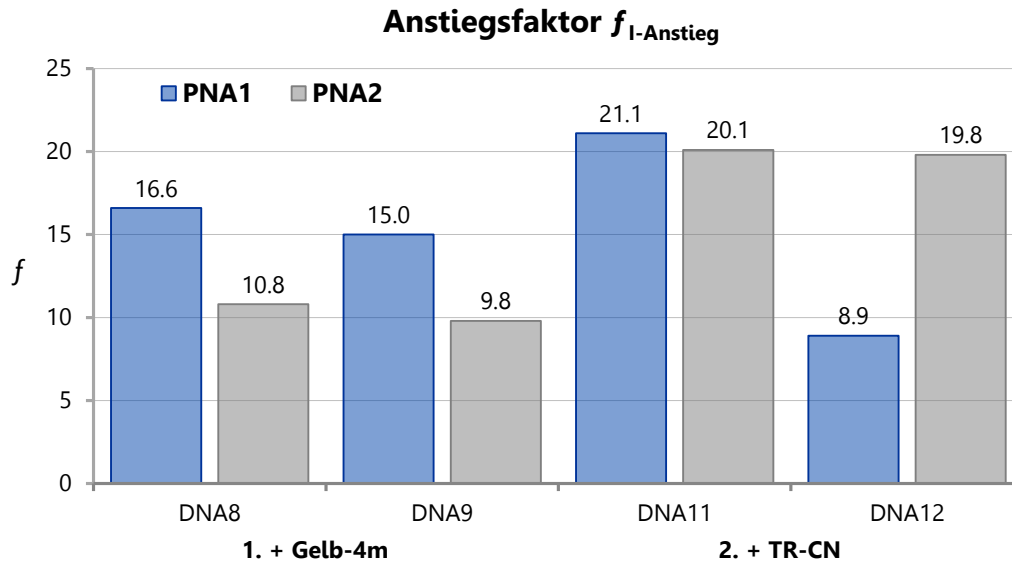


Abbildung 109: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung der Kontrastfaktoren f_{Anstieg} aus den Strangaustauschexperimenten.

An dieser Stelle soll sehr kurz auf eine Besonderheit hingewiesen werden, welche die abweichende PNA/DNA-Hybridstruktur im Vergleich zur herkömmlichen B-DNA-Doppelhelix wiedergibt.

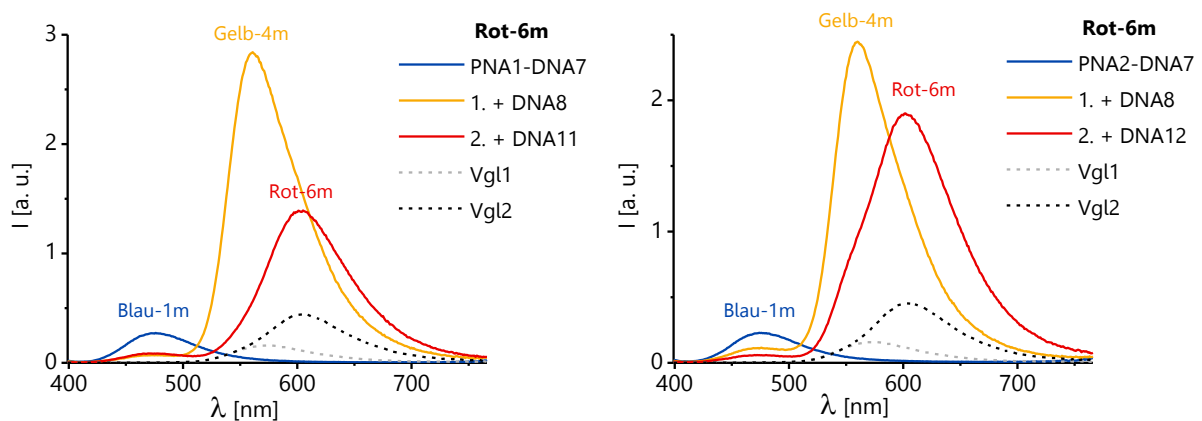


Abbildung 110: Emissionsspektren der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA8** und **DNA11_{Rot-6m}** (links) sowie Strangaustauschreaktionen von **PNA2-DNA7** mit **DNA8** und **DNA12_{Rot-6m}** (rechts). Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA8** (Vgl1), aus **DNA7-DNA8-DNA11_{Rot-6m}** (Vgl2a) und aus **DNA7-DNA8-DNA12_{Rot-6m}**.

Im Verlauf dieses Kapitels wurde ausschließlich von den DNA-14meren berichtet, die mit dem roten Emitter **TR-CN** versehen wurden. Hingegen fanden die Strangaustauschexperimente ebenso mit 14mer-DNA-Strängen statt, die mit dem

Farbstoff **Rot-6m** modifiziert wurden. Bei der Untersuchung des doppelt modifizierten DNA/DNA-Homoduplexes **DNA5** in Kapitel 5.3 zeigte der Akzeptor **Rot-6m** in der Kombination mit allen vier Donorfarbstoffen einen exzellenten Energietransfer. Interessanterweise ist dieses Verhalten von **Rot-6m** in PNA/DNA-Hybriden nicht vorhanden. Ganz im Gegenteil findet hier ein sehr schlechter Energietransfer zwischen dem Paar **Blau-1m** / **Rot-6m** statt, was sich den beiden Fluoreszenzspektren der Abbildung 110 und der entsprechenden ET-Effizienz aus Abbildung 111 entnehmen lässt. Offensichtlich ist der Phenylring in der gebildeten Helix des Hybrids äußerst ungünstig und erschwert die optimale Ausrichtung der Übergangsdipolmomente des ET-Paares zueinander.

Die finale Evaluation des erfolgten Energietransfers innerhalb der Hybridstrukturen wurde anhand ET-Effizienzen auf Basis der Bestimmung von Fluoreszenzlebenszeiten ermittelt. Hierbei wurde die Messung und Berechnung analog zu den Bestimmungen der DNA/DNA-Homodimere in Kapitel 5.3 durchgeführt. Die Spektren der Überlappungsintegrale von **PNA1** und **PNA2** in Verbindung mit den DNA-Gegensträngen, die Abklingkurven der Fluoreszenzlebenszeitmessungen der Hybride sowie sämtliche erhaltenen Werte und deren Standardabweichungen sind in Tabellen des Kapitels 8.8 aufgelistet. Im Folgenden wird kurz auf die Resultate eingegangen, die in Abbildung 111 veranschaulicht sind.

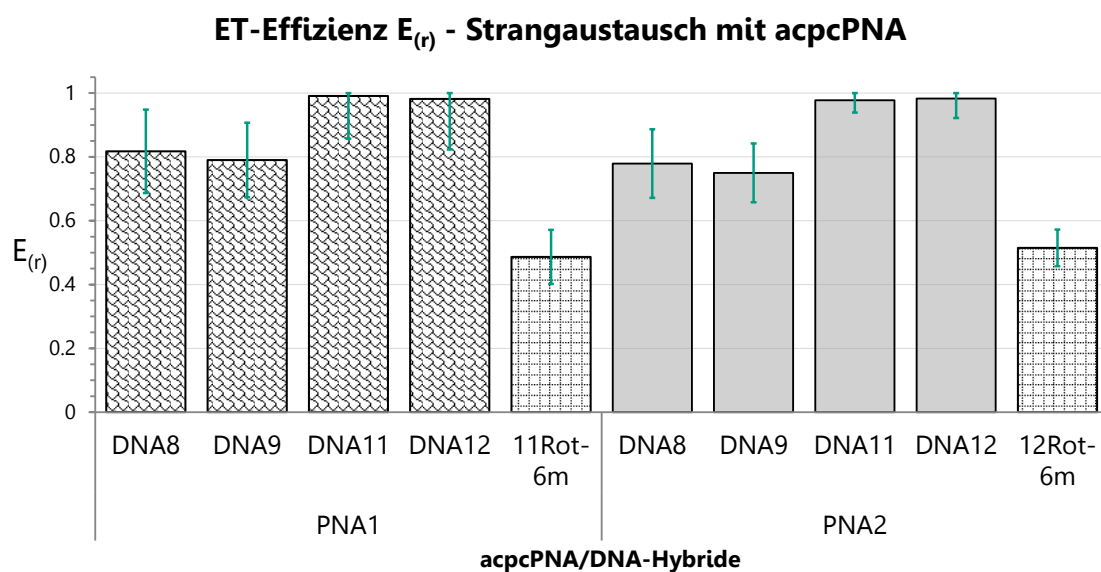


Abbildung 111: Gegenüberstellung der ET-Effizienzen der PNA/DNA-Heteroduplexe, die aus den Fluoreszenzlebenszeiten berechnet wurden.

Die ermittelten ET-Effizienzen liegen bei allen Paarungen mit **TR-CN** bei hervorragenden 0.99. Dieser Wert bestätigt die außergewöhnlich hohen Farbkontraste der entsprechenden ET-Paare. Die blau-gelben Kombinationen besitzen eine ET-Effizienz, die sich in einem Bereich von 0.75 bis 0.82 bewegt. Dies entspricht ebenfalls den Ergebnissen, die im Rahmen von $f_{\text{Kontrast,unkorr.}}$ bereits diskutiert wurden. Bemerkenswerterweise wiesen beide Fluorophorkombinationen bei den Homodimeren **DNA5_{Blau-1m+TR-CN}** sowie **DNA5_{Blau-1m+Gelb-4m}** in Kapitel 5.3 eine Effizienz von 0.85 auf. Die unterschiedlichen Effizienzwerte im direkten Vergleich zu den Hybriden beruht auf der unterschiedlichen Architektur der Helix, die sich aus einem Homo- oder Heteroduplex der beiden Nukleinsäuren bildet. Die strukturellen Gegebenheiten im PNA/DNA-Hybrid fördern den Energietransfer von **Blau-1m** und **TR-CN**, drosseln ihn hingegen wenn man den Akzeptor durch **Gelb-4m** ersetzt. Ein weiteres Mal bestätigt sich der große Einfluss der Helixstruktur auf die Orientierung der Fluorophor-Übergangsdipolmomente. Gleichzeitig liefert diese Tatsache ein Beweis für das entscheidende Zusammenspiel von struktureller Herkunft eines Chromophors und dessen kovalent gebundener Nukleinsäure, zwei Parameter, die es anwendungsspezifisch zu optimieren gilt.

Selbstverständlich wurde ergänzend zu den ET-Effizienzen dieses Forschungsprojektes auch der Fluorophorabstand r bestimmt, der Förster-Radius R_0 und der Quotienten r/R_0 berechnet. Die Einzelwerte sind in einer Übersicht des Kapitels 8.8 zusammengefasst und sollen hier nicht weiter besprochen werden.

Abschließend zu den Austauschprozessen stellte sich die Frage ob es möglich sei, einen Strang eines 14mer DNA/DNA-Duplexes mithilfe einer PNA-Sequenz entsprechender Länge zu ersetzen. Folglich wurde ein zusätzlicher Versuch vorgenommen, bei dem der Strangaustausch am Homodimer **DNA14-DNA11** durch Zugabe von **PNA1** bewirkt wurde. Die nachstehenden beiden Abbildungen zeigen die erfassten spektroskopischen Daten dieses Austauschprozesses.

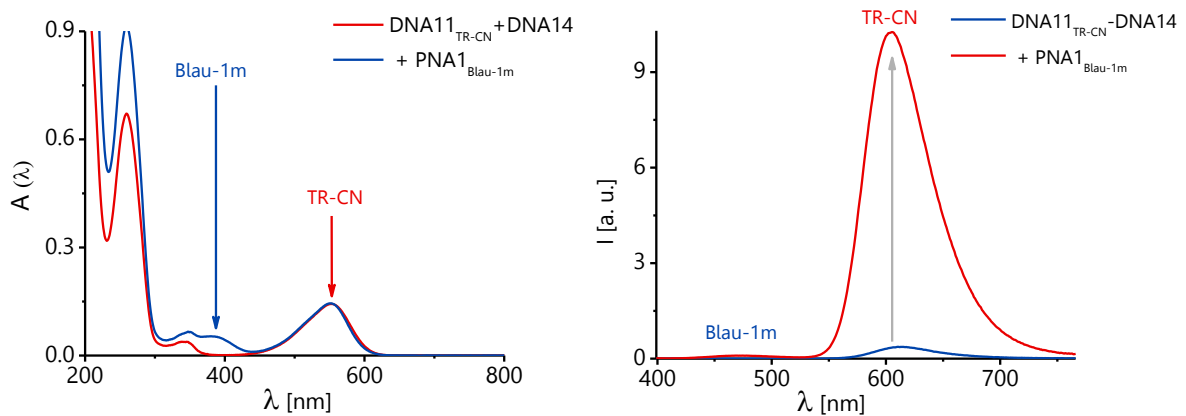


Abbildung 112: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) des Strangaustausches von **DNA14-DNA11** nach Zugabe von **PNA1**.

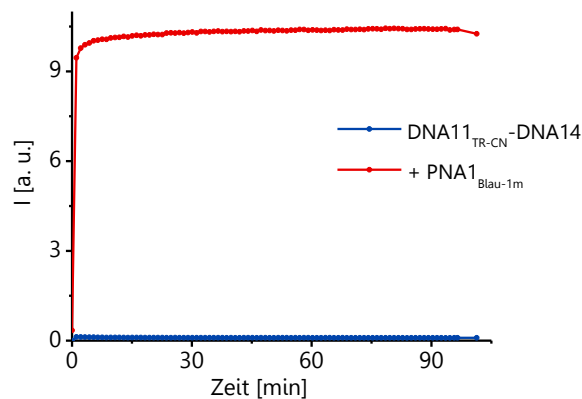


Abbildung 113: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität infolge des Strangaustausches von **DNA14-DNA11** nach Zugabe von **PNA1**.

Ein Blick auf Abbildung 112 und Abbildung 113 verrät, dass die gestellte Frage eindeutig mit „ja“ beantwortet werden kann. Aufgrund der hohen T_m -Differenzen zwischen den PNA/DNA-Hybriden im Vergleich zu doppelsträngiger DNA erfolgte der Austausch binnen kürzester Zeit und wurde durch den immensen Anstieg der **TR-CN**-Emission signalisiert. Diese Messung bildete die Basis für die Invasionsexperimente, die im folgenden Abschnitt der vorliegenden Dissertation präsentiert werden.

6.3 Duplex-Invasion mit "Click"-modifizierten acpcPNA-Sonden

Will man verhindern, dass eine Zelle ein bestimmtes Protein synthetisiert, hat man prinzipiell zwei verschiedene Strategien zur Auswahl. Bei der *antisense*-Strategie nutzt man ein zur mRNA komplementäres Oligonukleotid, um die Translation zu unterbinden. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, die Proteinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene zu stoppen (*antigene strategy*). In diesem Fall bindet ein Oligonukleotid an die komplementäre DNA-Sequenz innerhalb des geöffneten Promotorkomplexes und verhindert so, dass die RNA-Polymerase die Transkription initiieren kann (Abbildung 114). Sehr häufig handelt es sich bei den mRNA- oder DNA-bindenden Oligonukleotiden um synthetisch veränderte Nukleinsäureanaloge.

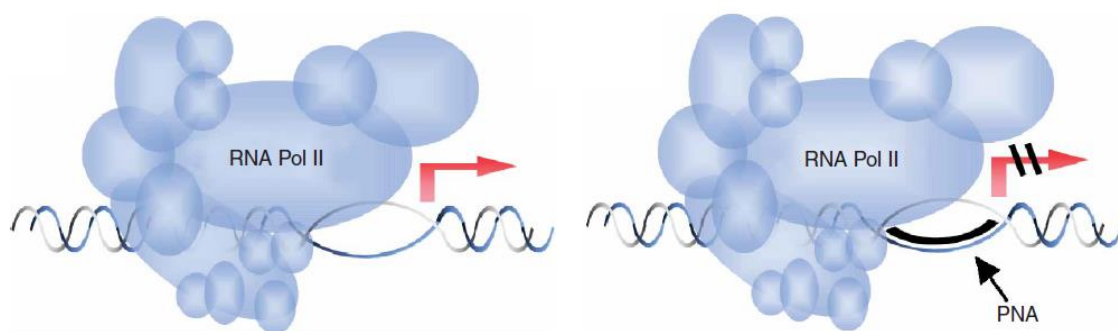


Abbildung 114: Illustration der antigenen Strategie. Links: Bei Abwesenheit der PNA bildet sich der offene Promotorkomplex aus DNA, RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren aus und die DNA wird zu mRNA transkribiert. Rechts: Die komplementäre PNA bindet an die DNA im offenen Promotorkomplex. Infolgedessen kann die RNA-Polymerase die Transkription der DNA nicht initiieren.^[267]

Seit über 20 Jahren stellt die PNA (*peptide nucleic acid*) ein wichtiges Nukleinsäurederivat dar, das als chemisch biologisches Werkzeug eingesetzt wird. Zu den ausschlaggebenden Eigenschaften der PNA zählen vor allem die hohe Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen wie Nukleasen und Proteasen. Diese Tatsache macht die PNA für diagnostische Forschungsbereiche besonders attraktiv.^[145] *Nielsen et al.* entwickelte die sogenannte **aegPNA**, welche zur Invasion in doppelsträngige DNA fähig ist. Die **aegPNA** bindet auf unterschiedliche Art und Weisen mit dem DNA-Duplex, sodass die entstehenden Komplexe verschiedenen Invasionsmodi zugeordnet

werden können. Zu den häufigsten Invasionsarten zählen vor allem die Triplex-, Duplex- oder doppelte Duplexinvasion.^[145,148,149,268] Da die sehr stark dazu neigt mit sich selbst zu binden, Es wurden verschiedene synthetische Änderungen an der **aegPNA**-Grundstruktur vorgenommen, welche die Selbstbindung unterdrücken und zugleich eine effiziente Duplexinvasion ermöglichen sollten.^[150,269] Zur Invasionssteigerung in B-DNA wurde die **aegPNA** mit karzinogenen Acridinresten versehen, oder die Nukleobase Cytosin durch „*G-clamp*“-Derivate ersetzt.^[154,156,270,271] Mit der Absicht, umfangreiche oder biologisch schädigende Modifikationen zu vermeiden, wurde die **γPNA** entwickelt, die bei längeren Sequenzen eine größere Affinität zu DNA als zu sich selbst besitzt. Jedoch sind für eine quantitative Duplexinvasion mittels **γPNA** Inkubationszeiten von ca. 8 Stunden und 20 Äquivalente an **γPNA** notwendig.^[272] Zudem weist die **γPNA** eine ungefähr gleich große Affinität zu komplementärer RNA als auch zu DNA auf, ein Nachteil, dem die Pyrollidinyl-PNA (**acpcPNA**) nicht unterliegt. Dieses PNA-Derivat bildet keine Homoduplexe aus. Überdies hinaus weist sie eine große Spezifität und Bindungsaffinität zu komplementärer DNA auf. Aufgrund dessen ist die **acpcPNA** zur Verwirklichung antigener Forschungsvorhaben besonders gut geeignet.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit *T. Vilaivan et al.* galt es, die Invasionsfähigkeit der **acpcPNA** in doppelsträngige DNA (**dsDNA**) zu untersuchen (Abbildung 115).

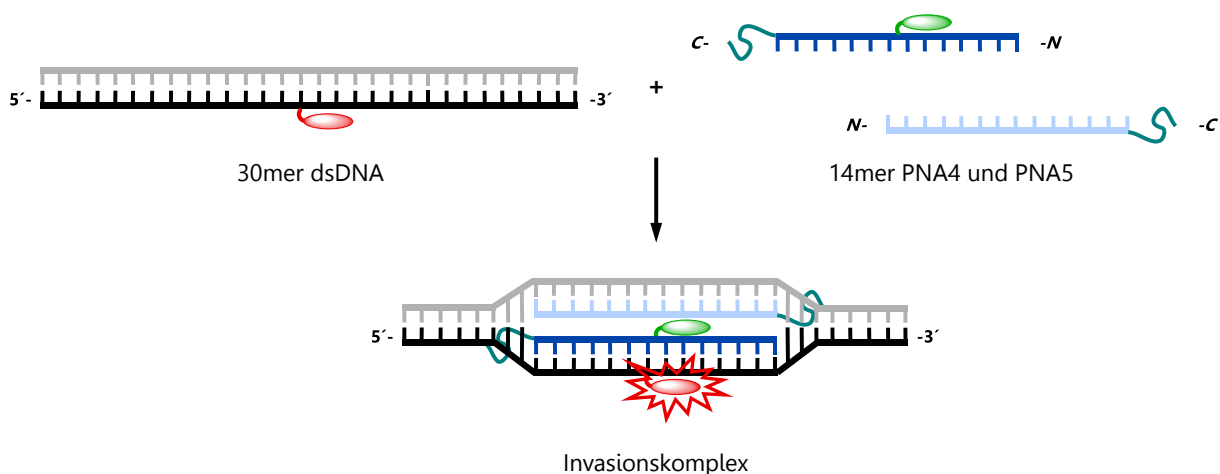
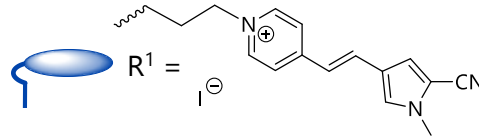
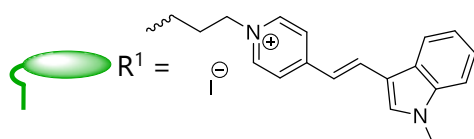
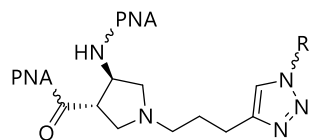
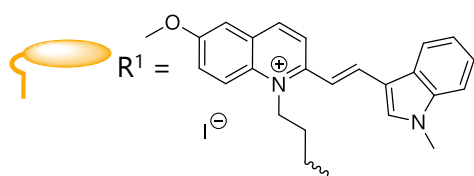
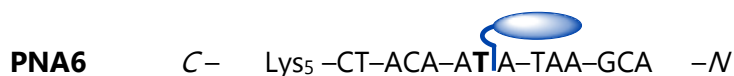
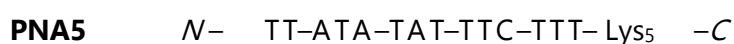
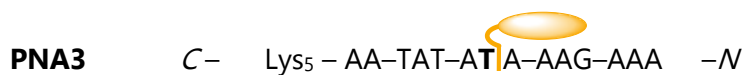


Abbildung 115: Schematische Darstellung der doppelten Duplexinvasion von **acpcPNA** in **dsDNA**.

Für diesen Zweck sollten **dsDNA**-Stränge synthetisiert werden, die eine Länge von 30 Basenpaaren besitzen und mit einem Fluoreszenzfarbstoff ausgestattet sind. Ebenso wurden 14mere einfach modifizierter **acpcPNA**-Sonden sowie ein unmodifizierter PNA-Strang hergestellt, sodass die Möglichkeit geschaffen wird, anhand eines Energietransfers die doppelte Duplexinvasion zu beobachten. Die Fluorophore **Grün-2m / TR-CN** und **Blau-1m / Gelb-4m** wurden als ET-Paare gewählt, welche die Invasion bei den Experimenten anzeigen sollten. Insgesamt wurden vier verschiedene **dsDNA** 30mere entworfen, die sich entweder in dem verknüpften Farbstoff (**Blau-1m** oder **TR-CN**) oder der modifizierten Base unterscheiden („click A“ oder „click U“). Die **acpcPNA**-Stränge **PNA3** und **PNA4** tragen den Chromophor **Gelb-4m** bzw. **Grün-2m** und sind komplementär zum mittleren Bereich der modifizierten 30mer-Sequenz. Eine unmodifizierte **PNA5** wurde anfangs als essentieller Bestandteil für die gewünschte Invasion angesehen und sollte zur Stabilisierung des offenen Nukleinsäurekomplexes beitragen.

PNA-Stränge:

 Abbildung 116: Sequenzen von **PNA3** bis **PNA6** und die zur Modifikation verwendeten Farbstoffe.

PNA6 wurde mit dem Fluorophor **Blau-1m** ausgestattet und dient in einem Kontrollexperiment als nicht-komplementäre PNA-Sequenz (*non-sense*). Die verwendeten Sequenzen der **acpcPNA**-Stränge und der **dsDNA** sind in Abbildung 116 bzw. Abbildung 117 gezeigt. In Kapitel 8.9, Abbildung 317 sind die Nukleinsäureabfolgen der DNA-Einzelstränge gezeigt.

dsDNA-Stränge:

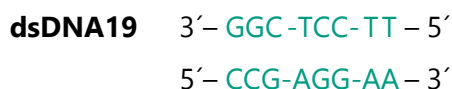
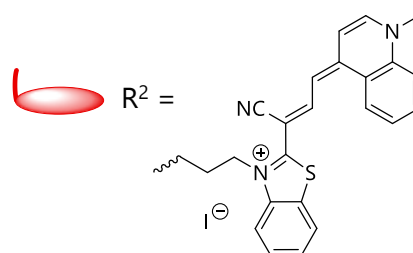
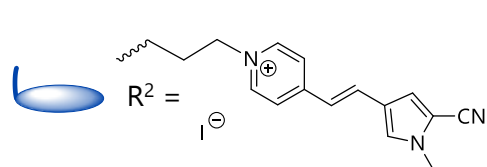
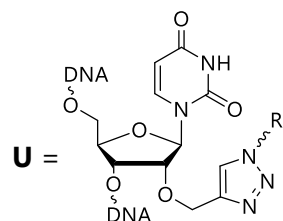
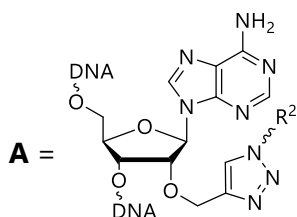
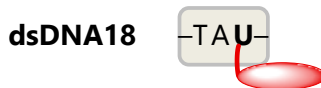
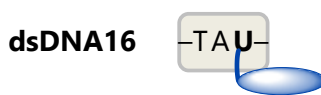
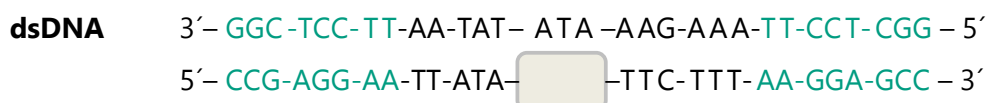


Abbildung 117: Sequenzen von **dsDNA15** bis **dsDNA19** und die zur Modifikation verwendeten Farbstoffe.

Alle Invasionsversuche wurden in An- bzw. Abwesenheit von NaCl (250mM) durchgeführt. Die erfolgte Invasion wurde mithilfe des Kontrastfaktors f_{Kontrast} (Gleichung 5.2) und dem Anstiegsfaktor f_{Anstieg} (Gleichung 6.2) detektiert. Zu Beginn wurde analog zu Kapitel 6.2 nach Zugabe von 1.0 Äquivalenten beider PNA-Stränge (**PNA3** und **PNA5** oder **PNA4** und **PNA5**) die Zeit bis zur Einstellung des

Gleichgewichtes auf Basis des Intensitätsanstieges der Akzeptoremission bestimmt. Alle Kombinationen erreichten nach ungefähr 90 Minuten eine konstante Fluoreszenzintensität. Die nachfolgenden Titrationsexperimente gaben Aufschluss über die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität und der dafür benötigten Menge an PNA. Es zeigte sich, dass bei dem ET-Paar **Grün-2m** / **TR-CN** nach einer Zugabe von 1.5 und bei **Blau-1m** / **Gelb-4m** nach 3.0 Äquivalenten beider PNA die Emissionsintensität ihren Maximalwert erreichte. Folglich wurden entsprechende PNA-Zugaben bei den Invasionsexperimenten verwendet. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Invasion auch durch den Zusatz eines einzigen PNA-Stranges zu bewerkstelligen sei. Diese Versuche wurden ausschließlich an **dsDNA17-PNA4** vorgenommen. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels werden die erhaltenen Resultate beispielhaft an den Spektren von **dsDNA17** nach Zugabe von **PNA4-PNA5** ohne NaCl-Zusatz gezeigt (Abbildung 118). Alle anderen Absorptions- und Fluoreszenzspektren sowie die zeitlichen Entwicklungen der Emissionsintensität sind in Kapitel 8.9 aufgeführt.

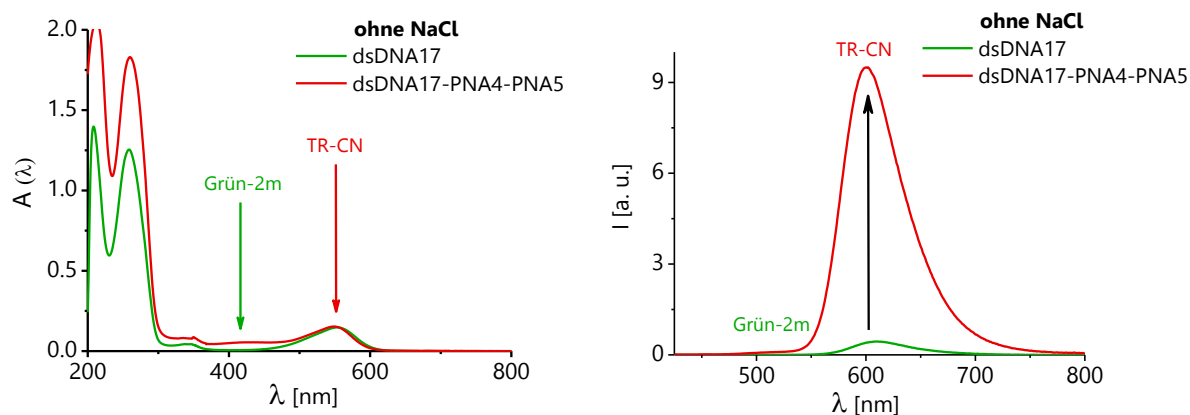


Abbildung 118: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA17-PNA4-PNA5** (ohne NaCl).

Die grün-gefärbte Linie in Abbildung 118 (rechts) zeigt die Fluoreszenz des **TR-CN**-modifizierten **dsDNA17** an, der bei der für **Grün-4m** spezifischen Wellenlänge von 420 nm angeregt wurde. Nachdem die beiden PNA-Stränge (jeweils 1.5 eq) zugesetzt wurden, gelangen Donor- und Akzeptorchromophor infolge der doppelten Duplexinvasion in räumliche Nähe zueinander, sodass ein ET von **Grün-4m** auf **TR-CN**

erfolgen kann. Wird nun bei 420 nm angeregt, steigt die Fluoreszenzintensität von **TR-CN** auf das 23.2-fache an (rote Kurve). Dabei wird ein Kontrastfaktor von 87 erreicht, der die erfolgte Duplexinvasion der acpcPNA-Sonden deutlich signalisiert. Die nachfolgenden zwei Abbildungen stellen die ermittelten Anstiegs- bzw. Kontrastfaktoren aller Kombinationen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von NaCl einander gegenüber.

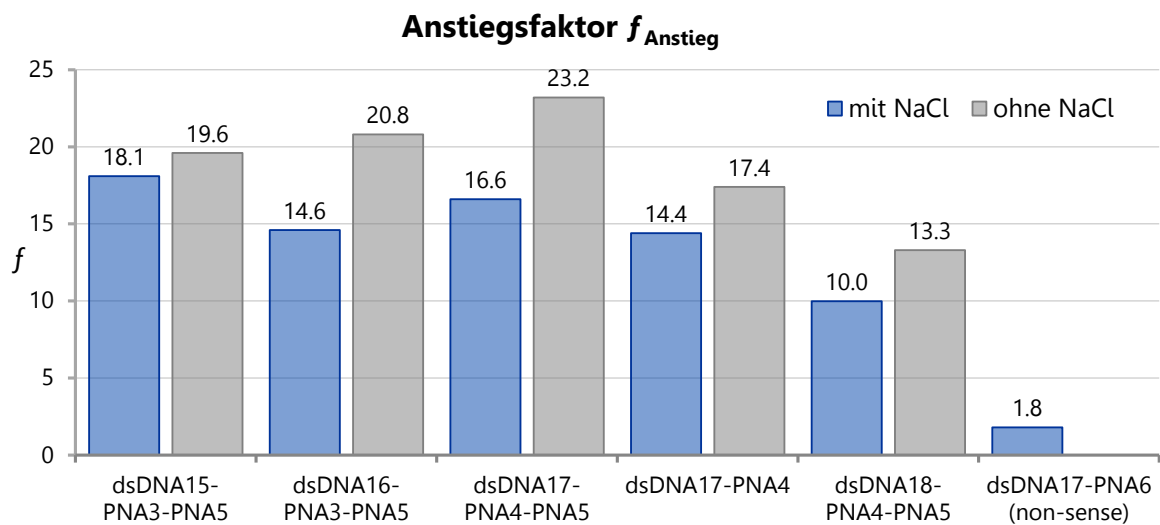


Abbildung 119: Anstiegsfaktoren aller Kombinationen in An- und Abwesenheit von NaCl.

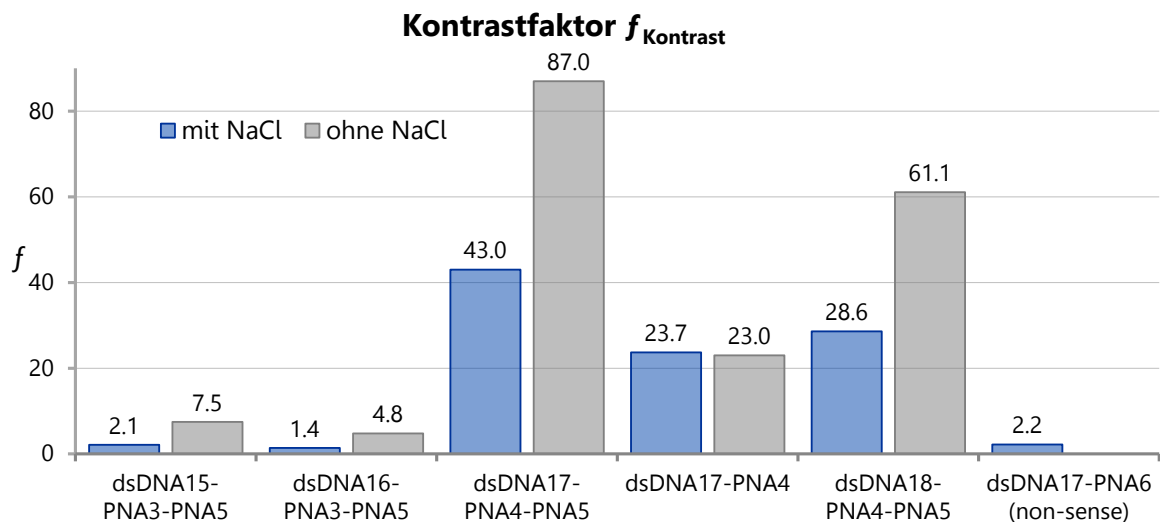


Abbildung 120: Kontrastfaktoren aller Kombinationen in An- und Abwesenheit von NaCl.

Im Hinblick auf die beiden Parameter f_{Kontrast} und f_{Anstieg} wird die doppelte Duplexinvasion bei NaCl-freien Bedingungen anhand einer ausgeprägteren Intensitätszunahme sowie eines größeren Farbkontrastes angezeigt. Die Werte des f_{Kontrast} der Farbstoffpaarung **Grün-4m / TR-CN** sind um ein Vielfaches größer als die des ET-Paares **Blau-1m / Gelb-4m**. Vergleicht man diese Werte mit denen, die im Rahmen der Strangaustauschexperimente (Kapitel 6.2) ermittelt wurden, so scheint die Farbstoffanordnung bei den Invasionsversuchen ungünstiger zu sein. Zur Beobachtung der Invasion wurde der Akzeptor **Gelb-4m** mit der PNA-Sonde verbunden, während die DNA mit dem Donormolekül **Blau-1m** versehen wurde. Im Falle des Strangaustausches lag eine entgegengesetzte Verknüpfung vor. Allgemein lässt sich eine niedrigere Fluoreszenzintensität bei Fluorophoren messen, die an **acpcPNA** gebunden vorliegen,^[172] was höchstwahrscheinlich die Hauptursache für den geminderten Farbkontrast darstellt. Der Unterschied zwischen den Kontrastfaktoren der **Grün-4m / TR-CN-ET-Paare** wird offensichtlich durch die Anknüpfung an die verschiedenen Nukleotide (A vs. U) hervorgerufen. **TR-CN** besitzt wenn es an die Base A gebunden vorliegt eine größere maximal erreichbare Emissionsintensität verglichen mit der, die gemessen werden kann wenn es am Uridin befestigt wurde.

Zudem lieferten die erfolgten Invasionsexperimente den Beweis dafür, dass eine Duplexinvasion mit nur einem einzigen PNA-Strang ebenso zu bewerkstelligen ist (Abbildung 121).

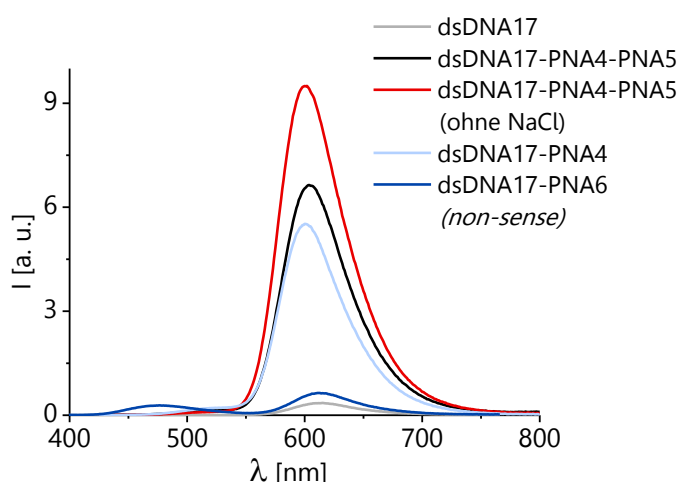


Abbildung 121: Gegenüberstellung der erfassten Emissionsspektren von dsDNA17 mit beiden PNA bei An- und Abwesenheit von NaCl, nach Zugabe von einem einzigen PNA-Strang sowie durch Zusatz der *non-sense*-PNA6.

Mit der Absicht, eine unspezifische Aggregation der **acpcPNA** mit dem DNA-Doppelstrang auszuschließen, wurde die *non-sense*-**PNA6** mit dem Donor **Blau-1m** ausgestattet und zu **dsDNA17** gegeben. Bei den berechneten Faktoren f_{Kontrast} und f_{Anstieg} werden nur minimale Werte erreicht, die mindestens um eine Größenordnung kleiner ausfallen als die der komplementären Sonden. Abbildung 121 bekräftigt das erhaltene Ergebnis in einem eindrucksvollen Vergleich der Resonanz von **dsDNA17** auf die Anwesenheit der *sense*- bzw. *non-sense*-PNA.

Nachfolgend wurden die Energietransfer-Effizienzen der Invasionskomplexe anhand der entsprechenden Fluoreszenzlebenszeiten bestimmt, wobei analog zu den ET-Bestimmungen vorheriger Kapitel vorgegangen wurde. Die Abklingkurven, Lebenszeiten, Effizienzen inklusive der Standardabweichungen sind in Kapitel 8.9 zusammengetragen. Die Effizienz blau-gelber ET-Paare liegt zwischen 66 % und 76 %. Auch hier zeigt sich eine positive Auswirkung auf die Resultate, wenn unter salzfreien Bedingungen gearbeitet wird. Die ET-Paarkombinationen mit den beiden Fluorophoren **Grün-4m** und **TR-CN** bewirken einen bemerkenswert effizienten Energietransfer mit Einzelwerten zwischen 93 % und 98 % (Abbildung 122).

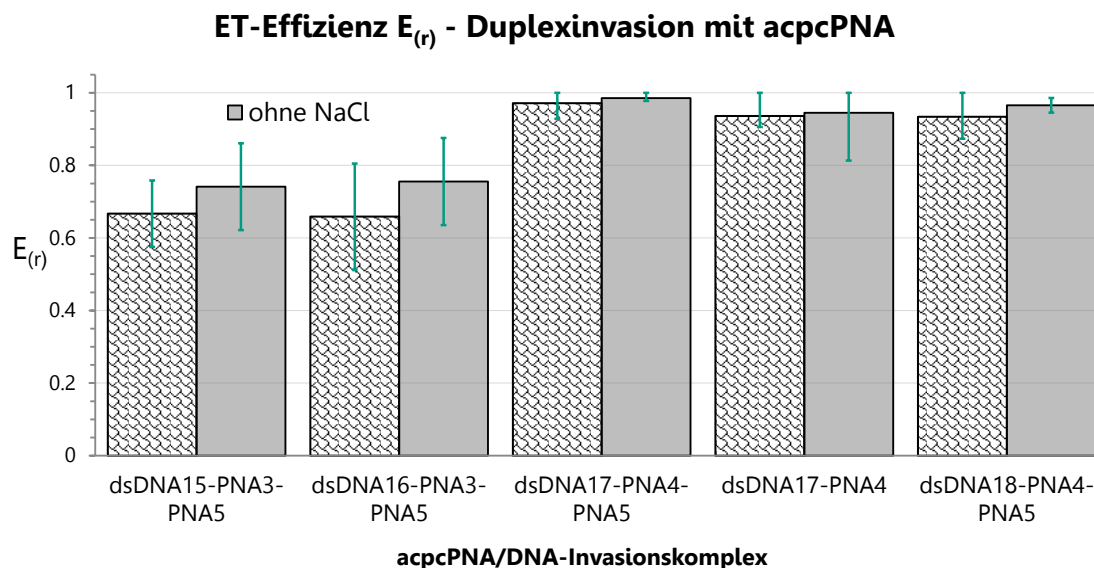


Abbildung 122: Ermittelte ET-Effizienzen der Invasionskomplexe.

Dies ist ein besonders erfreuliches und zugleich aussagekräftiges Ergebnis. In Kapitel 6.2 wurde gezeigt, dass die Geometrie eines PNA/DNA-Hybrides zu signifikanten

ET-Änderungen führen kann. Die ET-Effizienzen des Paares **Grün-4m** / **TR-CN** unterstützen diese Beobachtung. Speziell diese Fluorophorkombination wies innerhalb des DNA-Homodimers **DNA5** einen auffallend schlechten ET auf (Kapitel 5.3). Infolge der aus **acpcPNA** und DNA formierten Hybridhelix wird die strukturelle Umgebung der beiden Fluorophore derart abgewandelt, dass sie sich optimal zueinander orientieren können und somit ein enorm effizienter ET erfolgt.

Auf Basis der ET-Effizienzen können ebenfalls Angaben zur Invasionseffizienz gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden die Fluoreszenzlebenszeiten und daraus folgend die ET-Effizienzen von Vergleichsduplexen bestimmt. Diese Referenzduplexe bestehen aus dem jeweiligen verwendeten modifizierten PNA-Strang, der mit dem modifizierten Einzelstrang aus den dsDNA-30meren hybridisiert wurde. Die erhaltene ET-Effizienz eines Vergleichsduplexes wurde als 100 %-Wert gesetzt und mit der ET-Effizienz des entsprechenden Invasionskomplexes verrechnet. Dabei wurde bei allen Kombinationen mit einer Zugabe beider PNA-Stränge eine hervorragende Invasionseffizienz von 99 % erzielt. Die Invasionseffizienz von 95 % konnte bei der einzeln zugegebenen **PNA4** berechnet werden. Die entsprechenden Invasionseffizienzwerte sind einer Tabelle des Kapitels 8.9 zu entnehmen.

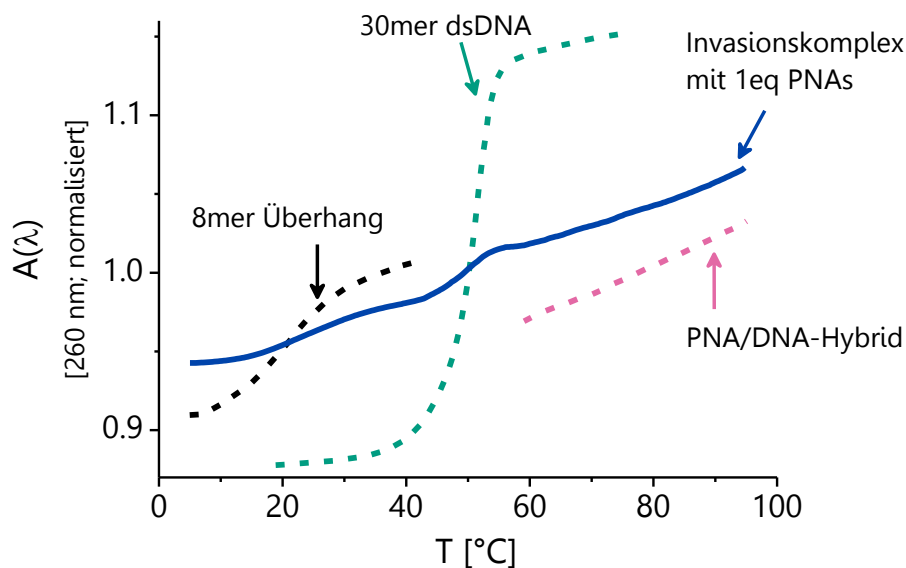


Abbildung 123: Repräsentative, normierte Kurven der Schmelztemperaturbestimmungen von **dsDNA19** (8mer-Überhang, schwarz), **dsDNA16** allein (grün) sowie mit 1.0 eq **PNA3** und **PNA5** (blau) und des Vergleichsduplexes **DNA18-PNA3** (rosa). Diese Messungen erfolgten ohne NaCl-Zusatz.

Abschließend wurden die Schmelztemperaturen (T_m) der dsDNAs, acpcPNA/DNA-Heteroduplexe sowie deren DNA/DNA-Analoga in Gegenwart und Abwesenheit von NaCl ermittelt (siehe Tabelle 26, Kapitel 8.9). Zudem wurden die temperaturabhängigen Absorbanzänderungen der Invasionskomplexe bei einem 1:1-Verhältnis von PNA zu DNA aufgezeichnet, d. h., bei unvollständiger Duplexinvasion. Beispielhaft ist in Abbildung 123 die normierte Schmelzkurve von **dsDNA16-PNA3-PNA5** (ohne NaCl) dargestellt. Bei genauer Betrachtung des Verlaufes und anhand eines direkten Vergleiches mit den Schmelzkurven des 8mer-Überhanges (**dsDNA19**), reiner **dsDNA16** und des Vergleichsduplexes **DNA18-PNA3** lassen sich die entsprechenden Schmelzbereiche zuordnen. Dies erbringt den zusätzlichen Beweis für eine stattfindende Duplexinvasion.

7. Zusammenfassung

Die erste Herausforderung dieser Arbeit beruhte auf der Synthese neuer Fluoreszenzfarbstoffe, die eine erhöhte Photostabilität im Vergleich zu den bereits etablierten Chromophoren **CyIQ**, **TO** und **TR** aufweisen sollten. Die synthetische Forschungsarbeit brachte 25 neu entwickelte Cyaninfarbstoffe hervor, von denen 22 das geforderte Kriterium erfüllten. Die durchgeführten Untersuchungen deuteten auf die Fluorophore mit ausgezeichneter Photostabilität hin, wobei die Halbwertszeiten bei Belichtung um das 20- bis 40-fache erhöht werden konnten. Eine geschickte chemische Variation der Strukturen führte gleichzeitig zu enorm gesteigerten fluoreszenten Eigenschaften der Chromophore, deren Emissionsfarben in Abbildung 124 gezeigt sind.

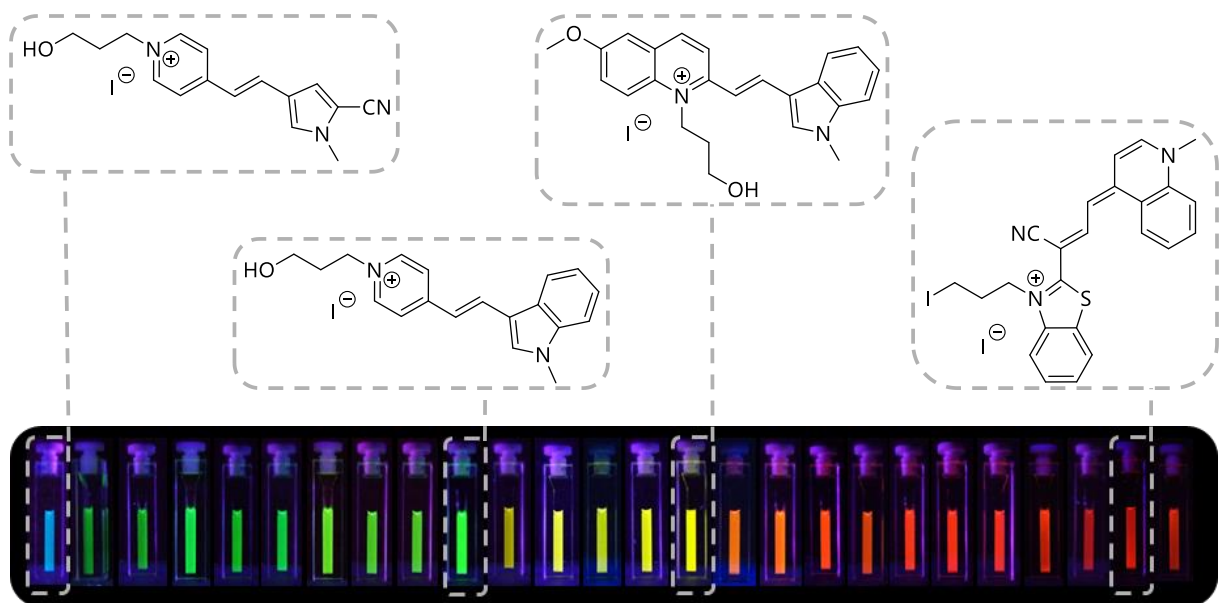
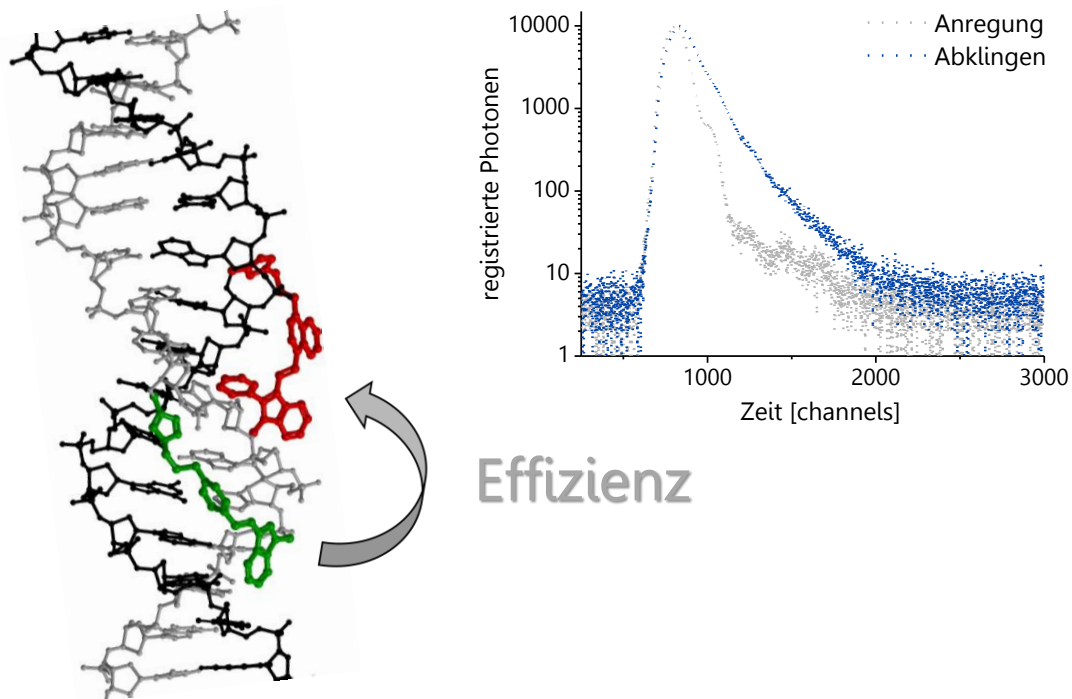


Abbildung 124: Oben: Die Strukturen entsprechen einer Auswahl von vier Cyaninfarbstoffen, die im Zuge der Arbeit synthetisiert wurden. Unten: Fluoreszenzfarben der 25 entwickelten Fluorophore, die im Verlauf der Dissertation untersucht und einander gegenübergestellt wurden.

Aus der Gegenüberstellung der verbesserten Fluoreszenzfarbstoffe gingen 11 Cyanine hervor, welche die Basis der nachfolgenden Forschung bildeten und dabei kovalent mit DNA verbunden wurden. Anhand der postsynthetisch modifizierten Oligonukleotide erfolgte die Kombination zu 19 Energietransferpaaren, deren spektroskopische Eigenschaften genauer untersucht wurden. Infolgedessen ermöglichte die Bestimmung von Fluoreszenzlebenszeiten einen Zugang zu den Energietransfer-

Effizienzen der gebildeten Paare und gestattete so die Auswahl geeigneter Donoren und Akzeptoren für die Anwendungen im Rahmen der finalen Entwicklungsarbeit (Abbildung 125).



182

Abbildung 125: Links: Modell eines Energietransferpaares (Donor = grün und Akzeptor = rot), das mithilfe der kupferkatalysierten „Click“-Reaktion postsynthetisch an DNA gebunden wurde. Rechts: Abklingkurve der Fluoreszenzlebenszeitmessung des Donors in Anwesenheit des Akzeptors. Zeitskala = 0.027 ns/channel.

Im Zuge eines Kooperationsprojektes mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum wurden „Molecular Beacon“ (MB) zur parallelen Detektion von miRNA-21 und miRNA-31 hergestellt (Abbildung 126). Das MB-Design erlaubte anhand von vier verschiedenen Emissionsfarben auf die Gegenwart der Zielmoleküle „zu antworten“.

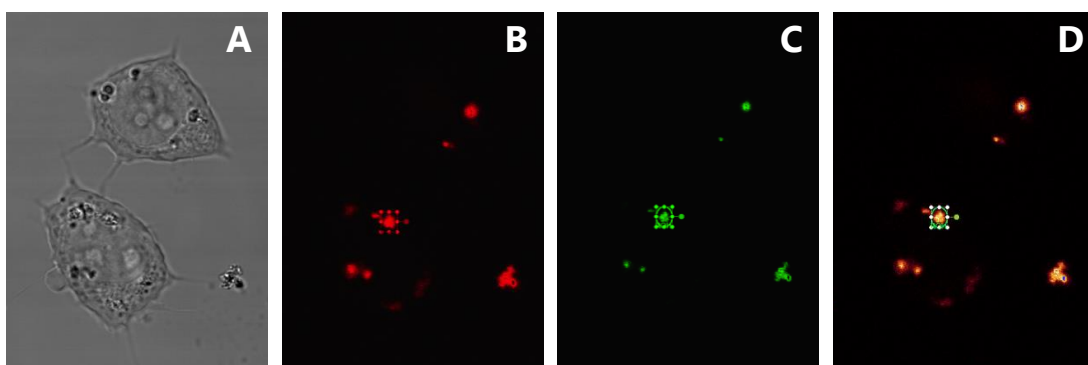


Abbildung 126: Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen mit der Zelllinie Colo 206f in Verbindung mit **MB3**.

Sowohl ein von KHYS (Karlsruhe House of Young Scientists) geförderter Auslandsaufenthalt als auch die Zusammenarbeit mit T. Vilaivan der Chulalongkorn Universität in Bangkok erlaubten die kovalente Verknüpfung der entwickelten Farbstoffe mit Pyrrolidinyl-PNA. Die hergestellten Nukleinsäuresonden dienten zum einen der Verfolgung und Untersuchung von Strangaustauschprozessen. Zum anderen ließ sich auf Grundlage des effizienten Energietransfers zwischen den Cyaninen und der herausragenden Eigenschaften von Pyrrolidinyl-PNA die Duplexinvasion in doppelsträngige DNA bewerkstelligen. Dabei zeigten die modifizierten PNA-Sonden eine bemerkenswert hohe Invasionseffizienz, während die verbundenen Chromophore die fluoreszenzspektroskopische Beobachtung der Duplexinvasion ermöglichten (Abbildung 127).

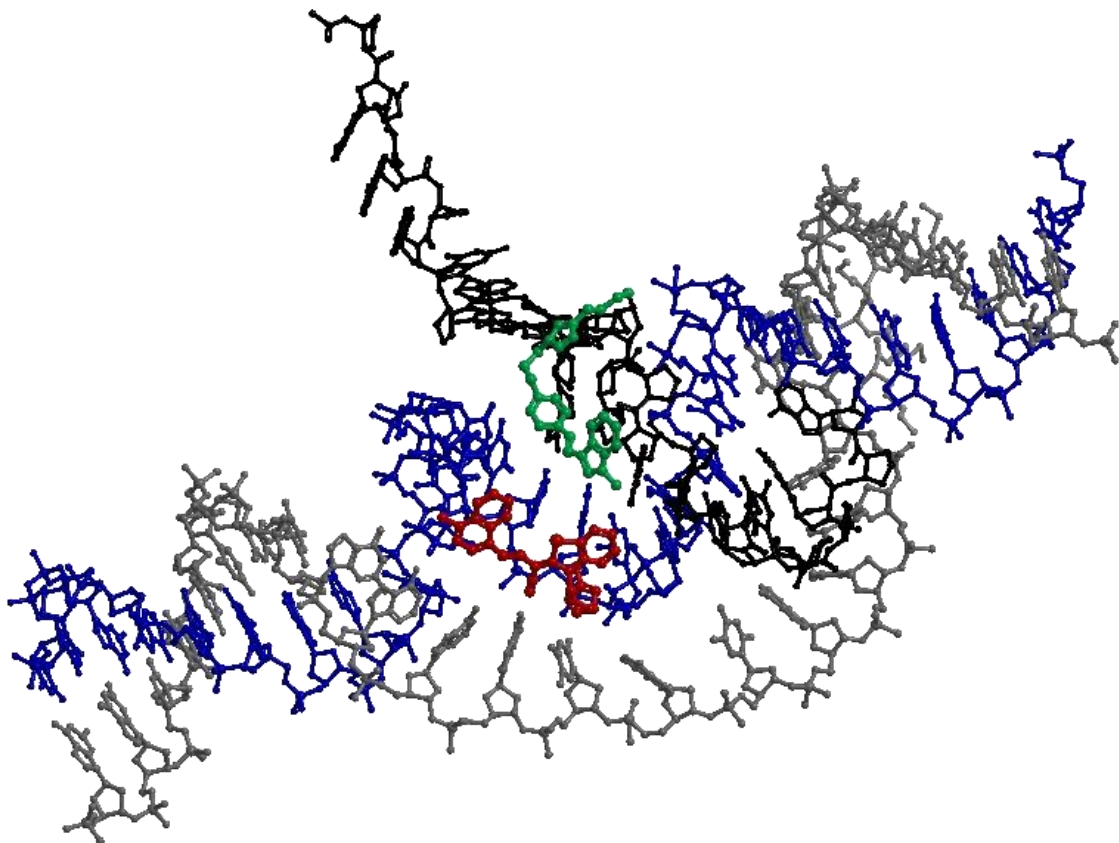


Abbildung 127: Illustration der Duplexinvasion von modifizierten Pyrrolidinyl-PNA-Sonden in doppelsträngige DNA.

8. Experimenteller Teil

8.1 Verbrauchsmaterialien, Methoden und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die für die Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *TCI*, *ABCR*, *VWR* und *Alfa Aesar* bezogen. Die verwendete Qualität war mindestens „zur Synthese“. Die verwendeten Lösungsmittel zur Reaktionsdurchführung hatten mindestens die Qualitätsstufe p.A. (*pro analysis*). Bei Ansatzaufarbeitungen wurde Diethylether mit technischer Qualität verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden von der Firma *Acros Organics* bezogen und unter Argon aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv* oder *Hypersolv*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Schutzgas

Die Reaktionen wurden gegebenenfalls zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Argonatmosphäre (Schweißargon 5.0, 99.999% Reinheit) durchgeführt.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Platten *ALUGRAM Sil G/UV254* 0,20 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator 254 nm der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* verwendet. Die Detektion erfolgte im UV bei 254 nm oder 366 nm. Die jeweils verwendeten Laufmittel wurden mit dem R_f -Wert der entsprechenden Verbindung angegeben.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Für die durchgeführten Säulenchromatographien wurde Kieselgel Typ 60 (Korndurchmesser 0,040 bis 0,063 mm) der Firma *Fluka (Silica gel 60)* verwendet. Die

zu reinigende Substanz wurde entweder in der mobilen Phase gelöst oder auf *Celite*-Filtermaterial aufgezogen.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden mit einem *Bruker Avance 300, Avance 400, Avance 600* oder *Avance DRX 500* am KIT, Institut für Organische Chemie, in deuterierten Lösungsmitteln aufgezeichnet (^1H bei 300, 400 oder 500 MHz, ^{13}C bei 75, 100 oder 125 MHz). Die Probenmenge belief sich auf ca. 15 - 20 mg Substanz in 0.6 mL Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz diente das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels (^1H -NMR) bzw. das Lösungsmittelsignal (^{13}C -NMR):

CDCl_3 : ^1H -NMR: $\delta = 7.26$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 77.16$ ppm

DMSO-d_6 : ^1H -NMR: $\delta = 2.50$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 39.52$ ppm

Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizität der ^1H -Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), qi, (Quintett), dd (Dublett von Dublett), dt (Dublett von Triplet), m (Multiplet).

Infrarotspektrometrie (IR)

Die Infrarotspektren wurden an einem FT-IR-Gerät IFS88 der Firma *Bruker* aufgenommen. Flüssigkeiten wurden als Film auf Kaliumbromid, Feststoffe im Drift-Modus aufgenommen. Angegeben ist die Lage der Absorptionsbanden in Wellenzahlen [cm^{-1}]. Die Intensitäten wurden abgeschätzt und mit den Abkürzungen s (*strong*), m (*middle*), w (*weak*) versehen.

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren wurden durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie am KIT, Institut für Organische Chemie gemessen. Die Spektrometer werden nachfolgend kurz zusammengefasst:

- FAB: Finnigan MAT 95 im positiven Ionisierungsmodus.
- MALDI: Biflex-IV Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linear negativen Modus (Matrix: 2:1 Mischung aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (0.3 M in EtOH) und Diammoniumcitrat (0.1 M in H₂O). Matrix für PNA: gesättigte α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CCA) –Lösung mit H₂O:Acetonitril (1:1) + 0.1 % TFA).
- Nano-ESI-Messungen der primären Photoprodukte wurden an einem *LTQ Orbitrap XL* Massenspektrometer mit enthaltener *Electrospray Ion Source (ESI)* der Firma *Thermo Fisher*.

Optische Spektroskopie

Alle Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, in 1.4 mL-Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm, bei 20 °C in NaP_i-Pufferlösung (10 mM, pH = 7) in An- oder Abwesenheit von 250 mM NaCl. Für die Messungen wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *UV-Spectrosolv*) bzw. entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

UV/Vis-Absorptionsmessungen

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden in einem Cary 100 Bio Absorptionsspektrometer der Firma *Varian* mit temperiertem Küvettenhalter aufgezeichnet. Die Spektren wurden gegen die UV/Vis-Absorbanz des Lösungsmittels hintergrundkorrigiert. Folgende Einstellungen wurden vorgenommen: SBW: 2.0 nm, Mittlere Zeit 0.1 s, Datenintervall 1.0, Wechsel der Lichtquelle von der Deuteriumlampe zur Wolframlampe bei 350 bzw. 370 nm.

Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax-3 Fluorimeter von Jobin-Yvon mit einem Peltier-Element LFI-3751 von *Wavelength Electronics* zur Temperatursteuerung durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einer Toleranz von 0.1 °C. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels hintergrundkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: *Increment: 1.0 nm, Increment time: 0.2 s, Integration time 0.1 s.*

Fluoreszenzlebenszeiten

Die Fluoreszenzlebenszeiten wurden an einem *Horiba Scientific FluoroMax-4* Spektrofluorometer anhand *time-correlated single photon counting (TCSPC)* Technik mit NanoLeds als Anregungsquelle bei 370 nm oder 455 nm (*Horiba, impulse repetition rate of 1 MHz, time calibration = 2.74E-11 sec/channel*) durchgeführt. Die Fluoreszenzlebenszeiten wurden mit *DAS6 v 6.8 decay analysis software* von *Horiba* ausgewertet.

Quantenausbeuten

Quantenausbeuten wurden am *Quantaaurus QY C11347* in 5 mL-Quarzglasküvetten der Firma *Hamamatsu* bestimmt.

Theoretische Berechnungen

Die theoretischen Berechnungen des Molekularen Modeling wurden anhand der Software *HyperChem 8* der Firma *Hypercube* und Geometrie-Optimierung mit Kraftfeld-Kalkulationen (CHARMM oder MM+) vorgenommen.

8.2 Oligonukleotidsynthese

DNA-Festphasensynthese (Standard Basen)

Die DNA-Festphasensynthese von modifizierten Oligonukleotiden erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* Syntheseautomaten von *Applied Biosystems*. Als Träger dienten CPGs mit 1 μmol Belegung (500 Å). Das Gerät wurde mit Argon (Schweißargon 5.0, 99.999% Reinheit) als Schutzgas betrieben. Die benötigten Reagenzien, CPG-Säulen und Phosphoramidite wurden von den Firmen *Glen Research* und *Proligo* bezogen.

Kupplungsprotokolle

Der Syntheseautomat fördert die Reagenzien aus ihren Reservoirs in Pulsen zu je 16 μL durch die Reaktionsgefäße. Die Kupplungsprotokolle bestehen aus den synthetischen Einzelschritten und definieren unter anderem die geförderten Reagenzien, die Puls-Anzahl und den zeitlichen Rahmen jedes Schrittes. Dabei gibt eine Zeit von 0 s das schnellstmögliche Durchlaufen des Einzelschritts an. Die dabei verwendeten Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt:

Dbk:	3% Dichloressigsäure in CH_2Cl_2
Wsh:	Acetonitril
Act:	0.45 mol/L Tetrazol in Acetonitril
Cap A:	Acetanhydrid in THF / Pyridin
Cap B:	N-Methylimidazol in THF / Pyridin
Ox:	Iod in H_2O / THF / Pyridin

Die kommerziell erhältlichen Phosphoramidite der natürlichen DNA-Basen werden in trockenem Acetonitril gelöst und zu einer finalen Konzentration von 0.067 mol/L gebracht. Der Einbau unveränderter Basen in Oligonukleotide nach einem Standardsyntheseprotokoll (Tabelle 9). Die 5'-terminale DMTr-Schutzgruppe kann wahlweise abgespalten werden (DMTr-on / -off).

Die Phosphoramidite 2'-*O*-Propargyl-Adenosin (*clickA*) und 2'-*O*-Propargyl-Uridin (*clickU*) wurden von *ChemGenes* bezogen.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit [s] /Arg2
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Tabelle 9: Standardprotokoll für die Kupplung der natürlichen Basen. Exemplarisch an **dA** (Phosphoramidit) gezeigt.

Aufarbeitung der DNA (Standard Basen)

Nach der DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen am Hochvakuum getrocknet. Zur Abspaltung der DNA von der festen Phase und zugleich werden Schutzgruppen von den Basenseitenketten abgespalten. Die Säulen werden geöffnet und das CPG in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von ca. 700 µL 25 %iger Ammoniaklösung (> 25%, *trace select, Fluka*) wird gründlich gemischt und ca. 16 h bei 55 °C erwärmt. Anschließend wird auf RT abgekühlt und der Ammoniak im Vakuum (*Vakuumkonzentrator Christ Alpha RVC*) bei ca. 34 °C innerhalb von 70 min abgezogen. Danach wird verbliebenes Wasser abgenommen und der Rückstand 2-3 Mal mit

200 – 300 µL HPLC-reinem Wasser gewaschen und mittels Zentrifugen-Filter vom CPG-Granulat separiert. Die vereinigten Waschlösungen werden im Vakuum (*Vakuumpkonzentrator Christ Alpha RVC*) zur Trockene eingengt.

Post-synthetische „Click“-Modifikation von Oligonukleotiden (mit einem Fluorophor – „single label“)

Die zu modifizierenden Oligonukleotid-Rückstände wurden in 50 – 100 µL Wasser suspendiert und mit folgenden Lösungen versetzt und gründlich gemischt.

- 25 µL (20 µmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mmol/L in H₂O)
- 34 µL Tris-[(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]amin (0.1 mmol/L in DMSO / t-BuOH = 3 : 1)
- 114 µL (1.14 µmol) Azid (10 mM in DMSO / t-BuOH 3:1)
- 17 µL (1.7 µmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO / t-BuOH 3:1)
- 35 µL Acetonitril

Die Reaktionsmischung wurde 1.5 h bei 60 °C erwärmt, und im 30 min-Rhythmus erneut gemischt. Nachdem die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt war, wurden 150 µL Na₂EDTA (40 mmol/L in Wasser), 450 µL Natriumacetat (300 mmol/L in Wasser) und 13 mL EtOH (100%) zugegeben, gemischt und für 18 h bei -20 °C aufbewahrt. Im Anschluss wurde die ausgefallene modifizierte DNA 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde in 250 µL Wasser gelöst und zur HPLC-Reinigung verwendet.

Reinigung mittels semi-präparativer HPLC

Die Oligonukleotide wurden über *reversed phase* HPLC an einer *Varian ProStar* Anlage (Autosampler 410, zwei Pumpeneinheiten 210, UV/Vis Detektor 325, Steuersoftware *Galaxy*) oder einer *Shimadzu* 10 HPLC (online-Entgaser, Pumpe LC-10AT, Injektor SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Für die analytische Chromatographie wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule

(250 x 4.6 mm) verwendet. (Semi-)Präparative Trennungen erfolgten über eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 10 mm, 5 µm).

Eluens A: 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5)

Eluens B: Acetonitril

Fluß: 1.0 mL/min bzw. 2.5 mL/min für semi-präparative Trennungen

Die Detektionswellenlänge, die Temperatur des Säulenofens sowie der Methoden-Gradient waren vom gebundenen Fluorophor (12 verschiedene) und der Natur des Oligonukleotides abhängig (Sequenzlänge variierte stark, zweifach markierte „*Molecular Beacon*“ oder „*single labeled probe*“ usw.).

Bei der semi-präparativen Trennung wurde fraktionsweise das Produkt gesammelt, die Fraktionen auf Produkt-Nukleotid mittels MALDI-Masse überprüft. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum (*Vakuumkonzentrator Christ Alpha RVC*) zur Trockene eingengt.

Charakterisierung durch Massenspektrometrie

MALDI-Massenspektren von Oligonukleotiden wurden am KIT, Institut für Organische Chemie an einem *Biflex-IV Spektrometer* von *Bruker Daltonics* im linear negativen Modus aufgenommen. Als Matrix diente entweder eine 2:1 Mischung aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (0.3 mol/L in EtOH) und Diammoniumcitrat (0.1 mol/L in Wasser) oder 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA, ges. Lösung in 50 % Acetonitril) und Diammoniumcitrat (0.1 mol/L in Wasser) im Volumenverhältnis 9:1.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda_{\text{abs.}} = 260 \text{ nm}$ und Anwendung des Lambert-Beer-Gesetz bestimmt. Die entsprechenden Absorptionsmessungen wurden an einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäure-Modus vorgenommen.

Unmodifizierte Oligonukleotide

Unmodifizierte Oligonukleotide wurden vollständig gereinigt und charakterisiert von *Metabion* erhalten. Vor Verwendung wurden sie in HPLC-reinem H₂O (*Millipore*-Entsalzungsanlage) gelöst und ihre Konzentration wie oben beschrieben bestimmt.

Hybridisierung

Wenn zu Hybridisierungsbedingungen in den einzelnen Abschnitten keine weiteren Angaben gemacht sind, dann wurden die jeweiligen Einzelstränge im Verhältnis 1:1 in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i) und 250 mM NaCl, bei pH 7 für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Schmelztemperaturmessungen

Die Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden wurden am *Cary 100 Bio* UV/Vis-Absorptionsspektrometer der Firma *Varian* gemessen. Je nach Anwendungsbedarf (vgl. hochschmelzende PNA) wurden die Messdaten in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 95 °C aufgezeichnet. Die Start- und End-Temperatur wurden jeweils 10 min gehalten. Die Datensammelrate lag anwendungsbedingt zwischen 0.3 °C bzw. 0.5 °C-Schritten, wobei Heizraten von 0.3 bis 0.7 °C/min verwendet wurden. Die Auswertung der Schmelzkurve mit sigmoidalem Fit lieferte anhand des Wendepunktes (Maximum der Ableitung) die Schmelztemperatur des Oligonukleotides.

Oligonukleotid-Synthese mit *ultramild bases* und ultramilden Abspaltungsbedingungen

Für die DNA-Synthese der „*Molecular Beacons*“ zur Detektion von miRNA (Kapitel 6.1) wurde aufgrund der Basenlabilität der zweifach markierten MB-Stränge zur

Oligonukleotid-Synthese die „*ultramild bases*“ verwendet. Die benötigten Reagenzien und CPG-Säulen wurden von *Glen Research*, die Phosphoramidite von 2'-*O*-Propargyl-Adenosin (*clickA*) und 2'-*O*-Propargyl-Uridin (*clickU*) wurden von *ChemGenes* bezogen. Zur DNA-Synthese wurden die Standardprotokolle für die Kupplung der natürlichen Basen des Einbaus von 2'-*O*-Propargyl-Uridins oder –Adenosin verwendet.

„Click“-Reaktion – an der festen Phase („on bead“ / *ultramild bases*)

Die „Click“-Reaktion zur zweifachen Modifizierung von Oligonukleotiden wurde an der festen Phase vorgenommen. Dazu wurden folgende Lösungen gemischt:

Reaktionslösung:

- 50 µL (20 µmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in H₂O)
- 130 µL Acetonitril
- 228 µL (2.28 µmol) Azid (10 mM in DMSO / t-BuOH 3:1)
- 34 µL (3.4 µmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO / t-BuOH 3:1)

Dies ergibt 442 µl Reaktionslösung, die mithilfe der Spritzen gleichmäßig über das CPG verteilt wurde. Anschließend wird die Mischung 1.5 h bei 60 °C erwärmt. Dabei wurde jeweils nach 30 min die Lösung vorsichtig durch die Säule gepumpt. Im Anschluss daran wurde nach Abkühlen die Reaktionslösung entfernt, und die feste Phase mit einer Abfolge von verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen. Es wurden jeweils 3 mL des Lösungsmittels verwendet. Acetonitril, Wasser, Na₂EDTA-Lsg. (ungefähr 130 mg in 9 mL Wasser), Wasser, Ethanol und abschließend Acetonitril bis keine Färbung der Waschlösung mehr zu erkennen war. Die Säulen wurden kurz im Hochvakuum (*Christ Alpha 1-2 LD Plus*) getrocknet, in den Synthesizer eingesetzt und dort weitere drei bis fünfmal mit Acetonitril (Wash A) gespült. Dann wurde der 2. Teil der MB-Sequenz synthetisiert.

Abspaltung und Aufarbeitung (*ultramild bases*)

Nach der zweifachen „Click“-Modifikation der DNA wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum (*Christ Alpha 1-2 LD Plus*) getrocknet, und das CPG-Pulver in

Mikroreaktionsgefäße überführt. Zur Abspaltung der DNA von der festen Phase wurde 1 mL 0.05 mol/L methanolische Kaliumcarbonat-Lösung zugegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Als erstes wird das Methanol in einem separaten Mikroreaktionsgefäß gesammelt. Nach Zugabe von 5.9 µl Essigsäure wurde gründlich gemischt und die DNA fiel aus. Die methanolische Phase wurde 1 h bei 340 mbar und 40 °C (*Vakuumkonzentrator Christ Alpha RVC*) entfernt. wurde das CPG ebenfalls mit 1 µL Essigsäure versetzt und dreimal mit je 200 µL HPLC-reinem Wasser gewaschen. Dieses wurde mit dem Rückstand der methanolischen Lösung vereinigt und über Nacht im *Vakuumkonzentrator* bei RT und einem Druck von 0.1 mbar getrocknet. Zur Aufreinigung der markierten DNA-Stränge wurden die Rückstände in 200 bis 300 µL Wasser aufgenommen, über *Zentrifugenfilter* von restlichem CPG befreit und anschließend mittels *reversed phase* HPLC getrennt.

Reinigung mittels semi-präparativer HPLC

Die Oligonukleotide wurden über *reversed phase* HPLC an einer *Varian ProStar* Anlage (Autosampler 410, zwei Pumpeneinheiten 210, UV/Vis Detektor 325, Steuersoftware *Galaxy*) oder einer *Shimadzu* 10 HPLC (online-Entgaser, Pumpe LC-10AT, Injektor SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Für die analytische Chromatographie wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm) verwendet. (Semi-)Präparative Trennungen erfolgten über eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 10 mm, 5 µm).

Eluens A: 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5)

Eluens B: Acetonitril

Fluß: 1.0 mL/min bzw. 2.5 mL/min für semi-präparative Trennungen

Die Detektionswellenlänge, die Temperatur des Säulenofens sowie der Methoden-Gradient waren vom gebundenen Fluorophor (12 verschiedene) und der Natur des Oligonukleotids abhängig (Sequenzlänge variierte stark, zweifach markierte „*Molecular Beacon*“ oder „*single labeled probe*“ usw.).

Bei der semi-präparativen Trennung wurde fraktionsweise das Produkt gesammelt, die Fraktionen auf Produkt-Nukleotid mittels MALDI-Masse überprüft. Die

produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum (*Vakuumpkonzentrator Christ Alpha RVC*) zur Trockene eingengt.

acpcPNA-Synthese und “Click“-Modifikation von PNA an der festen Phase

Synthese von acpcPNA

Die APC-modifizierte **acpcPNA** wurde an *Tentagel S-RAM* Harz aus den jeweiligen Fmoc-geschützten Monomeren manuell synthetisiert. Die Ansatzgrößen lagen in einem Bereich von 0.25 µmol bis 0.5 µmol. Die einzelnen Syntheseschritte erfolgten nach bereits publiziertem^[163,265] und etabliertem Verlauf, von Entschützung, Kupplung, *Capping*. Der C-Terminus aller hergestellten und verwendeten PNA-Stränge trug fünf Mal den Aminosäurerest von Lysin. Lysin-Reste fördern die Löslichkeit von PNA in Wasser und erhöhen die Zellpermeabilität. Nach erfolgter Synthese wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt, und die freie Aminofunktion wurde acetyliert. Die Trifluoracetyl-Schutzgruppe des APC-Spacers sowie die Seitenketten der Nukleobasen wurden mit einer Ammoniak-Dioxan-Mischung (1:1) bei 60 °C in ca. 16 h entschützt.

Reduktive Alkylierung des APC-Spacers^[171]

Die entschützte APC-modifizierte **acpcPNA** (bei 0.5 µmol **acpcPNA** an der Harzphase) wurde mit dem Aldehyd (4-Pentin-1-al, 15 µmol, 30 Äquivalente) in Anwesenheit von NaBH₃CN (30 µmol, 60 Äquivalente) und konzentrierter Essigsäure (30 µmol, 60 Äquivalente) in 100 µL Methanol versetzt, und die Reaktion über Nacht bei RT belassen. Danach wurde das Harz mit Methanol gewaschen und unter einem N₂-Strom getrocknet.

„Click“-Reaktion von **acpcPNA** an der festen Phase

Die „Click“-Reaktion zur Modifikation der **acpcPNA** am *APC-Spacer* wurde an der festen Phase vorgenommen. Dazu wurden folgende Lösungen gemischt:

Reaktionslösung:

- 37.5 µL Natriumascorbat-Lösung (400 mmol/L in H₂O)
- 51 µL Tris-[(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]amin (0.1 mmol/L in DMSO / t-BuOH = 3 : 1)
- 95 µL Acetonitril
- 171 µL Azid (10 mM in DMSO / t-BuOH 3:1)
- 25.5 µL Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO / t-BuOH 3:1)

Diese Lösungen wurden gründlich gemischt und zum Tränken von 0.5 µmol PNA (am Harz) verwendet. Diese Reaktionsmischung 3 h bei 60 °C belassen. Dabei wurde jeweils nach 30 min die Lösung vorsichtig durch die Säule gepumpt. Im Anschluss wurde nach Abkühlen die Reaktionslösung entfernt, und die feste Phase drei Mal mit Acetonitril und drei Mal mit Methanol gewaschen und unter einem N₂-Strom getrocknet. Danach wurde drei Mal mit je 500 µL Trifluoressigsäure die modifizierte **acpcPNA** vom Harz abgespalten, die Trifluoressigsäure-Lösungen vereinigt und unter einem N₂-Strom zur Trockene eingengt. Der erhaltene Rückstand zwei bis drei Mal mit Diethylether gewaschen und erneut getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt der modifizierten **acpcPNA** wurde in 250 µL Wasser aufgenommen und zur Reinigung mittels HPLC verwendet.

Reinigung von modifizierter PNA mittels semi-präparativer HPLC

Die Oligonukleotide wurden über *reversed phase* HPLC an einer *Shimadzu* 10 HPLC (online-Entgaser, Pumpe LC-10AT, Injektor SIL-10AD, Dioden Array Detektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Für die analytische Chromatographie wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm) verwendet.

(Semi-)Präparative Trennungen erfolgten über eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 10 mm, 5 µm).

Eluens A: 0.1%ige Trifluoressigsäure in Wasser

Eluens B: 0.1%ige Trifluoressigsäure in Methanol

Fluß: 0.8 mL/min bzw. 2.0 mL/min für semi-präparative Trennungen

Die Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur, UV/Vis Detektion bei 260 nm, 385 nm für **PNA1**, **PNA2** und **PNA6**, 260 nm, 506 nm für **PNA3**, 260 nm, 459 nm für **PNA4** und 260 nm für **PNA5**.

Folgender Gradient wurde für die Trennungen verwendet:

Zeit [min]	Anteil an Eluens B [%]
0	20
5	20
60	70
80	70
85	90
90	90
91	20
105	20

Tabelle 10: HPLC-Gradient der semi-präparativen Reinigung modifizierter **acpcPNA**.

Es wurde fraktionsweise das Produkt gesammelt, die Fraktionen auf Produkt-Nukleotid mittels MALDI-Masse überprüft. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum (*Vakuumkonzentrator Christ Alpha RVC*) zur Trockene eingengt.

8.3 Synthesevorschriften

Cyanid-modifizierte Cyaninfarbstoffe

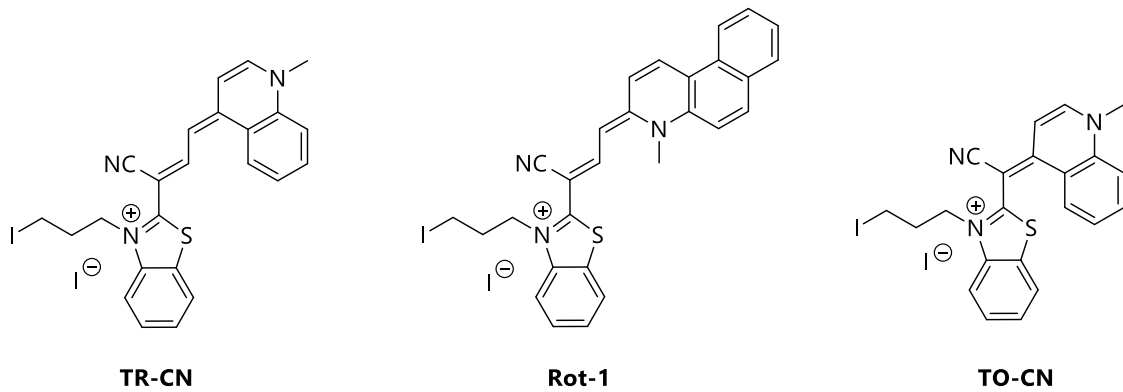


Abbildung 128: Strukturen der Cyanid-modifizierten Cyaninfarbstoffe **TR-CN**, **Rot-1** und **TO-CN**.

Styryl-Farbstoffe mit gelber Fluoreszenzfarbe

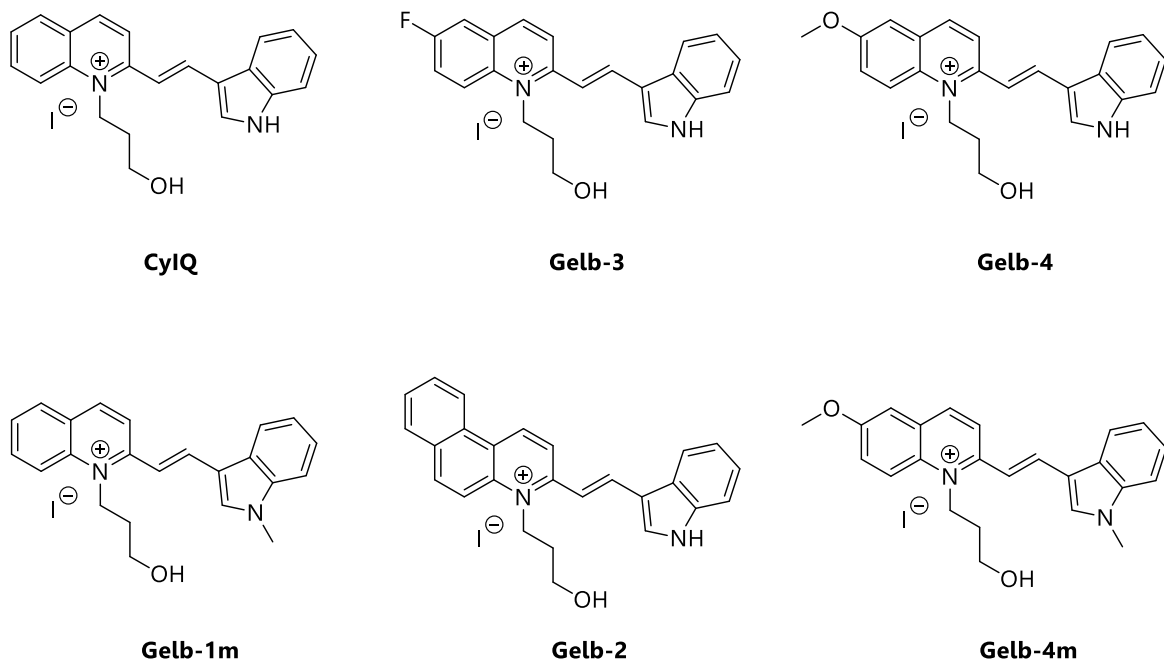
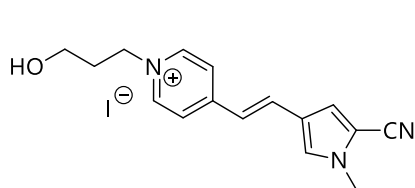
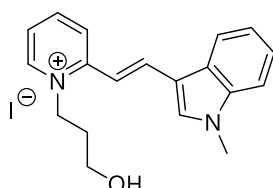


Abbildung 129: Strukturen der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **CyIQ**, **Gelb-1m**, **Gelb-2**, **Gelb-3**, **Gelb-4** und **Gelb-4m**.

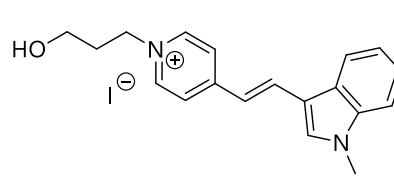
Styryl-Farbstoffe mit blauer und grüner Fluoreszenzfarbe



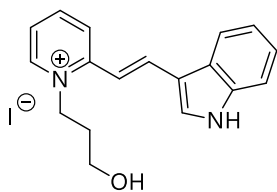
Blau-1m



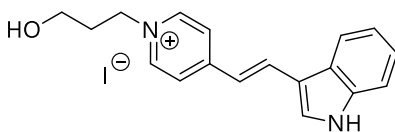
Grün-1m



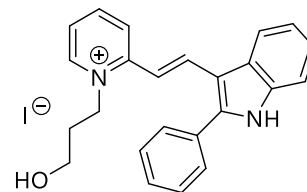
Grün-2m



Grün-1

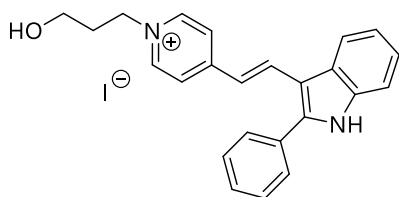


Grün-2

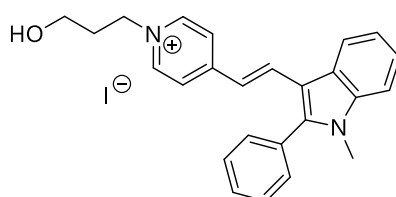


Grün-3

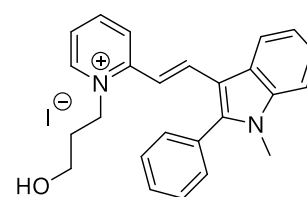
200



Grün-4



Grün-4m



Grün-3m

Abbildung 130: Strukturen der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **Blau-1m**, **Grün-1**, **Grün-1m**, **Grün-2**, **Grün-2m**, **Grün-3**, **Grün-3m**, **Grün-4** und **Grün-4m**.

Styryl-Farbstoffe mit roter Fluoreszenzfarbe

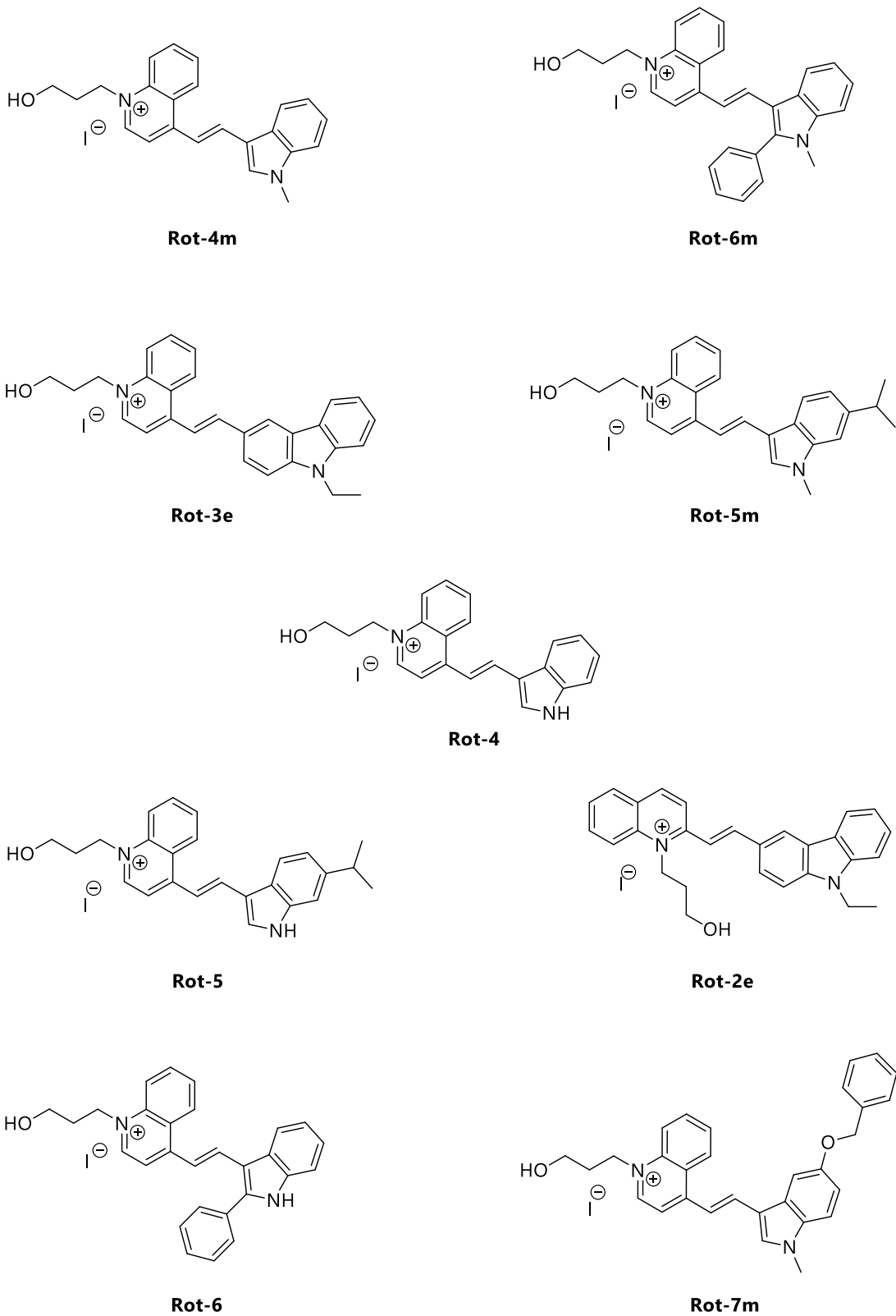
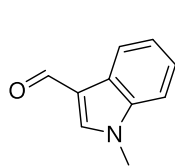
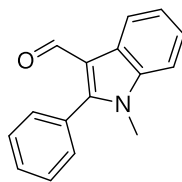


Abbildung 131: Strukturen der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **Rot-2e**, **Rot-3e**, **Rot-4**, **Rot-4m**, **Rot-5**, **Rot-5m**, **Rot-6**, **Rot-6m** und **Rot-7m**.

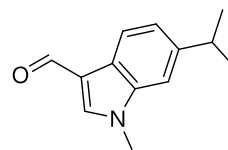
Indol-Aldehyde für Styryl-Farbstoffe



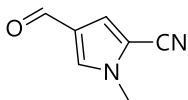
17



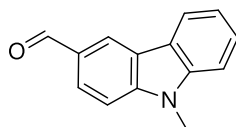
27



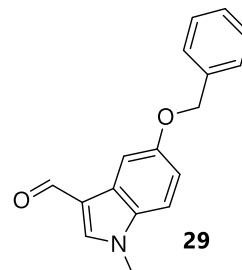
25



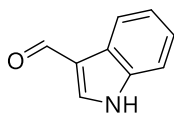
32



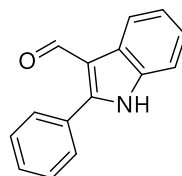
23



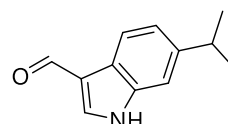
29



16



26



24

Abbildung 132: Strukturen der Indol-Aldehyde für die Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

Chinolinium- und Pyridinium-Derivate für Styryl-Farbstoffe

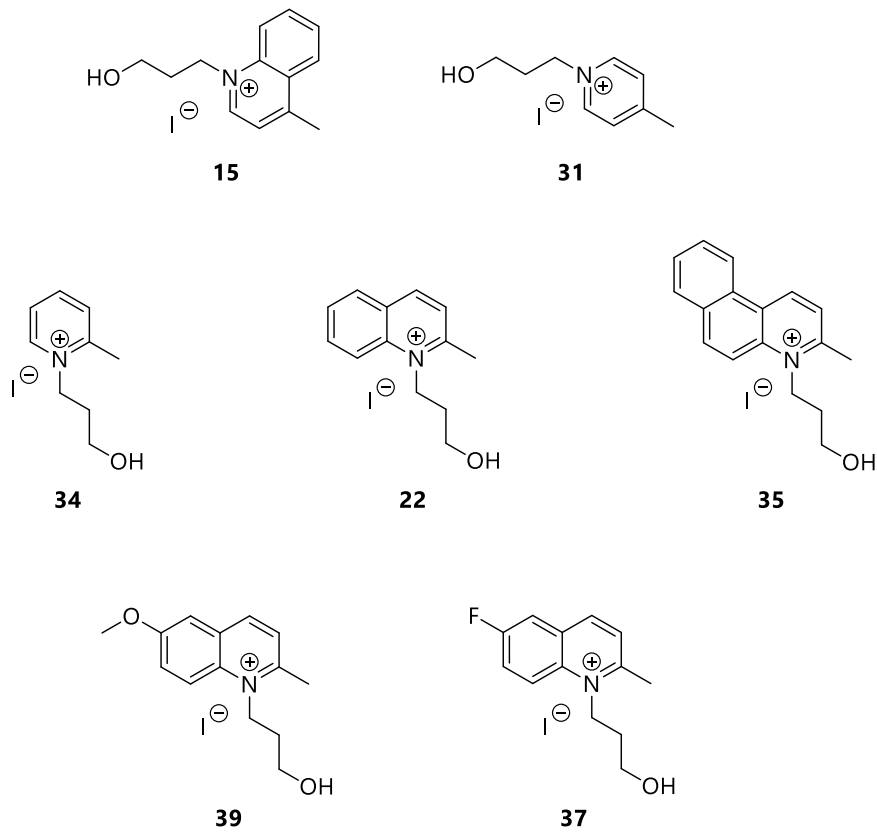


Abbildung 133: Strukturen der Chinolinium- und Pyridinium-Derivate für die Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

TO und TR:

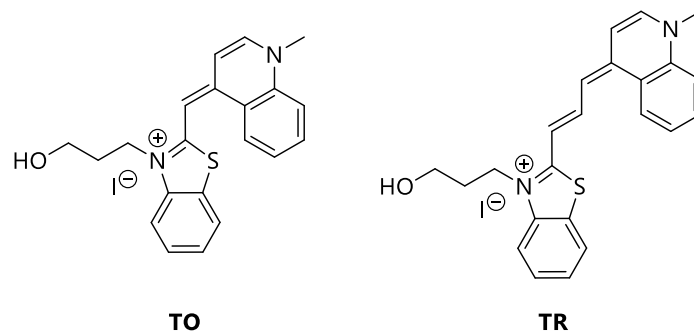


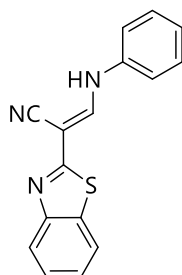
Abbildung 134: Strukturen der Cyaninfarbstoffe **TO** und **TR**.

Übersicht der Styryl-Fluorophore und deren Edukte

Farbstoff	Chinolinium- oder Pyridinium- Derivat	Aldehyd	Gesamt- Ausbeute bis zur OH- Stufe	Gesamt- Ausbeute bis zum Azid
TR-CN	Edukte siehe Abbildung 24		36 %*	31 %
Rot-1	Edukte siehe Abbildung 25		40 %*	-
Rot-2e	22	23	40 %	-
Rot-3e	15		85 %	57 %
Rot-4		16	83 %	-
Rot-4m		17	70 %	44 %
Rot-5		24	64 %	-
Rot-5m		25	63 %	33 %
Rot-6		26	73 %	-
Rot-6m		27	77 %	58 %
Rot-7m		29	90 %	-
Blau-1m	31	32	69 %	54 %
Grün-1	34	16	67 %	-
Grün-1m		17	59 %	32 %
Grün-2	31	16	61 %	-
Grün-2m		17	61 %	49 %
Grün-3	34	26	77 %	-
Grün-3m		27	71 %	31 %
Grün-4	31	26	86 %	-
Grün-4m		27	69 %	-
CylQ	22	16	58 %	27 %
Gelb-1m		17	41 %	26 %
Gelb-2	35	16	41 %	-
Gelb-3	37		31 %	-
Gelb-4	39		40 %	-
Gelb-4m			17	35 %

Tabelle 11: Übersicht zu den neuen Styryl-Farbstoffen. Die Struktur beider Edukte für ein Fluorophor sowie die Gesamtausbeute über alle Synthesestufen bis zum Cyaninfarbstoff (OH-Stufe) und, soweit durchgeführt, die Gesamtausbeute über alle Synthesestufen bis zum Azid des Fluoreszenzfarbstoffes.

Anmerkung: * Hier existiert keine OH-Stufe, deshalb ist Gesamtausbeute auf die Iodid-Spezies berechnet worden. Die Edukte und Ausbeuten von **TO**, **TO-CN** und **TR** sind hier nicht aufgeführt.

(E)-2-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-3-(phenylamino)acrylonitril**10**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus Benzothiazol-2-acetonitril (**9**, 1.74 g, 10.0 mmol), N,N'-Diphenylformamidin (2.16 g, 11.0 mmol) und Triethylorthoformiat (1.48 g, 1.65 mL, 10.0 mmol) in 20 mL Ethanol 3 h in der Siedehitze gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde bei 50 °C unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt, und der erhaltene Rückstand in 25 mL Essigester und 10 mL Hexan suspendiert. Die so gewonnene Ausfällung wurde gesammelt und drei Mal mit Hexan gewaschen. Trocknung des Niederschlages unter vermindertem Druck ergab das Produkt als hellgelben Feststoff (84 %).

DC (Dichlormethan : 2-Propanol = 19 : 1): $R_f = 0.81$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3053 (w), 2199 (s), 1635 (s), 1325 (m), 1305 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

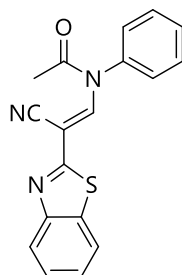
δ (ppm) = 7.19 (t, $J = 7.4$, 1H), 7.40 – 7.46 (m, 3H), 7.51 – 7.58 (m, 3H), 8.03 – 8.17 (m, 2H), 8.63 (d, $J = 13.1$, 1H), 12.09 (d, $J = 13.1$, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 77.0, 117.3, 119.5, 121.5, 122.0, 124.7, 124.8, 126.6, 129.7, 131.6, 138.8, 146.3, 152.7, 164.6.

MS (FAB) m/z (%): 278 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₁₆H₁₂N₃S [M⁺]: 278.0752, gefunden: 278.0750.

(E)-N-(2-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-2-cyanovinyl)-N-phenylacetamid**11**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **10** (2.22 g, 8.00 mmol) und Essigsäureanhydrid (27.0 g, 25.0 mL, 264 mmol) 19 h bei 139 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung auf 100 g Eis gegossen und die wässrige Phase drei Mal mit jeweils 100 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei 50 °C unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt in 125 mL Wasser suspendiert und das Lösungsmittel erneut bei 50 °C unter vermindertem Druck entfernt. Im Rohprodukt enthaltenes Wasser wurde im Anschluss mit ca. 30 mL Ethanol (100%) bei 50 °C koevaporiert. Nach Suspendieren des erhaltenen Rückstandes in 10 mL Essigester, wurde mit 150 mL Hexan verdünnt, der gewonnene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Hexan gewaschen. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als brauner Feststoff erhalten (87 %).

DC (Dichlormethan : 2-Propanol = 19 : 1): $R_f = 0.71$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3054 (w), 2214 (s), 1716 (s), 1603 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

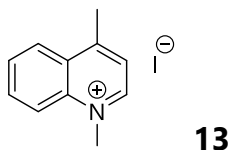
δ (ppm) = 2.03 (s, 2H), 7.36 – 7.45 (m, 1H), 7.52 (td, $J = 8.3, 7.8, 1.3$, 1H), 7.60 (q, $J = 3.0, 2.4$, 6H), 7.97 (d, $J = 7.9$, 1H), 8.06 (d, $J = 7.4$, 1H), 9.11 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 22.8, 86.5, 113.0, 122.2, 125.1, 126.8, 129.4, 129.8, 130.6, 133.6, 137.1, 142.5, 153.0, 163.8, 170.3.

MS (FAB) m/z (%): 320 (100) [M⁺], 278 (49).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₁₈H₁₄N₃OS [M⁺]: 320.0858, gefunden: 320.0858.

1,4-Dimethylchinolin-1-ium-iodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 4-Methylchinolin (**12**, 0.72 g, 0.67 mL, 5.0 mmol) und Methyljodid (0.31 mL, 0.71 g, 5.0 mmol) in 7 mL 1,4-Dioxan 1.5 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 5 mL Diethylether verdünnt, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als gelber Feststoff in quantitativer Ausbeute erhalten.

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.04$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3009 (w), 1604 (m), 1525 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

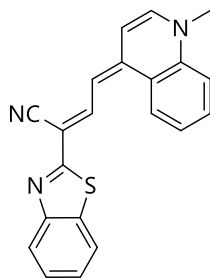
δ (ppm) = 3.00 (s, 3H), 4.58 (s, 3H), 8.06 (td, $J = 6.8, 6.4, 4.4$, 2H), 8.27 (ddd, $J = 8.6, 7.0, 1.4$, 1H), 8.45 – 8.62 (m, 2H), 9.38 (d, $J = 6.0$, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 19.6, 45.1, 119.5, 122.4, 126.8, 128.4, 129.6, 134.9, 137.6, 148.9, 158.1.

MS (FAB) m/z (%): 158 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₁₁H₁₂N [M⁺]: 158.0970, gefunden: 158.0968.

(2*E*,4*Z*)-2-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-4-(1-methylchinolin-4(1*H*)-yliden)but-2-enitril**14**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **11** (0.32 g, 1.00 mmol), **13** (0.29 g, 1.00 mmol) in 10 mL Dichlormethan mit Triethylamin (0.61 g, 0.83 mL, 6.00 mmol) versetzt und anschließend 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter einem Argonstrom auf ca. 2 mL reduziert und die erhaltene Suspension mit 40 mL tert. Butylmethylether verdünnt. Die so gewonnene Ausfällung wurde gesammelt und je drei Mal mit tert. Butylmethylether und Hexan gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend in 300 mL Dichlormethan gelöst, zwei Mal mit je 100 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als dunkelblau-grüner Feststoff erhalten (93 %).

DC (Dichlormethan : 2-Propanol = 19 : 1): $R_f = 0.43$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2920 (w), 2185 (s), 1622 (s), 1531 (m).

¹H-NMR (500 MHz; DMSO-d₆):

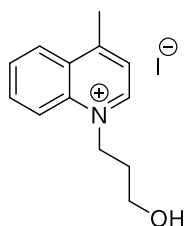
δ (ppm) = 3.85 (s, 3H), 6.57 (d, $J = 13.1$, 1H), 7.18 (d, $J = 7.4$, 1H), 7.27 (t, $J = 7.6$, 1H), 7.42 (t, $J = 7.6$, 1H), 7.52 (t, $J = 7.6$, 1H), 7.68 (d, $J = 8.5$, 1H), 7.78 (dt, $J = 15.7, 7.8$, 3H), 7.94 (d, $J = 7.9$, 1H), 8.15 (d, $J = 8.4$, 1H), 8.36 (d, $J = 13.0$, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 41.2, 88.7, 101.0, 106.4, 117.5, 119.4, 121.3, 122.1, 123.4, 124.1, 124.5, 125.9, 126.8, 132.6, 133.7, 139.3, 140.9, 142.8, 147.8, 154.4, 166.0.

MS (FAB) m/z (%): 342 (100) [M⁺], 107 (36).

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₂₁H₁₆N₃S [M⁺]: 342.1065, gefunden: 342.1064.

1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium-iodid**15**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 4-Methylchinolin (**14**, 0.72 g, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (0.72 mL, 1.40 g, 7.5 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 2 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 5 mL Diethylether verdünnt, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde das Produkt als gelber Feststoff gewonnen (95 %).

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3351 (s), 2934 (m), 2867 (m), 1366 (w), 1060 (m).

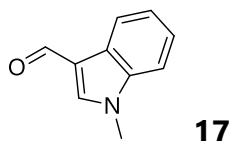
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.11 (t, J = 6.5, 2H), 3.00 (s, 3H), 3.52 (t, J = 5.7, 2H), 4.56 (s, 1H), 5.07 (t, J = 7.2, 2H), 8.01 – 8.09 (m, 2H), 8.21 – 8.31 (m, 1H), 8.50 – 8.61 (m, 2H), 9.39 (d, J = 6.0, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 19.7, 32.0, 54.8, 57.4, 119.3, 122.6, 127.2, 128.9, 129.5, 135.0, 136.7, 148.7, 158.5.

MS (FAB) m/z (%): 202.3 (100) [M].

1-Methyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus Indol-3-carbaldehyd (**16**, 1.45 g, 10.0 mmol), K₂CO₃ (1.52 g, 11.1 mmol) und Dimethylcarbonat (2.70 g, 2.53 mL, 30.0 mmol) in 10 mL *N,N*-Dimethylformamid 19 h bei 130 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung auf 100 g Eis gegossen und die wässrige Phase zwei Mal mit jeweils 100 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zwei Mal mit 150 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei 50 °C unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt kristallisierte anschließend aus dem verbliebenen orangefarbenen Öl aus. Das Kristallisat wurde gesammelt, drei Mal mit Hexan gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein hell-orangefarbener Feststoff erhalten (89 %).

210

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): *R_f* = 0.71.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2802 (w), 1638 (m), 1466 (m), 1072 (m), 743 (s).

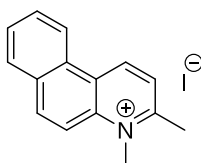
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 3.88 (s, 3H), 7.20 – 7.37 (m, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.0, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.1, 1H), 8.26 (s, 1H), 9.89 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 33.3, 110.9, 116.9, 120.9, 122.4, 123.4, 124.5, 137.7, 141.5, 184.3.

MS (FAB) *m/z* (%): 160.5 (100) [M⁺¹].

Bis(3,4-dimethylbenzo[f]chinolin-4-ium) monoiodid**19**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 3-Methylbenzo-5,6-chinolin (**18**, 0.97 g, 5.0 mmol) und Methyljodid (0.47 mL, 1.07 g, 7.5 mmol) in 7 mL 1,4-Dioxan 20 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 5 mL Diethylether verdünnt, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als gelber Feststoff erhalten (87 %).

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.07$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3031 (w), 1604 (m), 1430 (w).

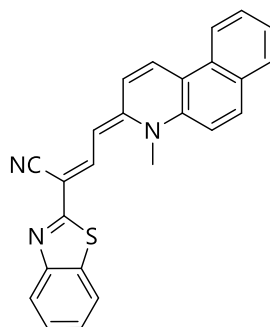
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 3.10 (s, 3H), 4.51 (s, 3H), 7.96 (p, $J = 7.2$, 2H), 8.29 (t, $J = 7.1$, 2H), 8.46 – 8.71 (m, 2H), 9.06 (d, $J = 8.0$, 1H), 9.94 (d, $J = 8.7$, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 22.6, 116.6, 123.9, 125.4, 125.9, 128.0, 129.2, 129.5, 129.8, 130.5, 137.0, 139.8, 140.2, 158.3.

MS (FAB) m/z (%): 208.2 (100) [M⁺].

(2*E*,4*Z*)-2-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-4-(4-methylbenzo[f]chinolin-3(4*H*)-yliden)but-2-enenitril**20**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **11** (0.64 g, 2.00 mmol), **19** (0.67 g, 2.00 mmol) in 10 mL Dichlormethan mit Triethylamin (1.22 g, 1.67 mL, 12.0 mmol) versetzt und anschließend 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zwischen 200 mL Dichlormethan 100 mL Wasser verteilt, drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 100 mL Aceton suspendiert und mindestens 30 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde gesammelt und nach Trocknung unter vermindertem Druck als grüner Feststoff erhalten (87 %).

DC (Dichlormethan : 2-Propanol = 19 : 1): *R_f* = 0.40.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2918 (w), 2188 (s), 1539 (s), 1525 (s), 1358 (w).

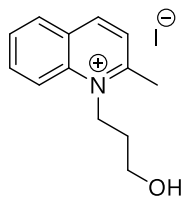
¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 3.94 (s, 3H), 5.98 (d, *J* = 13.3, 1H), 7.27 (t, *J* = 7.7, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.5, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.4, 1H), 7.73 – 7.80 (m, 2H), 7.96 (d, *J* = 7.6, 1H), 8.05 (t, *J* = 11.0, 3H), 8.23 (d, *J* = 9.4, 1H), 8.43 (d, *J* = 13.1, 1H), 8.57 – 8.82 (m, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 30.7, 96.7, 110.3, 114.5, 116.0, 119.7, 120.6, 121.5, 122.4, 123.4, 124.9, 126.2, 126.4, 128.4, 128.6, 128.7, 129.2, 129.8, 132.9, 133.0, 137.9, 139.2, 143.6, 153.9, 165.8.

MS (FAB) *m/z* (%): 329.1 (100) [M⁺].

1-(3-Hydroxypropyl)-2-methylchinolinium-iodid**22**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 2-Methylchinolin (**21**, 0.72 g, 0.67 mL, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (0.72 mL, 1.40 g, 7.5 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 19 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 5 mL Diethylether verdünnt, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde das Produkt als hellgrauer Feststoff gewonnen (67 %).

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3381 (s), 2931 (m), 2877 (m), 1351 (m), 1057 (m).

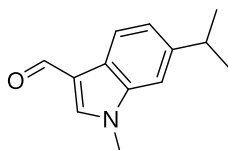
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.98 – 2.16 (m, 2H), 3.13 (s, 3H), 3.63 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 4.81 – 5.13 (m, 3H), 7.99 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.23 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 8.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.60 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 9.11 (d, J = 8.6 Hz, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 22.5, 31.1, 49.3, 57.5, 118.8, 125.5, 128.2, 129.0, 130.6, 135.2, 138.3, 145.6, 160.8.

MS (ESI) m/z (%): berechnet für C₁₃H₁₆NO: 202.1, gefunden: 201.8 (100 %) [M⁺].

6-Isopropyl-1-methyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd**25**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 6-Isopropylindol-3-carbaldehyd (**24**, 0.94 g, 5.0 mmol), K₂CO₃ (0.76 g, 5.5 mmol) und Dimethylcarbonat (1.35 g, 1.26 mL, 15.0 mmol) in 5 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei 130 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung auf 100 g Eis gegossen und die wässrige Phase drei Mal mit jeweils 100 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zwei Mal mit 150 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei 50 °C unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt kristallisierte anschließend aus dem verbliebenen gelben Öl aus. Das Kristallisat wurde gesammelt, drei Mal mit Hexan gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (85 %).

214

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): *R_f* = 0.74.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2955 (m), 2883 (m), 1643 (s), 1399 (m), 1066 (m), 814 (s).

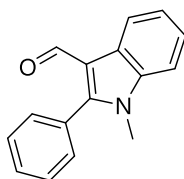
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.25 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 3.02 (p, *J* = 6.9, 1H), 3.87 (s, 3H), 7.17 (dd, *J* = 8.2, 1.5, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.2, 1H), 8.19 (d, *J* = 1.5, 1H), 9.85 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 24.3, 33.2, 33.8, 108.0, 116.8, 120.7, 121.5, 122.7, 138.0, 141.3, 144.3, 184.1.

MS (FAB) *m/z* (%): 202.5 (100) [M⁺¹].

1-Methyl-2-phenyl-1H-indol-3-carbaldehyd**27**

2.21 g (10.0 mmol) 2-Phenyl-1H-indol-3-carbaldehyd **26** und 1.52 g (11.1 mmol) Kaliumcarbonat wurden unter Argonatmosphäre in 10.0 mL trockenem *N,N'*-Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 3.37 mL Dimethylcarbonat (3.60 g, 40.0 mmol) wurde 19 h auf 130 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung, wurde diese auf 100 g Eis gegossen und die wässrige Phase fünf Mal mit je 50 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden zwei Mal mit je 150 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 50 °C entfernt und das Produkt im Vakuum getrocknet. Es konnten 2.30 g des buttergelben Feststoffes isoliert werden (98 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.80$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3044 (w), 1642 (s), 1379 (m), 1069 (m).

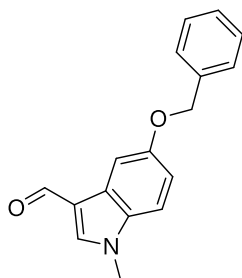
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 3.69 (s, 3H), 7.28 – 7.42 (m, 2H), 7.65 (dp, $J = 10.0, 3.4, 2.9, 6\text{H}$), 8.16 – 8.31 (m, 1H), 9.61 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.0, 111.0, 114.4, 120.8, 122.9, 123.7, 124.5, 128.1, 128.6, 129.9, 131.0, 137.1, 151.2, 185.2.

MS (FAB) m/z (%): 236.4 (100) [M⁺].

5-(Benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-3-carbaldehyd**29**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 5-Benzyloxyindol-3-carbaldehyd (**28**, 0.25 g, 1.00 mmol), K_2CO_3 (0.15 g, 1.11 mmol) und Dimethylcarbonat (0.27 g, 0.25 mL, 3.00 mmol) in 2.0 mL trockenem DMF 19 h bei 130 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Mischung auf 10 g Eis und 50 mL Wasser gegossen und die wässrige Phase zwei Mal mit jeweils 50 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zwei Mal mit 20 mL Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel bei 50 °C unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt kristallisierte anschließend aus dem verbliebenen orangefarbenen Öl aus, wurde zwei Mal mit 15 mL Heptan digeriert und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein hellbeiger Feststoff erhalten (99 %).

216

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.72$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3105 (w), 1637 (s), 1532 (m), 1370 (m), 1224 (m).

1H -NMR (300 MHz; $DMSO-d_6$):

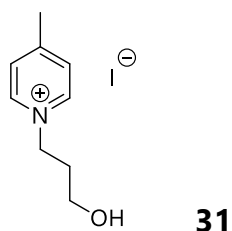
δ (ppm) = 3.84 (s, 3H), 5.14 (s, 2H), 7.03 (dd, $J = 8.9, 2.5$, 1H), 7.29 – 7.42 (m, 3H), 7.44 – 7.51 (m, 3H), 7.72 (d, $J = 2.5$, 1H), 8.18 (s, 1H), 9.85 (s, 1H).

^{13}C -NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$):

δ (ppm) = 33.3, 69.6, 104.1, 104.2, 111.8, 113.6, 116.6, 125.3, 127.6, 128.3, 132.8, 137.3, 141.4, 141.5, 155.0, 184.0, 184.2.

MS (FAB) m/z (%): 266.1 (100) [M^{+1}].

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für $C_{17}H_{15}NO_2$ [M^{+1}]: 266.1176, gefunden: 266.1175.

1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylpyridin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 4-Methylpyridin (**30**, 0.47 g, 0.49 mL, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (0.72 mL, 1.40 g, 7.5 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 16 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 7 mL Diethylether verdünnt und gründlich vermischt. Anschließend wurde die obere Phase entfernt und der Reinigungsschritt zwei Mal wiederholt. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als braunes Öl in quantitativer Ausbeute erhalten.

217

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.04$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3442 (s), 3047 (m), 2926 (m), 1643 (m), 1068 (w).

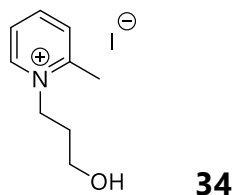
¹H-NMR (300 MHz; DMSO- d_6):

δ (ppm) = 1.97 – 2.12 (m, 2H), 2.60 (s, 3H), , 3.40 – 3.45 (m, 2H), 3.45 – 3.84 (m, 1H), 4.61 (t, $J = 7.0$, 2H), 7.98 (d, $J = 6.1$, 2H), 8.88 – 8.97 (m, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 21.4, 33.1, 57.1, 57.8, 128.1, 128.3, 143.8, 144.0, 158.6.

MS (FAB) m/z (%): 152.6 (100) [M^+].

1-(3-Hydroxypropyl)-2-methylpyridin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 2-Methylpyridin (**33**, 0.47 g, 0.49 mL, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (0.72 mL, 1.40 g, 7.5 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 16 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 7 mL Diethylether verdünnt und gründlich vermischt. Anschließend wurde die obere Phase entfernt und der Reinigungsschritt zwei Mal wiederholt. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als braunes Öl in quantitativer Ausbeute erhalten.

218

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.04$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3441 (s), 3041 (m), 2929 (m), 2882 (w), 1633 (m), 1054 (m).

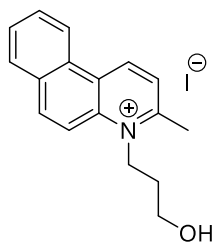
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.02 (p, $J = 6.5$, 2H), 2.84 (s, 3H), 3.34 – 3.40 (m, 1H), 3.49 (t, $J = 5.8$, 2H), 4.62 (t, $J = 7.3$, 2H), 7.96 (t, $J = 6.8$, 1H), 8.04 (d, $J = 8.1$, 1H), 8.47 (td, $J = 7.8, 1.7$, 1H), 8.96 (d, $J = 6.1$, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 19.6, 32.1, 55.0, 57.2, 125.5, 129.8, 145.0, 145.5, 155.2.

MS (FAB) m/z (%): 152.6 (100) [M⁺].

4-(3-Hydroxypropyl)-3-methylbenzo[f]chinolin-4-iumiodid**35**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 3-Methylbenzo-5,6-chinolin (**18**, 0.97 g, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (1.44 mL, 2.80 g, 15.0 mmol) in 5 mL 1,4-Dioxan 68 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 5 mL Diethylether verdünnt, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde das Produkt als hellgrauer Feststoff gewonnen (69 %).

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3334 (s), 2869 (m), 1599 (m), 1337 (m), 1056 (m).

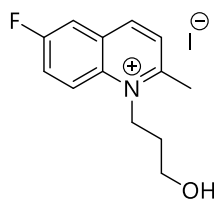
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.00 – 2.20 (m, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.49 – 3.79 (m, 2H), 4.19 (s, 1H), 4.71 – 5.26 (s, 2H), 7.86 – 8.03 (m, 2H), 8.16 – 8.39 (m, 2H), 8.41 – 8.82 (m, 2H), 9.06 (d, J = 8.5, 1H), 9.94 (d, J = 9.1, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 22.0, 31.4, 49.8, 57.5, 116.3, 123.9, 125.8, 126.4, 129.1, 129.5, 129.8, 130.4, 134.2, 137.1, 139.4, 140.0, 157.9.

MS (FAB) m/z (%): 252.2 (100) [M⁺].

6-Fluor-1-(3-hydroxypropyl)-2-methylchinolin-1-iumiodid**37**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 6-Fluor-2-methylchinolin (**36**, 0.81 g, 0,68 mL, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (1.44 mL, 2.80 g, 15.0 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 29 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 5 mL Diethylether verdünnt, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend aus Methanol und Diethylether umkristallisiert. Das gereinigte Produkt wurde gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die gewünschte Verbindung konnte als leicht grünlicher Feststoff gewonnen werden (55 %).

220

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3346 (s), 2927 (w), 2878 (w), 1374 (w), 1052 (m).

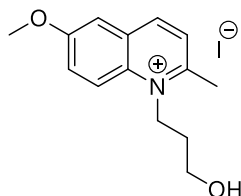
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.00 – 2.17 (m, 2H), 3.13 (s, 3H), 3.63 (t, J = 5.6, 2H), 4.51 (s, 1H), 5.00 (t, J = 7.9, 2H), 8.13 – 8.23 (m, 2H), 8.29 (dd, J = 8.3, 3.0, 1H), 8.70 (dd, J = 9.8, 4.4, 1H), 9.05 (d, J = 8.7, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 22.5, 31.1, 49.7, 57.5, 113.8, 122.4, 124.6, 126.6, 129.7, 129.8, 135.2, 144.8, 160.7.

MS (FAB) m/z (%): 220.1 (100) [M⁺].

1-(3-Hydroxypropyl)-6-methoxy-2-methylchinolin-1-iumiodid**39**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 6-Methoxychinaldin (**38**, 0.87 g, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol 1.44 mL, 2.80 g, 15.0 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 18 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend aus Methanol und Diethylether umkristallisiert. Das gereinigte Produkt wurde gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die gewünschte Verbindung konnte als hellgelber Feststoff gewonnen werden (60 %).

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3299 (s), 2928 (w), 2865 (w), 1389 (m), 1064 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

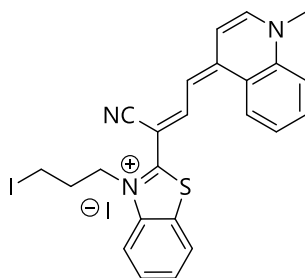
δ (ppm) = 1.99 – 2.10 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.62 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 4.81 – 5.01 (m, 3H), 7.78 – 7.89 (m, 2H), 8.06 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 8.6 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 22.0, 31.3, 40.1, 49.3, 56.3, 108.5, 120.6, 125.8, 126.7, 130.2, 133.9, 144.1, 157.6, 158.5.

MS (FAB) m/z (%): 232.2 (21) [M⁺], 137.1 (100), 90.1 (27).

Bis(2-((1*E*,3*Z*)-1-cyano-3-(1-methylchinolin-4(1*H*)-ylidene)prop-1-en-1-yl)-3-(3-iodopropyl)benzo[d]thiazol-3-ium)iodid



TR-CN

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **14** (0.30 g, 0.88 mmol) in 1,3-Diodopropan (10.0 mL, 25.7 g, 86.7 mmol) 4 Tage bei 90 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung in ca. 600 mL Aceton gelöst und über 150 g Kieselgel aufgereinigt. Es wurde dabei mit Aceton eluiert, bis keine Blaufärbung der gesammelten Fraktionen erkennbar war (zur Beschleunigung wurde das Kieselgel mehrmals durchmischt). Anschließend wurde das Produkt mit Aceton + Natriumiodid (500 mg / 100 mL) eluiert und das Lösungsmittel bei 50 °C unter vermindertem Druck entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde zwischen 150 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde vier Mal mit 100 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Koevaporation mit 100 mL Ethanol (100%) und Trocknen unter vermindertem Druck ergab das Produkt als dunkel-violetten Feststoff (53 %).

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.14$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2920 (w), 2182 (s), 1611 (m), 1557 (m), 1464 (s).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.43 (t, $J = 7.7$, 2H), 3.38 (t, $J = 7.3$, 2H), 4.40 (s, 3H), 4.62 (t, $J = 7.8$, 2H), 7.21 (d, $J = 14.2$, 1H), 7.41 (t, $J = 7.6$, 1H), 7.55 – 7.59 (m, 1H), 7.75 (d, $J = 8.4$, 1H), 7.95 – 8.03 (m, 3H), 8.15 – 8.19 (m, 1H), 8.27 – 8.31 (m, 2H), 8.51 (dd, $J = 8.9, 1.4$, 1H), 9.00 (d, $J = 6.8$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 28.0, 31.2, 42.8, 47.0, 73.5, 109.3, 112.1, 112.7, 116.2, 118.1, 121.6, 123.3, 123.8, 124.0, 124.1, 127.0, 127.8, 133.5, 137.7, 140.0, 141.1, 145.2, 150.6, 163.3.

MS (FAB) m/z (%): 510 (100) [M^+], 418 (19), 107 (21).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{IN}_3\text{S}^+$ [M^+]: 510.0495, gefunden: 510.0496.

Elementaranalyse

berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{I}_2\text{N}_3\text{S}$:

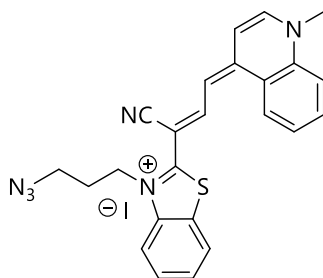
N: 6.59 % → gefunden: 5.99 %

C: 45.23 % → gefunden: 45.75 %

H: 3.32 % → gefunden: 3.70%

S: 5.03 % → gefunden: 4.48%

3-(3-Azidopropyl)-2-((1E,3Z)-1-cyano-3-(1-methylchinolin-4(1H)-yliden)prop-1-en-1-yl)benzo[d]thiazol-3-iumiodid



TR-CN-N₃

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **TR-CN** (0.13 g, 0.20 mmol), Natriumazid (0.26 g, 4.00 mmol) und Natriumiodid (0.10 g, 0.67 mmol) in 5 mL *N,N'*-Dimethylformamid 20 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 200 Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 150 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 100 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein dunkel-violetter Feststoff erhalten (86 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.07$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2184 (w), 2087 (s), 1611 (w), 1556 (m), 1467 (s).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.13 (p, $J = 7.0$, 2H), 3.57 (t, $J = 6.6$, 2H), 4.38 (s, 3H), 4.62 (t, $J = 7.7$, 2H), 7.14 (d, $J = 14.2$, 1H), 7.38 (t, $J = 7.7$, 1H), 7.52 (t, $J = 7.8$, 1H), 7.70 (d, $J = 8.6$, 1H), 7.96 (dd, $J = 21.5, 11.2$, 3H), 8.14 (t, $J = 7.8$, 1H), 8.25 (dd, $J = 7.5, 4.5$, 2H), 8.44 (d, $J = 8.7$, 1H), 8.97 (d, $J = 6.9$, 1H).

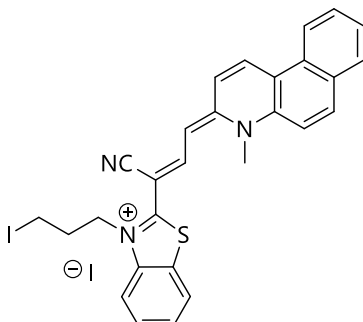
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 27.5, 43.7, 44.9, 47.7, 74.5, 110.1, 113.1, 113.5, 117.1, 119.1, 122.5, 124.2, 124.7, 124.8, 125.0, 128.0, 128.7, 134.4, 138.6, 140.9, 141.9, 146.1, 151.4, 164.1.

MS (FAB) m/z (%): 425 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₄H₂₁N₆IS⁺ [M⁺]: 425.1543, gefunden: 425.1542.

2-((1*E*,3*Z*)-1-Cyano-3-(4-methylbenzo[*f*]chinolin-3(4*H*)-yliden)prop-1-en-1-yl)-3-(3-iodpropyl)benzo[*d*]thiazol-3-iumiodid



Rot-1

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **20** (0.16 g, 0.41 mmol) in 1,3-Diiodopropan (4.00 mL, 10.3 g, 34.8 mmol) 67 h bei 90 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit ca. 6 mL Diethylether verdünnt und das Rohprodukt abgesaugt. Das gesammelte Rohprodukt wurde in ca. 60 mL Aceton suspendiert und 30 min im Ultraschallbad behandelt, erneut gesammelt und zur Aufreinigung über Kieselgel in Dichlormethan gelöst und. Zu Beginn der chromatographischen Reinigung wurde mit Dichlormethan eluiert, bis keine Blaufärbung der gesammelten Fraktionen erkennbar war. Anschließend wurde das Produkt mit Dichlormethan : Methanol (9 : 1) + Natriumiodid (200 mg / 100 mL) eluiert und das Lösungsmittel bei 50 °C unter vermindertem Druck entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde zwischen 150 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde vier Mal mit 100 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Koevaporation mit 100 mL Ethanol (100%) und Trocknen unter vermindertem Druck ergab das Produkt als dunkel-violetten Feststoff (73 %).

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.26$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2916 (w), 2184 (m), 1567 (s), 1486 (s), 1444 (s), 1358 (w).

¹H-NMR (600 MHz; DMSO-d₆):

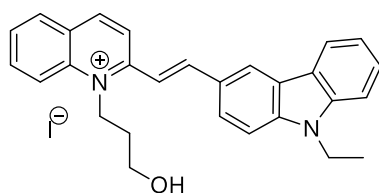
δ (ppm) = 2.52 – 2.56 (m, 2H), 3.41 (d, *J* = 7.3, 2H), 4.44 (s, 3H), 4.63 – 4.72 (m, 2H), 6.80 (dd, *J* = 14.3, 2.8, 1H), 7.44 – 7.48 (m, 1H), 7.61 – 7.64 (m, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.4, 1H), 7.87 (t, *J* = 7.5, 1H), 7.95 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4, 1H), 8.01 – 8.05 (m, 2H), 8.25 (dd, *J* = 8.0, 1.3, 1H), 8.41 (d, *J* = 9.4, 1H), 8.53 – 8.57 (m, 1H), 8.62 (d, *J* = 9.3, 1H), 9.04 (d, *J* = 8.5, 1H), 9.61 (d, *J* = 9.3, 1H).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 32.6, 48.6, 70.3, 74.6, 109.7, 113.8, 117.2, 117.6, 121.8, 123.1, 124.2, 124.3, 124.9, 125.7, 128.6, 128.7, 129.2, 129.5, 129.9, 130.7, 136.4, 136.9, 140.2, 142.5, 143.9, 154.6, 165.3.

MS (FAB) *m/z* (%): 560.1 (90) [M⁺].

HR-MS (FAB) *m/z*: berechnet für C₂₈H₂₃N₃IS⁺ [M⁺]: 560.0652, gefunden: 560.0651.

(E)-2-(2-(9-Ethyl-9H-carbazol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium-iodid**Rot-2e**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **22** (0.33 g, 1.00 mmol) und 9-Ethyl-3-carbazolcarboxaldehyd (**23**, 0.67 g, 3.00 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.38 g, 0.44 mL, 4.40 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. (Aus der Mutterlauge konnte zusätzlich eine zweite Produktfraktion gewonnen werden.) Es wurde ein orangefarbener bis roter Feststoff erhalten (59 %).

228

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.26$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3275 (m), 1583 (s), 1568 (s), 1523 (w), 1379 (m), 1301 (w), 1056 (m).

¹H-NMR (500 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.35 (t, $J = 7.2$, 3H), 2.21 (t, $J = 7.5$, 2H), 3.76 (q, $J = 5.1$, 2H), 4.50 (q, $J = 7.1$, 2H), 5.13 (t, $J = 8.0$, 2H), 5.30 (t, $J = 4.7$, 1H), 7.32 (t, $J = 7.4$, 1H), 7.54 (t, $J = 7.7$, 1H), 7.68 (d, $J = 8.2$, 1H), 7.77 (d, $J = 8.5$, 1H), 7.90 (t, $J = 7.5$, 1H), 7.97 (d, $J = 15.6$, 1H), 8.05 – 8.10 (m, 1H), 8.14 (t, $J = 7.9$, 1H), 8.22 (d, $J = 7.7$, 1H), 8.30 (d, $J = 8.0$, 1H), 8.49 – 8.57 (m, 2H), 8.63 (d, $J = 9.1$, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.96 (d, $J = 8.9$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 14.3, 32.1, 37.8, 48.7, 58.0, 110.4, 110.5, 115.1, 119.2, 120.5, 121.1, 122.6, 122.8, 123.3, 126.6, 127.2, 128.1, 128.2, 129.0, 130.7, 135.2, 138.9, 140.7, 142.2, 143.8, 150.0, 156.2.

MS (FAB) m/z (%): 407.1 (13) [M^+], 137.5 (61).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$ [M^+]: 407.2123, gefunden: 407.2126.

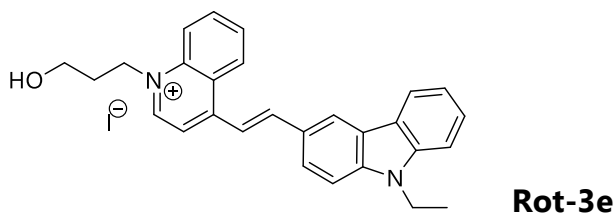
Elementaranalyse

berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$:

N: 5.24 % → gefunden: 5.12 %

C: 62.93 % → gefunden: 62.53 %

H: 5.09 % → gefunden: 5.21 %

(E)-4-(2-(9-Ethyl-9H-carbazol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium-iodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (0.33 g, 1.00 mmol) und 9-Ethyl-3-carbazolcarboxaldehyd (**23**, 0.67 g, 3.00 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.38 g, 0.44 mL, 4.40 mmol) versetzt und 20 Minuten bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (89 %).

230

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.21$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3335 (s), 1563 (m), 1530 (m), 1346 (w), 1328 (w), 1079 (m), 1048 (m).

¹H-NMR (500 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.36 (t, $J = 7.1$, 3H), 2.13 (t, $J = 6.8$, 2H), 3.56 (t, $J = 5.8$, 2H), 4.51 (q, $J = 7.1$, 2H), 4.82 (s, 1H), 5.00 (t, $J = 7.2$, 2H), 7.31 (t, $J = 7.4$, 1H), 7.53 (t, $J = 7.6$, 1H), 7.68 (d, $J = 8.1$, 1H), 7.76 (d, $J = 8.5$, 1H), 8.04 (t, $J = 7.7$, 1H), 8.13 (dd, $J = 8.6, 1.8$, 1H), 8.25 (dd, $J = 8.5, 6.3$, 2H), 8.35 (d, $J = 15.7$, 1H), 8.44 (d, $J = 15.8$, 1H), 8.49 (d, $J = 7.7$, 2H), 8.88 (s, 1H), 9.14 (d, $J = 8.5$, 1H), 9.28 (d, $J = 6.6$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 14.3, 32.5, 37.8, 54.6, 58.0, 110.3, 110.5, 115.7, 116.7, 119.5, 120.3, 121.1, 122.4, 122.8, 123.4, 127.0, 127.2, 127.3, 128.1, 129.3, 135.4, 138.4, 140.7, 141.8, 145.6, 147.7, 153.7.

MS (FAB) m/z (%): 407.0 (72) [M^+], 137.4 (100).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$ [M^+]: 407.2123, gefunden: 407.2121.

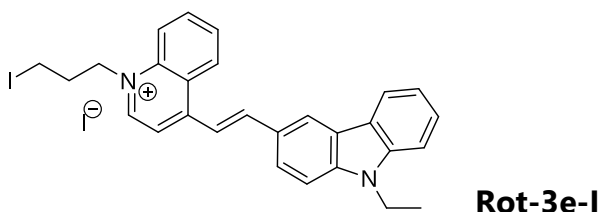
Elementaranalyse

berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$:

N: 5.24 % → gefunden: 5.18 %

C: 62.93 % → gefunden: 62.03 %

H: 5.09 % → gefunden: 5.27 %

(E)-4-(2-(9-Ethyl-9H-carbazol-3-yl)vinyl)-1-(3-iodpropyl)chinolin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-3e** (0.27 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2 g Natriumiodid versetzt und in 75 mL Aceton und 10 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck wurde der erhaltene Rückstand in 15 mL Aceton und 8 mL Methanol aufgenommen und 75 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der enthaltene Niederschlag abgetrennt und das Filtrat bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 5 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 10 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (93 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.27$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1579 (m), 1551 (s), 1327 (m), 1227 (s).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

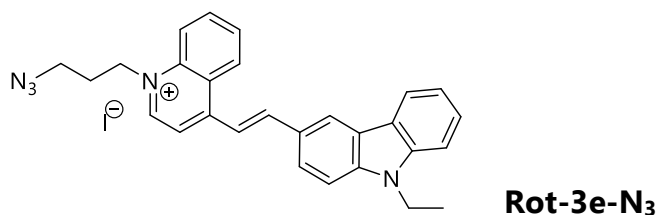
δ (ppm) = 1.36 (t, $J = 7.1$, 3H), 2.51 – 2.61 (m, 2H), 3.37 – 3.44 (m, 2H), 4.48 – 4.55 (m, 2H), 4.95 – 5.10 (m, 2H), 7.30 – 7.34 (m, 1H), 7.54 (t, $J = 7.8$, 2H), 7.68 – 7.71 (m, 1H), 7.76 – 7.79 (m, 1H), 8.03 – 8.08 (m, 1H), 8.13 – 8.17 (m, 1H), 8.27 (t, $J = 7.8$, 2H), 8.39 –

8.45 (m, 1H), 8.47 – 8.53 (m, 2H), 8.89 (t, $J = 2.6, 2.2$, 1H), 9.17 (d, $J = 12.0, 8.8$, 1H), 9.29 (dt, $J = 8.2, 4.4$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 11.6, 28.3, 28.4, 29.7, 35.1, 107.6, 113.0, 113.9, 116.6, 117.6, 118.3, 119.8, 120.0, 120.6, 124.3, 124.3, 124.4, 124.6, 125.4, 126.6, 132.8, 135.8, 137.9, 139.1, 143.1, 144.9, 151.3.

MS (FAB) m/z (%): 517.1 (20) [M^+].

(E)-1-(3-Azidpropyl)-4-(2-(9-ethyl-9H-carbazol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-3e-I** (0.19 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 20 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (73 %).

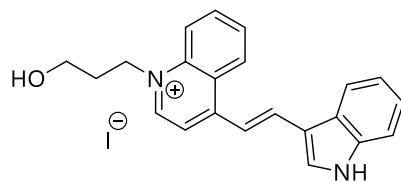
DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.28$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2928 (w), 2092 (s), 1551 (s), 1326 (w), 1225 (s).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.28 – 1.41 (m, 3H), 2.24 (s, 2H), 3.59 (t, $J = 6.4$, 2H), 4.43 – 4.58 (m, 2H), 5.00 (s, 2H), 7.33 (d, $J = 8.2$, 1H), 7.55 (d, $J = 9.4$, 1H), 7.70 (d, $J = 8.3$, 1H), 7.78 (d, $J = 8.6$, 1H), 8.06 (t, $J = 7.6$, 1H), 8.15 (d, $J = 8.7$, 1H), 8.26 (d, $J = 8.4$, 2H), 8.34 – 8.48 (m, 2H), 8.53 (d, $J = 8.0$, 2H), 8.89 (s, 1H), 9.16 (d, $J = 8.4$, 1H), 9.31 (d, $J = 6.7$, 1H).

MS (FAB) m/z (%): 432.2 (100) [M⁺].

(E)-4-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)quinolin-1-iumiodid**Rot-4**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (0.33 g, 1.00 mmol) und Indol-3-carbaldehyd (**16**, 0.44 g, 3.00 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.20 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Produkt konnte als roter Feststoff gewonnen werden (87 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.18$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3372 (m), 1584 (s), 1554 (s), 1510 (m), 1397 (m), 1311 (w), 1048 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.10 (t, $J = 6.5$, 2H), 3.48 – 3.65 (m, 2H), 4.63 – 4.87 (m, 1H), 4.93 (t, $J = 7.1$, 2H), 7.24 – 7.36 (m, 2H), 7.50 – 7.61 (m, 1H), 7.93 – 8.07 (m, 2H), 8.15 – 8.30 (m, 2H), 8.33 – 8.48 (m, 3H), 8.59 (d, $J = 15.6$, 1H), 8.98 (d, $J = 8.6$, 1H), 9.11 (d, $J = 6.8$, 1H), 12.14 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.9, 53.5, 57.5, 99.5, 112.7, 113.5, 114.6, 118.8, 120.3, 121.5, 123.1, 125.4, 125.7, 126.5, 128.4, 133.0, 134.6, 137.4, 137.9, 138.7, 146.2, 153.7.

MS (FAB) m/z (%): 329.2 (10) [M⁺], 137.5 (53).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₂H₂₁N₂O [M⁺]: 329.1654, gefunden: 329.1652.

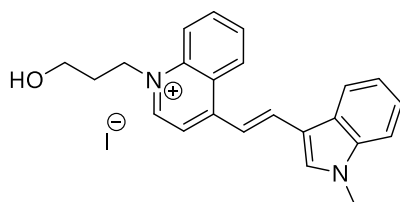
Elementaranalyse

berechnet für C₂₂H₂₁N₂O:

N: 6.14 % → gefunden: 6.12 %

C: 57.91 % → gefunden: 57.66 %

H: 4.64 % → gefunden: 4.67 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium-iodid**Rot-4m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (0.33 g, 1.00 mmol) und **17** (0.34 g, 2.11 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (83 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.29$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3362 (m), 1585 (s), 1561 (m), 1519 (s), 1299 (w), 1225 (w), 1077 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.09 (t, $J = 6.6$, 2H), 3.53 (q, $J = 5.2$, 2H), 3.92 (s, 3H), 4.83 (t, $J = 4.8$, 1H), 4.92 (t, $J = 7.0$, 2H), 7.29 – 7.39 (m, 2H), 7.56 – 7.64 (m, 1H), 7.92 – 7.97 (m, 1H), 7.97 – 8.05 (m, 1H), 8.19 (t, $J = 7.9$, 1H), 8.23 – 8.29 (m, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.37 – 8.45 (m, 2H), 8.54 (d, $J = 15.7$, 1H), 8.94 (d, $J = 8.4$, 1H), 9.08 (d, $J = 6.6$, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.9, 33.4, 53.5, 57.5, 111.1, 112.6, 113.4, 113.6, 118.7, 120.4, 121.8, 123.1, 125.7, 125.8, 126.4, 128.3, 134.6, 136.2, 137.8, 137.9, 138.1, 146.1, 153.5.

MS (FAB) m/z (%): 343.2 (100) [M⁺], 136.5 (27).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₃H₂₃N₂O [M⁺]: 343.1810, gefunden: 343.1808.

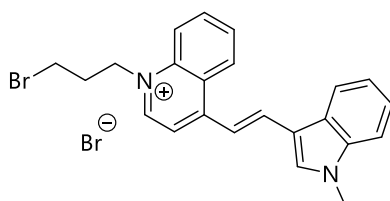
Elementaranalyse

berechnet für C₂₃H₂₃IN₂O:

N: 5.96 % → gefunden: 5.83 %

C: 58.73 % → gefunden: 57.76%

H: 4.93 % → gefunden: 5.03 %

(E)-1-(3-Brompropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium-bromid**Rot-4m-Br**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-4m** (0.24 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 0.1 g Natriumbromid versetzt und in 100 mL Aceton und 75 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 10 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 5 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein schwarzroter Feststoff erhalten (96 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.28$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3258 (m), 2916 (w), 1583 (w), 1561 (w), 1519 (m), 1072 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

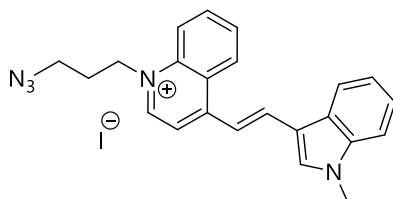
δ (ppm) = 2.54 (s, 2H), 3.66 – 3.72 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 4.95 (t, $J = 7.3$, 2H), 7.35 (p, $J = 7.0$, 2H), 7.61 (d, $J = 7.3$, 1H), 7.98 (dd, $J = 15.9, 8.7$, 2H), 8.20 (t, $J = 7.9$, 1H), 8.25 – 8.29 (m, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.43 (dd, $J = 12.7, 7.8$, 2H), 8.58 (d, $J = 15.6$, 1H), 8.96 (d, $J = 8.5$, 1H), 9.11 (d, $J = 6.7$, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 30.5, 31.8, 33.3, 54.4, 111.0, 112.5, 113.5, 113.6, 118.5, 120.3, 121.7, 123.1, 125.6, 125.8, 126.4, 128.3, 134.7, 136.3, 137.8, 138.3, 146.0, 153.8.

MS (FAB) m/z (%): 405.3 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₂₃H₂₂N₂Br⁺ [M⁺]: 405.0961, gefunden: 405.0960.

(E)-1-(3-Azidpropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid**Rot-4m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-4m-Br** (0.17 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (68 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.23$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2083 (s), 1586 (m), 1521 (m), 1349 (w).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

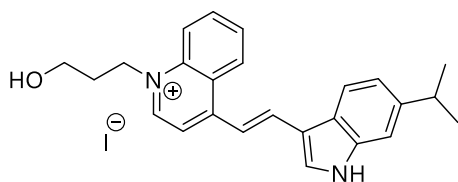
δ (ppm) = 2.21 (p, $J = 6.9$, 2H), 3.58 (t, $J = 6.6$, 2H), 3.94 (s, 3H), 4.91 (t, $J = 7.2$, 2H), 7.36 (tt, $J = 7.2$, 5.7, 2H), 7.59 – 7.64 (m, 1H), 7.95 – 8.03 (m, 2H), 8.21 (ddd, $J = 8.6$, 6.9, 1.3, 1H), 8.27 (dd, $J = 7.1$, 1.9, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.43 (t, $J = 8.0$, 2H), 8.57 (d, $J = 15.6$, 1H), 8.96 (dd, $J = 8.9$, 1.4, 1H), 9.11 (d, $J = 6.7$, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 28.3, 33.4, 47.9, 53.4, 111.1, 112.6, 113.5, 113.7, 118.7, 120.4, 121.8, 123.2, 125.7, 125.9, 126.5, 128.4, 134.7, 136.4, 137.9, 137.9, 138.3, 146.1, 153.8.

MS (FAB) m/z (%): 368.2 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₃H₂₂N₅⁺ [M⁺]: 368.1870, gefunden: 368.1872.

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(6-isopropyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium-iodid**Rot-5**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (0.33 g, 1.00 mmol) und 6-Isopropylindol-3-carboxaldehyd (**24**, 0.37 g, 2.00 mmol) in 10 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 3 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein schwarz-roter Feststoff erhalten (67 %).

242

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.21$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2953 (w), 2864 (w), 1583 (s), 1556 (s), 1516 (m), 1397 (m), 1218 (m), 1044 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.27 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 2.02 – 2.18 (m, 2H), 3.03 (q, $J = 6.8$, 1H), 3.48 – 3.61 (m, 2H), 4.82 (t, $J = 4.8$, 1H), 4.93 (t, $J = 7.2$, 2H), 7.20 (d, $J = 8.4$, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.92 – 8.07 (m, 2H), 8.11 – 8.24 (m, 2H), 8.28 (s, 1H), 8.37 – 8.48 (m, 2H), 8.56 (d, $J = 15.4$, 1H), 8.96 (d, $J = 8.7$, 1H), 9.09 (d, $J = 6.8$, 1H), 12.05 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 24.3, 31.9, 33.5, 53.5, 57.5, 109.6, 112.4, 113.3, 114.6, 118.7, 120.2, 120.7, 123.5, 125.7, 126.5, 128.4, 133.0, 134.6, 137.8, 137.9, 139.0, 143.9, 146.1, 153.7.

MS (FAB) m/z (%): 371.2 (58) [M⁺], 137.5 (61).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₅H₂₇N₂O [M⁺]: 371.2123, gefunden: 371.2126.

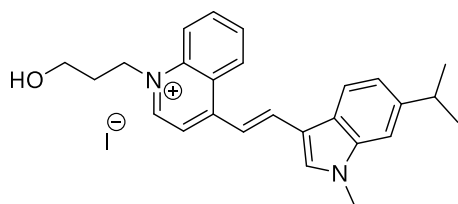
Elementaranalyse

berechnet für C₂₅H₂₇IN₂O:

N: 5.62 % → gefunden: 5.42 %

C: 60.25 % → gefunden: 58.11 %

H: 5.46 % → gefunden: 5.48 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(6-isopropyl-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-chinolin-1-iumiodid**Rot-5m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (0.33 g, 1.00 mmol) und **25** (0.40 g, 2.00 mmol) in 10 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein schwarz-roter Feststoff erhalten (78 %).

244

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.26$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3297 (m), 2922 (w), 2871 (w), 1577 (m), 1550 (m), 1520 (s), 1221 (m), 1069 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.30 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.98 – 2.16 (m, 2H), 3.06 (q, $J = 6.4, 5.8, 1\text{H}$), 3.53 (q, $J = 5.3, 2\text{H}$), 3.91 (s, 1H), 4.82 (t, $J = 4.8, 1\text{H}$), 4.90 (t, $J = 7.2, 2\text{H}$), 7.24 (d, $J = 8.0, 1\text{H}$), 7.44 (s, 1H), 7.87 – 8.01 (m, 2H), 8.11 – 8.22 (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.33 – 8.45 (m, 2H), 8.51 (d, $J = 15.5, 1\text{H}$), 8.93 (d, $J = 8.3, 1\text{H}$), 9.07 (d, $J = 6.7, 1\text{H}$).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 18.5, 24.3, 31.9, 33.3, 33.8, 57.5, 108.3, 112.3, 113.3, 113.7, 118.7, 120.4, 120.9, 124.0, 125.6, 126.4, 128.3, 134.6, 136.3, 137.8, 138.3, 138.4, 144.1, 146.0, 153.5.

MS (FAB) m/z (%): 385.2 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₆H₂₉N₂O [M⁺]: 385.2280, gefunden: 385.2278.

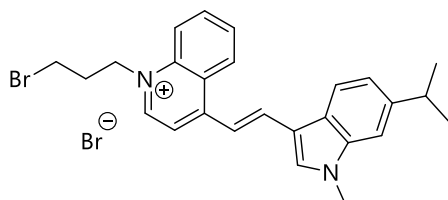
Elementaranalyse

berechnet für C₂₆H₂₉N₂O:

N: 5.47 % → gefunden: 5.16 %

C: 60.94 % → gefunden: 60.18 %

H: 5.70 % → gefunden: 5.86 %

(E)-1-(3-Brompropyl)-4-(2-(6-isopropyl-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumbromid**Rot-5m-Br**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-5m** (0.26 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 0.1 g Natriumbromid versetzt und in 100 mL Aceton und 75 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 10 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 5 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein schwarzroter Feststoff erhalten (76 %).

246

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.32$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2951 (w), 1578 (m), 1552 (w), 1516 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

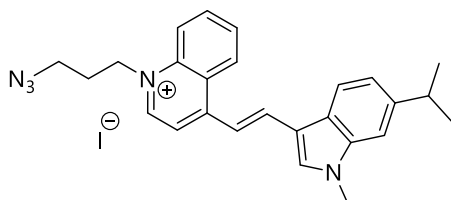
δ (ppm) = 1.31 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 3.07 (q, $J = 7.0$, 1H), 3.13 – 3.60 (m, 2H), 3.69 (t, $J = 6.6$, 2H), 3.92 (s, 3H), 4.94 (t, $J = 7.3$, 2H), 7.25 (d, $J = 8.2$, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.92 – 7.99 (m, 2H), 8.19 (t, $J = 8.5$, 2H), 8.27 (s, 1H), 8.41 (dd, $J = 7.9, 4.0$, 2H), 8.55 (d, $J = 15.5$, 1H), 8.95 (d, $J = 8.7$, 1H), 9.07 (d, $J = 6.8$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 24.2, 30.5, 31.8, 33.3, 33.7, 54.3, 85.9, 108.2, 112.2, 113.3, 113.7, 118.5, 120.3, 120.9, 123.9, 125.6, 126.4, 128.3, 134.6, 136.4, 137.8, 138.3, 138.6, 144.1, 145.9, 153.8.

MS (FAB) m/z (%): 447.0 (20) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Br}^+$ [M^+]: 447.1430, gefunden: 447.1429.

(E)-1-(3-Azidpropyl)-4-(2-(6-isopropyl-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid**Rot-5m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-5m-Br** (0.16 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (69 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.27$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2952 (w), 2095 (s), 1578 (m), 1516 (s), 1219 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

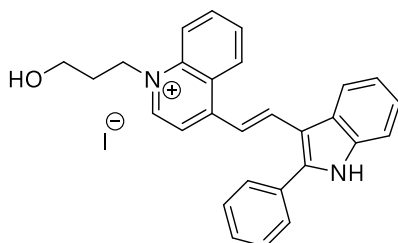
δ (ppm) = 1.31 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 2.19 (p, $J = 6.7$, 2H), 3.08 (hept, $J = 7.0$, 1H), 3.57 (t, $J = 6.5$, 2H), 3.92 (s, 3H), 4.89 (t, $J = 7.3$, 2H), 7.25 (dd, $J = 8.2, 1.6$, 1H), 7.45 (d, $J = 1.6$, 1H), 7.90 – 8.02 (m, 2H), 8.13 – 8.23 (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.40 (dd, $J = 7.8, 3.7$, 2H), 8.53 (d, $J = 15.5$, 1H), 8.90 – 9.00 (m, 1H), 9.08 (d, $J = 6.7$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 24.3, 28.3, 33.4, 33.8, 47.9, 53.3, 108.3, 112.3, 113.4, 113.7, 118.6, 120.4, 121.0, 124.0, 125.7, 126.4, 128.4, 134.7, 136.5, 137.9, 138.4, 138.7, 144.2, 146.0, 153.8.

MS (FAB) m/z (%): 410.3 (100) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5^+$ [M^+]: 410.2339, gefunden: 410.2340.

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium-iodid**Rot-6**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (50.0 mg, 0.15 mmol) und 2-Phenyl-1H-indol-3-carbaldehyd (**26**, 67.3 mg, 0.30 mmol) in 2 mL Ethanol mit Piperidin (0.07 g, 0.08 mL, 0.33 mmol) versetzt und 17 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und konnte als tieferer Feststoff gewonnen werden (77 %).

250

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.25$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3178 (w), 1560 (s), 1453 (m), 1388 (m), 1223 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.04 – 2.16 (m, 2H), 3.53 (q, $J = 5.2$, 2H), 4.82 (t, $J = 4.7$, 1H), 4.94 (t, $J = 7.2$, 2H), 7.36 (q, $J = 4.3, 3.8$, 2H), 7.61 (dq, $J = 23.5, 5.9, 4.8$, 4H), 7.75 (d, $J = 6.7$, 2H), 7.96 – 8.09 (m, 2H), 8.20 (dd, $J = 16.7, 7.5$, 3H), 8.32 – 8.39 (m, 1H), 8.44 (d, $J = 8.7$, 1H), 8.87 (d, $J = 8.5$, 1H), 9.04 (d, $J = 6.5$, 1H), 12.44 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.9, 53.7, 57.4, 111.2, 112.4, 114.1, 114.4, 118.8, 122.0, 123.7, 125.6, 125.8, 126.5, 128.7, 129.2, 129.4, 129.8, 130.7, 134.7, 137.0, 137.7, 138.2, 145.2, 146.7, 153.8.

MS (FAB) m/z (%): 405.1 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₈H₂₅N₂O [M⁺]: 405.1967, gefunden: 405.1965.

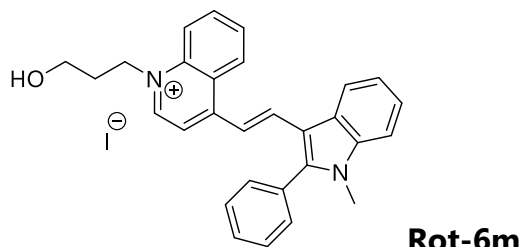
Elementaranalyse

berechnet für C₂₈H₂₅IN₂O:

N: 5.26 % → gefunden: 5.21 %

C: 63.16 % → gefunden: 62.09 %

H: 4.73 % → gefunden: 4.74 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (0.33 g, 1.00 mmol) und **27** (0.47 g, 2.00 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Aus der Mutterlauge konnte eine 2. Fraktion gewonnen werden. Es wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (83 %).

252

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.29$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3355 (w), 1580 (m), 1550 (s), 1386 (m), 1227 (s).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.06 (p, $J = 6.5$, 2H), 3.50 (q, $J = 5.4$, 2H), 3.71 (s, 3H), 4.79 (t, $J = 4.8$, 1H), 4.90 (t, $J = 7.1$, 2H), 7.37 – 7.48 (m, 2H), 7.59 – 7.74 (m, 6H), 7.80 – 7.99 (m, 4H), 8.18 (t, $J = 7.9$, 1H), 8.39 (t, $J = 7.6$, 2H), 8.68 (d, $J = 8.4$, 1H), 8.98 (d, $J = 6.6$, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.5, 31.8, 53.7, 57.4, 111.3, 111.9, 113.6, 113.7, 118.8, 121.0, 122.5, 123.7, 124.7, 125.7, 126.2, 128.6, 129.0, 129.3, 129.8, 131.0, 134.7, 137.7, 137.9, 146.6, 147.2, 153.5, 162.4.

MS (FAB) m/z (%): 419.1 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₉H₂₇N₂O [M⁺]: 419.2123, gefunden: 419.2121.

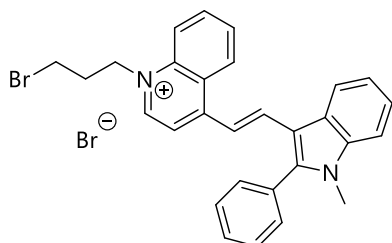
Elementaranalyse

berechnet für C₂₉H₂₇N₂O:

N: 5.13 % → gefunden: 5.01 %

C: 63.74 % → gefunden: 62.89 %

H: 4.98 % → gefunden: 4.95 %

(E)-1-(3-Brompropyl)-4-(2-(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumbromid**Rot-6m-Br**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-6m** (0.27 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 0.1 g Natriumbromid versetzt und in 100 mL Aceton und 75 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 10 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 5 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein schwarzroter Feststoff erhalten (90 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.48$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3340 (w), 1550 (s), 1385 (s), 1222 (m), 1130 (w).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

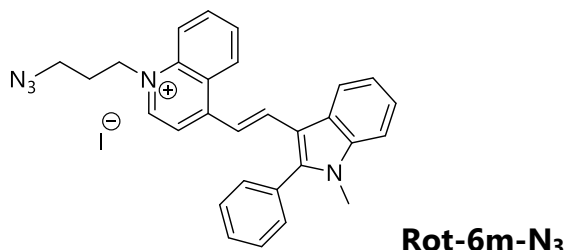
δ (ppm) = 2.41 – 2.49 (m, 2H), 3.66 (t, $J = 6.9$, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.88 – 4.99 (m, 2H), 7.41 – 7.49 (m, 2H), 7.64 – 7.75 (m, 6H), 7.89 – 8.03 (m, 4H), 8.17 – 8.24 (m, 1H), 8.44 (dd, $J = 8.0, 4.6$, 2H), 8.72 (d, $J = 9.0$, 1H), 8.95 – 9.04 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 30.5, 31.5, 31.8, 54.5, 111.3, 111.9, 113.5, 113.8, 118.6, 120.9, 122.4, 123.6, 124.6, 125.7, 126.3, 128.5, 128.9, 129.2, 129.7, 130.9, 134.7, 137.7, 137.8, 137.9, 146.5, 147.3, 153.7.

MS (FAB) m/z (%): 481.0 (20) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{Br}^+$ [M^+]: 481.1274, gefunden: 481.1276.

(E)-1-(3-Azidpropyl)-4-(2-(1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Rot-6m-Br** (0.17 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 200 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein schwarzroter Feststoff erhalten (84 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.45$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3390 (w), 2098 (s), 1580 (m), 1385 (m), 1220 (w).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

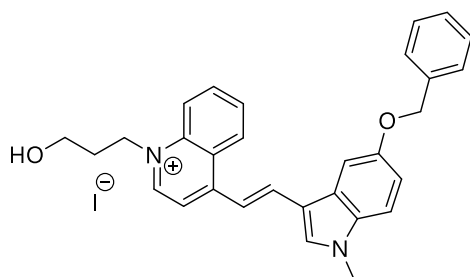
δ (ppm) = 2.16 (p, $J = 6.7$, 2H), 3.54 (t, $J = 6.6$, 2H), 3.72 (s, 3H), 4.90 (t, $J = 7.3$, 2H), 7.43 (p, $J = 7.1$, 2H), 7.62 – 7.74 (m, 6H), 7.84 – 8.01 (m, 4H), 8.19 (t, $J = 7.9$, 1H), 8.41 (t, $J = 9.0$, 2H), 8.69 (d, $J = 8.5$, 1H), 9.01 (d, $J = 6.7$, 1H).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 28.2, 31.5, 47.7, 53.5, 111.3, 112.0, 113.6, 113.8, 118.8, 121.0, 122.5, 123.7, 124.7, 125.7, 126.3, 128.6, 129.0, 129.3, 129.8, 131.0, 134.7, 137.7, 137.9, 137.9, 146.5, 147.3, 153.7.

MS (FAB) m/z (%): 444.1 (100) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_5^+$ [M^+]: 444.2183, gefunden: 444.2181.

(E)-4-(2-(5-(Benzyloxy)-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)-chinolin-1-iumiodid**Rot-7m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **15** (0.17 g, 0.50 mmol) und **29** (0.27 g, 1.00 mmol) in 6.5 mL Ethanol mit Piperidin (0.09 g, 0.11 mL, 1.10 mmol) versetzt und 3 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Aus der Mutterlauge konnte eine 2. Fraktion gewonnen werden. Es wurde ein roter Feststoff erhalten (96 %).

258

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.29$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3334 (m), 3013 (w), 1589 (s), 1523 (m), 1048 (s).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

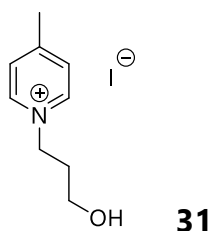
δ (ppm) = 2.08 (s, 2H), 3.54 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 4.84 (s, 1H), 4.90 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 3.5$, 6H), 7.79 (s, 3H), 8.17 (s, 1H), 8.38 (s, 3H), 8.55 (d, $J = 15.6$, 1H), 8.89 (s, 1H), 9.05 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.9, 33.6, 53.4, 57.5, 69.9, 103.9, 111.9, 112.2, 113.0, 113.3, 113.5, 118.7, 125.6, 126.3, 127.1, 127.7, 127.8, 128.2, 128.4, 132.9, 134.5, 135.7, 137.4, 137.8, 138.0, 145.9, 153.5, 154.5.

MS (FAB) m/z (%): 449.0 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₃₀H₂₉N₂O₂ [M⁺]: 449.2224, gefunden: 449.2222.

1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylpyridin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 4-Methylpyridin (**30**, 0.47 g, 0.49 mL, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (0.72 mL, 1.40 g, 7.5 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 16 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 7 mL Diethylether verdünnt und gründlich vermischt. Anschließend wurde die obere Phase entfernt und der Reinigungsschritt zwei Mal wiederholt. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als braunes Öl in quantitativer Ausbeute erhalten.

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.04$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3442 (s), 3047 (m), 2926 (m), 1643 (m), 1068 (w).

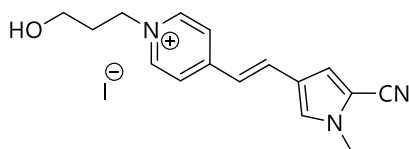
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; DMSO- d_6):

δ (ppm) = 1.97 – 2.12 (m, 2H), 2.60 (s, 3H), , 3.40 – 3.45 (m, 2H), 3.45 – 3.84 (m, 1H), 4.61 (t, $J = 7.0$, 2H), 7.98 (d, $J = 6.1$, 2H), 8.88 – 8.97 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 21.4, 33.1, 57.1, 57.8, 128.1, 128.3, 143.8, 144.0, 158.6.

MS (FAB) m/z (%): 152.6 (100) [M^+].

(E)-4-(2-(5-Cyano-1-methyl-1H-pyrrol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-iumiodid**Blau-1m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **31** (0.21 g, 1.00 mmol) und 4-Formyl-1-methyl-1H-pyrrol-2-carbonitril (0.20 g, 2.00 mmol) in 10 mL Ethanol mit Piperidin (0.14 g, 0.16 mL, 1.65 mmol) versetzt und 19 h bei 65 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Aus der Mutterlauge konnte eine 2. Fraktion gewonnen werden. Es wurde ein beige-brauner Feststoff erhalten (69 %).

260

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.10$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3345 (s), 2211 (s), 1610 (s), 1314 (w), 1146 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.93 - 2.13 (m, 2H), 3.39 - 3.53 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.44 - 4.63 (m, 2H), 4.74 (s, 1H), 7.13 (d, $J = 16.0$, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 15.8$, 1H), 8.08 (d, $J = 5.6$, 2H), 8.84 (d, $J = 5.9$, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 33.1, 35.5, 57.1, 57.3, 105.6, 113.0, 117.9, 120.5, 121.3, 122.8, 131.0, 133.8, 144.2, 153.2.

MS (FAB) m/z (%): 268.1 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₁₆H₁₈N₃O [M⁺]: 268.1450, gefunden: 268.1448.

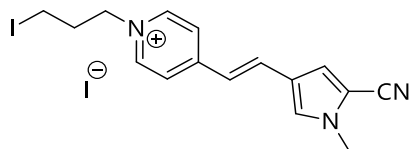
Elementaranalyse

berechnet für C₁₆H₁₈IN₃O:

N: 10.63 % → gefunden: 10.45 %

C: 48.62 % → gefunden: 48.71 %

H: 4.59 % → gefunden: 4.39 %

(E)-4-(2-(5-Cyano-1-methyl-1H-pyrrol-3-yl)vinyl)-1-(3-iodpropyl)pyridin-1-ium-iodid**Blau-1m-I**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Blau-1m** (0.20 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2 g Natriumiodid versetzt und in 75 mL Aceton und 10 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck wurde der erhaltene Rückstand in 20 mL Aceton und 8 mL Methanol aufgenommen und 90 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der enthaltene Niederschlag abgetrennt und das Filtrat bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 5 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 5 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Rohprodukt wurde gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und zwischen 50 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert, die vereinigten organischen Phasen bei 50 °C unter vermindertem Druck eingengt und der erhaltene Rückstand im Ultraschallbad in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein beige-brauner Feststoff erhalten (95 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.18$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3036 (w), 2221 (s), 1597 (s), 1501 (m), 1150 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

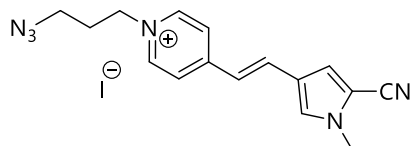
δ (ppm) = 2.45 (t, *J* = 7.0, 2H), 3.24 (t, *J* = 7.0, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.49 (t, *J* = 7.1, 2H), 7.11 (d, *J* = 16.1, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 16.0, 1H), 8.08 (d, *J* = 6.5, 2H), 8.82 (d, *J* = 6.4, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 32.3, 34.0, 58.5, 104.2, 111.5, 116.4, 118.9, 119.7, 121.57, 129.5, 132.5, 142.6, 151.9.

MS (FAB) *m/z* (%): 378.1 (60) [M⁺].

HR-MS (FAB) *m/z*: berechnet für C₁₆H₁₇N₃I⁺ [M⁺]: 378.0462, gefunden: 378.0464.

(E)-1-(3-Azidpropyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1H-pyrrol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Blau-1m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **(Blau-1m-I)** (0.15 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 Diethylether und 50 mL Hexan eingegossen und die überstehende Lösung vom entstandenen Niederschlag abdekantiert. Der Niederschlag wurde im Anschluss zwei Mal mit Diethylether gewaschen, mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 50 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert, die organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 3 mL Methanol und 12 mL Aceton gelöst und mit 120 mL Diethylether und 100 mL Hexan verdünnt. Diese Mischung wurde bei 35 °C unter vermindertem Druck fast vollständig vom Diethylether befreit. Nach Ultraschallbehandlung wurde das Produkt gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein beige-brauner Feststoff erhalten (82 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.12$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3006 (w), 2219 (s), 2074 (s), 1611 (s), 1150 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

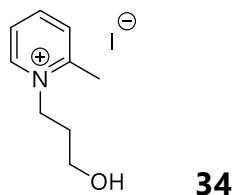
δ (ppm) = 2.17 (p, *J* = 6.9, 2H), 3.47 (t, *J* = 6.4, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.52 (t, *J* = 7.1, 2H), 7.12 (d, *J* = 16.1, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 16.1, 1H), 8.10 (d, *J* = 6.6, 2H), 8.86 (d, *J* = 6.6, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 29.5, 35.5, 47.6, 57.2, 105.7, 113.0, 117.9, 120.5, 121.2, 122.9, 131.0, 134.0, 144.1, 153.3.

MS (FAB) *m/z* (%): 293.2 (95) [M⁺].

HR-MS (FAB) *m/z*: berechnet für C₁₆H₁₇N₆⁺ [M⁺]: 293.1509, gefunden: 293.1508.

1-(3-Hydroxypropyl)-2-methylpyridin-1-iumiodid

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus 2-Methylpyridin (**33**, 0.47 g, 0.49 mL, 5.0 mmol) und 3-Iod-1-propanol (0.72 mL, 1.40 g, 7.5 mmol) in 3 mL 1,4-Dioxan 16 h bei 101 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 7 mL Diethylether verdünnt und gründlich vermischt. Anschließend wurde die obere Phase entfernt und der Reinigungsschritt zwei Mal wiederholt. Das Produkt wurde nach Trocknung unter vermindertem Druck als braunes Öl in quantitativer Ausbeute erhalten.

266

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.04$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 3441$ (s), 3041 (m), 2929 (m), 2882 (w), 1633 (m), 1054 (m).

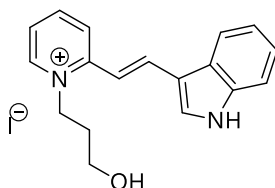
¹H-NMR (300 MHz; DMSO- d_6):

δ (ppm) = 2.02 (p, $J = 6.5$, 2H), 2.84 (s, 3H), 3.34 – 3.40 (m, 1H), 3.49 (t, $J = 5.8$, 2H), 4.62 (t, $J = 7.3$, 2H), 7.96 (t, $J = 6.8$, 1H), 8.04 (d, $J = 8.1$, 1H), 8.47 (td, $J = 7.8, 1.7$, 1H), 8.96 (d, $J = 6.1$, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 19.6, 32.1, 55.0, 57.2, 125.5, 129.8, 145.0, 145.5, 155.2.

MS (FAB) m/z (%): 152.6 (100) [M^+].

(E)-2-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-1**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **34** (0.28 g, 1.00 mmol) und Indol-3-carbaldehyd (**16**, 0.44 g, 3.00 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.20 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Produkt konnte als gelber Feststoff gewonnen werden (67 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.18$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3375 (w), 3174 (m), 3029 (w), 1609 (s), 1562 (m), 1425 (m), 1323 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.07 (q, $J = 6.6$, 2H), 3.54 (q, $J = 5.4$, 2H), 4.78 (t, $J = 7.2$, 2H), 4.98 (t, $J = 4.7$, 1H), 7.09 – 7.41 (m, 3H), 7.52 (d, $J = 7.8$, 1H), 7.72 (t, $J = 6.7$, 1H), 8.15 (d, $J = 7.4$, 2H), 8.23 – 8.44 (m, 2H), 8.54 (d, $J = 8.7$, 1H), 8.77 (d, $J = 6.5$, 1H), 12.03 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 32.2, 54.7, 57.1, 109.6, 112.6, 113.5, 120.2, 121.4, 122.9, 123.0, 123.7, 124.9, 132.6, 137.4, 138.5, 143.1, 144.7, 153.1.

MS (FAB) m/z (%): 279.2 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₁₈H₁₉N₂O [M⁺]: 279.1496, gefunden: 279.1499.

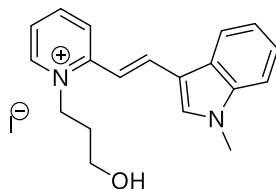
Elementaranalyse

berechnet für C₁₈H₁₉N₂O:

N: 6.90 % → gefunden: 6.77 %

C: 53.22 % → gefunden: 52.56 %

H: 4.71 % → gefunden: 4.72 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium-iodid**Grün-1m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **34** (0.28 g, 1.00 mmol) und **17** (0.34 g, 2.11 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 20 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (66 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.11$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3356 (m), 1604 (s), 1561 (m), 1501 (m), 1380 (m), 1053 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.06 (t, $J = 7.0$, 2H), 3.54 (q, $J = 5.3$, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.77 (t, $J = 7.6$, 2H), 4.97 (t, $J = 4.6$, 1H), 7.22 – 7.40 (m, 3H), 7.60 (d, $J = 8.0$, 1H), 7.72 (t, $J = 6.7$, 1H), 8.05 – 8.22 (m, 2H), 8.27 (d, $J = 15.5$, 1H), 8.36 (t, $J = 7.9$, 1H), 8.55 (d, $J = 8.5$, 1H), 8.76 (d, $J = 6.2$, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 32.1, 33.2, 54.7, 57.1, 109.5, 111.0, 112.5, 120.3, 121.6, 122.8, 123.0, 123.8, 125.3, 137.9, 143.0, 144.7, 153.0.

MS (FAB) m/z (%): 293.3 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₁₉H₂₁N₂O [M⁺]: 293.1654, gefunden: 293.1655.

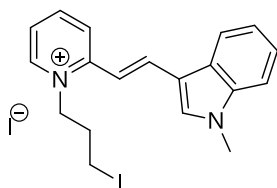
Elementaranalyse

berechnet für C₁₉H₂₁N₂O:

N: 6.67 % → gefunden: 6.68 %

C: 54.30 % → gefunden: 54.08 %

H: 5.04 % → gefunden: 4.97 %

(E)-1-(3-Iodpropyl)-2-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-1m-I**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Grün-1m** (0.21 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2 g Natriumiodid versetzt und in 75 mL Aceton und 10 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck wurde der erhaltene Rückstand in 10 mL Aceton und 6 mL Methanol aufgenommen und 71 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der enthaltene Niederschlag abgetrennt und das Filtrat bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 5 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 10 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (69 %).

271

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.13$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3025 (w), 1598 (m), 1556 (w), 1501 (m), 1316 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

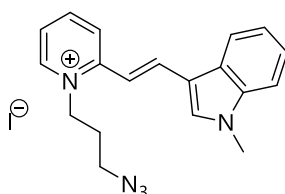
δ (ppm) = 2.36 – 2.47 (m, 2H), 3.36 – 3.52 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.80 (dt, $J = 26.3, 7.7$, 2H), 7.19 – 7.38 (m, 3H), 7.60 (d, $J = 8.1$, 1H), 7.73 (t, $J = 6.9$, 1H), 8.16 (dd, $J = 14.7, 6.9$, 2H), 8.26 – 8.41 (m, 2H), 8.57 (d, $J = 8.7$, 1H), 8.71 – 8.84 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 28.6, 31.2, 53.8, 55.6, 107.4, 109.0, 110.4, 118.2, 119.5, 121.0, 122.0, 123.5, 133.5, 133.7, 135.8, 135.9, 141.3, 142.6, 151.1.

MS (FAB) m/z (%): 403 (100) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{IN}_2^+$ [M^+]: 403.0666, gefunden: 403.0664.

(E)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-1m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Grün-1m-I** (0.16 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 15 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (79 %).

273

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.11$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3028 (w), 2098 (s), 1598 (m), 1556 (w), 1503 (m), 1380 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

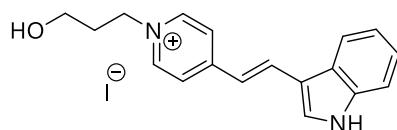
δ (ppm) = 2.13 (p, $J = 6.6$, 2H), 3.60 (t, $J = 6.2$, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.78 (t, $J = 7.4$, 2H), 7.21 – 7.38 (m, 3H), 7.60 (d, $J = 8.1$, 1H), 7.73 (t, $J = 6.9$, 1H), 8.16 (t, $J = 4.1$, 2H), 8.29 (d, $J = 15.6$, 1H), 8.37 (t, $J = 8.0$, 1H), 8.57 (d, $J = 8.6$, 1H), 8.78 (d, $J = 6.5$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 28.5, 33.3, 47.7, 54.7, 109.5, 111.1, 112.5, 120.1, 121.6, 123.0, 123.1, 123.9, 125.4, 135.9, 137.9, 138.0, 143.2, 144.7, 153.1.

MS (FAB) m/z (%): 318 (100) [M^+], 136 (35).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_5^+$ [M^+]: 318.1713, gefunden: 318.1715.

(E)-4-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-2**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **31** (0.28 g, 1.00 mmol) und Indol-3-carbaldehyd (**16**, 0.44 g, 3.00 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.20 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Produkt konnte als gelber Feststoff gewonnen werden (61 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.22$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3372 (w), 3175 (m), 1604 (s), 1504 (m), 1364 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.05 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.76 (s, 1H), 7.19 – 7.38 (m, 3H), 7.46 – 7.58 (m, 1H), 7.99 (s, 1H), 8.10 – 8.34 (m, 4H), 8.75 (d, $J = 6.1$, 2H), 11.95 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 33.1, 56.8, 57.1, 112.6, 113.6, 116.8, 120.4, 121.1, 121.7, 122.9, 124.9, 132.4, 136.4, 137.5, 143.5, 154.5.

MS (FAB) m/z (%): 279.3 (20) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für C₁₈H₁₉N₂O [M⁺]: 279.1496, gefunden: 279.1497.

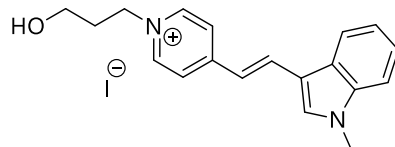
Elementaranalyse

berechnet für $C_{18}H_{19}IN_2O$:

N: 6.90 % → gefunden: 6.86 %

C: 53.22 % → gefunden: 52.95 %

H: 4.71 % → gefunden: 4.69 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-2m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **31** (0.28 g, 1.00 mmol) und **17** (0.34 g, 2.11 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 20 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (69 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): R_f = 0.18.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3333 (m), 1594 (s), 1504 (m), 1307 (w), 1173 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.05 (p, J = 6.6, 2H), 3.46 (q, J = 5.5, 2H), 3.88 (s, 3H), 4.49 (t, J = 7.0, 2H), 4.76 (t, J = 4.8, 1H), 7.25 – 7.36 (m, 3H), 7.57 (d, J = 8.0, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.12 – 8.27 (m, 4H), 8.75 (d, J = 6.5, 2H).

¹³C-NMR 100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 33.1, 56.8, 57.1, 111.0, 112.6, 116.8, 120.6, 121.4, 121.8, 123.0, 125.3, 135.7, 135.8, 138.0, 143.5, 154.3.

MS (FAB) m/z (%): 293.2 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₁₉H₂₁N₂O [M⁺]: 293.1648, gefunden: 293.1648.

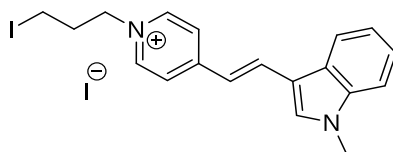
Elementaranalyse

berechnet für C₁₉H₂₁N₂O:

N: 6.67 % → gefunden: 6.58 %

C: 54.30 % → gefunden: 53.99 %

H: 5.04 % → gefunden: 5.05 %

(E)-1-(3-Iodpropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-2m-I**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Grün-2m** (0.21 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2.5 g Natriumiodid versetzt und in 75 mL Aceton und 10 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck wurde der erhaltene Rückstand in 20 mL Aceton und 8 mL Methanol aufgenommen und 90 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der enthaltene Niederschlag abgetrennt und das Filtrat bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 5 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 10 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Rohprodukt wurde gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und zwischen 50 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert, die vereinigten organischen Phasen bei 50 °C unter vermindertem Druck eingengt und der erhaltene Rückstand im Ultraschallbad in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (95 %).

279

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.33$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1586 (m), 1567 (w), 1370 (w), 1169 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

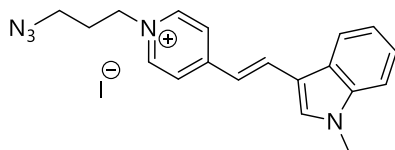
δ (ppm) = 2.42 – 2.48 (m, 2H), 3.25 (t, $J = 7.0$, 2H), 3.89 (s, 3H), 4.45 (t, $J = 7.1$, 2H), 7.25 – 7.36 (m, 3H), 7.58 (d, $J = 8.0$, 1H), 7.96 (s, 1H), 8.13 – 8.28 (m, 4H), 8.74 (d, $J = 6.7$, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.5, 32.2, 57.9, 109.4, 111.0, 115.1, 118.9, 119.8, 120.3, 121.4, 123.7, 134.2, 134.4, 136.4, 141.8, 153.0.

MS (FAB) m/z (%): 403.2 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₁₉H₂₀N₂I⁺ [M⁺]: 403.0666, gefunden: 403.0667.

(E)-1-(3-Azidpropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-2m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Grün-2m-I** (0.16 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 100 Diethylether und 100 mL Hexan eingegossen und die überstehende Lösung vom entstandenen Niederschlag abdekantiert. Der Niederschlag wurde im Anschluss zwei Mal mit Diethylether gewaschen, mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 50 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert, die organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 3 mL Methanol und 12 mL Aceton gelöst und mit 120 mL Diethylether und 100 mL Hexan verdünnt. Diese Mischung wurde bei 35 °C unter vermindertem Druck fast vollständig vom Diethylether befreit. Nach Ultraschallbehandlung wurde das Produkt gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (84 %).

281

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.27$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2924 (w), 2085 (s), 1593 (s), 1376 (w), 1170 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

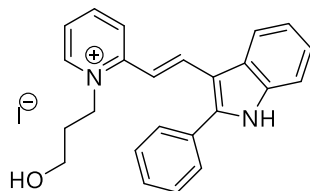
δ (ppm) = 2.18 (p, $J = 6.7$, 2H), 3.48 (t, $J = 6.5$, 2H), 3.89 (s, 3H), 4.48 (t, $J = 7.1$, 2H), 7.25 – 7.36 (m, 3H), 7.58 (d, $J = 8.1$, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.13 – 8.27 (m, 4H), 8.76 (d, $J = 6.7$, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 29.5, 33.1, 47.6, 56.7, 111.0, 112.6, 116.8, 120.5, 121.4, 121.9, 123.0, 125.3, 135.8, 136.0, 138.0, 143.4, 154.6.

MS (FAB) m/z (%): 318.2 (100) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_5^+$ [M^+]: 318.1713, gefunden: 318.1715.

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-3**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **34** (42.7 mg, 0.15 mmol) und 2-Phenyl-1H-indol-3-carbaldehyd (**26**, 67.3 mg, 0.30 mmol) in 2 mL Ethanol mit Piperidin (0.07 g, 0.08 mL, 0.33 mmol) versetzt und 3 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und konnte als orangefarbener Feststoff gewonnen werden (77 %).

283

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.18$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3409 (m), 3139 (m), 1601 (s), 1564 (m), 1450 (m), 1432 (m), 1048 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.01 – 2.15 (m, 2H), 3.54 (s, 2H), 4.79 (t, $J = 7.7$, 2H), 4.93 – 5.07 (m, 1H), 7.25 – 7.37 (m, 2H), 7.43 (d, $J = 15.4$, 1H), 7.52 – 7.68 (m, 4H), 7.74 (d, $J = 8.4$, 3H), 7.94 (d, $J = 15.4$, 1H), 8.23 (d, $J = 7.6$, 1H), 8.34 (d, $J = 4.9$, 2H), 8.82 (d, $J = 6.3$, 1H), 12.35 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 32.1, 54.8, 57.1, 109.9, 111.4, 112.3, 120.7, 121.8, 123.5, 124.3, 125.4, 129.2, 129.3, 129.6, 130.7, 132.9, 136.9, 137.7, 143.6, 144.3, 144.8, 153.1.

MS (FAB) m/z (%): 355.2 (100) [M⁺], 307.2 (20).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₄H₂₃N₂O [M⁺]: 355.1810, gefunden: 355.1808.

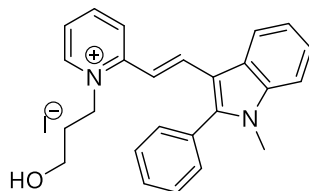
Elementaranalyse

berechnet für C₁₉H₂₁IN₂O:

N: 6.67 % → gefunden: 5.52 %

C: 54.30 % → gefunden: 57.64 %

H: 5.04 % → gefunden: 4.86 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-3m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **34** (0.28 g, 1.00 mmol) und **27** (0.47 g, 2.00 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.20 mmol) versetzt und 22 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (72 %).

285

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.15$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3345 (w), 1585 (s), 1591 (m), 1567 (m), 1462 (s), 1377 (w), 1162 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 1.98 (p, $J = 6.5, 5.9, 2H$), 3.49 (q, $J = 5.2, 2H$), 3.68 (s, 3H), 4.68 (t, $J = 7.3, 2H$), 4.96 (d, $J = 4.9, 1H$), 7.21 – 7.44 (m, 3H), 7.55 – 7.77 (m, 8H), 8.16 (d, $J = 8.5, 1H$), 8.21 – 8.40 (m, 2H), 8.77 (d, $J = 6.3, 1H$).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.4, 32.0, 54.8, 57.0, 110.6, 110.7, 111.2, 120.4, 122.2, 123.2, 123.5, 123.9, 124.6, 129.0, 129.2, 129.6, 130.9, 137.2, 137.7, 143.5, 144.8, 146.3, 152.9.

MS (FAB) m/z (%): 369.2 (80) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₅H₂₅N₂O [M⁺]: 369.1967, gefunden: 369.1965.

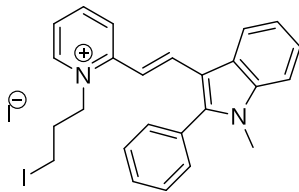
Elementaranalyse

berechnet für C₂₅H₂₅N₂O:

N: 5.64 % → gefunden: 5.62 %

C: 60.49 % → gefunden: 60.39 %

H: 5.08 % → gefunden: 5.04 %

(E)-1-(3-Iodpropyl)-2-(2-(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-3m-I**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Grün-3m** (0.25 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2 g Natriumiodid versetzt und in 75 mL Aceton und 10 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck wurde der erhaltene Rückstand in 10 mL Aceton und 6 mL Methanol aufgenommen und 75 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der enthaltene Niederschlag abgetrennt und das Filtrat bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 5 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 10 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (49 %).

287

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.23$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1595 (m), 1560 (m), 1464 (s), 1162 (m).

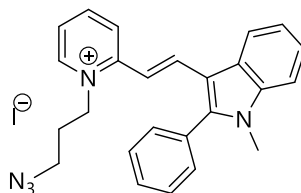
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.30 – 2.39 (m, 2H), 3.21 – 3.29 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 4.68 (t, $J = 7.4$, 2H), 7.09 – 7.29 (m, 2H), 7.38 (p, $J = 7.7$, 3H), 7.65 (t, $J = 8.3$, 6H), 8.16 – 8.34 (m, 3H), 8.75 (d, $J = 6.4$, 1H).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 29.4, 30.3, 55.8, 108.6, 109.2, 118.5, 120.2, 121.4, 121.5, 122.3, 122.5, 126.9, 127.2, 127.6, 128.9, 131.7, 135.5, 135.7, 141.8, 142.8, 144.2, 151.1.

MS (FAB) m/z (%): 479.1 (100) [M^+], 403.0 (35).

(E)-1-(3-Azidpropyl)-2-(2-(1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-3m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Grün-3m-I** (0.18 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 20 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (90 %).

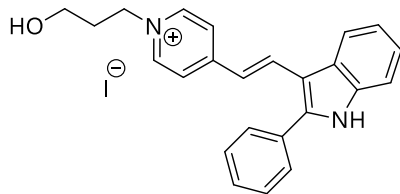
DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.21$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2925 (w), 2093 (s), 1594 (m), 1560 (m), 1462 (m), 1263 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.08 (q, $J = 7.2$, 2H), 3.55 (t, $J = 6.0$, 2H), 3.70 (s, 3H), 4.71 (t, $J = 7.4$, 2H), 7.20 (d, $J = 15.7$, 1H), 7.34 – 7.46 (m, 2H), 7.59 – 7.77 (m, 8H), 8.19 (d, $J = 8.5$, 1H), 8.23 – 8.41 (m, 2H), 8.79 (d, $J = 6.2$, 1H).

MS (FAB) m/z (%): 394.3 (100) [M⁺].

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(2-phenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-4**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **31** (42.7 mg, 0.15 mmol) und 2-Phenyl-1H-indol-3-carbaldehyd (**26**, 67.3 mg, 0.30 mmol) in 2 mL Ethanol mit Piperidin (0.07 g, 0.08 mL, 0.33 mmol) versetzt und 18 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und konnte als orangefarbener Feststoff gewonnen werden (86 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.23$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3379 (w), 3162 (m), 1597 (s), 1452 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.03 (p, $J = 6.5$, 2H), 3.45 (q, $J = 5.5$, 2H), 4.49 (t, $J = 7.0$, 2H), 4.76 (t, $J = 4.7$, 1H), 7.30 (p, $J = 7.7$, 6.0, 2H), 7.43 – 7.55 (m, 2H), 7.57 – 7.67 (m, 3H), 7.68 – 7.78 (m, 2H), 7.97 (d, $J = 16.1$, 1H), 8.09 (d, $J = 6.5$, 2H), 8.24 (d, $J = 7.4$, 1H), 8.72 (d, $J = 6.4$, 2H), 12.27 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 33.1, 56.8, 57.1, 110.0, 112.3, 118.5, 120.9, 121.5, 122.1, 123.4, 125.6, 129.1, 129.2, 129.6, 130.8, 135.4, 136.9, 143.6, 143.9, 154.2.

MS (FAB) m/z (%): 355.2 (75) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₄H₂₃N₂O [M⁺]: 355.1810, gefunden: 355.1809.

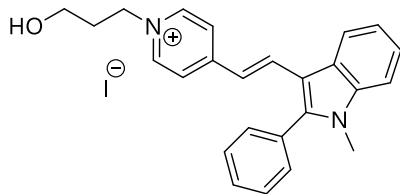
Elementaranalyse

berechnet für C₂₄H₂₃IN₂O:

N: 5.81 % → gefunden: 5.63 %

C: 59.76 % → gefunden: 59.17 %

H: 4.81 % → gefunden: 4.79 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-iumiodid**Grün-4m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **31** (0.14 g, 0.50 mmol) und **27** (0.24 g, 1.00 mmol) in 6 mL Ethanol mit Piperidin (0.11 g, 0.094 mL, 1.10 mmol) versetzt und 17 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und konnte als orangefarbener Feststoff gewonnen werden (70 %).

292

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.20$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3301 (m), 1588 (s), 1467 (m), 1174 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.01 (p, $J = 6.5$, 2H), 3.41 – 3.47 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 4.47 (t, $J = 7.0$, 2H), 4.74 (t, $J = 4.8$, 1H), 7.32 – 7.44 (m, 3H), 7.57 – 7.70 (m, 7H), 7.94 (d, $J = 6.4$, 2H), 8.29 (d, $J = 7.5$, 1H), 8.67 (d, $J = 6.6$, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.4, 33.1, 56.8, 57.1, 110.9, 111.2, 117.8, 120.8, 121.8, 122.0, 123.4, 124.5, 128.8, 129.2, 129.5, 131.0, 135.1, 137.8, 143.5, 146.2, 154.0.

MS (FAB) m/z (%): 369.2 (20) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₅H₂₅N₂O [M⁺]: 369.1967, gefunden: 369.1965.

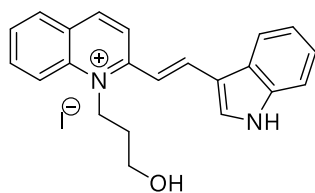
Elementaranalyse

berechnet für C₂₅H₂₅N₂O:

N: 5.64 % → gefunden: 5.53 %

C: 60.49 % → gefunden: 60.49 %

H: 5.08 % → gefunden: 5.15 %

(E)-2-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinoliniumiodid**CyIQ**

22 (9.93 g, 30.2 mmol) wurden in 80 mL Ethanol gelöst und 10 Minuten im Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde Piperidin (6.60 mL, 66.4 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 30 Minuten im Rückfluss erhitzt. Danach wurde eine Lösung aus Indole-3-carbaldehyd (**16**, 13.14 g, 90.5 mol) in Ethanol zugegeben und 16 h in der Siedehitze gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Produkt wurde als dunkelroter Feststoff erhalten (87 %).

294

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.21$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 3347$ (m), 1593 (m), 1569 (m), 1510 (m), 1347 (w), 1316 (w), 1048 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO- d_6):

δ (ppm) = 2.06 - 2.23 (m, 2H), 3.69 - 3.81 (m, 2H), 4.93 - 5.08 (m, 2H), 5.20 - 5.32 (m, 1H), 7.23-7.34 (m, 2H), 7.50-7.63 (m, 2H), 7.83 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.00-8.12 (m, 1H), 8.19 - 8.33 (m, 3H), 8.46 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.60 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 8.69 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 8.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 12.32 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 31.1, 47.6, 57.5, 110.3, 112.8, 114.7, 118.4, 119.8, 120.6, 122.0, 123.5, 124.9, 126.8, 127.9, 130.0, 134.2, 135.2, 137.6, 138.3, 141.8, 143.6, 156.0.

MS (FAB) m/z (%): 329.2 (59) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₂H₂₁N₂O⁺ [M⁺]: 329.1648, gefunden: 329.1656.

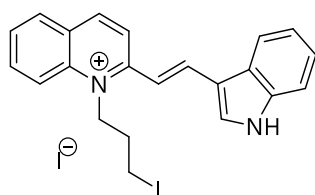
Elementaranalyse

berechnet für C₂₂H₂₁N₂O:

N: 6.14 % → gefunden: 5.94 %

C: 57.91 % → gefunden: 57.92 %

H: 4.64 % → gefunden: 4.48 %

(E)-2-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-1-(3-iodpropyl)chinolin-1-iumiodid**CylQ-I**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **CylQ** (0.23 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2 g Natriumiodid versetzt und in 100 mL Aceton und 20 mL Methanol gelöst. Danach wurde das Lösungsmittel bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 20 mL Methanol eingengt. Die Suspension wurde mit 10 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (70 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.26$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1586 (m), 1563 (s), 1303 (m), 962 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

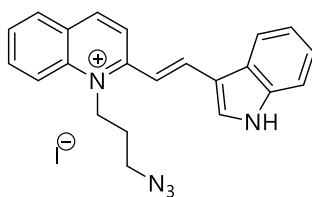
δ (ppm) = 3.52 - 3.76 (m, 2H), 4.88 - 5.14 (m, 2H), 7.23-7.37 (m, 2H), 7.44 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 7.51 - 7.62 (m, 1H), 7.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.18 - 8.31 (m, 2H), 8.35 - 8.48 (m, 2H), 8.63 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.72 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 8.82 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 12.36 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz. DMSO-d₆):

δ (ppm) = 28.3, 31.2, 50.6, 110.3, 112.9, 114.5, 118.2, 120.0, 120.4, 121.9, 123.5, 125.1, 126.9, 127.9, 130.1, 134.3, 134.8, 137.5, 138.4, 142.0, 143.7, 156.2.

MS (FAB) m/z (%): 439.1 (48) [M⁺], 106.9 (35).

HR-MS (FAB) m/z: calculated for C₂₂H₂₀N₂I [M⁺]: 439.0666, found: 439.0672.

(E)-2-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-1-(3-azidpropyl)chinolin-1-iumiodid**CylQ-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **CylQ-I** (0.17 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 3 mL *N,N'*-Dimethylformamid 18 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 15 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orange-roter Feststoff erhalten (65 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.26$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2088 (s), 1597 (s), 1570 (m), 1513 (m), 1352 (w), 1319 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

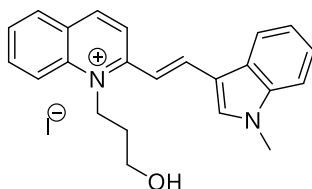
δ (ppm) = 2.07 – 2.32 (m, 2H), 3.68 - 3.94 (m, 2H), 4.86 - 5.17 (m, 2H), 7.22-7.38 (m, 2H), 7.46 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.84 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.09 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.19 - 8.39 (m, 3H), 8.45 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 8.82 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 12.36 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz. DMSO-d₆):

δ (ppm) = 27.3, 47.4, 48.0, 110.2, 113.0, 114.6, 118.3, 119.9, 120.2, 122.0, 123.5, 124.9, 126.8, 127.9, 130.1, 134.3, 135.4, 137.7, 138.2, 142.0, 143.9, 156.0.

MS (FAB) m/z (%): 354.3 (50) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: calculated for C₂₂H₂₀N₅ [M⁺]: 354.1713, found: 354.1718.

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium-iodid**Gelb-1m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **22** (0.33 g, 1.00 mmol) und **17** (0.34 g, 2.11 mmol) in 12 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. (Aus der Mutterlauge konnte zusätzlich eine zweite Produktfraktion gewonnen werden.) Es wurde ein roter Feststoff erhalten (68 %).

300

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.13$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3334 (m), 1593 (m), 1568 (m), 1516 (m), 1353 (w), 1314 (w), 1073 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.08 – 2.25 (m, 2H), 3.70 – 3.82 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 5.01 (t, $J = 7.6$, 2H), 5.27 (t, $J = 4.6$, 1H), 7.29 – 7.43 (m, 2H), 7.52 – 7.68 (m, 2H), 7.84 (t, $J = 7.5$, 1H), 8.08 (t, $J = 7.9$, 1H), 8.20 – 8.34 (m, 3H), 8.46 (d, $J = 9.0$, 1H), 8.59 – 8.73 (m, 2H), 8.81 (d, $J = 9.1$, 1H).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 31.1, 33.5, 47.6, 57.4, 111.3, 113.7, 118.4, 119.8, 120.7, 122.4, 123.5, 125.4, 126.9, 127.9, 130.0, 134.2, 138.2, 138.4, 141.8, 143.0, 155.9.

MS (FAB) m/z (%): 343.2 (50) [M^+], 137.5 (61).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$ [M^+]: 343.1810, gefunden: 343.1808.

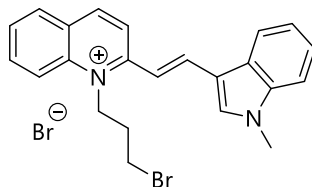
Elementaranalyse

berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$:

N: 5.96 % → gefunden: 5.80 %

C: 58.73 % → gefunden: 58.15 %

H: 4.93 % → gefunden: 4.91 %

(E)-1-(3-Brompropyl)-2-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumbromid**Gelb-1m-Br**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Gelb-1m** (0.24 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 0.1 g Natriumbromid versetzt und in 100 mL Aceton und 75 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 10 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 5 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orange-roter Feststoff erhalten (82 %).

302

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.21$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3339 (w), 3009 (w), 1591 (s), 1516 (s), 1315 (w), 1167 (w).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

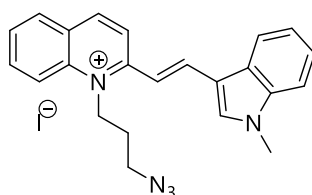
δ (ppm) = 2.51 – 2.58 (m, 2H), 3.29 – 3.63 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 5.07 (t, $J = 8.1$, 2H), 7.25 – 7.49 (m, 3H), 7.63 (d, $J = 7.8$, 1H), 7.84 (t, $J = 7.5$, 1H), 8.06 – 8.14 (m, 1H), 8.24 (t, $J = 6.7$, 2H), 8.36 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 8.9$, 1H), 8.61 – 8.74 (m, 2H), 8.81 (d, $J = 9.1$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 30.5, 31.2, 33.5, 48.5, 110.0, 111.4, 113.5, 118.1, 119.9, 120.4, 122.2, 123.5, 125.4, 126.8, 127.8, 130.1, 134.2, 138.0, 138.1, 138.2, 141.9, 143.1, 156.0.

MS (FAB) m/z (%): 405.3 (30) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z : berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{Br}^+$ [M^+]: 405.0961, gefunden: 405.0959.

(E)-1-(3-Azidpropyl)-2-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid**Gelb-1m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Gelb-1m-Br** (0.09 g, 0.19 mmol), Natriumazid (0.13 g, 2.00 mmol) und Natriumiodid (0.10 g, 0.65 mmol) in 2 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (77 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.21$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2086 (s), 1590 (m), 1514 (m), 1461 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

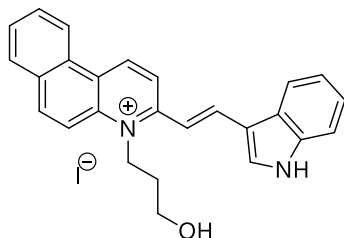
δ (ppm) = 2.18 (p, $J = 12.2, 6.4, 2H$), 3.82 (t, $J = 6.1, 2H$), 3.94 (s, 3H), 4.99 (t, $J = 7.5, 2H$), 7.32 – 7.44 (m, 3H), 7.59 – 7.66 (m, 1H), 7.84 (t, $J = 7.5, 1H$), 8.09 (ddd, $J = 8.8, 7.1, 1.7, 1H$), 8.25 (ddd, $J = 7.5, 5.4, 1.6, 2H$), 8.32 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 9.0, 1H$), 8.60 – 8.71 (m, 2H), 8.80 (d, $J = 9.1, 1H$).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 27.3, 33.5, 47.3, 48.0, 110.1, 111.5, 113.6, 118.2, 119.9, 120.4, 122.3, 123.6, 125.3, 126.8, 127.9, 130.1, 134.3, 138.2, 138.5, 141.9, 143.2, 155.9.

MS (FAB) m/z (%): 368.2 (100) [M⁺].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₃H₂₂N₅⁺ [M⁺]: 368.1870, gefunden: 368.1867.

(E)-3-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-4-(3-hydroxypropyl)benzo[*f*]chinolin-4-ium-iodid**Gelb-2**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **35** (0.38 g, 1.00 mmol) und Indol-3-carbaldehyd (**16**, 0.44 g, 3.0 mmol) in 15 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. (Aus der Mutterlauge konnte zusätzlich eine zweite Rohproduktfraktion gewonnen werden.) Das Rohprodukt wurde anschließend aus Methanol und Diethylether umkristallisiert. Das gereinigte Produkt wurde gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die gewünschte Verbindung konnte als orangefarbener Feststoff gewonnen werden (60 %).

306

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.32$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 3337$ (w), 2929 (w), 2876 (w), 1594 (s), 1571 (s), 1340 (w), 1312 (w), 1049 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-*d*₆):

δ (ppm) = 2.11 – 2.31 (m, 2H), 3.71 – 3.87 (m, 2H), 4.96 – 5.19 (m, 2H), 5.28 (s, 1H), 7.20 – 7.33 (m, 2H), 7.46 – 7.61 (m, 2H), 7.80 – 7.96 (m, 2H), 8.18 – 8.32 (m, 3H), 8.24 – 8.73 m, 4H), 9.02 (d, $J = 7.7$, 1H), 9.63 (d, $J = 8.5$, 1H), 12.20 (s, 1H).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 31.4, 48.5, 57.5, 99.5, 110.3, 112.7, 114.4, 116.3, 120.4, 120.5, 121.8, 123.2, 123.7, 124.3, 124.9, 128.3, 128.9, 129.3, 130.2, 134.3, 136.0, 136.9, 137.5, 138.9, 142.0, 154.5.

MS (FAB) m/z (%): 379.3 (100) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$ [M^+]: 379.1805, gefunden: 379.1806.

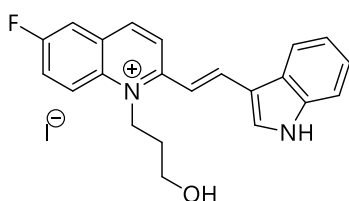
Elementaranalyse

berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$:

N: 5.53 % → gefunden: 5.75 %

C: 61.67 % → gefunden: 62.51 %

H: 4.58 % → gefunden: 4.66 %

(E)-2-(2-(1H-Indol-3-yl)vinyl)-6-fluor-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-iumiodid**Gelb-3**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **37** (0.35 g, 1.00 mmol) und Indol-3-carbaldehyd (**16**, 0.44 g, 3.0 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 17 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend aus Methanol, Aceton und Diethylether umkristallisiert. Das gereinigte Produkt wurde gesammelt, drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die gewünschte Verbindung konnte als dunkel-orangefarbener Feststoff gewonnen werden (57 %).

308

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.34$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1593 (m), 1567 (s), 1511 (m), 1349 (w), 1226 (m), 1130 (m), 1047 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.04 – 2.24 (m, 2H), 3.64 – 3.83 (m, 2H), 4.87 – 5.13 (m, 2H), 5.26 (s, 1H), 7.21 – 7.36 (m, 2H), 7.46 – 7.63 (m, 2H), 7.92 – 8.04 (m, 1H), 8.10 (d, $J = 8.3$, 1H), 8.22 – 8.38 (m, 2H), 8.48 – 8.58 (m, 1H), 8.61 – 8.80 (m, 3H), 12.34 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 31.1, 47.9, 57.4, 110.1, 112.9, 113.7, 114.0, 114.7, 120.6, 121.0, 121.6, 121.5, 122.1, 123.0, 123.5, 124.9, 128.2, 135.4, 137.7, 140.9, 143.9, 155.7.

MS (FAB) m/z (%): 347.1 (18) [M^+], 137.5 (61).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{FN}_2\text{O}$ [M^+]: 347.1560, gefunden: 347.1562.

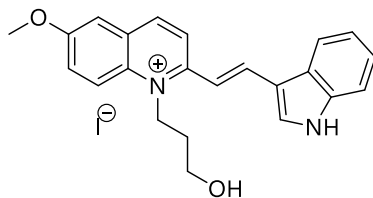
Elementaranalyse

berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{FIN}_2\text{O}$:

N: 5.91 % \rightarrow gefunden: 5.41 %

C: 55.71 % \rightarrow gefunden: 51.76 %

H: 4.25 % \rightarrow gefunden: 4.30 %

(E)-2-(2-(1*H*-Indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)-6-methoxychinolin-1-ium-iodid**Gelb-4**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **39** (0.18 g, 0.50 mmol) und Indol-3-carbaldehyd (**16**, 0.22 g, 1.5 mmol) in 7 mL Ethanol mit Piperidin (0.10 g, 0.11 mL, 1.1 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit 5 mL Diethylether verdünnt, der erhaltene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und konnte als orangefarbener Feststoff gewonnen werden (66 %).

310

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.30$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3375 (s), 1598 (s), 1572 (s), 1512 (m), 1352 (w), 1319 (w), 1020 (w).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 2.05 – 2.24 (m, 2H), 3.62 – 3.80 (m, 2H), 3.97 (s, 3H), 4.88 – 5.13 (m, 2H), 5.15 – 5.34 (m, 1H), 7.21 – 7.37 (m, 2H), 7.48 – 7.66 (m, 2H), 7.64 – 7.78 (m, 2H), 8.25 (d, $J = 8.1$, 2H), 8.42 (d, $J = 9.7$, 1H), 8.57 (d, $J = 11.9$, 2H), 8.72 (d, $J = 9.0$, 1H), 12.21 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆):

δ (ppm) = 31.4, 47.7, 56.1, 57.4, 109.1, 110.5, 112.7, 114.4, 120.2, 120.3, 120.5, 121.8, 123.3, 124.9, 128.7, 133.5, 134.2, 137.6, 140.9, 141.0, 153.7, 158.0.

MS (FAB) m/z (%): 359.1 (97) [M⁺], 136.4 (62).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für C₂₃H₂₃N₂O₂ [M⁺]: 359.1760, gefunden: 359.1757.

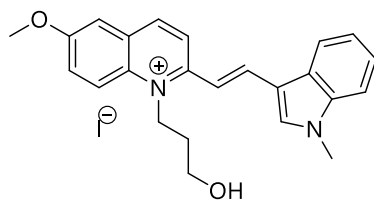
Elementaranalyse

berechnet für C₂₃H₂₃N₂O₂:

N: 5.76 % → gefunden: 5.37 %

C: 56.80 % → gefunden: 55.10 %

H: 4.77 % → gefunden: 4.75 %

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-6-methoxy-2-(2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-chinolin-1-iumiodid**Gelb-4m**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **39** (0.36 g, 1.00 mmol) und **17** (0.34 g, 2.11 mmol) in 13 mL Ethanol mit Piperidin (0.19 g, 0.22 mL, 2.2 mmol) versetzt und 19 h bei 80 °C in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Niederschlag drei Mal mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. (Aus der Mutterlauge konnte zusätzlich eine zweite Produktfraktion gewonnen werden.) Es wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (66 %).

312

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.19$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 3392$ (m), 1595 (m), 1568 (m), 1513 (m), 1350 (w), 1319 (w), 1072 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO- d_6):

δ (ppm) = 2.03 – 2.19 (m, 2H), 3.66 – 3.78 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 4.91 – 5.05 (m, 2H), 5.26 (s, 1H), 7.33 (p, $J = 6.9$, 2H), 7.46 – 7.56 (m, 1H), 7.57 – 7.62 (m, 1H), 7.64 – 7.74 (m, 2H), 8.14 – 8.22 (m, 1H), 8.26 (d, $J = 7.4$, 1H), 8.35 – 8.44 (m, 1H), 8.48 – 8.60 (m, 2H), 8.65 – 8.73 (m, 1H).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 31.3, 33.4, 56.1, 57.4, 109.0, 110.4, 111.2, 113.4, 120.2, 120.3, 120.6, 123.3, 124.9, 125.3, 128.7, 133.4, 134.3, 137.4, 138.1, 140.8, 141.3, 153.6, 158.0.

MS (FAB) m/z (%): 373.3 (87) [M^+], 136.1 (75).

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2$ [M^+]: 373.1911, gefunden: 373.1912.

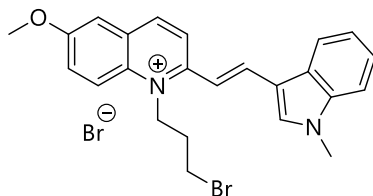
Elementaranalyse

berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2$:

N: 5.60 % → gefunden: 5.48 %

C: 57.61 % → gefunden: 57.13 %

H: 5.04 % → gefunden: 5.00 %

(E)-1-(3-Brompropyl)-6-methoxy-2-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumbromid**Gelb-4m-Br**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **Gelb-4m** (0.25 g, 0.50 mmol), Triphenylphosphin (0.39 g, 1.50 mmol) und Tetrabrommethan (0.55 g, 1.65 mmol) in 5 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 0.1 g Natriumbromid versetzt und in 75 mL Aceton und 10 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 15 mL eingengt. Die Suspension wurde mit 5 mL Methanol verdünnt und das Produkt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (75 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.36$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1592 (m), 1568 (m), 1513 (m), 1350 (w).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

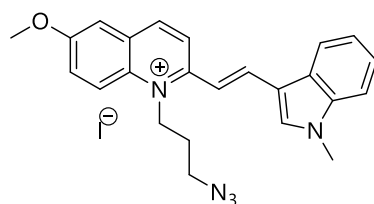
δ (ppm) = 3.87 – 4.02 (m, 8H), 4.98 - 5.15 (m, 2H), 7.28 – 7.45 (m, 3H), 7.62 (d, $J = 8.1$, 1H), 7.68 - 7.79 (m 2H), 8.21 (d, $J = 7.6$, 1H), 8.26 – 8.33 (m, 1H), 8.39 (d, $J = 9.6$, 1H), 8.57 (dd, $J = 20.6, 7.5$, 2H), 8.72 (d, $J = 9.4$, 1H).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 30.8, 31.3, 33.5, 48.8, 56.1, 109.2, 110.4, 111.3, 113.3, 120.0, 120.4, 120.5, 122.0, 123.4, 125.0, 125.5, 128.8, 133.5, 137.2, 138.1, 141.1, 141.5, 153.8, 158.1.

MS (FAB) m/z (%): 435.0 (50) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{Br}^+$ [M^+]: 435.1067, gefunden: 435.1066.

(E)-1-(3-Azidpropyl)-6-methoxy-2-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-iumiodid**Gelb-4m-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **(Gelb-4m-Br)** (0.16 g, 0.30 mmol), Natriumazid (0.20 g, 3.00 mmol) und Natriumiodid (0.15 g, 1.00 mmol) in 6 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 150 Diethylether und 50 mL Hexan eingegossen und die überstehende Lösung vom entstandenen Niederschlag abdekantiert. Der Niederschlag wurde im Anschluss zwei Mal mit Diethylether gewaschen, mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 50 mL Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde vier Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert, die organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Aus der Mutterlauge konnte eine 2. Fraktion gewonnen werden. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (72 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.32$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3056 (w), 2097 (s), 1592 (m), 1567 (m), 1511 (w), 1350 (w).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

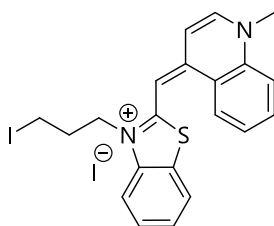
δ (ppm) = 2.12 – 2.24 (m, 2H), 3.78 (t, $J = 6.1$, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 4.92 – 5.07 (m, 2H), 7.31 – 7.46 (m, 3H), 7.64 (d, $J = 8.0$, 1H), 7.68 – 7.77 (m, 2H), 8.20 – 8.30 (m, 2H), 8.40 (d, $J = 9.8$, 1H), 8.51 – 8.62 (m, 2H), 8.72 (d, $J = 9.2$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 27.5, 33.4, 47.5, 48.0, 56.1, 109.2, 110.4, 111.36, 113.3, 120.1, 120.3, 120.4, 122.1, 123.4, 125.0, 125.4, 128.8, 133.4, 137.6, 138.2, 141.1, 141.5, 153.7, 158.1.

MS (FAB) m/z (%): 398.3 (300) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ON}_5^+$ [M^+]: 398.1975, gefunden: 398.1974.

(Z)-3-(3-Iodpropyl)-2-((1-methylchinolin-4(1H)-yliden)methyl)benzo[d]thiazol-3-iumiodid**TO-I**

318

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **TO** (0.19 g, 0.40 mmol), Triphenylphosphin (0.32 g, 1.20 mmol) und Tetrabrommethan (0.44 g, 1.32 mmol) in 4 mL Dichlormethan in einem verschlossenen Bördelglas 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2 g Natriumiodid versetzt und in 75 mL Aceton und 10 mL Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C unter vermindertem Druck wurde der erhaltene Rückstand in 10 mL Aceton und 6 mL Methanol aufgenommen und 75 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der enthaltene Niederschlag abgetrennt und das Filtrat bei 50 °C unter vermindertem Druck bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 5 mL eingeeengt. Die Suspension wurde mit 10 mL Methanol verdünnt und das Rohprodukt mit Hilfe von Ultraschall gewonnen, gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde aus Methanol umkristallisiert, gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten (83 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.17$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2949 (w), 1543 (w), 1479 (s), 1372 (m), 1317 (s).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

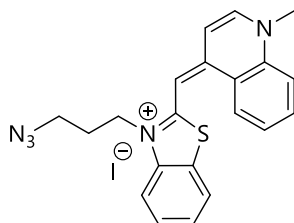
δ (ppm) = 2.22 – 2.29 (m, 2H), 2.81 – 3.05 (m, 2H), 4.19 (d, $J = 6.5$, 3H), 4.66 (t, $J = 19.4$, 12.0, 2H), 6.91 (s, 1H), 7.38 – 7.44 (m, 2H), 7.60 (d, $J = 7.5$, 1H), 7.77 (t, $J = 7.7$, 2H), 8.03 – 8.11 (m, 3H), 8.67 (d, $J = 8.6$, 1H), 8.78 (d, $J = 7.5$, 1H).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 20.7, 42.5, 43.0, 44.7, 87.3, 99.4, 110.2, 115.3, 118.8, 121.8, 123.2, 123.4, 127.1, 129.6, 134.4, 138.9, 141.1, 144.7, 153.3, 155.9.

MS (FAB) m/z (%): 458.9 (100) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Si}^+$ [M^+]: 459.0386, gefunden: 459.0388.

(Z)-3-(3-Azidpropyl)-2-((1-methylchinolin-4(1H)-yliden)methyl)benzo[d]-thiazol-3-iumiodid**TO-N₃**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **TO-I** (0.15 g, 0.25 mmol), Natriumazid (0.16 g, 2.50 mmol) und Natriumiodid (0.12 g, 0.83 mmol) in 2.5 mL *N,N'*-Dimethylformamid 19 h bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Bördelglas gerührt. Anschließend wurde die Mischung in ca. 175 mL Diethylether eingegossen, der entstandene Niederschlag gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde im Anschluss mit 2 g Natriumiodid versetzt und zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Dichlormethan verteilt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 50 mL Dichlormethan nachextrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 35 °C entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde unter Verwendung von Ultraschall in 10 mL Methanol suspendiert. Das Produkt wurde gesammelt und drei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (80 %).

DC (2-Butanol : Wasser : Essigsäure = 80 : 15 : 5): $R_f = 0.18$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2086 (s), 1612 (s), 1482 (m), 1319 (m).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆):

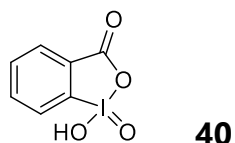
δ (ppm) = 2.05 (p, $J = 6.9$, 2H), 3.55 – 3.64 (m, 2H), 4.17 (s, 3H), 4.63 (t, $J = 7.2$, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.31 – 7.44 (m, 2H), 7.59 (t, $J = 7.8$, 1H), 7.70 – 7.81 (m, 2H), 7.96 – 8.10 (m, 3H), 8.63 (d, $J = 7.2$, 1H), 8.74 (d, $J = 8.6$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 26.1, 42.5, 43.1, 48.0, 87.4, 108.0, 112.6, 118.3, 122.9, 123.8, 124.0, 124.4, 125.3, 127.0, 128.2, 133.2, 138.0, 139.8, 145.0, 148.6, 159.2.

MS (FAB) m/z (%): 374.2 (10) [M^+].

HR-MS (FAB) m/z: berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{S}^+$ [M^+]: 374.1434, gefunden: 374.1432.

2-Iodoxybenzoesäure (IBX)

In einem 250 mL-Rundkolben wurden 2-Iodbenzoesäure (6.25 g, 25.0 mmol) und Oxone® (Kaliummonopersulfat) (45.3 g, 65.0 mmol) in 80 mL Wasser suspendiert und 3.5 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung kristallisierte das Produkt aus, wurde mehrmals mit Wasser und einmal mit Aceton gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. 2-Iodoxybenzoesäure wurde als weiß kristalliner Feststoff gewonnen (88 %).^[273,274]

Analytische Daten^[275]

322

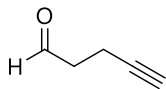
IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1640 (s).

¹H-NMR (DMSO-d₆):

δ (ppm) = 7.84 (t, 1H), 7.98 (t, 1H), 8.01 (d, 1H), 8.15 (d, 1H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆):

δ (ppm) = 125.0, 130.1, 131.4, 133.0, 133.4, 146.6, 167.5.

4-Pentinal**41**

0.43 g (5.0 mmol; 380 μ L) 4-Pentinal wurden in 35 mL Essigester gelöst und mit 1.68 g (15.0 mmol) 2-Iodoxybenzoesäure (IBX, **40**) versehen. Die Mischung wurde 3.5 h in der Siedehitze (80 °C) gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Das IBX wurde abfiltriert und das Filtrat mit ca. 30 mL Aceton verdünnt (Nachwaschen des Rückstandes). Das Filtrat wurde bei 35 °C unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt 4-Pentinal verblieb als hellgelbes Öl (58 %).

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3292 (s), 2925 (w), 2720 (w), 2120 (w), 1711 (s).

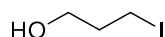
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; DMSO- d_6):

δ (ppm) = 2.42 (s, 1H), 2.64 (t, J = 7.2, 2H), 2.75 (dd, J = 4.7, 2.3, 2H), 9.64 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 13.9, 41.7, 71.3, 83.5, 201.5.

MS (FAB) m/z (%): 83.1 (100) [M^+].

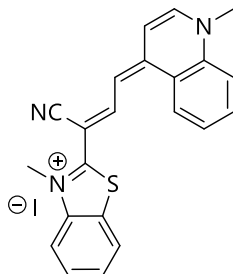
3-Iodpropan-1-ol**42**C₃H₇IO

M = 185.99 g/mol

In einem 100 mL Rundkolben wurden 20.0 g (2.10 eq, 133 mmol) Natriumiodid in 90 mL Aceton gelöst. Anschließend wurden 5.30 mL (6.00 g, 1.00 eq, 63.4 mmol) 3-Chlorpropanol zugegeben und die Reaktionsmischung 40 Stunden bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 40 °C und 200 mbar eingeeengt. Der erhaltende Rückstand wurde zwischen Wasser und die Diethylether verteilt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Diethylether nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Filtrat bei 40 °C und maximal 29 mbar eingeeengt. Das so erhaltende Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt. Als Fließmittel wurde ein Gradient mit Hexan:Essigester-Mischungen von 29:1 – 9:1 verwendet. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und eingeeengt. Es wurden 9.81 g (52.7 mmol; 83 %) als hellgelbe Flüssigkeit erhalten.

324

DC: $R_f = 0.60$ (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1).**IR (DRIFT):** $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2935 (m), 2881 (m), 1469 (m), 602 (m).**¹H-NMR** (300 MHz. DMSO-d₆): δ (ppm) = 1.88 (qi, ³J = 6.8 Hz, 2 H), 3.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 2 H), 3.43 (t, ³J = 5.8 Hz, 2 H), 4.58 (s, 1 H).**¹³C-NMR** (75 MHz. DMSO-d₆): δ (ppm) = 5.4, 36.1, 60.4.**MS (EI):** m/z (%) = 186 (14) [M], 153 (90), 136 (37), 107 (61), 89 (56), 77 (100).

2-((1*E*,3*Z*)-1-Cyano-3-(1-methylchinolin-4(1*H*)-ylidene)prop-1-en-1-yl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-iumiodid**55**

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus **14** (0.15 g, 1.00 eq, 0.44 mmol) in 1.0 mL 1,4-Dioxan suspendiert, mit 0.28 mL (0.62 g, 10.0 eq, 4.40 mmol) Iodmethan versetzt und in einem "headspace-vial" fest verschlossen. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei 90 °C gerührt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit Hexan verdünnt. Der erhaltene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Hexan gewaschen und anschließend über Kieselgel aufgereinigt. Als Eluens wurde erst reines Dichlormethan und anschließend ein Gradient mit Methanol (29:1 – 9:1) verwendet. Es wurden 0.18 g (0.37 mmol) **55** als schwarz-braunes Pulver erhalten (85 %).

325

DC (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1): $R_f = 0.16$.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3010 (w), 2185 (s), 1613 (s), 1552 (s), 1504 (m).

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆):

δ (ppm) = 4.09 (s, 3 H), 4.38 (s, 3 H), 7.11 (d, $J = 13.9$ Hz, 1 H), 7.31-7.39 (m, 1 H), 7.45-7.59 (m, 1 H), 7.60-7.76 (m, 1 H), 8.03-8.32 (m, 4 H), 8.37-8.53 (m, 1 H), 8.94 (d, $J = 5.4$ Hz, 1 H).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6):

δ (ppm) = 36.1, 43.6, 75.3, 109.3, 113.1, 113.4, 117.4, 118.9, 122.4, 124.2, 124.5, 124.7, 127.8, 128.5, 134.3, 138.5, 140.8, 142.6, 145.8, 151.4, 164.8.

MS (FAB) m/z (%): 356 (100) [M^+], 107 (16).

8.4 Charakterisierung der Cyaninfarbstoffe

Im Folgenden sind die gesammelten Daten und Spektren aus der Photostabilitätsuntersuchung, der Fluoreszenztitration, der Fluoreszenz-Quantenausbeute und entsprechende Übersichtstabellen gezeigt. Anschließend sind in einer Tabelle die Extinktionskoeffizienten aller Cyanine zu finden.

Photostabilität und Halbwertszeiten

Die Halbwertszeiten und Photostabilitäten der Farbstoffe wurden auf Basis der Fluoreszenzintensitätsabnahme bei Belichtung bestimmt. Die Probelösungen enthielten 10 μM Farbstoff, 2.5 μM **DNA0** (Abbildung 135), 10 mM NaP_i (pH = 7), 250 mM NaCl und 5 % Ethanol. Die Lösungen wurden mit einer 75 W Xenon-Lampe belichtet. Um eine Anregung der DNA-Bestandteile zu unterbinden, wurde ein 305 nm Vorfilter verwendet, der Licht mit Wellenlängen kleiner 305 nm abfängt. Die Probelösungen wurden variierenden Belichtungszeiten ausgesetzt, anschließend gründlich gemischt und ein Fluoreszenzspektrum aufgezeichnet. Abhängig, von der Fluoreszenzintensität der Farbstoffe, wurde unterschiedliche Spaltweite (Eingangs- und Ausgangsspalt) gewählt und ist im entsprechenden Abbildungstitel angegeben.

5' - TCA-GTG-ATC-TAG-ACT-GC - 3'

3' - AGT-CAC-TAG-ATC-TGA-CG - 5'

Abbildung 135: Sequenz der verwendeten doppelsträngigen **DNA0**.

Im Folgenden sind neben den aufgezeichneten Fluoreszenzspektren der Photostabilitätsmessungen aller Farbstoffe sowie die prozentuale Abnahme der Emissionsintensitäten im Zuge der Belichtung abgebildet. Eine exponentielle Ausgleichsgerade der jeweiligen Intensitätswerte lieferte den Zugang zu den angegebenen Halbwertszeiten $t_{1/2}$.

TR-CN:

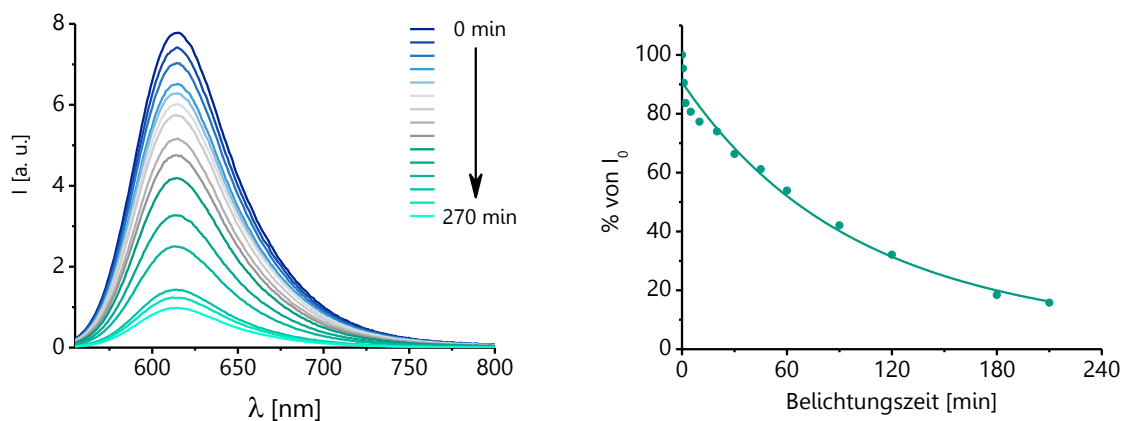


Abbildung 136: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 614 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 66 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **TR-CN**.

Rot-1:

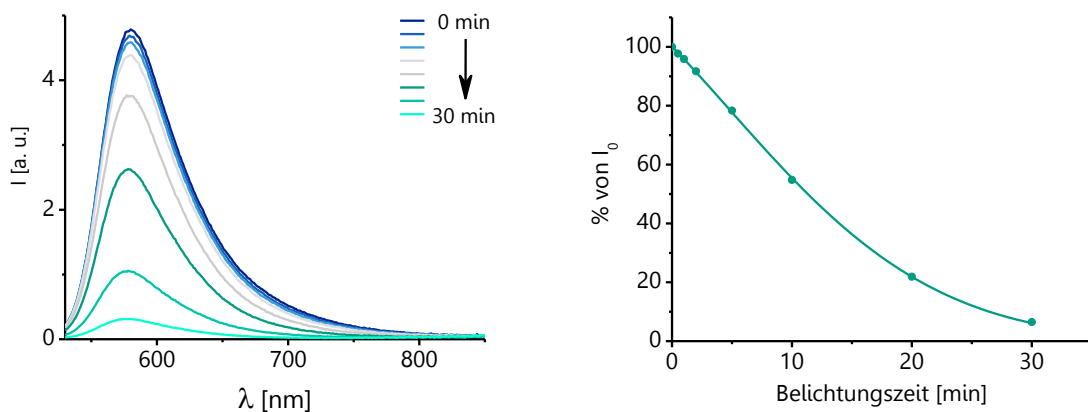


Abbildung 137: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 580 \text{ nm}$, Spalt = 3 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 11 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-1**.

Rot-2e:

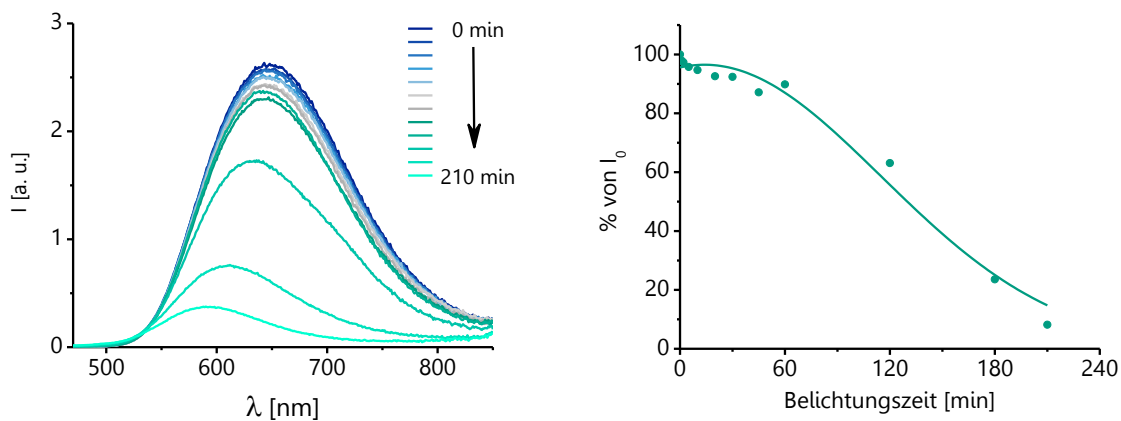


Abbildung 138: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 455 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 648 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 130 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-2e**.

Rot-3e:

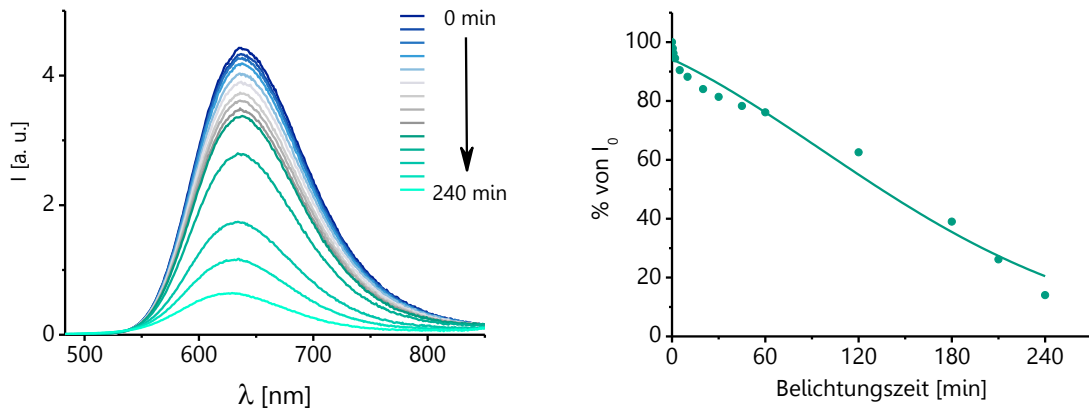


Abbildung 139: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 637 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 134 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-3e**.

Rot-4:

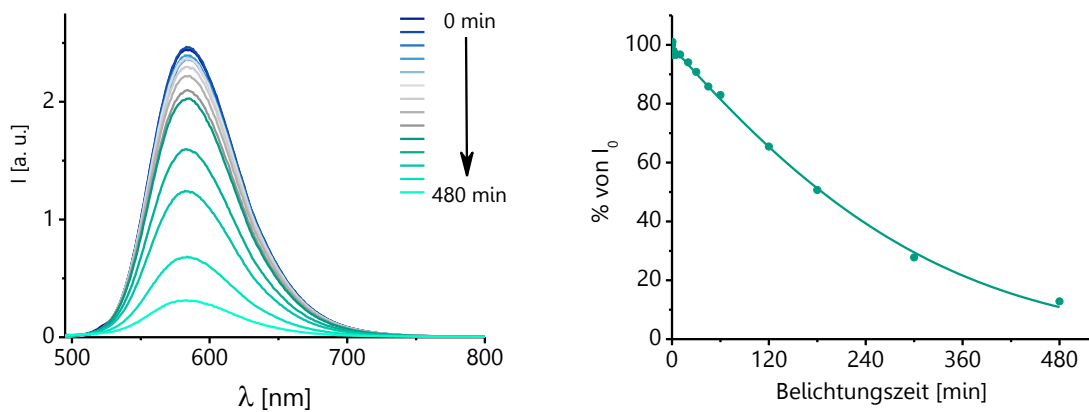


Abbildung 140: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 583 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 186 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-4**.

Rot-4m:

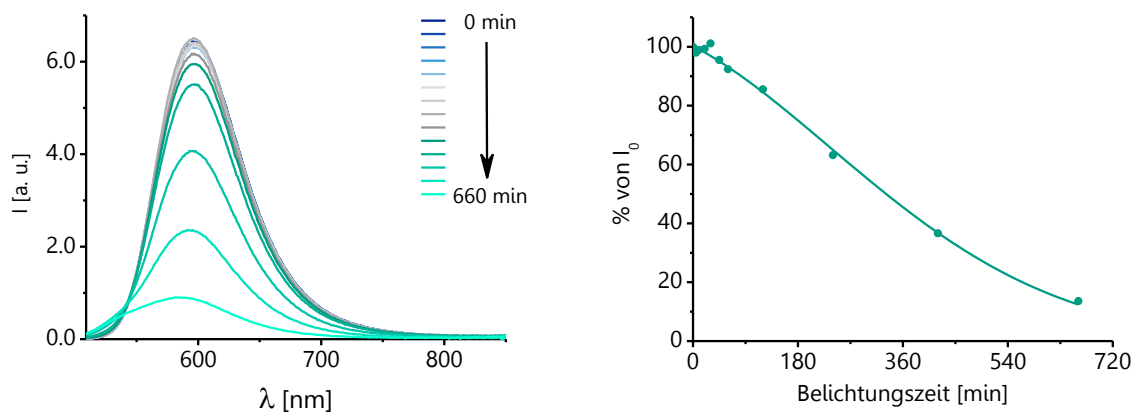


Abbildung 141: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 596 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 331 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-4m**.

Rot-5:

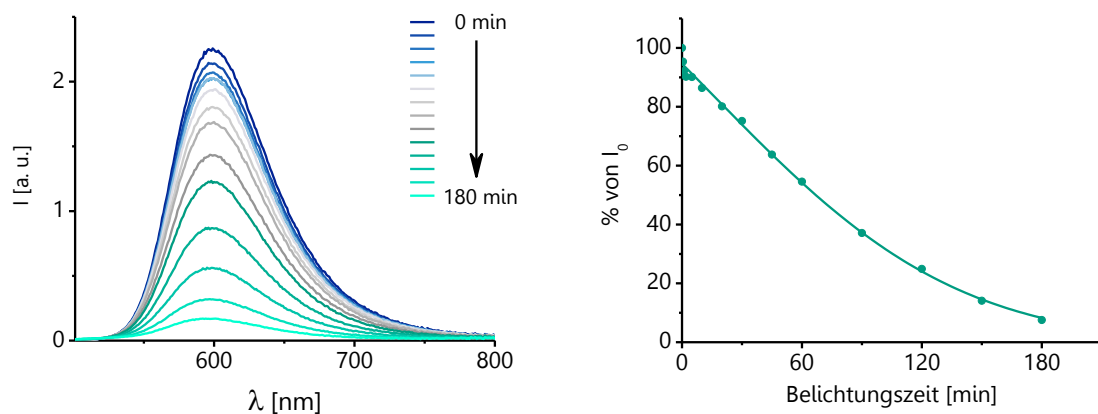


Abbildung 142: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 486 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 600 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 67 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-5**.

Rot-5m:

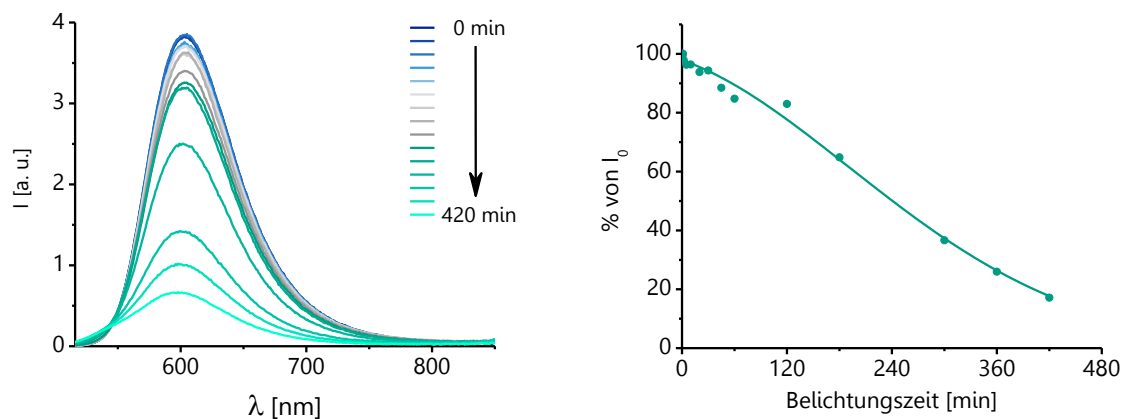


Abbildung 143: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 501 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 603 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 241 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-5m**.

Rot-6:

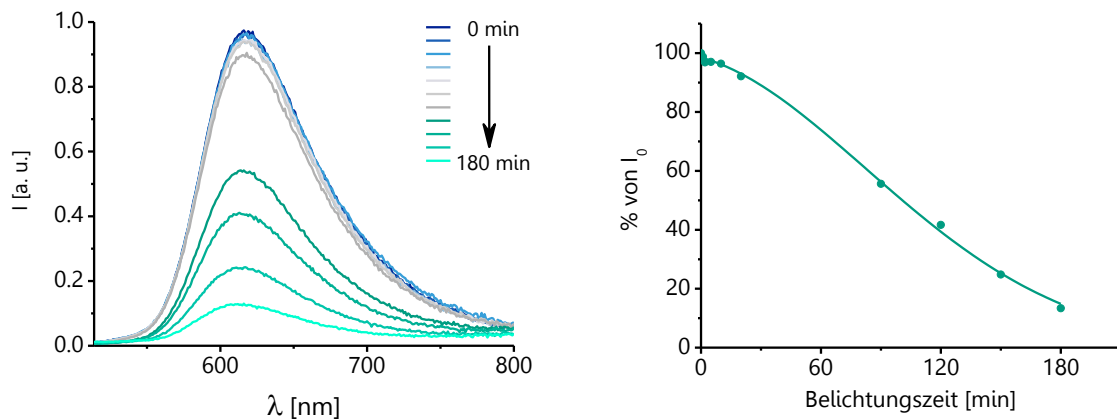


Abbildung 144: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 499 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 616 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 101 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-6**.

Rot-6m:

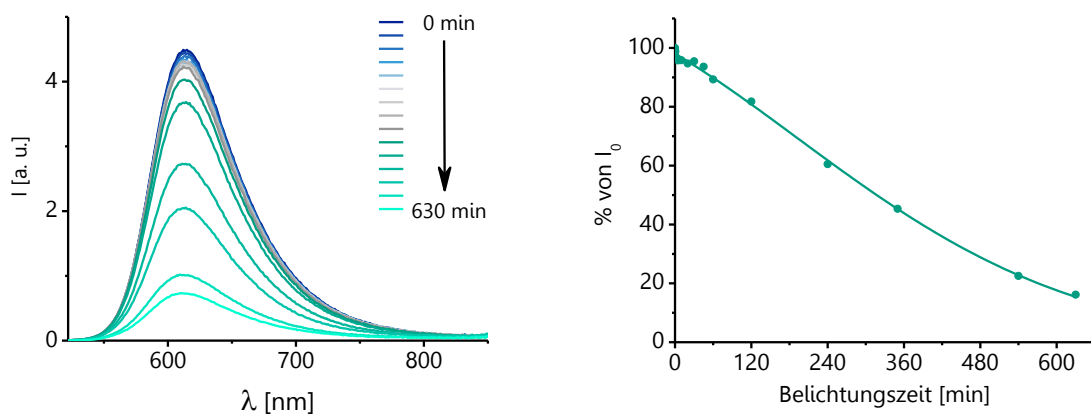


Abbildung 145: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 507 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 615 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 317 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-6m**.

Rot-7m:

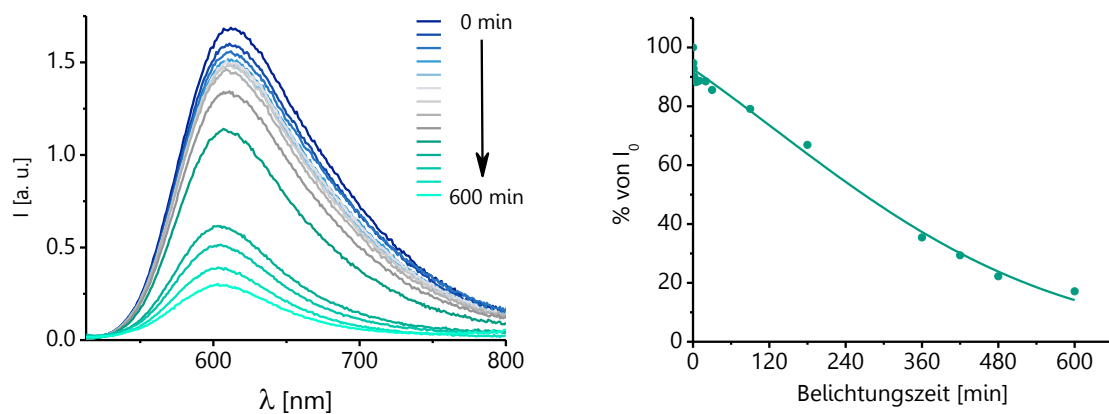


Abbildung 146: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 612 \text{ nm}$, Spalt = 5 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 269 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Rot-7m**.

TR:

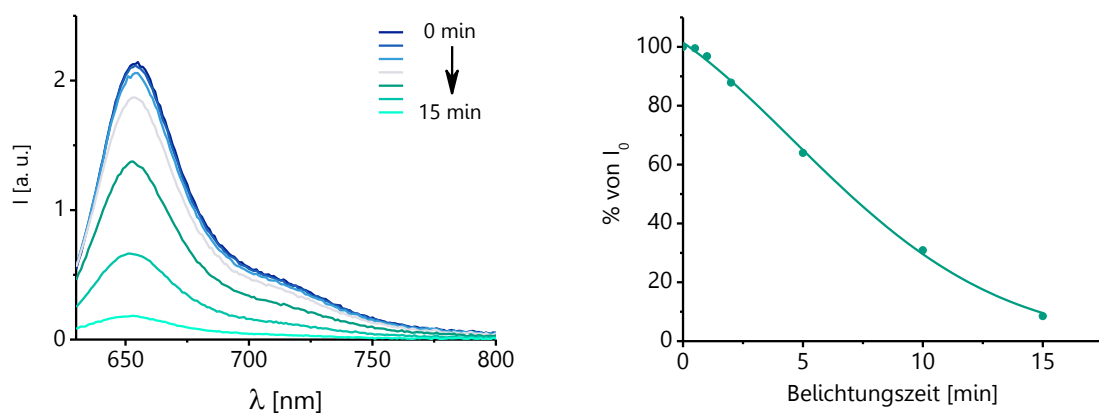


Abbildung 147: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 620 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 654 \text{ nm}$, Spalt = 3 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 7 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von TR.

Blau-1m:

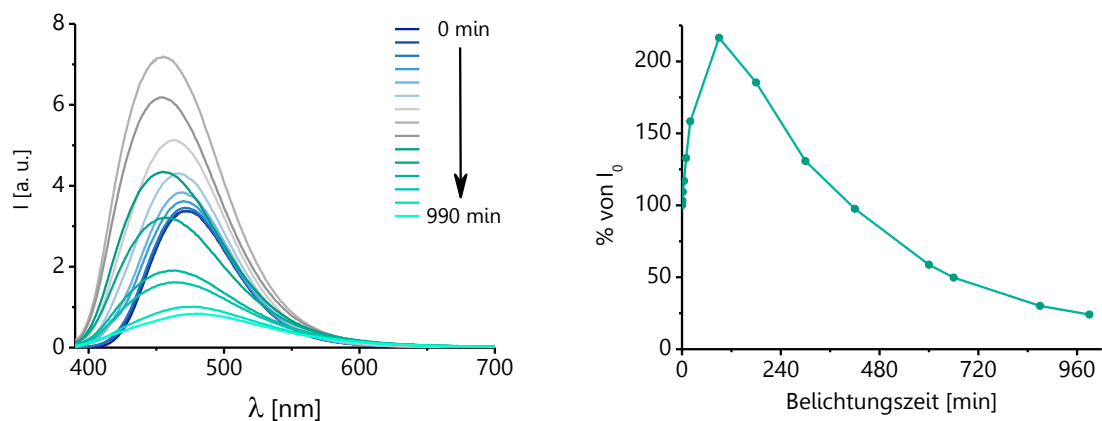


Abbildung 148: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 464 \text{ nm}$, Spalt = 5 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 658 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Blau-1m**.

Grün-1:

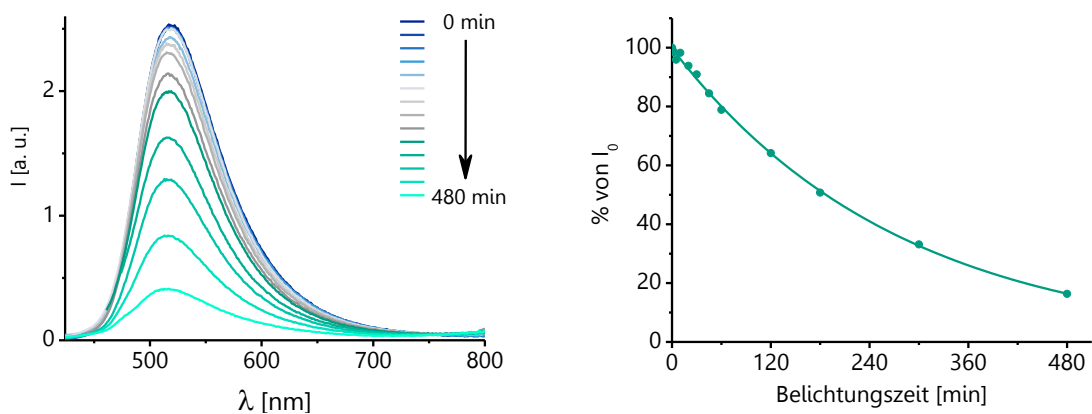


Abbildung 149: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 409 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 517 \text{ nm}$, Spalt = 5 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 187 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-1**.

Grün-1m:

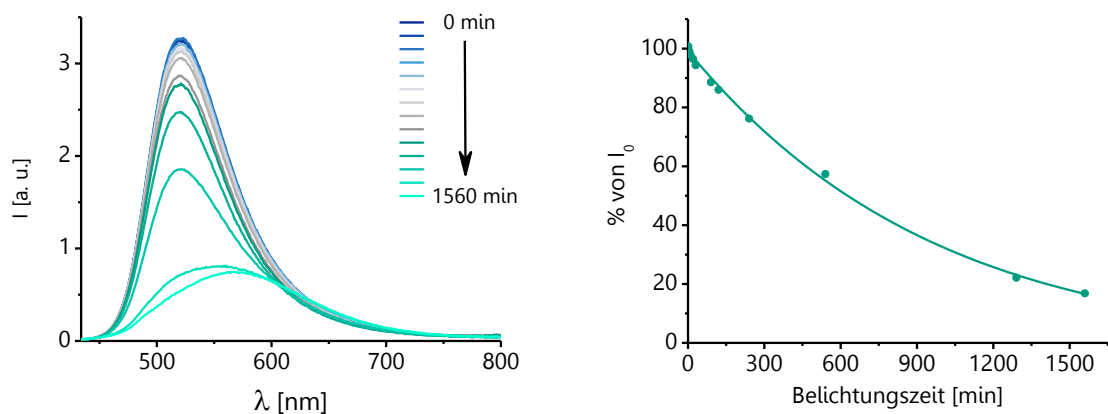


Abbildung 150: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 419 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 521 \text{ nm}$, Spalt = 5 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 636 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-1m**.

Grün-2:

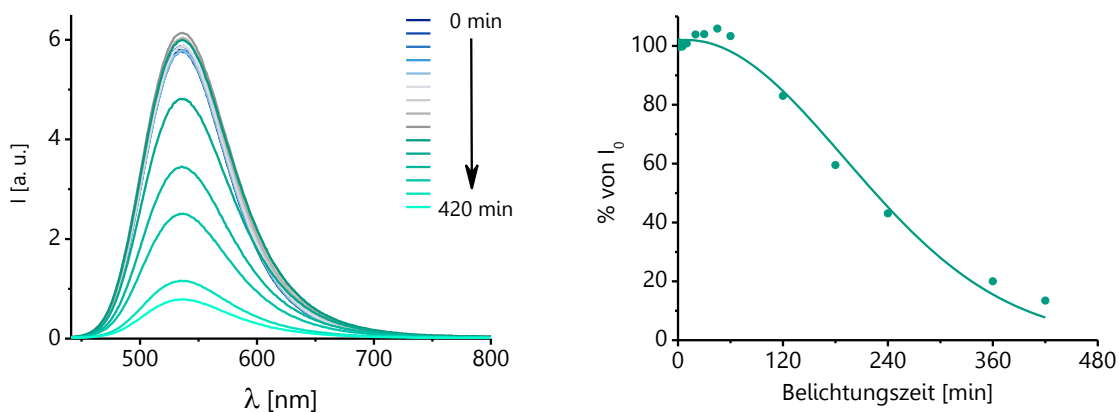


Abbildung 151: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 535 \text{ nm}$, Spalt = 5 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 225 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-2**.

Grün-2m:

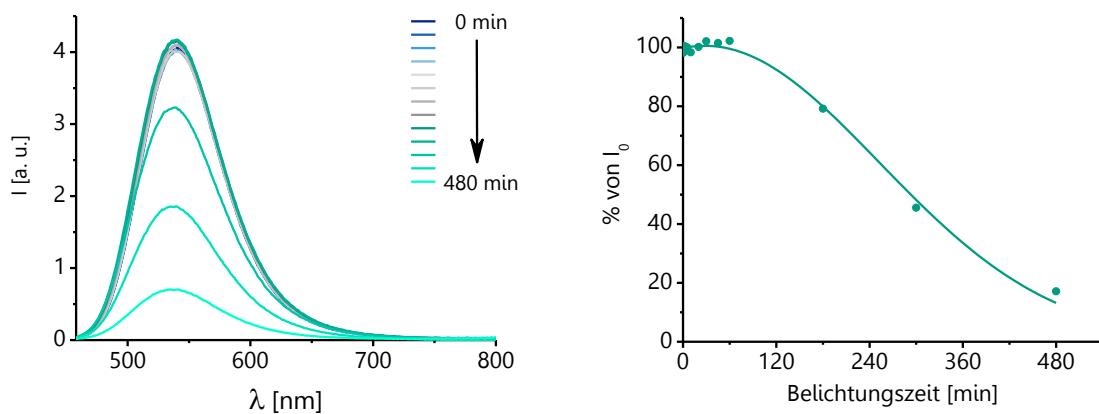


Abbildung 152: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 436 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 539 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 293 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-2m**.

Grün-3:

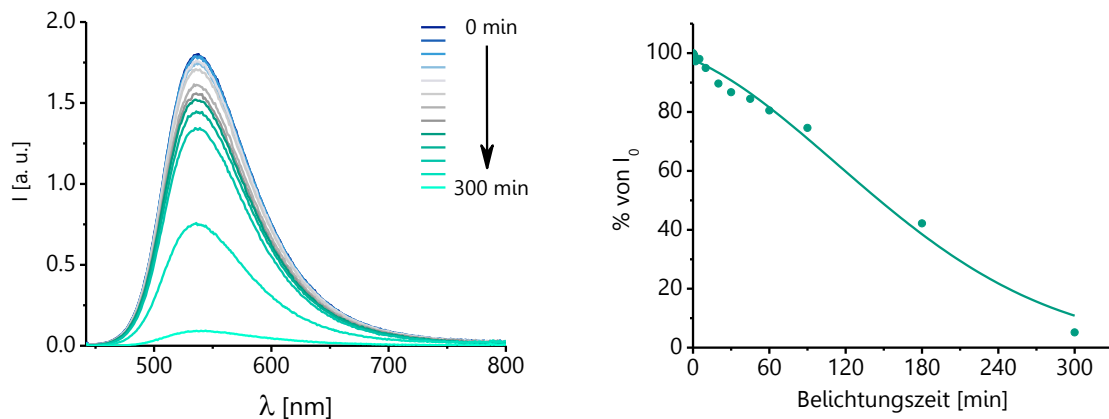


Abbildung 153: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 427 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 536 \text{ nm}$, Spalt = 5 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 146 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-3**.

Grün-3m:

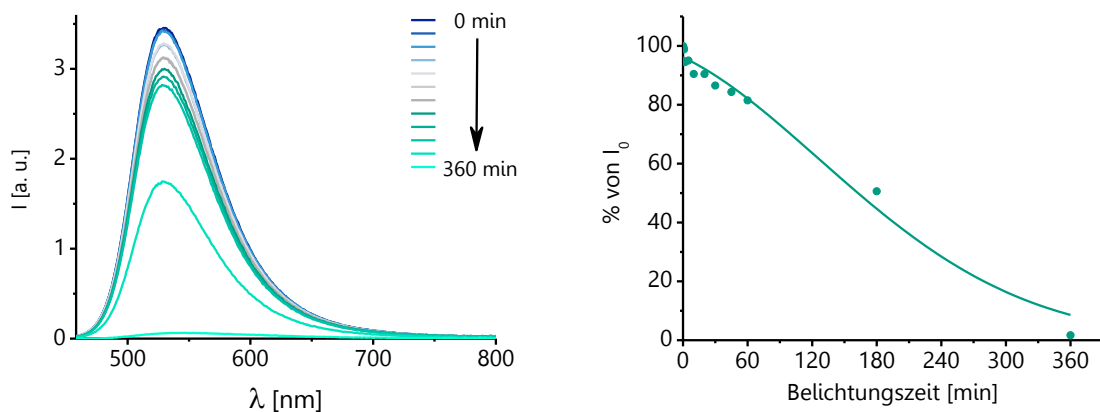


Abbildung 154: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 429 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 529 \text{ nm}$, Spalt = 5 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 162 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-3m**.

Grün-4:

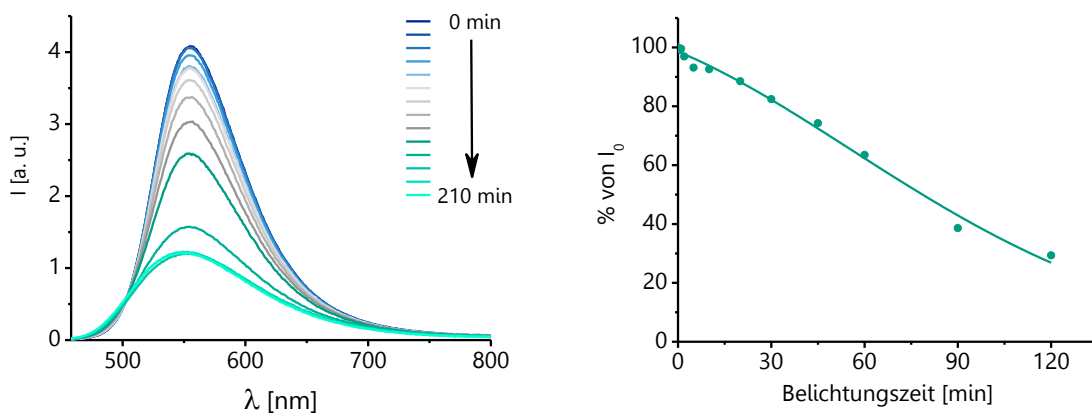


Abbildung 155: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 443 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 555 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 78 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-4**.

Grün-4m:

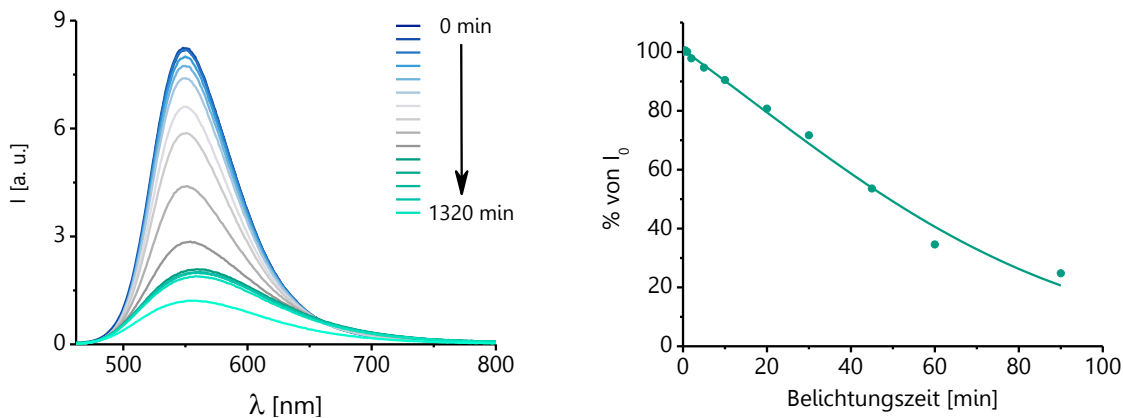


Abbildung 156: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 447 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 550 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 49 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Grün-4m**.

TO:

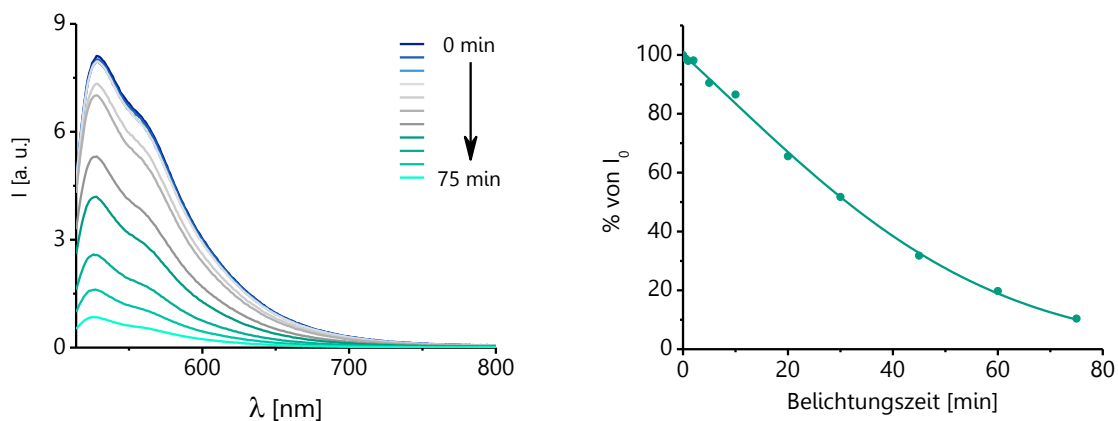


Abbildung 157: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 504$ nm, $\lambda_{em.max.} = 528$ nm, Spalt = 3 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 32$ min) der Photostabilitätsuntersuchung von **TO**.

TO-CN:

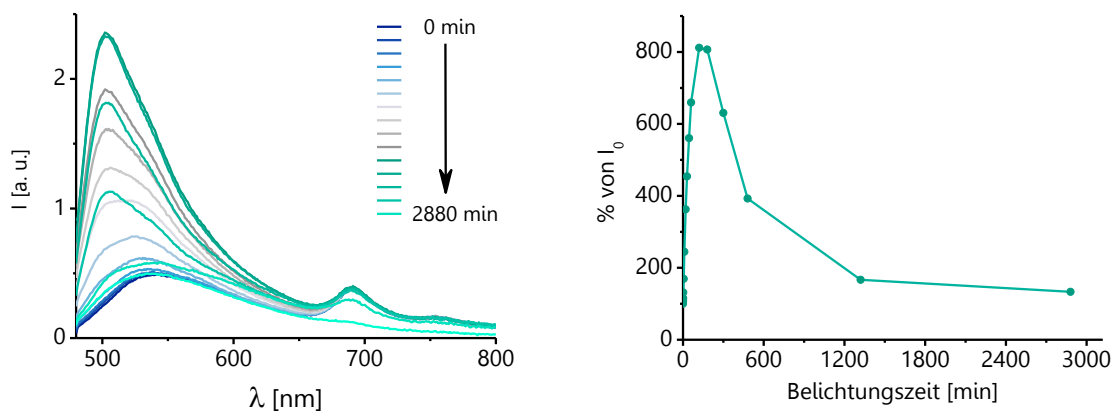


Abbildung 158: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 470$ nm, $\lambda_{em.max.} = 505$ nm, Spalt = 3 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2}$ nicht bestimmt) der Photostabilitätsuntersuchung von **TO-CN**.

CylIQ:

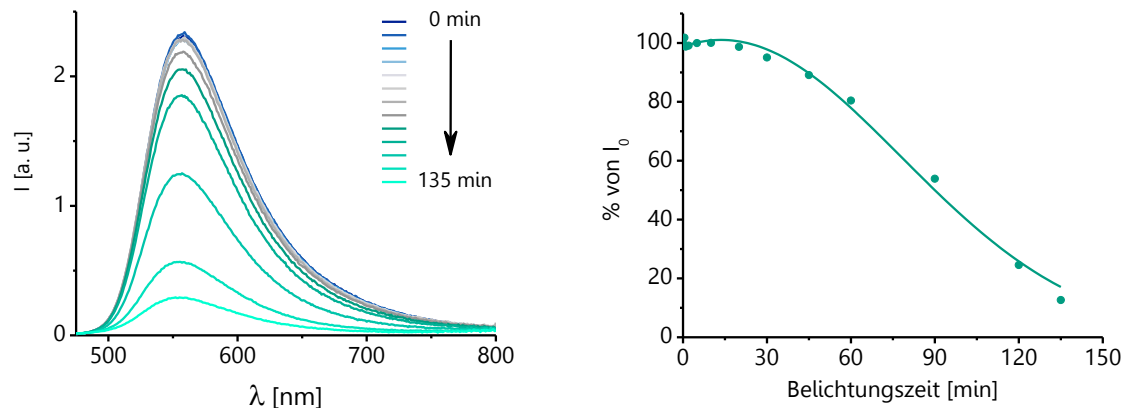


Abbildung 159: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 460$ nm, $\lambda_{em.max.} = 559$ nm, Spalt = 3 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 90$ min) der Photostabilitätsuntersuchung von **CylIQ**.

Gelb-1m:

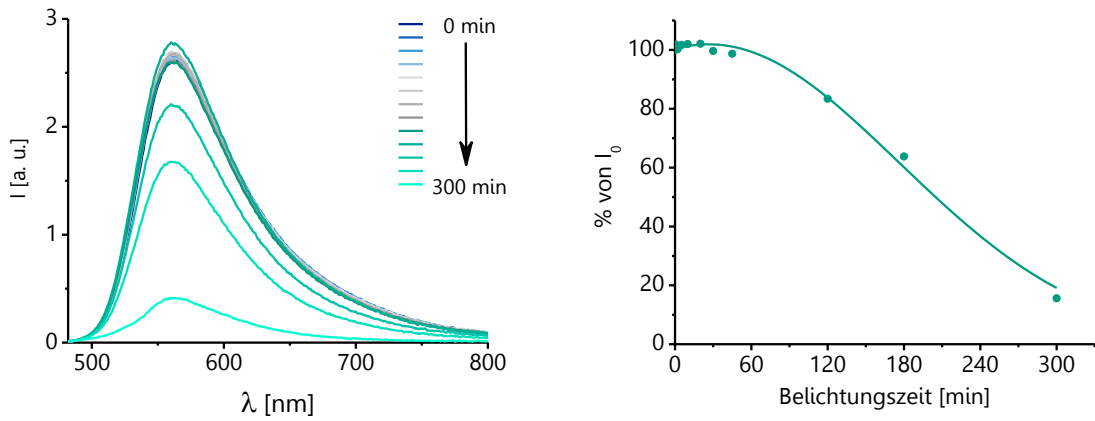


Abbildung 160: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 467 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 563 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 205 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Gelb-1m**.

Gelb-2:

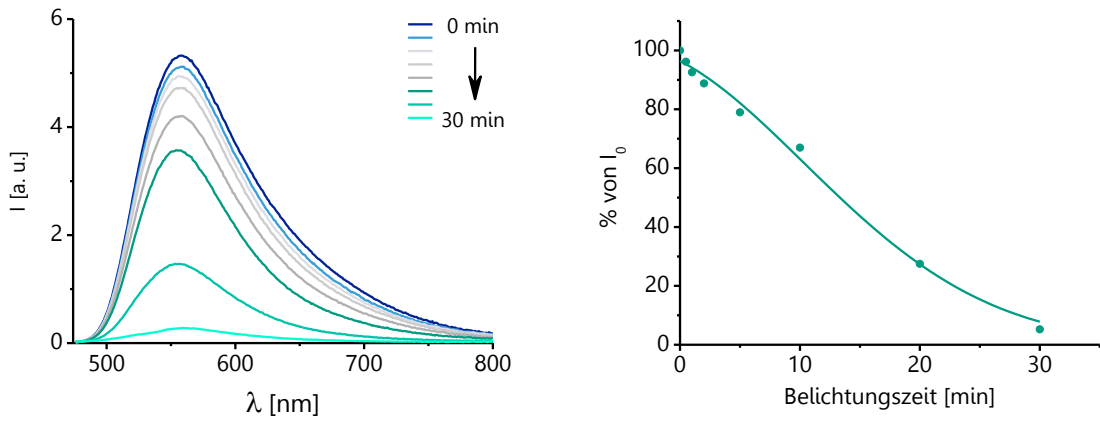


Abbildung 161: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 461 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 558 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 13 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Gelb-2**.

Gelb-3:

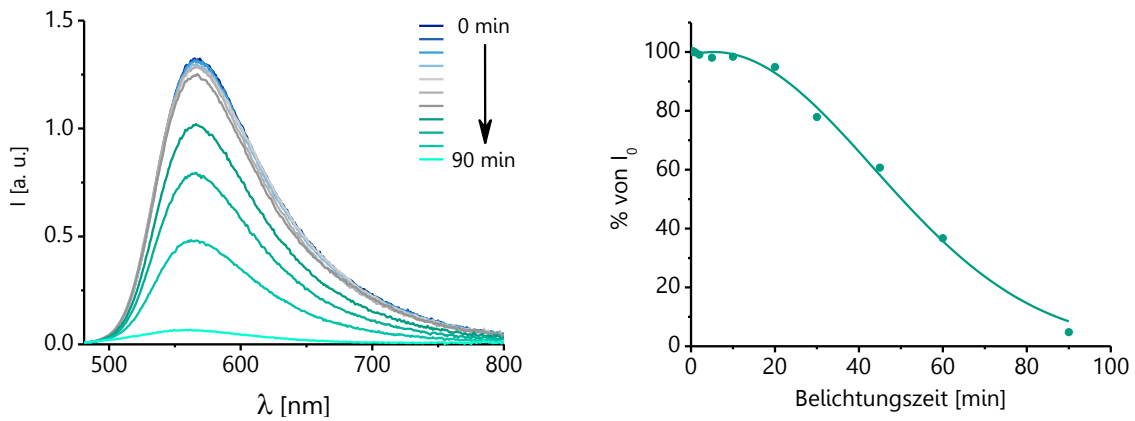


Abbildung 162: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 466 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 566 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 50 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Gelb-3**.

Gelb-4:

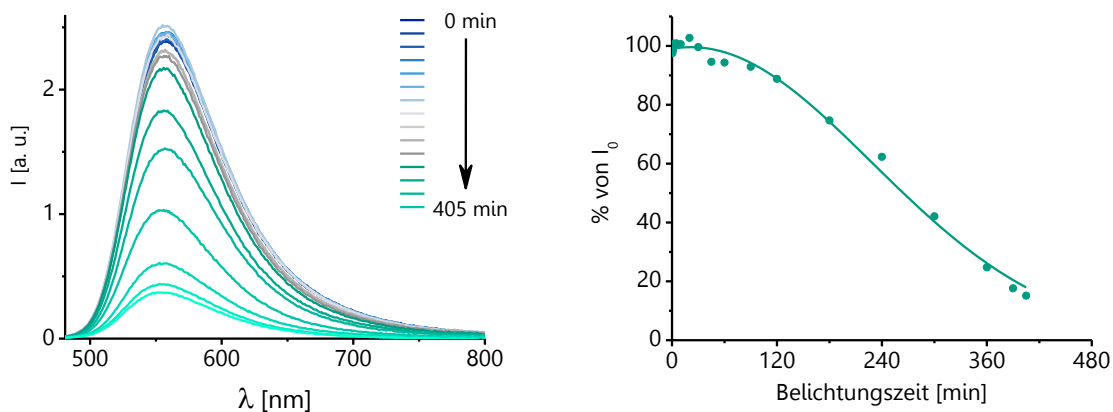


Abbildung 163: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 558 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 264 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Gelb-4**.

Gelb-4m:

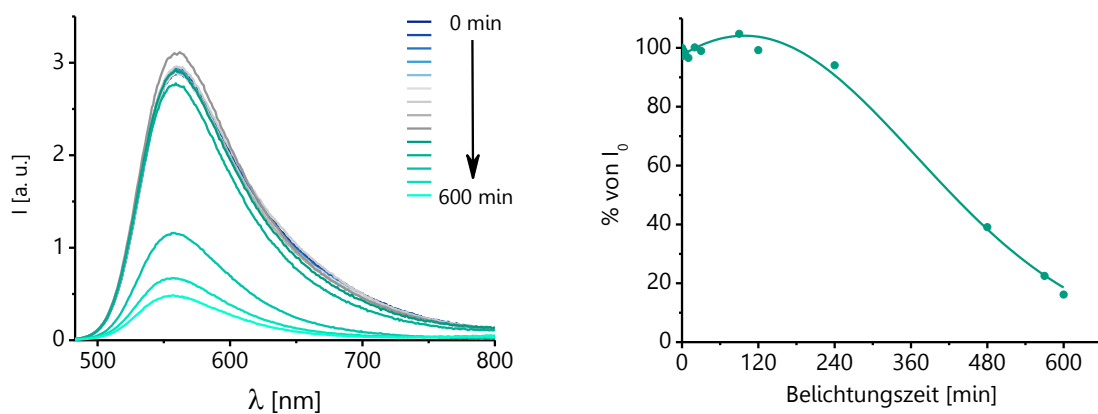


Abbildung 164: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc.} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 559 \text{ nm}$, Spalt = 4 nm) und Änderung der Fluoreszenzintensität ($t_{1/2} = 425 \text{ min}$) der Photostabilitätsuntersuchung von **Gelb-4m**.

Photostabilitätsdaten

Farbstoff	Anregungs- wellenlänge $\lambda_{\text{exc.}}$ [nm]	Emissions- maximum $\lambda_{\text{em.max.}}$ [nm]	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [min]
Blau-1m	375	464	658*
Grün-1	409	517	187
Grün-1m	426	535	225
Grün-2	419	521	636
Grün-2m	436	539	293
Grün-3	427	536	146
Grün-3m	443	555	78
Grün-4	429	529	162
Grün-4m	447	550	49
TO-CN	470	505	-
TO	504	528	32
CyIQ	460	559	90
Gelb-1m	467	563	205
Gelb-2	461	558	13
Gelb-3	466	566	50
Gelb-4	460	558	264
Gelb-4m	468	559	425
TR-CN	545	614	66
Rot-1	520	580	11
Rot-2e	455	648	130
Rot-3e	468	637	134
Rot-4	480	583	186
Rot-4m	494	596	331
Rot-5	486	600	67
Rot-5m	501	603	241
Rot-6	499	616	101
Rot-6m	507	615	317
Rot-7m	498	612	269
TR	620	654	7

Tabelle 12: Übersicht der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ aus der Photostabilitätsuntersuchung mit **DNA0**. Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine Lösung der Farbstoffe in 5 % Ethanol.

Vergleich der Halbwertszeiten von Farbstoffen gleicher Fluoreszenzfarbe

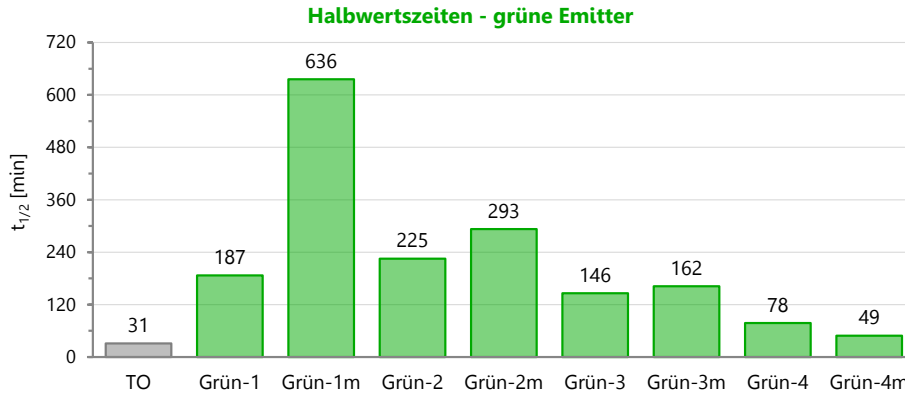


Abbildung 165: Vergleich der Halbwertszeiten von Farbstoffen mit grüner Fluoreszenzfarbe.

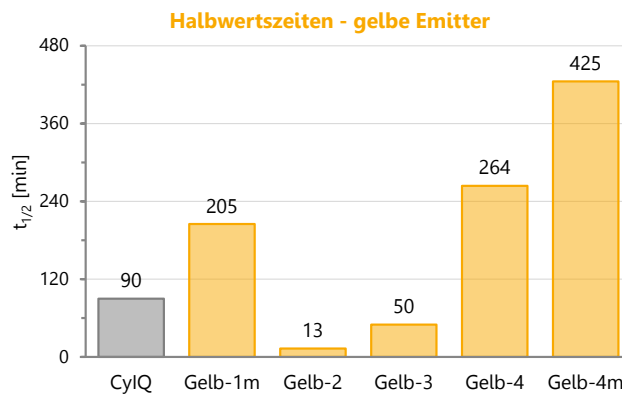


Abbildung 166: Vergleich der Halbwertszeiten von Farbstoffen mit gelber Fluoreszenzfarbe.

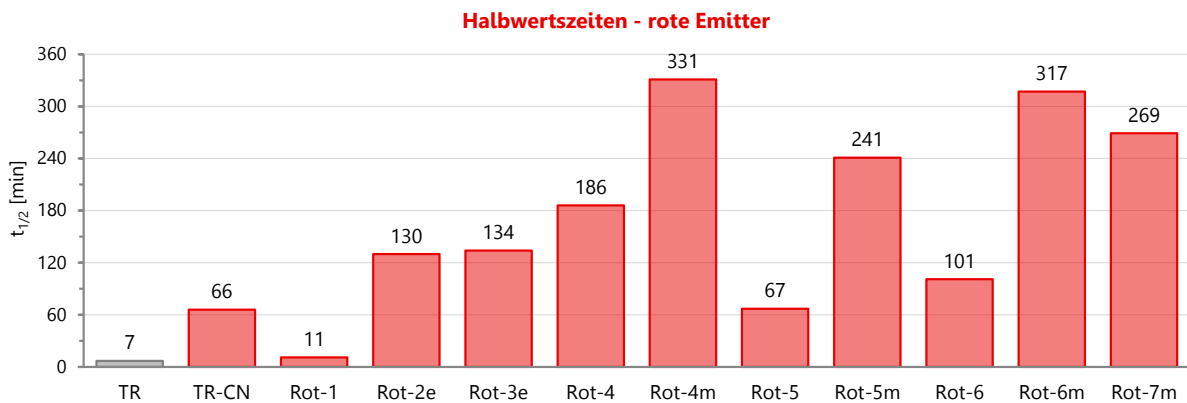


Abbildung 167: Vergleich der Halbwertszeiten von Farbstoffen mit roter Fluoreszenzfarbe.

Bestimmung der primären Photo-Abbauprodukte

Mit dem Ziel Hinweise auf die Struktur der primären Photo-Abbauprodukte von Styryl-Farbstoffen zu erhalten, wurden die Proben analog zur Photostabilitätsbestimmung belichtet. Im Anschluss wurden die belichteten Proben mittels HPLC in ihre Hauptbestandteile aufgetrennt und zugleich das Absorptionsspektrum eines jeden Bestandteils aufgezeichnet. Die gesammelten Fraktionen dieser HPLC-Trennungen wurden im Vakuum zur Trockene eingengt. Die erhaltenen Rückstände wurden in Acetonitril : Wasser = 7 : 3 gelöst und danach zur Massenbestimmung mit Nano-ESI-MS-Messungen analysiert.

Die belichteten Proben wurden über *reversed phase* HPLC an einer *Shimadzu 10* HPLC (online-Entgaser, Pumpe LC-10AT, Injektor SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Für die Trennungen wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm) verwendet.

Eluens A: 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5)

Eluens B: Acetonitril

Fluß: 1.0 mL/min

Gradient:	0 min	→ 0 % Eluens B
	5 min	→ 0 % Eluens B
	40 min	→ 50 % Eluens B
	45 min	→ 50 % Eluens B
	45.1 min	→ 95 % Eluens B
	50 min	→ 95 % Eluens B
	50.1 min	→ 0 % Eluens B
	57 min	→ 0 % Eluens B

Die Detektionswellenlängen umfassten einen Bereich von 200 bis 800 nm. Die erhaltenen Chromatogramme wurden bei dem jeweiligen Absorptionsmaximum der einzelnen Bestandteile ausgewertet. Der Dioden-Array-Detektor ermöglichte die Erfassung von Absorptionsspektren der Photo-Abbauprodukte.

Deprotonierung von CyIQ

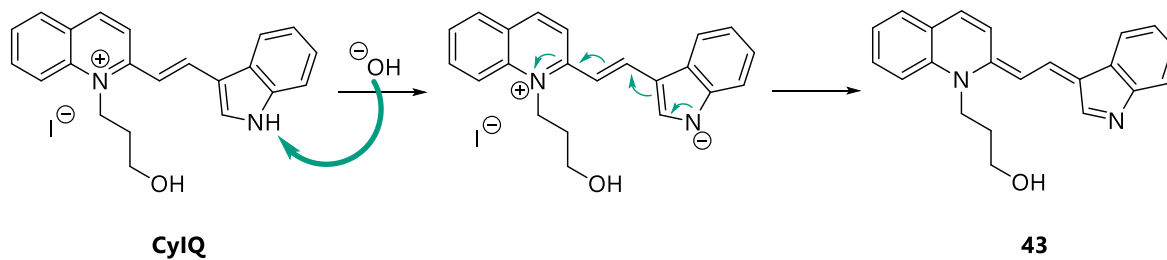


Abbildung 168: Mechanistische Vorgänge bei der Deprotonierung von **CyIQ**.

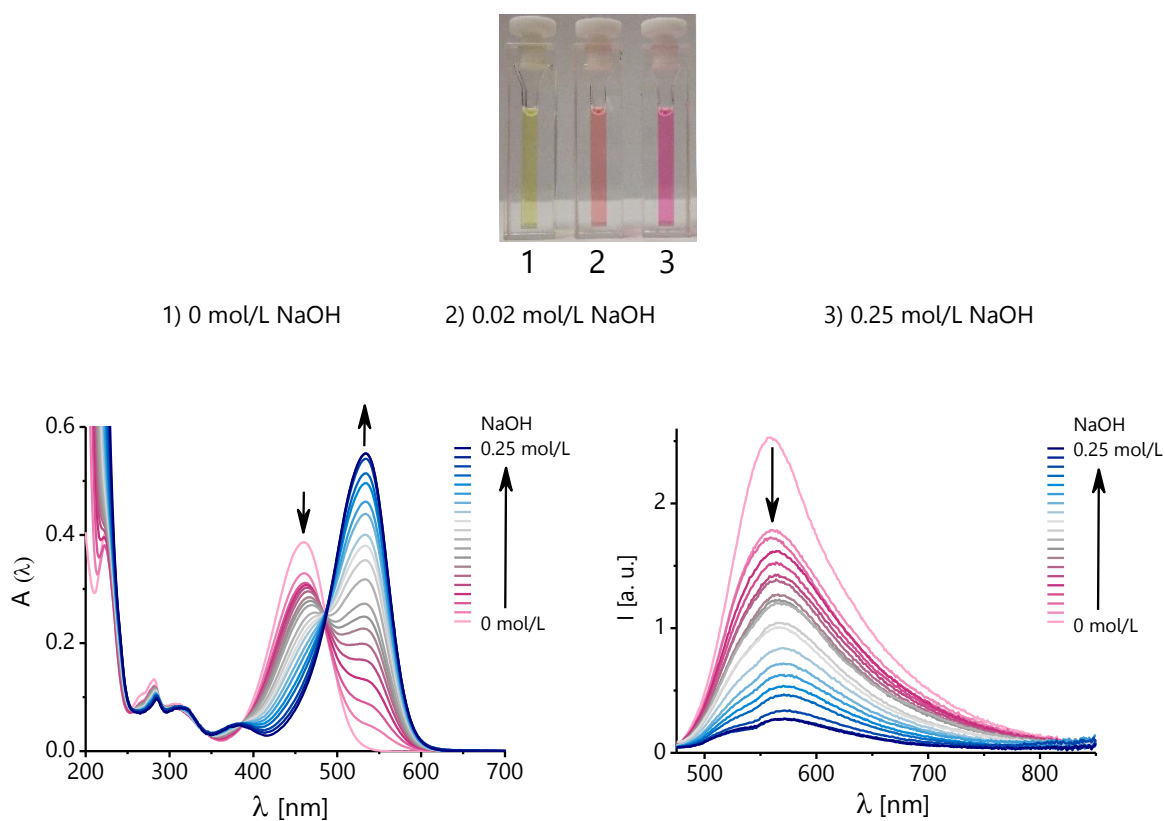


Abbildung 169: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Deprotonierung von **CyIQ**. Die ausgeprägte Absorptionsmaximum-Verschiebung ist deutlich an der Probelösung (oben) sichtbar. Mit zunehmender Bildung von **43** geht die Emission stark zurück.

Analyse des primären Photo-Abbauproduktes von CyIQ

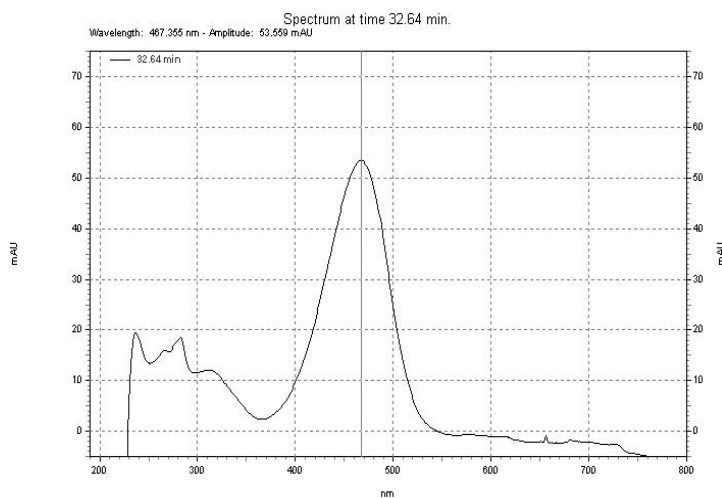


Abbildung 170: Spektrum von **CyIQ**.

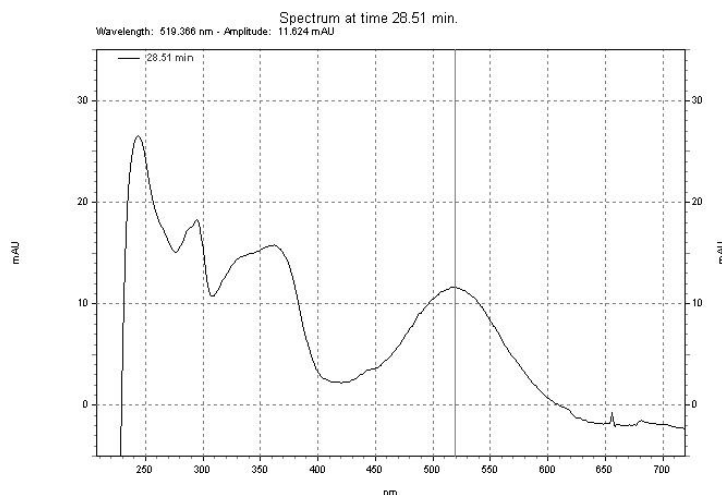


Abbildung 171: Spektrum vom **CyIQ**-Abbauprodukt **CyIQ^{ox}**.

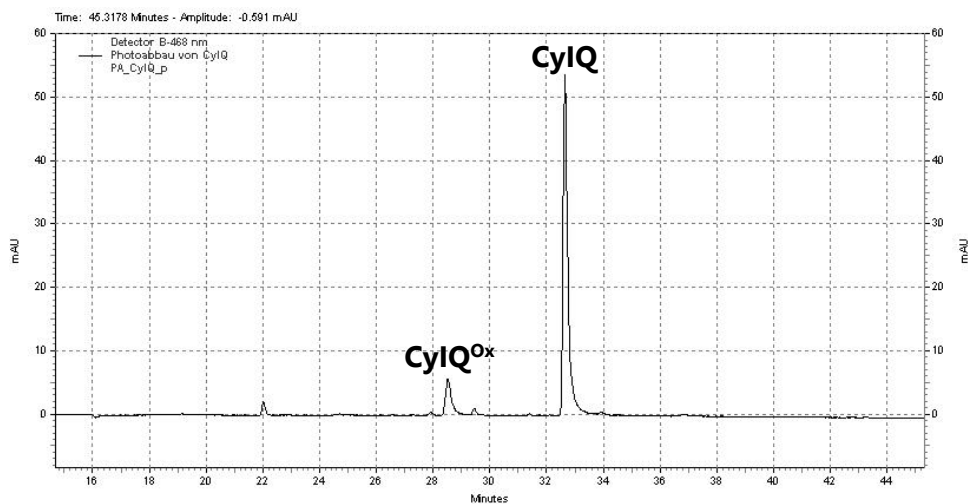


Abbildung 172: HPLC-Chromatogramm der präparativen Trennung der Abbauprodukte von **CyIQ** bei 468 nm.

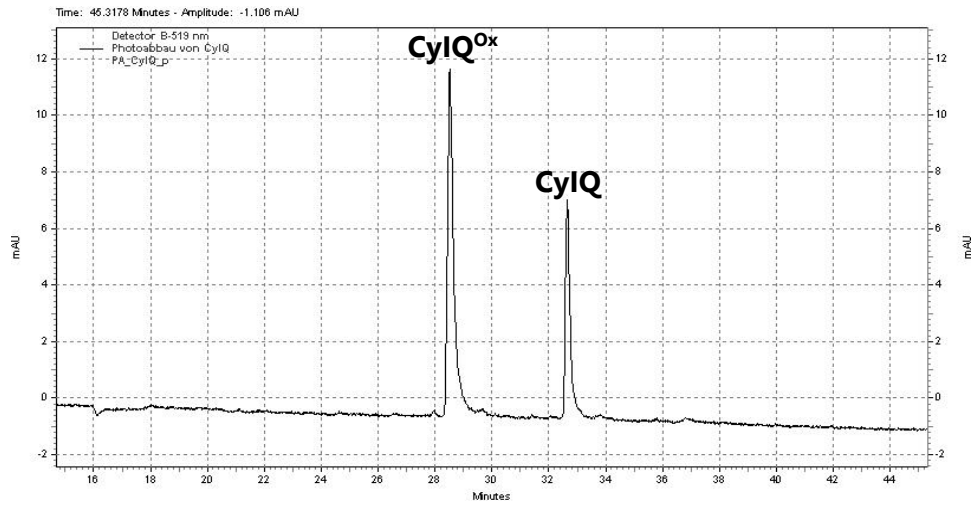


Abbildung 173: HPLC-Chromatogramm der präparativen Trennung der Abbauprodukte von **CyIQ** bei 519 nm.

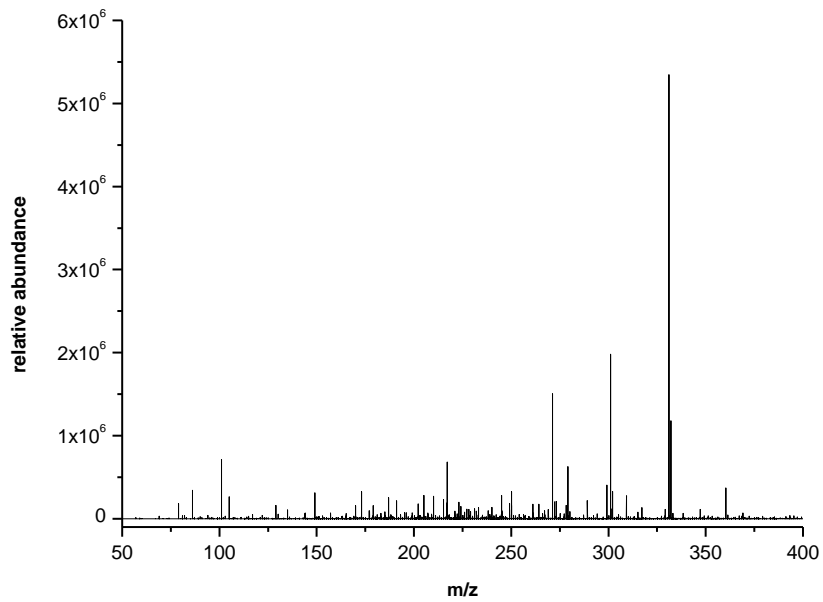


Abbildung 174: Nano-ESI-Massenspektrum vom Abbauprodukt **CyIQ^{ox}**.

Analyse des primären Photo-Abbauproduktes von Rot-4:

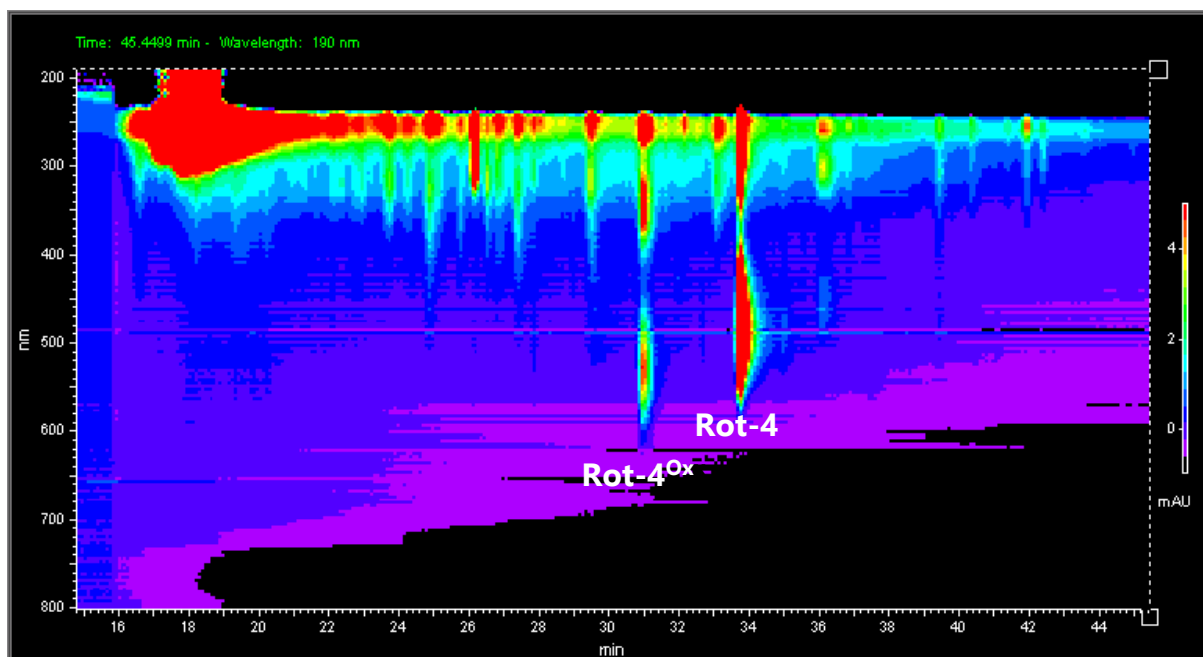


Abbildung 175: DAD-Spektrum der HPLC-Trennung von der belichteten **Rot-4**-Probelösung.

344

Es ist ein konjugiertes Photo-Abbauprodukt analog zu **CylQ** zu erkennen, generell zeigte **Rot-4** deutlich mehr Abbauprodukte als **CylQ**. Nachfolgend sind die entsprechenden Chromatogramme und Spektren dargestellt.

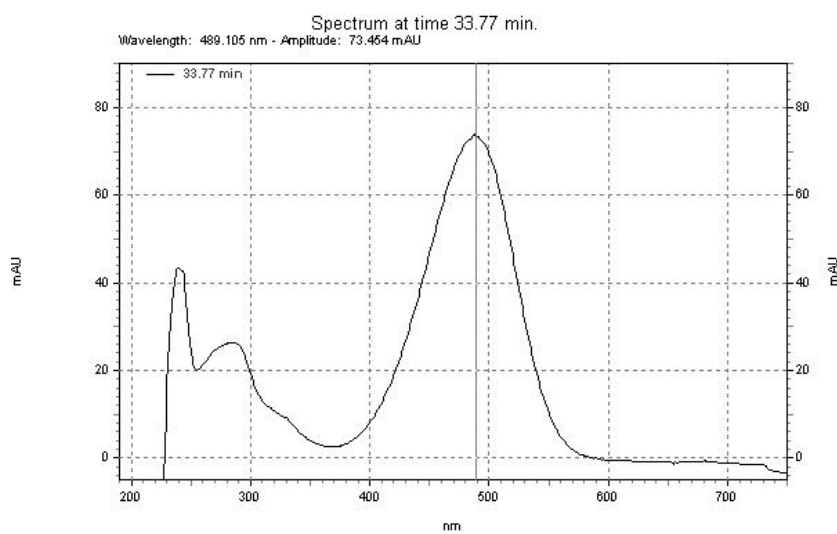


Abbildung 176: Spektrum von **Rot-4**.

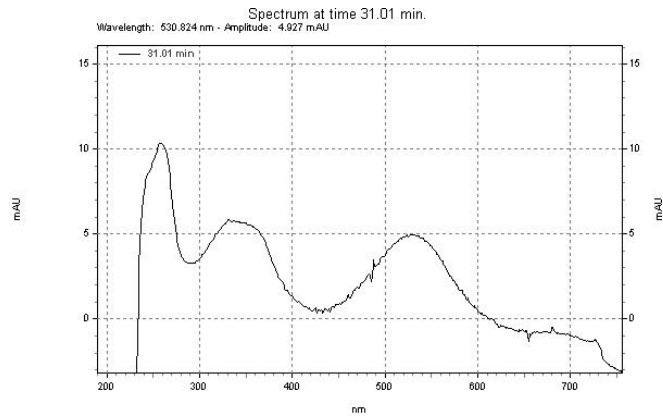


Abbildung 177: Spektrum vom **Rot-4**-Abbauprodukt **Rot-4^{0x}**.

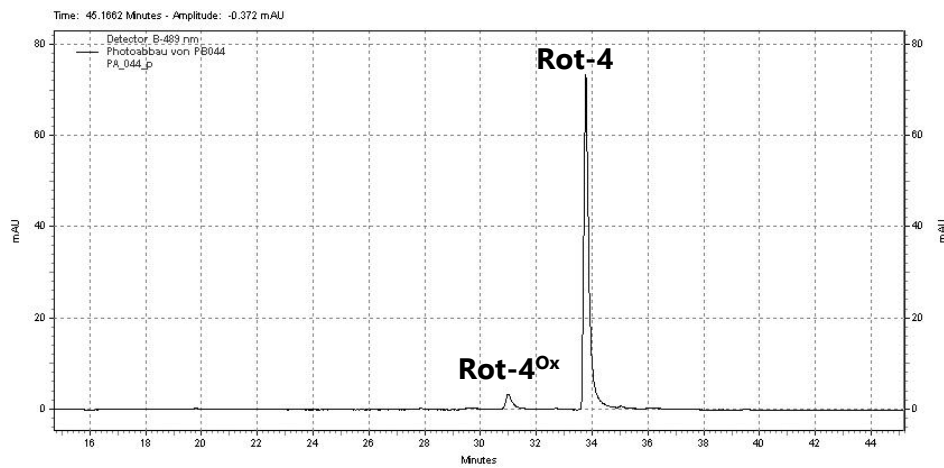


Abbildung 178: HPLC-Chromatogramm der präparativen Trennung der Abbauprodukte von **Rot-4** bei 489 nm.

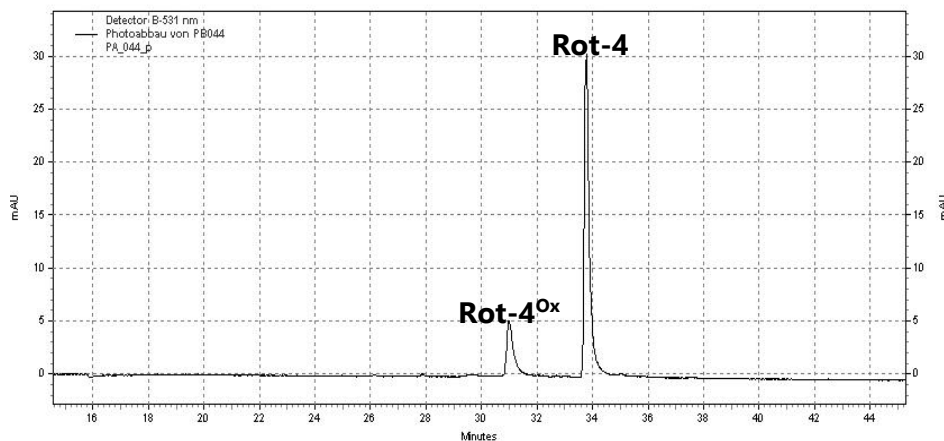


Abbildung 179: HPLC-Chromatogramm der präparativen Trennung der Abbauprodukte von **Rot-4** bei 531 nm.

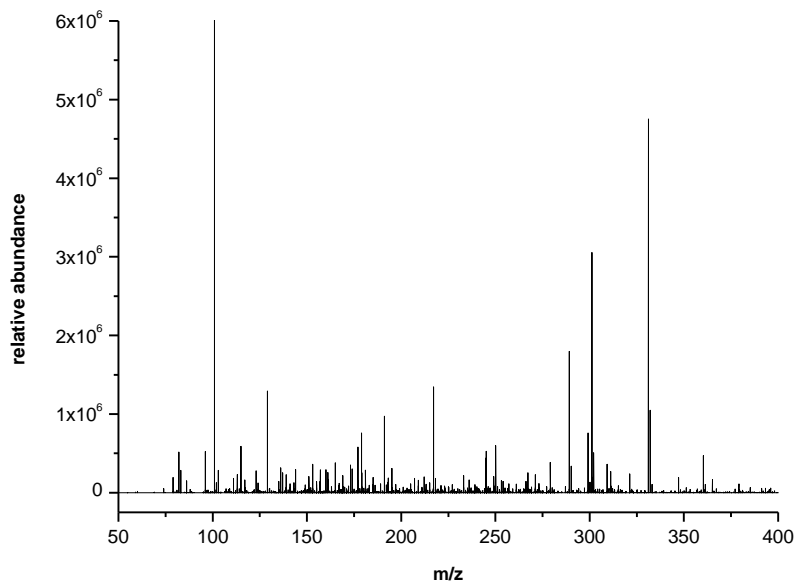


Abbildung 180: Nano-ESI-Massenspektrum von Abbauprodukt **Rot-4^{ox}** von **Rot-4**.

Analyse des primären Photo-Abbauproduktes von Gelb-4

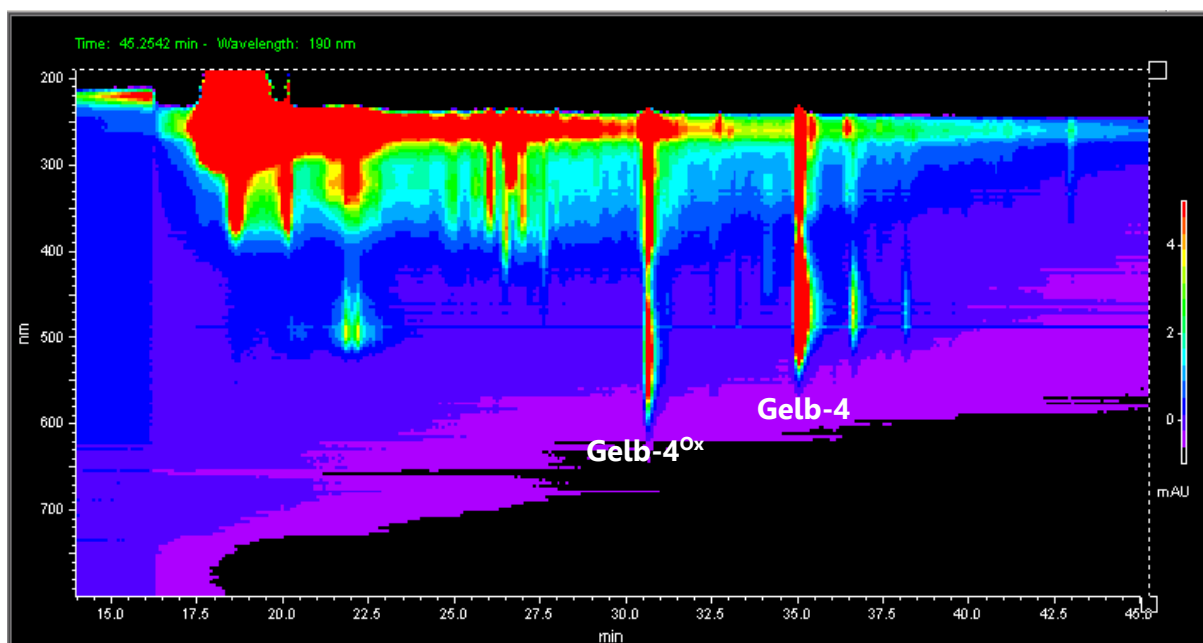


Abbildung 181: DAD-Spektrum der HPLC-Trennung von der belichteten **Gelb-4**-Probelösung.

Es ist ein konjugiertes Abbauprodukt analog zu **CyIQ** vorhanden. Allerdings sind bei **Gelb-4** mehrere verschiedene, konjugierte Abbauprodukte entstanden als bei **CyIQ** oder **Gelb-4**. Es ist möglich, dass damit ein zusätzlicher Hinweis auf die große Photostabilität gegeben wird, da viele andersartige Zersetzungsprodukte einen

schematisch verlaufenden Abbauweg ausschließen. Nachfolgend sind die entsprechenden Chromatogramme und Spektren dargestellt.

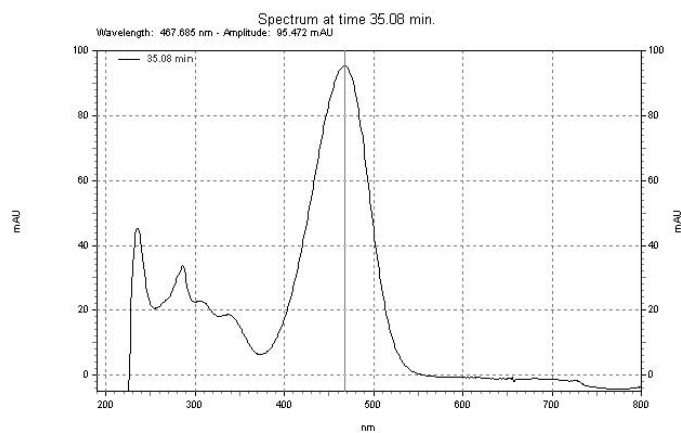


Abbildung 182: Spektrum von **Gelb-4**.

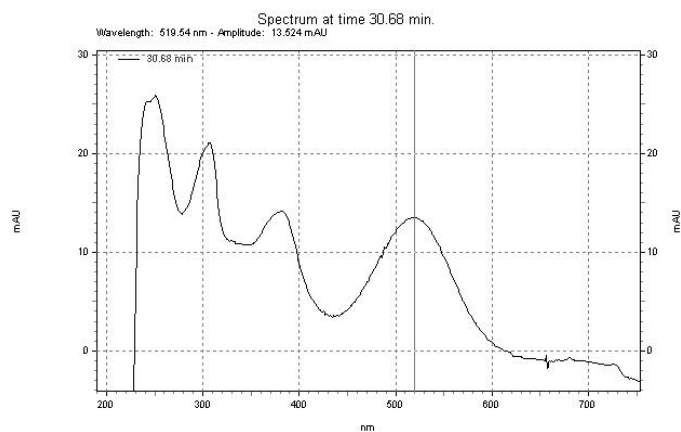


Abbildung 183: Spektrum vom Abbauprodukt **Gelb-4^{ox}**.

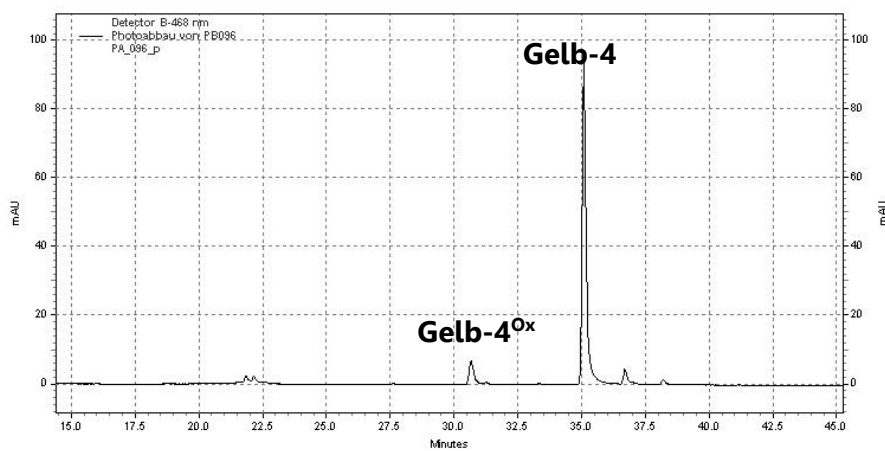


Abbildung 184: HPLC-Chromatogramm der präparativen Trennung der Abbauprodukte von **Gelb-4** bei 468 nm.

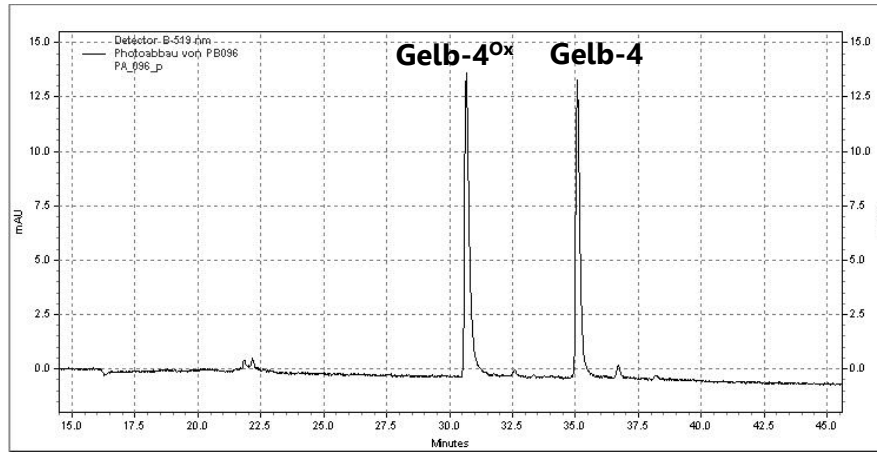


Abbildung 185: HPLC-Chromatogramm der präparativen Trennung der Abbauprodukte von **Gelb-4** bei 519 nm.

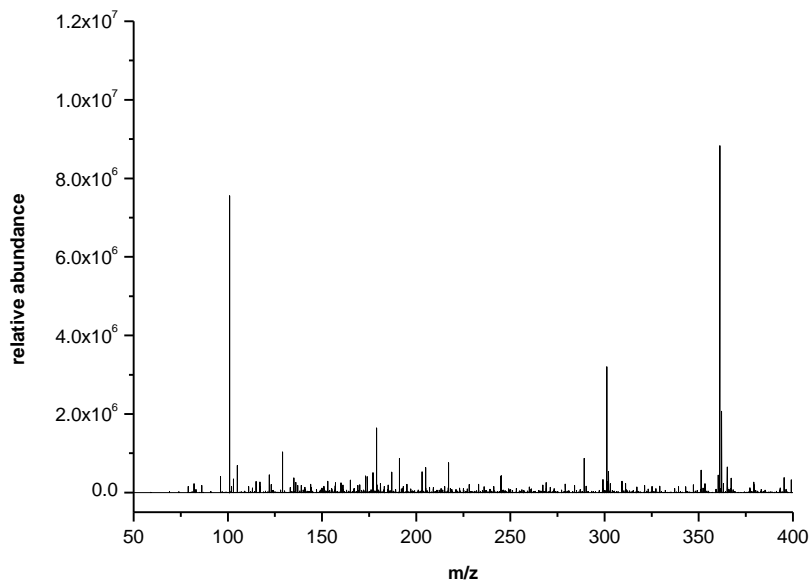


Abbildung 186: Nano-ESI-Massenspektrum vom Abbauprodukt **Gelb-4^{ox}** des Farbstoffes **Gelb-4**.

Fluoreszenztitration mit DNA0

Mit dem Ziel, das Verhalten der synthetisierten Cyaninfarbstoffe in Gegenwart von DNA, zu untersuchen und zu vergleichen, wurden alle Farbstoffe in einer Fluoreszenztitration mit insgesamt 4.0 Äquivalenten **DNA0** (Abbildung 135) versetzt und spektroskopisch vermessen. Es wurde eine 10 μM Farbstofflösung (mit 10 mM NaP_i (pH = 7), 250 mM NaCl und 2 % Ethanol) in einer Quarzglas-Küvette vorgelegt. Im Anschluss wurde schrittweise eine DNA-Titrationslösung (mit 40 μM **DNA0**, 10 μM Farbstoff, 10 mM NaP_i (pH = 7), 250 mM NaCl und 2 % Ethanol) zugegeben. Nach jedem Zugabeschritt wurde die Probelösung gründlich gemischt und ein Absorptionsspektrum sowie ein Fluoreszenzspektrum aufgezeichnet. Um eine spätere Vergleichbarkeit der gemessenen Fluoreszenzintensitäten zu gewährleisten, wurde bei allen Titrationen eine Spalteinstellung von 3 nm (Eingangs- und Ausgangspalt) verwendet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die aufgezeichneten Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektren der Titrationen der neuen Cyanine sowie zum Vergleich die Spektren der Vorgänger **TR**, **TO**, **TO-CN** und **CyIQ**. Zudem sind die Absorbanz-Änderungen, der Absorptionsmaxima des Farbstoffes in Abwesenheit $\lambda_{\text{abs.max.ohne}}$ bzw. in Anwesenheit von 4.0 eq **DNA0** $\lambda_{\text{abs.max.mit}}$ gezeigt. Folgend werden Intensitätsänderungen der Emission im Verlauf der Titration bei dem jeweils entsprechenden Emissionsmaximum $\lambda_{\text{em.max.}}$ dargestellt. Die im Anschluss befindliche Tabelle stellt eine Übersicht der spektroskopisch gewonnenen Titrationsdaten dar.

TR-CN:

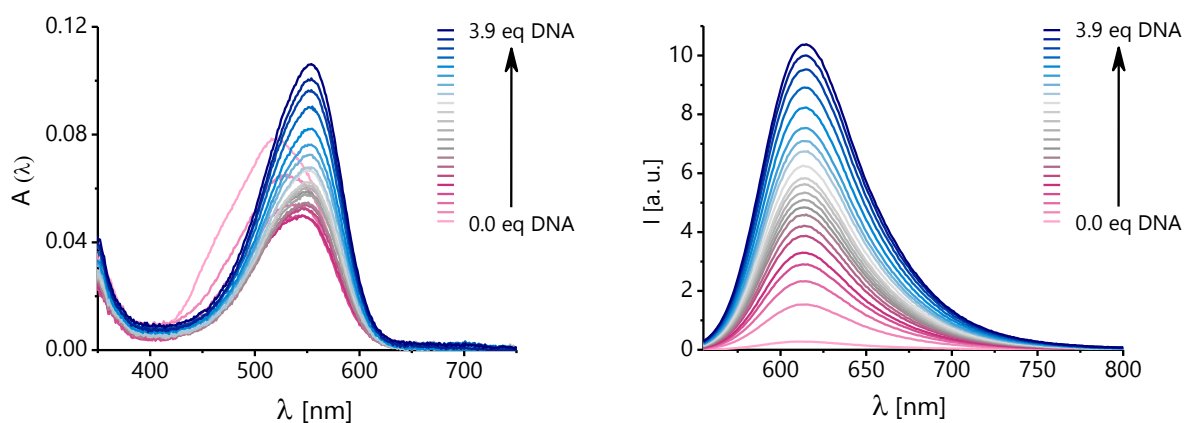


Abbildung 187: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 521 \text{ nm} - 554 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 33 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 615 \text{ nm}$) der Titration von **TR-CN** mit **DNA0**.

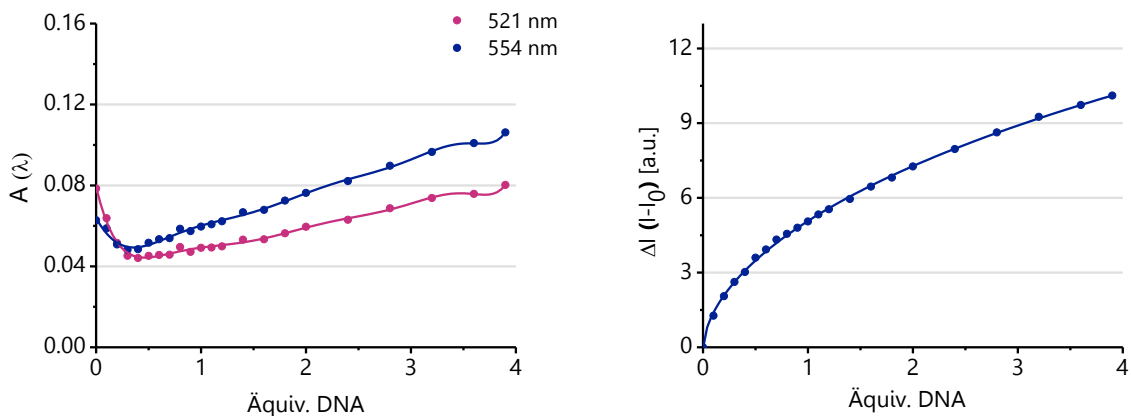


Abbildung 188: Titrationsverlauf von **TR-CN** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 521$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 554$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 615$ nm).

Rot-1:

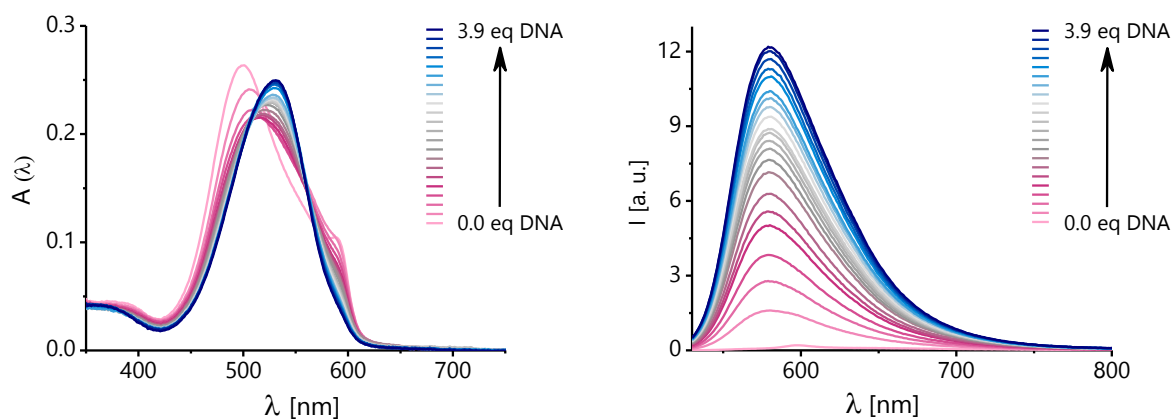


Abbildung 189: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 500$ nm – 531 nm, $\Delta\lambda = 31$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 520$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 581$ nm) der Titration von **Rot-1** mit **DNA0**.

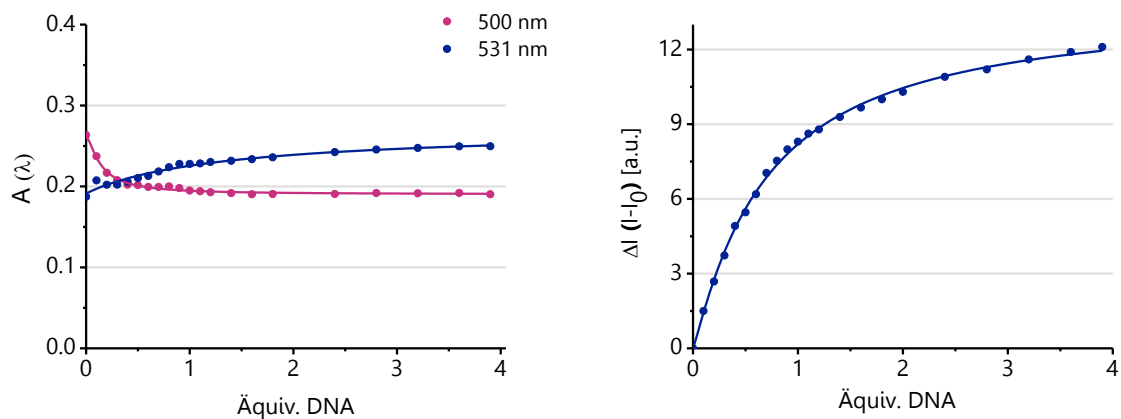


Abbildung 190: Titrationsverlauf von **Rot-1** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 500$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 531$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 581$ nm).

Rot-2e:

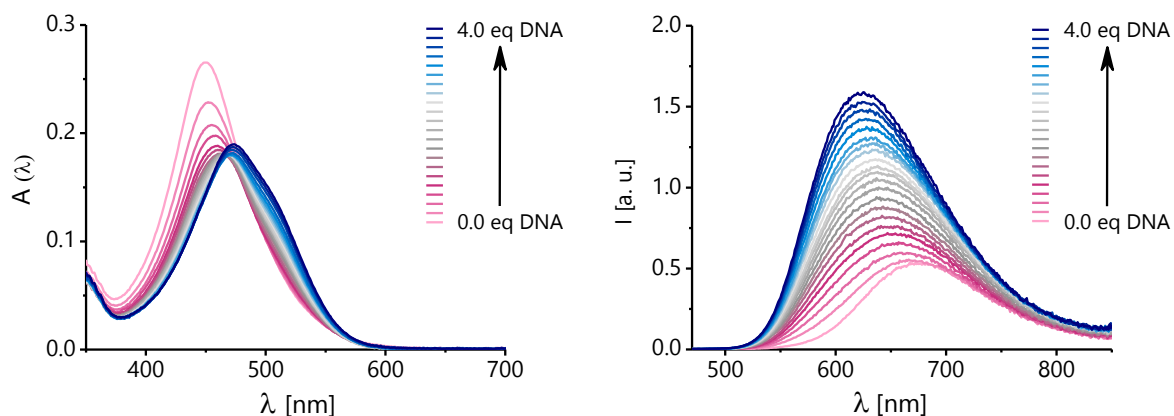


Abbildung 191: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 449 \text{ nm} - 473 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 24 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 455 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 625 \text{ nm}$) der Titration von **Rot-2e** mit **DNA0**.

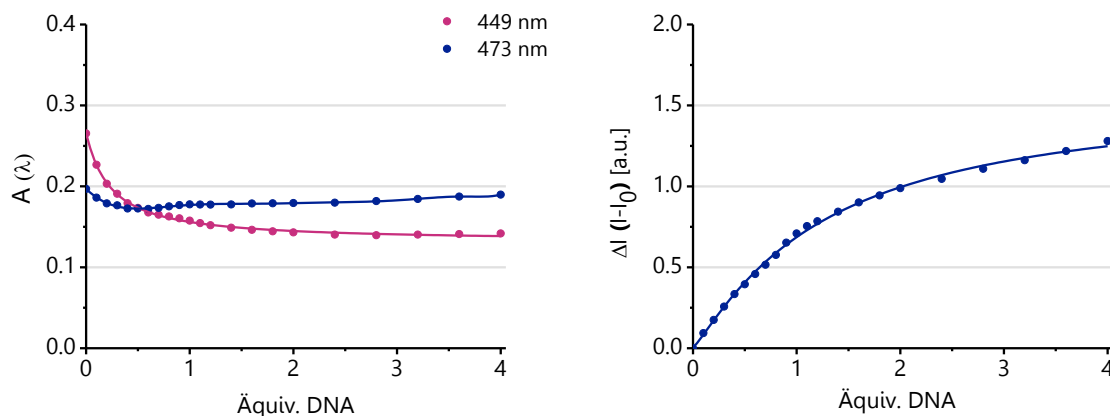


Abbildung 192: Titrationsverlauf von **Rot-2e** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 449 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 473 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 625 \text{ nm}$).

Rot-3e:

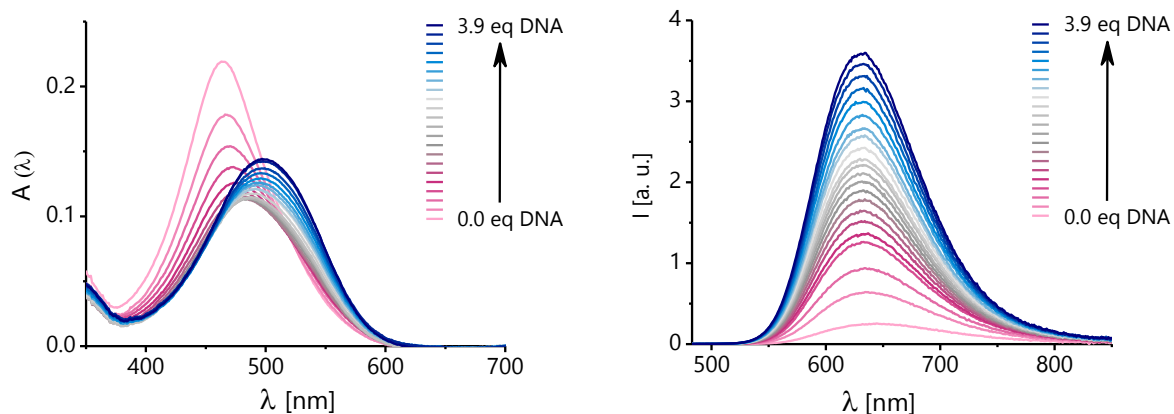


Abbildung 193: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 464 \text{ nm} - 501 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 632 \text{ nm}$) der Titration von **Rot-3e** mit **DNA0**.

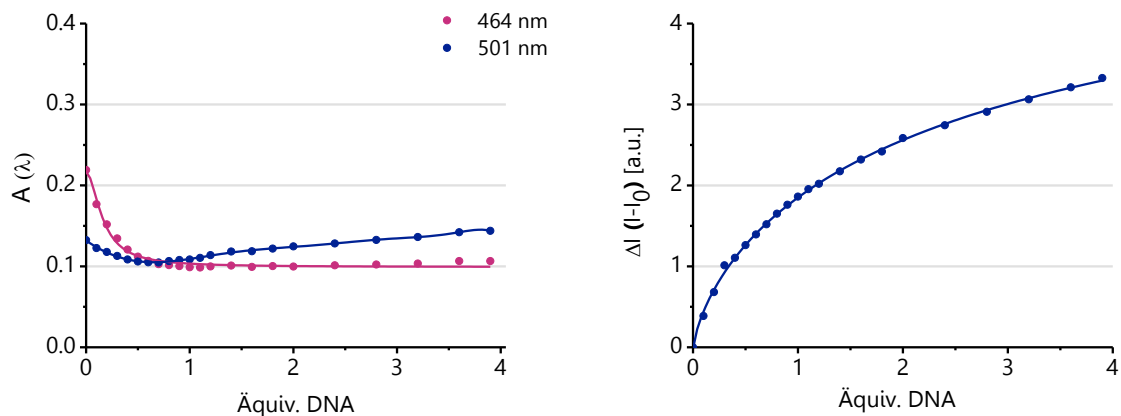


Abbildung 194: Titrationsverlauf von **Rot-3e** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 464$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 501$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 632$ nm).

Rot-4:

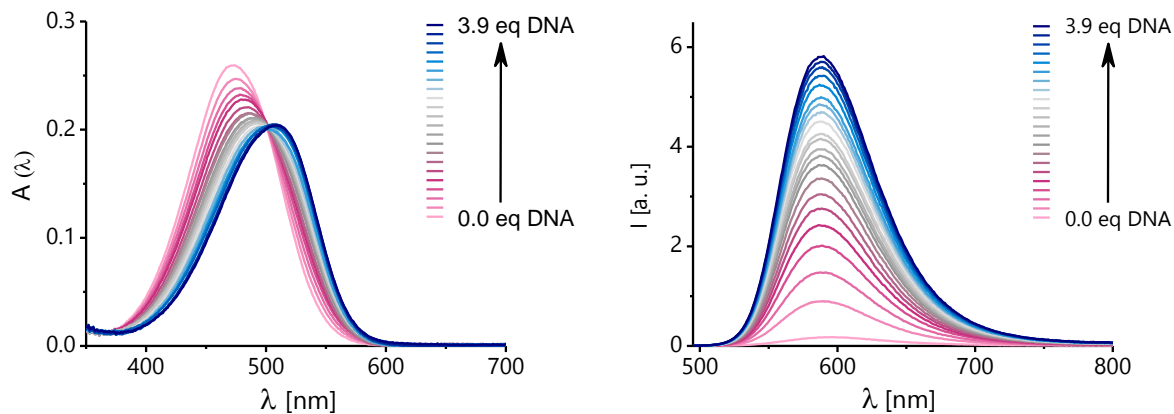


Abbildung 195: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 473$ nm – 509 nm, $\Delta\lambda = 36$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 480$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 590$ nm) der Titration von **Rot-4** mit **DNA0**.

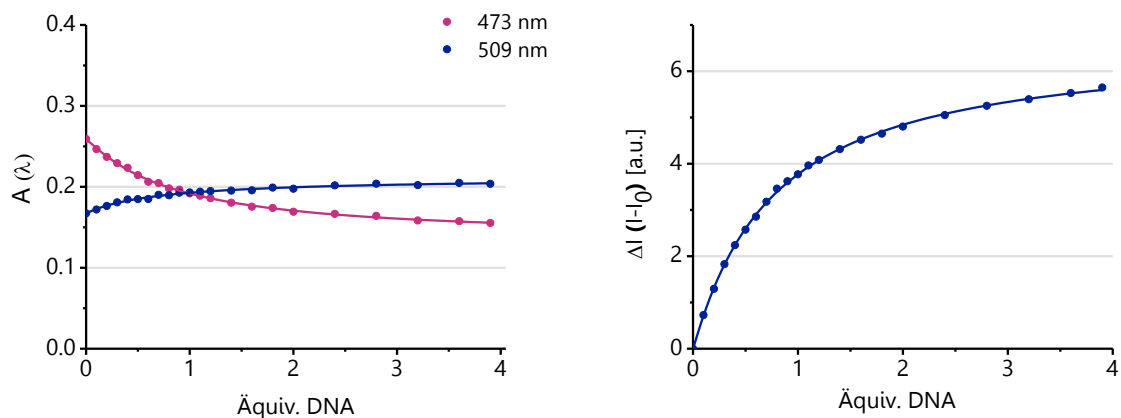


Abbildung 196: Titrationsverlauf von **Rot-4** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 473$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 509$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 590$ nm).

Rot-4m:

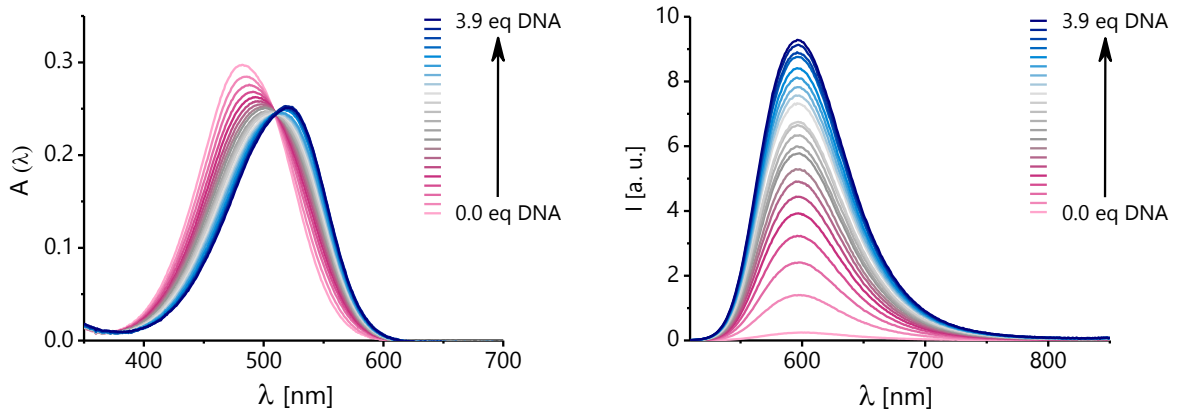


Abbildung 197: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 482 \text{ nm} - 521 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 29 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 596 \text{ nm}$) der Titration von **Rot-4m** mit **DNA0**.

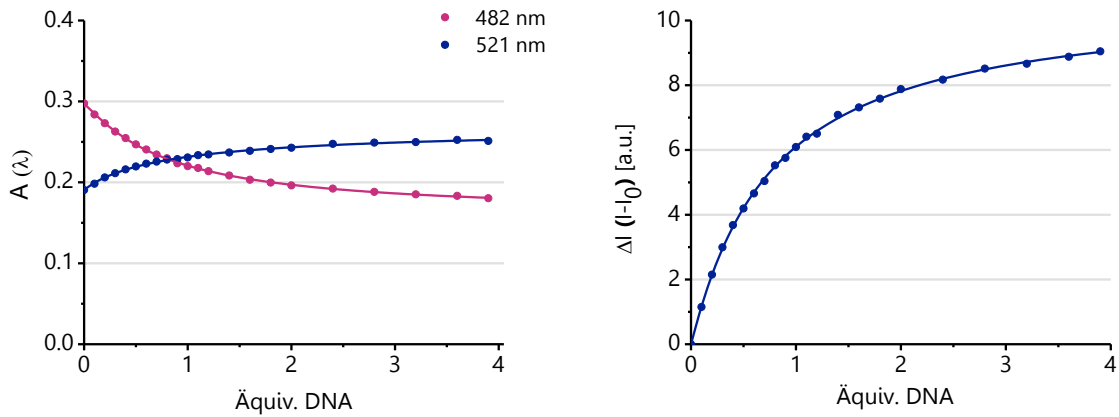


Abbildung 198: Titrationsverlauf von **Rot-4m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 482 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 521 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 596 \text{ nm}$).

Rot-5:

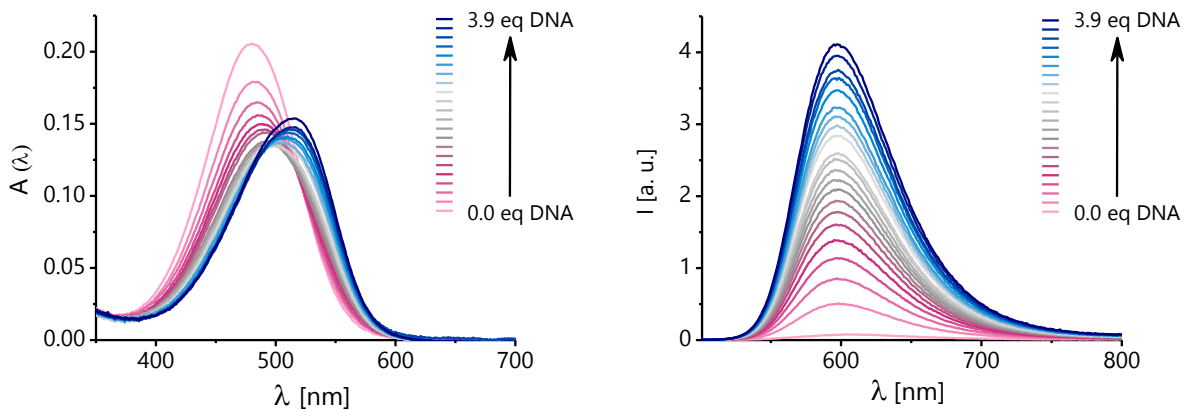


Abbildung 199: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 480 \text{ nm} - 515 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 598 \text{ nm}$) der Titration von **Rot-5** mit **DNA0**.

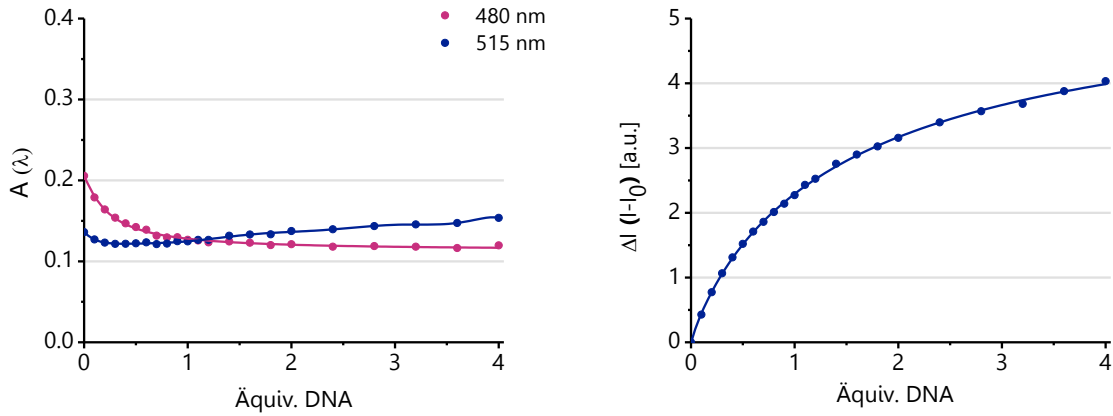


Abbildung 200: Titrationsverlauf von **Rot-5** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 480$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 515$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 598$ nm).

Rot-5m:

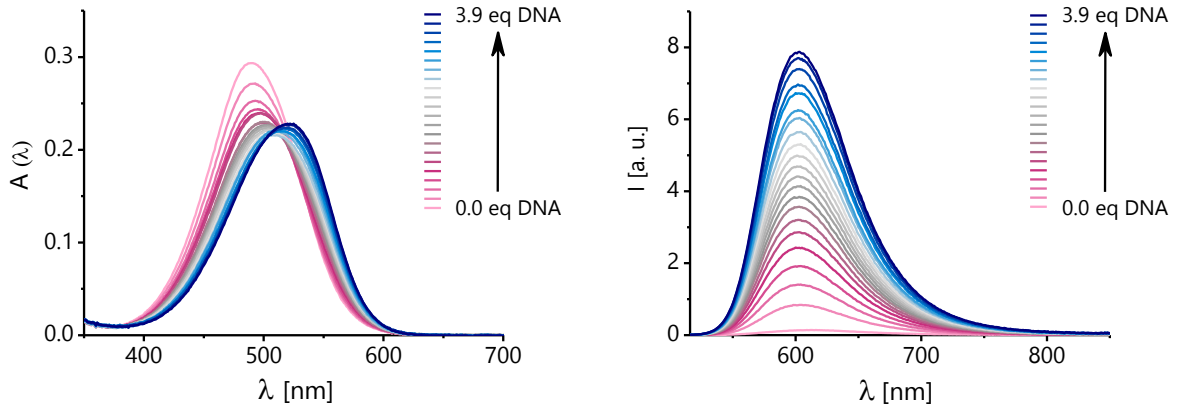


Abbildung 201: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 490$ nm – 522 nm, $\Delta\lambda = 32$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 501$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 602$ nm) der Titration von **Rot-5m** mit **DNA0**.

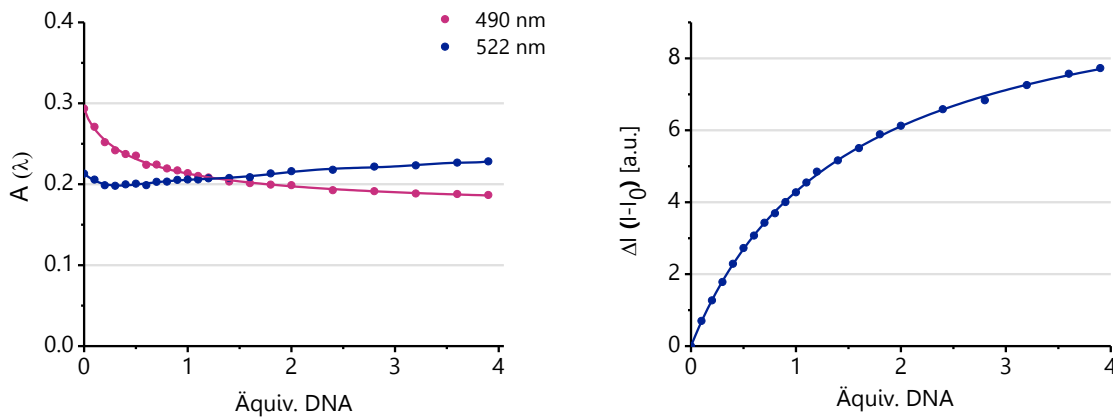


Abbildung 202: Titrationsverlauf von **Rot-5m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 490$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 522$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 602$ nm).

Rot-6:

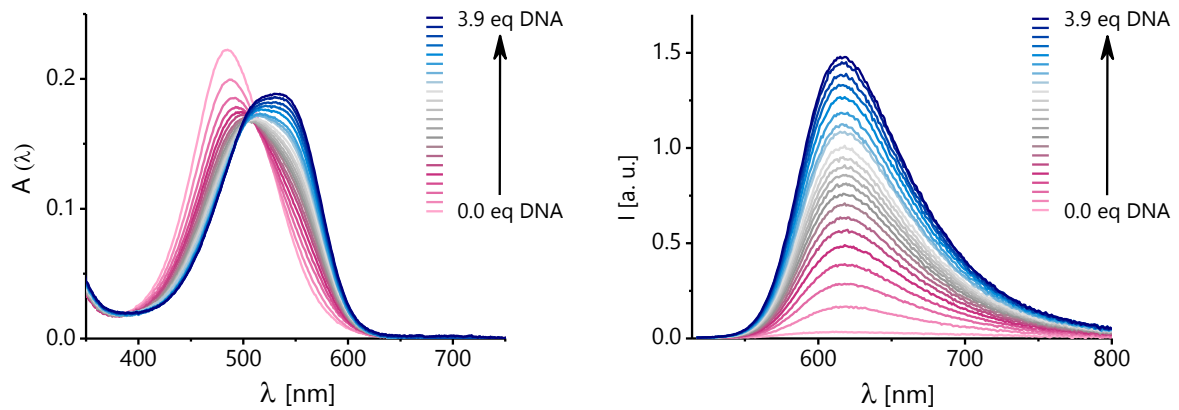


Abbildung 203: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 485 \text{ nm} - 535 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 50 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 499 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 616 \text{ nm}$) der Titration von **Rot-6** mit **DNA0**.

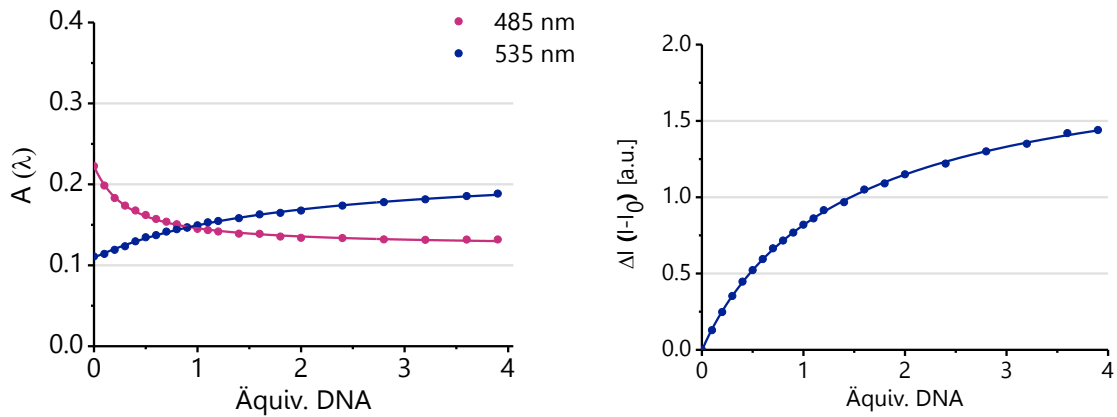


Abbildung 204: Titrationsverlauf von **Rot-6** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 485 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 535 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 616 \text{ nm}$).

Rot-6m:

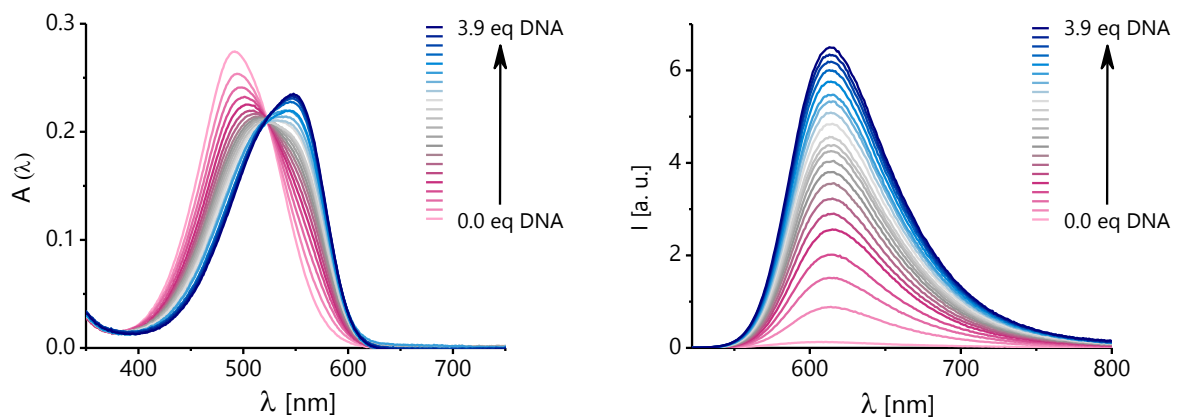


Abbildung 205: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 492 \text{ nm} - 548 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 56 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 507 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 614 \text{ nm}$) der Titration von **Rot-6m** mit **DNA0**.

Charakterisierung der Cyaninfarbstoffe

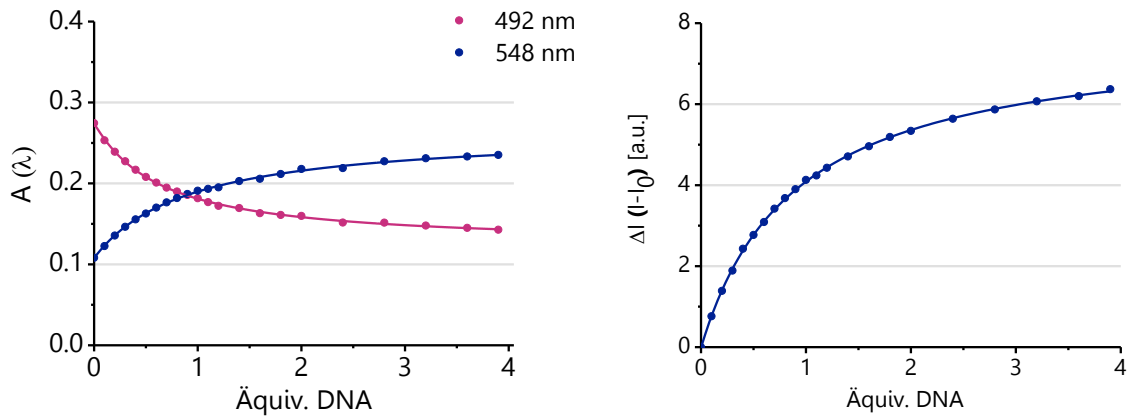


Abbildung 206: Titrationsverlauf von **Rot-6m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 492$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 548$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 614$ nm).

Rot-7m:

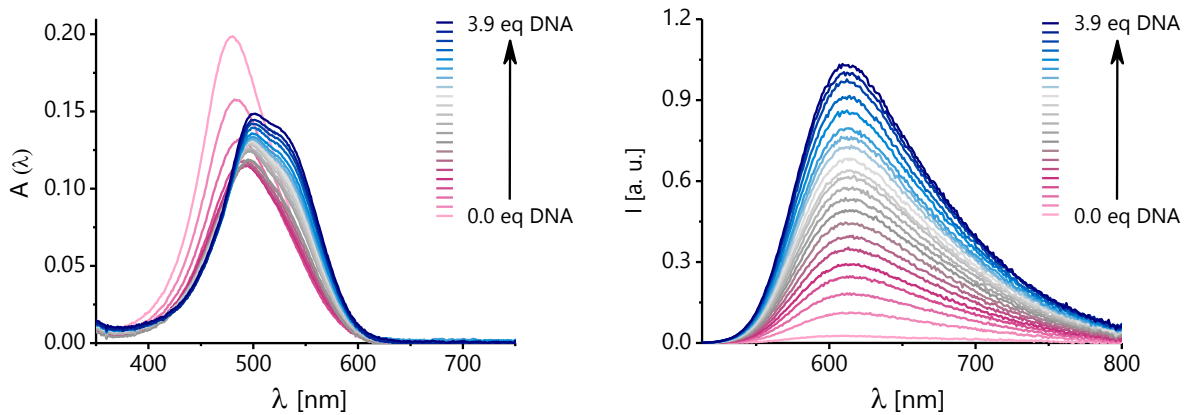


Abbildung 207: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 480$ nm – 525 nm, $\Delta\lambda = 45$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 498$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 612$ nm) der Titration von **Rot-7m** mit **DNA0**.

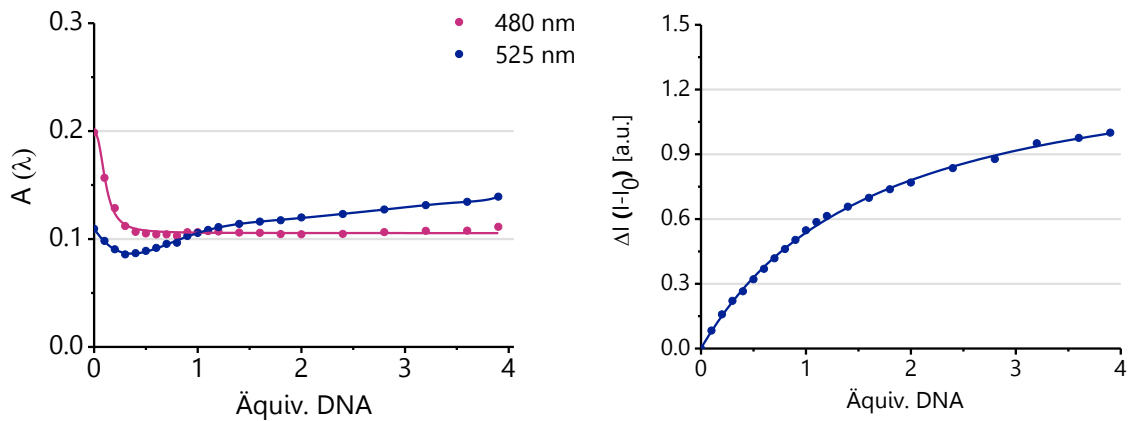


Abbildung 208: Titrationsverlauf von **Rot-7m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 480$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 525$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 612$ nm).

TR:

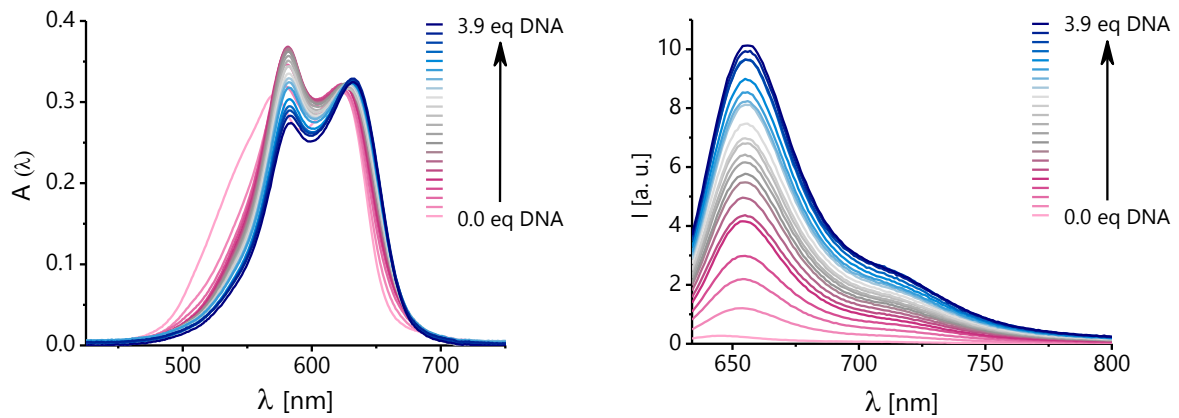


Abbildung 209: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 621 \text{ nm} - 633 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 12 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 624 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 655 \text{ nm}$) der Titration von **TR** mit **DNA0**.

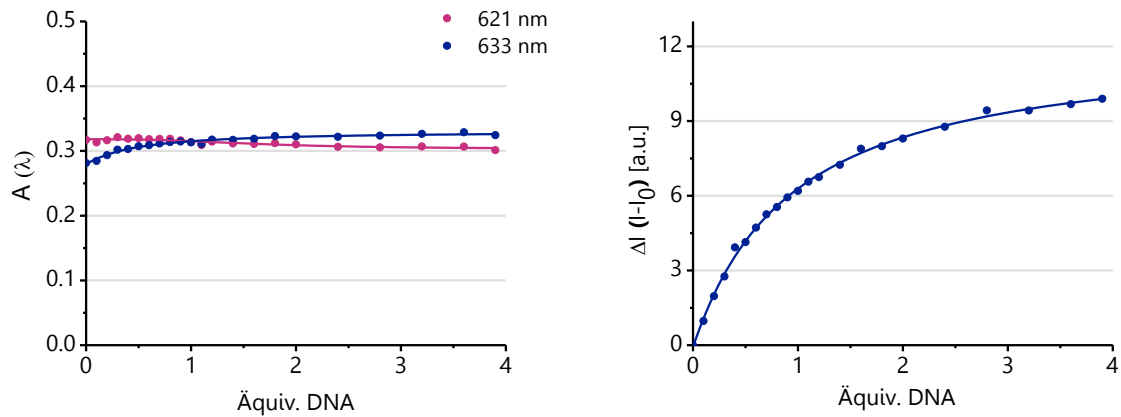


Abbildung 210: Titrationsverlauf von **TR** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 621 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 633 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 655 \text{ nm}$).

Blau-1m:

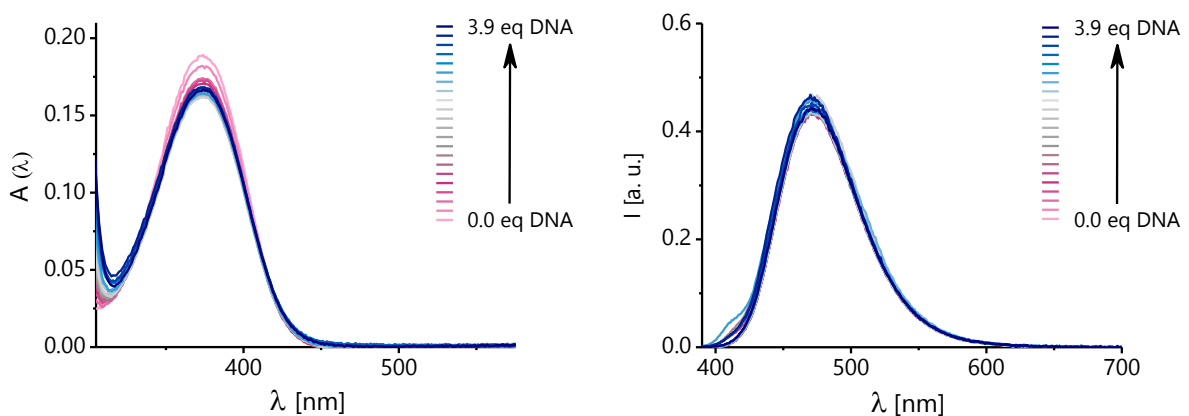


Abbildung 211: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 374 \text{ nm}$, kein λ_{shift}) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 471 \text{ nm}$) der Titration von **Blau-1m** mit **DNA0**.

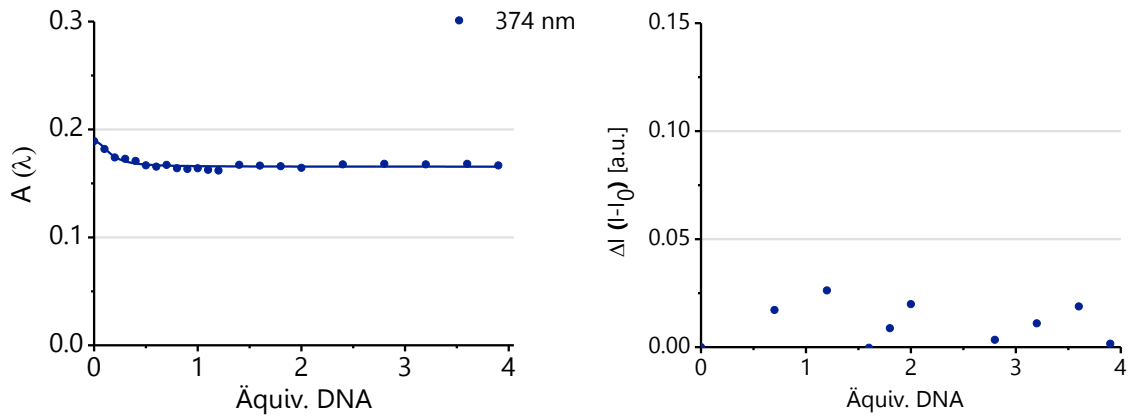


Abbildung 212: Titrationsverlauf von **Blau-1m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 374 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 471 \text{ nm}$).

Grün-1:

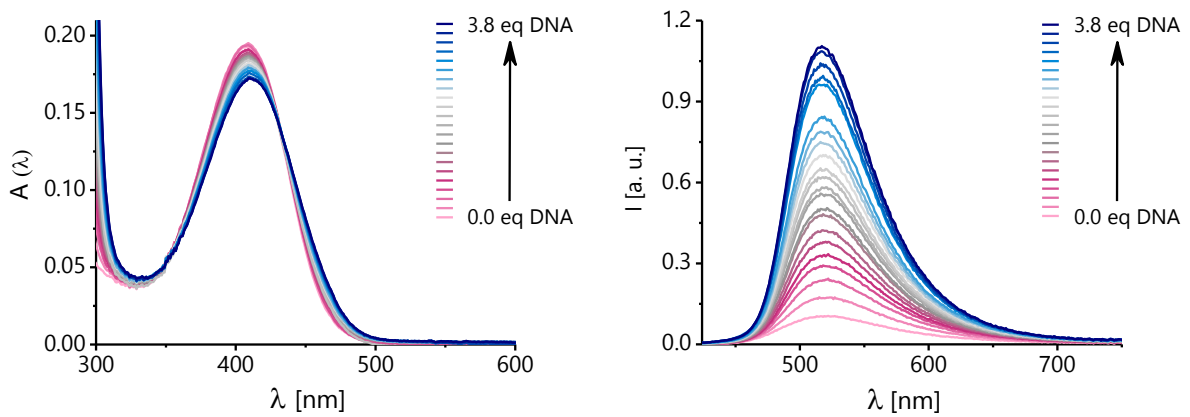


Abbildung 213: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 409 \text{ nm} - 410 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 409 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 517 \text{ nm}$) der Titration von **Grün-1** mit **DNA0**.

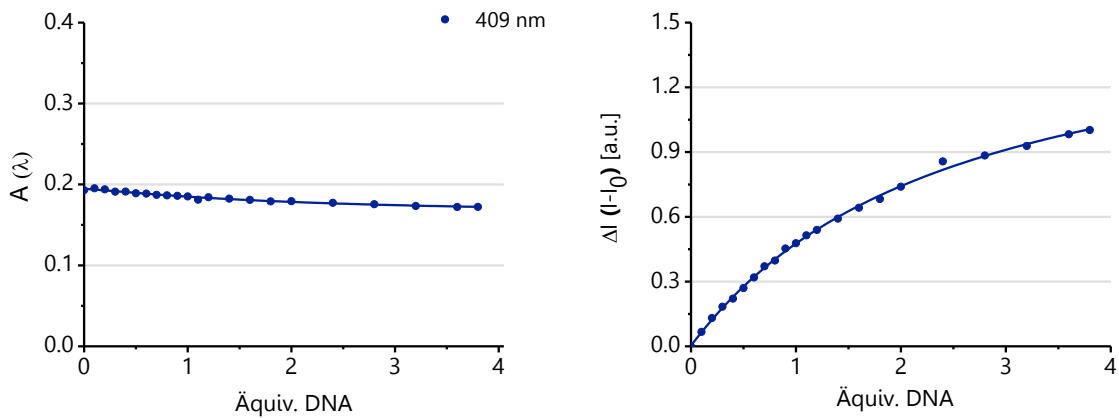


Abbildung 214: Titrationsverlauf von **Grün-1** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 409 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 517 \text{ nm}$).

Grün-1m:

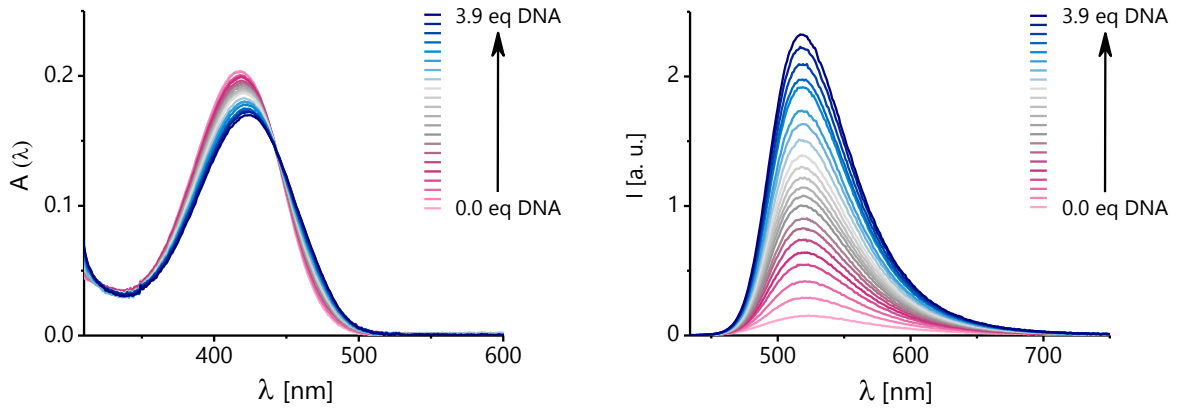


Abbildung 215: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 418 \text{ nm} - 426 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 8 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 419 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 518 \text{ nm}$) der Titration von **Grün-1m** mit **DNA0**.

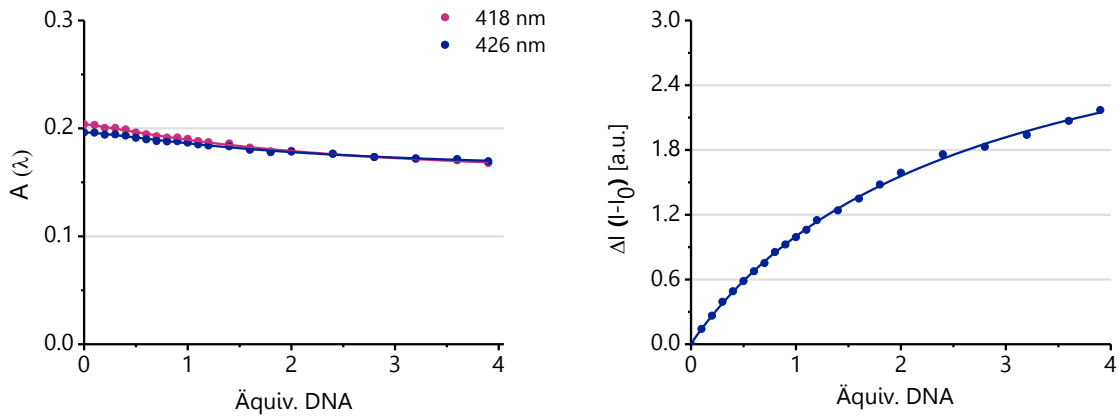


Abbildung 216: Titrationsverlauf von **Grün-1m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 418 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 426 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 518 \text{ nm}$).

Grün-2:

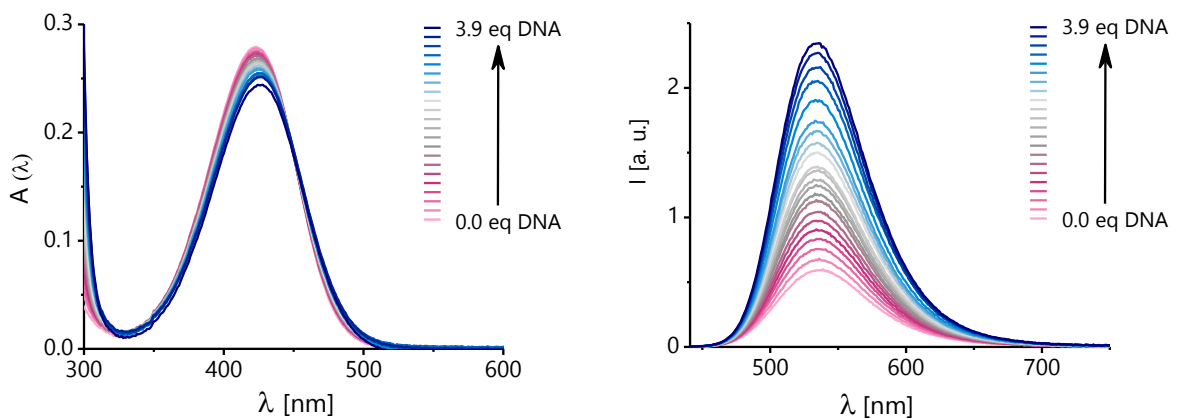


Abbildung 217: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 423 \text{ nm} - 426 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 3 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 535 \text{ nm}$) der Titration von **Grün-2** mit **DNA0**.

Charakterisierung der Cyaninfarbstoffe

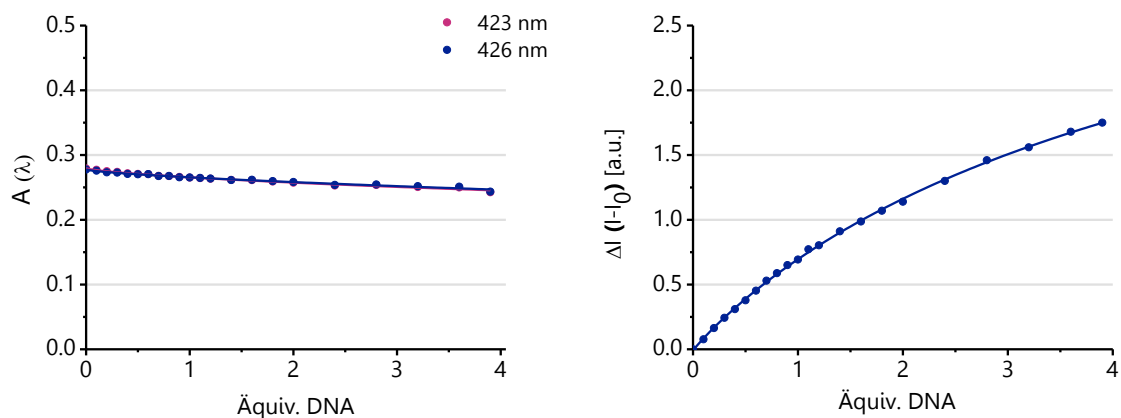


Abbildung 218: Titrationsverlauf von **Grün-2** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 423$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 426$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 535$ nm).

Grün-2m:

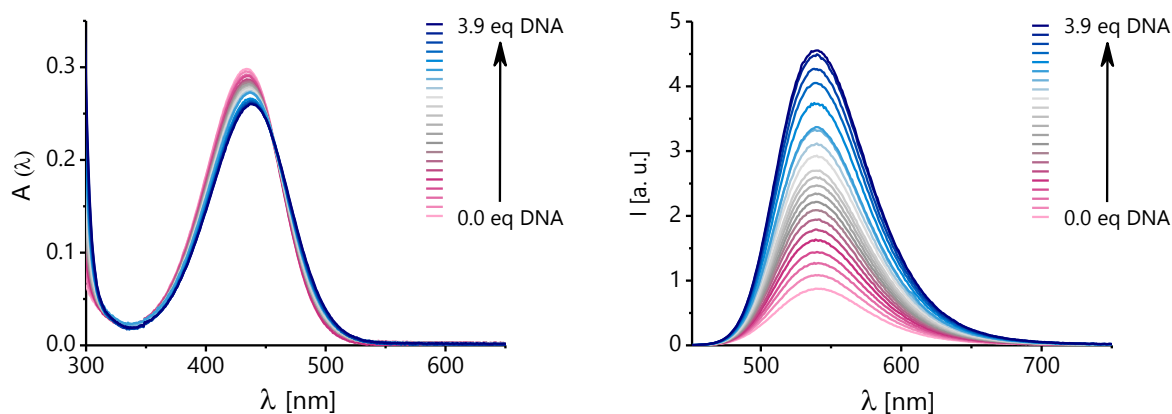


Abbildung 219: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 434$ nm – 438 nm, $\Delta\lambda = 4$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 436$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 540$ nm) der Titration von **Grün-2m** mit **DNA0**.

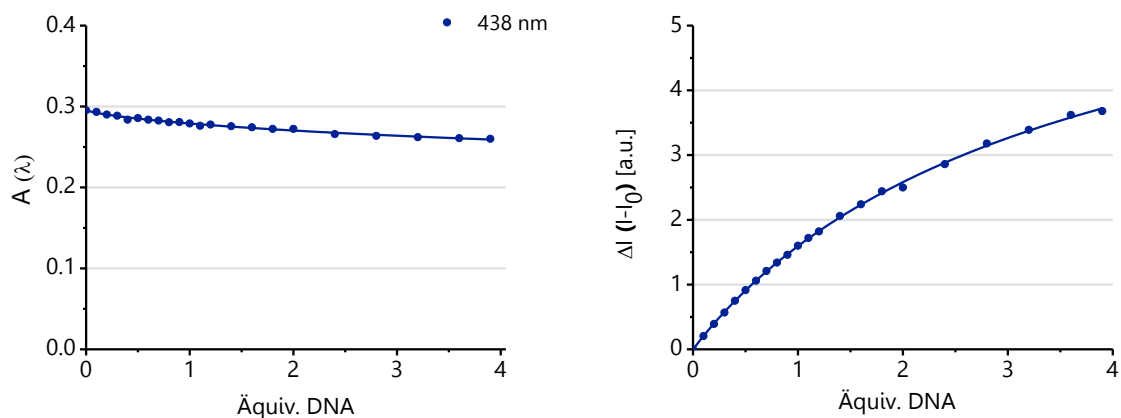


Abbildung 220: Titrationsverlauf von **Grün-2m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 438$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 540$ nm).

Grün-3:

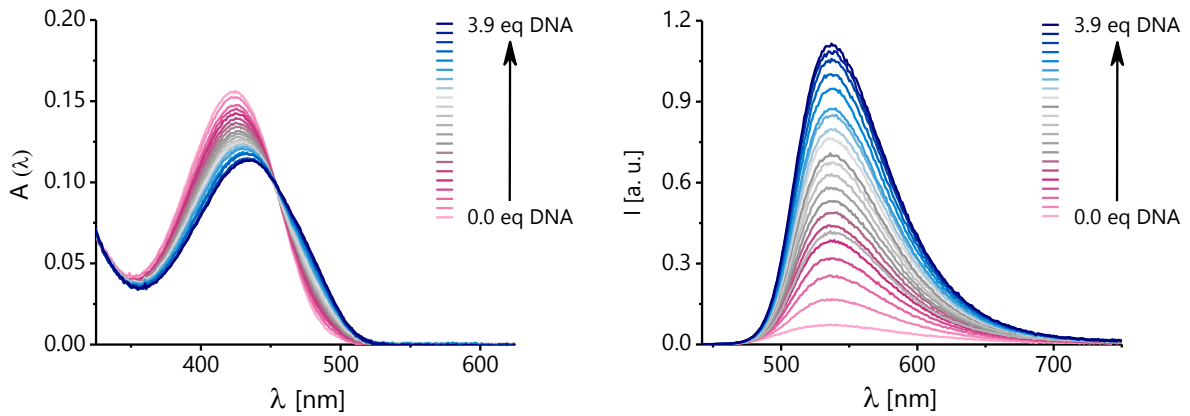


Abbildung 221: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 424 \text{ nm} - 436 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 12 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 427 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 536 \text{ nm}$) der Titration von **Grün-3** mit **DNA0**.

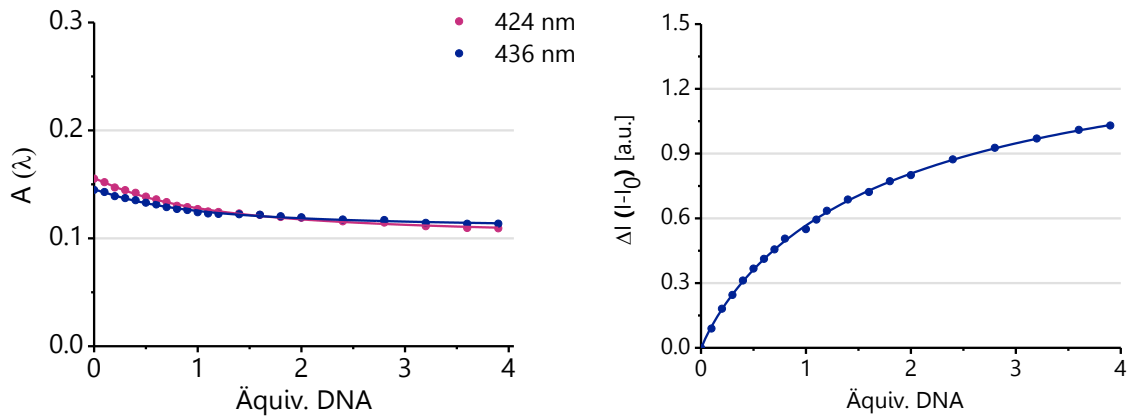


Abbildung 222: Titrationsverlauf von **Grün-3** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 424 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 436 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 536 \text{ nm}$).

Grün-3m:

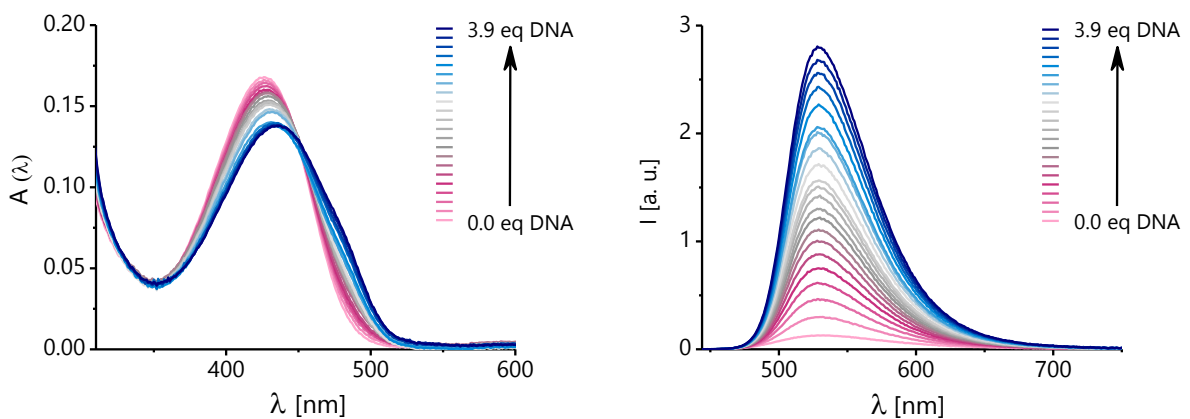


Abbildung 223: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 426 \text{ nm} - 436 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 429 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 529 \text{ nm}$) der Titration von **Grün-3m** mit **DNA0**.

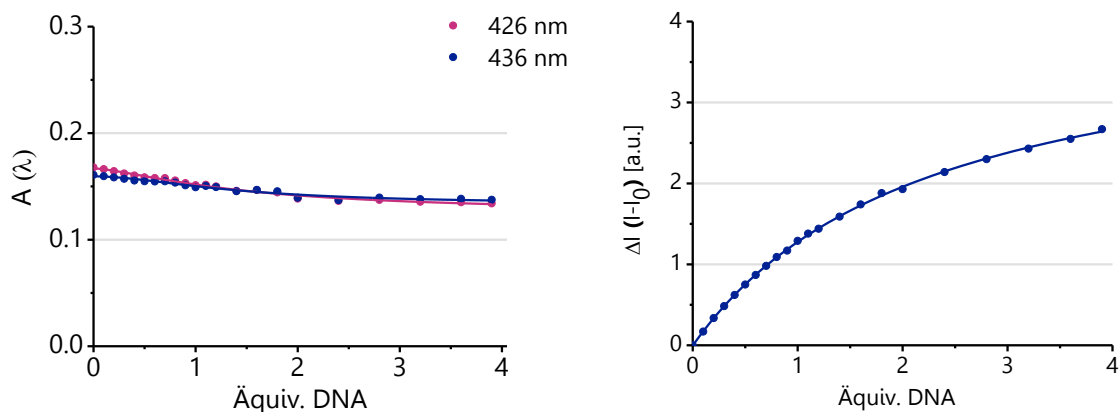


Abbildung 224: Titrationsverlauf von **Grün-3m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 426$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 436$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 529$ nm).

Grün-4:

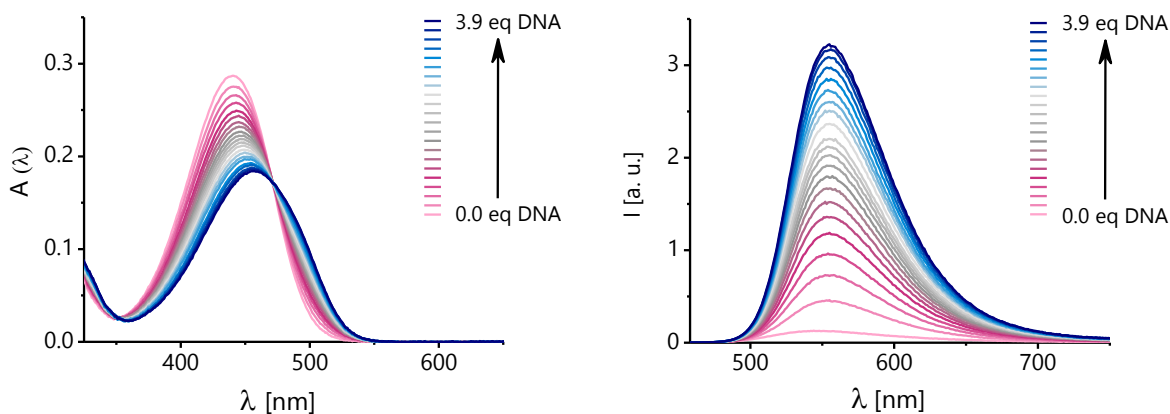


Abbildung 225: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 440$ nm – 457 nm, $\Delta\lambda = 17$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 443$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 555$ nm) der Titration von **Grün-4** mit **DNA0**.

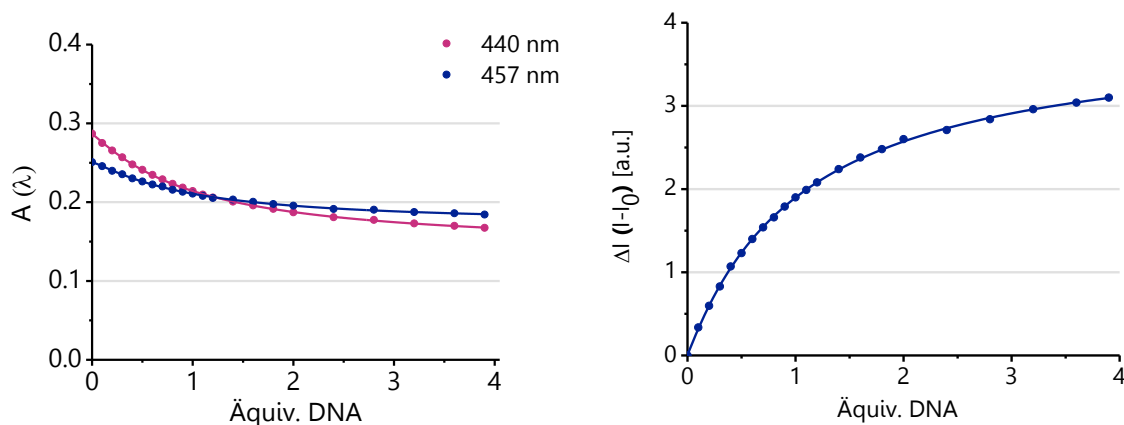


Abbildung 226: Titrationsverlauf von **Grün-4** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 440$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 457$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 555$ nm).

Grün-4m:

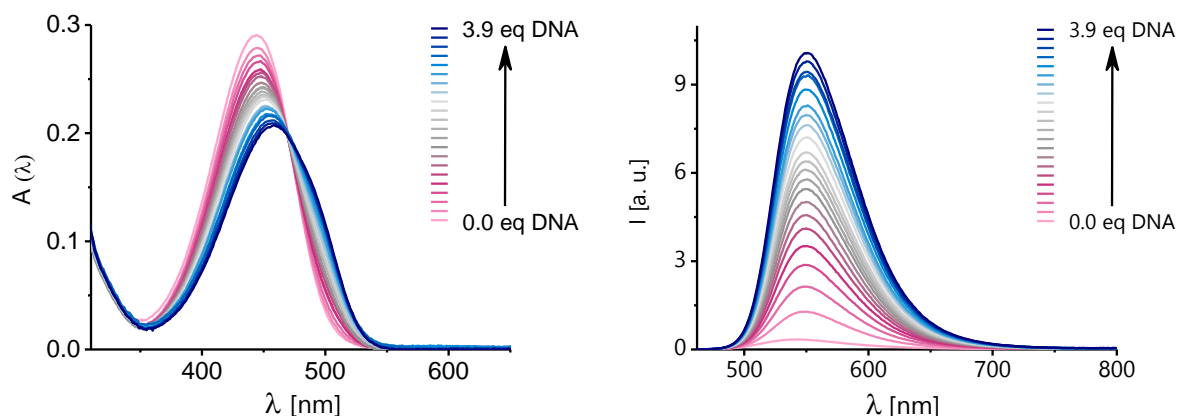


Abbildung 227: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 444 \text{ nm} - 459 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 447 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 550 \text{ nm}$) der Titration von **Grün-4m** mit **DNA0**.

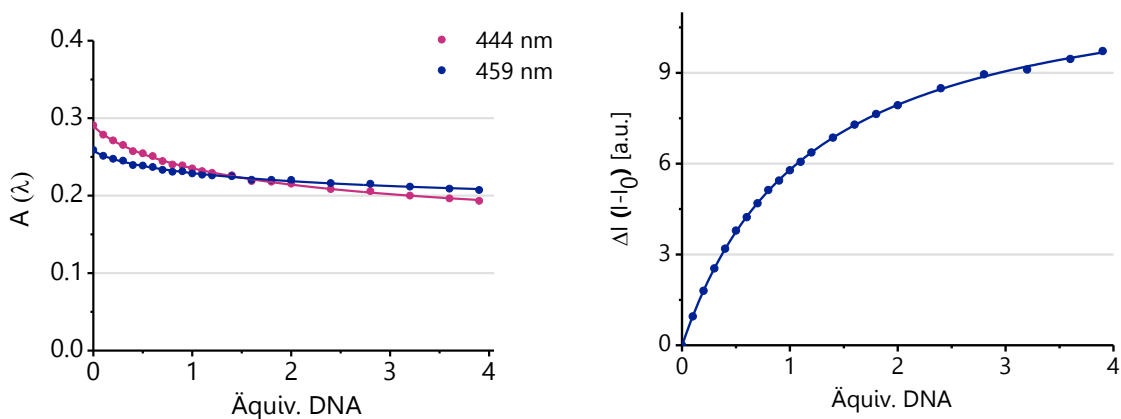


Abbildung 228: Titrationsverlauf von **Grün-4m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 444 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 459 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 550 \text{ nm}$).

TO:

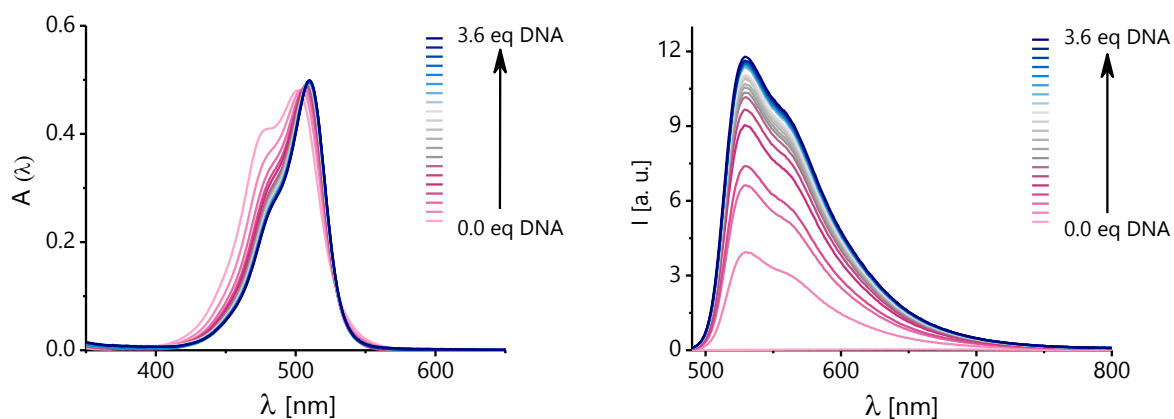


Abbildung 229: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 502 \text{ nm} - 510 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 8 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 530 \text{ nm}$) der Titration von **TO** mit **DNA0**.

Charakterisierung der Cyaninfarbstoffe

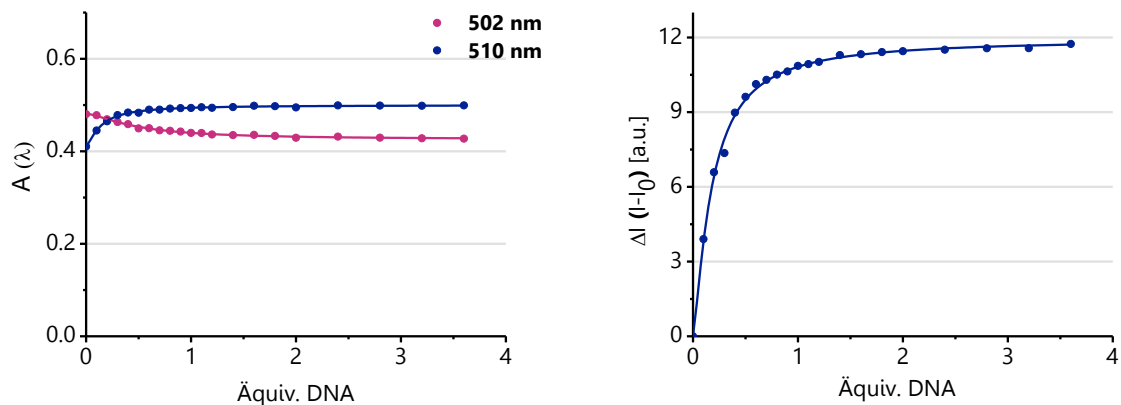


Abbildung 230: Titrationsverlauf von **TO** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 502 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 510 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 530 \text{ nm}$).

TO-CN:

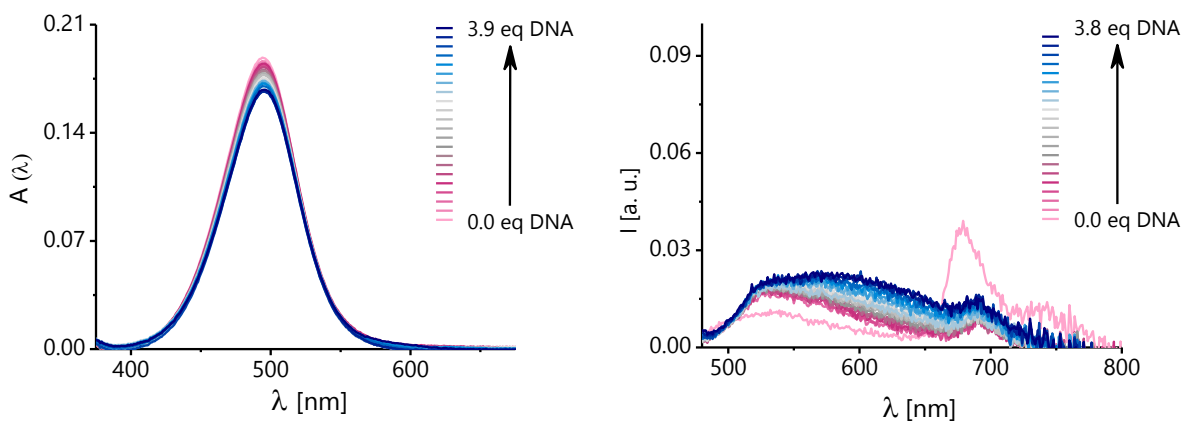


Abbildung 231: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 495 \text{ nm}$, kein λ_{shift}) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 530 \text{ nm}$) der Titration von **TO-CN** mit **DNA0**.

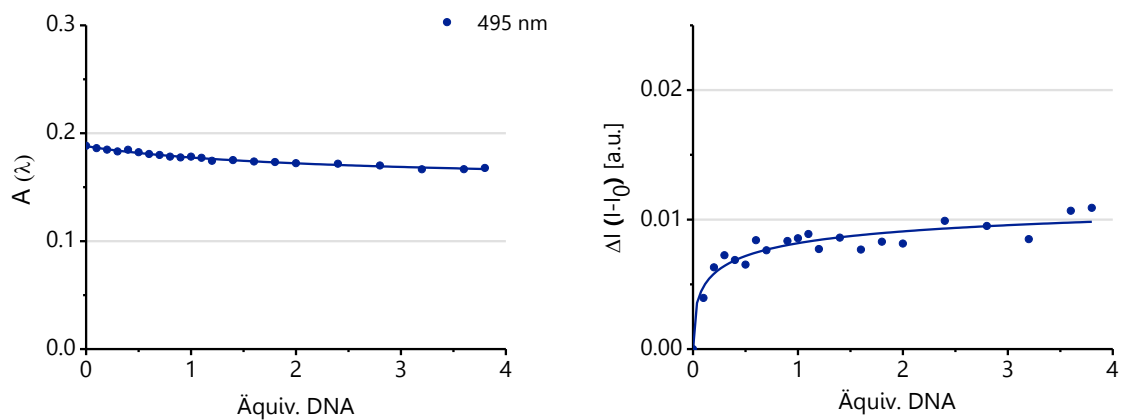


Abbildung 232: Titrationsverlauf von **TO-CN** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 495 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 530 \text{ nm}$).

CyIQ:

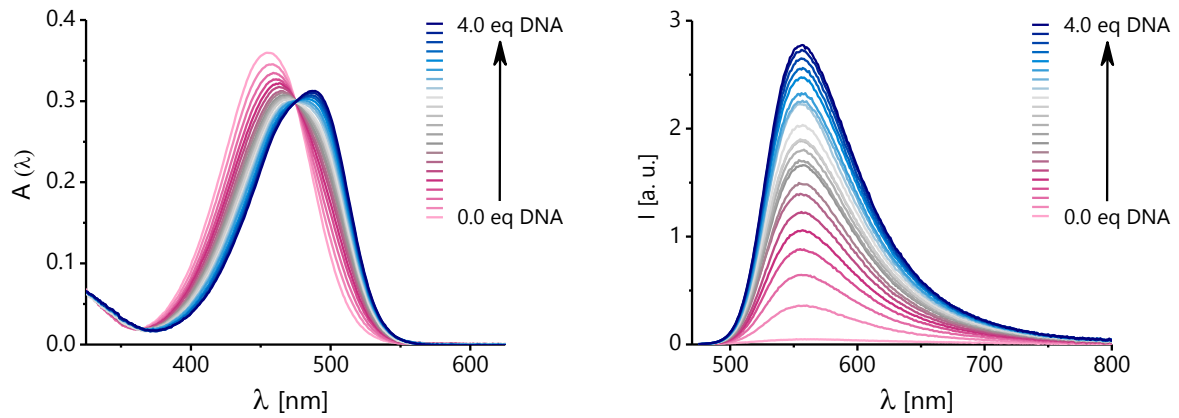


Abbildung 233: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs,max.}} = 455 \text{ nm} - 489 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 34 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max.}} = 556 \text{ nm}$) der Titration von **CyIQ** mit **DNA0**.

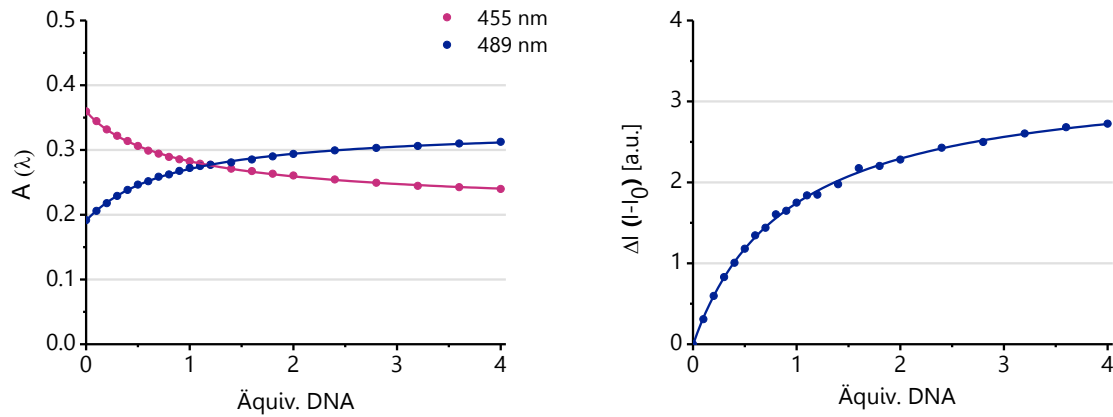


Abbildung 234: Titrationsverlauf von **CyIQ** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs,max.ohne}} = 455 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs,max.mit}} = 489 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em,max.}} = 556 \text{ nm}$).

Gelb-1m:

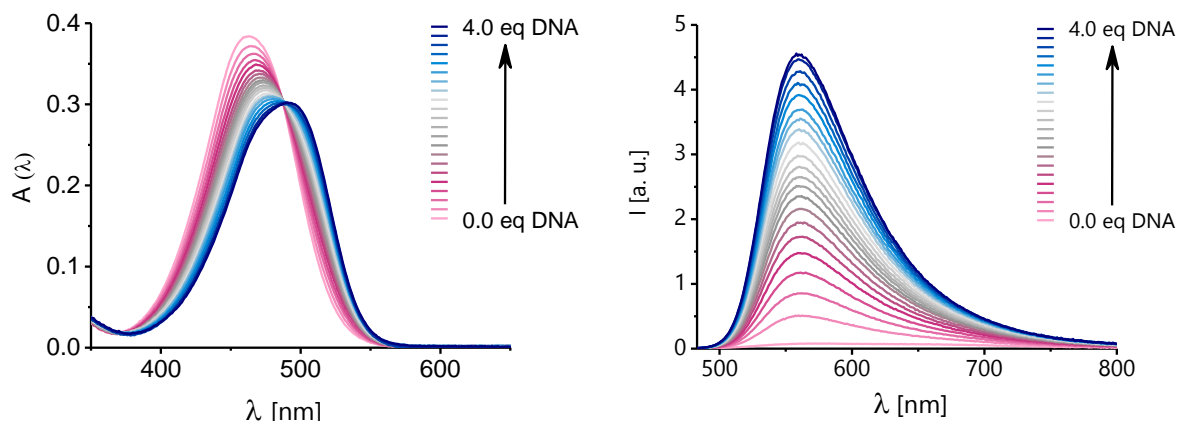


Abbildung 235: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs,max.}} = 463 \text{ nm} - 493 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 30 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 467 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max.}} = 560 \text{ nm}$) der Titration von **Gelb-1m** mit **DNA0**.

Charakterisierung der Cyaninfarbstoffe

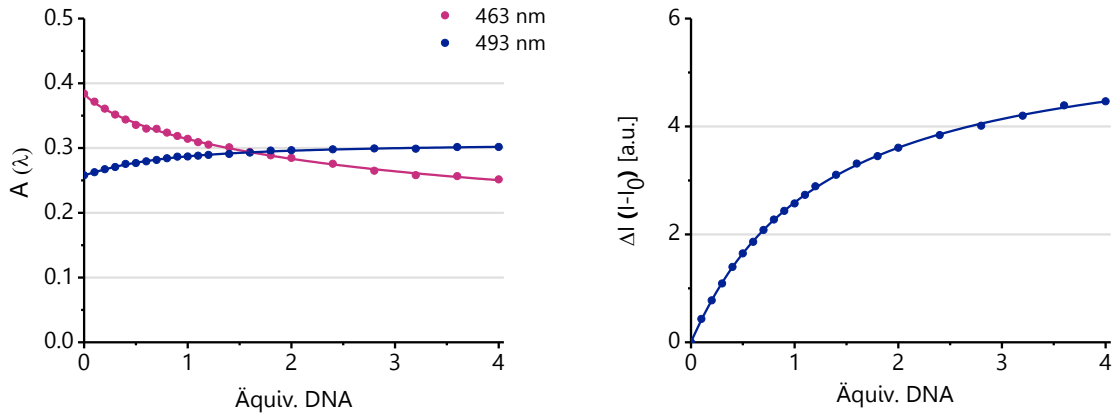


Abbildung 236: Titrationsverlauf von **Gelb-1m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 463$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 493$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 560$ nm).

Gelb-2:

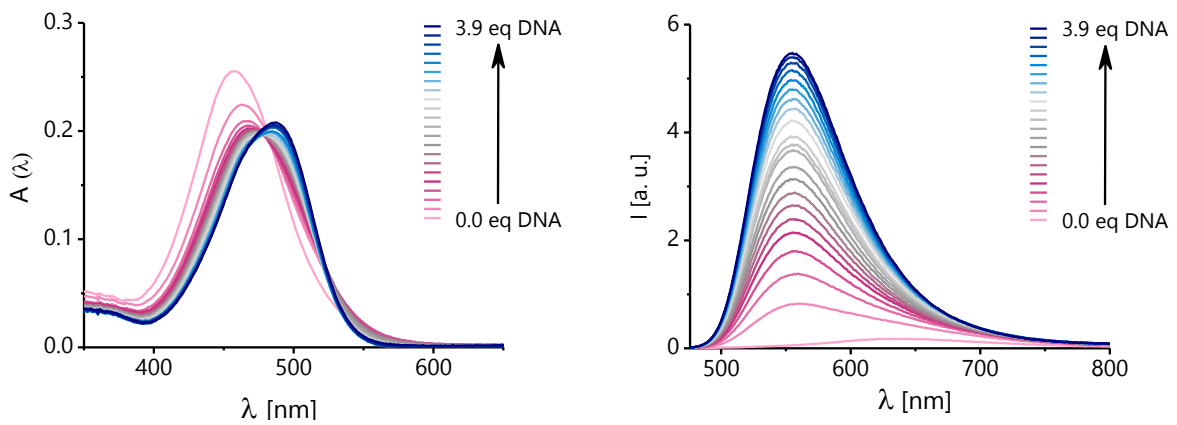


Abbildung 237: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 458$ nm – 487 nm, $\Delta\lambda = 29$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 461$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 555$ nm) der Titration von **Gelb-2** mit **DNA0**.

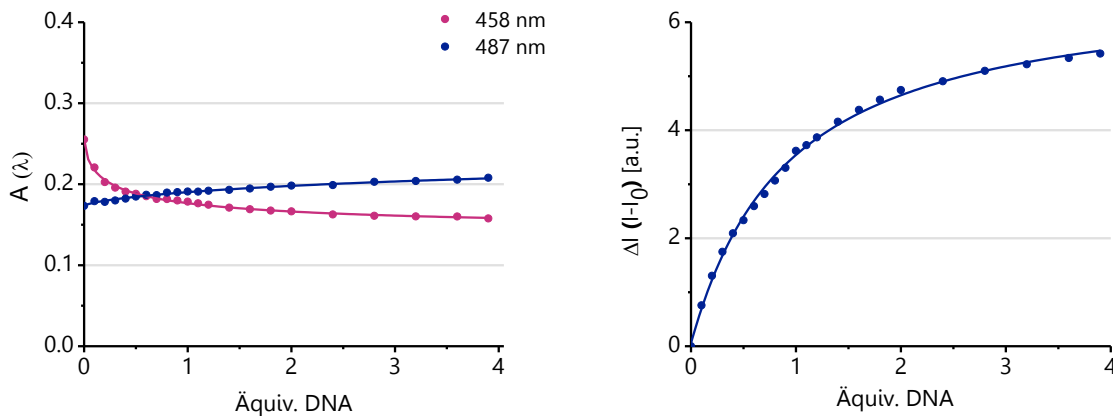


Abbildung 238: Titrationsverlauf von **Gelb-2** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 458$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 487$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 555$ nm).

Gelb-3:

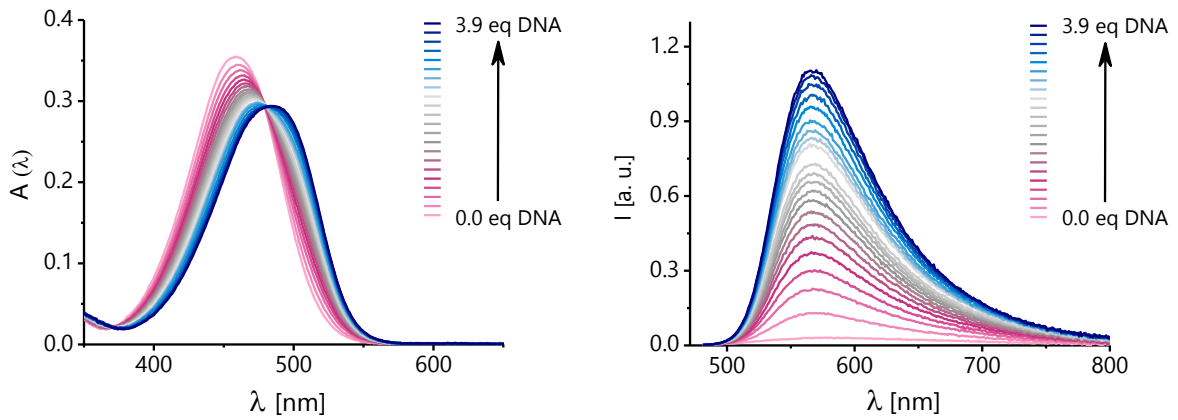


Abbildung 239: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 458 \text{ nm} - 486 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 28 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 466 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 568 \text{ nm}$) der Titration von **Gelb-3** mit **DNA0**.

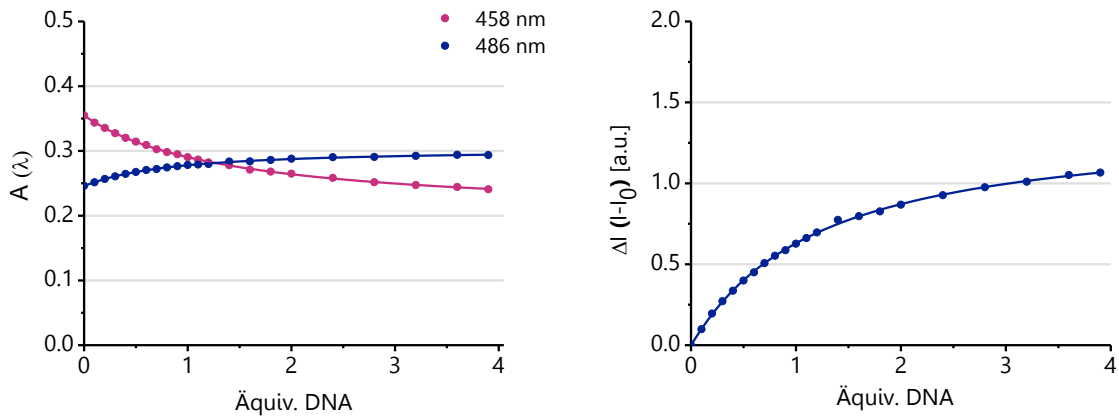


Abbildung 240: Titrationsverlauf von **Gelb-3** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 458 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 486 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 568 \text{ nm}$).

Gelb-4:

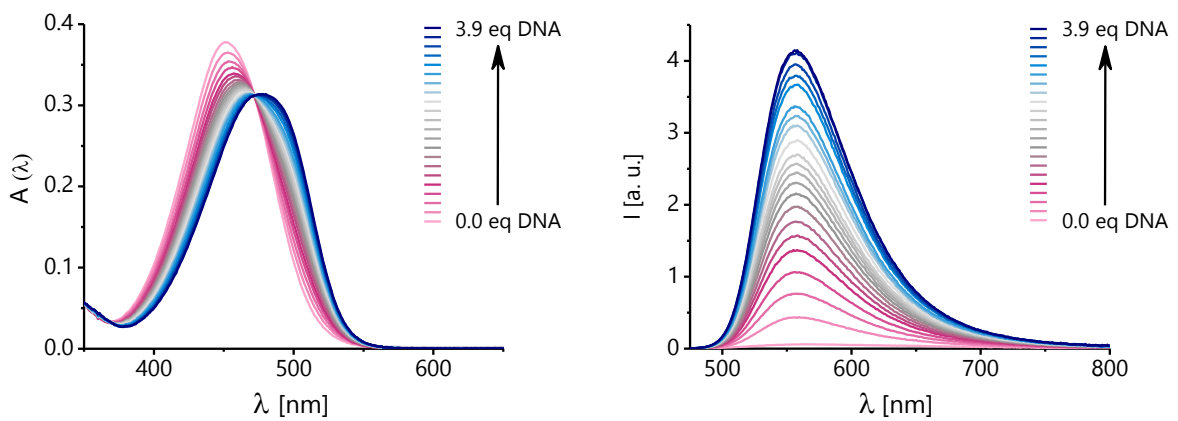


Abbildung 241: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 451 \text{ nm} - 480 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 29 \text{ nm}$) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.max.}} = 558 \text{ nm}$) der Titration von **Gelb-4** mit **DNA0**.

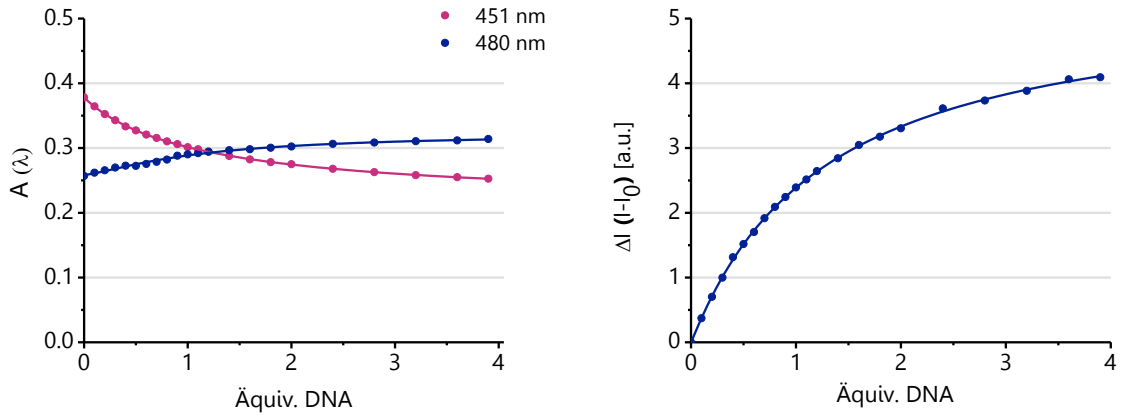


Abbildung 242: Titrationsverlauf von **Gelb-4** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 451$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 480$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 558$ nm).

Gelb-4m:

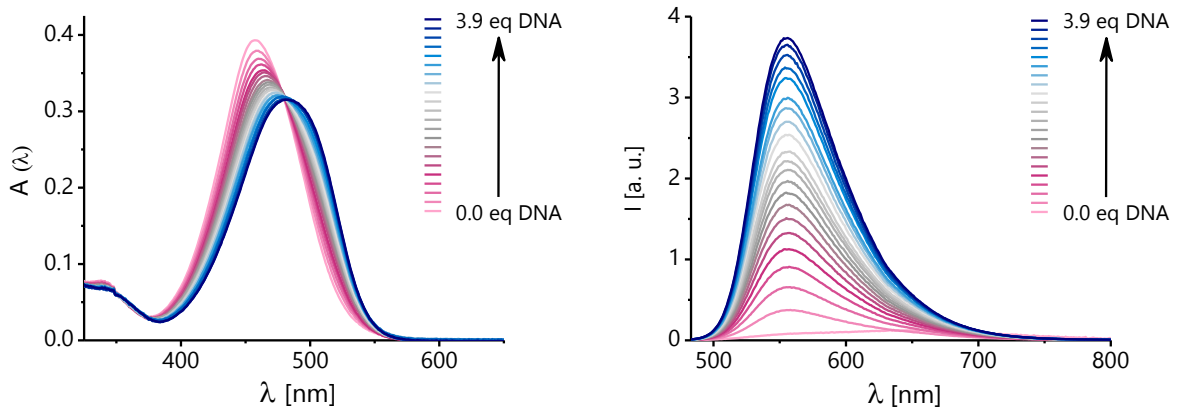


Abbildung 243: links: Absorptionsspektren ($\lambda_{\text{abs.max.}} = 457$ nm – 481 nm, $\Delta\lambda = 24$ nm) und rechts: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 468$ nm, $\lambda_{\text{em.max.}} = 556$ nm) der Titration von **Gelb-4m** mit **DNA0**.

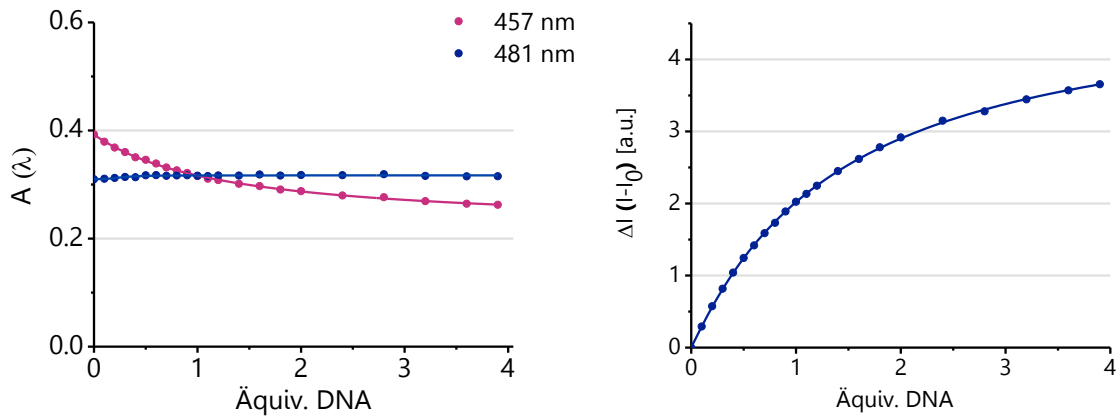
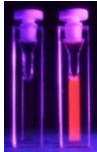
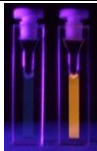
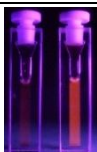

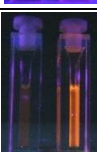


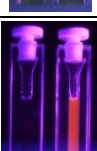



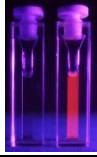


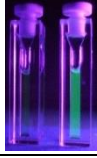


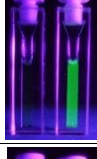
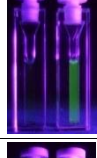
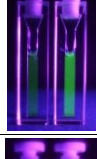
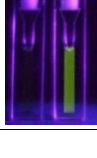
Abbildung 244: Titrationsverlauf von **Gelb-4m** mit **DNA0**; links: Absorbanz ($\lambda_{\text{abs.max.ohne}} = 457$ nm bzw. $\lambda_{\text{abs.max.mit}} = 481$ nm) und rechts: Fluoreszenzintensitätsänderung ($\lambda_{\text{em.max.}} = 556$ nm).

Titrationdaten

Diese Tabelle erstreckt sich über drei Seiten!

Farbstoff	ohne DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.ohne}}$ [nm]	mit 4 eq DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.mit}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.max.}}$ [nm]	λ_{Stokes} [nm]	ΔI	Probelösung ohne / mit 4 eq DNA0
TR-CN	521	554	615	61	10.1	
Rot-1	500	531	581	50	12.1	
Rot-2e	449	473	625	152	1.3	
Rot-3e	464	501	632	131	3.3	
Rot-4	473	509	590	81	5.7	
Rot-4m	482	521	596	75	9.1	
Rot-5	480	515	598	83	4.0	
Rot-5m	490	522	602	80	7.7	
Rot-6	485	535	616	81	1.4	

Charakterisierung der Cyaninfarbstoffe

Farbstoff	ohne DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.ohne}}$ [nm]	mit 4 eq DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.mit}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.max.}}$ [nm]	λ_{Stokes} [nm]	ΔI	Probelösung ohne / mit 4 eq DNA0
Rot-6m	492	548	614	66	6.4	
Rot-7m	480	525	612	87	1.0	
TR	621	633	655	22	9.9	-
Blau-1m	374	374	471	97	0.02	
Grün-1	409	409	517	108	1.0	
Grün-1m	418	426	518	92	2.2	
Grün-2	423	426	535	109	1.8	
Grün-2m	434	438	540	102	3.7	
Grün-3	424	436	536	100	1.0	
Grün-3m	426	436	529	93	2.7	
Grün-4	440	457	555	98	3.1	



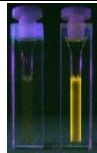
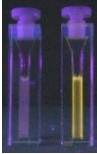
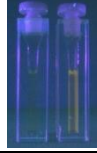

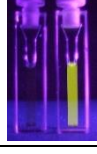
Farbstoff	ohne DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.ohne}}$ [nm]	mit 4 eq DNA0 $\lambda_{\text{abs.max.mit}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.max.}}$ [nm]	λ_{Stokes} [nm]	ΔI	Probelösung ohne / mit 4 eq DNA0
Grün-4m	444	459	550	91	9.7	
TO	502	510	530	20	11.7	-
TO-CN	495	495	530	35	0.1	
CylQ	455	489	556	67	2.7	-
Gelb-1m	463	493	560	67	4.5	
Gelb-2	458	487	555	68	5.4	
Gelb-3	458	486	568	82	1.1	
Gelb-4	451	480	558	78	4.1	
Gelb-4m	457	481	556	75	3.7	

Tabelle 13: Übersicht der spektroskopischen Daten aus den Fluoreszenz-Titrationsen der Cyanin-Farbstoffe mit **DNA0**. Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine Lösung mit 10 μM Farbstoff, 40 μM **DNA0**, 10 mM NaP_i (pH = 7), 250 mM NaCl und 2 % Ethanol.

Anstieg der Fluoreszenzintensität ΔI

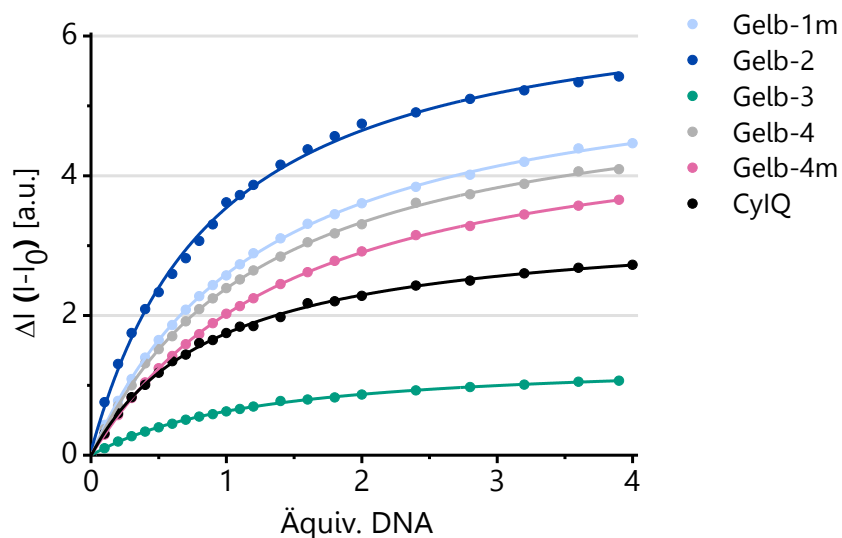


Abbildung 245: Vergleich der Intensitätszunahmen ΔI im Zuge des Titrationsfortschrittes der gelb-fluoreszierenden Fluorophore.

372

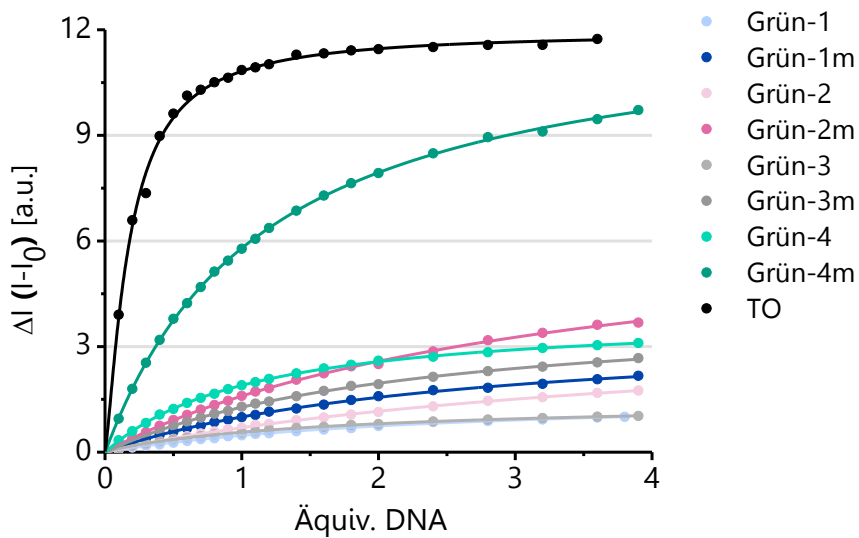


Abbildung 246: Vergleich der Intensitätszunahmen ΔI im Zuge des Titrationsfortschrittes der grün-fluoreszierenden Fluorophore.

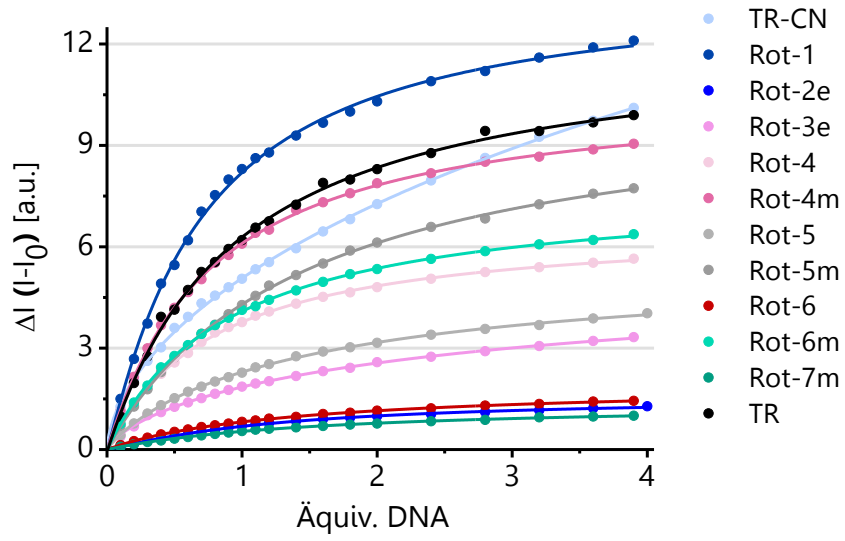


Abbildung 247: Vergleich der Intensitätszunahmen ΔI im Zuge des Titrationsfortschrittes der rot-fluoreszierenden Fluorophore.

Fluoreszenz-Quantenausbeuten in Gegenwart von DNA0

Im Rahmen der ersten Evaluation aller neuen Fluorophore, wurde die Quantenausbeute der einzelnen Cyanine in Gegenwart von 4.0 Äquivalenten an **DNA0** bestimmt. Hierfür wurde eine 10 μM Farbstofflösung (in 10 mM NaP_i (pH = 7), 250 mM NaCl und 2 % Ethanol) in Anwesenheit von 40 μM **DNA0** analysiert. Die Anregungswellenlänge wurde entsprechend den Fluoreszenztitrationsdaten an das Absorptionsmaximum in DNA-Gegenwart angepasst. Die nachfolgende Tabelle präsentiert die Werte der mittels angelagerten Fluorophoren erfassten Quantenausbeuten.

Farbstoff	$\Phi_{\text{F.angel.}}$ [%]
Blau-1m	1.0
Grün-1	1.2
Grün-1m	2.4
Grün-2	1.9
Grün-2m	4.6
Grün-3	2.3
Grün-3m	4.1
Grün-4	5.8
Grün-4m	13.7
TO	16.5
TO-CN	nicht bestimmt
CylQ	4.4
Gelb-1m	6.6
Gelb-2	17.0
Gelb-3	1.5
Gelb-4	5.7
Gelb-4m	5.8

Farbstoff	$\Phi_{\text{F.angel.}}$ [%]
TR-CN	32.9
Rot-1	35.5
Rot-2e	6.1
Rot-3e	12.5
Rot-4	12.8
Rot-4m	17.6
Rot-5	12.7
Rot-5m	15.3
Rot-6	5.2
Rot-6m	18.8
Rot-7m	3.6
TR	11.6

Tabelle 14: Übersicht der Quantenausbeuten von den an **DNA0** angelagerten Fluorophoren.

Extinktionskoeffizienten ϵ der neuen Fluorophore

Zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten bei 260 nm sowie dem jeweiligen Absorptionsmaximum der Farbstoffe, wurden 10 Farbstofflösungen variierender Konzentration hergestellt. Es wurden pro Farbstoff 5 Stammlösungen hergestellt, deren Konzentrationen zwischen 10 und 60 $\mu\text{mol/L}$ lagen. Hierfür wurden die benötigten Substanzmengen der Farbstoffe in je einen 50 mL-Messkolben eingewogen und 5 mL Ethanol (99,8 %) zugegeben. Um eine vollständige Lösung der Farbstoffe zu gewährleisten, wurden die Lösungen 15 min im Ultraschallbad behandelt, und erst im Anschluss mit Wasser (HPLC-rein) zu 50 mL verdünnt (Ethanolanteil = 10 %). Diese fünf Stammlösungen wurden mit 10%igem Ethanol jeweils 1 : 10 verdünnt.

Von sämtlichen hergestellten Farbstofflösungen wurde ein Absorptionsspektrum von 200 bis 800 nm bei 20 °C aufgezeichnet. Zur Berechnung der Extinktionskoeffizienten, mit Hilfe des *Lambert-Beer'schen* Gesetzes (Gleichung 8.3.1), wurden ausschließlich Werte der Absorbanz kleiner 1 verwendet. Die entsprechenden Absorbanzen wurden in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgerade entspricht dem Extinktionskoeffizient.

$$A(\lambda) = \log \left(\frac{I(T)}{I(0)} \right) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (8.1)$$

$A(\lambda)$: Absorbanz des Farbstoffes bei der Wellenlänge λ

$I(T)$: Intensität des transmittierten Lichtes

$I(0)$: Intensität des eingestrahnten Lichtes

$\epsilon(\lambda)$: molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
[L/mol*cm]

c : Stoffmengenkonzentration [mol/L]

d : Schichtdicke der durchstrahlten Probe [cm]

Übersicht der Extinktionskoeffizienten:

Farbstoff	$\lambda_{\text{abs.max.}}$ [nm]	$\epsilon(\lambda)$ [L/mol*cm]		Farbton der Fluoreszenz
		bei $\lambda_{\text{abs.max.}}$	bei 260 nm	
Blau-1m	375	19200	10580	blau
Grün-1	409	19400		grün
Grün-1m	426	28400		
Grün-2	419	24800	8430	
Grün-2m	436	30000	10150	
Grün-3	427	16400		
Grün-3m	443	28600		
Grün-4	429	16600	8430	
Grün-4m	447	30100		
TO	502	27000		
TO-CN	495	16600		
CylQ	461	42400	9830	gelb
Gelb-1m	470	42700	8450	
Gelb-2	461	37700		
Gelb-3	466	38000		
Gelb-4	460	39400		
Gelb-4m	468	39300	9040	
TR-CN	538	13000	2980	rot
Rot-1	510	38400		
Rot-2e	455	35700		
Rot-3e	468	26100	17300	
Rot-4	480	30800		
Rot-4m	494	30800	8570	
Rot-5	486	27500		
Rot-5m	501	35700	8580	
Rot-6	499	27600		
Rot-6m	507	31100	13070	
Rot-7m	498	32300		
TR	624	15000		

Tabelle 15: Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe bei ihrem jeweiligen Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{abs.max}}$ und bei 260 nm (für ausgewählte Cyanine). Die angegebenen Werte beziehen sich auf Farbstofflösungen in 10 % Ethanol.

8.5 Charakterisierung einfach modifizierter DNA

Optimierung der CuAAC-Methode

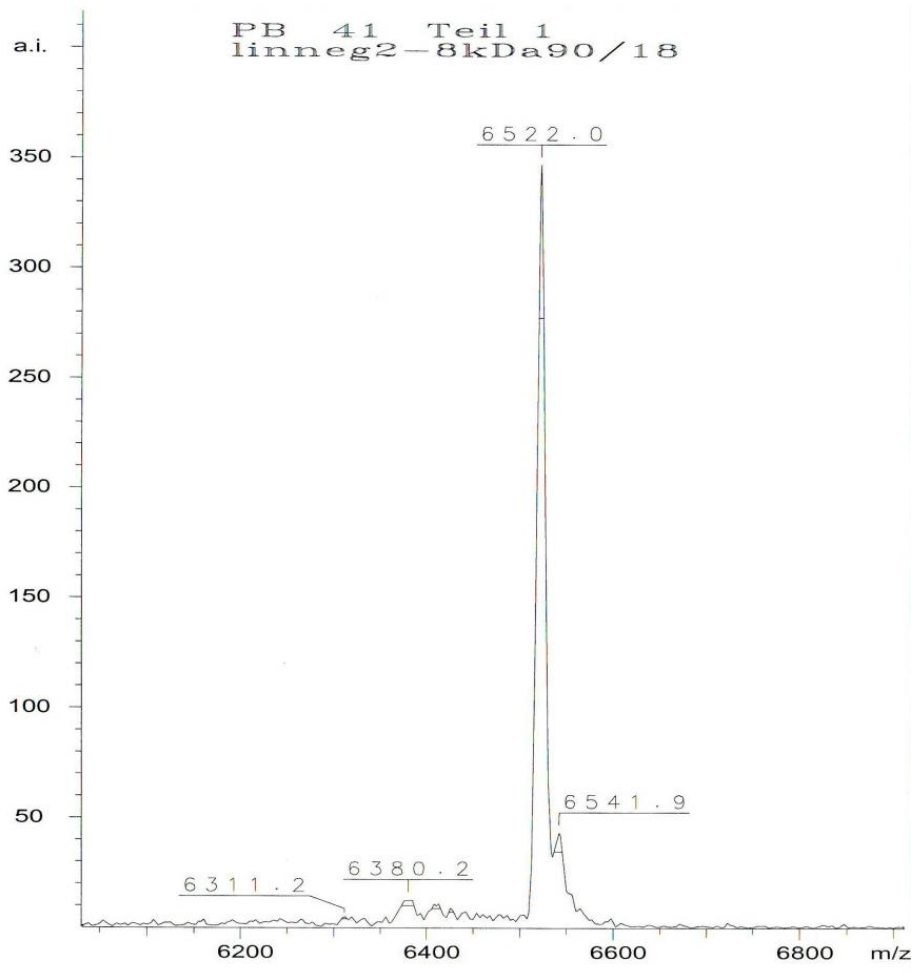


Abbildung 248: MALDI-Spektrum eines **Gelb-1m**-markierten DNA-Stranges, der Spuren an oxidiertem Produktstrang enthält.

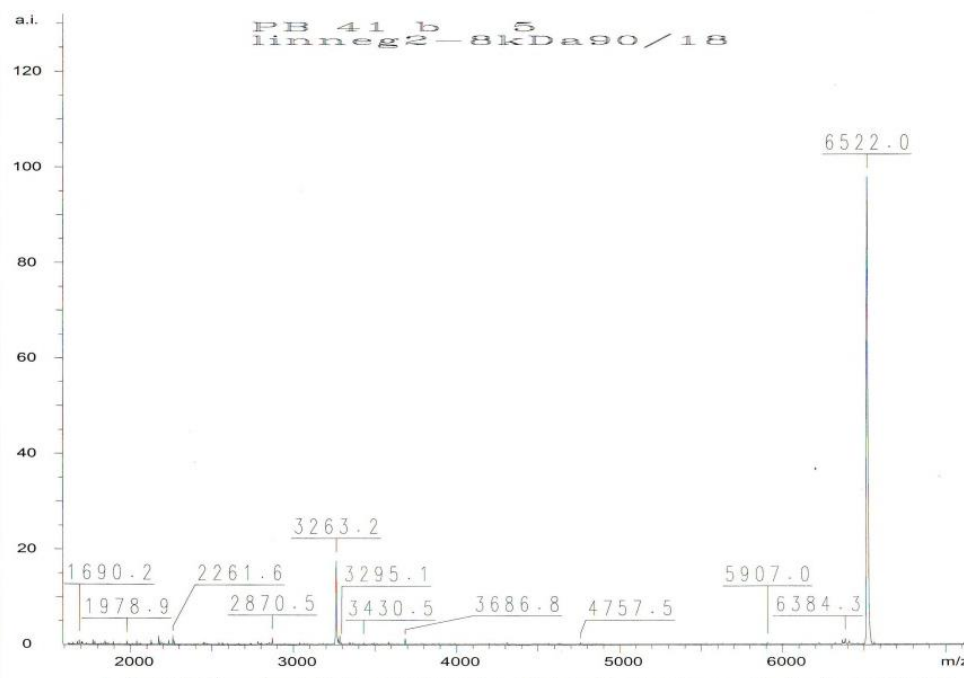
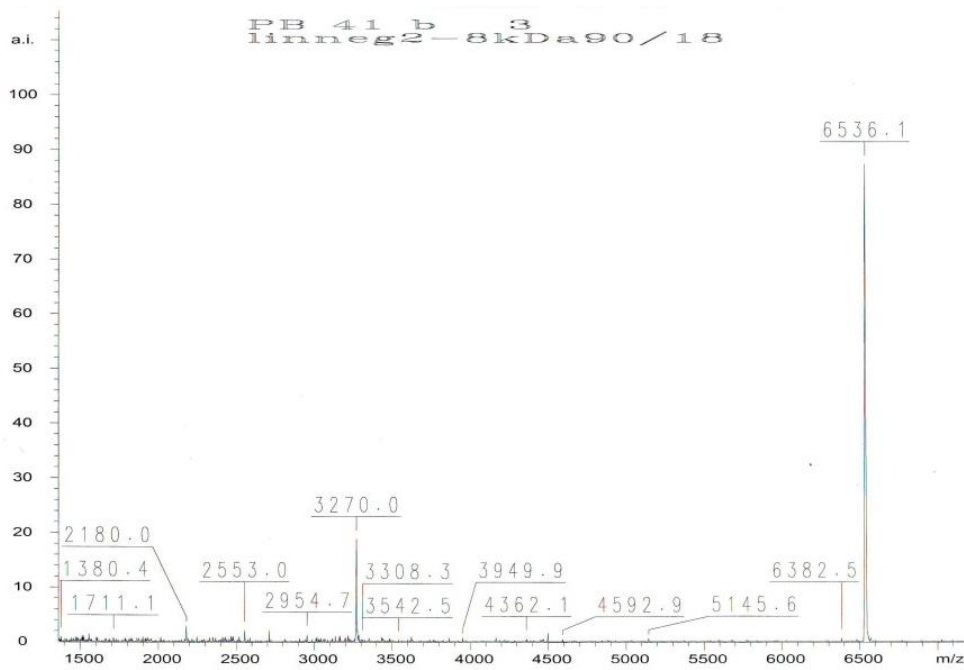


Abbildung 249: MALDI-Spektren von verschiedenen Fraktionen des **Gelb-1m**-markierten DNA-Stranges, der mittels flacherem HPLC-Gradient die Separierung des oxidierten Produktstranges erlaubte. Oben: MALDI-Spektrum des oxidierten Nebenproduktes. Unten: MALDI-Spektrum des gewünschten unbeschädigten Produktstranges.

Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Nachfolgend sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der einfach modifizierten Einzelstränge **DNA1** und **DNA2** den doppelsträngigen **DNA3** bzw. **DNA4** gegenübergestellt.

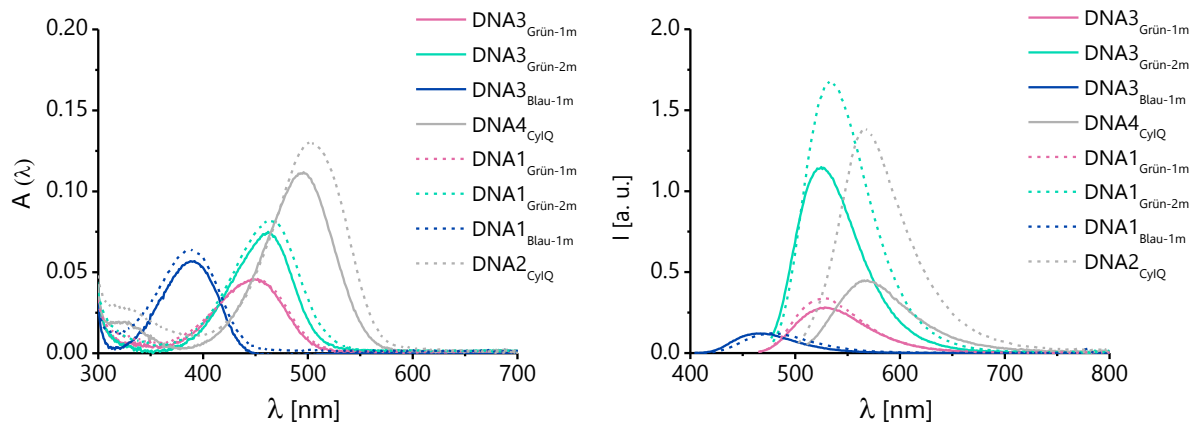


Abbildung 250: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA1**) und DNA-Doppelstränge (**DNA3**) von den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Blau-1m** sowie der Vergleich zum Referenzfluorophor **CyIQ** (**DNA2** und **DNA4**).

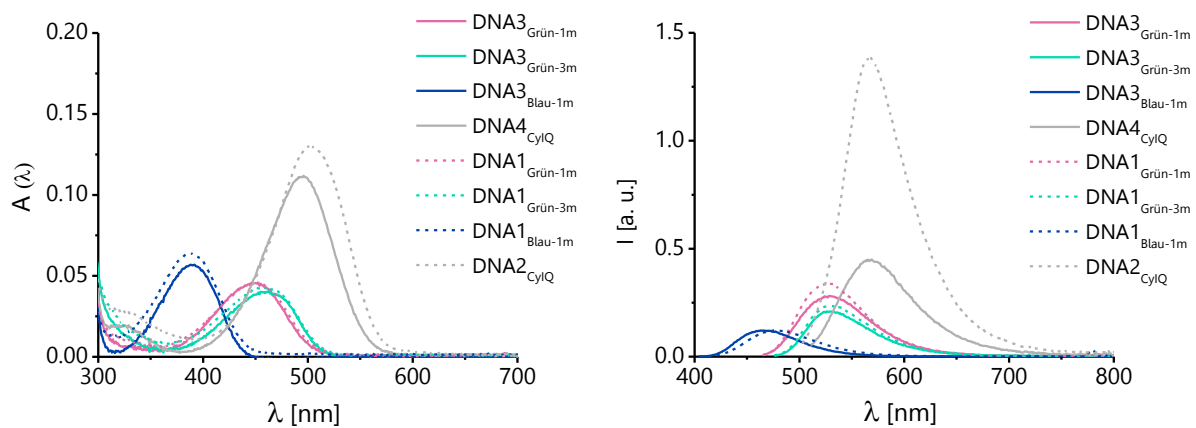


Abbildung 251: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA1**) und DNA-Doppelstränge (**DNA3**) von den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-3m** und **Blau-1m** sowie der Vergleich zum Referenzfluorophor **CyIQ** (**DNA2** und **DNA4**).

Charakterisierung einfach modifizierter DNA

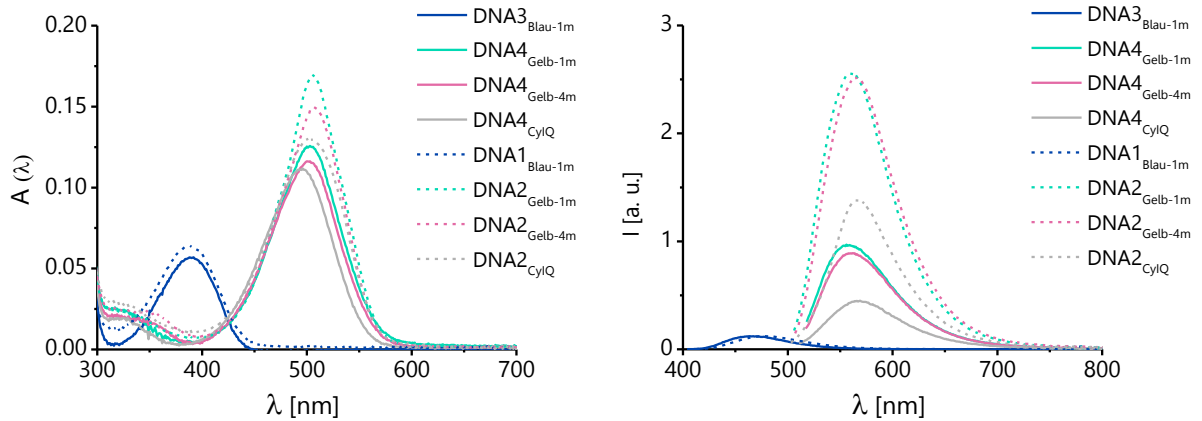


Abbildung 252: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA1** und **DNA2**) und DNA-Doppelstränge (**DNA3** und **DNA4**) von Donor- (**Blau-1m**) und Akzeptorfarbstoffen (**Gelb-1m**, **Gelb-4m** sowie **CylQ** zum Vergleich).

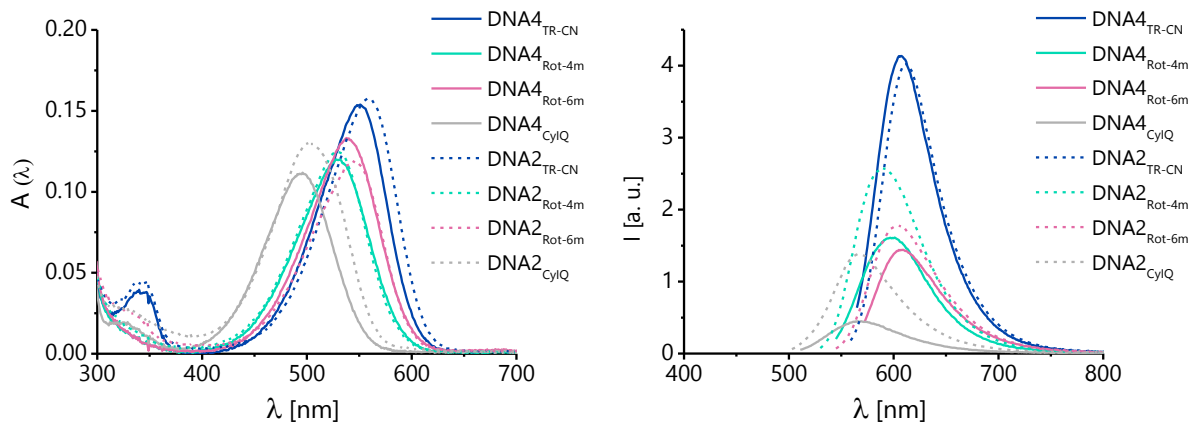


Abbildung 253: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA2**) und DNA-Doppelstränge (**DNA4**) von den Akzeptorfarbstoffen **TR-CN**, **Rot-4m** und **Rot-6m** sowie der Vergleich zum Referenzfluorophor **CylQ**.

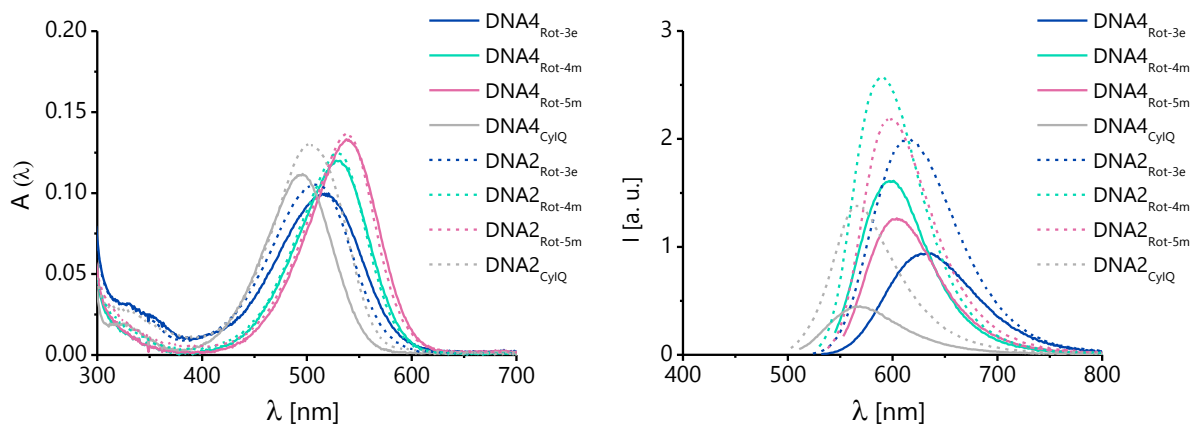


Abbildung 254: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA2**) und DNA-Doppelstränge (**DNA4**) von den Akzeptorfarbstoffen **Rot-3e**, **Rot-4m** und **Rot-5m** sowie der Vergleich zum Referenzfluorophor **CylQ**.

Charakterisierung einfach modifizierter DNA

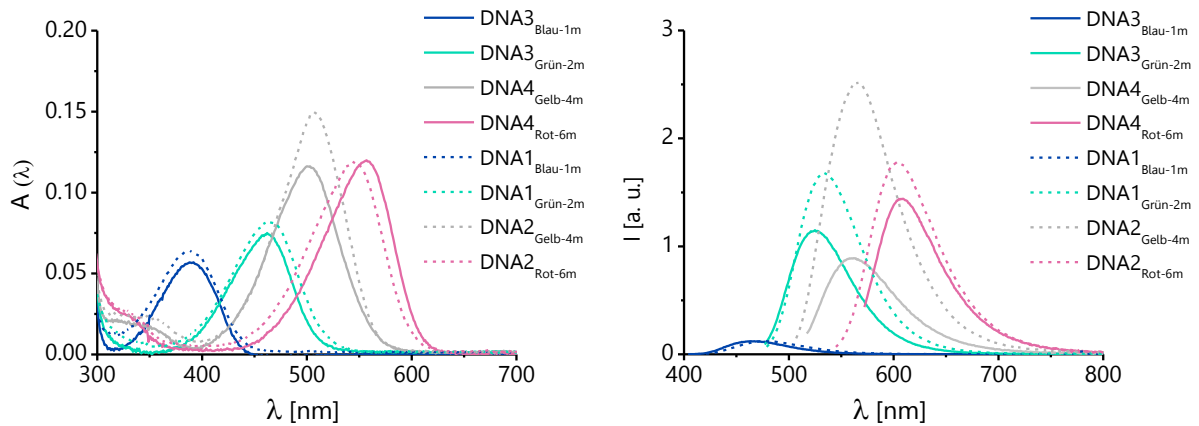


Abbildung 255: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA1** und **DNA2**) und DNA-Doppelstränge (**DNA3** und **DNA4**) von Donor- (**Blau-1m**, **Grün-2m**) und Akzeptorfarbstoffen (**Gelb-4m**, **Rot-6m**).

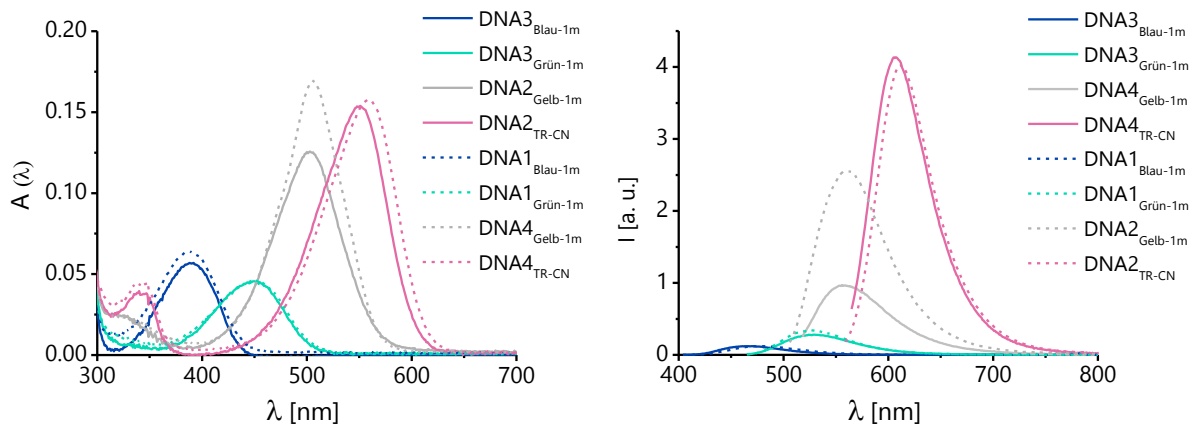
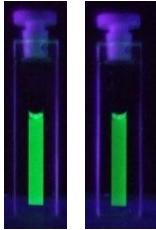
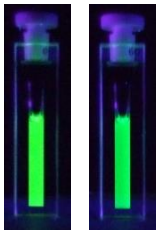
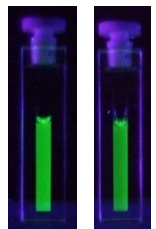
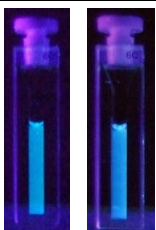
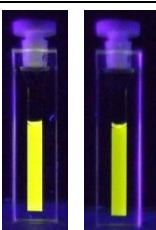
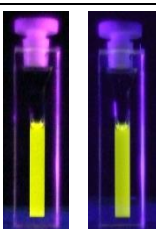
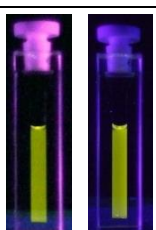


Abbildung 256: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge (**DNA1** und **DNA2**) und DNA-Doppelstränge (**DNA3** und **DNA4**) von Donor- (**Blau-1m**, **Grün-1m**) und Akzeptorfarbstoffen (**Gelb-1m**, **TR-CN**).

Die folgende Tabelle fasst alle Daten der einfach modifizierten Einzelstränge **DNA1** und **DNA2** und den doppelsträngigen **DNA3** bzw. **DNA4** zusammen. Diese Datentabelle erstreckt sich über zwei Seiten!

DNA-Strang	$\lambda_{\text{abs.max.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.max.}}$ [nm]	λ_{Stokes} [nm]	I_{dsDNA} [% der I_{ssDNA}]	ϕ_F [%]	T_m [°C]	ss / ds DNA
DNA1 _{Grün-1m}	451	529	78	-	9.8	-	
DNA3 _{Grün-1m}	449	528	79	77.0	9.4	65.1	
DNA1 _{Grün-2m}	464	534	70	-	36.2	-	
DNA3 _{Grün-2m}	462	525	63	68.9	28.3	64.6	
DNA1 _{Grün-3m}	461	534	73	-	10.2	-	
DNA3 _{Grün-3m}	462	529	71	82.8	8.9	64.0	
DNA1 _{Blau-1m}	389	476	87	-	5.2	-	
DNA3 _{Blau-1m}	388	463	75	81.7	4.6	63.7	
DNA2 _{Gelb-1m}	505	560	55	-	40.4	-	
DNA4 _{Gelb-1m}	503	557	54	42.6	20.4	67.0	
DNA2 _{Gelb-4m}	507	566	59	-	47.1	-	
DNA4 _{Gelb-4m}	503	560	57	40.6	21.2	66.3	
DNA2 _{CyIQ}	503	568	65	-	25.5	-	
DNA4 _{CyIQ}	496	566	70	33.1	10.9	66.1	

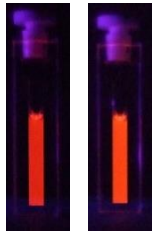
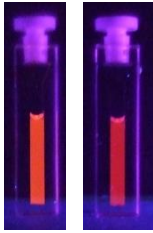
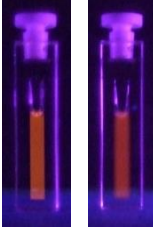
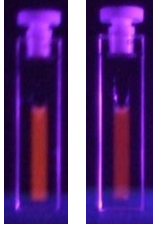
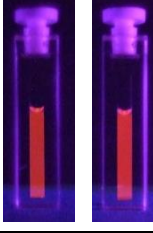
DNA-Strang	$\lambda_{\text{abs.max.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.max.}}$ [nm]	λ_{Stokes} [nm]	I_{dsDNA} [% der I_{ssDNA}]	ϕ_{F} [%]	T_{m} [°C]	ss / ds DNA
DNA2 _{TR-CN}	560	613	53	-	59.9	-	
DNA4 _{TR-CN}	551	608	57	95.0	63.4	65.6	
DNA2 _{Rot-3e}	509	617	106	-	57.2	-	
DNA4 _{Rot-3e}	515	634	119	52.4	35.8	67.4	
DNA2 _{Rot-4m}	529	590	71	-	51.2	-	
DNA4 _{Rot-4m}	528	596	68	64.2	33.2	66.4	
DNA2 _{Rot-5m}	538	599	61	-	43.7	-	
DNA4 _{Rot-5m}	538	601	63	59.6	26.1	66.2	
DNA2 _{Rot-6m}	544	604	60	-	39.0	-	
DNA4 _{Rot-6m}	557	607	50	83.0	31.9	66.6	

Tabelle 16: Übersicht aller Daten der einfach modifizierten Einzelstränge **DNA1** und **DNA2** und der doppelsträngigen **DNA3** bzw. **DNA4**. Der Schmelzpunkt der unmodifizierten **DNA6** beträgt 64.5 °C.

Überlappungsintegrale – normierte Spektren

Zur Berechnung der Überlappungsintegrale wurden die Spektren doppelsträngiger einfach modifizierter DNA verwendet. Bei Donoren wurde das Emissionsspektrum der **DNA3**, bei Akzeptoren wurde das Absorptionsspektrum der **DNA4** normiert. Die folgenden Abbildungen veranschaulichen das jeweilige Überlappungsintegral anhand der grau eingefärbten Fläche.

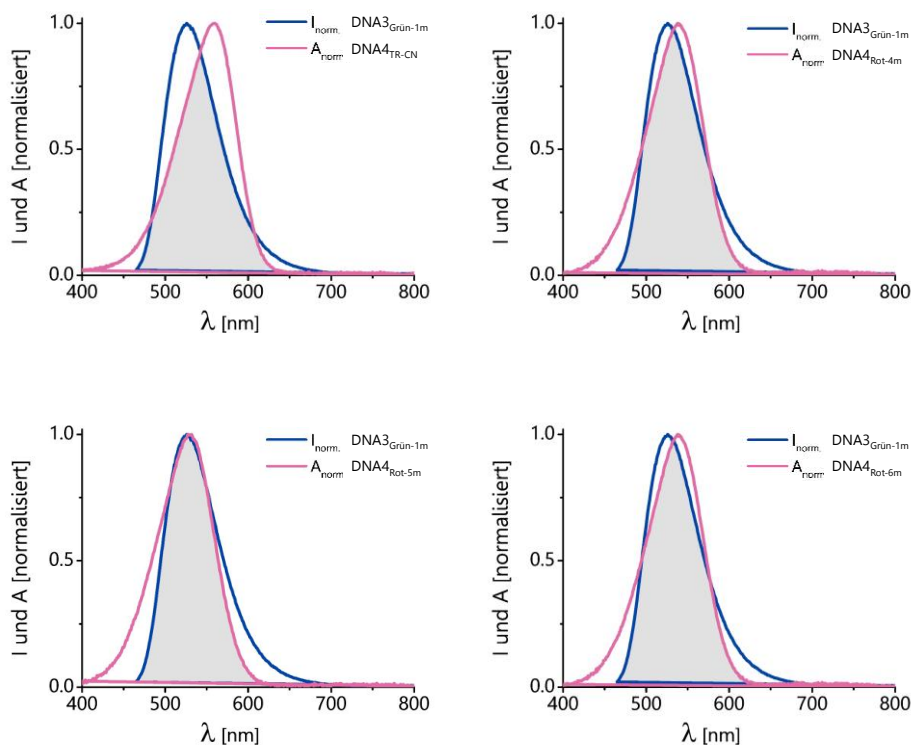


Abbildung 257: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrum der **DNA3_{Grün-1m}** mit dem jeweiligen normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum der **DNA4**. Akzeptor-DNA: **DNA4_{TR-CN}**, **DNA4_{Rot-4m}**, **DNA4_{Rot-5m}** und **DNA4_{Rot-6m}**.

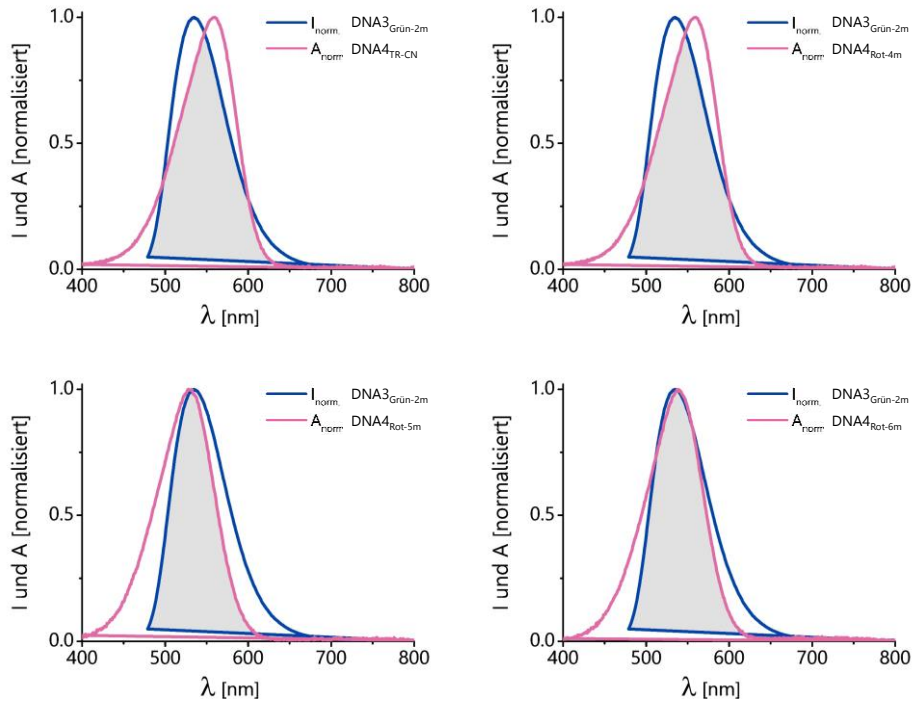


Abbildung 258: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrum der **DNA3_{Grün-2m}** mit dem jeweiligen normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum der **DNA4**. Akzeptor-DNA: **DNA4_{TR-CN}**, **DNA4_{Rot-4m}**, **DNA4_{Rot-5m}** und **DNA4_{Rot-6m}**.

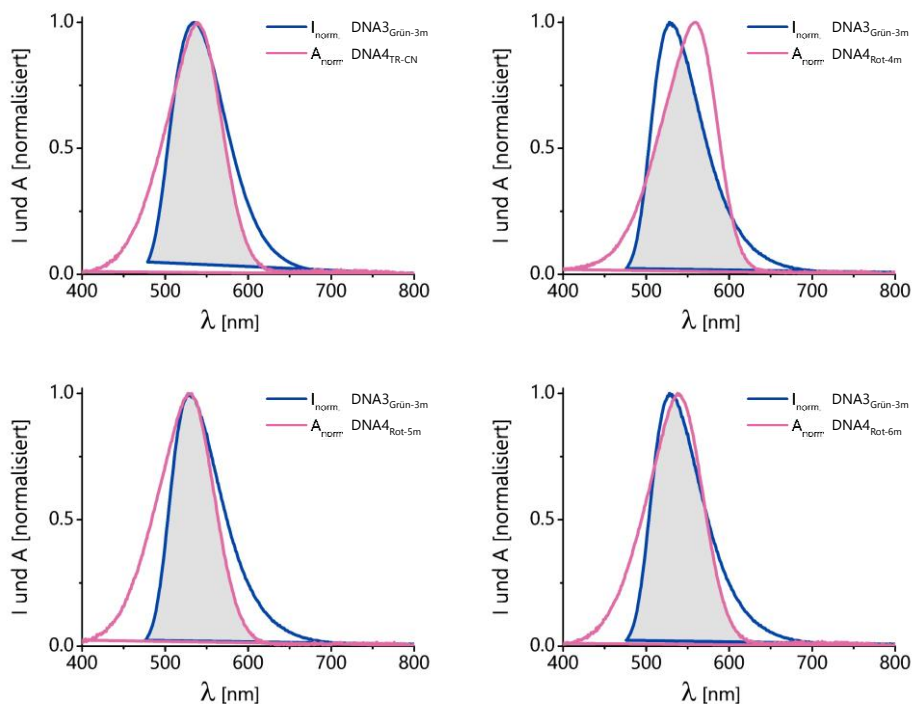


Abbildung 259: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrum der **DNA3_{Grün-3m}** mit dem jeweiligen normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum der **DNA4**. Akzeptor-DNA: **DNA4_{TR-CN}**, **DNA4_{Rot-4m}**, **DNA4_{Rot-5m}** und **DNA4_{Rot-6m}**.

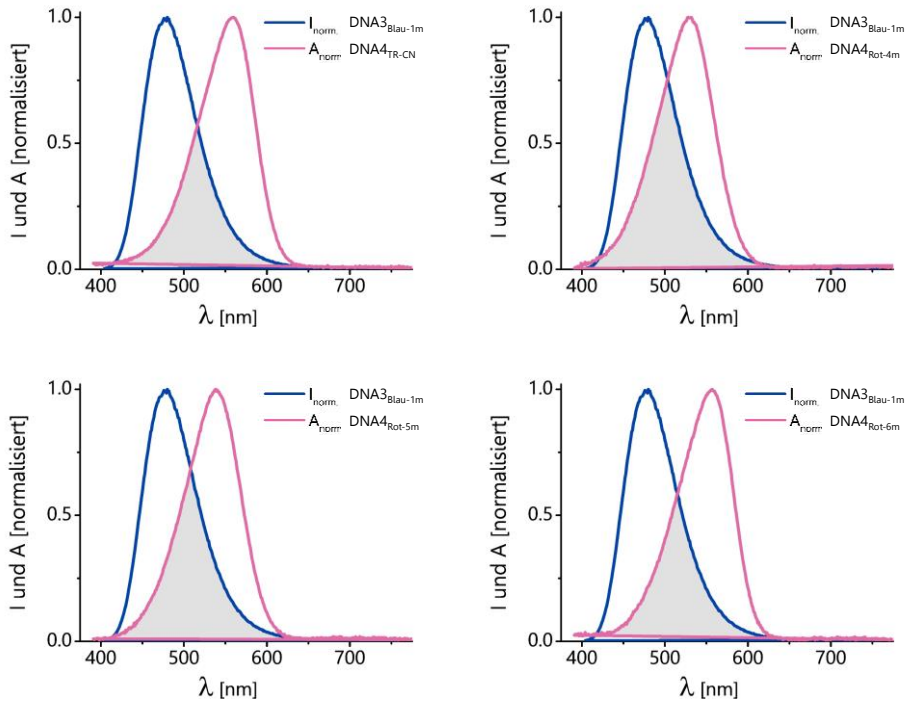


Abbildung 260: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrum der **DNA3_{Blau-1m}** mit dem jeweiligen normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum der **DNA4**. Akzeptor-DNA: **DNA4_{TR-CN}**, **DNA4_{Rot-4m}**, **DNA4_{Rot-5m}** und **DNA4_{Rot-6m}**.

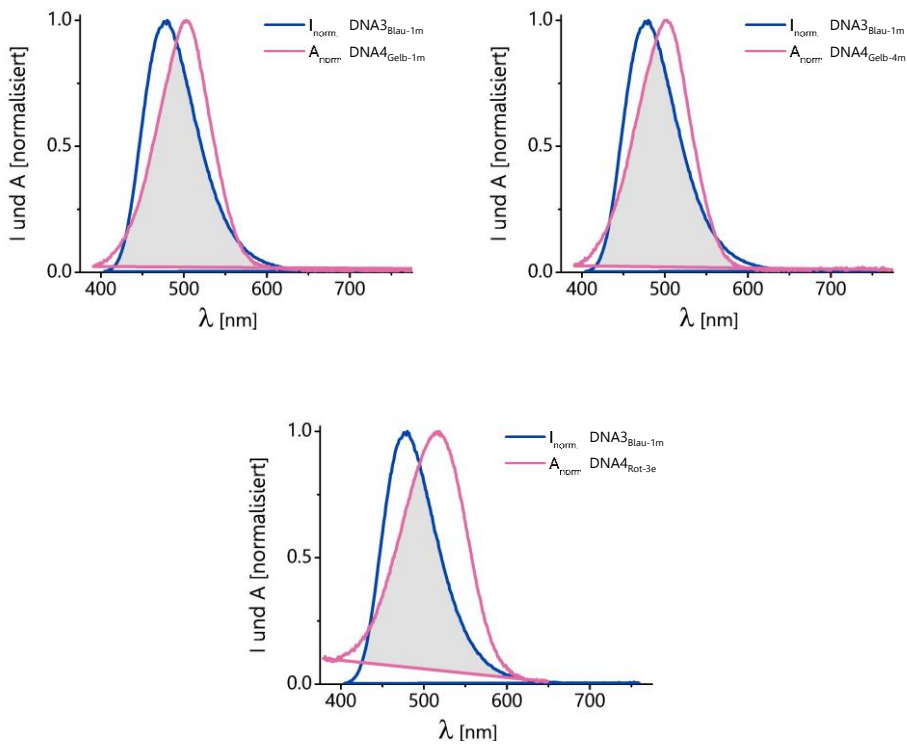


Abbildung 261: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrum der **DNA3_{Blau-1m}** mit dem jeweiligen normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum der **DNA4**. Akzeptor-DNA: **DNA4_{Gelb-1m}**, **DNA4_{Gelb-4m}** und **DNA4_{Rot-3e}**.

8.6 Charakterisierung zweifach modifizierter DNA

Absorptions- und Fluoreszenzspektren

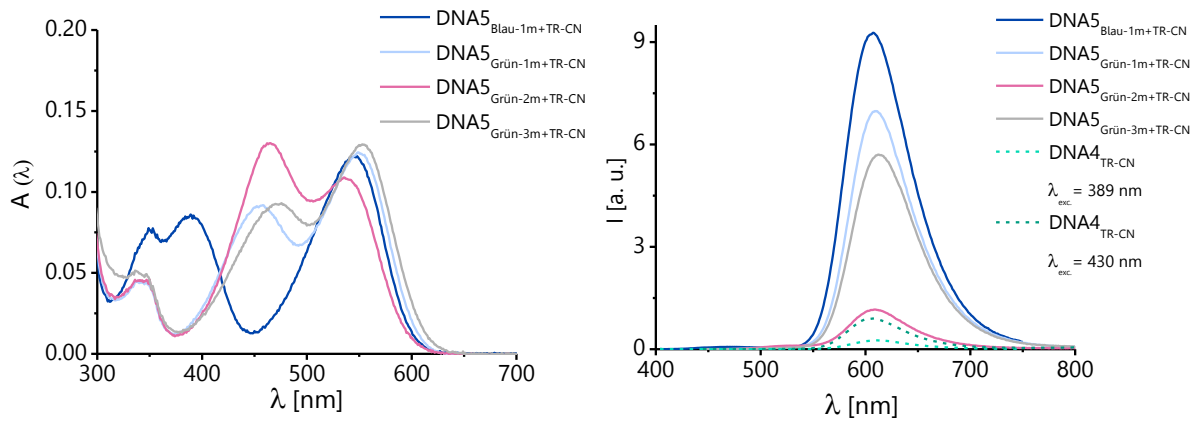


Abbildung 262: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der zweifach modifizierten **DNA5** mit dem Akzeptor **TR-CN** und den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-2m**, **Grün-3m** und **Blau-1m**.

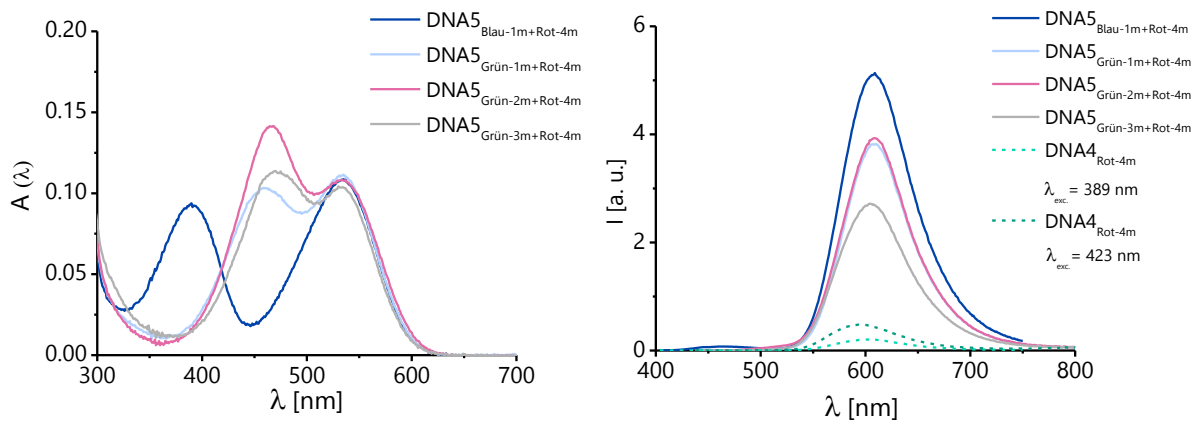


Abbildung 263: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der zweifach modifizierten **DNA5** mit dem Akzeptor **Rot-4m** und den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-2m**, **Grün-3m** und **Blau-1m**.

Charakterisierung zweifach modifizierter DNA

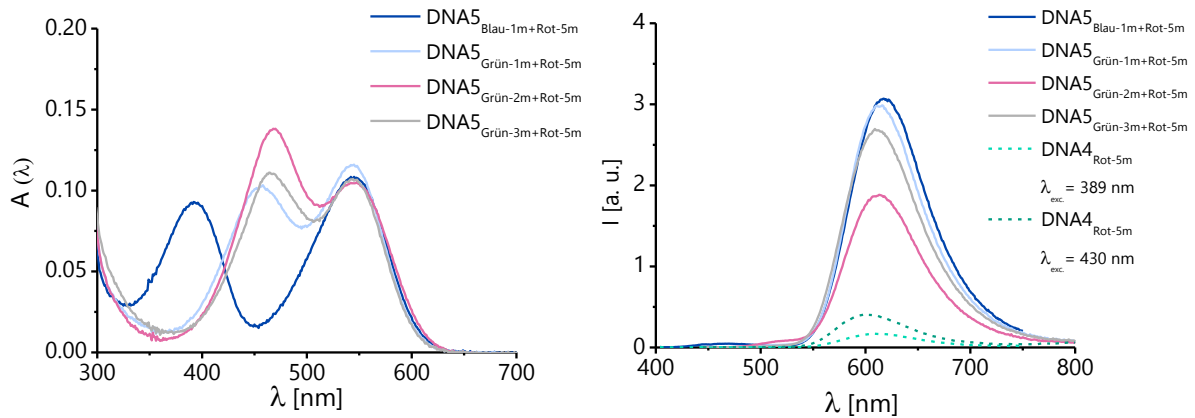


Abbildung 264: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der zweifach modifizierten **DNA5** mit dem Akzeptor **Rot-5m** und den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-2m**, **Grün-3m** und **Blau-1m**.

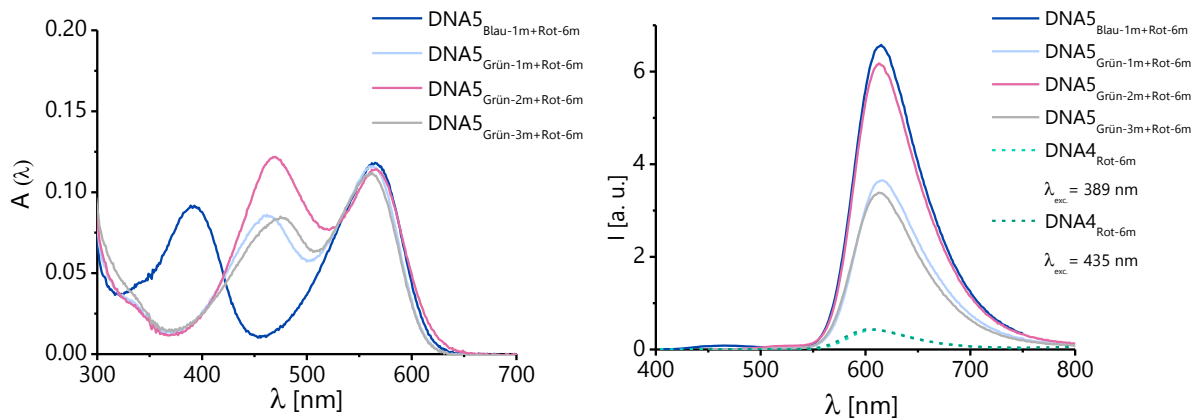


Abbildung 265: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der zweifach modifizierten **DNA5** mit dem Akzeptor **Rot-6m** und den Donorfarbstoffen **Grün-1m**, **Grün-2m**, **Grün-3m** und **Blau-1m**.

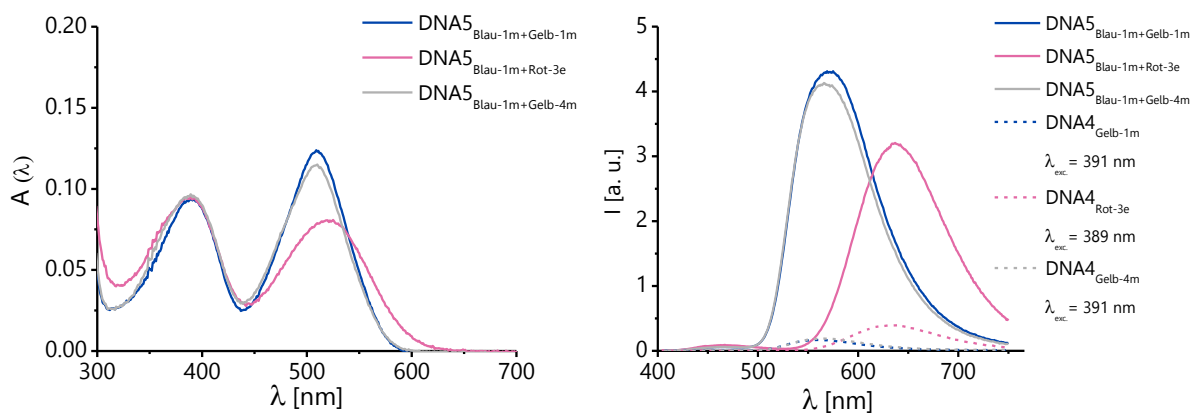
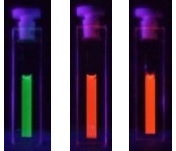
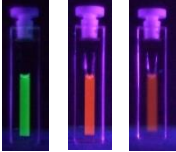
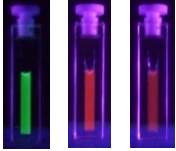
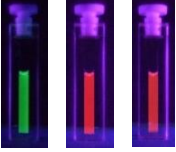
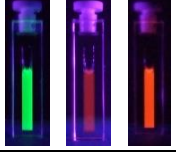
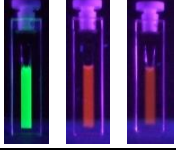
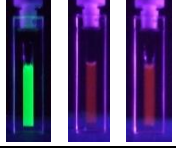
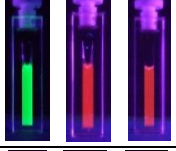
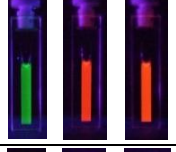
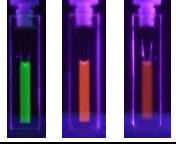


Abbildung 266: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der zweifach modifizierten **DNA5** mit dem Donor **Blau-1m** und den Akzeptorfarbstoffen **Gelb-1m**, **Rot-3e** und **Gelb-4m**.

Übersicht der spektroskopischen Daten zweifach modifizierter Duplexe **DNA5**:

ET-Paar in DNA5	$\lambda_{exc.Do.}$ [nm]	$\lambda_{em.Ak.}$ [nm]	$\lambda_{appa.}$ [nm]	$f_{Kontrast}$	T_m [°C]	Do / Paar / Ak DNA3 / 5 / 4
Grün-1m +TR-CN	430	609	179	94 (107)	67.2	
Grün-1m +Rot-4m	423	609	186	62 (70)	66.8	
Grün-1m +Rot-5m	430	614	184	67 (77)	66.9	
Grün-1m +Rot-6m	435	616	181	104 (118)	66.9	
Grün-2m +TR-CN	430	609	179	3 (11)	68.5	
Grün-2m +Rot-4m	423	609	186	36 (40)	65.9	
Grün-2m +Rot-5m	430	613	183	18 (22)	66.0	
Grün-2m +Rot-6m	435	613	178	72 (77)	66.2	
Grün-3m +TR-CN	430	613	183	102 (120)	66.5	
Grün-3m +Rot-4m	423	604	181	35 (42)	66.4	

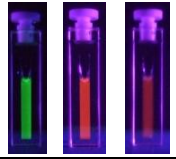
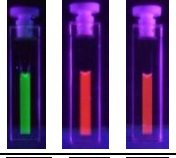
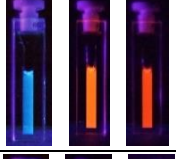
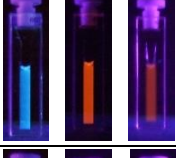
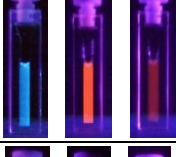
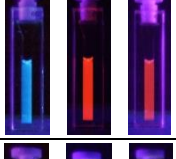
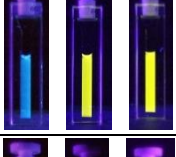
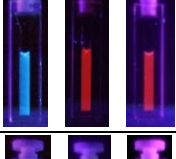
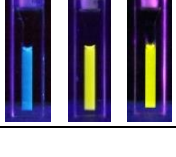
ET-Paar in DNA5	$\lambda_{\text{exc.Do.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.Ak.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{appa.}}$ [nm]	f_{Kontrast}	T_m [°C]	Do / Paar / Ak DNA3 / 5 / 4
Grün-3m +Rot-5m	430	609	179	65 (77)	67.1	
Grün-3m +Rot-6m	435	613	178	133 (153)	66.7	
Blau-1m +TR-CN	389	607	218	131 (135)	66.7	
Blau-1m +Rot-4m	389	609	220	67 (69)	64.9	
Blau-1m +Rot-5m	389	618	229	62 (66)	65.1	
Blau-1m +Rot-6m	389	615	226	74 (79)	65.6	
Blau-1m +Gelb-1m	391	572	181	69 (72)	65.3	
Blau-1m +Rot-3e	389	637	248	32 (36)	66.1	
Blau-1m +Gelb-4m	391	566	175	66 (69)	65.3	

Tabelle 17: Übersicht der spektroskopischen Daten der doppelt modifizierten **DNA5**. Der Schmelzpunkt der unmodifizierten **DNA6** beträgt 64.5 °C. Zum Vergleich sind die Kontrastfaktoren ohne Korrekturvornahme, in Klammern hinter den korrigierten Werten in der Übersichtstabelle angegeben.

Fluoreszenzlebenszeit-Messungen

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten erfolgte bei 20 °C mit einer Probelösung, die 2.5 µM DNA in NaP_i-Puffer (10 mM, pH = 7) und 250 mM NaCl enthält. Die Fluoreszenzlebenszeiten wurden an einem *Horiba Scientific FluoroMax-4* Spektrofluorometer anhand *time-correlated single photon counting (TCSPC)* Technik mit NanoLeds als Anregungsquelle bei 370 nm (bei Duplexen mit **Blau-1m**) oder 455 nm (bei Duplexen mit **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Grün-3m**) (*Horiba, impulse repetition rate of 1 MHz, time calibration = 2.74E-11 sec/channel*) durchgeführt, wobei das Abklingen der Emission bei 478 nm (bei Duplexen mit **Blau-1m**) bzw. 528 nm (bei Duplexen mit **Grün-1m**, **Grün-2m** und **Grün-3m**) detektiert wurde.

Die Auswertung der Abklingkurven erfolgte mit dem Programm *DAS6 v 6.8 decay analysis (Horiba)*, wobei die Fluoreszenzlebenszeiten der Donoren in Abwesenheit des jeweiligen Akzeptors mit einer monoexponentiellen (Gleichung 8.2) und bei Gegenwart des Akzeptors mit einer biexponentiellen Fitfunktion (Gleichung 8.2) angepasst wurden.

$$I_{(t)} = I_{(0)} + I_{(Do.)} \cdot e^{\frac{-t}{\tau_{Do}}} \quad (8.2)$$

$$I_{(t)} = I_{(0)} + I_{(Do.)} \cdot e^{\frac{-t}{\tau_{Do+Ak}}} + I_{(Ak.)} \cdot e^{\frac{-t}{\tau_{Ak}}} \quad (8.3)$$

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Abklingkurven sowie die *Residuals* von den Fluoreszenzlebenszeit-Bestimmungen des Donors in Abwesenheit (τ_{Do}) und in Anwesenheit (τ_{Do+Ak}) des Akzeptors.

Charakterisierung zweifach modifizierter DNA

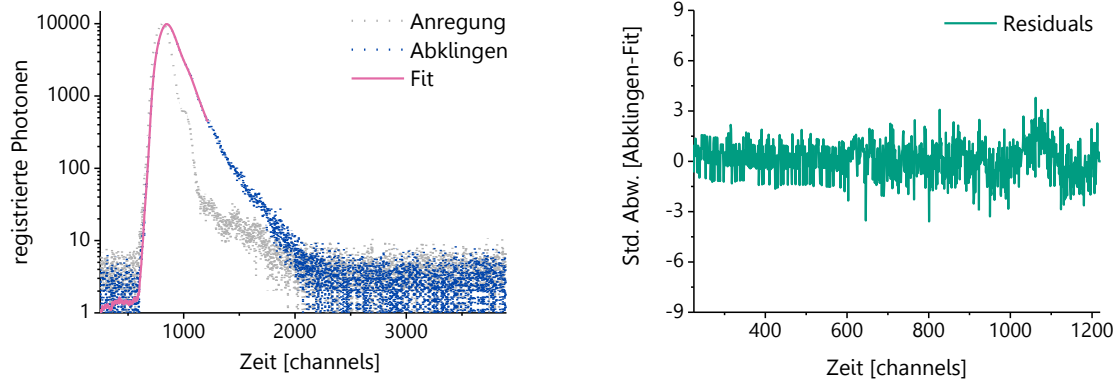


Abbildung 267: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA3Grün-1m** (τ_{Do}).

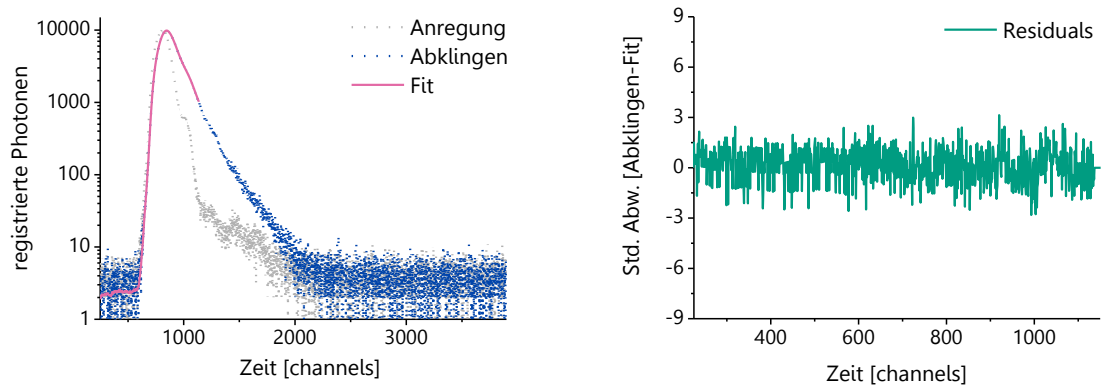


Abbildung 268: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-1m+TR-CN** (τ_{Do+Ak}).

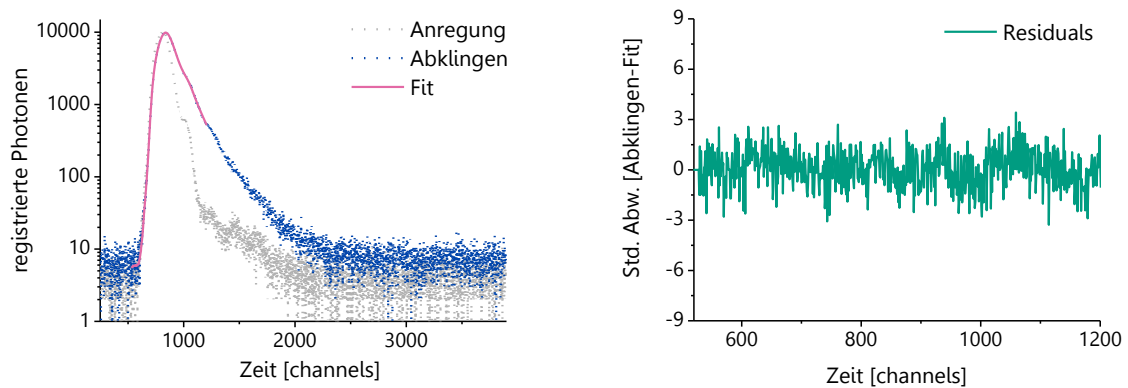


Abbildung 269: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-1m+Rot-4m** (τ_{Do+Ak}).

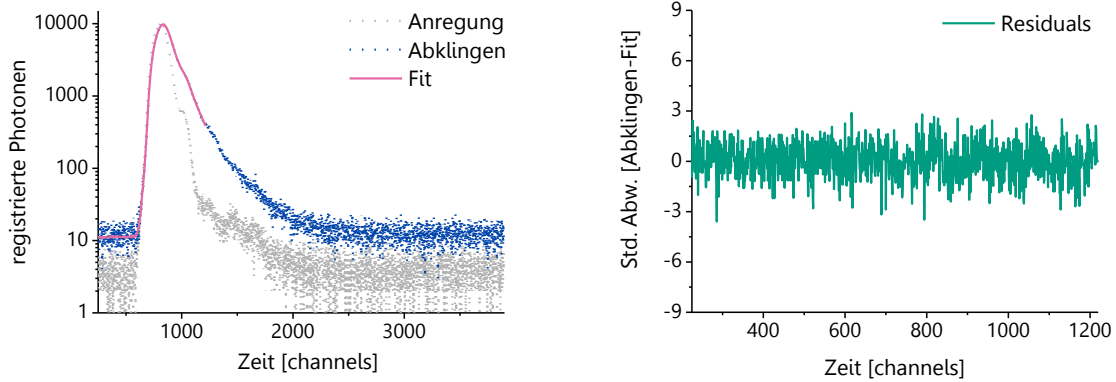


Abbildung 270: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-1m+Rot-5m** (τ_{Do+Ak}).

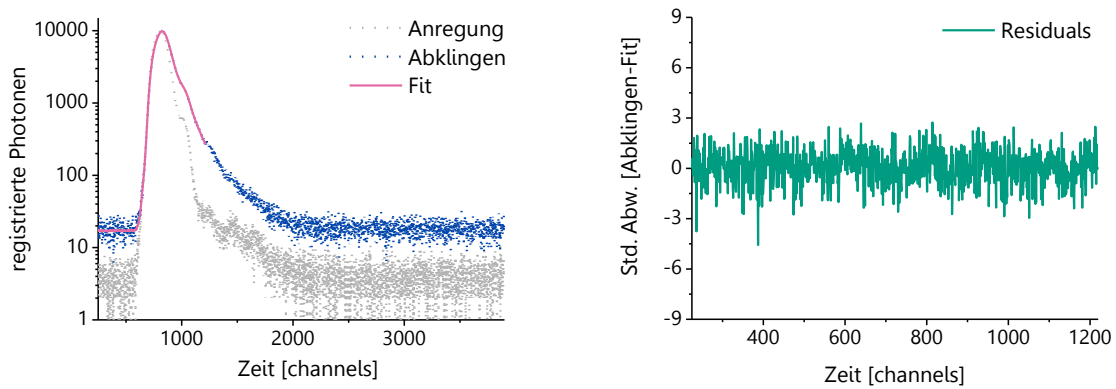


Abbildung 271: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-1m+Rot-6m** (τ_{Do+Ak}).

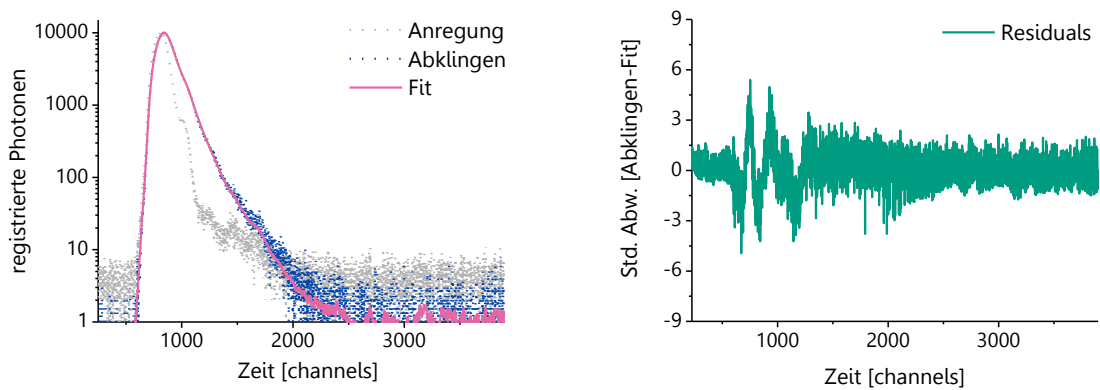


Abbildung 272: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA3Grün-2m** (τ_{Do}).

Charakterisierung zweifach modifizierter DNA

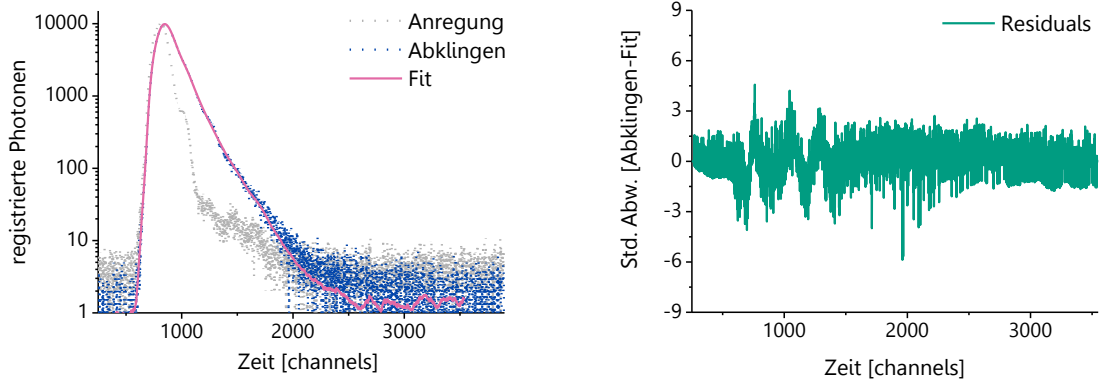


Abbildung 273: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-2m+TR-CN** (τ_{Do+Ak}).

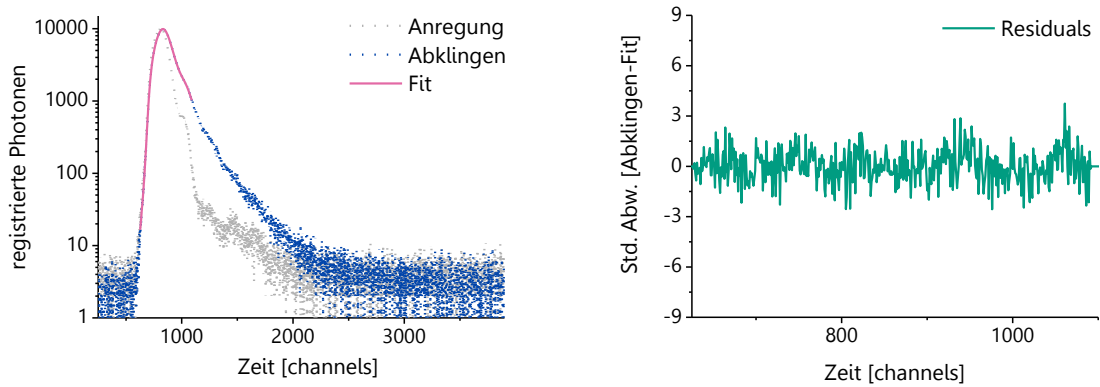


Abbildung 274: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-2m+Rot-4m** (τ_{Do+Ak}).

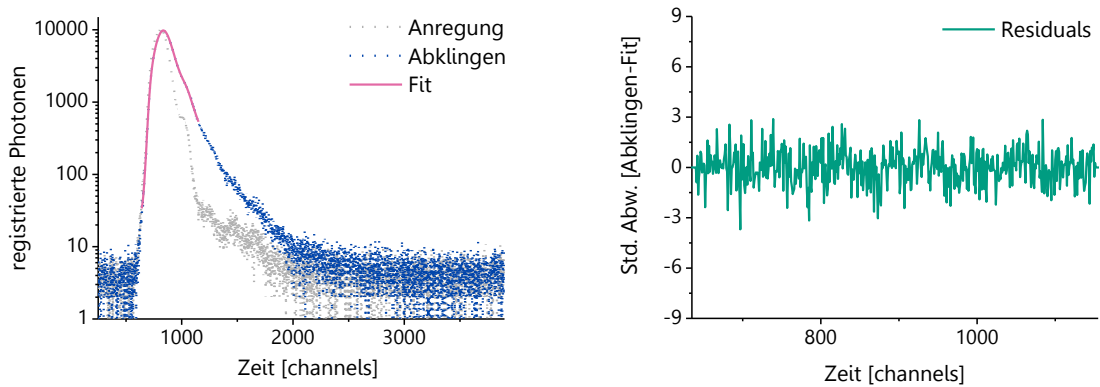


Abbildung 275: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-2m+Rot-5m** (τ_{Do+Ak}).

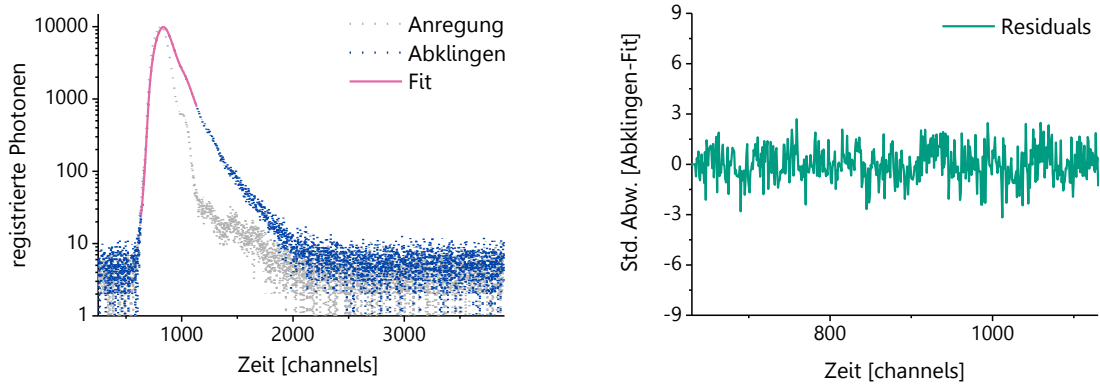


Abbildung 276: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-2m+Rot-6m** (τ_{Do+Ak}).

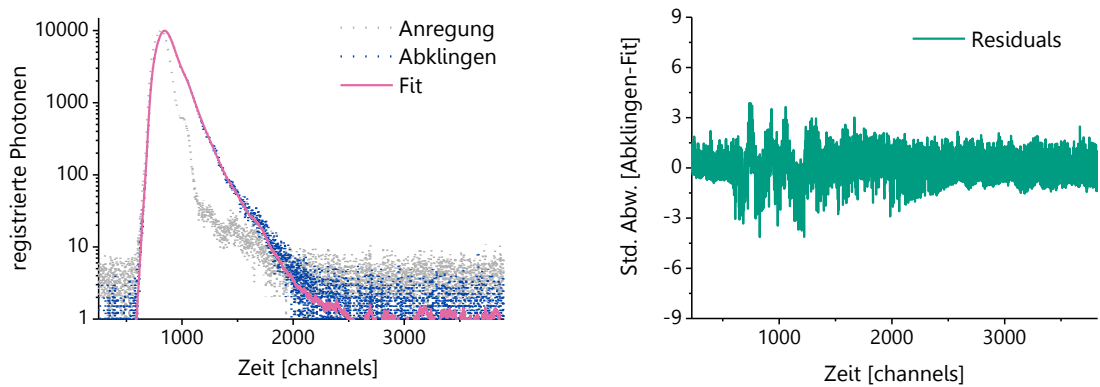


Abbildung 277: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA3Grün-3m** (τ_{Do}).

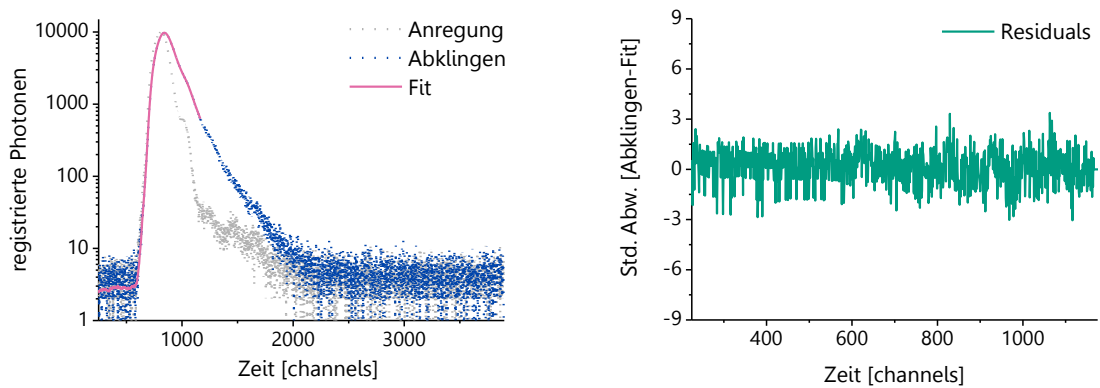


Abbildung 278: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-3m+TR-CN** (τ_{Do+Ak}).

Charakterisierung zweifach modifizierter DNA

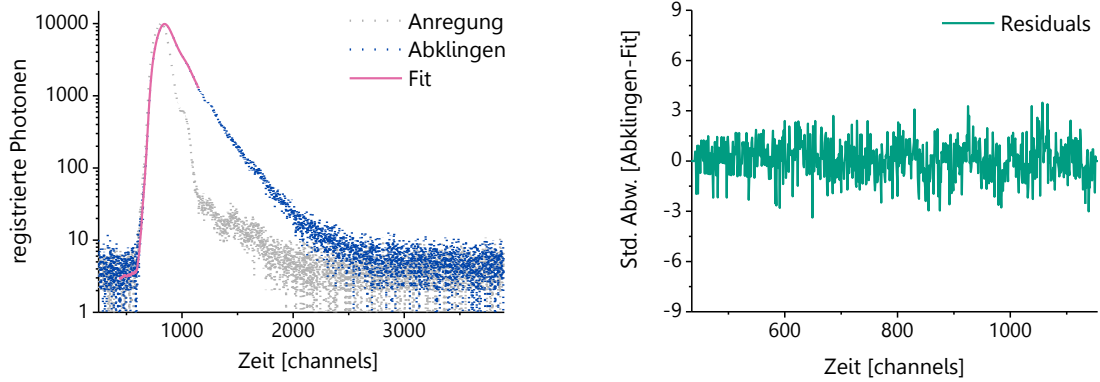


Abbildung 279: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-3m+Rot-4m** (τ_{Do+Ak}).

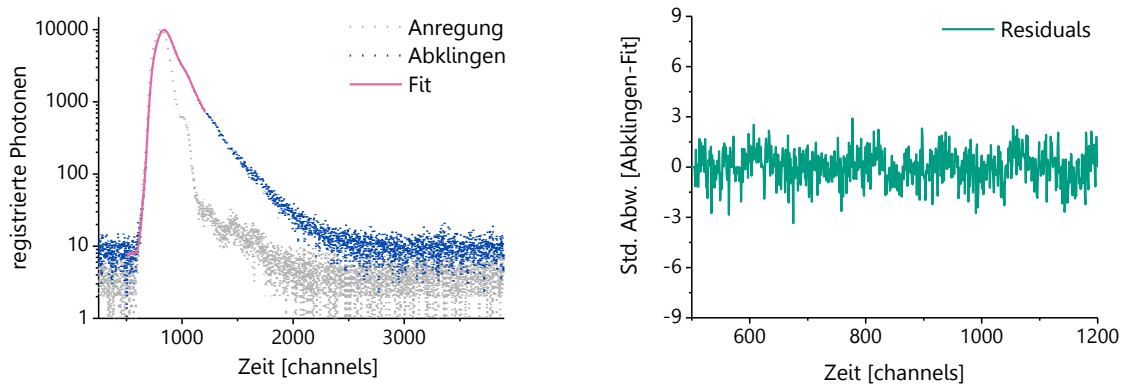


Abbildung 280: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-3m+Rot-5m** (τ_{Do+Ak}).

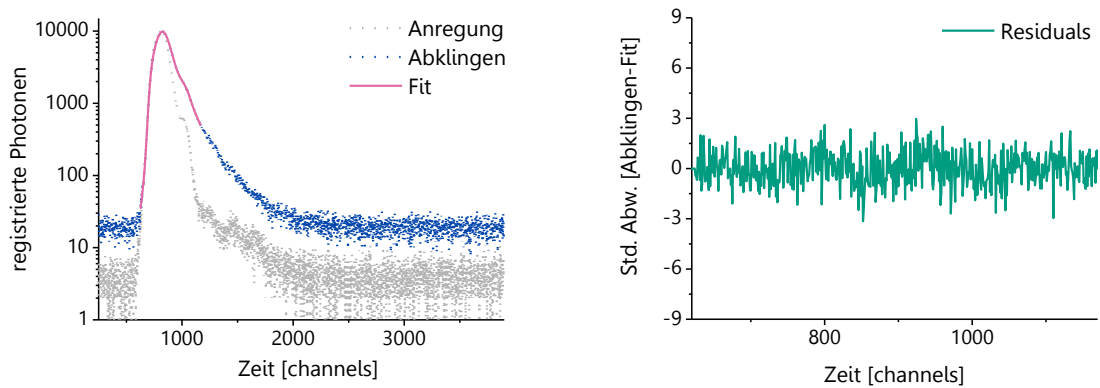


Abbildung 281: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Grün-3m+Rot-6m** (τ_{Do+Ak}).

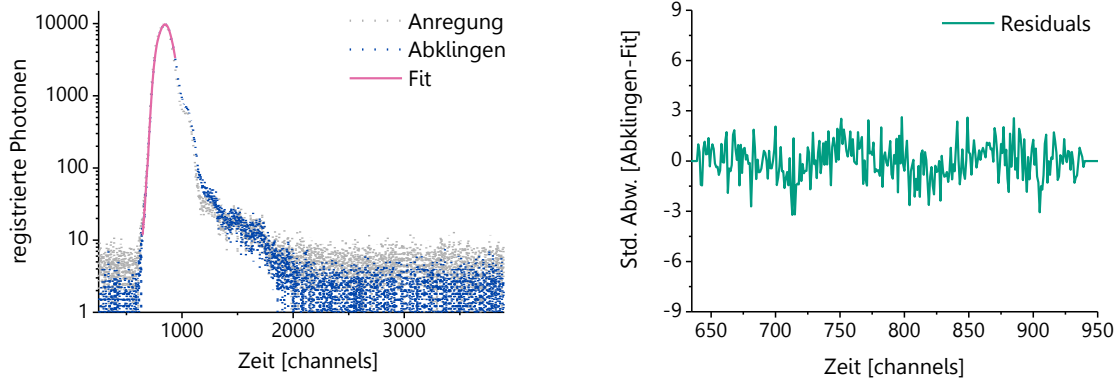


Abbildung 282: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA3 Blau-1m** (τ_{Do}).

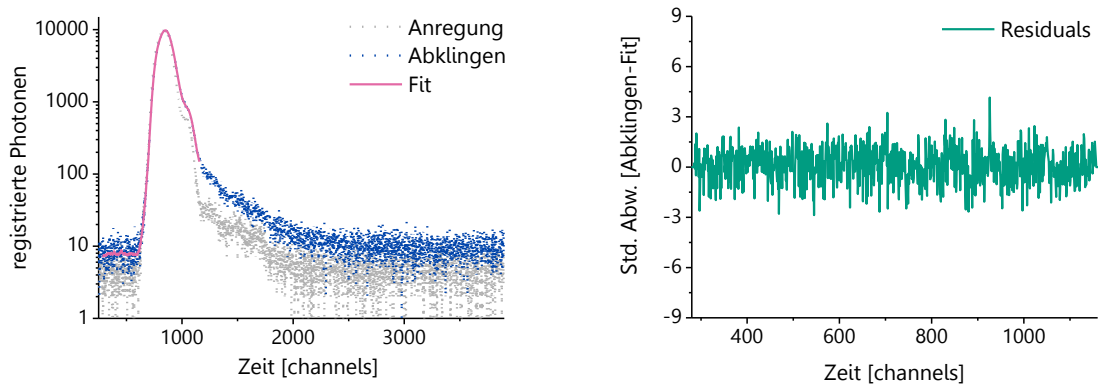


Abbildung 283: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5 Blau-1m+TR-CN** (τ_{Do+Ak}).

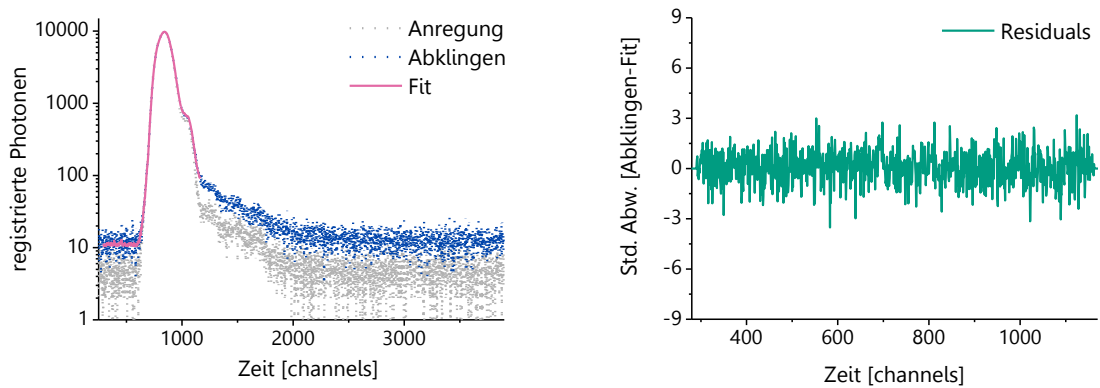


Abbildung 284: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5 Blau-1m+Rot-4m** (τ_{Do+Ak}).

Charakterisierung zweifach modifizierter DNA

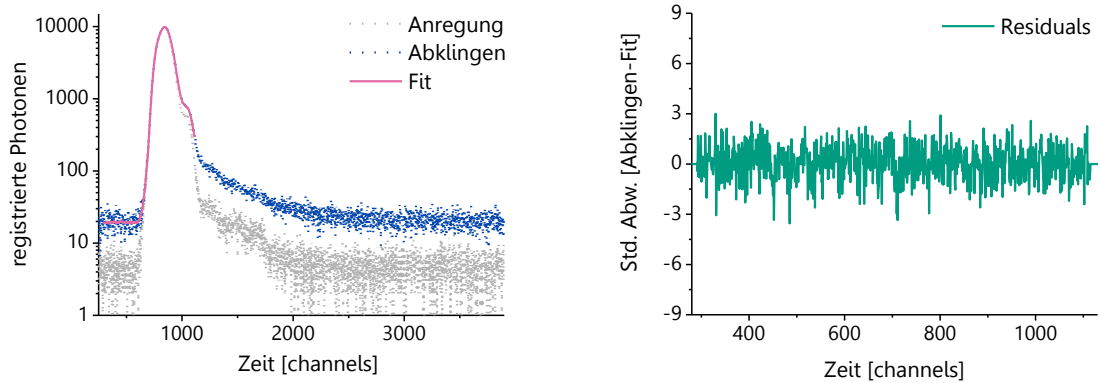


Abbildung 285: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Blau-1m+Rot-5m** (τ_{Do+Ak}).

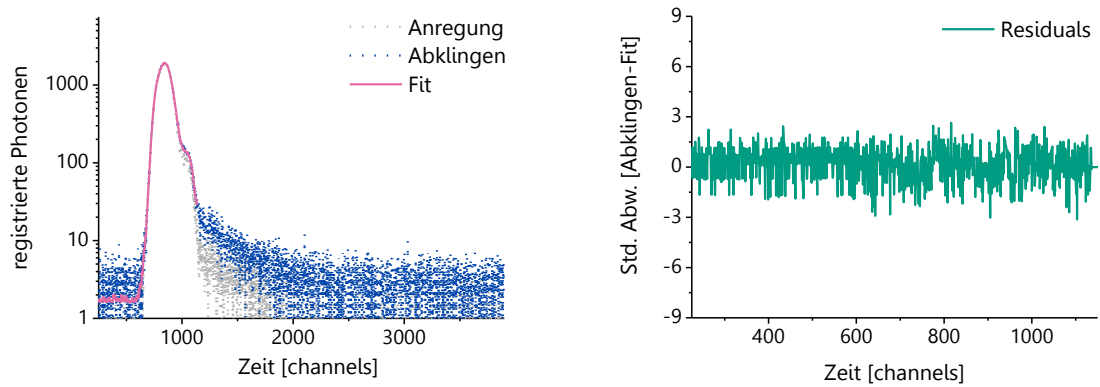


Abbildung 286: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Blau-1m+Rot-6m** (τ_{Do+Ak}).

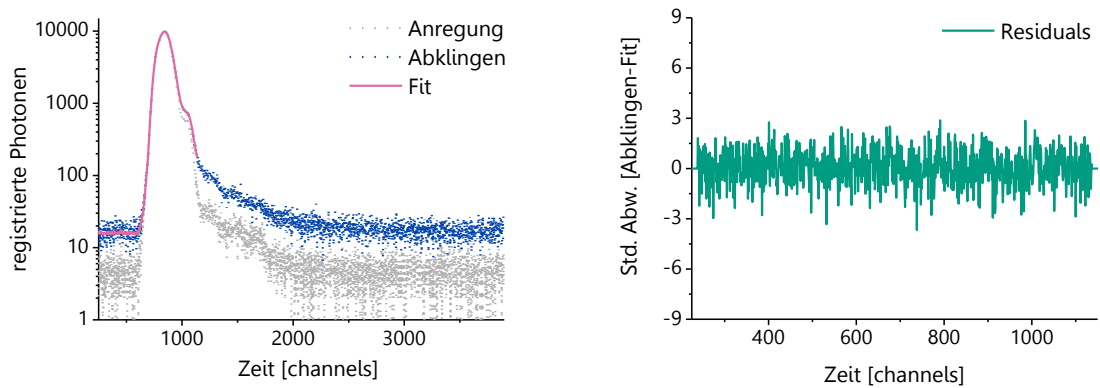


Abbildung 287: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Blau-1m+Gelb-1m** (τ_{Do+Ak}).

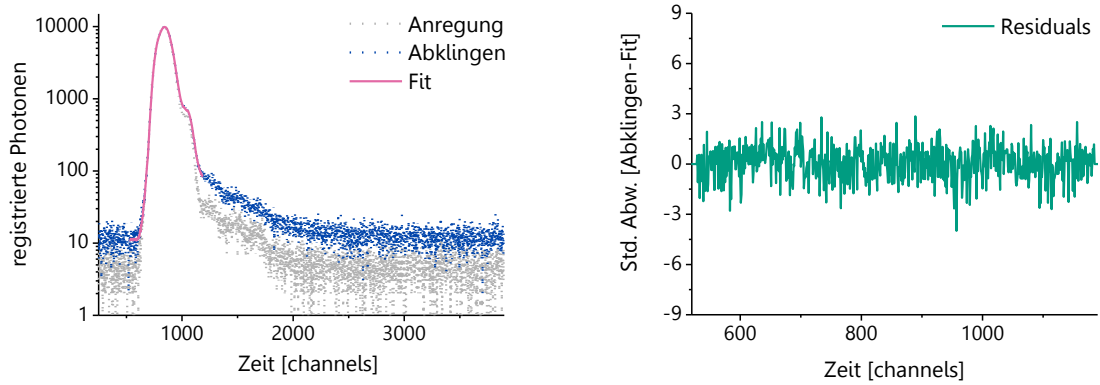


Abbildung 288: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Blau-1m+Rot-3e** (τ_{Do+Ak}).

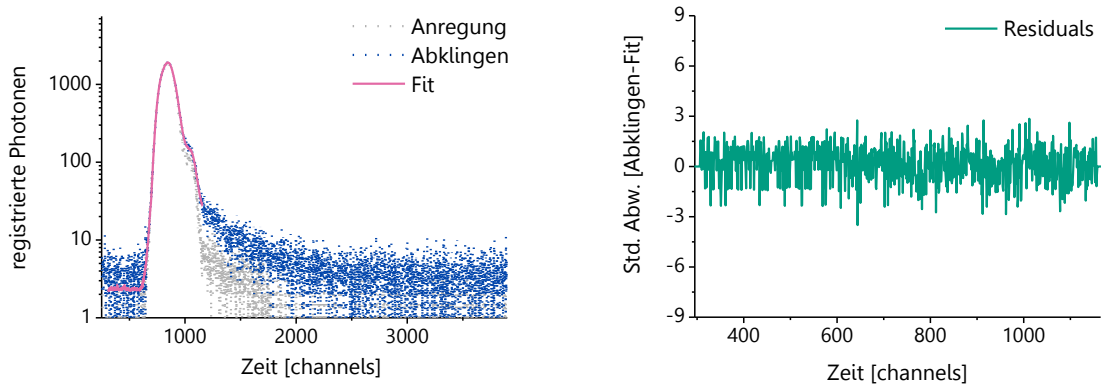


Abbildung 289: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **DNA5Blau-1m+Gelb-4m** (τ_{Do+Ak}).

Übersichtstabelle der Fluoreszenzlebenszeiten des Donors und der ET-Effizienzen sowie deren Standardabweichungen

Donor	Akzeptor	τ [sec]	$\Delta\tau$ [sec]	$\Delta\tau$ [%]	$E_{(r)}$	$\Delta E_{(r)}$ [%]	$\Delta E_{(r)}$
Grün-1m	-	4.274E-09	7.912E-12	0.19	-	-	-
	TR-CN	6.371E-10	3.092E-11	4.85	0.851	5.04	0.043
	Rot-4m	5.351E-10	1.717E-11	3.21	0.875	3.39	0.030
	Rot-5m	4.612E-10	1.470E-11	3.19	0.892	3.37	0.030
	Rot-6m	3.366E-10	1.191E-11	3.54	0.921	3.72	0.034
Grün-2m	-	4.326E-09	6.855E-12	0.16	-	-	-
	TR-CN	1.542E-09	1.895E-11	1.23	0.643	1.39	0.009
	Rot-4m	5.836E-10	2.016E-11	3.45	0.865	3.61	0.031
	Rot-5m	7.789E-10	2.485E-11	3.19	0.820	3.35	0.027
	Rot-6m	6.235E-10	2.836E-11	4.55	0.856	4.71	0.040
Grün-3m	-	4.360E-09	5.898E-12	0.14	-	-	-
	TR-CN	6.373E-10	2.486E-11	3.90	0.854	4.04	0.034
	Rot-4m	6.655E-10	3.016E-11	4.53	0.847	4.67	0.040
	Rot-5m	5.435E-10	1.705E-11	3.14	0.875	3.27	0.029
	Rot-6m	4.845E-10	1.869E-11	3.86	0.889	3.99	0.035
Blau-1m	-	2.507E-09	4.520E-11	1.80	-	-	-
	TR-CN	3.717E-10	1.303E-11	3.51	0.852	5.31	0.045
	Rot-4m	1.115E-10	6.203E-12	5.56	0.954	7.37	0.070
	Rot-5m	2.152E-10	9.582E-12	4.45	0.914	6.26	0.057
	Rot-6m	1.975E-10	1.055E-11	5.34	0.921	7.14	0.066
	Gelb-1m	2.469E-10	9.238E-12	3.74	0.902	5.54	0.050
	Rot-3e	1.816E-10	8.164E-12	4.50	0.928	6.30	0.058
	Gelb-4m	3.379E-10	2.531E-11	7.49	0.865	9.29	0.080

Tabelle 18: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{Do} bzw. τ_{Do+Ak} von **DNA3** und **DNA5** sowie der ET-Effizienzen und deren berechnete Standardabweichungen.

Übersichtstabelle der Fluoreszenzlebenszeiten des Akzeptors und der Parameter $I_{(0)}$, $I_{(Do.)}$ sowie $I_{(Ak.)}$

Donor	Akzeptor	τ_{Ak} [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [%]	$I_{(0)}$	$I_{(Do.)}$	$I_{(Ak.)}$
Grün-1m	-	-	-	-	6.14E-1	4.72E-2	-
	TR-CN	2.998E-9	1.43E-11	0.48	1.61E+0	1.80E-2	9.20E-3
	Rot-4m	3.331E-9	1.42E-11	0.43	5.58E+0	2.98E-2	6.51E-3
	Rot-5m	3.190E-9	1.31E-11	0.41	1.05E+1	3.74E-2	5.70E-3
	Rot-6m	3.043E-9	1.40E-11	0.46	1.65E+1	6.63E-2	4.24E-3
Grün-2m	-	-	-	-	-1.2E+0	5.77E-2	-
	TR-CN	3.948E-9	1.34E-11	0.34	1.57E-1	1.48E-2	4.47E-3
	Rot-4m	3.172E-9	2.66E-11	0.84	1.58E+1	3.35E-2	5.28E-3
	Rot-5m	3.015E-9	1.97E-11	0.65	3.07E+1	2.79E-2	5.67E-3
	Rot-6m	3.012E-9	1.62E-11	0.54	1.83E+1	2.53E-2	7.33E-3
Grün-3m	-	-	-	-	-1.61E-1	5.11E-2	-
	TR-CN	2.900E-9	1.38E-11	0.47	2.07E+0	2.13E-2	8.10E-3
	Rot-4m	3.873E-9	1.90E-11	0.49	2.91E+0	2.82E-2	7.52E-3
	Rot-5m	3.733E-9	1.33E-11	0.36	7.50E+0	2.73E-2	6.86E-3
	Rot-6m	3.333E-9	1.70E-11	0.51	3.46E+1	1.11E-1	4.52E-3
Blau-1m	-	-	-	-	1.20E+1	1.53E-1	-
	TR-CN	2.247E-9	3.90E-11	1.74	7.09E+0	8.60E-2	1.74E-3
	Rot-4m	3.280E-9	1.33E-10	4.06	1.04E+1	2.14E-1	3.43E-4
	Rot-5m	3.615E-9	1.53E-10	4.23	1.87E+1	1.17E-1	5.38E-4
	Rot-6m	3.775E-9	4.10E-10	10.87	1.58E+0	1.30E-1	3.41E-4
	Gelb-1m	3.580E-9	1.24E-10	3.47	1.52E+1	2.16E-1	5.07E-4
	Rot-3e	3.416E-9	1.13E-10	3.30	1.08E+1	1.39E-1	3.80E-4
	Gelb-4m	3.688E-9	2.55E-10	6.91	2.19E+0	4.18E-2	9.82E-5

Tabelle 19: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{Ak} von **DNA3** und **DNA5** sowie der Parameter $I_{(0)}$, $I_{(Do.)}$ und $I_{(Ak.)}$.

Übersichtstabelle der erhaltenen und berechneten Daten aus den Fluoreszenzlebenszeit-Messungen

Donor	Akzeptor	$J_{(\lambda)}$ [10^{12} $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot$ nm^4]	Φ_{Do} DNA3	R_0 Förster [nm]	$E_{(r)}$ DNA5	r	r/ R_0
Grün-1m	TR-CN	3499	0.094	3.95	0.851	2.96	0.75
	Rot-4m	2576		3.75	0.875	2.72	0.72
	Rot-5m	2948		3.84	0.892	2.70	0.70
	Rot-6m	2673		3.78	0.921	2.51	0.66
Grün-2m	TR-CN	3876	0.283	4.83	0.643	4.38	0.91
	Rot-4m	2637		4.53	0.865	3.32	0.73
	Rot-5m	3111		4.66	0.820	3.62	0.78
	Rot-6m	2865		4.59	0.856	3.41	0.74
Grün-3m	TR-CN	3663	0.089	3.95	0.854	2.94	0.75
	Rot-4m	2531		3.71	0.847	2.79	0.75
	Rot-5m	2968		3.81	0.875	2.75	0.72
	Rot-6m	2721		3.75	0.889	2.66	0.71
Blau-1m	TR-CN	1539	0.046	3.06	0.852	2.29	0.75
	Rot-4m	1686		3.11	0.954	1.87	0.60
	Rot-5m	1675		3.10	0.914	2.09	0.67
	Rot-6m	1425		3.02	0.921	2.00	0.66
	Gelb-1m	2365		3.29	0.902	2.27	0.69
	Rot-3e	1774		3.13	0.928	2.05	0.65
	Gelb-4m	2177		3.24	0.865	2.38	0.73
TO	TR	1350	0.168	3.71	-	-	-

Tabelle 20: Zusammenstellung der Donor-Akzeptor-Abstände r, die aus den entsprechenden ET-Effizienzen berechnet wurden. Aufgeführt sind ebenfalls die Werte der Förster-Radien R_0 , dem Quotient r/R_0 und Überlappungsintegrale der kombinierten Farbstoffpaare.

8.7 Daten der "Molecular Beacon"

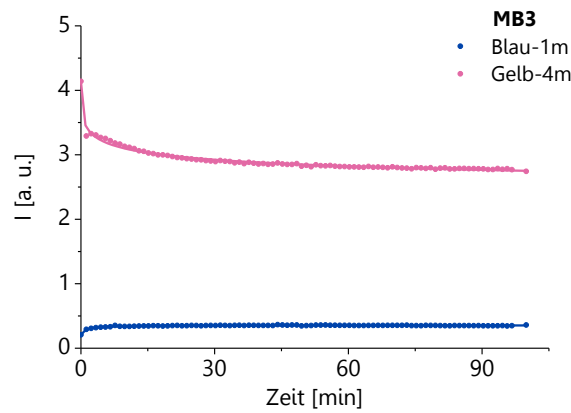


Abbildung 290: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität beider Chromophore eines MBs nach Zugabe von 0.5 eq miRNA. Dargestellt ist **MB3** bei Anwesenheit von miRNA-31 ($\lambda_{exc.} = 389$ nm).

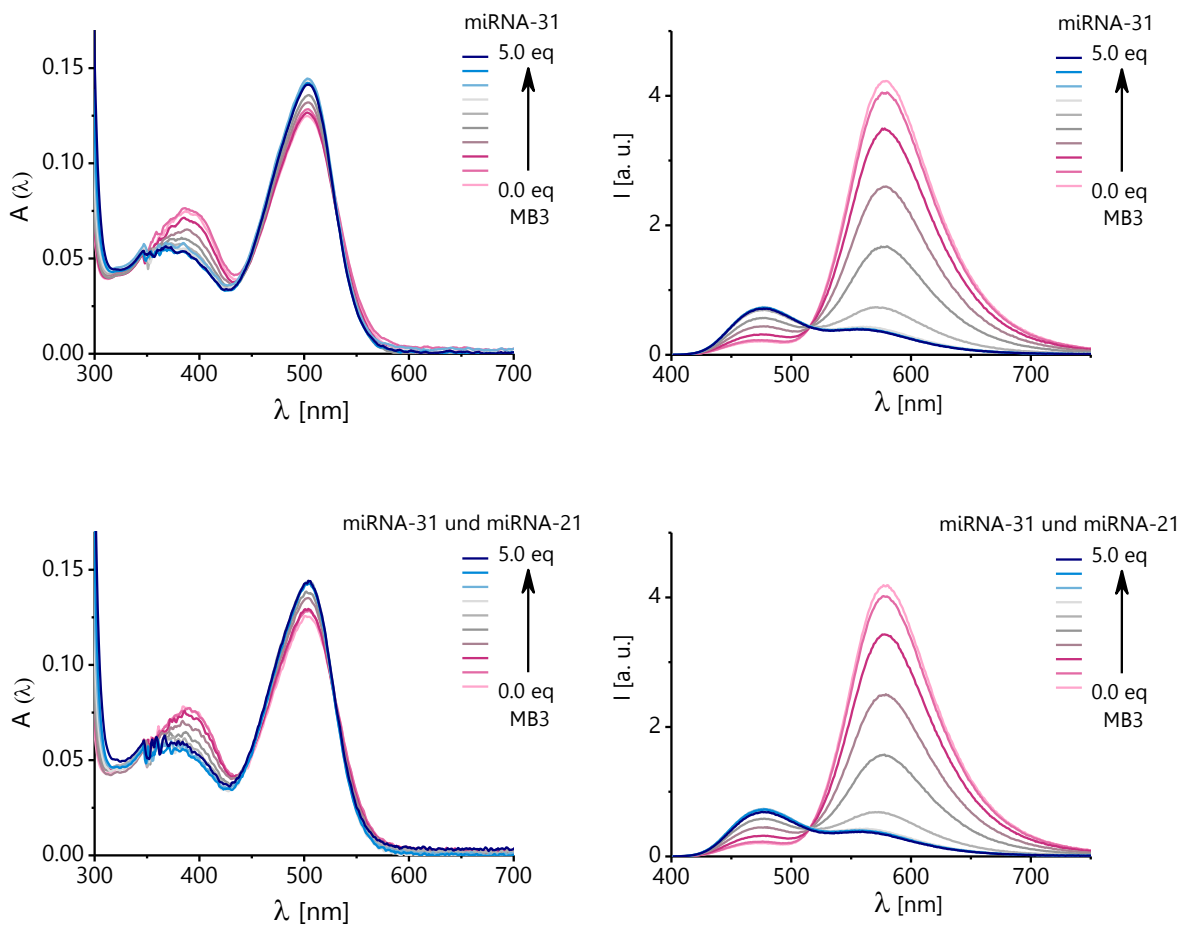


Abbildung 291: Titration des **MB3** mit miRNA ($\lambda_{exc.} = 389$ nm). Oben: Zugabe der Zielsequenz miRNA-31. Unten: Zugabe beider miRNAs (miRNA-31 und miRNA-21).

Verbrauchsmaterialien, Methoden und Geräte „Click“-modifizierte DNA

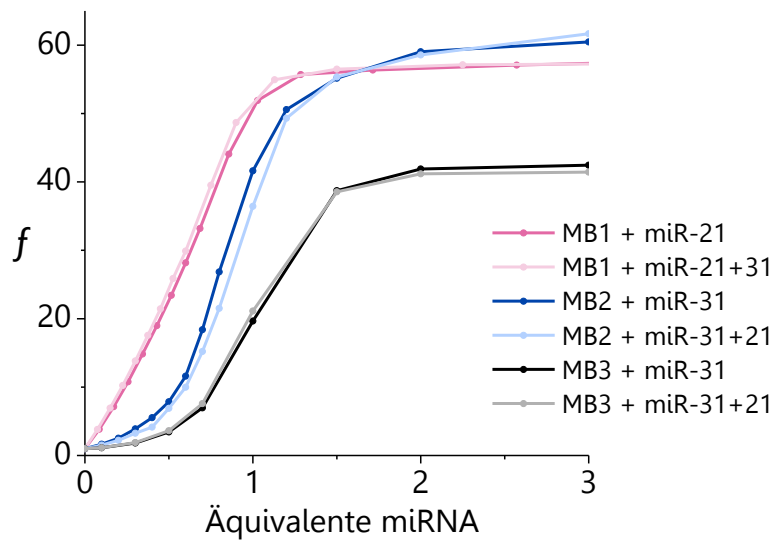


Abbildung 292: Verlauf des Kontrastfaktors f im Zuge der Titrationsexperimente von **MB1**, **MB2** und **MB3** bei Addition der komplementären sowie beider miRNAs.

8.8 Strangaustausch mit acpcPNA-Sonden

Spektren und Daten der Strangaustauschexperimente

Alle Messungen wurden bei einer Konzentration von jeweils 2.5 μM PNA als auch DNA-Strängen in 10 mM NaPi -Puffer (pH = 7) durchgeführt. Die Emissionsspektren wurden bei einer Eingangs- sowie Ausgangsspalteinstellung von 3 nm aufgezeichnet. Im Anschluss an die gemessenen Spektren führt eine Tabelle die Anregungswellenlänge des Donors in **PNA1** bzw. **PNA2**, alle Emissionsmaxima der Donoren sowie der Akzeptoren auf. Zugleich enthält die Tabelle eine Auflistung der gemessenen Schmelztemperaturen der gebildeten Heteroduplexe.

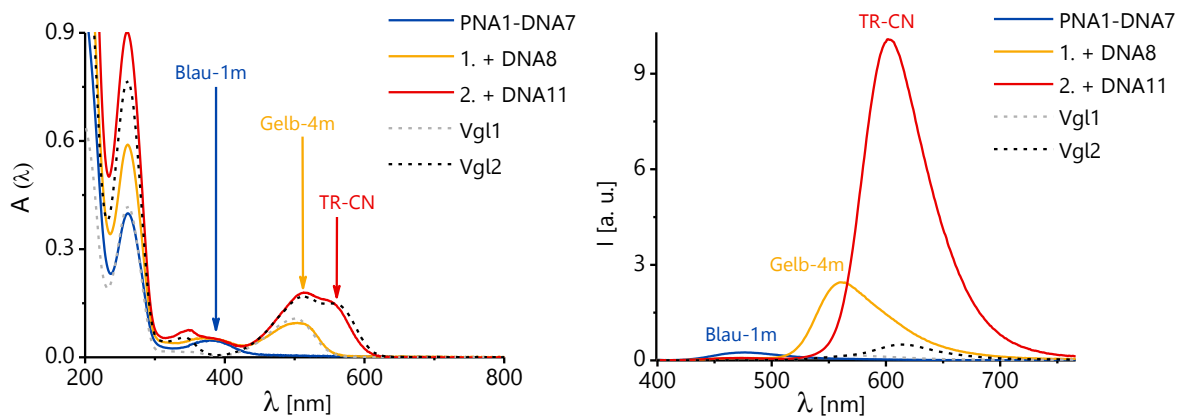


Abbildung 293: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA8** und anschließend mit **DNA11**. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA8** (Vgl1) und aus **DNA7-DNA8-DNA11** (Vgl2).

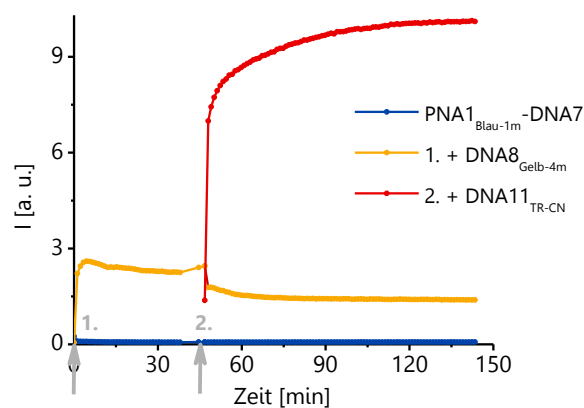


Abbildung 294: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität infolge der beiden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA8** (1.) und **DNA11** (2.).

Daten der Strangaustauschexperimente

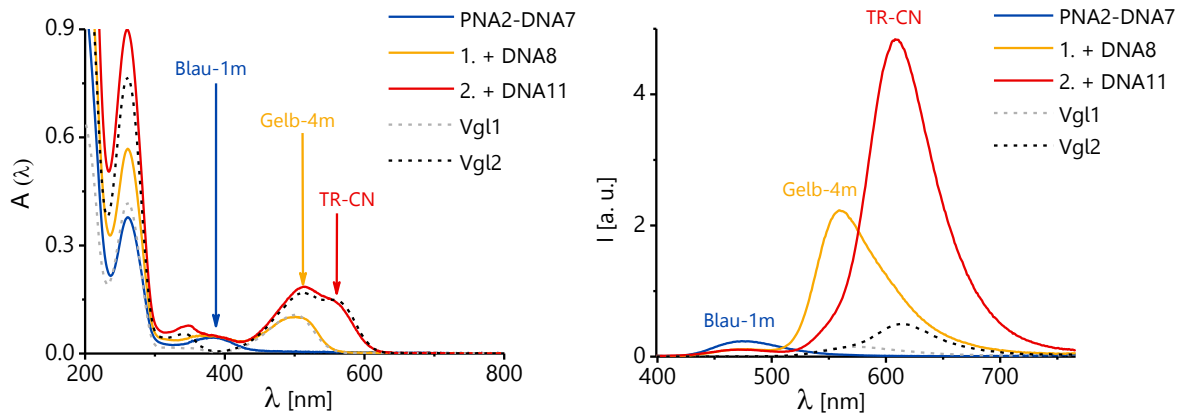


Abbildung 295: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA2-DNA7** mit **DNA8** und anschließend mit **DNA11**. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA8** (Vgl1) und aus **DNA7-DNA8-DNA11** (Vgl2).

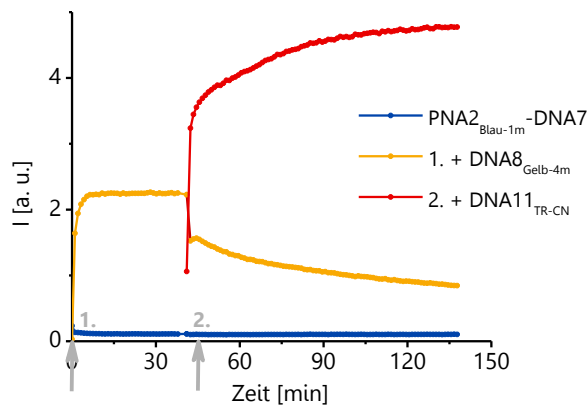


Abbildung 296: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität infolge der beiden Strangaustauschreaktionen von **PNA2-DNA7** mit **DNA8** (1.) und **DNA11** (2.).

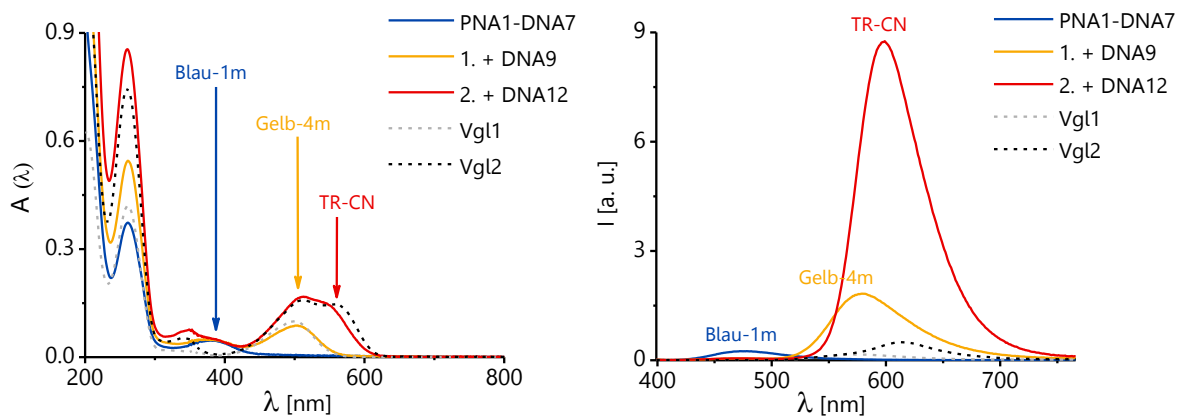


Abbildung 297: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA9** und anschließend mit **DNA12**. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA9** (Vgl1) und aus **DNA7-DNA9-DNA12** (Vgl2).

Daten der Strangaustauschexperimente

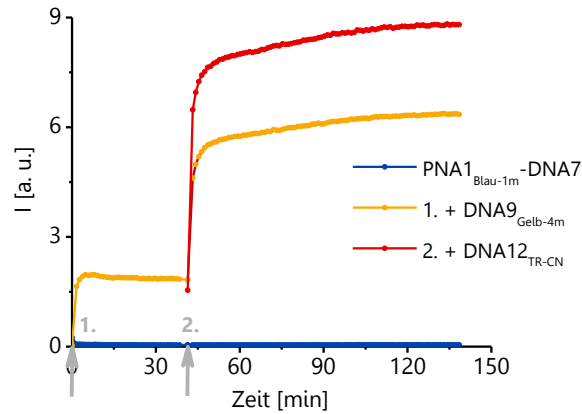


Abbildung 298: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität infolge der beiden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA9** (1.) und **DNA12** (2.).

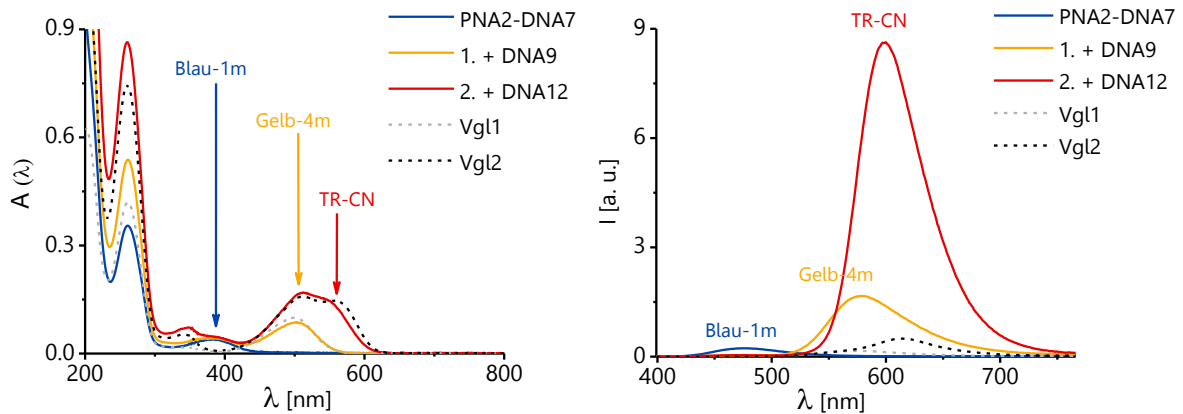


Abbildung 299: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA2-DNA7** mit **DNA9** und anschließend mit **DNA12**. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA9** (Vgl1) und aus **DNA7-DNA9-DNA12** (Vgl2).

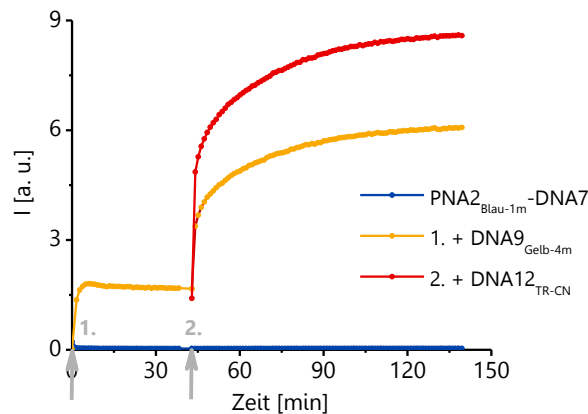


Abbildung 300: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität infolge der beiden Strangaustauschreaktionen von **PNA2-DNA7** mit **DNA9** (1.) und **DNA12** (2.).

Daten der Strangaustauschexperimente

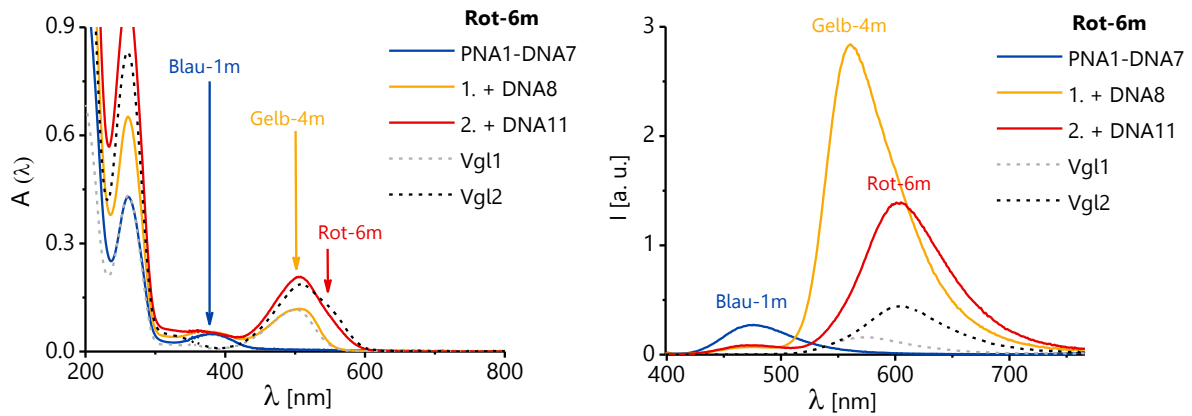


Abbildung 301: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA1-DNA7** mit **DNA8** und anschließend mit **DNA11_{Rot-6m}**. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA8** (Vgl1) und aus **DNA7-DNA8-DNA11_{Rot-6m}** (Vgl2a).

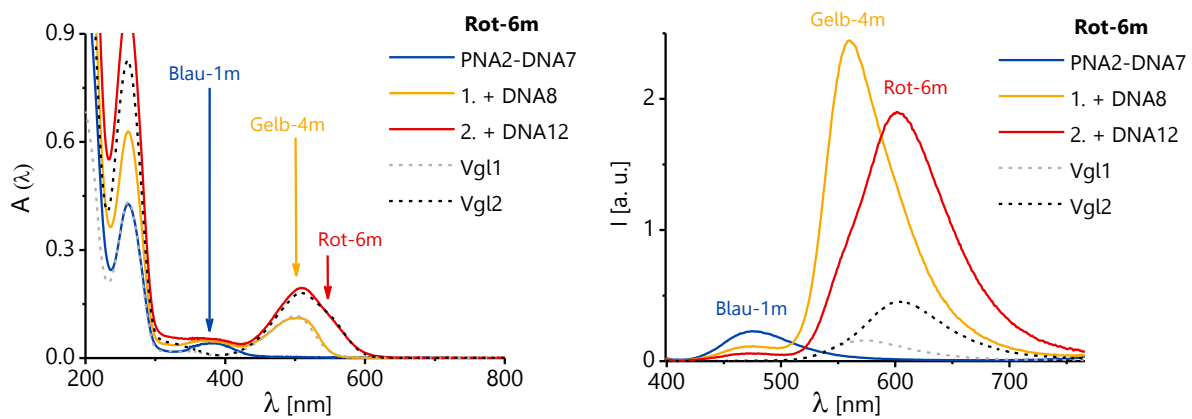


Abbildung 302: Absorptionsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) der beiden aufeinanderfolgenden Strangaustauschreaktionen von **PNA2-DNA7** mit **DNA8** und anschließend mit **DNA12_{Rot-6m}**. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichslösungen aus **DNA7-DNA8** (Vgl1) und aus **DNA7-DNA8-DNA12_{Rot-6m}** (Vgl2b).

acpcPNA-Hybrid	$\lambda_{exc.Do.}$ [nm]	$\lambda_{em.Do.}$ [nm]	$\lambda_{em.Ak.}$ [nm]	T_m [°C]
PNA1 _{Blau-1m} -DNA7	389	478	-	71.0
PNA2 _{Blau-1m} -DNA7				71.5
DNA14-DNA7	-			< 10
PNA1 _{Blau-1m} -DNA10	389	478	-	> 90
PNA2 _{Blau-1m} -DNA10				> 90
DNA14-DNA10	-			< 10
PNA1 _{Blau-1m} -DNA8 _{Gelb-4m}	389	478	560	78.2
PNA2 _{Blau-1m} -DNA8 _{Gelb-4m}			560	77.2
DNA14-DNA8 _{Gelb-4m}	-			< 20
PNA1 _{Blau-1m} -DNA9 _{Gelb-4m}	389	478	579	> 90
PNA2 _{Blau-1m} -DNA9 _{Gelb-4m}			579	82.7
DNA14-DNA9 _{Gelb-4m}	-			< 20
PNA1 _{Blau-1m} -DNA13	389	478	-	> 90
PNA2 _{Blau-1m} -DNA13			-	> 90
DNA14-DNA13	-			28.9
PNA1 _{Blau-1m} -DNA11 _{TR-CN}	389	478	603	> 90
PNA2 _{Blau-1m} -DNA11 _{TR-CN}			608	> 90
DNA14-DNA11 _{TR-CN}	-			-
PNA1 _{Blau-1m} -DNA11 _{Rot-6m}	389	478	602	78.5
PNA2 _{Blau-1m} -DNA11 _{Rot-6m}			603	81.1
PNA1 _{Blau-1m} -DNA12 _{TR-CN}	389	478	599	> 90
PNA2 _{Blau-1m} -DNA12 _{TR-CN}			599	> 90
DNA14-DNA12 _{TR-CN}	-			32.7

Tabelle 21: Anregungswellenlänge des Donors in **PNA1** bzw. **PNA2**, Emissionsmaxima der Donoren sowie der Akzeptoren bei den Strangaustauschreaktionen. Zugleich enthält die Tabelle eine Auflistung der gemessenen Schmelztemperaturen der gebildeten Heteroduplexe (1:1-Verhältnis von PNA zu DNA 7-, 10- oder 14-mer).

Spektren der Fluoreszenzlebenszeitmessungen

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten und die Auswertung der Abklingkurven erfolgte analog der in Abschnitt 8.6 beschriebenen Methodik.

Die mit dem Programm *DAS6 v 6.8 decay analysis (Horiba)*, wobei die Fluoreszenzlebenszeiten der Donoren in Abwesenheit des jeweiligen Akzeptors mit einer monoexponentiellen (Gleichung 8.2) und bei Gegenwart des Akzeptors mit einer biexponentiellen Fitfunktion (Gleichung 8.3) angepasst wurden.

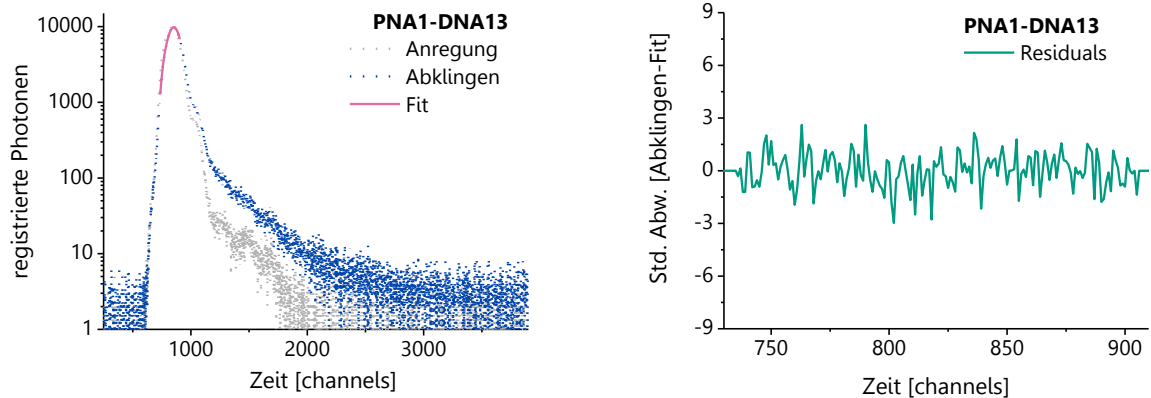


Abbildung 303: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA1-DNA13** (τ_{Do}).

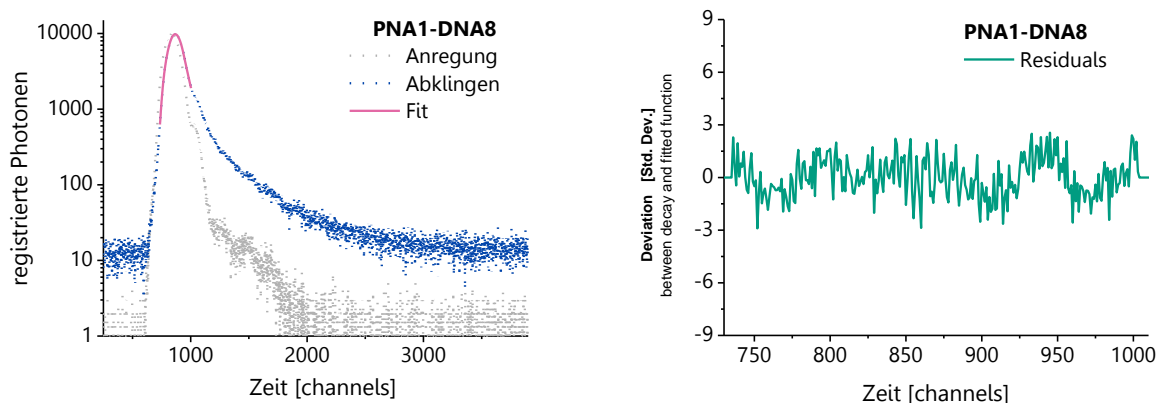


Abbildung 304: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA1-DNA8** (τ_{Do+Ak}).

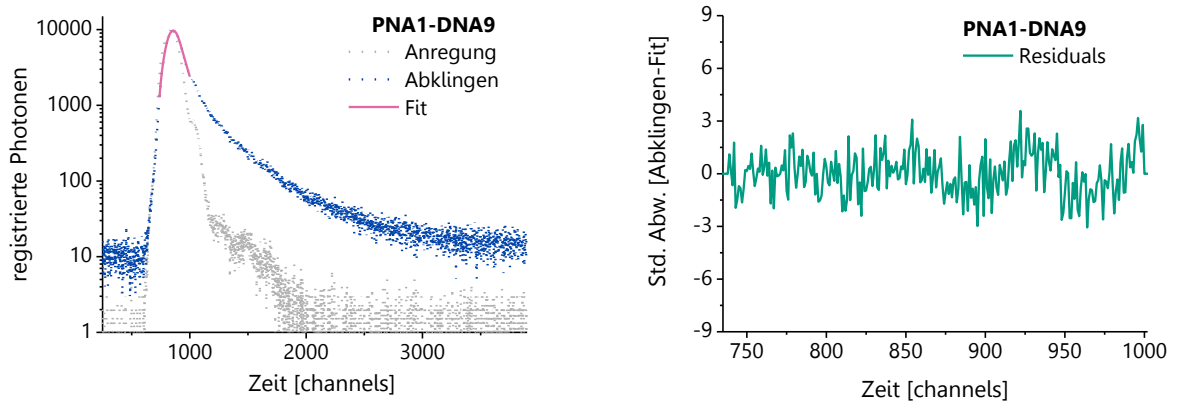


Abbildung 305: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA1-DNA9** (τ_{Do+Ak}).

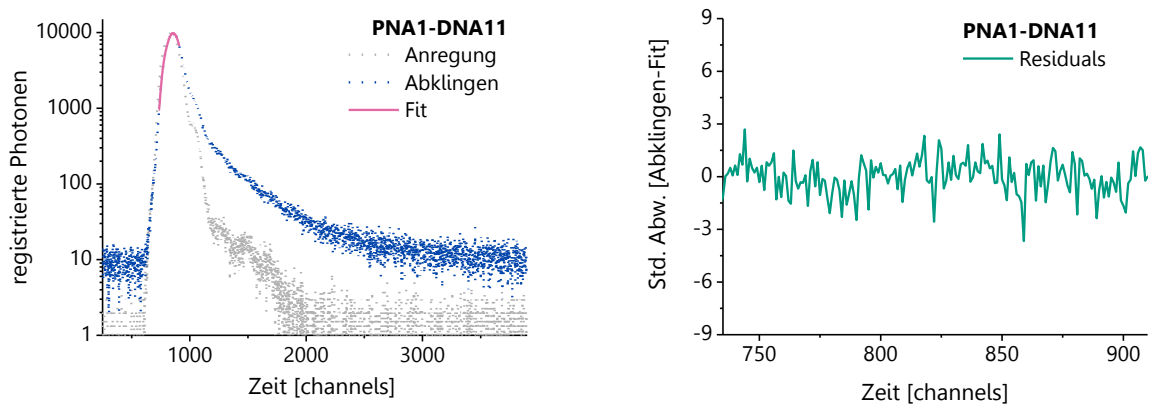


Abbildung 306: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA1-DNA11** (τ_{Do+Ak}).

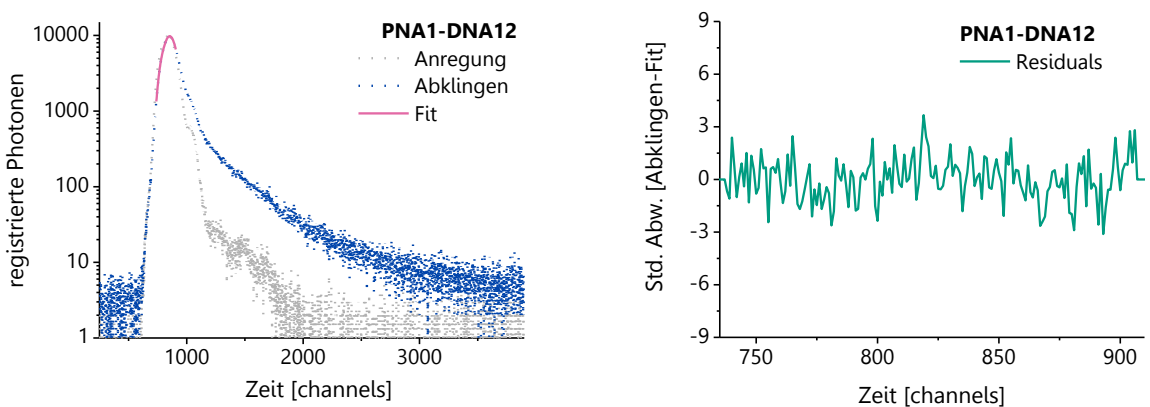


Abbildung 307: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA1-DNA12** (τ_{Do+Ak}).

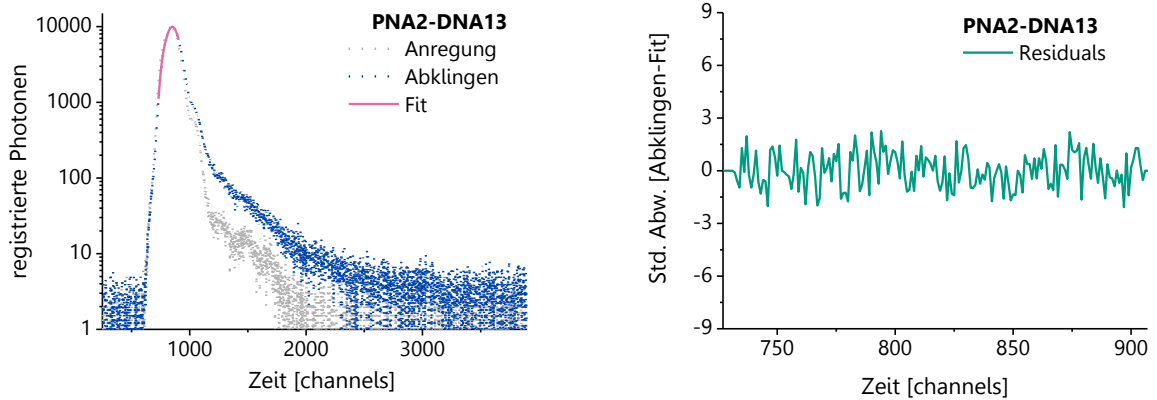


Abbildung 308: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA2-DNA13** (τ_{Do}).

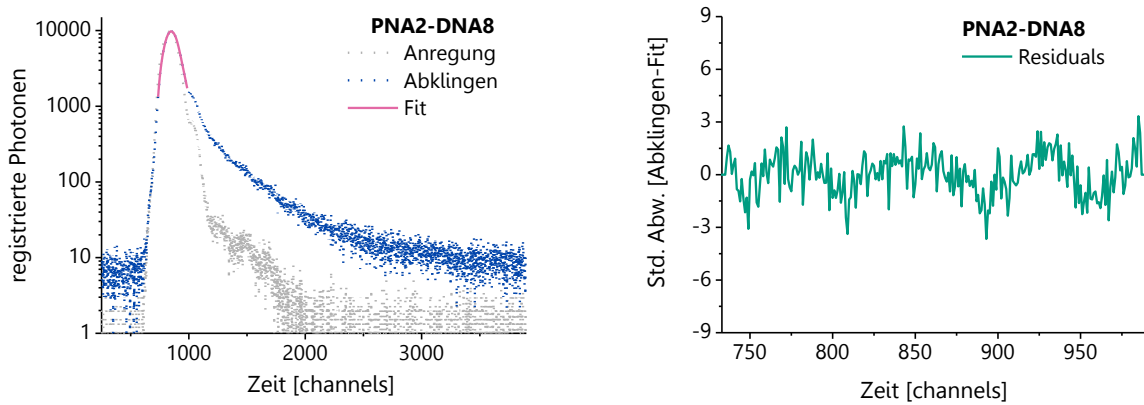


Abbildung 309: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA2-DNA8** (τ_{Do+Ak}).

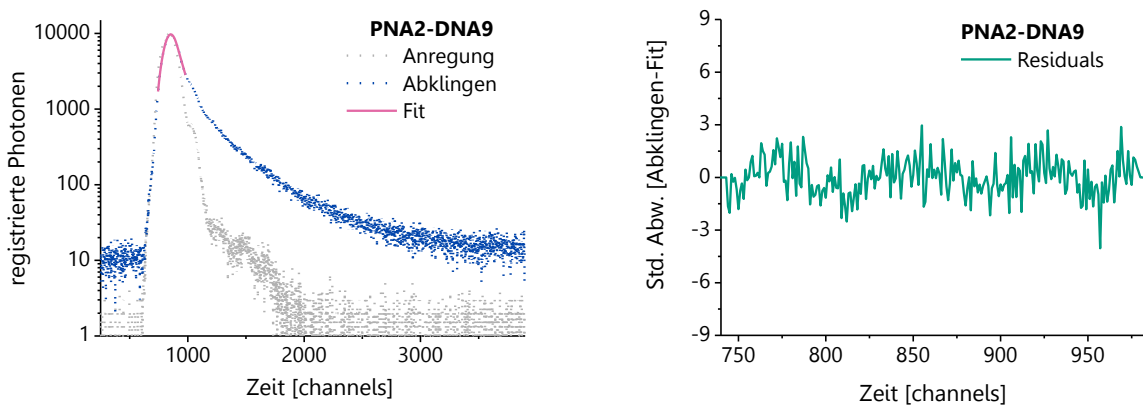


Abbildung 310: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA2-DNA9** (τ_{Do+Ak}).

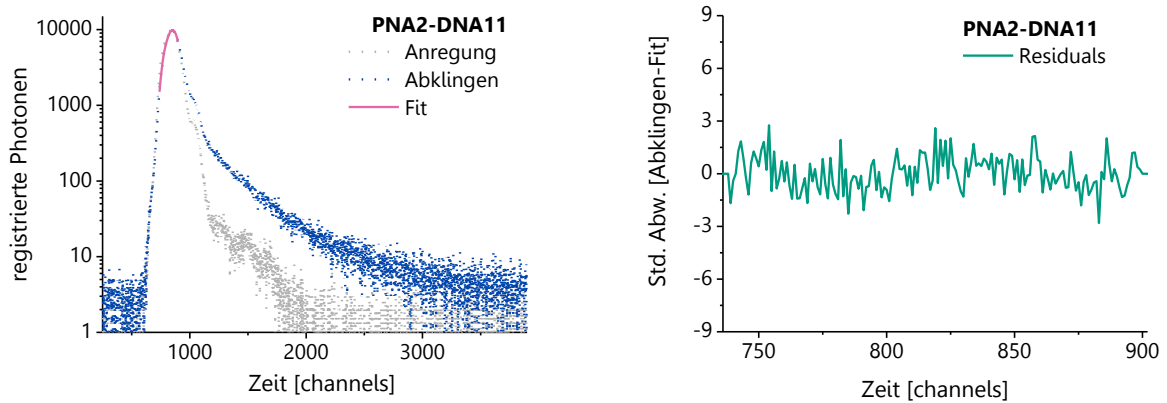


Abbildung 311: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA2-DNA11** (τ_{Do+Ak}).

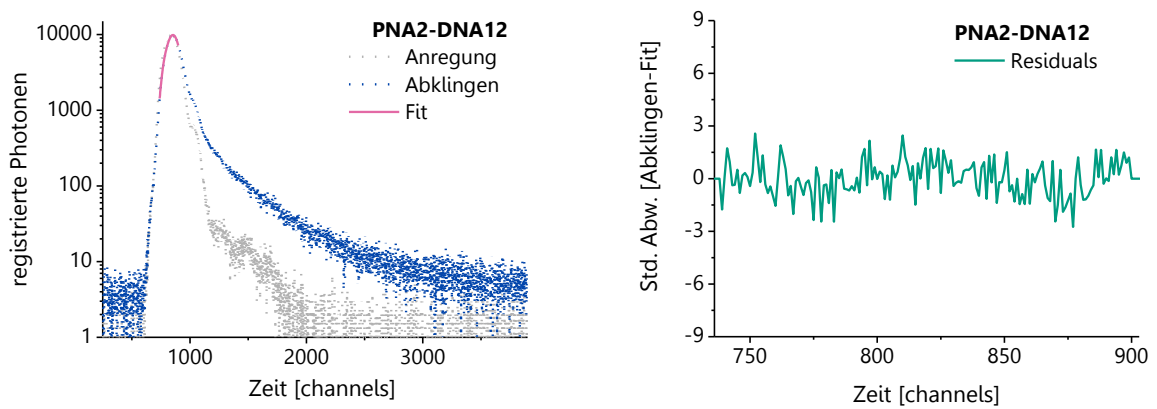


Abbildung 312: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA2-DNA12** (τ_{Do+Ak}).

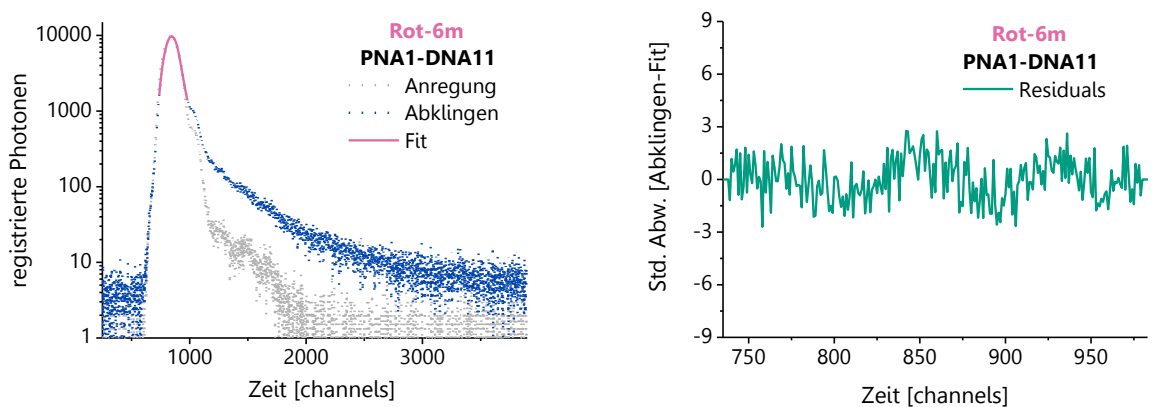


Abbildung 313: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA2-DNA11_{Rot-6m}** (τ_{Do+Ak}).

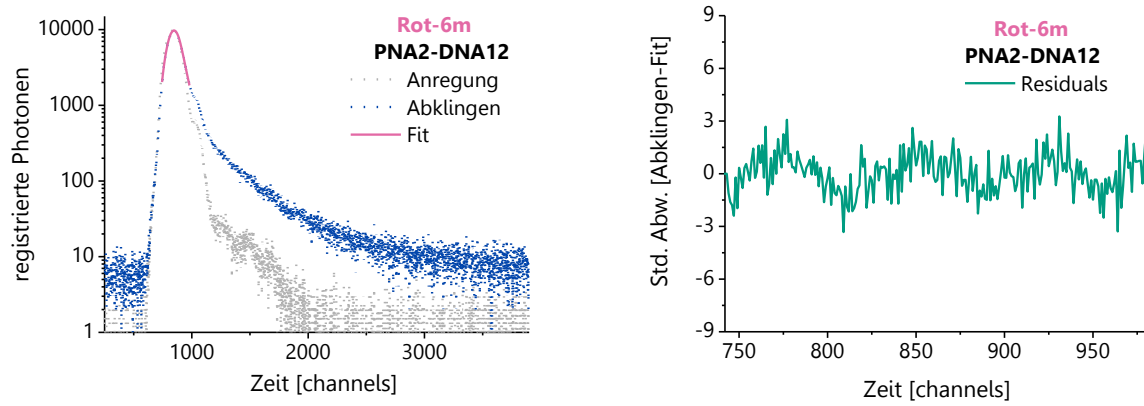


Abbildung 314: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA2-DNA12_{Rot-6m}** (τ_{Do+Ak}).

Überlappungsintegrale

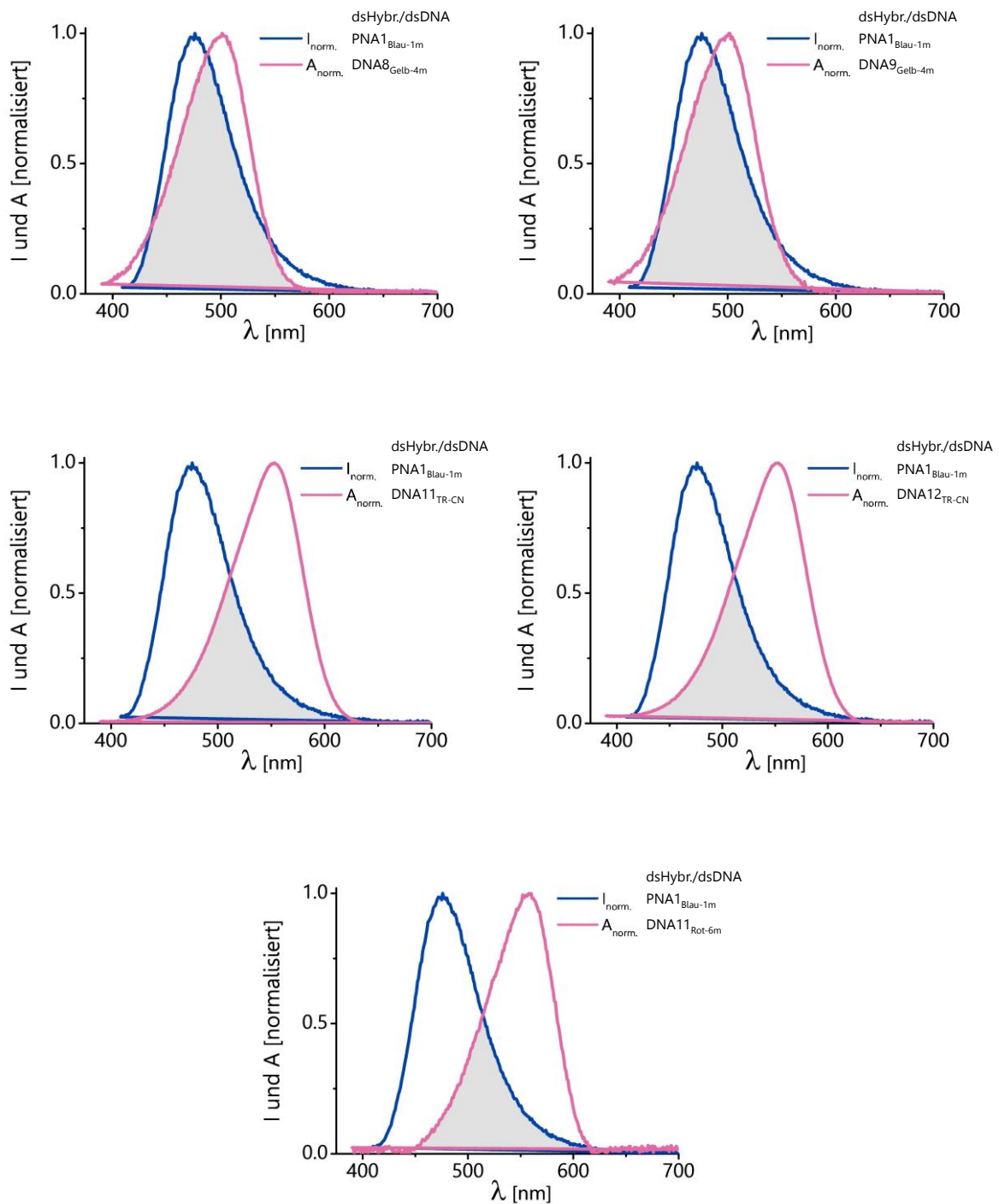


Abbildung 315: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrum der **PNA1^{Blau-1m}** mit dem jeweiligen normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum der DNA. Akzeptor-DNA: Oben: **DNA^{Gelb-4m}** und **DNA9^{Gelb-4m}**, Mitte: **DNA11^{TR-CN}** und **DNA12^{TR-CN}**, Unten: **DNA11^{Rot-6m}**.

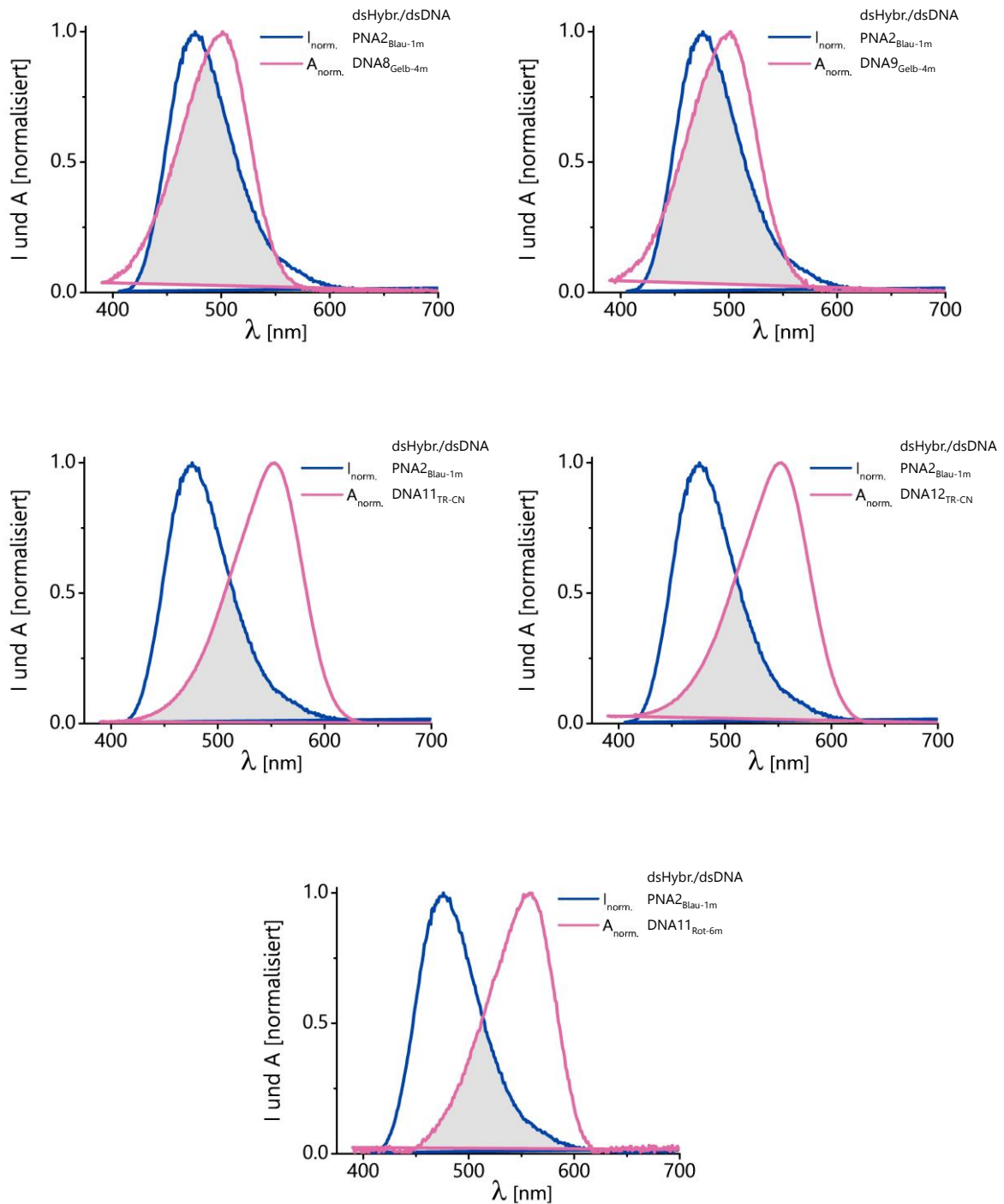


Abbildung 316: Überlappung des normierten Donor-Emissionsspektrum der **PNA2_{Blau-1m}** mit dem jeweiligen normierten Akzeptor-Absorptionsspektrum der DNA. Akzeptor-DNA: Oben: **DNA_{Gelb-4m}** und **DNA9_{Gelb-4m}**, Mitte: **DNA11_{TR-CN}** und **DNA12_{TR-CN}**, Unten: **DNA11_{Rot-6m}**.

Übersichtstabelle der Fluoreszenzlebenszeiten des Donors und der ET-Effizienzen sowie deren Standardabweichungen

PNA (Do)	DNA (Akzeptor)	τ [sec]	$\Delta\tau$ [sec]	$\Delta\tau$ [%]	$E_{(r)}$	$\Delta E_{(r)}$ [%]	$\Delta E_{(r)}$
PNA1 Blau-1m	-	1.606E-09	5.364E-11	3.34	-	-	-
	DNA8 _{Gelb-4m}	2.930E-10	3.706E-11	12.65	0.818	15.99	0.131
	DNA9 _{Gelb-4m}	3.368E-10	3.854E-11	11.44	0.790	14.78	0.117
	DNA11 _{TR-CN}	1.418E-11	1.448E-12	10.22	0.991	13.56	0.134
	DNA12 _{TR-CN}	2.890E-11	3.710E-12	12.84	0.982	16.18	0.159
	DNA11 _{Rot-6m}	8.244E-10	1.162E-10	14.10	0.487	17.44	0.085
PNA2 Blau-1m	-	1.528E-09	3.773E-11	2.47	-	-	-
	DNA8 _{Gelb-4m}	3.375E-10	3.820E-11	11.32	0.779	13.79	0.107
	DNA9 _{Gelb-4m}	3.820E-10	3.747E-11	9.81	0.750	12.28	0.092
	DNA11 _{TR-CN}	3.408E-11	5.096E-13	1.50	0.978	3.96	0.039
	DNA12 _{TR-CN}	2.586E-11	9.759E-13	3.77	0.983	6.24	0.061
	DNA12 _{Rot-6m}	7.411E-10	6.409E-11	8.65	0.515	11.12	0.057

Tabelle 22: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{Do} bzw. τ_{Do+Ak} der Heteroduplexe mit **PNA1** und **PNA2**, der ET-Effizienzen sowie deren berechnete Standardabweichungen.

Übersichtstabelle der Fluoreszenzlebenszeiten des Akzeptors und der Parameter $I_{(0)}$, $I_{(Do.)}$ sowie $I_{(Ak.)}$

PNA (Do)	DNA (Akzeptor)	τ_{Ak} [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [%]	$I_{(0)}$	$I_{(Do.)}$	$I_{(Ak.)}$
PNA1 Blau-1m	-	-	-	-	9.79E+2	1.05E-1	-
	DNA8 _{Gelb-4m}	1.494E-9	1.31E-11	0.87	3.38E+2	-3.75E-2	3.70E-2
	DNA9 _{Gelb-4m}	2.057E-9	2.26E-11	1.10	2.64E+2	-2.97E-2	3.10E-2
	DNA11 _{TR-CN}	7.394E-10	2.59E-11	3.50	9.52E+2	1.91E+0	3.50E-2
	DNA12 _{TR-CN}	7.050E-10	4.68E-11	6.63	1.33E+3	6.91E-1	3.12E-2
	DNA11 _{Rot-6m}	1.007E-9	1.93E-11	1.91	4.37E+2	-1.63E-1	1.28E-1
PNA2 Blau-1m	-	-	-	-	8.50E+2	1.23E-1	-
	DNA8 _{Gelb-4m}	1.599E-9	2.260E-11	1.41	-2.5E+1	-3.86E-2	3.76E-2
	DNA9 _{Gelb-4m}	1.945E-9	2.196E-11	1.13	4.33E+2	-3.40E-2	3.55E-2
	DNA11 _{TR-CN}	6.255E-10	4.025E-11	6.44	1.47E+3	5.55E-1	3.42E-2
	DNA12 _{TR-CN}	6.909E-10	4.270E-11	6.18	1.41E+3	7.74E-1	3.39E-2
	DNA12 _{Rot-6m}	1.129E-9	2.483E-11	2.20	5.17E+2	-1.23E-1	1.27E-1

Tabelle 23: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{Ak} der Heteroduplexe mit **PNA1** und **PNA2** sowie der Parameter $I_{(0)}$, $I_{(Do.)}$ und $I_{(Ak.)}$.

Übersichtstabelle der erhaltenen und berechneten Daten aus den Fluoreszenzlebenszeit-Messungen

PNA (Do)	DNA (Akzeptor)	$J(\lambda)$ [10^{12} $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot nm^4$]	ϕ_{Do} PNA	R_0 Förster [nm]	$E_{(r)}$ Hybrid	r	r/ R_0
PNA1 Blau-1m	DNA8 _{Gelb-4m}	1489	0.028	2.80	0.818	2.18	0.78
	DNA9 _{Gelb-4m}	1433		2.78	0.790	2.23	0.80
	DNA11 _{TR-CN}	1337		2.75	0.991	1.25	0.46
	DNA12 _{TR-CN}	1543		2.82	0.982	1.45	0.51
	DNA11 _{Rot-6m}	1083		2.66	0.487	2.68	1.01
PNA2 Blau-1m	DNA8 _{Gelb-4m}	1418	0.028	2.78	0.779	2.25	0.81
	DNA9 _{Gelb-4m}	1367		2.76	0.750	2.30	0.83
	DNA11 _{TR-CN}	1257		2.72	0.978	1.45	0.53
	DNA12 _{TR-CN}	1458		2.79	0.983	1.42	0.51
	DNA12 _{Rot-6m}	1030		2.63	0.515	2.61	0.99

Tabelle 24: Zusammenstellung der Donor-Akzeptor-Abstände r, die aus den entsprechenden ET-Effizienzen berechnet wurden. Aufgeführt sind ebenfalls die Werte der Förster-Radien R_0 , dem Quotient r/R_0 und Überlappungsintegrale der kombinierten Farbstoffpaare.

8.9 Duplex-Invasion mit acpcPNA

Sequenzen einzelsträngiger DNA (ssDNA)

ssDNA-Stränge:

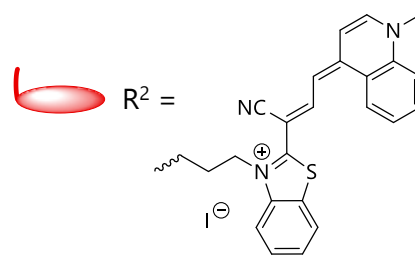
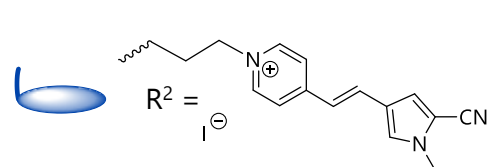
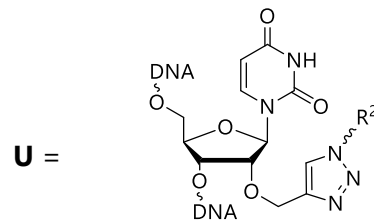
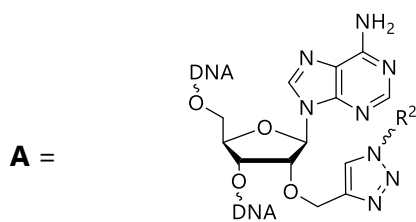
DNA20 3'-GGC-TCC-TT-AA-TAT-ATA-AAG-AAA-TT-CCT-CGG-5'

DNA21 5'-CCG-AGG-AA-TT-ATA-TAT-TTC-TTT-AA-GGA-GCC-3'

DNA 5'-CCG-AGG-AA-TT-ATA--TTC-TTT-AA-GGA-GCC-3'

DNA22 -TAT- **DNA23** -TAU-

DNA24 -TAT- **DNA25** -TAU-



DNA26 3'-AA-TAT-ATA-AAG-AAA-5'

DNA27 5'-TT-ATA-ATA-TTC-TTT-3'

Abbildung 317: Sequenzen von einzelsträngiger **dsDNA20** bis **dsDNA27** und die zur Modifikation verwendeten Farbstoffe.

Spektren und Daten zur Duplexinvasion mit acpPNA

Alle Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei einer Konzentration von jeweils 2.5 μM PNA als auch DNA-Strängen in 10 mM NaPi-Puffer (pH = 7) durchgeführt. Die Emissionsspektren wurden bei einer Eingangs- sowie Ausgangspalteinstellung von 3 nm aufgezeichnet. Im Anschluss an die gemessenen Spektren führt eine Tabelle die Anregungswellenlänge des Donors in **PNA4** bzw. **PNA6** sowie der **dsDNA15** und **dsDNA16**, alle Emissionsmaxima der Donoren sowie der Akzeptoren auf. Nachfolgend geben diverse Tabellen Auskunft über die gemessenen Schmelztemperaturen der Duplexe und über die ermittelten Kontrast- sowie Anstiegsfaktoren.

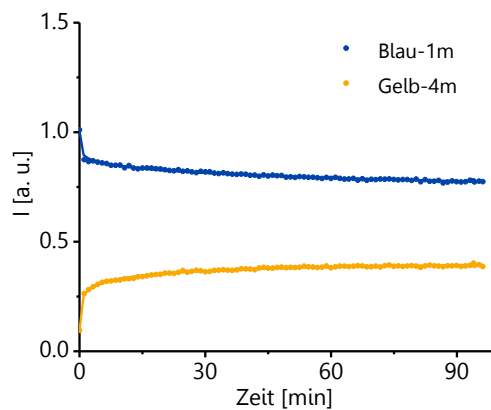


Abbildung 318: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität von **dsDNA15** infolge der Zugabe von jeweils 1.0 Äquivalent **PNA3** und **PNA5**.

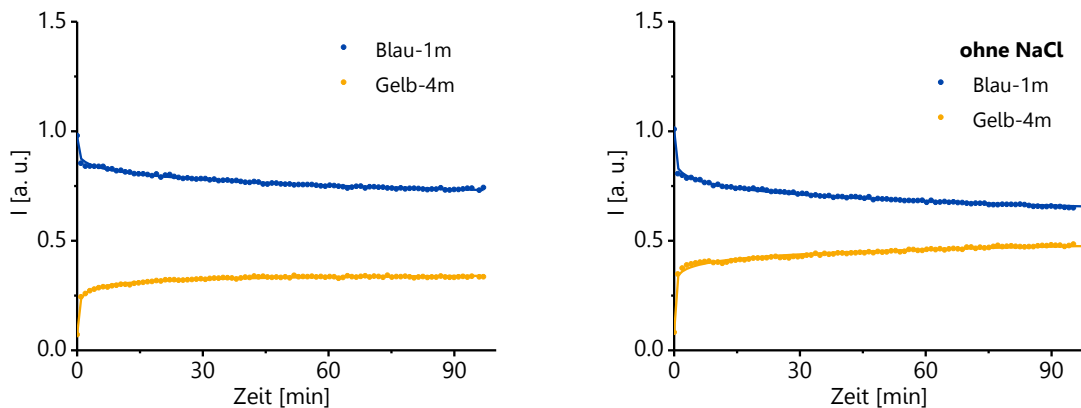


Abbildung 319: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität von **dsDNA16** infolge der Zugabe von jeweils 1.0 Äquivalent **PNA3** und **PNA5**, in Anwesenheit (links) und in Abwesenheit von 250 mM NaCl (rechts).

Daten der Duplexinvasion

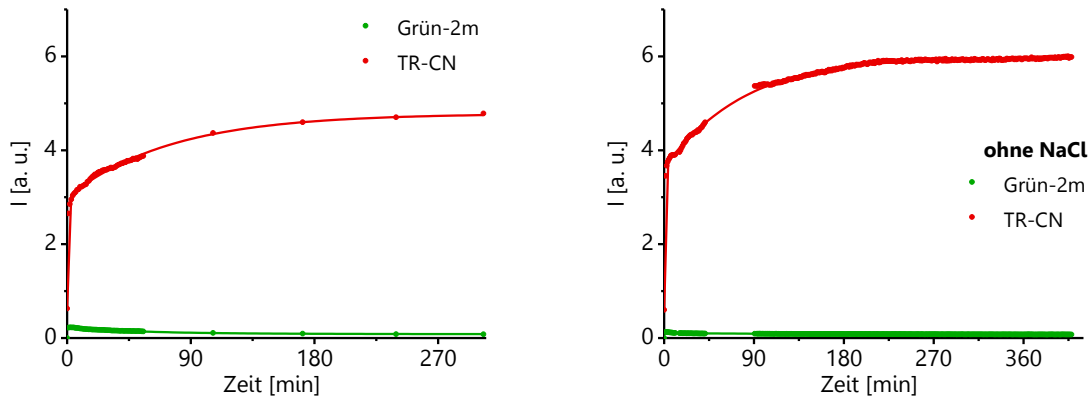


Abbildung 320: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität von **dsDNA17** infolge der Zugabe von jeweils 1.0 Äquivalent **PNA4** und **PNA5**, in Anwesenheit (links) und in Abwesenheit von 250 mM NaCl (rechts).

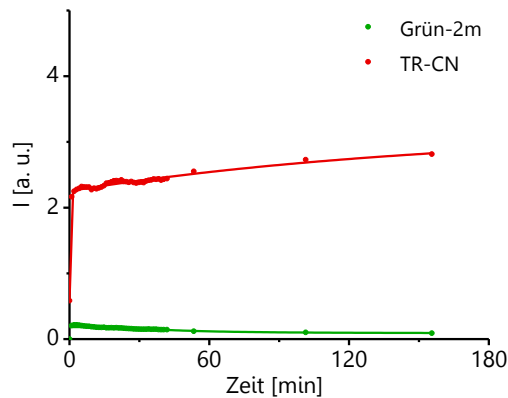


Abbildung 321: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität von **dsDNA18** infolge der Zugabe von jeweils 1.0 Äquivalent **PNA4** und **PNA5**.

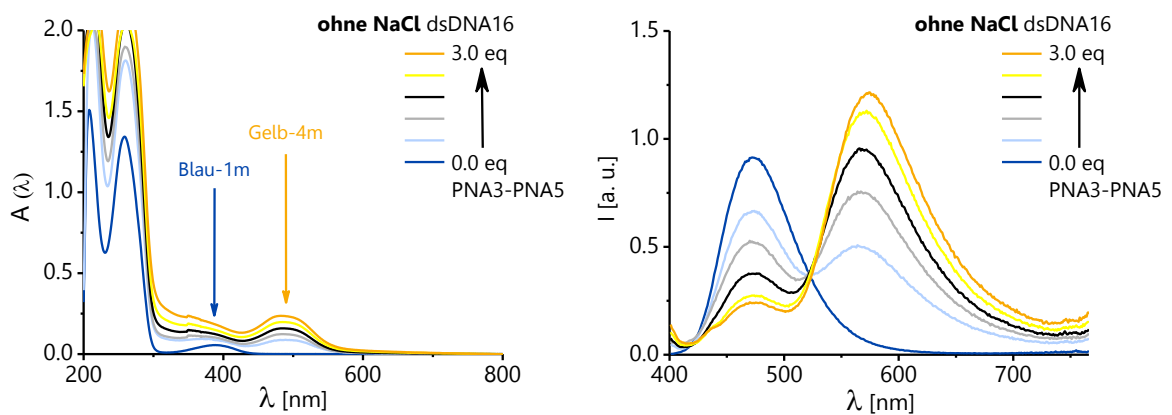


Abbildung 322: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der Titration von **dsDNA16** mit **PNA3** und **PNA5**.

Daten der Duplexinvasion

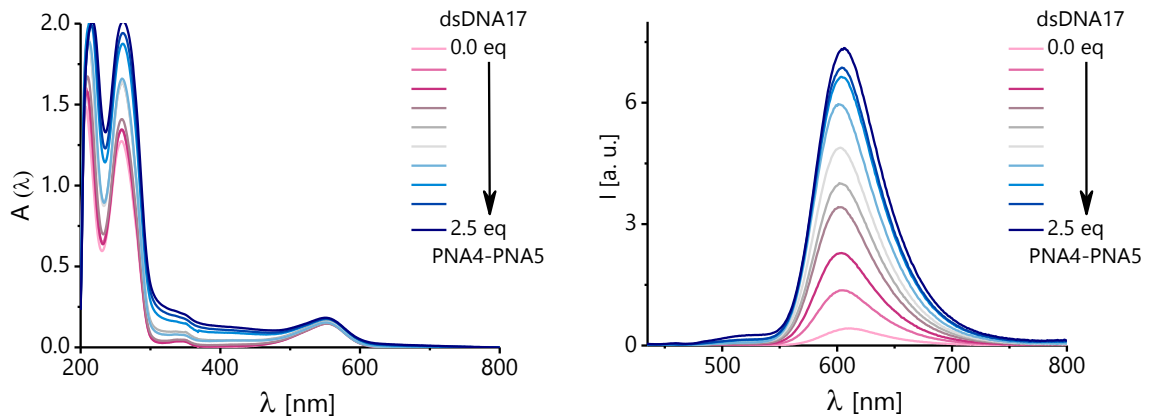


Abbildung 323: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der Titration von **dsDNA17** mit **PNA4** und **PNA5**.

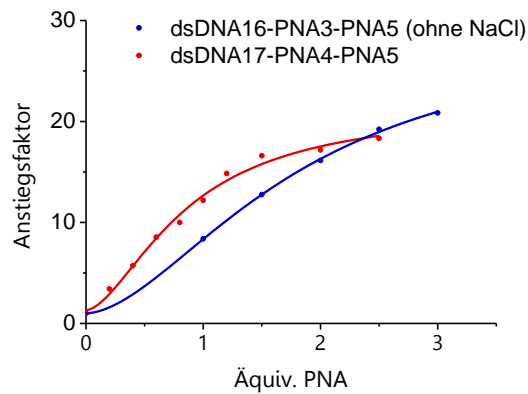


Abbildung 324: Verlauf des Anstiegsfaktors im Zuge der Titration von **dsDNA16** mit **PNA3** und **PNA5** bzw. **dsDNA17** mit **PNA4** und **PNA5**.

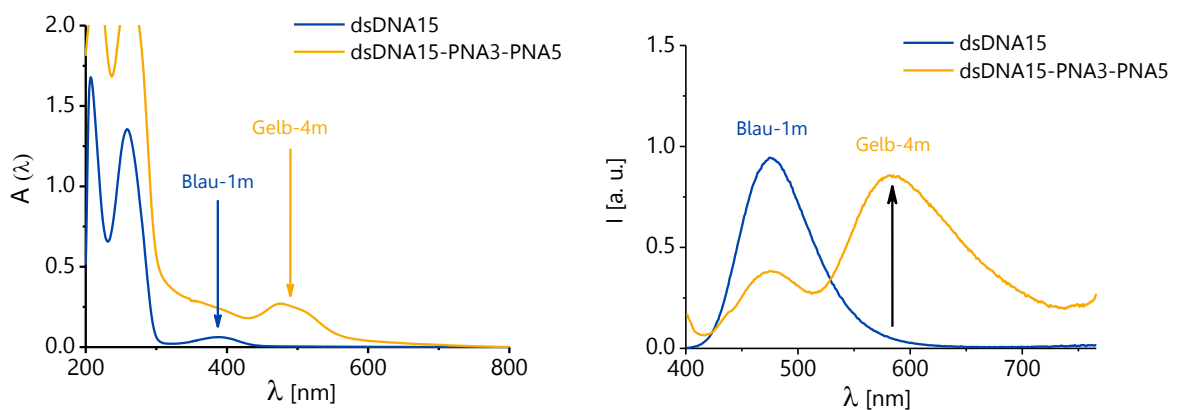


Abbildung 325: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA15-PNA3-PNA5**.

Daten der Duplexinvasion

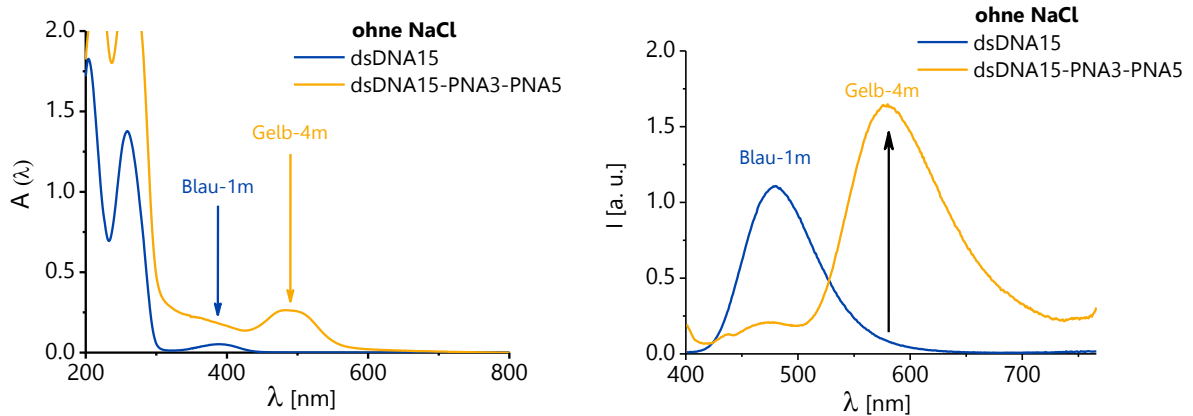


Abbildung 326: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA15-PNA3-PNA5** (ohne NaCl).

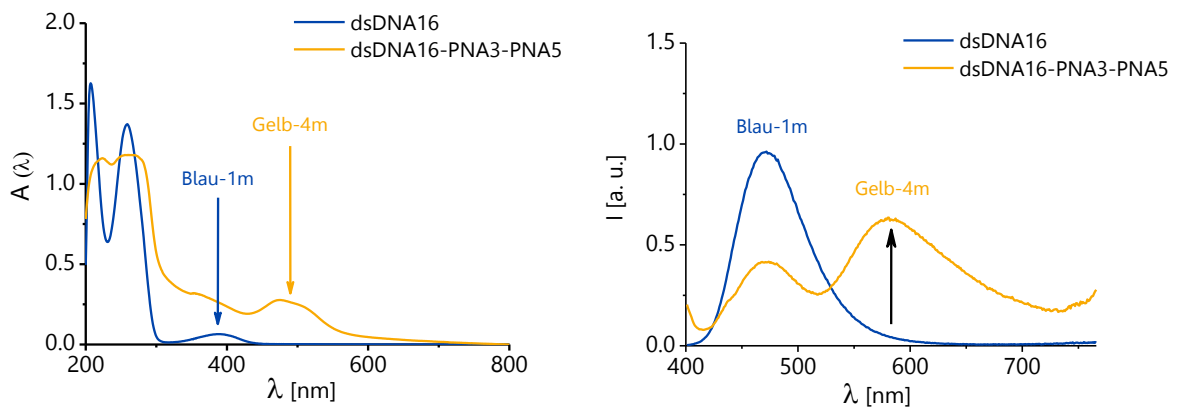


Abbildung 327: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA16-PNA3-PNA5**.

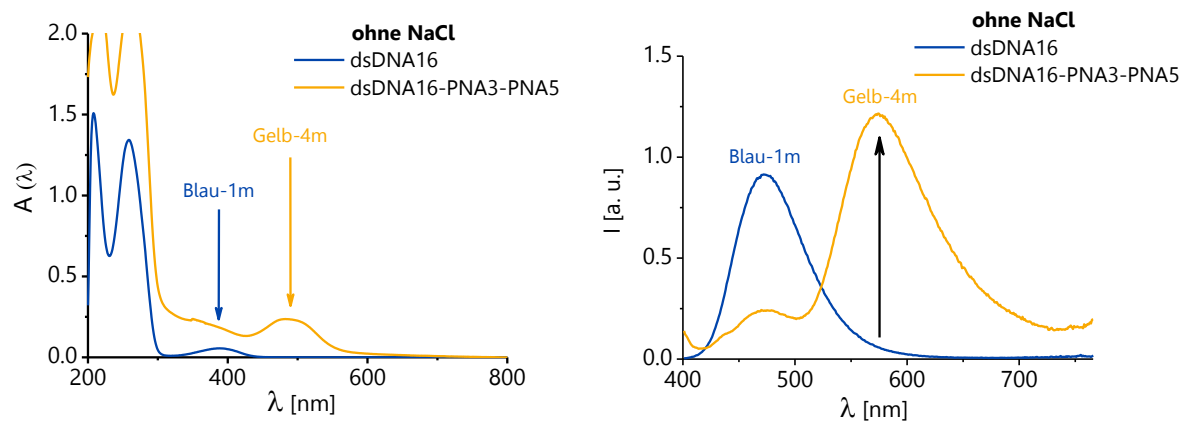


Abbildung 328: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA16-PNA3-PNA5** (ohne NaCl).

Daten der Duplexinvasion

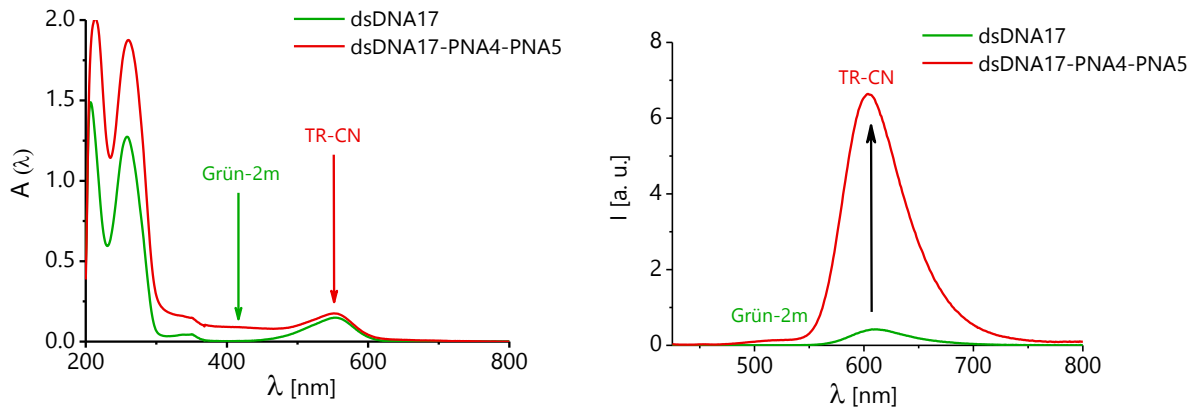


Abbildung 329: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA17-PNA4-PNA5**.

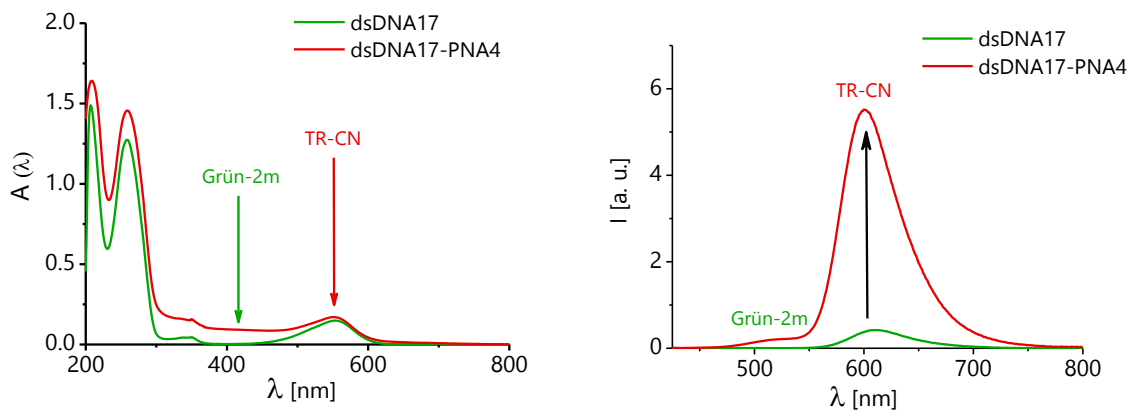


Abbildung 330: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA17-PNA4**.

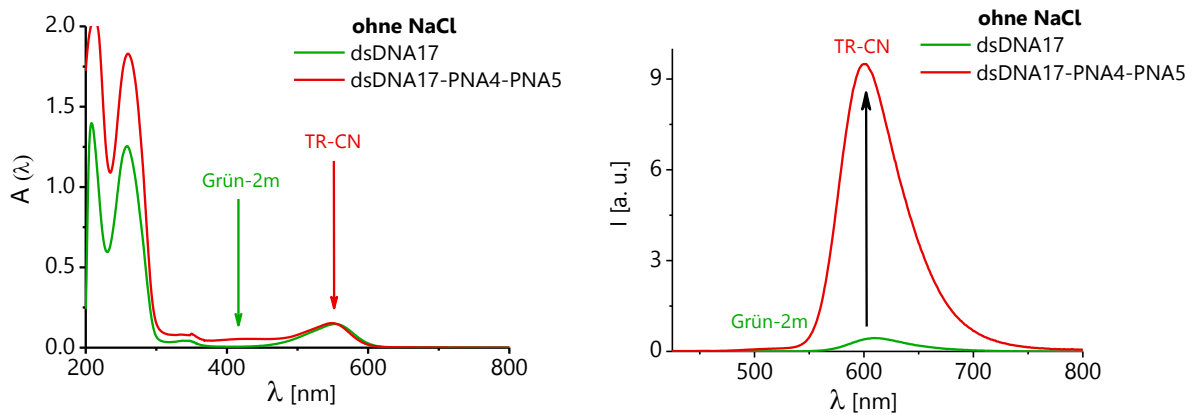


Abbildung 331: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA17-PNA4-PNA5** (ohne NaCl).

Daten der Duplexinvasion

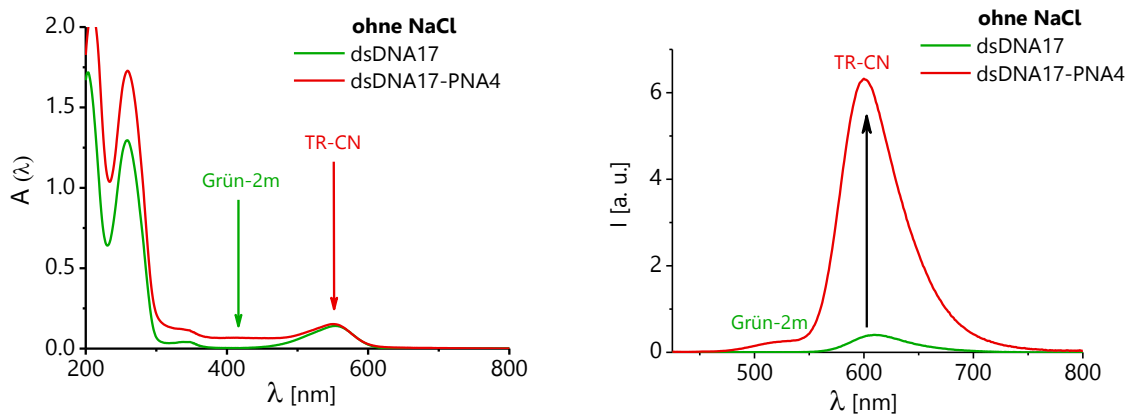


Abbildung 332: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA17-PNA4** (ohne NaCl).

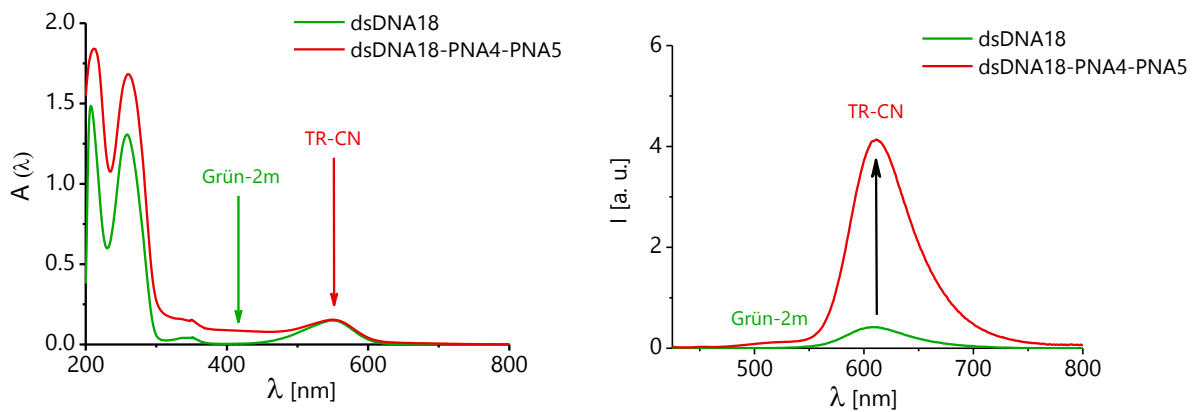


Abbildung 333: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA18-PNA4-PNA5**.

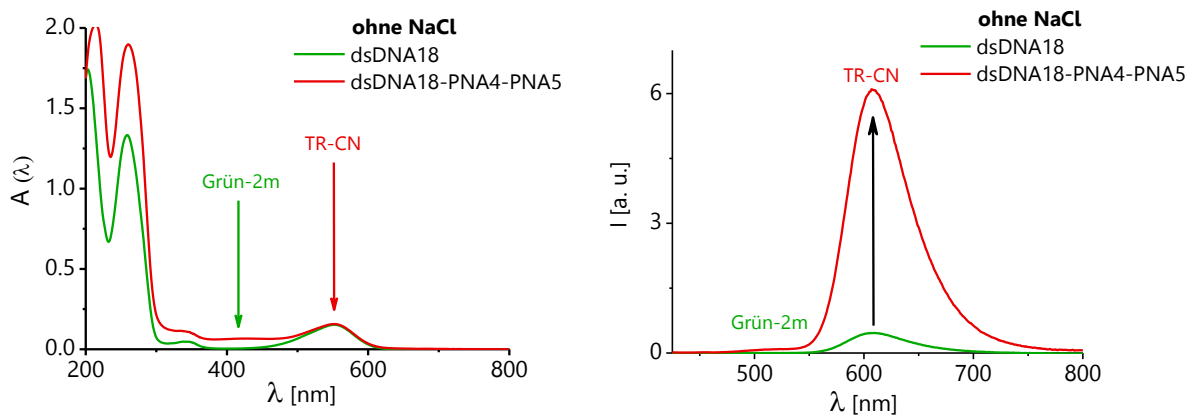


Abbildung 334: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA18-PNA4-PNA5** (ohne NaCl).

Daten der Duplexinvasion

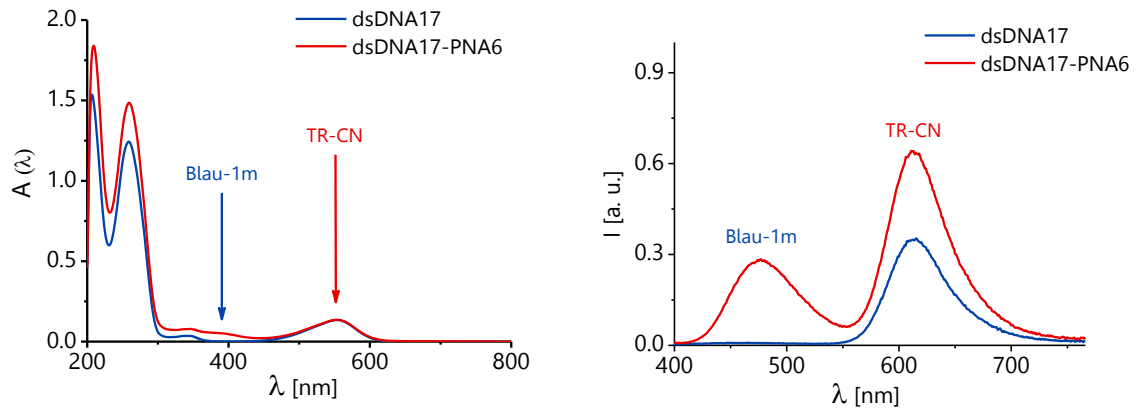


Abbildung 335: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit mit **dsDNA17-PNA6** (*non-sense*).

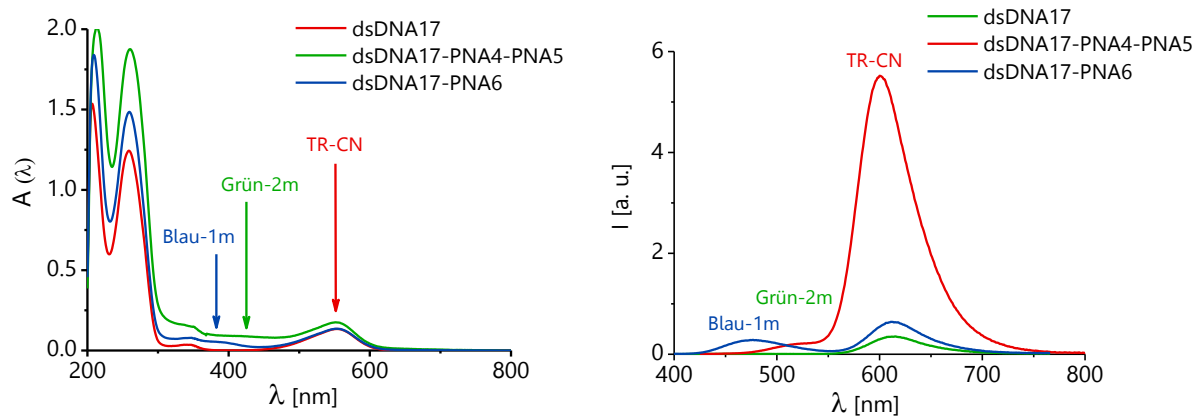


Abbildung 336: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) des Invasionsexperimentes mit **dsDNA17-PNA4-PNA5** sowie mit **dsDNA17-PNA6** (*non-sense*).

Übersichtstabelle der Emissionsmaxima, des Kontrastfaktors und des Anstiegfaktors

acpcPNA-DNA-Hybrid	$\lambda_{\text{exc.Do.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.Do.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em.Ak.}}$ [nm]	f_{Kontrast}	f_{Anstieg}
dsDNA15	391	477	-		
dsDNA15 (ohne NaCl)		477	-		
dsDNA15-PNA3-PNA5		475	585	2.1	18.1
dsDNA15-PNA3-PNA5 (ohne NaCl)		477	580	7.5	19.6
dsDNA16		477	-		
dsDNA16 (ohne NaCl)		477	-		
dsDNA16-PNA3-PNA5		472	583	1.4	14.6
dsDNA16-PNA3-PNA5 (ohne NaCl)		475	574	4.8	20.8
PNA4-DNA27	420	528	-		
PNA4-DNA27 (ohne NaCl)		528	-		
dsDNA17-PNA4-PNA5		528	604	43.0	16.6
dsDNA17-PNA4-PNA5 (ohne NaCl)		527	601	23.7	14.4
dsDNA17-PNA4		527	601	87.0	23.2
dsDNA17-PNA4 (ohne NaCl)		528	600	23.0	17.4
dsDNA18-PNA4-PNA5		529	611	28.6	9.98
dsDNA18-PNA4-PNA5 (ohne NaCl)		528	608	61.1	13.3
dsDNA17-PNA6 (<i>non-sense</i>)	391	477	609	2.2	1.8

Tabelle 25: Anregungswellenlängen, Emissionsmaxima der Donoren sowie der Akzeptoren. Zugleich enthält die Tabelle eine Auflistung der ermittelten Kontrastfaktoren und Anstiegfaktoren.

Übersichtstabelle der gemessenen Schmelztemperaturen

Duplex	T_m [°C] mit NaCl	T_m [°C] mit NaCl
dsDNA15	68.7	49.4
dsDNA16	69.0	50.4
dsDNA17	69.7	51.3
dsDNA18	70.5	50.7
dsDNA19	39.0	19.1
DNA16-DNA15	70.4	48.7
PNA3-DNA22	> 90	> 90
PNA3-DNA23	> 90	> 90
PNA3-DNA21	> 90	82.8
PNA4-DNA24	> 90	> 90
PNA4-DNA25	> 90	> 90
PNA4-DNA21	> 90	88.6
DNA26-DNA21	36.5	17.1
PNA3-PNA5	< 10	< 10
PNA4-PNA5	< 10	< 10
DNA26-PNA5	> 90	> 90
PNA3-DNA27	> 90	> 90
PNA4-DNA27	> 90	> 90
DNA26-DNA27	36.3	15.5

Tabelle 26: Auflistung der gemessenen Schmelztemperaturen der Heteroduplexe

(1:1-Verhältnis von PNA zu DNA).

Spektren der Fluoreszenzlebenszeitmessungen

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten und die Auswertung der Abklingkurven erfolgte analog der in Abschnitt 8.6 beschriebenen Methodik.

Die mit dem Programm *DAS6 v 6.8 decay analysis (Horiba)*, wobei die Fluoreszenzlebenszeiten der Donoren in Abwesenheit des jeweiligen Akzeptors mit einer monoexponentiellen (Gleichung 8.2) und bei Gegenwart des Akzeptors mit einer biexponentiellen Fitfunktion (Gleichung 8.3) angepasst wurden.

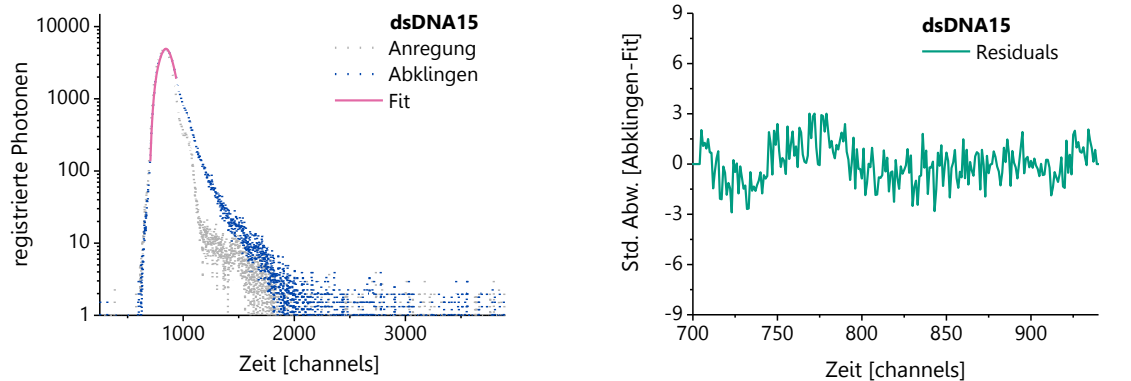


Abbildung 337: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA15** (τ_{D0}).

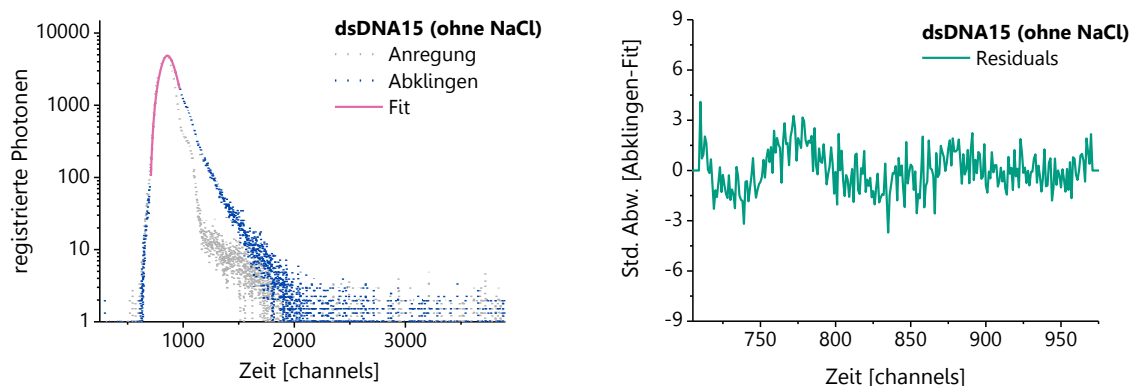


Abbildung 338: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA15** (τ_{D0}) in Abwesenheit von NaCl.

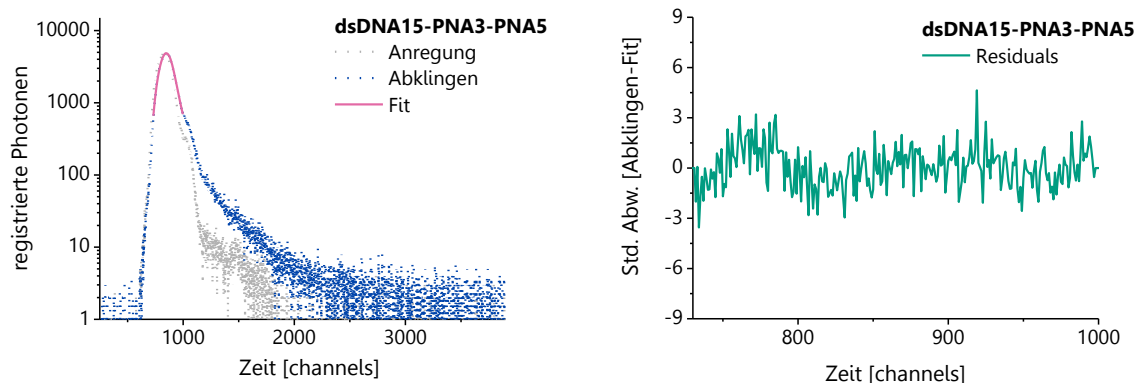


Abbildung 339: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA15-PNA3-PNA5** (τ_{Do+Ak}).

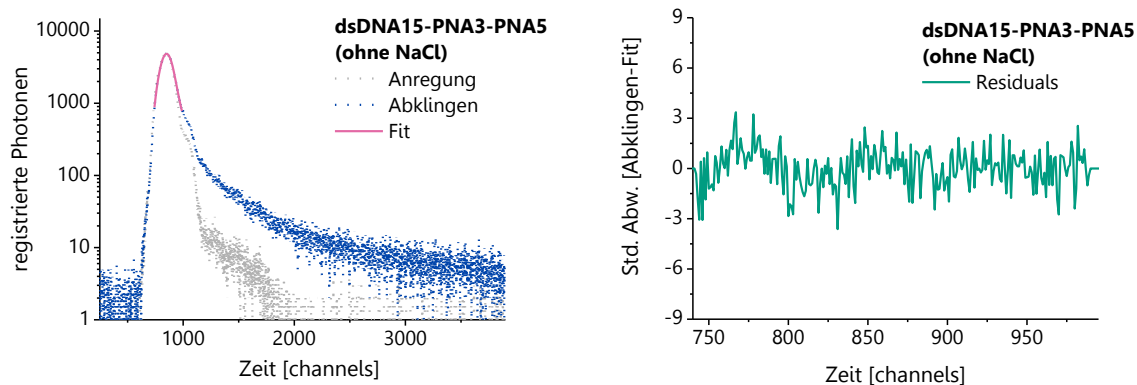


Abbildung 340: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA15-PNA3-PNA5** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

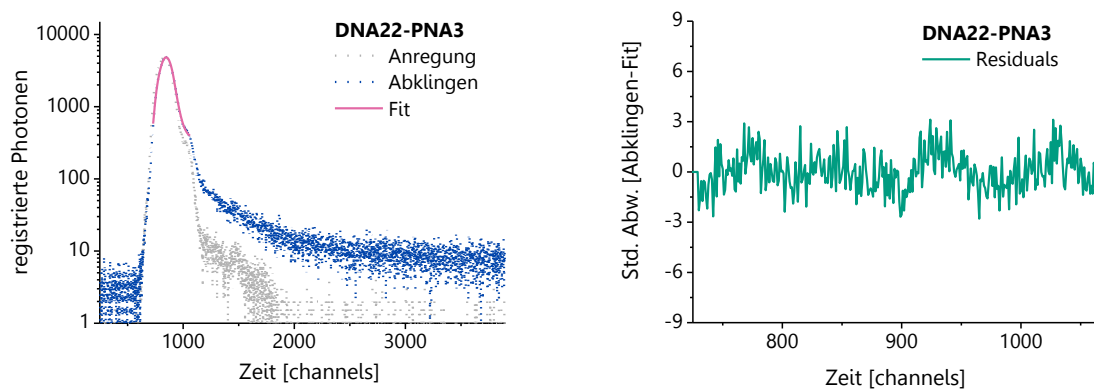


Abbildung 341: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA22-PNA3** (τ_{Do+Ak}).

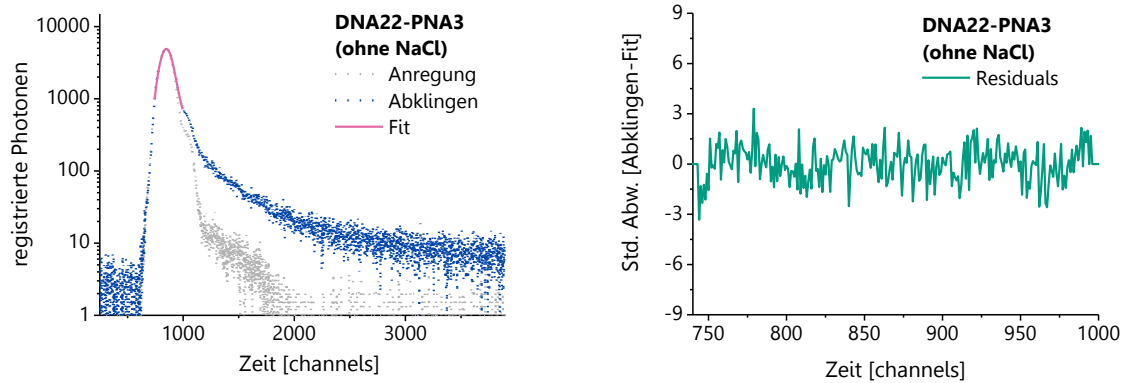


Abbildung 342: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA22-PNA3** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

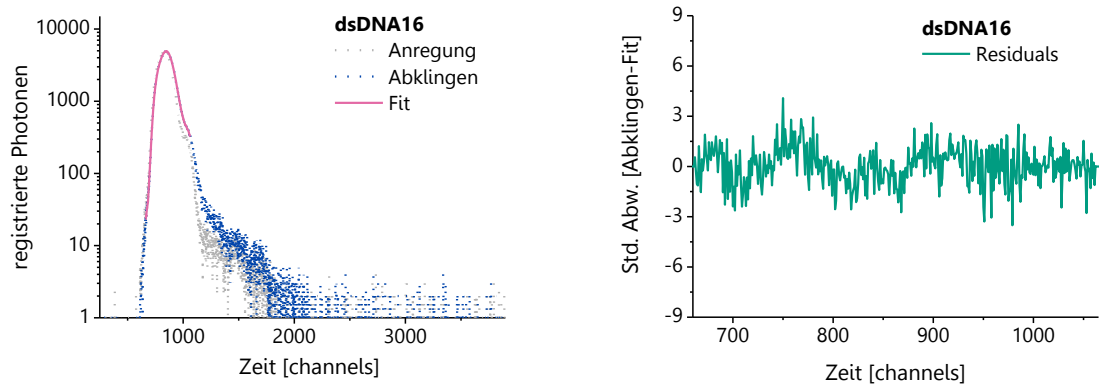


Abbildung 343: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA16** (τ_{Do}).

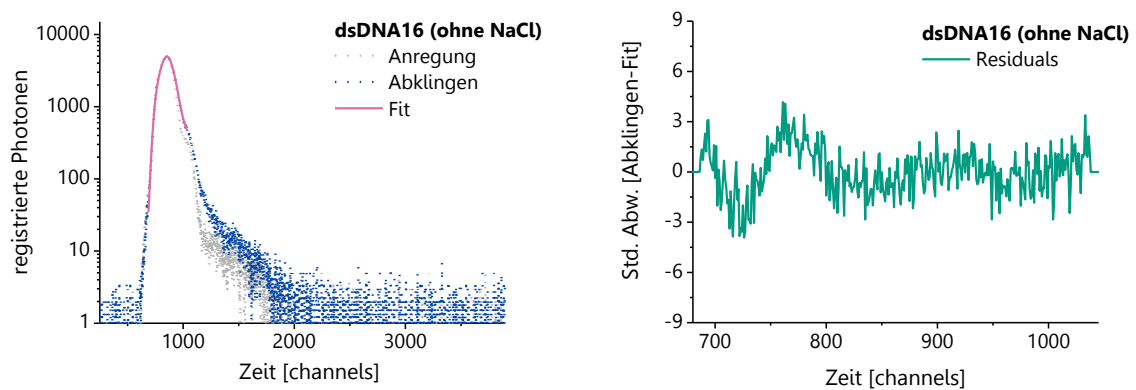


Abbildung 344: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA16** (τ_{Do}) in Abwesenheit von NaCl.

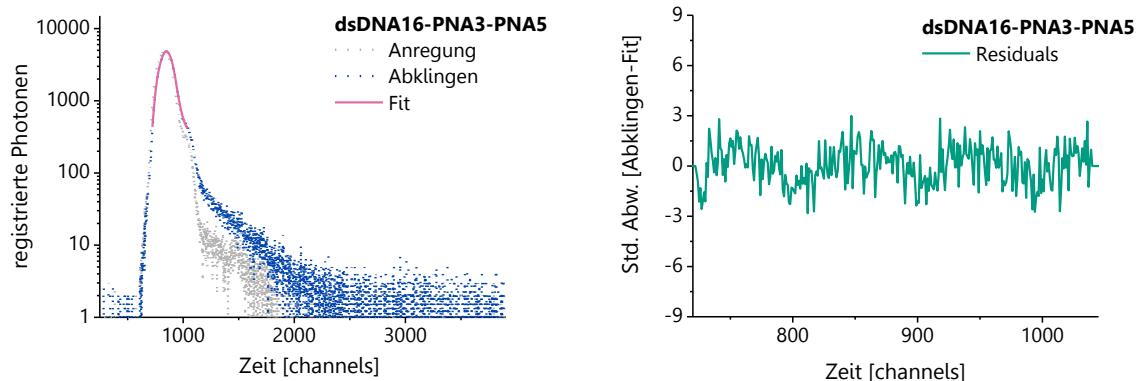


Abbildung 345: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA16-PNA3-PNA5** (τ_{Do+Ak}).

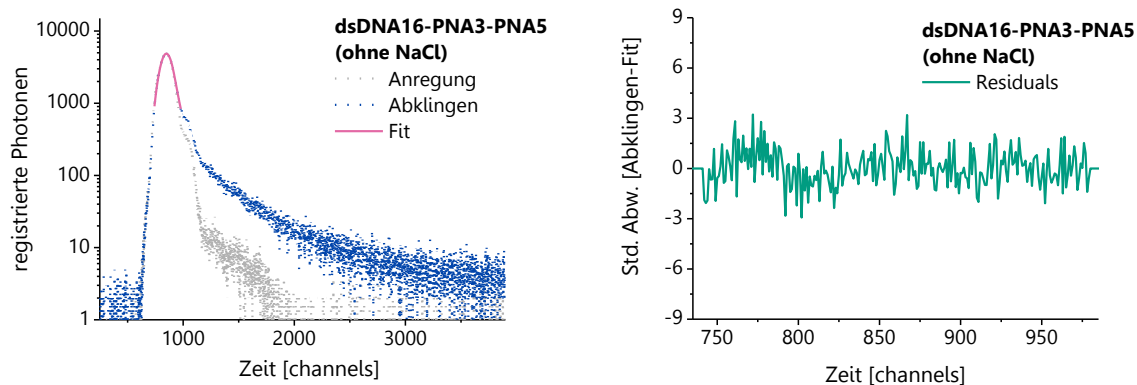


Abbildung 346: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA16-PNA3-PNA5** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

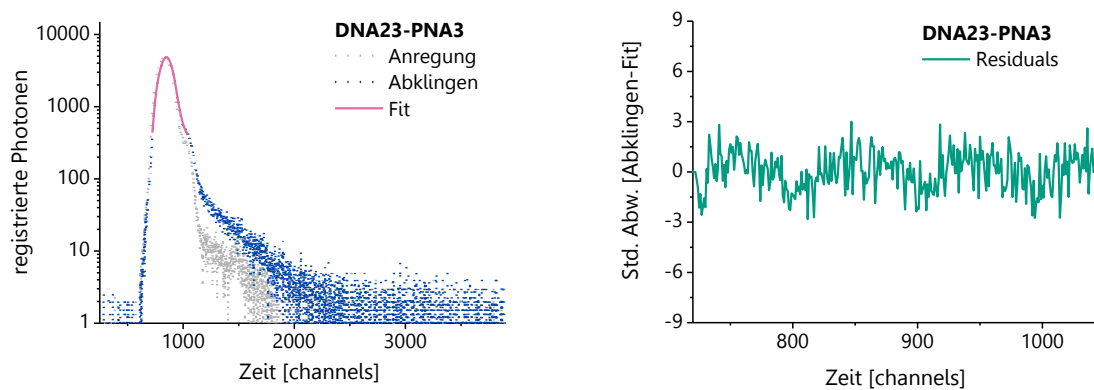


Abbildung 347: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA23-PNA3** (τ_{Do+Ak}).

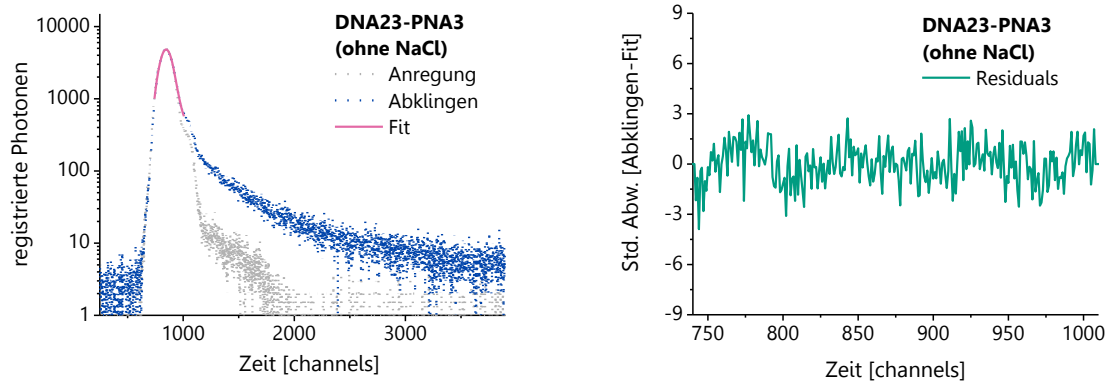


Abbildung 348: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA23-PNA3** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

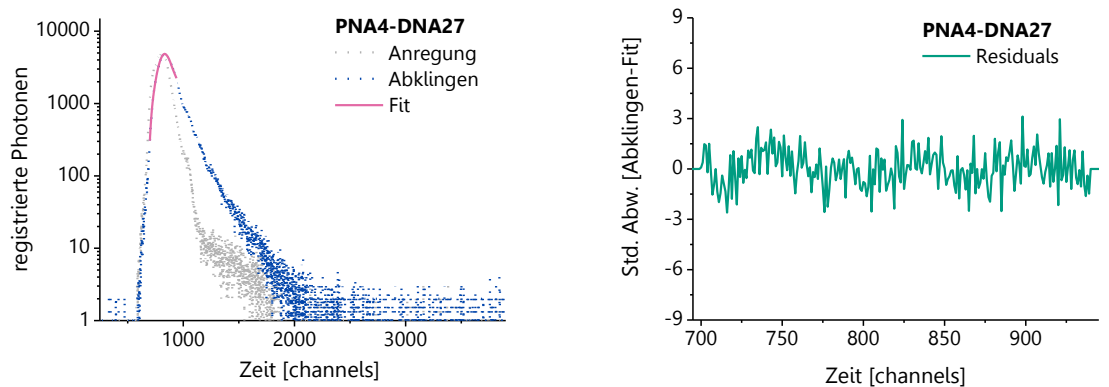


Abbildung 349: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA4-DNA27** (τ_{Do}).

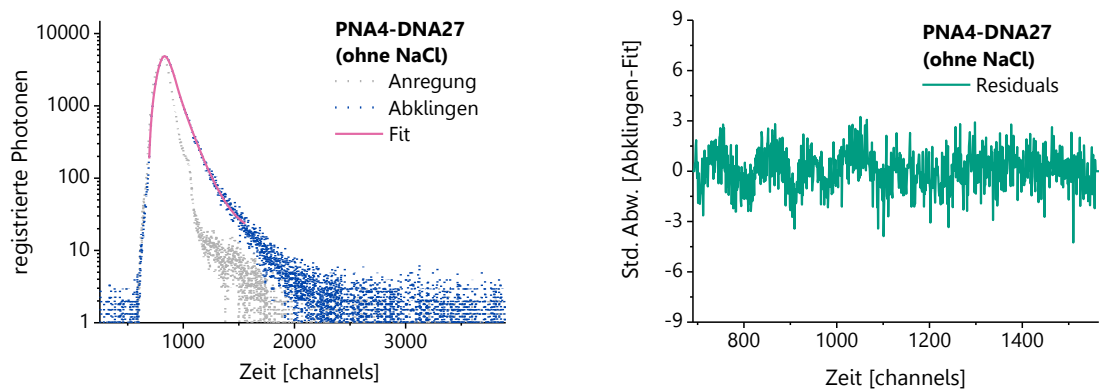


Abbildung 350: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **PNA4-DNA27** (τ_{Do}) in Abwesenheit von NaCl.

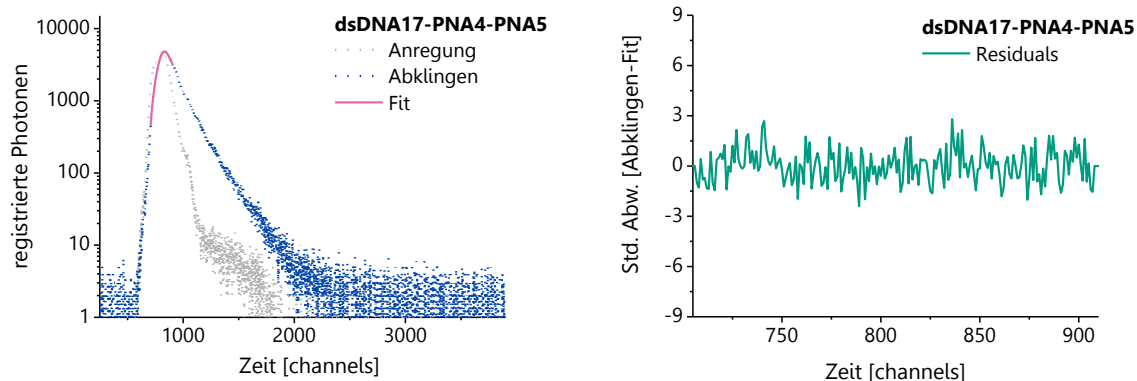


Abbildung 351: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA17-PNA4-PNA5** (τ_{Do+Ak}).

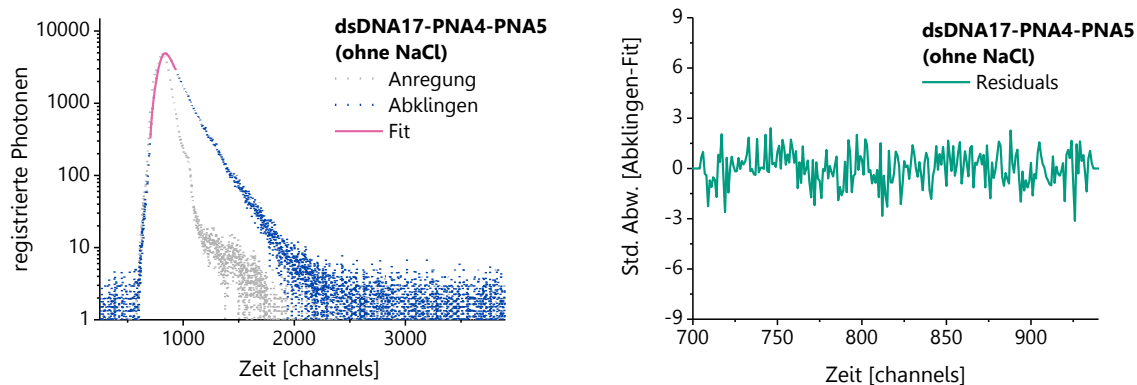


Abbildung 352: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA17-PNA4-PNA5** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

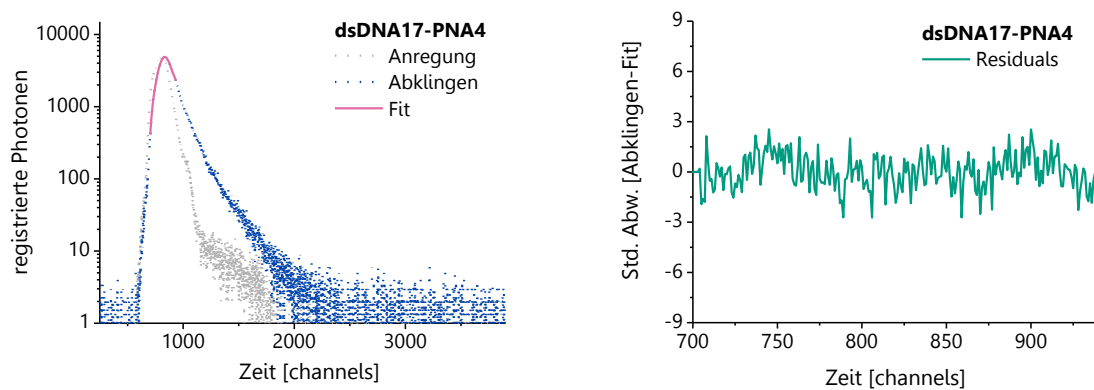


Abbildung 353: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA17-PNA4** (τ_{Do+Ak}).

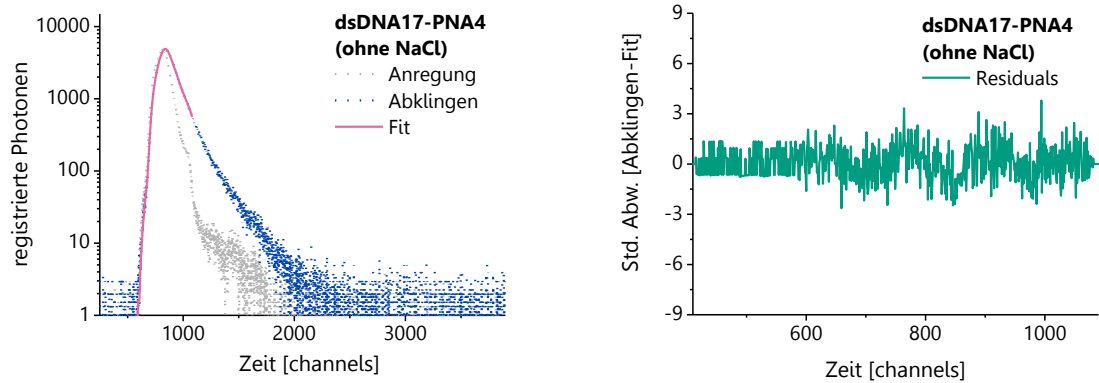


Abbildung 354: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA17-PNA4** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

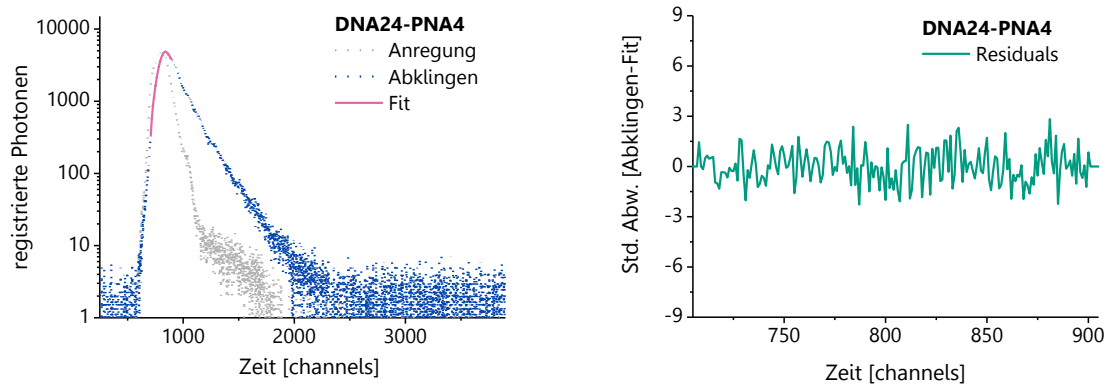


Abbildung 355: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA24-PNA4** (τ_{Do+Ak}).

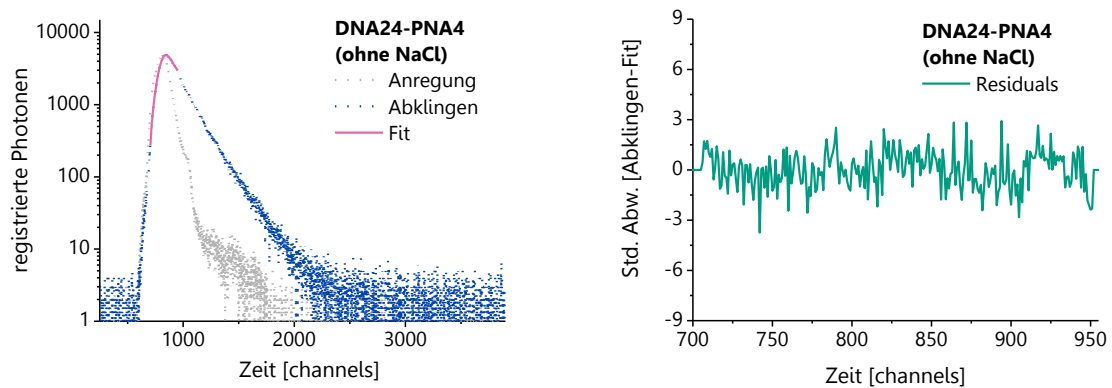


Abbildung 356: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA24-PNA4** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

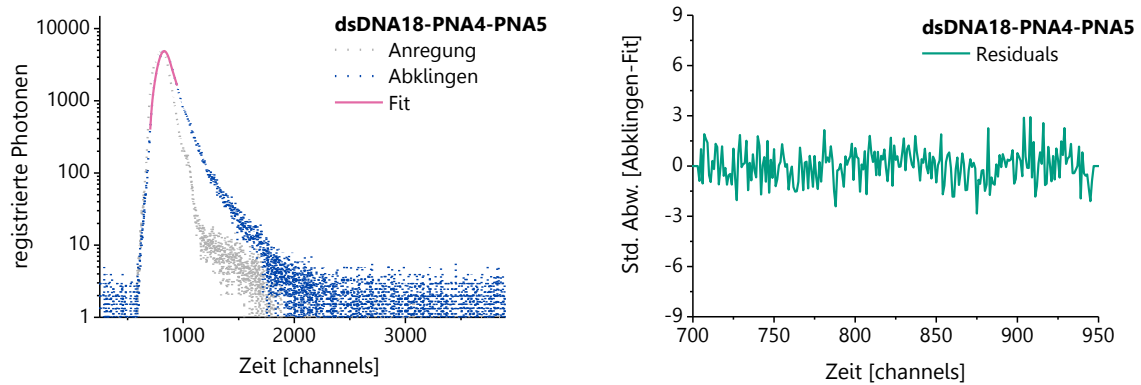


Abbildung 357: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA18-PNA4-PNA5** (τ_{Do+Ak}).

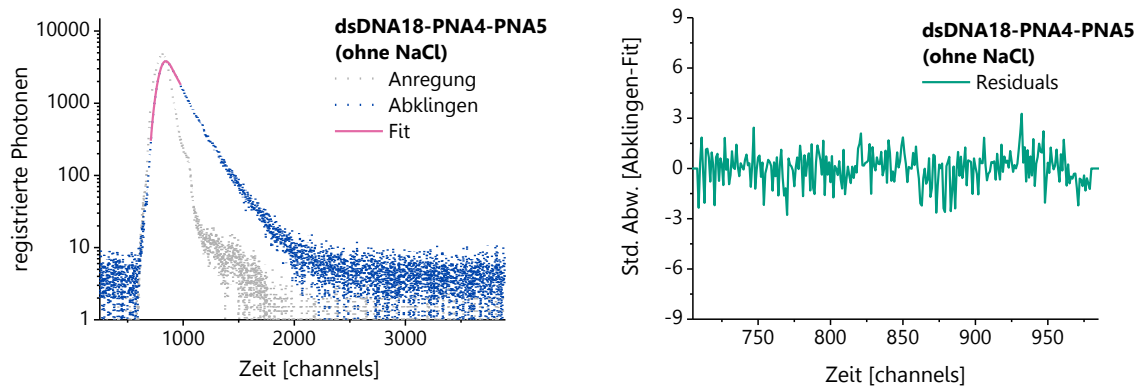


Abbildung 358: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von **dsDNA18-PNA4-PNA5** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

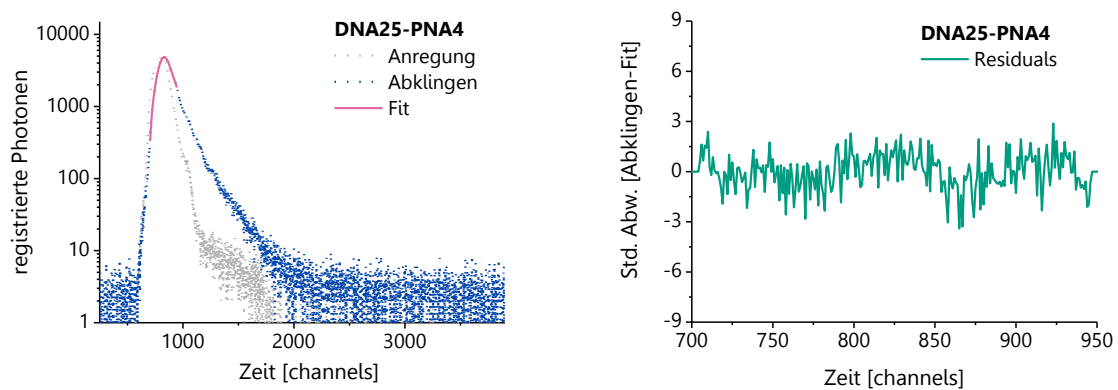


Abbildung 359: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA25-PNA4** (τ_{Do+Ak}).

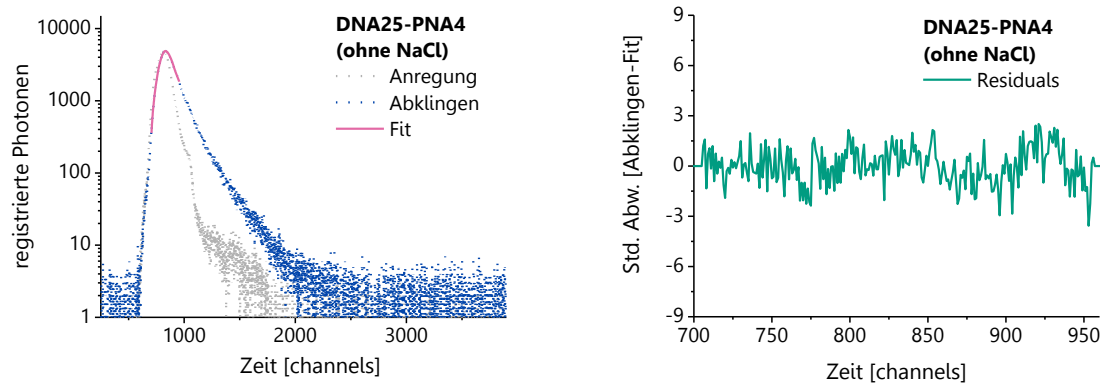


Abbildung 360: Abklingkurve (links) und *Residuals* (rechts) der Fluoreszenzlebenszeit-Messung von dem Vergleichsduplex **DNA25-PNA4** (τ_{Do+Ak}) in Abwesenheit von NaCl.

Übersichtstabellen der Fluoreszenzlebenszeiten des Donors und der ET-Effizienzen sowie deren Standardabweichungen

Bei Invasionsexperimenten in Anwesenheit von 250 mM NaCl:

Invasionskomplex oder Vgl-Duplex	τ [sec]	$\Delta\tau$ [sec]	$\Delta\tau$ [%]	$E_{(r)}$	$\Delta E_{(r)}$ [%]	$\Delta E_{(r)}$
dsDNA15	2.577E-09	7.405E-11	2.87	-	-	-
dsDNA15-PNA3-PNA5	8.587E-10	9.347E-11	10.89	0.667	13.76	0.092
DNA22-PNA3	8.396E-10	2.200E-11	2.62	0.674	5.49	0.037
dsDNA16	2.584E-09	2.414E-11	0.93	-	-	-
dsDNA16-PNA3-PNA5	8.820E-10	1.705E-10	19.33	0.659	22.20	0.146
DNA23-PNA3	8.708E-10	1.231E-10	14.13	0.663	17.01	0.113
PNA4-DNA27	4.408E-09	6.360E-11	1.44	-	-	-
dsDNA17-PNA4-PNA5	1.275E-10	3.763E-12	2.95	0.971	4.40	0.043
dsDNA17-PNA4	2.823E-10	5.047E-12	1.79	0.936	3.23	0.030
DNA24-PNA4	8.231E-11	3.140E-12	3.81	0.981	5.26	0.052
dsDNA18-PNA4-PNA5	2.913E-10	1.472E-11	5.05	0.934	6.50	0.061
DNA25-PNA4	2.642E-10	8.976E-12	3.40	0.940	4.84	0.045

Tabelle 27: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{Do} bzw. τ_{Do+Ak} der Invasionskomplexe und Vgl-Duplexe in Anwesenheit von 250 mM NaCl und der ET-Effizienzen sowie deren berechnete Standardabweichungen.

Bei Invasionsexperimenten in Abwesenheit von NaCl:

Invasionskomplex oder Vgl-Duplex	τ [sec]	$\Delta\tau$ [sec]	$\Delta\tau$ [%]	$E_{(r)}$	$\Delta E_{(r)}$ [%]	$\Delta E_{(r)}$
dsDNA15	2.427E-09	4.091E-11	1.69	-	-	-
dsDNA15-PNA3-PNA5	6.281E-10	9.067E-11	14.44	0.741	16.12	0.119
DNA22-PNA3	6.109E-10	6.349E-11	10.39	0.748	12.08	0.090
dsDNA16	2.518E-09	3.765E-11	1.50	-	-	-
dsDNA16-PNA3-PNA5	6.160E-10	8.755E-11	14.21	0.755	15.90	0.120
DNA23-PNA3	6.315E-10	1.813E-11	2.87	0.749	4.56	0.034
PNA4-DNA27	4.121E-09	1.148E-11	0.28	-	-	-
dsDNA17-PNA4-PNA5	6.000E-11	4.816E-13	0.80	0.985	1.08	0.011
dsDNA17-PNA4	2.270E-10	3.165E-11	13.94	0.945	14.22	0.134
DNA24-PNA4	6.299E-11	1.565E-12	2.48	0.985	2.76	0.027
dsDNA18-PNA4-PNA5	1.418E-10	2.972E-12	2.10	0.966	2.37	0.023
DNA24-PNA4	1.195E-10	8.248E-12	6.90	0.971	7.18	0.070

Tabelle 28: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{D_0} bzw. $\tau_{D_0+A_k}$ der Invasionskomplexe und Vgl-Duplexe in Abwesenheit von NaCl und der ET-Effizienzen sowie deren berechnete Standardabweichungen.

Übersichtstabellen der Fluoreszenzlebenszeiten des Akzeptors und der Parameter $I_{(0)}$, $I_{(Do.)}$ sowie $I_{(Ak.)}$

Bei Invasionsexperimenten in Anwesenheit von 250 mM NaCl:

Invasionskomplex oder Vgl-Duplex	τ_{Ak} [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [%]	$I_{(0)}$	$I_{(Do.)}$	$I_{(Ak.)}$
dsDNA15	-	-	-	2.86E+1	5.84E-2	-
dsDNA15-PNA3-PNA5	9.969E-10	2.963E-11	2.97	2.51E+2	-3.29E-1	3.29E-1
DNA22-PNA3	9.271E-10	2.647E-11	2.86	3.60E+2	-7.52E-2	7.70E-2
dsDNA16	-	-	-	2.32E+1	2.33E-1	-
dsDNA16-PNA3-PNA5	8.532E-10	7.647E-11	8.96	3.33E+2	1.93E-1	-1.6E-1
DNA23-PNA3	8.676E-10	1.704E-10	19.64	3.34E+2	1.59E+0	-1.6E+0
PNA4-DNA27	-	-	-	6.88E+1	3.42E-2	-
dsDNA17-PNA4-PNA5	4.593E-09	1.814E-10	3.95	1.53E+2	4.32E-2	1.98E-2
dsDNA17-PNA4	2.931E-09	5.310E-11	1.81	2.11E+2	2.18E-2	1.88E-2
DNA24-PNA4	5.046E-09	2.379E-10	4.72	1.76E+2	8.87E-2	1.82E-2
dsDNA18-PNA4-PNA5	2.251E-09	3.040E-11	1.35	1.19E+2	1.13E-2	2.33E-2
DNA25-PNA4	2.596E-09	3.595E-11	1.38	5.37E+1	3.70E-3	2.37E-2

Tabelle 29: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{Ak} der Invasionskomplexe und Vgl-Duplexe in Anwesenheit von 250 mM NaCl sowie der Parameter $I_{(0)}$, $I_{(Do.)}$ und $I_{(Ak.)}$.

Bei Invasionsexperimenten in Abwesenheit von NaCl:

Invasionskomplex oder Vgl-Duplex	τ_{Ak} [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [sec]	$\Delta\tau_{Ak}$ [%]	$I_{(0)}$	$I_{(Do.)}$	$I_{(Ak.)}$
dsDNA15	-	-	-	$1.34E+1$	$3.30E-2$	-
dsDNA15-PNA3-PNA5	$1.003E-09$	$3.08E-11$	3.07	$3.45E+2$	$-1.05E-1$	$1.10E-1$
DNA22-PNA3	$1.067E-09$	$2.72E-11$	2.55	$3.28E+2$	$-9.46E-2$	$9.46E-2$
dsDNA16	-	-	-	$2.05E+1$	$1.80E-1$	-
dsDNA16-PNA3-PNA5	$9.616E-10$	$2.91E-11$	3.03	$3.31E+2$	$-1.15E-1$	$1.20E-1$
DNA23-PNA3	$9.098E-10$	$4.75E-11$	5.22	$3.69E+2$	$1.75E-1$	$-1.75E-1$
PNA4-DNA27	-	-	-	$1.66E+1$	$5.12E-2$	-
dsDNA17-PNA4-PNA5	$4.198E-09$	$1.07E-10$	2.55	$1.68E+2$	$2.17E-1$	$1.35E-2$
dsDNA17-PNA4	$2.547E-09$	$2.05E-11$	0.81	$5.99E-1$	$7.26E-2$	$8.65E-3$
DNA24-PNA4	$5.173E-09$	$6.07E-11$	1.17	$1.52E+2$	$1.80E-1$	$1.32E-2$
dsDNA18-PNA4-PNA5	$3.947E-09$	$4.14E-11$	1.05	$1.08E+2$	$4.47E-3$	$1.43E-2$
DNA24-PNA4	$2.809E-09$	$7.28E-11$	2.58	$1.43E+2$	$9.13E-2$	$1.59E-2$

Tabelle 30: Übersicht der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten τ_{Ak} der Invasionskomplexe und Vgl-Duplexe in Abwesenheit von NaCl sowie der Parameter $I_{(0)}$, $I_{(Do.)}$ und $I_{(Ak.)}$.

Übersichtstabellen der Invasioneffizienzen

Bei Invasionsexperimenten in Anwesenheit von 250 mM NaCl:

Invasionskomplex	E_{Invasion}	$\Delta E_{\text{Invasion}}$ [%]	$\Delta E_{\text{Invasion}}$
dsDNA15-PNA3-PNA5	0.989	19.25	0.129
dsDNA16-PNA3-PNA5	0.993	39.21	0.259
dsDNA17-PNA4-PNA5	0.990	9.65	0.094
dsDNA17-PNA4	0.954	8.49	0.082
dsDNA18-PNA4-PNA5	0.993	11.34	0.106

Tabelle 31: Übersicht der Invasioneffizienzen der Invasionsexperimente in Anwesenheit von 250 mM NaCl sowie deren berechnete Standardabweichungen.

Bei Invasionsexperimenten in Abwesenheit von NaCl:

Invasionskomplex	E_{Invasion}	$\Delta E_{\text{Invasion}}$ [%]	$\Delta E_{\text{Invasion}}$
dsDNA15-PNA3-PNA5	0.991	28.20	0.210
dsDNA16-PNA3-PNA5	1.008	20.46	0.154
dsDNA17-PNA4-PNA5	1.001	3.57	0.035
dsDNA17-PNA4	0.960	16.70	0.159
dsDNA18-PNA4-PNA5	0.994	9.28	0.090

Tabelle 32: Übersicht der Invasioneffizienzen der Invasionsexperimente in Abwesenheit von NaCl sowie deren berechnete Standardabweichungen.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Hell, S. W. - Banquet Speech, Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/hell-speech.html
(Stand: 23.03.2015).
- [2] Abbe, E. *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung* **1873**.
- [3] Kopelman, R.; Tan, W. *Science (New York, NY)* **1993**, *262*, 1382-1384.
- [4] Hell, S. W.; Wichmann, J. *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780-782.
- [5] Klar, T. A.; Hell, S. W. *Opt. Lett.* **1999**, *24*, 954-956.
- [6] Willig, K. I.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Jahn, R.; Hell, S. W. *Nature* **2006**, *440*, 935-939.
- [7] Moerner, W.; Kador, L. *Phys Rev Lett* **1989**, *62*, 2535.
- [8] Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. *Nature* **1997**, *388*, 355-358.
- [9] Moerner, W. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 910-927.
- [10] Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. *Science* **2006**, *313*, 1642-1645.
- [11] Göttfert, F.; Wurm, Christian A.; Mueller, V.; Berning, S.; Cordes, Volker C.; Honigmann, A.; Hell, Stefan W. *Biophysical Journal* **2013**, *105*, L01-L03.
- [12] <http://de.wikipedia.org/wiki/STED-Mikroskop#/media/File:2color-STED-example.png> (Stand: 17.04.2015).
- [13] Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- [14] Huang, J.; Yang, X.; He, X.; Wang, K.; Liu, J.; Shi, H.; Wang, Q.; Guo, Q.; He, D. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *53*, 11-20.
- [15] Waggoner, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 62-66.
- [16] Schepartz, A.; Gonzalez, R. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 749-751.
- [17] Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *110*, 2620-2640.
- [18] Berezin, M. Y.; Achilefu, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641-2684.
- [19] Armitage, B. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 806-812.
- [20] Chang, P. V.; Bertozzi, C. R. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8864-8879.

- [21] Stennett, E. M.; Ciuba, M. A.; Levitus, M. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1057-1075.
- [22] Patterson, G.; Davidson, M.; Manley, S.; Lippincott-Schwartz, J. *Appl. Rev. Phys. Chem.* **2010**, *61*, 345.
- [23] Zheng, Q.; Juette, M. F.; Jockusch, S.; Wasserman, M. R.; Zhou, Z.; Altman, R. B.; Blanchard, S. C. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1044-1056.
- [24] Marti, A. A.; Jockusch, S.; Stevens, N.; Ju, J.; Turro, N. J. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 402-409.
- [25] Wang, K.; Tang, Z.; Yang, C. J.; Kim, Y.; Fang, X.; Li, W.; Wu, Y.; Medley, C. D.; Cao, Z.; Li, J.; Colon, P.; Lin, H.; Tan, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856-870.
- [26] Stambasky, J.; Hocek, M.; Kocovsky, P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764.
- [27] Malinowski, V. L.; Wenger, D.; Häner, R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 410-422.
- [28] Teo, Y. N.; Kool, E. T. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4221-4245.
- [29] Preus, S.; Wilhelmsson, L. M. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1990-2001.
- [30] Socher, E.; Knoll, A.; Seitz, O. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7363-7371.
- [31] Okamoto, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [32] Holzhauser, C.; Wagenknecht, H. A. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.
- [33] Barrois, S.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3085-3088.
- [34] Holzhauser, C.; Berndl, S.; Menacher, F.; Breunig, M.; Göpferich, A.; Wagenknecht, H. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 1239-1248.
- [35] Holzhauser, C.; Liebl, R.; Goepferich, A.; Wagenknecht, H.-A.; Breunig, M. *ACS chemical biology* **2013**, *8*, 890-894.
- [36] Holzhauser, C.; Wagenknecht, H.-A. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7373-7379.
- [37] Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2 ed. New York, 1999.
- [38] Kasha, M. *Discuss Faraday Soc* **1950**, 14-19.
- [39] Stokes, G. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463-562.
- [40] Förster, T. *Annalen der Physik* **1948**, *437*, 55-75.
- [41] Stryer, L.; Haugland, R. P. *P Natl Acad Sci USA* **1967**, *58*, 719.
- [42] Valeur, B.; 1. ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2001.
- [43] Dale, R. E.; Eisinger, J.; Blumberg, W. *Biophysical Journal* **1979**, *26*, 161-193.
- [44] Kato, T.; Kashida, H.; Kishida, H.; Yada, H.; Okamoto, H.; Asanuma, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 741-750.

- [45] Borjesson, K.; Preus, S.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.
- [46] Sindbert, S.; Kalinin, S.; Nguyen, H.; Kienzler, A.; Clima, L.; Bannwarth, W.; Appel, B.; Müller, S.; Seidel, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2463-2480.
- [47] Bassi, G. S.; Mollegaard, N. E.; Murchie, A. I. H.; Lilley, D. M. *J. Biochemistry* **1999**, *38*, 3345-3354.
- [48] Walter, N. G.; Burke, J. M.; Millar, D. P. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 544-549.
- [49] Fang, H.; Clark, D. J.; Hayes, J. J. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1475-1484.
- [50] Kienzler, A.; Flehr, R.; Kramer, R. A.; Gehne, S. r.; Kumke, M. U.; Bannwarth, W. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 1852-1863.
- [51] Dexter, D. L. *The Journal of Chemical Physics* **1953**, *21*, 836-850.
- [52] Reineke, S.; Lindner, F.; Schwartz, G.; Seidler, N.; Walzer, K.; Lussem, B.; Leo, K. *Nature* **2009**, *459*, 234-238.
- [53] Reese, C. B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868.
- [54] Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [55] Amann, N.; Wagenknecht, H.-A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1685-1690.
- [56] Barbaric, J.; Wanninger-Weiß, C.; Wagenknecht, H.-A. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 364-370.
- [57] Weisbrod Samuel, H.; Marx, A. *Chem Commun* **2008**, 5675-5685.
- [58] Rubner, M. M.; Holzhauser, C.; Bohländer, P. R.; Wagenknecht, H. A. *Chemistry-A European Journal* **2012**, *18*, 1299-1302.
- [59] Bohländer, P. R.; Wagenknecht, H. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7547-7551.
- [60] Walter, H.-K.; Bohländer, P. R.; Wagenknecht, H.-A. *ChemistryOpen* **2015**, *9999*, n/a-n/a.
- [61] Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *2*, 565-598.
- [62] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [63] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [64] Chan Timothy, R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin Valery, V. *Org Lett* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [65] Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051-8056.

- [66] Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794-8804.
- [67] Gramlich, P. M.; Wirges, C. T.; Manetto, A.; Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [68] El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388-1405.
- [69] Boyce, M.; Bertozzi, C. R. *Nat. Meth.* **2011**, *8*, 638-642.
- [70] Astakhova, I. K.; Wengel, J. *Chemistry-A European Journal* **2013**, *19*, 1112-1122.
- [71] Berndl, S.; Herzig, N.; Kele, P.; Lachmann, D.; Li, X.; Wolfbeis, O.; Wagenknecht, H.-A. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [72] Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M.; Hammond, D. M.; Carell, T. *Organic letters* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [73] Seela, F.; Xiong, H.; Leonard, P.; Budow, S. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1374-1387.
- [74] Xiong, H.; Seela, F. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5584-5597.
- [75] Seela, F.; Ingale, S. A. *J. Org. Chem.* **2009**, *75*, 284-295.
- [76] Holzhauser, C.; Wagenknecht, H. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268-7272.
- [77] Holzhauser, C.; Rubner, M. M.; Wagenknecht, H.-A. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2013**, *12*, 722-724.
- [78] Barrois, S.; Wörner, S.; Wagenknecht, H.-A. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2014**, *13*, 1126-1129.
- [79] Gramlich, P. M.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [80] Berndl, S.; Herzig, N.; Kele, P.; Lachmann, D.; Li, X.; Wolfbeis, O. S.; Wagenknecht, H.-A. *Bioconjugate chemistry* **2009**, *20*, 558-564.
- [81] Lachmann, D.; Berndl, S.; Wolfbeis, O. S.; Wagenknecht, H. A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, No. 13.
- [82] Aigner, M.; Hartl, M.; Fauster, K.; Steger, J.; Bister, K.; Micura, R. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 47-51.
- [83] Fauster, K.; Hartl, M.; Santner, T.; Aigner, M.; Kreutz, C.; Bister, K.; Ennifar, E.; Micura, R. *ACS Chemical Biology* **2012**, *7*, 581-589.
- [84] Fomich, M. A.; Kvach, M. V.; Navakouski, M. J.; Weise, C.; Baranovsky, A. V.; Korshun, V. A.; Shmanai, V. V. *Organic letters* **2014**, *16*, 4590-4593.
- [85] Blomquist, A.; Liu, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153-2154.

- [86] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [87] Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Sletten, E. M.; Baskin, J. M.; Miller, I. A.; Agard, N. J.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821-1826.
- [88] Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. *Science* **2008**, *320*, 664-667.
- [89] Debets, M. F.; Doelen, C. W. J. v. d.; Rutjes, F. P. J. T.; Delft, F. L. v. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168-1184.
- [90] Heaney, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3043-3058.
- [91] Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
- [92] Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.
- [93] Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [94] MacKenzie, D. A.; Sherratt, A. R.; Chigrinova, M.; Cheung, L. L.; Pezacki, J. P. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 81-88.
- [95] Stubinitzky, C.; Cserep, G. B.; Batzner, E.; Kele, P.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11218-11221.
- [96] Knall, A.-C.; Slugovc, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
- [97] Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476-7479.
- [98] Wieczorek, A.; Buckup, T.; Wombacher, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4177-4185.
- [99] Wijnen, J. W.; Zavarise, S.; Engberts, J. B.; Charton, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2001-2005.
- [100] Šečkutè, J.; Devaraj, N. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 761-767.
- [101] Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Lang, K.; Wallace, S.; Mehl, R. A.; Chin, J. W. *Nature chemistry* **2014**, *6*, 393-403.
- [102] Clovis, J. S.; Eckell, A.; Huisgen, R.; Sustmann, R. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60-70.
- [103] Wang, Y. H., Wen J.; Song, Wenjiao; Lim, Reyna K.V.; Lin, Qing *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3725-3728.
- [104] An, P.; Yu, Z.; Lin, Q. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9920-9922.

- [105] Ramil, C. P.; Lin, Q. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 89-95.
- [106] Yu, Z. H., Lok Yin; Wang, Zhiyong; Lin, Qing *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2011**, *21*, 5033-5036.
- [107] Leihkauf, P.; Lohse, V.; Csongr, C.; Tomaschewski, G. *Journal für Praktische Chemie* **1989**, *331*, 789-798.
- [108] Meier, H.; Heimgartner, H. *Helvetica chimica acta* **1985**, *68*, 1283-1300.
- [109] Wang, Y. S., Wenjiao; Hu, Wen J.; Lin, Qing *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5330-5333.
- [110] Lim, R. K.; Lin, Q. *Accounts Chem. Res.* **2011**, *44*, 828-839.
- [111] Yu, Z. H., Lok Yin; Lin, Qing *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11912-11915.
- [112] Arndt, S.; Wagenknecht, H. A. *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14808-14811.
- [113] Keller, S.; Marx, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5690-5697.
- [114] Wenge, U.; Ehrenschwender, T.; Wagenknecht, H. A. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 301-304.
- [115] Gierlich, J.; Gutsmedl, K.; Gramlich, P. M. E.; Schmidt, A.; Burley, G. A.; Carell, T. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486-9494.
- [116] LeProust, E. M.; Peck, B. J.; Spirin, K.; McCuen, H. B.; Moore, B.; Namsaraev, E.; Caruthers, M. H. *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38*, 2522-2540.
- [117] Rosania, G. R.; Lee, J. W.; Ding, L.; Yoon, H.-S.; Chang, Y.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1130-1131.
- [118] Li, Q.; Kim, Y.; Namm, J.; Kulkarni, A.; Rosania, G. R.; Ahn, Y.-H.; Chang, Y.-T. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 615-623.
- [119] Li, Q.; Chang, Y. T. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2922-2932.
- [120] Lee, J. W.; Jung, M.; Rosania, G. R.; Chang, Y.-T. *Chem. Commun.* **2003**, 1852-1853.
- [121] Lee, J.-S.; Kim, Y. K.; Vendrell, M.; Chang, Y.-T. *Molecular BioSystems* **2009**, *5*, 411-421.
- [122] Lee, J.-S.; Vendrell, M.; Chang, Y.-T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 760-767.
- [123] Deligeorgiev, T.; Vasilev, A.; Kaloyanova, S.; Vaquero, J. J. *Coloration Technology* **2010**, *126*, 55-80.
- [124]
- <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/fluorophoresintro.html>
(Stand: 16.04.2015).

- [125] Widengren, J.; Chmyrov, A.; Eggeling, C.; Löfdahl, P.-Å.; Seidel, C. A. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 429-440.
- [126] Tinnefeld, P.; Cordes, T. *Nature methods* **2012**, *9*, 426-427.
- [127] Zheng, Q.; Jockusch, S.; Zhou, Z.; Altman, R. B.; Warren, J. D.; Turro, N. J.; Blanchard, S. C. *The journal of physical chemistry letters* **2012**, *3*, 2200-2203.
- [128] Zheng, Q.; Jockusch, S.; Zhou, Z.; Blanchard, S. C. *Photochemistry and photobiology* **2014**, *90*, 448-454.
- [129] Levitus, M.; Ranjit, S. *Quart. Rev. Biophys.* **2011**, *44*, 123-151.
- [130] Kuramoto, N.; Kitao, T. *Dyes and Pigments* **1982**, *3*, 49-58.
- [131] Chen, P.; Li, J.; Qian, Z. G.; Zheng, D. S.; Okasaki, T.; Hayami, M. *Dyes Pigments* **1998**, *37*, 213-222.
- [132] Sheetz, M. P.; Koppel, D. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1979**, *76*, 3314-3317.
- [133] Dixit, R.; Cyr, R. *The plant journal* **2003**, *36*, 280-290.
- [134] Sies, H.; Menck, C. F. *Mutation Research/DNAging* **1992**, *275*, 367-375.
- [135] Swoboda, M.; Henig, J. r.; Cheng, H.-M.; Brugger, D.; Haltrich, D.; Plumeré, N.; Schlierf, M. *Acs Nano* **2012**, *6*, 6364-6369.
- [136] Altman, R. B.; Terry, D. S.; Zhou, Z.; Zheng, Q.; Geggier, P.; Kolster, R. A.; Zhao, Y.; Javitch, J. A.; Warren, J. D.; Blanchard, S. C. *Nature methods* **2012**, *9*, 68-71.
- [137] Dave, R.; Terry, D. S.; Munro, J. B.; Blanchard, S. C. *Biophysical journal* **2009**, *96*, 2371-2381.
- [138] Toutchkine, A.; Nguyen, D.-V.; Hahn, K. M. *Organic letters* **2007**, *9*, 2775-2777.
- [139] Joo, C.; Balci, H.; Ishitsuka, Y.; Buranachai, C.; Ha, T. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 51-76.
- [140] Byers, G.; Gross, S.; Henrichs, P. *Photochemistry and photobiology* **1976**, *23*, 37-43.
- [141] Shank, N. I.; Zanolli, K. J.; Lanni, F.; Berget, P. B.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12960-12969.
- [142] Shank, N. I.; Pham, H. H.; Waggoner, A. S.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *135*, 242-251.
- [143] Altman, R. B.; Zheng, Q.; Zhou, Z.; Terry, D. S.; Warren, J. D.; Blanchard, S. C. *Nature methods* **2012**, *9*, 428-429.

- [144] Juette, M. F.; Terry, D. S.; Wasserman, M. R.; Zhou, Z.; Altman, R. B.; Zheng, Q.; Blanchard, S. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *20*, 103-111.
- [145] Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [146] Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Berg, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897.
- [147] Buchardt, O.; Egholm, M.; H.Berg, R.; Nielsen, P. E. *Tibtech* **1993**, *11*, 384-386.
- [148] Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, 566-568.
- [149] Nielsen, P. E. *Chemistry & biodiversity* **2010**, *7*, 786-804.
- [150] Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 11804-11808.
- [151] Haaima, G.; Hansen, H. F.; Christensen, L.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Nucleic acids research* **1997**, *25*, 4639-4643.
- [152] Sen, A.; Nielsen, P. E. *Biophysical chemistry* **2009**, *141*, 29-33.
- [153] Ortega, J.-A.; Blas, J. R.; Orozco, M.; Grandas, A.; Pedroso, E.; Robles, J. *Organic letters* **2007**, *9*, 4503-4506.
- [154] Chenna, V.; Rapireddy, S.; Sahu, B.; Ausin, C.; Pedroso, E.; Ly, D. H. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2388-2391.
- [155] Dragulescu-Andrasi, A.; Rapireddy, S.; Frezza, B. M.; Gayathri, C.; Gil, R. R.; Ly, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10258-10267.
- [156] Rapireddy, S.; He, G.; Roy, S.; Armitage, B. A.; Ly, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15596-15600.
- [157] Kumar, V.; Ganesh, K. N. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 494-412.
- [158] Ganesh, K. N.; Nielsen, P. E. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 931-943.
- [159] Pokorski, J. K.; Witschi, M. A.; Purnell, B. L.; Appella, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15067-15073.
- [160] Englund, E. A.; Xu, Q.; Witschi, M. A.; Appella, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16456-16457.
- [161] Zhang, N.; Appella, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8424-8425.
- [162] Vilaivan, T.; Lowe, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326-9327.
- [163] Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. *Organic letters* **2006**, *8*, 1897-1900.

- [164] Taechalertpaisarn, J.; Sriwarom, P.; Boonlua, C.; Yotapan, N.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5822-5826.
- [165] Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. *Artificial DNA: PNA & XNA* **2011**, *2*, 50-59.
- [166] Siriwong, K.; Chuichay, P.; Saen-oon, S.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T.; Hannongbua, S. *Biochemical and biophysical research communications* **2008**, *372*, 765-771.
- [167] Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P.; Su, X. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25*, 1064-1069.
- [168] Stubinitzky, C.; Vilaivan, T.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3586-3589.
- [169] Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H. A.; Vilaivan, T. *Chemistry-an Asian Journal* **2011**, *6*, 3251.
- [170] Boonlua, C.; Ditmangklo, B.; Reenabthue, N.; Suparpprom, C.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8817-8827.
- [171] Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 614-625.
- [172] Yotapan, N.; Charoenpakdee, C.; Wathanathavorn, P.; Ditmangklo, B.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2166-2174.
- [173] Mason, S. J.; Hake, J. L.; Nairne, J.; Cummins, W. J.; Balasubramanian, S. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2939-2949.
- [174] Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973-2012.
- [175] Silva, G. L.; Ediz, V.; Yaron, D.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5710-5718.
- [176] Klessinger, M. *Chem. in unserer Zeit* **1978**, *12*, 1-11.
- [177] Samanta, A.; Vendrell, M.; Das, R.; Chang, Y. T. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7406-7408.
- [178] Cigan, M.; Gaplovsky, A.; Sigmundova, I.; Zahradnik, P.; Dedic, R.; Hromadova, M. *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, *24*, 450-459.
- [179] Bohländer, P. R.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [180] Benitez, F. J.; Acero, J. L.; Real, F. J.; Roldan, G.; Rodriguez, E. *Water research* **2013**, *47*, 870-880.

- [181] Jing, J.; Li, W.; Boyd, A.; Zhang, Y.; Colvin, V. L.; William, W. Y. *Journal of hazardous materials* **2012**, *237*, 247-255.
- [182] Armitage, B. A.; Renikuntla, B. R.; Rose, H. C.; Eldo, J.; Waggoner, A. S. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 909-912.
- [183] Peggy R. Bohländer, H. A. W. *MAF* **2015**, *submitted*.
- [184] Dash, S.; Panigrahi, M.; Baliyarsingh, S.; K Behera, P.; Patel, S.; K Mishra, B. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 2673-2689.
- [185] Armitage, B. In *DNA Binders and Related Subjects*; Waring, M., Chaires, J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: 2005; Vol. 253, p 55-76.
- [186] Prunkl, C.; Pichlmaier, M.; Winter, R.; Kharlanov, V.; Rettig, W.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2293-3402.
- [187] Sanborn, M. E.; Connolly, B. K.; Gurunathan, K.; Levitus, M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 11064-11074.
- [188] Widengren, J.; Schwille, P. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6416-6428.
- [189] Huang, Z.; Ji, D.; Wang, S.; Xia, A.; Koberling, F.; Patting, M.; Erdmann, R. *The Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 45-50.
- [190] Karunakaran, V.; Lustres, J. L. P.; Zhao, L.; Ernsting, N. P.; Seitz, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954-2962.
- [191] Yarmulok, S. M.; Lukashov, S. S.; Ogul'chansky, T. Y.; Losytskyy, M. Y.; Korniyushyna, O. S. *Biopolymers* **2001**, *62*, 219-227.
- [192] Aramendia, P. F.; Negri, R. M.; Roman, E. S. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 3165-3173.
- [193] Nagy, K.; Orban, E.; Bosze, S.; Kele, P. *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 773-777.
- [194] Cserép, G. B.; Enyedi, K. N.; Demeter, A.; Mező, G.; Kele, P. *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 494-502.
- [195] Sahoo, D.; Bhattacharya, P.; Chakravorti, S. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 2044-2050.
- [196] Manna, A.; Chakravorti, S. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 5226-5233.
- [197] Barrois, S. *Dissertation* **2014**.
- [198] Peng, X.; Wu, T.; Fan, J.; Wang, J.; Zhang, S.; Song, F.; Sun, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4180-4183.

- [199] Kumar, C. V.; Turner, R. S.; Asuncion, E. H. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1993**, *74*, 231-238.
- [200] Armitage, B. A. In *Heterocyclic Polymethine Dyes*, Springer: 2008, p 11-29.
- [201] Park, S.; Sugiyama, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3870-3878.
- [202] Engman, K. C.; Sandin, P.; Osborne, S.; Brown, T.; Billeter, M.; Lincoln, P.; Nordén, B.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 5087-5095.
- [203] Boersma, A. J.; Megens, R. P.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2083-2092.
- [204] Drew, H. R.; Dickerson, R. E. *Journal of Molecular Biology* **1981**, *151*, 535-556.
- [205] Thiviyathan, V.; Somasunderam, A.; Hazra, T. K.; Mitra, S.; Gorenstein, D. G. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *325*, 433-442.
- [206] Kim, S.-G.; Lin, L.-J.; Reid, B. R. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3564-3574.
- [207] Cromsigt, J. M. T. C.; Hilbers, C.; Wijmenga, S. *J Biomol NMR* **2001**, *21*, 11-29.
- [208] Shakked, Z.; Rabinovich, D. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1986**, *47*, 159-195.
- [209] Dickerson, R. E.; Klug, A. *Journal of Molecular Biology* **1983**, *166*, 419-441.
- [210] Van De Ven, F. J. M.; Hilbers, C. W. *European Journal of Biochemistry* **1988**, *178*, 1-38.
- [211] Hunter, C. A. *Journal of Molecular Biology* **1993**, *230*, 1025-1054.
- [212] Xu, Y.; Noguchi, Y.; Sugiyama, H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 5584-5591.
- [213] Tashiro, R.; Ohtsuki, A.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14361-14363.
- [214] Nordlund, T. M.; Andersson, S.; Nilsson, L.; Rigler, R.; Graeslund, A.; McLaughlin, L. W. *Biochemistry* **1989**, *28*, 9095-9103.
- [215] Rothmund, P. W. K. *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- [216] Chen, J.; Seeman, N. C. *Nature* **1991**, *350*, 631-633.
- [217] König, B. *Chemical photocatalysis*, Walter de Gruyter, 2013.
- [218] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Edition ed.; Kluwer Academic / Plenum Publishers, 1999.
- [219] Sczegan, M.; Rettig, W.; Tolmachev, A.; Kurdyukov, V. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3*, 3555-3561.

- [220] Wilhelmsson, L. M. *Quart. Rev. Biophys.* **2010**, *43*, 159-183.
- [221] Iqbal, A.; Arslan, S.; Okumus, B.; Wilson, T. J.; Giraud, G.; Norman, D. G.; Ha, T.; Lilley, D. M. J. *PNAS* **2008**, *105*, 11176-11181.
- [222] Ouellet, J.; Schorr, S.; Iqbal, A.; Wilson, Timothy J.; Lilley, David M. J. *Biophysical Journal* **2011**, *101*, 1148-1154.
- [223] Preus, S.; Börjesson, K.; Kilså, K.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *114*, 1050-1056.
- [224] Dolgih, E.; Roitberg, A. E.; Krause, J. L. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, *190*, 321-327.
- [225] Dirks, R. W.; Molenaar, C.; Tanke, H. J. *Methods* **2003**, *29*, 51-57.
- [226] Tanke, H. J.; Dirks, R. W.; Raap, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 49-54.
- [227] Bratu, D. P.; Cha, B.-j.; Mhlanga, M. M.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13308-13313.
- [228] Srivatsan, S. G.; Weizman, H.; Tor, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1334-1338.
- [229] Kawai, R.; Kimoto, M.; Ikeda, S.; Mitsui, T.; Endo, M.; Yokoyama, S.; Hirao, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17286-17295.
- [230] Pianowski, Z.; Gorska, K.; Oswald, L.; Merten, C. A.; Winssinger, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492-6497.
- [231] Berndl, S.; Breunig, M.; Göpferich, A.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, DOI: 10.1039/b921227b.
- [232] Cottonham, C. L.; Kaneko, S.; Xu, L. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 35293-35302.
- [233] Asangani, I.; Rasheed, S.; Nikolova, D.; Leupold, J.; Colburn, N.; Post, S.; Allgayer, H. *Oncogene* **2008**, *27*, 2128-2136.
- [234] Noshō, K.; Igarashi, H.; Nojima, M.; Ito, M.; Maruyama, R.; Yoshii, S.; Naito, T.; Sukawa, Y.; Mikami, M.; Sumioka, W.; Yamamoto, E.; Kurokawa, S.; Adachi, Y.; Takahashi, H.; Okuda, H.; Kusumi, T.; Hosokawa, M.; Fujita, M.; Hasegawa, T.; Okita, K.; Hirata, K.; Suzuki, H.; Yamamoto, H.; Shinomura, Y. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 776-783.
- [235] Liu, M.; Tang, Q.; Qiu, M.; Lang, N.; Li, M.; Zheng, Y.; Bi, F. *FEBS Letters* **2011**, *585*, 2998-3005.
- [236] Xiong, B.; Cheng, Y.; Ma, L.; Zhang, C. *International journal of oncology* **2013**, *42*, 219-228.

- [237] Kim, S. B.; Zhang, L.; Barron, S.; Shay, J. W. *Life Sciences in Space Research* **2014**, *1*, 67-73.
- [238] Wang, C.-J.; Stratmann, J.; Zhou, Z.-G.; Sun, X.-F. *BMC cancer* **2010**, *10*, 616.
- [239] Yang, M.-H.; Yu, J.; Chen, N.; Wang, X.-Y.; Liu, X.-Y.; Wang, S.; Ding, Y.-Q. *PloS one* **2013**, *8*, e85353.
- [240] Toiyama, Y.; Takahashi, M.; Hur, K.; Nagasaka, T.; Tanaka, K.; Inoue, Y.; Kusunoki, M.; Boland, C. R.; Goel, A. *Journal of the National Cancer Institute* **2013**, *105*, 849-859.
- [241] Strekowski, L. *Heterocyclic polymethine dyes: synthesis, properties and applications*, Springer Science & Business Media, 2008; Vol. 14.
- [242] Willner, I.; Shlyahovsky, B.; Zayats, M.; Willner, B. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1153-1165.
- [243] Lu, Y.; Liu, J. *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, *17*, 580-588.
- [244] Lizardi, P. M.; Huang, X.; Zhu, Z.; Bray-Ward, P.; Thomas, D. C.; Ward, D. C. *Nat Genet* **1998**, *19*, 225-232.
- [245] Srinivas, N.; Ouldrige, T. E.; Šulc, P.; Schaeffer, J. M.; Yurke, B.; Louis, A. A.; Doye, J. P.; Winfree, E. *Nucleic acids research* **2013**, *41*, 10641-10658.
- [246] Zhang, D. Y.; Seelig, G. *Nat Chem* **2011**, *3*, 103-113.
- [247] Seeman, N. C. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 65-87.
- [248] Seeman, N. C. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1151-1159.
- [249] Wengel, J. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277-280.
- [250] Yurke, B.; Turberfield, A. J.; Mills, A. P.; Simmel, F. C.; Neumann, J. L. *Nature* **2000**, *406*, 605-608.
- [251] Simmel, F. C.; Yurke, B. *Applied Physics Letters* **2002**, *80*, 883-885.
- [252] Yan, H.; Zhang, X.; Shen, Z.; Seeman, N. C. *Nature* **2002**, *415*, 62-65.
- [253] Chakraborty, B.; Sha, R.; Seeman, N. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 17245-17249.
- [254] Takahashi, K.; Yaegashi, S.; Kameda, A.; Hagiya, M. In *DNA computing*, Springer: 2006, p 347-358.
- [255] Sherman, W. B.; Seeman, N. C. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1203-1207.
- [256] Gu, H.; Chao, J.; Xiao, S.-J.; Seeman, N. C. *Nature* **2010**, *465*, 202-205.
- [257] Shin, J.-S.; Pierce, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10834-10835.
- [258] Astakhova, I. K.; Pasternak, K.; Campbell, M. A.; Gupta, P.; Wengel, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2423-2426.

- [259] Seelig, G.; Soloveichik, D.; Zhang, D. Y.; Winfree, E. *Science* **2006**, *314*, 1585-1588.
- [260] Picuri, J. M.; Frezza, B. M.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9368-9377.
- [261] Frezza, B. M.; Cockroft, S. L.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14875-14879.
- [262] Qian, L.; Soloveichik, D.; Winfree, E. In *DNA computing and molecular programming*; Springer: 2011, p 123-140.
- [263] Wang, X.; Seeman, N. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8169-8176.
- [264] Seemann, I. T.; Singh, V.; Azarkh, M.; Drescher, M.; Hartig, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4706-4709.
- [265] Reenabthue, N.; Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21*, 6465-6469.
- [266] Wittung, P.; Nielsen, P.; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7049-7054.
- [267] Janowski, B. A.; Kaihatsu, K.; Huffman, K. E.; Schwartz, J. C.; Ram, R.; Hardy, D.; Mendelson, C. R.; Corey, D. R. *Nature chemical biology* **2005**, *1*, 210-215.
- [268] Nielsen, P. E. *Accounts Chem. Res.* **1999**, *32*, 624-630.
- [269] Ishizuka, T.; Yoshida, J.; Yamamoto, Y.; Sumaoka, J.; Tedeschi, T.; Corradini, R.; Sforza, S.; Komiyama, M. *Nucleic acids research* **2008**, *36*, 1464-1471.
- [270] Bentin, T.; Nielsen, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6378-6379.
- [271] Hansen, M. E.; Bentin, T.; Nielsen, P. E. *Nucleic acids research* **2009**, gkp437.
- [272] He, G.; Rapireddy, S.; Bahal, R.; Sahu, B.; Ly, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12088-12090.
- [273] AcO, O. **2003**.
- [274] Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.
- [275] Frigerio, M.; Santagostino, M. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 8019-8022.

10. Appendix

10.1 Publikationsliste

- M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohländer, H. A. Wagenknecht
„A “clickable” styryl dye for fluorescent DNA labeling by excitonic and energy transfer interactions”, *Chemistry-A European Journal* **2012**, *18*, 1299-1302.
- P. R. Bohländer, H. A. Wagenknecht
„Synthesis and evaluation of cyanine–styryl dyes with enhanced photostability for fluorescent DNA staining”, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- P. R. Bohländer, H. A. Wagenknecht
„Synthesis of a Photostable Energy-Transfer Pair for “DNA Traffic Lights”,
Eur. J. Org. Chem. **2014**, *34*, 7547-7551.
- H.-K. Walter, P. R. Bohländer, H. A. Wagenknecht
„Development of a Wavelength-Shifting Fluorescent Module for the Adenosine Aptamer Using Photostable Cyanine Dyes”, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 92-96.
- P. R. Bohländer, T. Vilaivan, H. A. Wagenknecht
„Strand Displacement and Duplex Invasion into Double-Stranded DNA by Pyrrolidinyll Peptide Nucleic Acids”, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9223-9230.
- P. R. Bohländer, H. A. Wagenknecht
“Bright and photostable cyanine-styryl chromophores with green and red fluorescence color for DNA staining”, *MAF* **2015**, *3*, 044003.
- C. Schwechheimer, M. Merkel, P. R. Bohländer, H. A. Wagenknecht,
“Synthetic Wavelength-Shifting Fluorescent Probes of Nucleic Acids”,
Chemically Modified Nucleic Acids **2016** *in press*.
(edited by K. Nakatani and Y. Tor)

10.2 Beiträge zu Konferenzen

- 11.2011: V. Nukleinsäurechemie-Treffen der DNG in Frankfurt
Posterbeitrag:
„Synthesis and Optical Properties of a Cyanine Dye with Improved Photostability“

- 10.2012: I. Doktorandenseminar der DNG in Bad Herrenalb
(Teilnahme)

- 09.2013: VI. Nukleinsäurechemie-Treffen der DNG in Greifswald
Posterbeitrag:
„Evaluation of new Photostable Cyanine-Styryl Dyes as Fluorescent DNA Staining Agents“

- 10.2014: II. Doktorandenseminar der DNG in Bad Herrenalb
Vortrag:
„Photostable Cyanine Dyes as Energy Transfer Pairs for *‘DNA Traffic Lights’*“

- 10.2014: 15. Tag der Organischen Chemie der Universität Stuttgart (TOCUS)
Vortrag:
„Photostable Cyanine Dyes and Post-Synthetic *‘Click’* DNA Modification“

10.3 Lehre

09.2011 - 08.2013	Betreuung der Auszubildenden Celine Geiges während des zweiten und dritten Ausbildungsjahres zur Chemielaborantin
WS 2011 – 2012	Betreuung des organisch chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, der chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie, des KIT
04.2012 – 07.2012	Betreuung der Bachelorarbeit von Ruben Garrecht
08.2012 – 11.2012	Betreuung der Vertieferarbeit von David Rombach
WS 2012 – 2013	Betreuung des organisch chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, der chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie, des KIT
08.2013 – 11.2013	Betreuung der Bachelorarbeit von Christian Schwechheimer
07.2013 – 10.2013	Betreuung der wissenschaftlichen Hilfsarbeit von Johannes Becherer
10.2013 – 12.2013	Betreuung der wissenschaftlichen Hilfsarbeit von Christian Schwechheimer
WS 2013 – 2014	Betreuung des organisch chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, der chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie, des KIT
10.2013 – 12.2013	Betreuung der Vertieferarbeit von Benjamin Lehmann
SS 2014	Betreuung des organisch chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, der chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie, des KIT
WS 2014 – 2015	Betreuung des organisch chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, der chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie, des KIT

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Karlsruhe, 11.08.2015

Peggy Bohländer