

**Fluoreszente H-Aggregate von  
Thiazol Orange in DNA und RNA,  
sowie  
postsynthetische Klick-Ligation an DNA**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV — Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Sina Berndt**

aus Mundelsheim  
Baden-Württemberg

März 2010



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

Promotionsgesuch eingereicht am: 10. März 2010

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 2010

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Arno Pfitzner (Vorsitzender)  
Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht  
Prof. Dr. Burkhard König  
Prof. Dr. Achim Göpferich



*In liebevoller Erinnerung an meinen Bruder*  
***Dominik Berndl***



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2007 bis März 2010 am Institut für Organische Chemie an der Universität von Regensburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die sehr gute Betreuung und die wissenschaftliche Freiheit, alle meine Ideen verwirklichen zu können.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Achim Göpferich und Dr. Miriam Breunig (*Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, Universität Regensburg*) für die erfolgreiche Zusammenarbeit, das Durchführen der Zelltests und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Für die zeitaufgelösten Transientenabsorptionsmessungen bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Torsten Fiebig und seinen Mitarbeitern (*Northwestern University, Evanston, Illinois, USA*).

Ich bedanke mich bei Péter Kele und Xiaohua Li aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis (*Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg*) für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Nilblau-Azids.

Die Massenspektren wurden von Dr. Kiermaier und seinen Mitarbeitern (*Zentrale Analytik des Instituts für Organische Chemie, Universität Regensburg*) angefertigt – vielen Dank dafür.

Ulrike Weck danke ich für ihre organisatorische Unterstützung und ihre große Hilfsbereitschaft in allen verwaltungstechnischen Dingen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Daniel Lachmann bedanken, der mich durch seine sehr gute, zuverlässige und gewissenhafte Arbeit großartig unterstützt hat. Er hat musikalische Differenzen beispielhaft gemeistert und gemeinsam mit Florian Menacher zu einer äußerst angenehmen und fröhlichen Laboratmosphäre beigetragen. Ich bedanke mich bei Flo natürlich auch für die Synthese und Bereitstellung des TO'-Phosphoramidits. Die Zeit mit euch war toll, karamba, karacho!

Ich bedanke mich bei allen meinen Arbeitskreiskollegen: Carolin Holzhauser, die mir nicht nur als Praktikantin zur Seite gestanden ist, Thomas Ehrenschwender, Moritz Rubner und in diesem Zusammenhang danke ich natürlich auch Hans Eichel! Ich danke Dr. Christa Prunkl, Nadine Herzig für die Bereitstellung des acetylenmodifizierten Uridins, Christoph Beyer, Wolfgang Schmucker, Sabrina Sezi, Daniela Baumstark und Dr. Janez Barbaric, der mir besonders in der Anfangszeit ein guter Freund gewesen ist. Ich bedanke mich bei Dr. Reji Varghese für den Mut, den er mir immer wieder zugesprochen hat, neue Wege zu gehen. Ich danke Ulrike Bruckner, Michael Weinberger, Alexander Penner, Claudia Stubinitzky, Christian Wellner und meinem fleißigen Bachelor Christian Marquardt. Alle haben zu drei fröhlichen Jahren beigetragen – vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt Sandra Zugmann und Dr. Franz Wudy für die wunderbare Freundschaft, die vielen fröhlichen Stunden und den Rückhalt in nicht so fröhlichen Zeiten.

Ich danke meiner Familie.



## Veröffentlichungen

1. Menacher, Florian; Rubner, Moritz; **Berndl, Sina**; Wagenknecht, Hans-Achim. Thiazole Orange and Cy3: Improvement of Fluorescent DNA Probes with Use of Short Range Electron Transfer. *Journal of Organic Chemistry* (**2008**), 73(11), 4263-4266.
2. **Berndl, Sina**; Herzig, Nadine; Kele, Peter; Lachmann, Daniel; Li, Xiaohua; Wolfbeis, Otto S.; Wagenknecht, Hans-Achim. Comparison of a Nucleosidic vs. Non-Nucleosidic Postsynthetic "Klick" Modification of DNA with Base-Labile Fluorescent Probes. *Bioconjugate Chemistry* (**2009**), 20(3), 558-564.
3. **Berndl, Sina**; Wagenknecht, Hans-Achim. Fluorescent color readout of DNA hybridization with thiazole orange as an artificial DNA base. *Angewandte Chemie, International Edition* (**2009**), 48(13), 2418-2421.
4. Prunkl, Christa; **Berndl, Sina**; Wanninger-Weiß, Claudia; Barbaric, Janez; Wagenknecht, Hans-Achim. Photoinduced short-range electron transfer in DNA with fluorescent DNA bases: Lessons from ethidium and thiazole orange as charge donors. *Physical Chemistry, Chemical Physics* (**2010**), 12, 32-43.
5. **Berndl, Sina**; Breunig, Miriam; Göpferich, Achim; Wagenknecht, Hans-Achim. Imaging of RNA Delivery to Cells by Thiazole Orange as a Fluorescent Base Substitution. *Organic and Biomolecular Chemistry* (**2010**), 8, 997-999.
6. Lachmann, Daniel; **Berndl, Sina**; Li, Xiaohua; Wolfbeis, Otto S.; and Wagenknecht, Hans-Achim. Synthetic incorporation of Nile blue into DNA using 2'-deoxyriboside substitutes: Representative comparison of (*R*)- and (*S*)-aminopropanediol as an acyclic linker. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* (**2010**), 6(13), doi:10.3762/bjoc.6.13.
7. Holzhauser, Carolin; **Berndl, Sina**; Menacher, Florian; Breunig, Miriam; Göpferich, Achim; and Wagenknecht, Hans-Achim. Synthesis and optical properties of cyanine dyes as fluorescent DNA base substitutions for live cell imaging. *European Journal of Organic Chemistry* (**2010**), 7, 1239-1248.



---

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Motivation und Aufgabenstellung</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>9</b>
3.1	Nicht-enzymatische SNP-Detektion	9
3.2	Molecular Beacons	14
3.2.1.	MB auf Basis von FRET-Wechselwirkungen	14
3.2.2.	MB auf Basis von Excimer-Bildung	21
3.3	Cyanine: Thiazole Orange	25
3.3.1.	Cyanine	25
3.3.2.	Bisherige und aktuelle Studien zu Thiazol Orange	26
3.4	Excitonische Wechselwirkungen zwischen Chromophoren	32
<b>4.</b>	<b>Thiazole Orange in DNA</b>	<b>39</b>
4.1	Synthese	39
4.2	Interstrang-Dimere	43
4.2.1.	Optische Eigenschaften	43
4.2.2.	Gegenbasenvariation	52
4.2.3.	Nachbarbasenvariation	55
4.3	Intrastrang-Dimere	59
4.3.1.	Parallele Anordnung	59
4.3.2.	Antiparallele Anordnung	62
4.4	„Split Probes“	68
4.5	Thiazol Orange Chromophorenstapel in DNA	72
4.6	Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie	78
4.6.1.	Einführung	78
4.6.2.	Messungen	79
4.7	Excimere oder fluoreszente H-Aggregate	81
<b>5.</b>	<b>Bioanalytische TO-Dimer Anwendungen</b>	<b>86</b>

<b>5.1</b>	<b>SNP-Detektion</b>	<b>86</b>
<b>5.2</b>	<b>Molecular Beacon</b>	<b>91</b>
5.2.1.	Vorversuche	91
5.2.2.	Vollständig komplementäre Zielsequenz	98
5.2.3.	Zielsequenz mit Basenfehlpaarungen	106
5.2.4.	Evaluation der Stammlänge	113
5.2.5.	Molecular Beacons mit doppeltem TO-Dimer	120
<b>6.</b>	<b>Thiazol Orange in RNA</b>	<b>126</b>
<b>6.1</b>	<b>TO-Monomer und TO-Dimer in RNA</b>	<b>128</b>
<b>6.2</b>	<b>Cell Imaging</b>	<b>132</b>
<b>6.3</b>	<b>Gene Silencing</b>	<b>136</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
<b>8.</b>	<b>Klick-Chemie</b>	<b>142</b>
<b>8.1</b>	<b>Einführung in die Klick-Chemie</b>	<b>142</b>
<b>8.2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>145</b>
<b>8.3</b>	<b>Klick-Linker</b>	<b>146</b>
8.3.1.	( <i>R</i> )- vs. ( <i>S</i> )-Klick-Linker	146
8.3.2.	Klick-Uridin vs. ( <i>S</i> )-Klick-Linker	154
<b>8.4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>161</b>
<b>9.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>164</b>
<b>9.1</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>164</b>
<b>9.2</b>	<b>Organisch-chemische Synthesen</b>	<b>169</b>
<b>9.3</b>	<b>DNA Synthesen</b>	<b>186</b>
9.3.1.	Kopplungsprotokolle	186
9.3.2.	Reinigung und Aufarbeitung	188
9.3.3.	Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide	190
<b>9.4</b>	<b>RNA Synthesen</b>	<b>200</b>
9.4.1.	Kopplungsprotokolle	200
9.4.2.	Reinigung und Aufarbeitung	203
9.4.3.	Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide	203
	<b>Klick-DNA Synthesen</b>	<b>206</b>

---

9.4.4.	Klick-Ligation	206
9.4.5.	Charakterisierung der synthetisierten Klick-DNA-Sequenzen	206
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>211</b>
<b>11.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>215</b>



---

## 2. Motivation und Aufgabenstellung

Eine der größten Herausforderungen der Wissenschaft besteht immer noch in der Bekämpfung und Heilung schwerer Erkrankungen, wie zum Beispiel Autoimmunkrankheiten oder Krebs. 1990 gelang die erste gentherapeutische Behandlung eines vierjährigen Mädchens, das an SCID (**S**evere **C**ombined **I**mmun**o**deficiency) litt.<sup>[1, 2]</sup> SCID ist eine Krankheit, bei der das Immunsystem in seiner Funktion erheblich oder nahezu vollständig eingeschränkt ist.<sup>[3]</sup> Das heißt, es findet nur eine ungenügende oder gar keine Immunantwort statt – schon eine Erkältung kann zum Tode führen.

Mit der Entdeckung und Isolierung von Nukleinsäuren, dies gelang erstmals 1871 durch *Friedrich Miescher*<sup>[4]</sup>, wurde der Grundstein der modernen Molekularbiologie gelegt. 70 Jahre später konnte *Oswald Avery* die DNA als Träger der Erbinformation identifizieren.<sup>[5]</sup> *James Watson* und *Francis Crick* gelang mit Hilfe der Röntgenbeugungsdiagramme von *Rosalind Franklin* die Aufklärung der doppelhelikalen Struktur der DNA im Jahr 1953.<sup>[6]</sup> Diese denkwürdige Publikation enthält gegen Ende den Satz „*It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material*“ (Es ist unserer Aufmerksamkeit nicht entgangen, dass die speziellen Paarungen, die wir als gegeben voraussetzen, unmittelbar auf einen möglichen Vervielfältigungsmechanismus für die genetische Erbsubstanz schließen lassen.) Damit war die Grundlage zur Entwicklung leistungsfähiger Verfahren zur Analyse<sup>[7]</sup>, Herstellung<sup>[8-10]</sup> und Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen, letztere gelang mittels PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)<sup>[11]</sup>, für die Kary Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt.<sup>[4]</sup> Den vorläufigen Höhepunkt erreichte diese Entwicklung 2003 mit der Vollendung des *Humanen Genom Projekts*.<sup>[12]</sup>

Bei der Erfassung des menschlichen Genoms konnte festgestellt werden, dass häufig sogenannte Einzelbasenmutationen (SNP, **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) auftreten.<sup>[13]</sup> Die beiden Kopien des menschlichen Genoms, die Chromosomen, unterscheiden sich in 0.1 % der Nukleotide. Das bedeutet, dass im Durchschnitt eine Punktmutation pro 1000 Basen auftritt. Eine Punktmutation kann erhebliche Folgen nach sich ziehen. Befinden sich diese in codierenden Bereichen von Genen, können Krankheiten, wie Alzheimer, Krebs oder Parkinson resultieren.<sup>[14]</sup> Die Detektion von

Mutanten, insbesondere von SNPs, ist von fundamentaler Bedeutung, da nur bei Kenntnis der individuellen genetischen Voraussetzungen ein Ausbruch dieser Krankheiten frühzeitig erkannt, verzögert oder gar verhindert werden kann. Ebenso können Infektionskrankheiten durch Analyse des Krankheitserregers frühzeitig und zweifelsfrei identifiziert und dadurch gezielt behandelt werden.<sup>[15]</sup>

Es wurde seither eine Reihe von enzymatischen und nicht-enzymatischen Methoden zur Detektion von SNPs entwickelt.<sup>[16, 17]</sup> Wünschenswert sind Detektionssysteme, die schnell, zuverlässig und kostengünstig Auskunft über die Existenz von Punktmutationen geben, ohne die Notwendigkeit einer aufwendigen Detektionsmaschinerie.

Die Entdeckung, dass prokaryotische Zellen ebenfalls Nukleinsäuren enthalten, führte 1939 zu der Annahme, dass diese eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese darstellen müssen.<sup>[18]</sup> *Roger D. Kornberg* erhielt 2006 für seine Arbeiten über die RNA-Polymerase den Nobelpreis für Chemie. Er konnte maßgeblich zur Aufklärung der RNA-Synthesemechanismen und der Grundlagen der Transkriptionsprozesse beitragen.<sup>[19]</sup> Für die Entdeckung der katalytischen Aktivität von RNA-Oligonukleotiden (Ribozyme) wurden *Sidney Altman* und *Thomas Cech* 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt.<sup>[20-23]</sup> Im Jahr 2006 erhielten *Andrew Fire* und *Craig Mello* den Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung der RNA-Interferenz.<sup>[24]</sup> Die molekularbiologische Forschung setzt synthetisierte siRNA (*small interfering RNA*) ein, um die Expression bestimmter Gene herab zu regulieren (*Gene-Knockdown* oder *Gene Silencing*). 2004 konnten die ersten Therapeutika auf siRNA-Basis entwickelt und zugelassen werden.<sup>[25, 26]</sup>

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines fluoreszenten Detektionssystems für Oligonukleotide. Durch die duale Markierung von Oligonukleotiden mit dem Cyaninfarbstoff Thiazol Orange sollen Punktmutationen anhand der Emissionsfarbe mit dem Auge detektiert werden. Zunächst soll die Sensitivität der als diagonales Dimer in DNA inkorporierten Chromophore auf ihre Basenumgebung evaluiert werden, um im Anschluss die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der Chromophore in Abhängigkeit ihres Einbaus in DNA als Inter- bzw. Intrastrang-Dimere zu untersuchen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe



*Fiebig* an der *Northwestern University, Evanston*, sollen durch zeitaufgelöste, transiente Absorptionsmessungen die photophysikalischen Ursachen für die veränderten optischen Eigenschaften der Thiazol-Orange-Dimere, im Vergleich zu den Monomeren, erforscht werden. Eine Anwendung des Thiazol-Orange-Dimers zur schnellen, zuverlässigen und einfachen Detektion von Basenfehlpaarungen soll mit Hilfe der Molecular-Beacon-Technik realisiert werden.

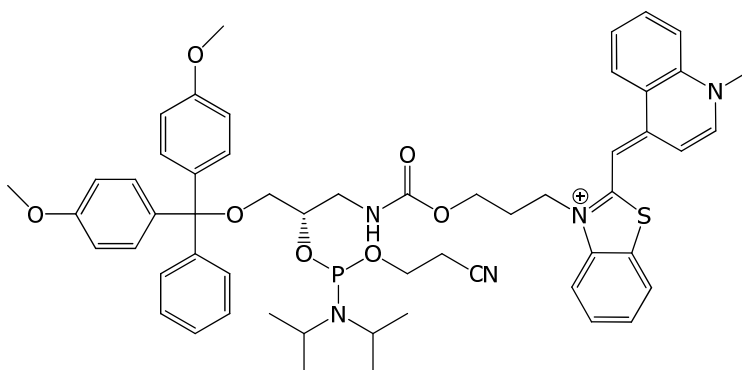


Abbildung 2-1: Zielmolekül Thiazol-Orange-Phosphoramidit **8**.

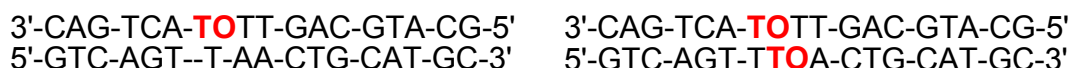


Abbildung 2-2: Beispielsequenzen eines monomeren Thiazol Oranges in DNA (links), diagonale Anordnung zweier TO-Chromophore als Dimer in DNA (rechts).

Im zweiten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob das TO-Dimer-Konzept von DNA auf RNA übertragen werden kann und dadurch zur Weiterentwicklung fluoreszenter RNA-Analytik und -Bildgebung in Zellen beitragen kann. Dies soll am Beispiel des *Gene-Silencing*-Prozesses (Genstilllegung) des für EGFP-codierenden Gens in CHO-K1/EGFP-Zellen gezeigt werden (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*).

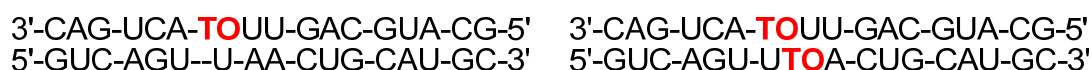


Abbildung 2-3: Beispielsequenzen eines monomeren Thiazol Oranges in RNA (links), diagonale Anordnung zweier TO-Chromophore als Dimer in RNA (rechts).

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der postsynthetischen Ligation von Chromophoren an DNA mittels der CuAAC (**Cu**(I)-katalysierte **Azid Alkin Cycloaddition**). Dies soll die zeitaufwendige Synthese der jeweiligen Phosphoramidit-

Derivate umgehen und so eine schnellere Evaluation der optischen Eigenschaften fluoreszenter Moleküle in DNA ermöglichen. Dabei soll der in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* standardmäßig verwendete azyklische Linker 3-Amino-1,2-propandiol mit einer Acetylenfunktion modifiziert und der Einfluss der (*S*)- bzw. (*R*)-Konfiguration auf die optischen Eigenschaften eines Chromophors untersucht werden. Um ein optimales Anbindungssystem an Oligonukleotide zu entwickeln, soll das azyklische (*S*)-Linkersystem mit einer glykosidischen Anknüpfungweise (acetylenmodifiziertes Uridin) verglichen werden. Als Chromophor soll das Nilblau-Azid verwendet werden, dessen Fluoreszenz durch Oxidation eines Guanins gelöscht wird. Diese Eigenschaft kann als sensibles Werkzeug zur Evaluation des Interkalationsverhaltens des Chromophors in Abhängigkeit seiner Anknüpfungsweise an das Oligonukleotid ausgenutzt werden.

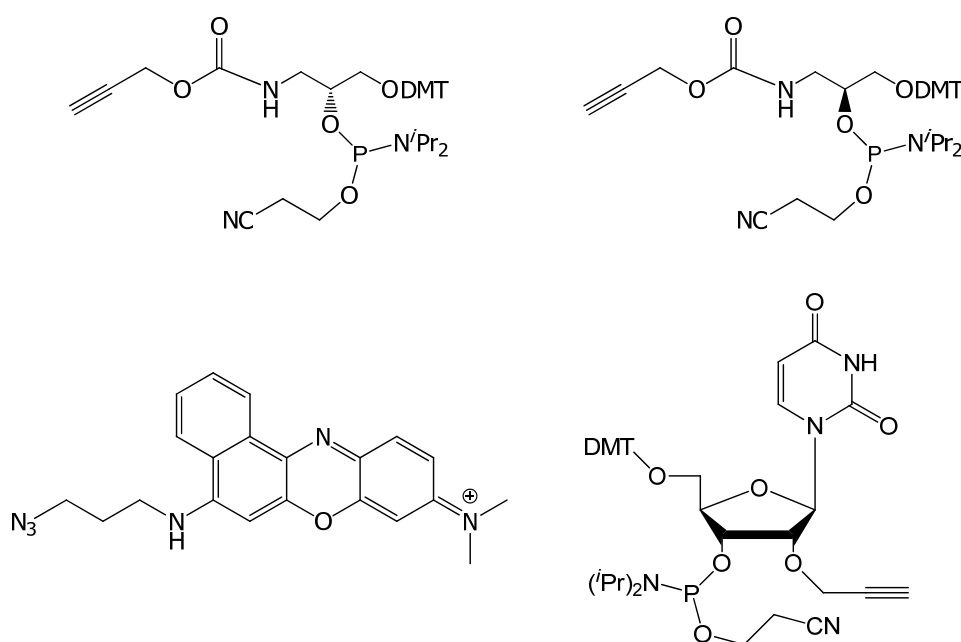


Abbildung 2-4: Zielmoleküle (*R*)-3-Amino-1,2-propandiol **10** (oben, links), (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol **16** (oben, rechts), sowie das Nilblau-Azid (unten, links) und das acetylenmodifizierte Uridin (unten, rechts).

### 3. Theoretischer Hintergrund

DNA als Träger der Erbinformation rückte im Laufe der letzten Jahre in den Fokus medizinischer Diagnostik. Die Behandlung von Erbkrankheiten durch Gentherapie<sup>[27]</sup> gewinnt an Bedeutung, die Ausschaltung von Onkogenen<sup>[28]</sup> und die Identifizierung von pathogenen oder viralen DNA-Sequenzen<sup>[15]</sup> ist heute relativ einfach möglich. Die Entwicklung neuer Analysemethoden zur Detektion einzelner Basenfehlpaarungen in bestimmten Gensequenzen ist von großem medizinischem und pharmazeutischem Interesse.<sup>[16, 29]</sup>

#### 3.1 Nicht-enzymatische SNP-Detektion

Als Punktmutationen (SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*) bezeichnet man veränderte Genabschnitte, die sich im Vergleich zum Wildtyp um nur eine einzige Base unterscheiden.<sup>[16, 30-33]</sup> Dabei handelt es sich nicht um eine Basenfehlpaarung, sondern um den Austausch eines ganzen Basenpaares (siehe Abbildung 3-1).

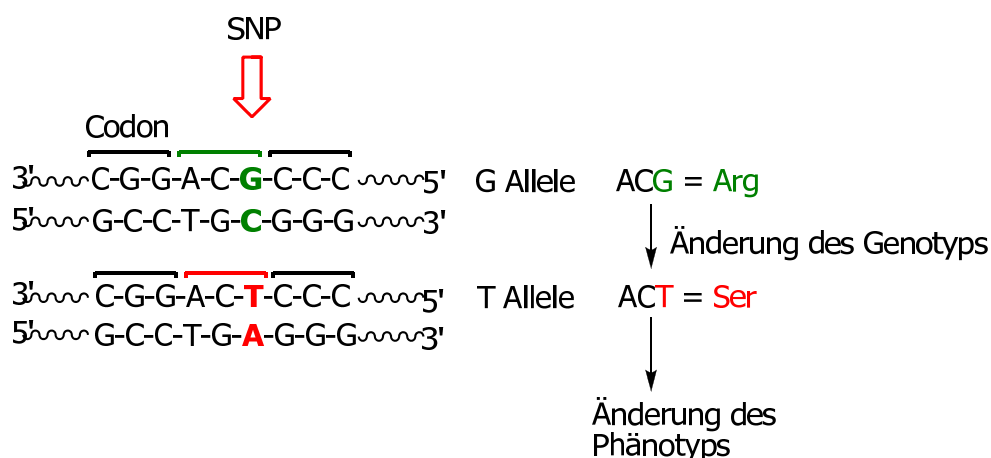


Abbildung 3-1: Beispiel für eine Punktmutation: Wildtyp (oben), Mutante (unten).

Liegen diese Punktmutationen in einem Bereich, der für Proteine codiert, kann es zu Änderungen in der Aminosäuresequenz kommen, die wiederum einen veränderten Phänotyp zur Folge haben kann. Liegt der SNP in einer Promotorregion, kann eine veränderte Genexpression zu vererbten Krankheiten führen. Daher ist die Detektion von SNPs in der medizinischen und pharmazeutischen Diagnostik<sup>[16, 17]</sup> von erheblicher Bedeutung.

Ein gut verstandenes Beispiel für die Folgen, die eine Punktmutation haben kann, ist das p53-Protein.<sup>[34]</sup> Dieses Protein fungiert in der Zelle als Tumorsuppressor, der an bestimmten Kontrollpunkten des Zellzyklus Schäden signalisiert und Reparaturmechanismen oder Apoptose<sup>[35]</sup> einleitet. Dadurch wird der Organismus vor der Entstehung von Tumoren bewahrt. In ungefähr der Hälfte aller humanen Tumore ist das p53-Protein als Folge einer Mutation im p53-Gen inaktiv.<sup>[35]</sup> Anhand dieses Beispiels wird die enorme Bedeutung der SNP-Detektion für diagnostische Zwecke deutlich. Die bestehenden Methoden zum Nachweis von Punktmutationen durch Fluoreszenzanalytik lassen sich in enzymatische (TaqMan-Assay<sup>[16, 17, 36]</sup>, Invader-Assay<sup>[16, 17, 37]</sup> oder Einzelnukleotid-Primer-Verlängerung<sup>[16, 38]</sup>) und nicht enzymatische Systeme einteilen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung nicht-enzymatischer Nachweismethoden von richtig und fehlgepaarten Oligonukleotiden, daher werden hier kurz die wichtigsten, aktuellen Methoden vorgestellt.

### Allelspezifische Hybridisierung<sup>[39]</sup>

Diese Methode basiert auf unterschiedlichen Stabilitäten von richtig und fehlgepaarten Duplexen. Fluoreszenzmarkierte allelspezifische Oligonukleotide werden auf einer Oberfläche immobilisiert, nach der Hybridisierung mit der Ziel-DNA werden fehlgepaarte Duplexe dehybridisiert und gewaschen. Da die thermischen Stabilitätsunterschiede zwischen richtig und fehlgepaarten Duplexen oft nur sehr gering und sequenzabhängig sind, gibt es eine hohe Fehlerquote.

### Strang-Austausch-Methode<sup>[16, 40]</sup>

Während bei der Allelspezifischen Hybridisierung thermodynamische Unterschiede der Duplexstabilität ausgenutzt werden, spielt bei der Strang-Austausch-Methode die Kinetik der Duplexbildung die entscheidende Rolle. Als Sonde wird ein korrekt gepaarter Duplex verwendet, der an beiden Enden jeweils einen Chromophor trägt (z.B. TAMRA, Carboxytetramethyl-Rhodamin, und FITC, Fluorescein-Isothiocyanat), zwischen denen ein FRET stattfindet. Es hat sich herausgestellt, dass kammartig ausgebildete kationische Copolymere (CCTC, *cationic comb-type copolymers*) den Strangaustausch eines richtig gepaarten Duplexes mit einem komplementären Einzelstrang beschleunigen.<sup>[16]</sup> Werden zur FRET-Sonde als Ziel-DNA komplementäre

und nicht-komplementäre Sequenzen in Anwesenheit des CCTC gegeben, so werden die komplementären Einzelstränge ausgetauscht, wodurch der FRET unterbrochen wird und ein Fluoreszenzsignal entsteht. Der nicht-komplementäre Einzelstrang wird deutlich langsamer ausgetauscht, der FRET bleibt bestehen.

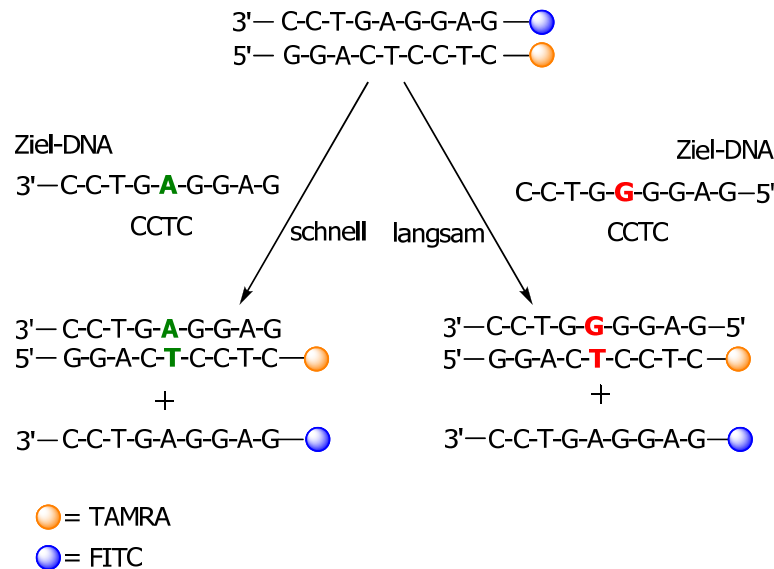


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Strang-Austausch-Methode.

### Artifizielle fluoreszente Basensurrogate

Alternativ wird versucht, Detektionssysteme zu entwickeln, die auf fluoreszenten Basensurrogaten basieren. Sogenannte BDF Probes (***Base-Discriminating Fluorescence Probes***) ändern ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit der elektronischen und strukturellen Basenumgebung. Sie werden als Basenersatz in das Oligonukleotid eingebaut und zeigen durch Varianzen in der Fluoreszenzintensität an, ob ein Wildtyp vorliegt oder eine Mutante.

Saito *et al.*<sup>[41-45]</sup> entwickelten fluoreszenzmarkierte DNA-Basen (z.B. <sup>Py</sup>dC oder <sup>Py</sup>dU), die in der Lage sind, Basenfehlpaarungen zu erkennen und durch verminderte Fluoreszenz anzuzeigen. Die Autoren gehen davon aus, dass das Pyren im richtig gepaarten Duplex nach außen in die große Furche zeigt, beim fehlgepaarten Strang dagegen in den Duplex dreht und die Fluoreszenz durch elektronische Wechselwirkungen mit den Basen gelöscht wird.

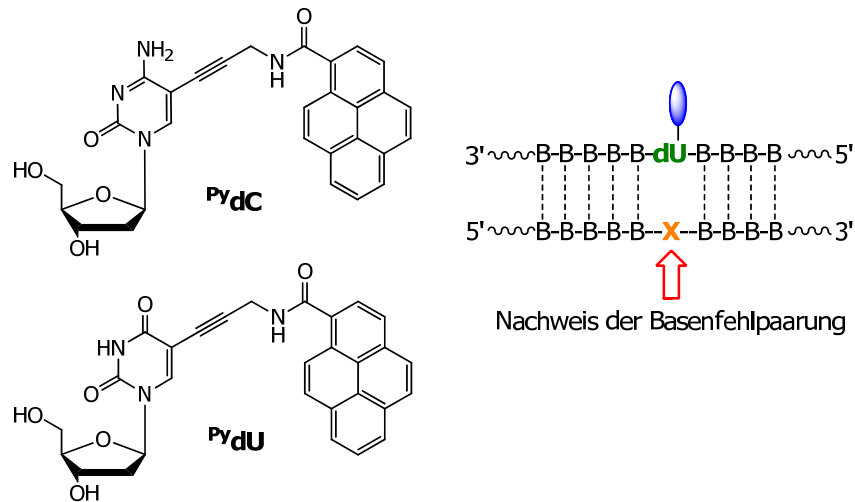


Abbildung 3-3: Prinzip der BDFs nach *Saito et al.* (rechts) am Beispiel von Pyren-modifiziertem Cytosin (oben) und Uridin (unten).

*Seitz et al.* entwickelten mit Thiazol Orange die sogenannten FIT-Probes (**F**orced **I**ntercalation of **T**hiazole **O**range **P**robes).<sup>[46-51]</sup> Wird ein mit Thiazol Orange modifizierter PNA-Strang (PNA = **P**eptide **N**ucleic **A**cid) mit DNA hybridisiert, steigt die Fluoreszenz des TO erheblich an. Bei Basenfehlpaarungen unmittelbar neben dem Chromophor sinkt die Emissionsintensität stark ab. Dies liegt daran, dass dem Thiazol Orange in fehlgepaarter Basenumgebung mehr konformationelle Freiheit zur Verfügung steht und die Energie, die es bei der Anregung aufnimmt, über Rotation um die Methinbrücke abgibt. Interkaliert der Chromophor, kann es seine Energie nur über Strahlung, d.h. Fluoreszenz abgeben.

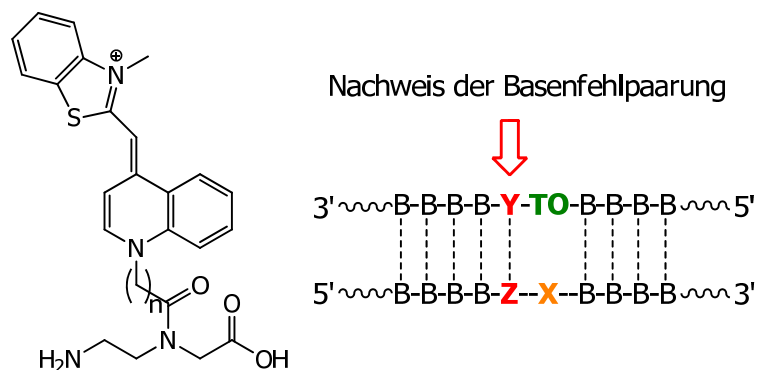


Abbildung 3-4: TO-Baustein von *Seitz et al.* (links), Nachweis der Basenfehlpaarung in unmittelbarer Nachbarschaft zum TO (rechts).

Einen ganz anderen Ansatz wählten *Wagenknecht et al.* mit der Entwicklung des DETEQ-Systems (**D**etection by **E**lectron **T**ransfer-controlled **E**mission **Q**uenching).<sup>[52]</sup> Dazu wird ein redoxaktiver Fluorophor im Abstand von bis zu drei Basenpaaren von einem geeigneten Ladungsakzeptor positioniert. Wird der Fluorophor angeregt, wird seine Fluoreszenz durch Ladungstransfer auf den Akzeptor gelöscht. Befindet sich allerdings eine Basenfehlpaarung zwischen Donor und Akzeptor, nimmt die Ladungstransfereffizienz ab und die Fluoreszenzintensität steigt an.

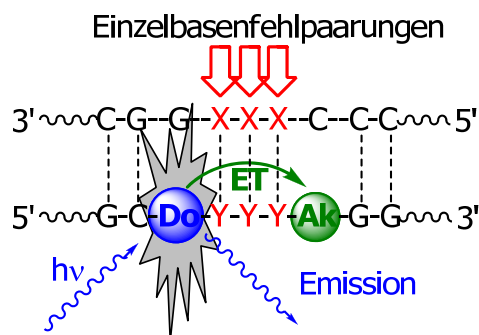


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung des DETEQ-Konzepts der *Wagenknecht*-Gruppe.  
Do = Donor, Ak = Akzeptor, ET = Elektronentransfer.

Dies sind nur einige Beispiele fluoreszenter Oligonukleotidsonden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Großteil auf FRET-Systemen oder basenumgebungsabhängigen Fluoreszenzintensitätsunterschieden beruht. Dabei sind die wesentlichen Nachteile, dass thermodynamische Stabilitätsunterschiede oft nur sehr klein sind und entsprechende Hybridisierungsbedingungen sorgfältig gewählt werden müssen. Zum anderen resultieren die Fluoreszenzsignale oft nur aus einem Chromophor, dessen Fluoreszenzintensität durch Artefakte in der Anregung oder Detektion zu verfälschten Ergebnisse führen kann. In dieser Arbeit präsentieren wir mit Thiazol Orange markierte Oligonukleotide, die diesen Problemen durch Verschiebung von Wellenlängen im Fluoreszenzsignal begegnen, bei gleichzeitig hoher thermodynamischer Stabilität der Duplexe.

## **3.2 Molecular Beacons**

Das rasch anwachsende Wissen über das Genom und die Genexpression, ließ die Nachfrage nach neuen, fluoreszenten DNA-Analysetechniken sehr stark ansteigen. Gensequenzierung, Detektion von Mutanten und Nachweise von bestimmten Nukleinsäuresequenzen sind sowohl für die Krankheitsdiagnostik als auch für die Entwicklung neuer Medikamente äußerst wichtig.<sup>[53-56]</sup> Nach ihrer Entwicklung 1965<sup>[57]</sup>, wurden die Molecular Beacons (MB) zu einem der wichtigsten<sup>[58-61]</sup> Instrumente in der Chemie, Biologie, Biotechnologie und in den medizinischen Wissenschaften, zur Erkennung und Detektion biomolekularer Strukturen.<sup>[55, 56, 62-64]</sup>

### **3.2.1. MB auf Basis von FRET-Wechselwirkungen**

Theodor Förster entdeckte 1946 den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), einen physikalischen Prozess<sup>[65]</sup>, bei dem die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor) auf einen zweiten Fluorophor (Akzeptor) strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen<sup>[66]</sup> übertragen werden kann. Der Fluoreszenz-Energie-Resonanz-Transfer ist eine Variante des Förster-Energietransfers.<sup>[67]</sup> FRET kann sowohl über die Abnahme der Fluoreszenz des Donors, als auch über die Zunahme der Fluoreszenz des Akzeptors detektiert werden.<sup>[68]</sup> Damit ein FRET stattfinden kann, müssen verschiedene Voraussetzungen gegeben sein:

1. Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen.<sup>[68]</sup>
2. Donor und Akzeptor müssen in einem Abstand zwischen 1.5 und 10 nm positioniert sein (Förster-Radius).

Die Distanzabhängigkeit eines FRET wird durch folgende Gleichung wiedergegeben:

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

Gleichung 3-1: Distanzabhängigkeit der Energietransferrate eines FRET;

$k_T$  = Energietransferrate

$\tau_D$  = Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

$R_0$  = Försterradius (Abstand mit 50 % Energietransfereffizienz)

$r$  = Abstand der Chromophore



In Abbildung 3-6 ist ein Beispiel für ein sich überlappendes Donorabsorptions- und Akzeptoremissionsspektrum aufgeführt, hier wäre ein FRET möglich.

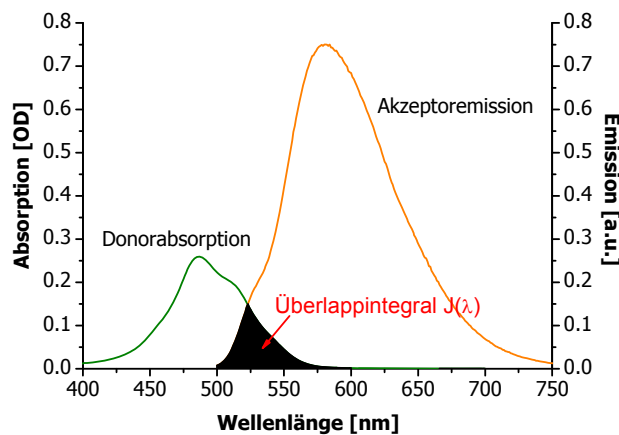


Abbildung 3-6: Beispiel für ein sich überlappendes Absorptions- (Donor) und Emissionsspektrum (Akzeptor), Überlappintegral  $J(\lambda)$  ist schwarz ausgefüllt.

FRET-Experimente sind inzwischen ein häufig angewendetes Instrument zur Detektion von Abstandsverhältnissen in DNA<sup>[69]</sup> oder RNA.<sup>[70]</sup> Sie werden ebenso zur Beobachtung konformationeller Änderungen<sup>[71]</sup>, zur Verfolgung biologischer Prozesse<sup>[72, 73]</sup> oder im Bereich der Nanotechnologie angewandt (als Molecular Beacon auf DNA-Microarrays oder in der Genexpressionsanalyse).<sup>[74-76]</sup>

Die Molecular Beacons erster Generation fungieren wie Lichtschalter. Eine DNA-Sequenz ist an beiden Enden jeweils selbstkomplementär und bildet so eine Haarnadel mit einem kurzen Duplex, dem Stamm. Das 3'-Ende ist mit einem Fluorophor markiert (z.B. TAMRA, ein Rhodamin-Derivat), dessen Fluoreszenz durch den Quencher am 5'-Ende (z.B. Dabcyl, ein Azobenzol-Derivat), aufgrund der räumlichen Nähe bei der Ausbildung der Haarnadel gelöscht wird. Im Ausgangszustand, der Haarnadel, zeigen die MB keine Fluoreszenz. Durch die Erkennung der Zielsequenz öffnet sich die Haarnadel und bildet einen Duplex mit dem komplementären Gegenstrang. Quencher und Fluorophor werden dadurch voneinander getrennt, der Chromophor beginnt zu emittieren. Abbildung 3-7 zeigt die Funktionsweise eines Molecular Beacons.

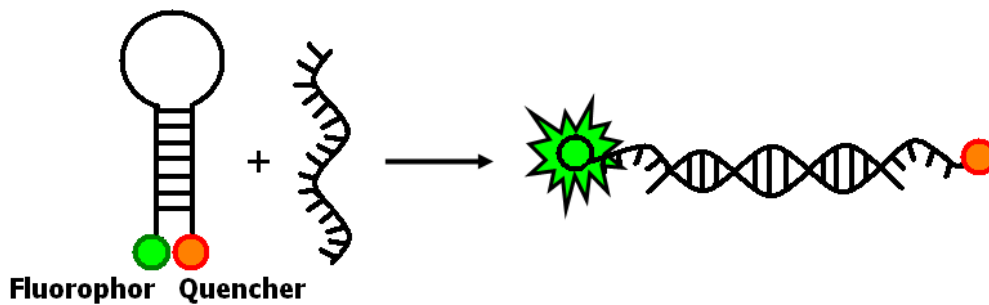


Abbildung 3-7: Schematische Funktionsweise eines Molecular Beacons.

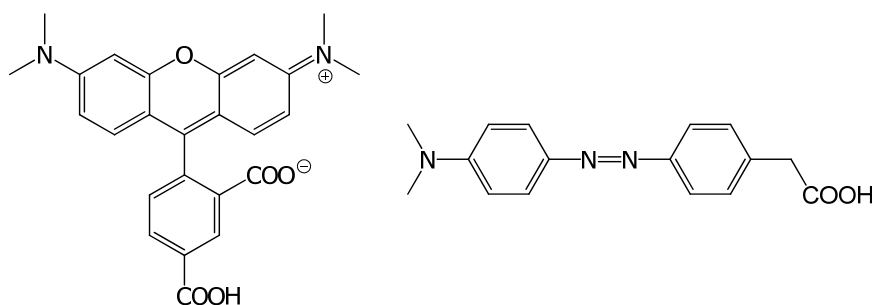


Abbildung 3-8: Typisches Fluorophor-Quencher-Paar:  
 Fluorophor: TAMRA [5 - Carboxytetramethyl-Rhodamin] (links),  
 Quencher: Dabcyl 2-(4-((4-(Dimethylamino)phenyl)diazenyl)-  
 phenyl)essigsäure (rechts).

Die Schleifen-Region (15-30 bp) ist komplementär zur Zielsequenz, während die Stamm-Region (5-7 bp) komplementär zu sich selbst ist. Das Signal entsteht durch einen FRET bzw. durch die Aufhebung des FRETs aufgrund der Separation von Fluorophor und Quencher. Die Öffnung der Haarnadel kommt dadurch zustande, dass der entstehende Duplex durch eine längere Basensequenz einen thermodynamisch stabileren Zustand darstellt, als die Schleife.

Die Molecular-Beacon-Technik wurde mit dem Ziel weiterentwickelt, ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis, bei höherer Sensitivität für die Zielsequenz zu erreichen. Dazu wurden von *Saito et al.* *in-stem*-Molecular Beacons synthetisiert, die den Fluorophor und den Quencher im Stamm platzierten. Dadurch sind Fluorophor und Quencher gezwungen in räumliche Nähe zueinander zu treten, die Hintergrundfluoreszenz konnte so stark reduziert werden.<sup>[77, 78]</sup>

Im Gegensatz zu den MB erster Generation, bei denen eine dynamische Fluoreszenzlöschung stattfindet, wird die Emission von *in-stem*-Molecular Beacons

durch statisches Quenchen gelöscht.<sup>[79]</sup> Abbildung 3-9 zeigt die grundlegenden Unterschiede zwischen dynamischem und statischem Löschen von Fluoreszenz.

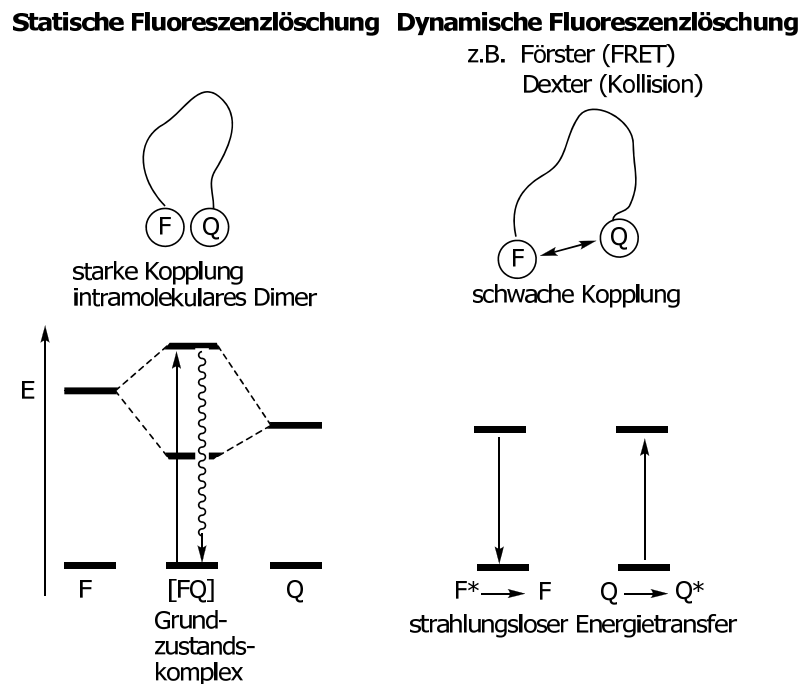


Abbildung 3-9: Vergleich der statischen (links) und dynamischen (rechts) Fluoreszenzlöschung.  
F = Fluorophor, Q = Quencher.

Beim dynamischen Quenchen unterscheidet man zwischen Förster- und Dexter-Mechanismus.<sup>[67, 80]</sup> Der Dexter-Mechanismus (auch bekannt als Kollisions-Energie-Transfer) hängt von der Überlappung der Molekülorbitale ab und ist daher stark distanzabhängig (die Abnahme des Dexter Energie Transfers ist proportional zu  $e^{-R}$ , wobei R die Donor-Akzeptor-Distanz darstellt). Der Förster-Mechanismus basiert auf den Wechselwirkungen zwischen den Übergangsdipolmomenten von Donor und Akzeptor.<sup>[81]</sup> Die Abnahme des Förster-Energie-Transfers ist proportional zu  $1/R^6$ . Die statische Fluoreszenzlöschung kommt durch die Bildung von Grundzustandskomplexen zustande, d.h. Donor und Akzeptor aggregieren, dadurch wird die Fluoreszenz des Donors nahezu vollständig gelöscht.<sup>[82, 83]</sup> Im Gegensatz zu FRET-Prozessen, die abhängig sind von der Überlappung des Absorptionsspektrums des Donors mit dem Fluoreszenzspektrums des Akzeptors, sind die statischen Löschprozesse lediglich abhängig von der Überlappung der Absorptionsspektren von

Donor und Akzeptor. Dies vereinfacht die Auswahl und Kombination von Chromophoren und damit das Design von Molecular Beacons.<sup>[84]</sup>

Eine weitere Möglichkeit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu optimieren, ist die *shared-stem* Variante eines Molecular Beacons, bei der die Zielsequenz nicht nur komplementär zur Schleife ist, sondern auch einen Teil des Stamms abdeckt.<sup>[85]</sup>

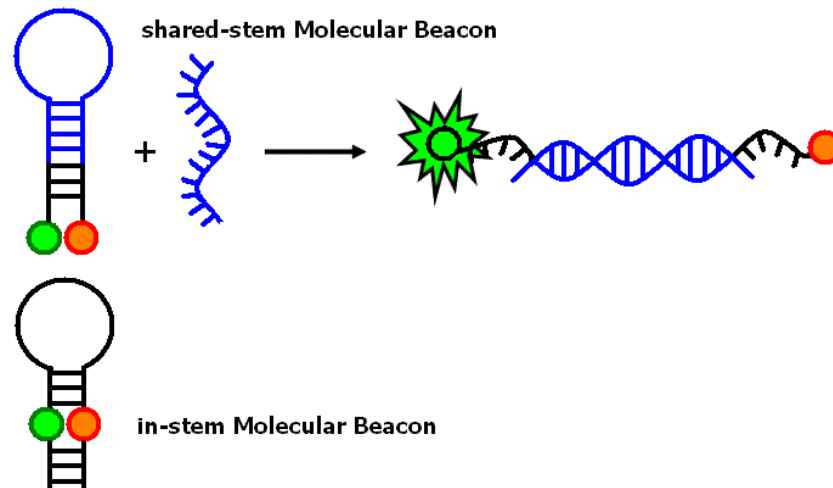


Abbildung 3-10: Schematische Darstellung eines *shared-stem* Molecular Beacons (oben) und eines *in-stem* Molecular Beacons (unten).

Es wurde bereits eine Vielzahl von organischen Fluorophoren an DNA gebunden, um so über die Molecular-Beacon-Technik die Komplementarität einer gegebenen Sequenz oder Einzelbasenmutationen durch gesteigerte oder gelöschte Fluoreszenz anzuzeigen.<sup>[16, 17, 45, 50, 57, 84, 86-91]</sup> Es ist möglich, dass es durch unerwünschte Fluoreszenzlöschungen, z.B. durch Ladungstransferprozesse oder Artefakte in der Emissionsanregung, zu Fehlsignalen und damit zu verfälschten Ergebnissen kommen kann. Durch duale Fluoreszenzmarkierung können solche Probleme umgangen werden, da sich bei der Erkennung eines Zielstranges die Wellenlänge des Emissionsmaximums ändert und damit die Farbe der Fluoreszenz.<sup>[76, 92, 93]</sup>

Das Prinzip des Molecular Beacons ist von *Tyagi et al.* weiter entwickelt worden<sup>[92]</sup>: es wurde durch Dreifach-Markierung eine Reihe von MBs geschaffen, die alle durch die gleiche monochromatische Lichtquelle anregbar sind, jedoch in unterschiedlichen

Farben fluoreszieren. Möglich wird dies durch die Kombination unterschiedlicher Emitter-Fluorophore (z.B. Texas Red) mit einem sog. „Harvester-Fluorophor“ (Tetramethyl-Rhodamin), welcher sich im Falle der Haarnadelstruktur des MB in unmittelbarer Nähe zum *FRET*-Akzeptor befindet. Wird die komplementäre Zielsequenz zugegeben, so findet keine Löschung mehr durch den Quencher (Dabcyl) statt, sondern ein *FRET* vom Harvester- zum Emitterfluorophor, die über einen Spacer miteinander verbunden sind.

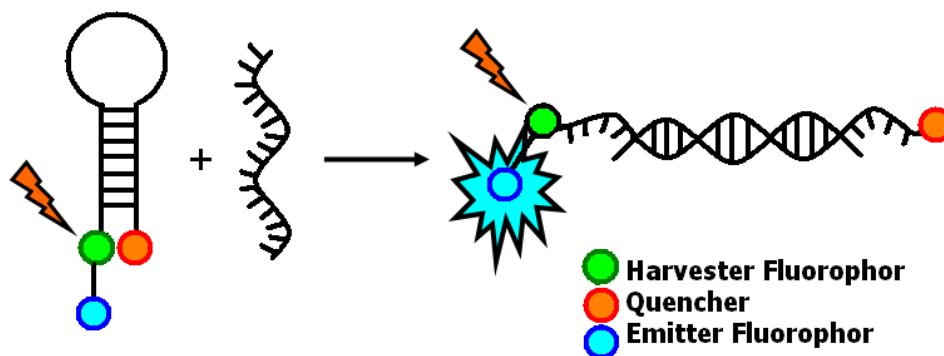


Abbildung 3-11: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines dreifach markierten Molecular Beacons nach Tyagi.

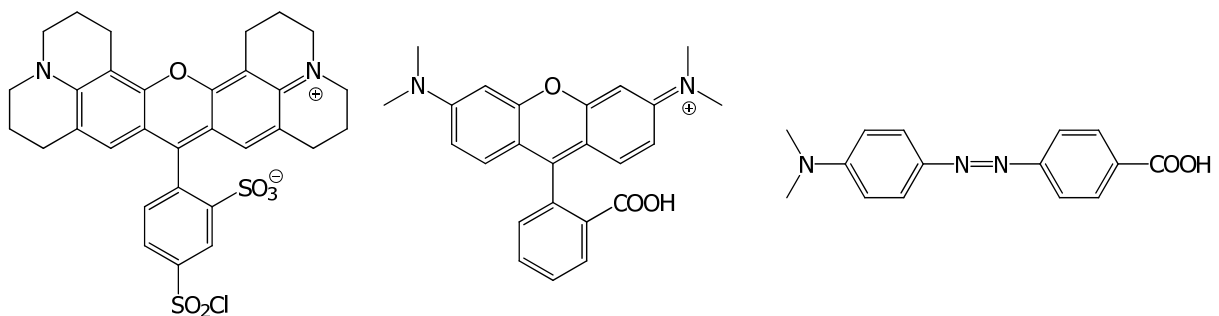


Abbildung 3-12: Texas Red (links), Tetramethyl-Rhodamin (Mitte), Dabcyl (rechts).

Durch die Verschiebung der Emissionswellenlänge ist ein eindeutiges Messsignal möglich, allerdings entsteht kein zusätzlicher Beitrag zur Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, da das Signal nur von einem Emitterfluorophor erzeugt wird.

*Tan et al.* gelang die Entwicklung eines Molecular Beacons mit zwei Fluorophoren.<sup>[94]</sup> Der MB wurde so gestaltet, dass in der Haarnadel-Form einer der Fluorophore emittiert und der andere gelöscht wird. In der offenen Duplexform wird der erste Chromophor nicht mehr gelöscht, sondern fluoresziert nun. Dies gelang mit einem Fluorescein-Coumarin-Paar. So konnte nicht nur der Anstieg der Emissionsintensität eines einzigen Fluorophors detektiert werden, sondern sowohl die Abnahme des einen Chromophors, als auch die Zunahme der Fluoreszenzintensität des anderen Chromophors. Die Auswertung der Emissionsunterschiede mit Verhältnisse erleichtert die Handhabung. Die Wahrscheinlichkeit von zufällig verfälschten Signalen wird deutlich verringert.

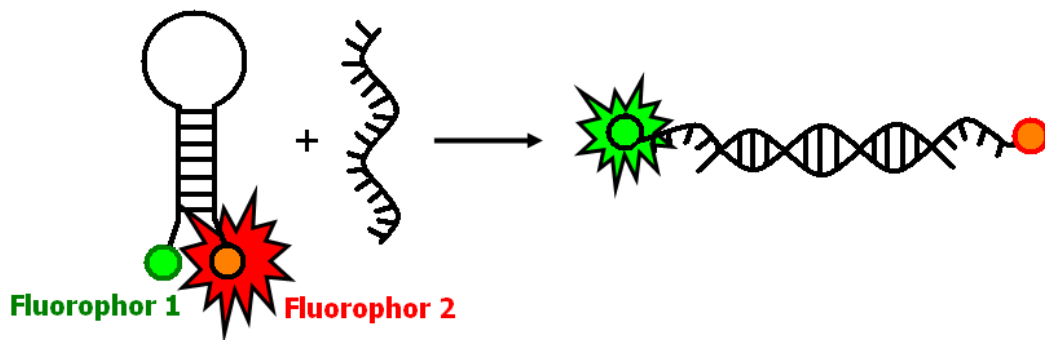


Abbildung 3-13: Schematische Darstellung der Funktionsweise des von *Tan et al.* entwickelten Molecular Beacons mit zwei Fluorophoren.

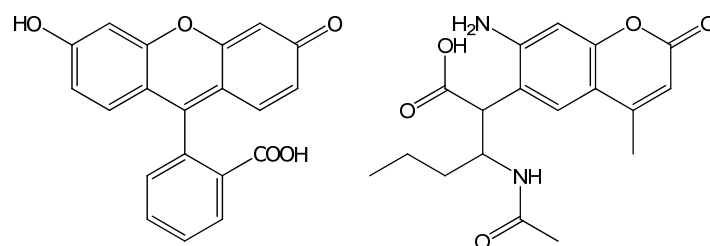
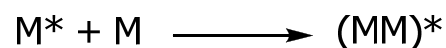


Abbildung 3-14: Fluorescein (links), Coumarin-Derivat (rechts).

Der Einsatz von Multichromophorsystemen wird durch die Farbstoffaggregation limitiert, die in der Regel eine Minderung der Fluoreszenzintensität bewirkt.<sup>[95]</sup>

### 3.2.2. MB auf Basis von Excimer-Bildung

Als Excimere bezeichnet man Dimere, die sich nur bilden, wenn sich wenigstens eines der beiden Moleküle im angeregten Zustand befindet. Dieses Phänomen wurde ausführlich von *Förster* und *Kaspar* untersucht.<sup>[96-99]</sup> Bekanntestes Beispiel ist die Excimerbildung aus Pyrenen.<sup>[99]</sup> Der Name „Excimer“ ist eine Kurzform aus „*excited dimer*“. Die Formierung des Dimers wird durch nachfolgendes Reaktionsschema widergegeben:



Die Eigenschaften von Excimeren lassen sich am einfachsten durch ein einfaches Energie-Diagramm (siehe Abbildung 3-15) erklären.<sup>[100]</sup> Werden zwei Chromophore in räumliche Nähe zueinander gebracht, ziehen sie sich nicht an, sondern stoßen sich ab, die Energie zwischen beiden Chromophoren steigt an. Die untere Kurve in Abbildung 3-15 gibt dies wieder.

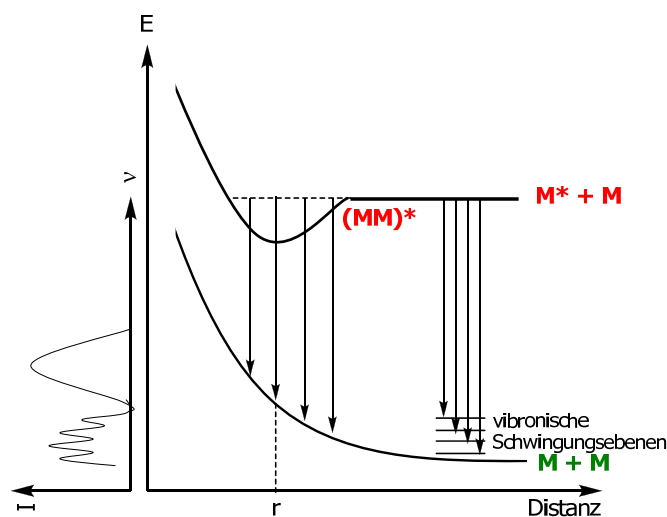
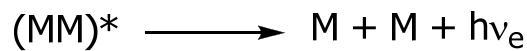


Abbildung 3-15: Intermolekulares Energiediagramm für Monomere und Excimere.

Die untere Kurve ist charakteristisch für ein repulsives dimeres System. Im Gegensatz dazu steht die obere Kurve charakteristisch für ein excimeres System. Wenn sich eines der Moleküle im angeregten Zustand befindet, steigt die Energie des Systems an. Bei einer bestimmten Distanz  $r$  bildet sich ein Komplex, das Excimer, das

eine neue energetisch angeregte Spezies darstellt, mit eigener elektronischer und geometrischer Struktur, vibronischen und rotatorischen Energiebanden und charakteristischen Reaktivität.<sup>[101]</sup>

Durch die ungebundenen Monomere im Grundzustand kommt es bei einer Emission zur Separation der Chromophore:



wobei  $h\nu_e$  für die Excimer Emission steht.

Die Emission von Excimeren weist charakteristische Merkmale auf. So ist das Maximum der Emissionsbanden rot verschoben, d.h. sie erscheinen bei höheren Wellenlängen und sind strukturlos. Die Verschiebung zu höheren Wellenlängen liegt daran, dass das nicht-vibronische Level des Excimers  $(MM)^*$  auf energetisch niedrigerem Niveau liegt, als die separierten Monomere  $M^* + M$ <sup>[100]</sup>. Das heißt, dass das emittierte Licht aus der Entvölkerung des energetisch niedrigsten Levels des Excimers in das niedrigere Energielevel der repulsiv wechselwirkenden Monomere resultiert. Diese Energiedifferenz ist deutlich geringer als die Energiedifferenz, die bei der Emission des angeregten Monomers entsteht (siehe Abbildung 3-15). Die Strukturlosigkeit der Excimer-Emissionsbanden rührt daher, dass das Energielevel, auf das das Excimer zurück fällt, ein repulsives ist und keine diskreten gebunden Zustände existieren. Das bedeutet dass die Franck-Condon-Einhüllende eine Vielzahl an Energielevel beinhaltet. Diese Energielevel überlappen und es wird unmöglich, eine vibronische Struktur im Emissionsspektrum zu erkennen.<sup>[100]</sup>

Ein weiteres Merkmal excimerer Emission sind verlängerte Fluoreszenzlebenszeiten im Vergleich zum Monomer. Diese sind durch den Reabsorptions-Effekt zu erklären<sup>[102]</sup>, der besagt, dass bei hohen Konzentrationen primär ausgesendete Photonen vom nächsten Molekül wieder absorbiert werden und dieses Molekül erneut emittiert. Dadurch scheint die Fluoreszenz langsamer abzuklingen. Es wurde versucht, diesen Effekt durch geeignete Versuche zu eliminieren<sup>[103-106]</sup> oder durch theoretische Modelle<sup>[107]</sup> zu korrigieren. Die Resultate jedoch erscheinen ungenügend.<sup>[102]</sup>



Die Excimerbildung ist nicht nur auf identische Moleküle beschränkt, es bilden sich auch angeregte Komplexe aus verschiedenen Molekülen. Man spricht dann allerdings von Exciplexen („*excited complex*“).<sup>[108-111]</sup>

DNA-Sequenzen mit Inter- und Intrastrangdimeren aus Pyrenen oder Perylenen zeigen intensive Excimerfluoreszenz<sup>[112-119]</sup>, die auch im Rahmen der Molecular Beacon-Technik verwendet werden kann.<sup>[78, 120-122]</sup>

*Kashida et al.* waren durch die Kombination zweier Pyren-Chromophore in der Lage, Basendeletionen zu detektieren. Dies ist möglich, da die Pyrene im Falle einer Basendeletion Intrastrang-Dimere ausbilden, die dann eine starke, excimertypische Fluoreszenz zeigen (siehe Abbildung 3-16).<sup>[112]</sup>

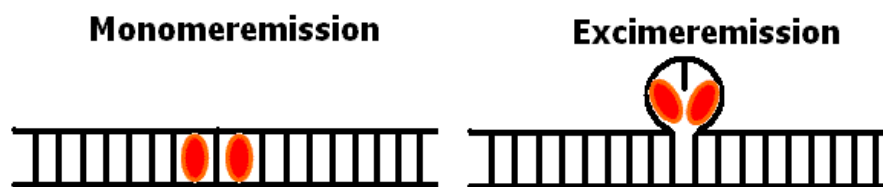


Abbildung 3-16: Schematische Darstellung des Excimer-Assays nach *Kashida*. Wildtyp (links), Deletionsmutante (rechts).

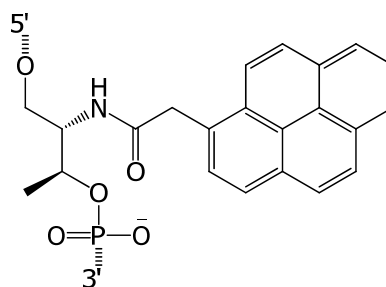


Abbildung 3-17: Pyren-Basensurrogat nach *Kashida et al.*

Wenn in demselben Assay eines der Perylene durch *N,N*-Dimethylanilin ersetzt wird, entsteht ein Exciplex, mit dem im Falle einer Basendeletion ebenfalls eine Emissionsmaximumsverschiebung beobachtbar ist.<sup>[123]</sup> Die Anwendung von Pyrenen oder Perylenbisimiden in der Nukleinsäureanalytik ist allerdings stark begrenzt, da sie, sowohl als Monomer als auch als Excimer oder Exciplex, in der Lage sind, im

angeregten Zustand Guanin zu oxidieren und dadurch ihre Fluoreszenz gelöscht wird.<sup>[124, 125]</sup>

*Häner et al.* entwickelten einen Molecular Beacon der im Stamm sowohl zwei Pyrene als auch zwei Perylendiimide aufweist.<sup>[126]</sup> In der geschlossenen Haarnadel-Form bilden alle vier Chromophore einen Donor-Akzeptor-Komplex, wodurch die Excimerbildung der Pyrene vollständig unterbunden wird. Durch Zugabe der Ziel-DNA öffnet sich die Haarnadel, dies wird angezeigt durch einen starken Anstieg der Excimeremission der Pyrene. So konnte die Ziel-DNA in nanomolarer Konzentration nachgewiesen werden.

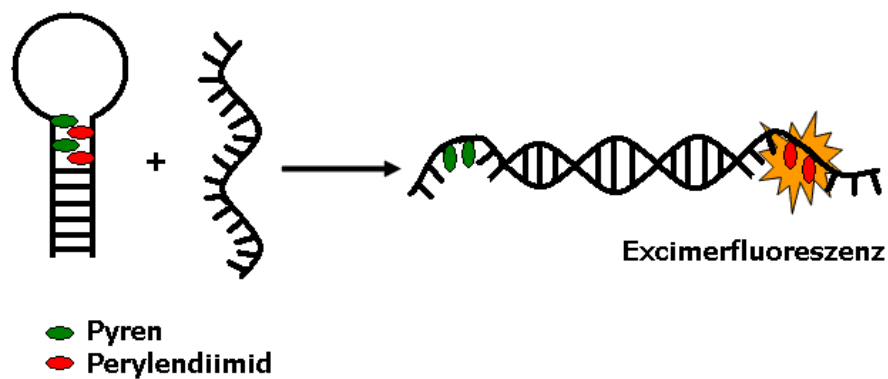


Abbildung 3-18: Molecular Beacon auf Excimer-Basis nach *Häner et al.*

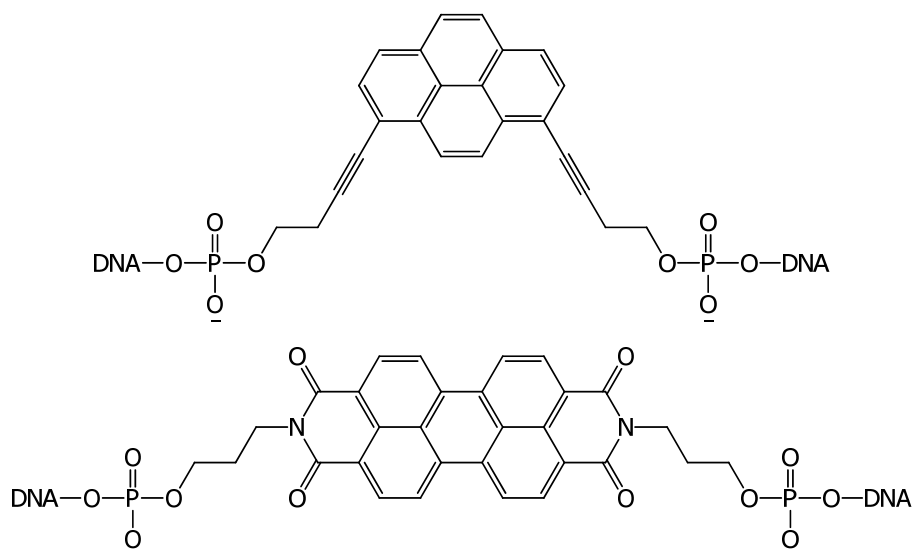
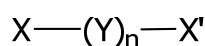


Abbildung 3-19: Pyren- (oben) und Perylendiimid-Derivat (unten) im Molecular Beacon nach *Häner*.

### 3.3 Cyanine: Thiazole Orange

#### 3.3.1. Cyanine

Von der Vielzahl der organischen Farbstoffklassen, die als funktionelle Farbstoffe eine weite technische Anwendung finden, ist die Gruppe der Polymethinfarbstoffe eine der Wichtigsten. Der Name dieser Farbstoffklasse basiert auf dem charakteristischen Grundgerüst dieser Substanzen, das sich aus einer Aneinanderreihung von Methingruppen ( $=CH-$ ) zusammensetzt. Polymethinfarbstoffe im engeren Sinn sind nach *Dähne*<sup>[127]</sup> substituierte oder unsubstituierte Polyene mit einer ungeraden Anzahl  $n$  von Methingruppen (Y) zwischen zwei so genannten Auxochromen, einer Donor- (X) und einer Akzeptorgruppe (X').<sup>[128]</sup>



$$n = 1, 3, 5, \dots$$

Die Atomkette  $X-Y-X'$  bildet in den Polymethinfarbstoffen den Chromophor. Bei Y muss es sich nicht zwingend um reine  $-CH=$ -Gruppen handeln. Y sowie die Kettenendatome X und X' stehen allgemein für Atome oder Atomgruppen der IV., V. und VI. Hauptgruppe des Periodensystems. Cyanine, die wohl wichtigsten Polymethinfarbstoffe, unterteilen sich weiter in drei Klassen: offenkettige Cyaninfarbstoffe (Strepto-Cyanine), Hemi-Cyaninfarbstoffe und geschlossenkettige Cyaninfarbstoffe (Cyanine, siehe Abbildung 3-20).

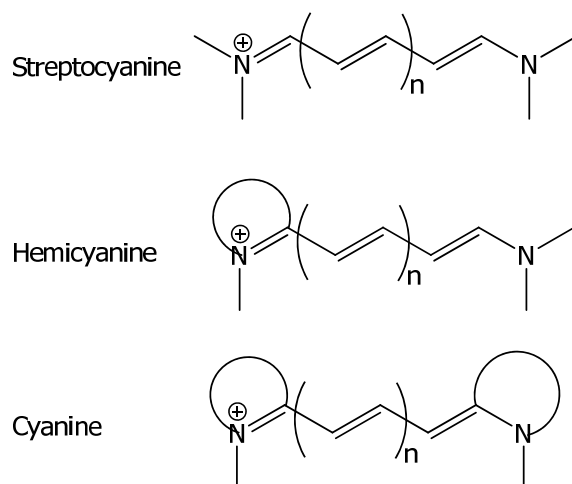


Abbildung 3-20: Cyanin-Farbstoffklassen

Cyanine mit identischen Heterocyclen nennt man symmetrische, mit unterschiedlichen Heterocyclen asymmetrische Cyanine. Die meisten asymmetrischen Cyanine weisen in Lösung eine geringe Fluoreszenz auf, bei Interkalation in DNA allerdings zeigt sich oft ein enormer Fluoreszenzanstieg.<sup>[51]</sup> Man geht davon aus, dass dies an der eingeschränkten Rotation der aromatischen Systeme um die Methingruppe liegt<sup>[129]</sup>, da so keine Möglichkeit mehr zu strahlungsloser Deaktivierung des angeregten Singulettzustands besteht.<sup>[51, 130, 131]</sup>

### 3.3.2. Bisherige und aktuelle Studien zu Thiazol Orange

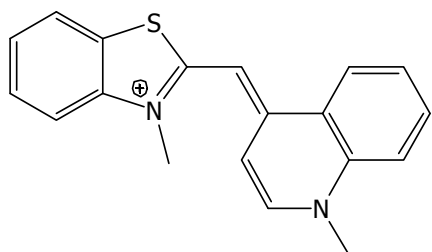


Abbildung 3-21: Thiazol Orange TO

Thiazol Orange bietet als kationischer asymmetrischer Cyaninfarbstoff einzigartige Eigenschaften, die es für die Analytik von Oligonukleotiden prädestinieren. TO interkaliert sowohl in DNA als auch in RNA und steigert dabei seine Quantenausbeute um das 18 900fache.<sup>[132, 133]</sup>

Der Chromophor ist hydrophob, löst sich aber dennoch als kationische Spezies in Wasser. Thiazol Orange besitzt einen sehr hohen Extinktionskoeffizient ( $\epsilon = 63\,000$ <sup>[129]</sup>) und weist damit eine sehr helle Fluoreszenz ( $\epsilon \cdot \Phi$ ) auf, bei einer Quantenausbeute von ca. 20 % in DNA.<sup>[134]</sup> Damit eignet sich Thiazol Orange als Fluoreszenzsonde für Oligonukleotide, zumal es mit einem Oxidationspotential von  $E(\text{TO}^{*+} / \text{TO}^*) = 1.2\text{ eV}$ <sup>[135]</sup> im angeregten Zustand nicht in der Lage ist, photoinduziert eine der Nukleobasen zu oxidieren, wodurch seine Fluoreszenz gelöscht würde.

### Thiazol Orange in Peptiden

*Kelley et al.* entwickelten eine TO-Sonde, bestehend aus TO und verschiedenen Peptidkonjugaten.<sup>[136]</sup> Beinhaltet diese TO-Peptid-Sonde aromatische Aminosäuren, wie zum Beispiel Tryptophan (Trp, W), so interkalieren sowohl TO und Trp in einen DNA-Duplex und bilden dadurch einen Triplex aus.<sup>[137]</sup> TO reagiert als  $^1\text{O}_2$ -Sensitizer, wodurch es zu Oxidationen der DNA-Basen und damit zu DNA-Schäden kommen kann. Da Trp in Anwesenheit von  $^1\text{O}_2$  Peroxide erzeugt, führt die Kombination von TO

und aromatischen Aminosäuren im Triplexverbund mit DNA zu direktem Strangbruch. Diese Kombination zeigt in menschlichen Zellen signifikante Phototoxizität.<sup>[138]</sup>

*Barton et al.* synthetisierten Metallointerkalatorkomplexe<sup>[139-141]</sup> (z.B. mit  $\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{chrysi}^{3+}$ ), die Basenfehlpaarungen detektieren können. Durch ihre Größe interkalieren sie besser in thermodynamisch instabilere, fehlgepaarte DNA als in thermodynamisch stabile, richtig gepaarte DNA. Zudem führt die Photoaktivierung dieses Komplexes zu Strangbrüchen neben einem SNP.<sup>[140]</sup> Um zu erreichen, dass diese Metallointerkalatoren die Plasmamembran einer Zelle durchschreiten, werden sie an sog. **Cell-penetrating Peptides (CPP)**<sup>[142]</sup> gebunden, die als molekulare Transporter fungieren. *Barton et al.* nutzten dafür Oligoarginin, das aus 7–9 Arginin-Molekülen besteht. Um das Binden dieser Sonde an DNA auch fluoreszenzspektroskopisch beobachten zu können, wurde die Sonde mit TO markiert. TO steigert – im Gegensatz zu z.B. Fluorescein – die Bindungsaffinität der Sonde zu DNA.<sup>[143]</sup>

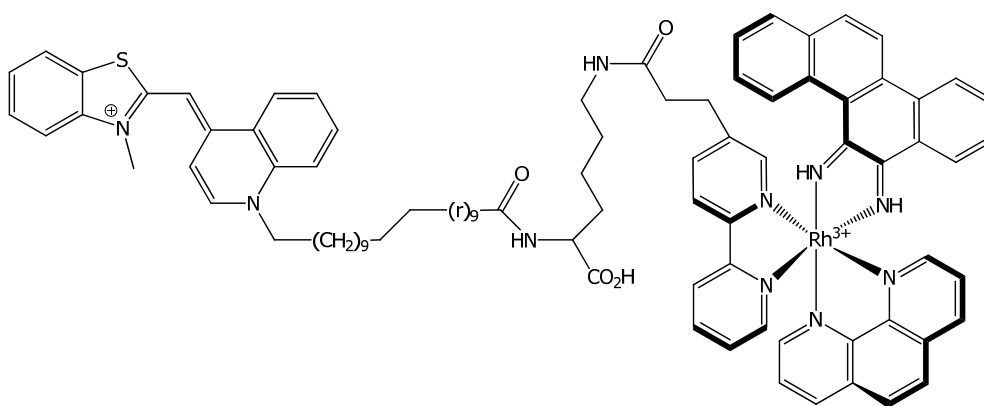


Abbildung 3-22: TO-Sonde mit Metallointerkalator nach *Barton*, r = Arg.

*Kubista et al.* entwickelten sog. *Light-up Probes*. Das sind Sondenmoleküle, bei denen man die gute Hybridisierungseigenschaften von PNA mit der starken Fluoreszenzsteigerung von TO bei Bindung an DNA kombiniert.<sup>[144]</sup> TO wird über einen flexiblen Linker an PNA gebunden, der es ihm ermöglicht, mit DNA zu wechselwirken. Um zu verhindern, dass TO durch Rückfaltung in die Sonde interkaliert und so zu einer höheren Eigenfluoreszenz der Sonde beiträgt, hat man sich entschieden, die Sonde aus PNA statt aus DNA aufzubauen. So werden die

elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen dem positiv geladenen TO und negativ geladener DNA minimiert.<sup>[145]</sup> Die Sonde ist in der Lage, Einzelstrang-DNA über die (komplementäre) Sequenz der PNA zu erkennen und über die Fluoreszenzsteigerung des TO Chromophors anzuzeigen.

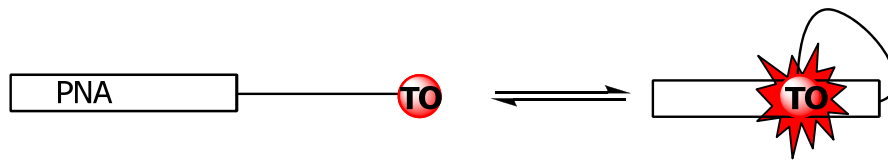


Abbildung 3-23: Rückfaltung des Thiazol Oranges in die Sonde der *Light-up Probes* nach *Kubista*.

### Thiazol Orange in DNA

Zahlreiche Derivate von Thiazol Orange wurden bereits auf unterschiedliche Weise in DNA eingebaut. Dabei wurde der Chromophor meist über einen der Stickstoffe der heteroaromatischen Ringe mit einer Alkylkette verknüpft, die dann entweder an einer Phosphatgruppe<sup>[146]</sup>, am 5'-Terminus des Oligonukleotids<sup>[147-149]</sup> oder direkt an ein Uridinderivat<sup>[150]</sup> gekoppelt wurden (Abbildung 3-24).

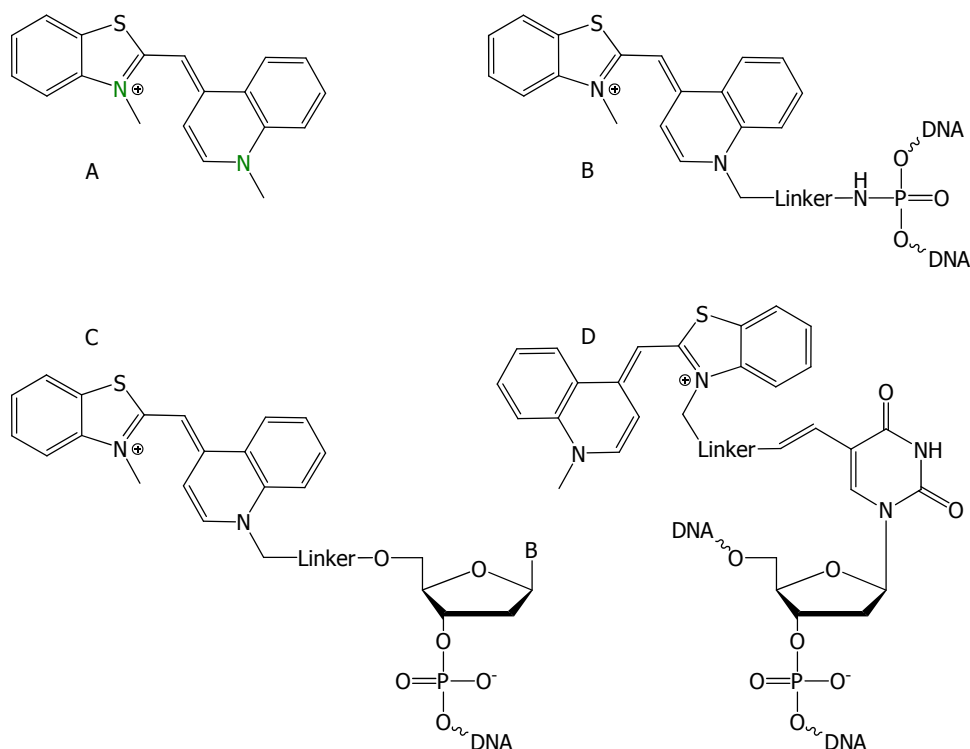


Abbildung 3-24: Unterschiedliche Anknüpfungsmöglichkeiten von Thiazol Orange an DNA.

- A = Anknüpfung über den Chinolin- bzw. den Benzothiazol-Stickstoff
- B = Anknüpfung des TO an eine Phosphatgruppe,
- C = an das 5'-ende eines Oligonukleotids,
- D = an eine Base.

TO wurde von *Krull et al.* über einen Polyethylenglykol-Linker an die Phosphatgruppe des 5'-Endes eines Oligonukleotids gebunden.<sup>[149]</sup> Das Oligonukleotid selbst wurde am 3'-Ende auf Glasfaser gebunden, um so die spektroskopischen Eigenschaften des TO-Chromophors an der Festphase zu bestimmen.<sup>[151]</sup> In weiterführenden Studien wurden der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) von TO und kovalent gebundenen Fluoreszenzmarkern wie TAMRA und Cy<sub>3/5</sub> untersucht.<sup>[148]</sup> Es wurde gezeigt, dass TO als FRET-Donor agiert.

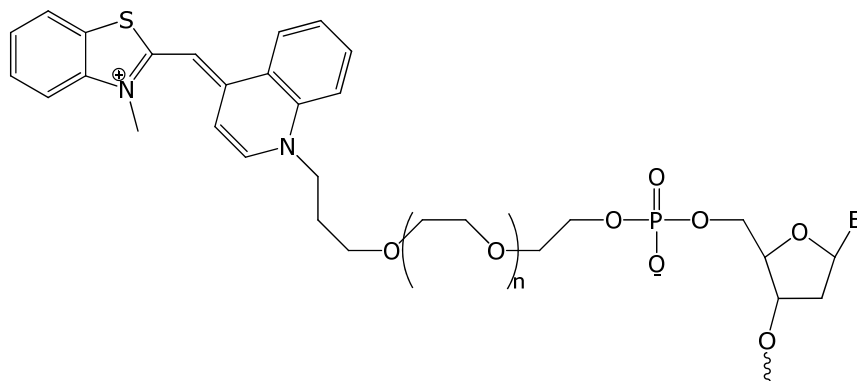


Abbildung 3-25: Anknüpfung von Thiazol Orange an die Oligonukleotidsonde nach *Krull*.

*Asseline et al.* modifizierten Oligonukleotide ebenfalls am 5'-Ende durch kovalente Anknüpfung von verschiedenen Monomethin-Farbstoffen, darunter auch TO, an die Phosphatgruppe. Zudem wurde Einzelstrang-DNA an einer internen Phosphatgruppe des Stranges mit TO markiert<sup>[152-154]</sup>:

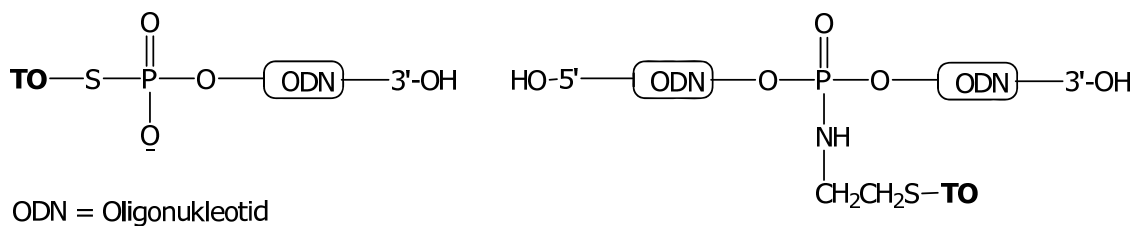


Abbildung 3-26: Oligonukleotidmarkierung mit TO nach *Asseline*.

Untersucht wurden die Absorptions- und Fluoreszenzspektren<sup>[146]</sup> der freien und hybridisierten Proben. Die unterschiedlichen spektrochemischen Eigenschaften und Stabilitäten der Cyanin-markierten Oligonukleotide wurden auf die verschiedenen Konnektivitäten der beiden Heteroaromaten zurückgeführt. Des Weiteren wurden von *Asseline et al.* Sonden entwickelt, die TO am 5'-Ende der Phosphatgruppe tragen, mit denen SNPs detektiert werden konnten.<sup>[147]</sup>

*Yarmoluk et al.* untersuchten die Fluoreszenz- und Absorptionsspektren von TO über einen großen Konzentrationsbereich.<sup>[155]</sup> Bei kleinen Konzentrationen interkaliert TO in DNA. Wird das Verhältnis von TO zu DNA erhöht, aggregieren freies und gebundenes TO in einer sandwichartigen Struktur, wobei eine Stokes-Verschiebung



von über 100 nm zu beobachten ist. Es wird angenommen, dass TO im Halbinterkalationsmodus<sup>[156]</sup> mit DNA wechselwirkt, d.h. TO interkaliert nur mit einem Heterozyklus. Der andere aromatische Ring des TO, der sich außerhalb des Duplexes befindet, kann mit freiem TO wechselwirken. Der Aggregationsprozess reduziert die Empfindlichkeit der DNA-Detektion erheblich.

*Seitz et al.* entwickelten sogenannte stammlose PNA-Molecular-Beacons.<sup>[157]</sup> Diese sind mit Thiazol Orange und einem weiteren Cyaninfarbstoff markiert (NIR667). In Abwesenheit des Ziel-Oligonukleotids faltet sich die Fluoreszenzsonde so, dass die Emission nahezu vollständig gelöscht wird. Durch die Hybridisierung mit dem Zielstrang, wird die Aggregation beider Chromophore aufgehoben und es kann ein FRET von Thiazol Orange auf den Cyaninfarbstoff stattfinden, begleitet von einer Fluoreszenzintensitätserhöhung um Faktor 102 und einer Stokes-Verschiebung von 200 nm.

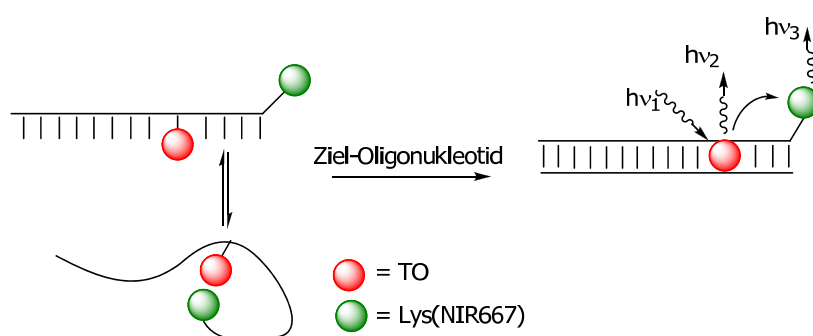


Abbildung 3-27: Schematische Darstellung der Funktionsweise von stammlosen Molecular Beacons nach *Seitz*.

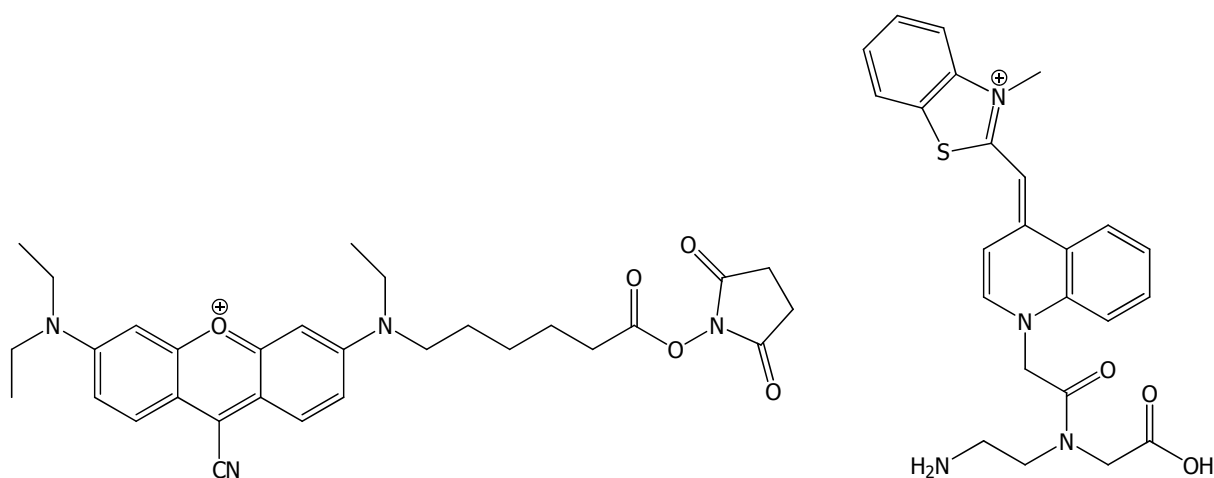


Abbildung 3-28: NIR667 (9-Cyano-3-(diethylamino)-6-((6-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxy)-6-oxohexyl)(ethyl)amino)xanthylum, links), Thiazol-Orange-PNA-Baustein (rechts).

*Okamoto et al.* markierten ein Oligonukleotid zweifach mit Thiazol Orange an einem Uridin-Nukleosid.<sup>[150, 158-163]</sup> In Abwesenheit des Ziel-Oligonukleotids findet auch hier eine Aggregation beider Chromophore statt, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird. Nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz wird die Aggregation aufgehoben und beide Chromophore zeigen eine hohe Fluoreszenzintensität.

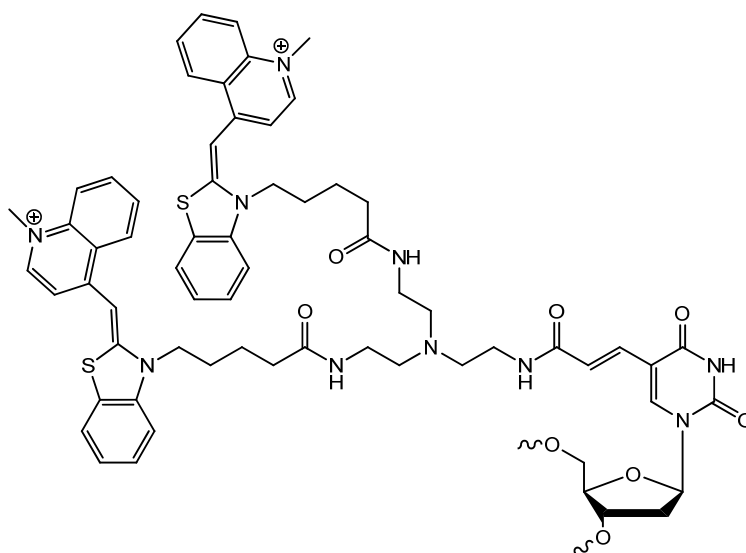


Abbildung 3-29: Zweifach markierte TO-Sonde nach *Okamoto*.

### **3.4 Excitonische Wechselwirkungen zwischen Chromophoren**

Die Anregung von Elektronen vom Grundzustand in einen energetisch höheren Zustand schafft einen momentanen Dipol im Molekül, ein elektronisches Übergangsdipolmoment.<sup>[164]</sup> Damit hängt eine Polarisation des Moleküls zusammen, die eine Richtung und eine Intensität besitzt, abhängig von der Natur des Chromophors und seiner Anregung. Wenn zwei oder mehr Chromophore in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, können ihre elektronischen Übergangsdipole über sogenannte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Exciton-Kopplungen) miteinander interagieren. Der angeregte Zustand ist dann delocalisiert (Exciton). Exciton-Kopplungen sind am effektivsten, wenn die elektronischen Dipol-Übergänge erlaubt sind.<sup>[164]</sup> Interagieren zwei Chromophore excitonisch miteinander, spaltet sich der

angeregte Zustand in zwei Energieniveaus auf (Davydov Splitting, siehe Abbildung 3-30).<sup>[165, 166]</sup>

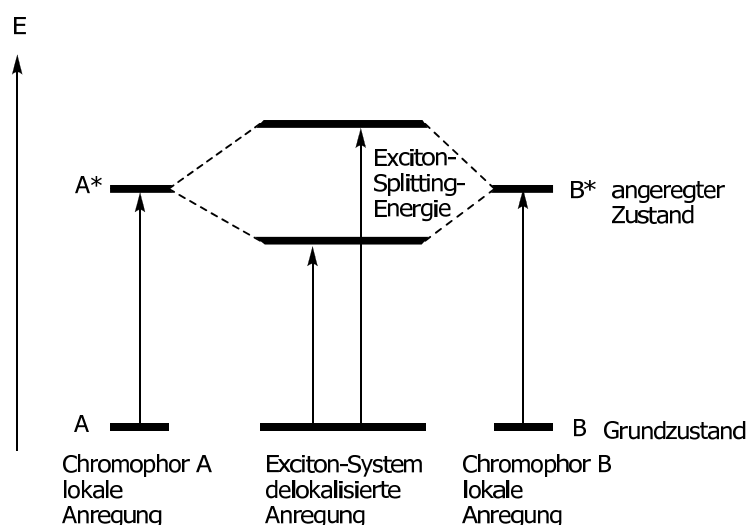


Abbildung 3-30: Energieniveauschema zweier Chromophore A und B, die im angeregten Zustand ein delokalisiertes Exciton-System ausbilden, Exciton-Splitting-Energie = Davydov-Aufspaltung.

Exciton-Kopplungen verursachen verschobene Maxima im Absorptionsspektrum im Vergleich zum Monomer. Bathochrome Verschiebungen werden J-Banden, die entsprechenden Dimere oder Chromophor Aggregate J-Aggregate genannt.<sup>[167]</sup> „J“ steht für Jelly, einem der ersten Wissenschaftler, der diese Absorptionsverschiebungen untersucht hat. Hypsochrome Verschiebungen werden H-Banden, „H“ wie hypsochrom, die entsprechenden Dimere H-Aggregate<sup>[167-173]</sup> genannt. In Abbildung 3-31 wird deutlich, wie die Verschiebungen zustande kommen. Wenn die Chromophore entlang ihrer vertikalen Achse ( $\alpha = 90^\circ$ ) aggregieren, entsteht eine hypsochrome Verschiebung, da der Übergang zum energiereicheren Zustand erlaubt, der zum niedrigeren Zustand jedoch verboten ist. Dieser energiereichere Zustand ist an der H-Bande mit einem Absorptionsmaximum bei kürzeren Wellenlängen im Vergleich zum Monomer beobachtbar. Aggregieren die Moleküle zu einer Kopf-Schwanz-Verbindung mit  $\alpha = 0^\circ$ , ist der Übergang zum niedrigeren Energieniveau erlaubt, der zum höheren Niveau verboten.<sup>[167]</sup> Dieser niedrigere Energiezustand ist im Absorptionsspektrum zu beobachten, es entsteht eine bathochrome Verschiebung im Vergleich zur Monomerabsorption. Die Stärke der

Verschiebung hängt ab von der Größe der Aggregate und vom Winkel der Aggregationsanordnung.<sup>[164, 167]</sup>

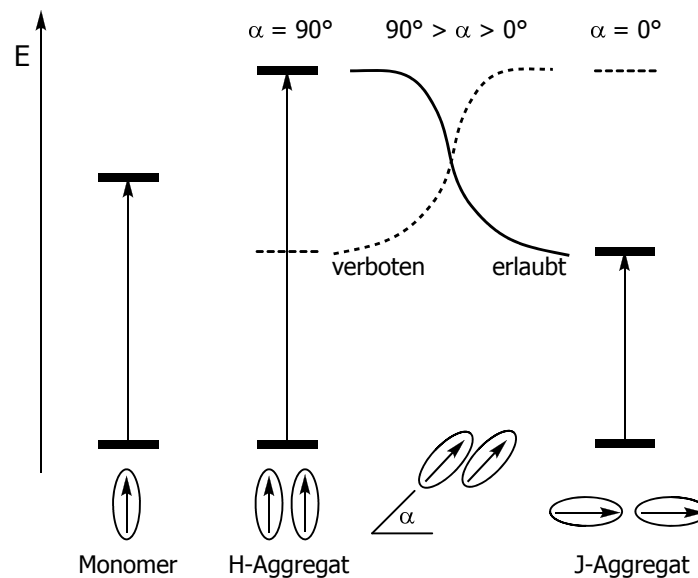


Abbildung 3-31: Schematische Darstellung der elektronischen Übergänge bei einem Monomer, H- und J-Aggregaten, basierend auf Exciton-Wechselwirkungen. Pfeile repräsentieren die Übergangsdipolmomente der Chromophore.

Viele der J-Aggregate zeigen Fluoreszenz mit Quantenausbeuten, die die der Monomere oft übertreffen.<sup>[174-176]</sup> Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenz von H-Aggregaten gelöscht. Das Löschen der Fluoreszenz von H-Aggregaten ist ein seit langem beobachtetes Phänomen, das bei vielen Chromophoren festgestellt werden konnte (darunter Fluorescein, Methylen Blau oder einige Cyaninfarbstoffe).<sup>[177-182]</sup> Der nicht-fluoreszente angeregte Zustand wurde als generelle Eigenschaft von H-Aggregaten akzeptiert.<sup>[183-186]</sup> Förster und Kasha konnten durch ihre theoretischen Modelle (*Coupled Oscillator Model*<sup>[65]</sup> und *Exciton-Theorie*<sup>[171]</sup>) dieses Verhalten erklären. Der energiereichere Zustand des Excitons wird durch *Internal Conversion* in den energieärmeren Exciton-Zustand transformiert. Aufgrund der abnehmenden Übergangsmöglichkeit für Strahlungsprozesse von diesem Zustand aus zum Grundzustand wird die Fluoreszenz gelöscht. Es sind nur wenige Ausnahmen dieser Regel bekannt, die nur unter speziellen Bedingungen wie niedrigerer Temperatur in gefrorenen Lösungen beobachtet wurden oder bei Chromophor Aggregaten, die in sogenannten *Langmuir-Blodgett*-Schichten eingelagert wurden.<sup>[187-193]</sup> In aktuelleren

Studien wurde von Mero- oder Hemicyaninen berichtet, die sich zu fluoreszenten H-Aggregaten anlagerten.<sup>[194, 195]</sup>

*Wortmann* und *Würthner* publizierten fluoreszente H-Aggregate aus Merocyaninen, die im Absorptionsspektrum die typischen, hypsochrom verschobenen H-Banden zeigen.<sup>[196]</sup> Konzentrationsabhängige Absorptionsänderungen mit deutlichen isosbestischen Punkten zeigten eine Gleichgewichtssituation zwischen monomerem und dimerem Merocyanin. So konnte in den Absorptionsspektren eine hypsochrome Maximumverschiebung von 570 nm des Monomers zu 492 nm des Dimers beobachtet werden. Im Fluoreszenzspektrum ist eine bathochrome Maximumverschiebung von 597 nm des Monomers zu 697 nm des Dimers zu beobachten. Die Fluoreszenzlebenszeit des Dimers (4.4 ns) ist deutlich länger, als die des Monomers (0.5 ns). Die Berechnung des monomeren und dimeren Absorptionsspektrums ergab zudem eine sehr kleine Absorptionsbande im langwelligeren Bereich (596 nm), die den verbotenen Übergang zwischen Grundzustand und dem niedrigeren Exciton-Zustand repräsentiert (siehe Abbildung 3-31). Die Autoren konnten durch Röntgen-Kristallographie, NMR und EOA Berechnungen (*Electrooptical Absorption*)<sup>[197]</sup> die energetisch günstigste Konstellation beider Chromophore bestimmen. Aus den Berechnungen der Dipolmomente für den energetisch höheren und niedrigeren Exciton-Zustand, konnten die Winkel berechnet werden, die das Arrangement beider Chromophore charakterisiert und die optischen Eigenschaften erklärt. So stellten die Autoren nicht nur einen Verschiebungswinkel  $\theta$  von 59.9° fest, sondern auch einen Rotationswinkel  $\alpha$  von 10° (siehe Abbildung 3-32). Der Rotationswinkel  $\alpha$  ermöglicht den verbotenen Übergang vom Grundzustand in den niedrigeren Exciton-Zustand, der eine Fluoreszenz der H-Aggregate bewirkt. Ohne die Rotation der Dipolmomente um 10° wäre dieser Übergang nicht möglich und die H-Aggregate würden strahlungslos vom energetisch höher gelegenen Exciton-Zustand in den Grundzustand übergehen. So konnten *Würthner* und *Wortmann* die Fluoreszenz der H-Aggregate durch die Exciton-Theorie<sup>[171]</sup> nach *Kasha* erklären.

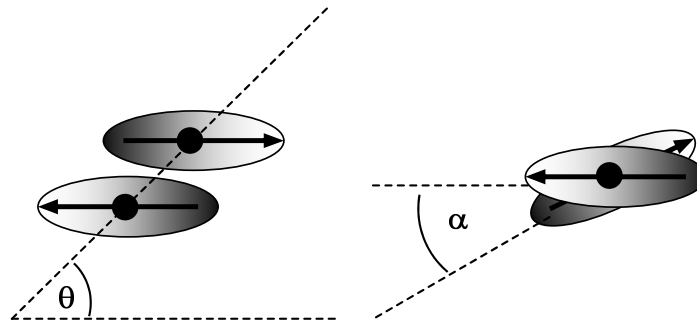


Abbildung 3-32: Dimerarrangement (links: Seitenansicht, rechts: Sicht von oben), Pfeile stellen Übergangsdipolmomente dar,  $\theta$  = Verschiebungswinkel,  $\alpha$  = Rotationswinkel.

Ähnliche Resultate, wie sie *Würthner* und *Wortmann* für Merocyanine feststellen konnten, gelangen mit Thiazol-Orange-Chromophore in DNA. Diese Ergebnisse werden in der vorliegenden Arbeit präsentiert.

Bei Chromophoren, deren Übergangsdipolmomente eine chirale Orientierung zeigen, kann die Exciton-Kopplung im CD-Spektrum beobachtet werden, es zeigen sich gegensätzliche Cotton-Effekte rechts und links der Wellenlänge, die dem Absorptionsmaximum entspricht.<sup>[164, 198]</sup>

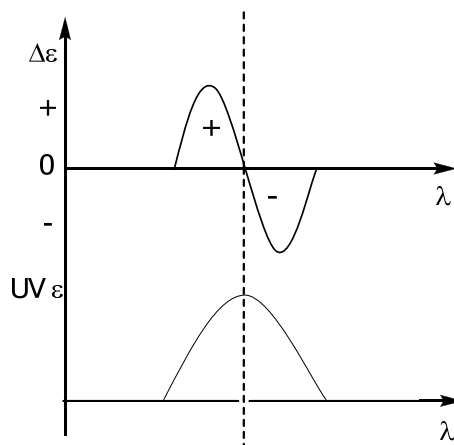


Abbildung 3-33: Typisches bisignales Exciton CD- und UV-Spektrum.

Die Vorzeichenabfolge (positiv oder negativ) der CD-Signale korrelieren mit der relativen Orientierung der jeweiligen Übergangsdipolmomente jedes Chromophors, die absolute Orientierung bzw. Helikalität des Chromophor Aggregats kann daher durch CD-Messungen bestimmt werden (*Exciton-Chiralitäts-Regel*<sup>[198, 199]</sup>). Wenn die

Übergangsdipolmomente beider Chromophore in positiver Helikalität orientiert sind, weist der langwelligere Anteil des CD-Signals einen positiven Cotton-Effekt auf. Sind die Übergangsdipolmomente in negativer Helikalität angeordnet, weist der langwelligere Anteil des CD-Signals einen negativen Cotton-Effekt auf. Der nachfolgende kurzwelligere Teil des CD-Signals weist dann das entsprechende gegensätzliche Vorzeichen des Cotton-Effekts auf (siehe Abbildung 3-34). Daher kann anhand des CD-Signals auf die Helikalität der Übergangsdipolmomente geschlossen werden.

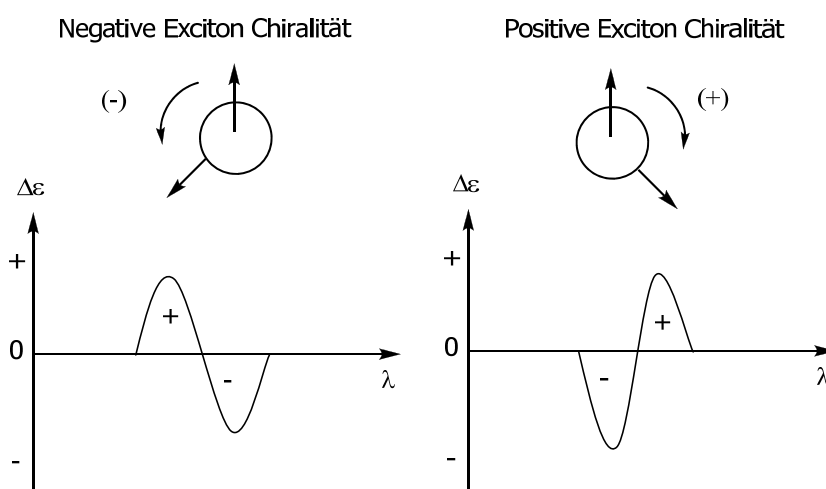


Abbildung 3-34: Grundlage der Exciton-Chiralitäts-Regel, die die Helikalität zweier elektrischer Übergangsdipolmomente dem entsprechenden CD-Signal zuordnet.

Die Signalintensität im CD-Spektrum ist sehr stark abhängig vom Winkel zwischen beiden Übergangsdipolmomenten.<sup>[200, 201]</sup> Gleichung 3-2 gibt diese Abhängigkeit an.

$$\Delta\epsilon \approx \pm \frac{\pi}{4\lambda} \mu_a \mu_d R_{da}^{-2} \sin(2\theta)$$

Gleichung 3-2: CD-Signalintensität in Abhängigkeit des Winkels zwischen den Übergangsdipolmomenten zweier Chromophore.

$\mu_a, \mu_d$  = elektronische Übergangsdipolmomente der Chromophore a und d

$R_{da}$  = Abstand beider Chromophore

$\theta$  = Winkel zwischen beiden Übergangsdipolmomenten.

Wenn der Winkel  $\theta = 0^\circ, 90^\circ$  oder  $180^\circ$  annimmt, wird die Signalintensität gleich null. Am intensivsten sollte das CD-Signal sein, wenn  $\theta = 45^\circ$  oder  $135^\circ$  annimmt. Das bedeutet konkret, dass bei einer linearen Anordnung der Chromophore ( $\theta =$

180°, d.h. ohne eine Verdrehung der Übergangsdipolmomente) kein oder nur ein sehr schwaches CD-Signal zu beobachten ist.<sup>[196, 198-202]</sup>



## 4. Thiazole Orange in DNA

In den letzten Jahren wurden fluoreszente Oligonukleotidsysteme entwickelt, die die Komplementarität von DNA-Duplexen oder die Existenz von Basenfehlpaarungen durch einen signifikanten Anstieg oder Löschung von Fluoreszenz anzeigen.<sup>[16, 17, 57, 84, 86-88]</sup> Änderungen in der Fluoreszenzintensität können aber auch durch unerwünschte Nebeneffekte zustandekommen, die Auslesefehler des Fluoreszenzsignals als Folge haben. Wünschenswert sind daher Fluoreszenzsonden, die aufgrund von Hybridisierung bzw. Dehybridisierung ihr Fluoreszenzmaximum und damit ihre Fluoreszenzfarbe ändern.

### 4.1 *Synthese*

*Wagenknecht et al.* inkorporieren Chromophore als Basensurrogate in DNA mit Hilfe eines azyklischen Linkersystems zwischen den Phosphodiesterbrücken. Ein azyklischer Linker ist im Falle des positiv geladenen Thiazol-Orange-Chromophors zu bevorzugen, weil der Farbstoff bei einer glykosidischen Anknüpfung, eine sehr gute Abgangsgruppe am anomeren Zentrum darstellen würde. Der azyklische Linker sorgt für eine höhere chemische Stabilität, außerdem gewährt er genügend Flexibilität für die Interkalation des Chromophors zwischen den Basenstapel.<sup>[203, 204]</sup> Als 2'-Deoxyribose-Ersatz dient (*S*)-(-)-3-Amino-1,2-propandiol (Abbildung 4-1), das zwischen zwei Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats eingebaut wird. Das (*S*)-Stereoisomer wurde gewählt, um die Konfiguration am C-3' der 2'-Deoxyribose nachzuahmen. Diese offenkettige Variante wurde bereits erfolgreich zur Synthese von Ethidium<sup>[205, 206]</sup>-, Perylenbisimid<sup>[124]</sup>, Indol<sup>[207, 208]</sup> und Phenothiazin<sup>[209]</sup> modifizierter DNA verwendet.

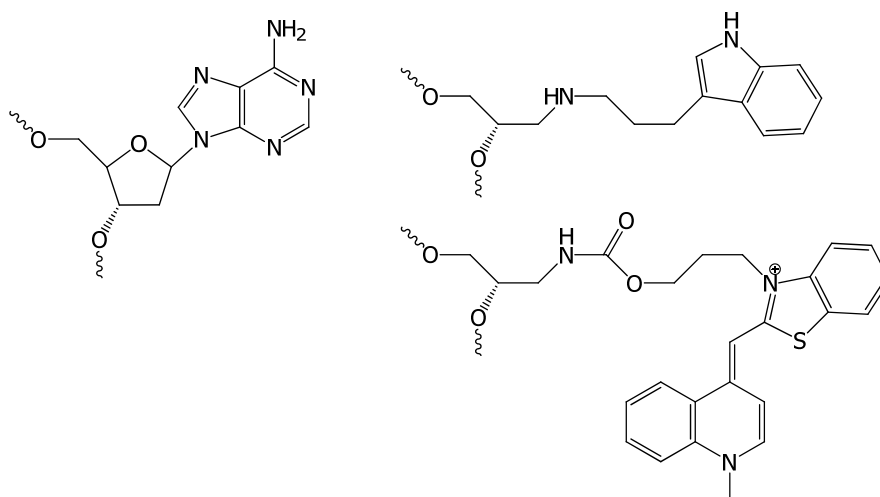


Abbildung 4-1: Natürliches Nukleosid (links), azyklisches Linkersystem als Riboseersatz, verknüpft mit Indol (rechts oben). Weiterentwicklung des azyklischen Linkers via Carbamatfunktion (unten), verknüpft mit Thiazol Orange.

In meiner Diplomarbeit konnte ich die Anknüpfung von Thiazol Orange an das azyklische Linkersystem um eine Synthesestufe vereinfachen, indem ich statt einer direkten Ankopplung des Chromophors an das Amin des Linkers eine Carbamatfunktion als Brücke zwischen beiden Molekülteilen eingefügt habe. Dadurch wird eine Schützung und Entschützung des Amins während und nach der Phosphitylierung unnötig, da nun eine pseudo-Doppelbindung durch die Konjugation mit der Carbonylfunktion vorliegt.

Der in der Arbeitsgruppe etablierte azyklische Linker **3** (Abbildung 4-3) wurde ausgehend von (*S*)-(-)-3-Amino-1,2-propandiol gemäß den bereits publizierten Vorschriften synthetisiert.<sup>[205, 206, 210]</sup> Dieser kann entweder über den Chinolin-Stickstoff an Thiazol Orange gebunden werden<sup>[134]</sup> oder über den Benzothiazol-Stickstoff<sup>[211]</sup> (Abbildung 4-2). Die unterschiedliche Verknüpfung des Thiazol Oranges an DNA hat Auswirkungen auf die Interkalation und damit auf die optischen Eigenschaften des Chromophors.<sup>[134]</sup> So zeigt über den Chinolin-Stickstoff verbrücktes Thiazol Orange kein Aggregationsverhalten, wie es in dieser Arbeit für den Chromophor, verbrückt über den Benzothiazol-Stickstoff, beschrieben ist.<sup>[212]</sup>

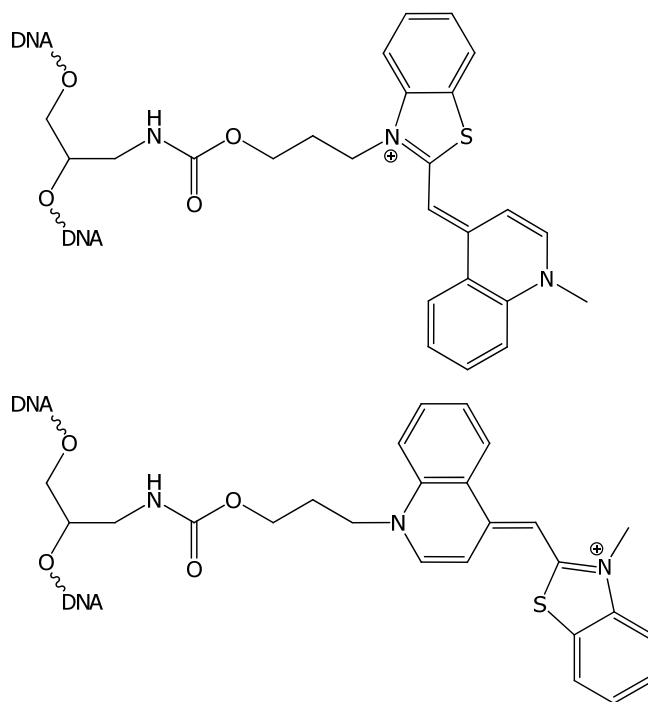


Abbildung 4-2: Anknüpfung des Thiazol-Orange-Chromophors über den Benzothiazol-Stickstoff (TO, oben), Anknüpfung über den Chinolin-Stickstoff (TO', unten).

Zur Synthese des Chromophors wurde Chinolin gemäß Literatur<sup>[133]</sup> mit Methyljodid am Stickstoff alkyliert, es entsteht **5** (Abbildung 4-3). 2-Methylbenzothiazol wurde mit 1-Iodopropanol zu **4** umgesetzt, um in der Folgereaktion in basischer Lösung selektiv an der para-Position von **5** anzugreifen, dies konnte mittels NOESY-NMR nachgewiesen werden. Eine Kopplung des entstandenen Thiazol Oranges mit 1,1'-Carbonyldiimidazol und nachfolgender Weiterreaktion mit dem Linker **3** ergibt **7** in guter Ausbeute. Aufgrund von Nebenreaktionen, wie z.B. der Eigenkopplung des Linkers, ist eine Reinigung von **7** mittels Flash-Säulenchromatographie notwendig. Hierbei ist auf eine sehr zügige Durchführung zu achten, um Gegenionenverluste zu vermeiden. Eine Bereitstellung von Acetatanionen im Laufmittel führt zum Zerfall des Phosphoramidits **8** im nächsten Reaktionsschritt und ist daher zu vermeiden. Die besten Ausbeuten von **8** wurden mit einer verlängerten Reaktionszeit über Nacht erreicht, im Gegensatz zur standardisierten Reaktionszeit von 60 min.

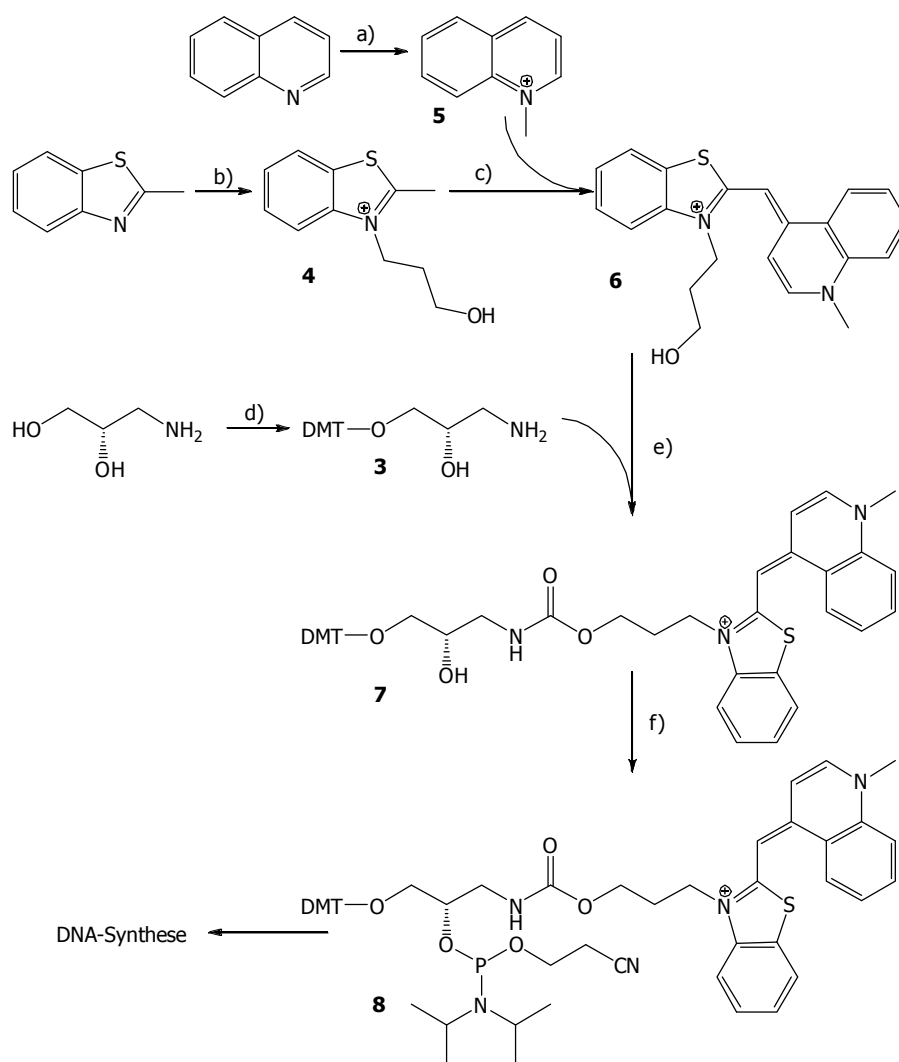


Abbildung 4-3: Synthesestrategie zum Aufbau des Thiazol-Orange-Phosphoramidits **8**.

- 1,4-Dioxan, 3.3 eq. MeI, Rückfluss, 1h; 99 %.
- MeCN, 110 °C, 91 h; 90 %.
- NEt<sub>3</sub> (2.5 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 1:1, RT, 15 h; 31 %.
1. Trifluoressigsäureethylester, über Nacht, RT; 91 %. 2. DMT-Cl, 12 h, RT; 87 %. 3. NH<sub>3</sub>, über Nacht, RT; 95 %.
- 1,1'-Carbonyldiimidazol (1.1 eq.), DMF, RT, 48 h; 56 %.
- DIPEA, 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 15 h; quant.

Nach wässriger Aufarbeitung konnte **8** zur DNA-Synthese sofort verwendet werden. Zum Einbau in Oligonukleotide wurde ein verändertes Kopplungsprotokoll mit einer verlängerten Reaktionszeit von 61.6 min (siehe Kapitel 9.3.1) verwendet, um eine ausreichend hohe Kopplungseffizienz zu erreichen.

## 4.2 Interstrang-Dimere

### 4.2.1. Optische Eigenschaften

Es werden die optischen Eigenschaften folgender DNA Duplexe untersucht:

**DNA1:** 3'-CAG-TCA-GTT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA2:** 5'-GTC-AGT-CAA-CTG-CAT-GC-3'

Dieser Duplex dient als unmodifizierter Referenzduplex.

**DNA3:** 3'-CAG-TCA-**TO**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA2:** 5'-GTC-AGT-CAA-CTG-CAT-GC-3'

Dieser Duplex weist monomeres Thiazol Orange auf.

**DNA3:** 3'-CAG-TCA-**TO**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT-T**TO**A-CTG-CAT-GC-3'

Dieser Duplex weist zwei Thiazol-Orange-Chromophore auf, die durch die Basenkomplementarität gezwungen werden, in räumliche Nähe zueinander zu treten. Hierbei ist zu beachten, dass sich beide Thiazol-Orange-Chromophore in der sequentiellen Abfolge nicht direkt gegenüber stehen, sondern diagonal zueinander. Dabei bilden sie excitonische Wechselwirkungen miteinander aus, die drastische Veränderungen in den optischen Eigenschaften zur Folge haben.

Zunächst werden die optischen Eigenschaften der Einzelstränge untersucht. DNA4 zeigt im Absorptionsspektrum (Abbildung 4-4) die für Thiazol Orange erwartete Feinstruktur mit einem Emissionsmaximum bei 510 nm und einer Schulter bei 490 nm. Diese resultieren aus den für diese Chromophore typischen, vibronischen 0→1 und 0→0 Übergängen. DNA3 zeigt eine höhere Intensität der Schulter, aber ebenfalls das erwartete Maximum.

Das Absorptionsspektrum des Thiazol Oranges in DNA3-2 weist das erwartete Maximum bei 507 nm auf und die Feinstruktur mit einer Schulter bei 486 nm. Dass die Absorptionsintensität von DNA3-2 im Vergleich zu DNA3 sinkt, liegt an der Basensensitivität des Thiazol Oranges bezüglich Nachbar- und Gegenbasen, bei der der Extinktionskoeffizient des Chromophors um bis zu 60 % variieren kann.<sup>[213]</sup>

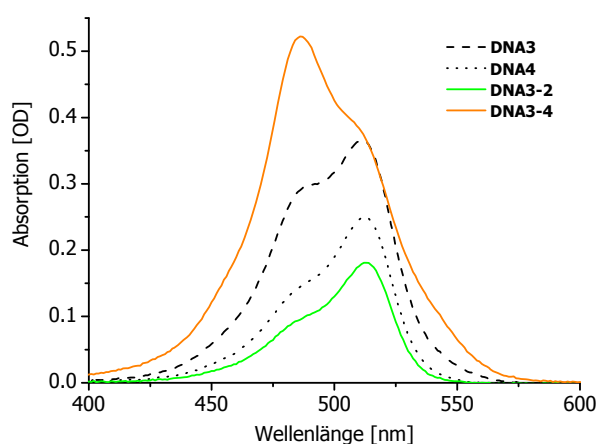


Abbildung 4-4: Absorptionsspektren von DNA3, DNA3-2, DNA4, und DNA3-4; 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Die Absorption von DNA3-4 zeigt drastische Veränderungen im Vergleich zu DNA3-2. Die Intensität steigt stark an, dies entspricht aber ungefähr den Erwartungen bei doppelter Anzahl an Chromophoren. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 510 nm um ca. 30 nm hypsochrom zu 487 nm. Bei sorgfältiger Betrachtung der Absorptionsbanden ist festzustellen, dass sich die Intensitäten der Maxima und der Schultern umkehren. So stellt die Schulter der Monomerabsorptionsbande bei 486 nm nun das Maximum der Dimerabsorption dar, wohingegen das Maximum der Monomerabsorption bei 507 nm zur Schulter im Dimerabsorptionsspektrum wird. Es findet also eine Umkehr der Intensitäten statt. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei Aggregaten von Cyaninfarbstoffen<sup>[186, 214-216]</sup>, sowie bei dimeren Formen von Cyaninen (TOTO, ein TO-Dimerkonjugat)<sup>[132, 158, 217, 218]</sup> gemacht.

Im Fluoreszenzspektrum (Abbildung 4-5) zeigt DNA4, wie erwartet die typische Feinstruktur des Thiazol-Orange-Chromophors mit einem Maximum bei 530 nm und einer Schulter bei 565 nm. DNA3 zeigt eine erhöhte Intensität der Emissionsschulter, besitzt aber dasselbe Emissionsmaximum wie DNA4.

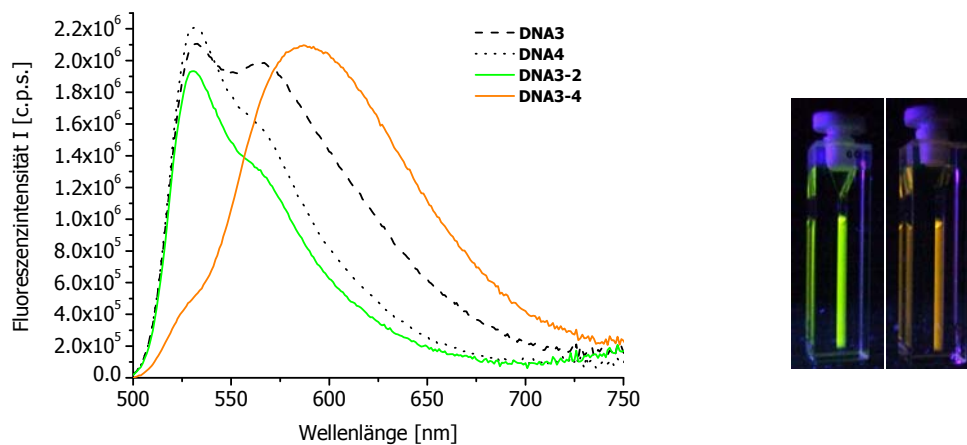


Abbildung 4-5: Emissionsspektren von DNA3, DNA4, DNA3-2 und DNA3-4; 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto: DNA3-2 (links), DNA3-4 (rechts); 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C; angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

DNA3-2 zeigt ebenfalls die typischen Emissionseigenschaften des monomeren Thiazol-Orange-Chromophors. Werden die DNA-Lösungen, die einfach modifizierte Oligonukleotide enthalten, mit einer UV-Lampe angeregt (254 nm) wird die typische, grüne TO-Monomeremission für das Auge sichtbar (Abbildung 4-5, Foto links). Diese optischen Eigenschaften des Thiazol Oranges sind seit 1986<sup>[219]</sup> bekannt und wurden vielfach für die Oligonukleotidanalytik ausgenutzt.

Die drastischen Veränderungen, die im Emissionsspektrum von DNA3-4 beobachtet werden können, sind unseres Wissens nach und nach sorgfältiger Überprüfung der Literatur, unbekannt. Das Maximum der Fluoreszenzintensität von DNA3-4 verschiebt sich um ca. 50 nm bathochrom auf 580 nm, dabei verliert das Emissionsspektrum die TO-typische Feinstruktur und weist eine breite Bande auf (Abbildung 4-5). Diese Veränderungen sind mit bloßem Auge beobachtbar; die DNA-Lösung, mit einer UV-Lampe angeregt, zeigt orangefarbene Fluoreszenz (Abbildung 4-5, Foto rechts), wohingegen DNA3-2 grünes Licht emittiert.

Da die Wellenlänge des Monomerfluoreszenzmaximums Bestandteil des Dimeremissionsspektrums ist, und umgekehrt die Wellenlänge des Dimerfluoreszenzmaximums auch ein Bestandteil des Monomeremissionsspektrums ist, empfiehlt es sich, zur Vereinfachung die Verhältnisse beider Maxima in Betracht

zu ziehen (Gleichung 4-1). Teilt man die Fluoreszenzintensität bei 533 nm (Monomermaximum) durch die Fluoreszenzintensität bei 585 nm (Dimermaximum), so kann man Werte errechnen, die charakteristisch sind für die jeweilige monomere oder dimere Form des Thiazol Oranges.

$$R_{FI} = \frac{FI_{533nm}}{FI_{585nm}}$$

Gleichung 4-1: Fluoreszenzintensitätsverhältnis  $R_{FI}$  (FI = Fluoreszenzintensität bei angegebener Wellenlänge)

Für das Thiazol-Orange-Monomer errechnet man so einen Wert von 2.54, für das TO-Dimer einen Wert von 0.15 (Tabelle 4-1). Diese Zahlen erleichtern die Handhabung und Bewertung der nachfolgenden Analysen und Fluoreszenzspektren.

Das Thiazol-Orange-Monomer zeigt eine Stokes-Verschiebung von 17 nm, dies ist ein für ein organisches Chromophor üblicher Wert (Abbildung 4-6). Das Thiazol-Orange-Dimer hingegen zeigt eine enorme Stokes-Verschiebung von nahezu 100 nm. Das ist für organische Fluorophore ein erstaunlicher Wert.

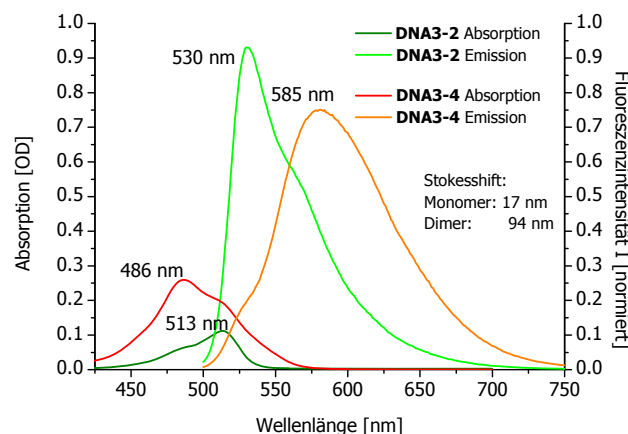


Abbildung 4-6: Normierte Absorptions- und Emissionsspektren von DNA3-2 und DNA3-4; 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{exc}$  = 490 nm, 20 °C.

Die Fluoreszenzlebenszeit des TO-Dimers ist deutlich länger (2.83 ns), als die des TO-Monomers (1.55 ns). Die Quantenausbeute des TO-Dimers (8.0 %) ist niedriger, als die des TO-Monomers (22.0 %) (Tabelle 4-1). Oberflächlich betrachtet, sind diese spektroskopischen Eigenschaften charakteristisch für Excimere (Vergleiche dazu



Kapitel 4.7). Die Excimerbildung steht im Widerspruch zur excitonischen Wechselwirkung der TO-Chromophore.

Tabelle 4-1: Charakteristische Daten von **DNA1-2**, **DNA3-2** und **DNA3-4**; 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$ .

DNA	$\text{FI}_{\text{max}}/\text{nm}$	$\tau / \text{ns}$	$\Phi$	$R_{\text{FI}} (\text{FI}_{533\text{nm}}/\text{FI}_{585\text{nm}})$	$T_{\text{m}}/^{\circ}\text{C}$ [260 nm]	$T_{\text{m}}/^{\circ}\text{C}$ [508 nm]
<b>DNA1-2</b>	-	-	-	-	67.5	-
<b>DNA3-2</b>	530	2.31	0.22	2.54	65.5	-
<b>DNA3-4</b>	585	3.1	0.08	0.15	69.4	70.5

In einem geometrisch optimierten Modell (Abbildung 4-7) ist deutlich zu erkennen, wie beide Chromophore antiparallel aggregieren. Das bedeutet, dass der Chinolinteil

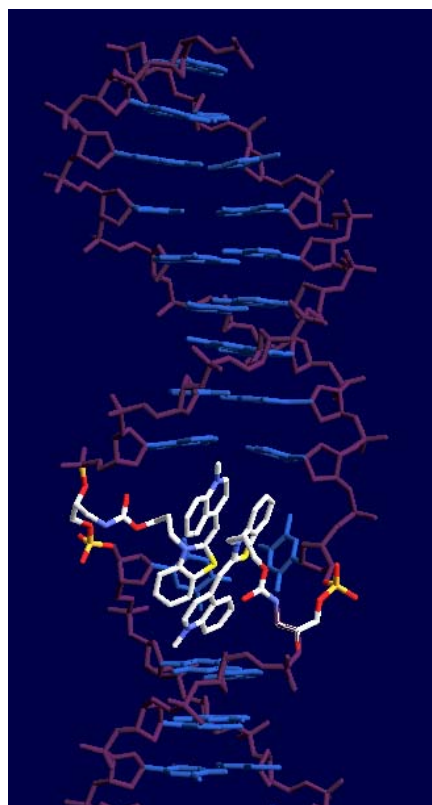


Abbildung 4-7: Geometrisch optimierte Modelldarstellung von DNA3-4.

des einen Chromophors gegenüber dem Benzthiazolteil des anderen Chromophors positioniert ist und umgekehrt. Es ist klar zu erkennen, dass beide Chromophore nicht interkaliert sind, sie bilden keine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Nachbarbasen aus, sondern sie lagern sich beide innerhalb der kleinen Furche aneinander an.

Dass die Existenz des DNA-Duplex als Grundgerüst für die Ausbildung des Dimers trotzdem von entscheidender Bedeutung ist, konnte durch Dehybridisierungsexperimente nachgewiesen werden (Abbildung 4-10). Die thermische Dehybridisierung des Duplexes DNA3-2 zeigt im Absorptionsspektrum (Abbildung 4-8, links) lediglich eine leichte Minderung der Absorptionsintensität und eine sehr kleine hypsochrome Verschiebung des Maximas um ca. 6 nm. Das temperaturabhängige

Absorptionsspektrum von DNA3-4 zeigt bei niedrigen Temperaturen zunächst die charakteristischen optischen Eigenschaften von dimerem Thiazol Orange. Bei

steigender Temperatur findet jedoch eine bathochrome Verschiebung statt. Bei 90 °C liegen die Oligonukleotide als Einzelstränge vor, dadurch wird das TO-Dimer separiert und zeigt nun die charakteristischen optischen Eigenschaften von monomerem Thiazol Orange.

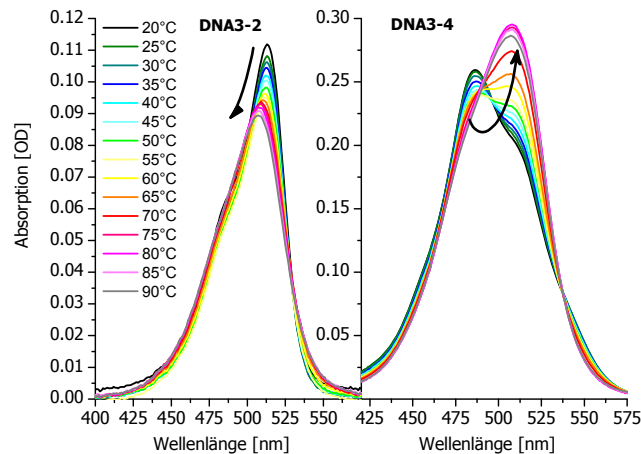


Abbildung 4-8: Temperaturabhängige Absorptionsspektren von DNA3-2 (links) und DNA3-4 (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20-90 °C.

Der starke Absorptionsanstieg bei 507 nm kann zur Bestimmung der Schmelztemperatur des Duplexes heran gezogen werden, denn die Absorptionsänderung, aufgrund der Separation beider Chromophore, geschieht gleichzeitig mit der thermischen Dehybridisierung des gesamten Duplexes. Abbildung 4-9 zeigt links eine Schmelztemperaturkurve, gemessen bei 507 nm, rechts ist eine Schmelztemperaturkurve zu sehen, wie sie standardmäßig bei 260 nm aufgenommen wurde. Beide Messungen zeigen sehr schöne, sigmoidale Kurvenverläufe, die sehr nahe bei einander liegende Schmelztemperaturen ergeben (67.8 °C und 67.2 °C).

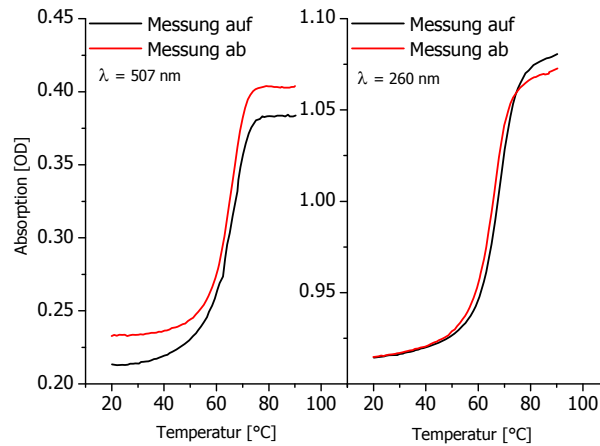


Abbildung 4-9: Schmelztemperaturkurven von DNA3-4 gemessen bei 507 nm (links) und bei 260 nm (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Das temperaturabhängige Fluoreszenzspektrum von DNA3-2 zeigt eine abnehmende Emissionsintensität bei steigender Temperatur. Die Fluoreszenz wird schließlich ganz gelöscht, da der Duplex auseinander bricht und der Chromophor nun die absorbierte Energie strahlungslos durch Rotation um die Methinbrücke abgeben kann. Zwischen dem Spektrum bei 60 °C und dem Spektrum bei 70 °C ist ein deutlicher Einbruch der Fluoreszenzintensität zu sehen. Dies entspricht der Schmelztemperatur des Duplexes, der bei 65.5 °C liegt.

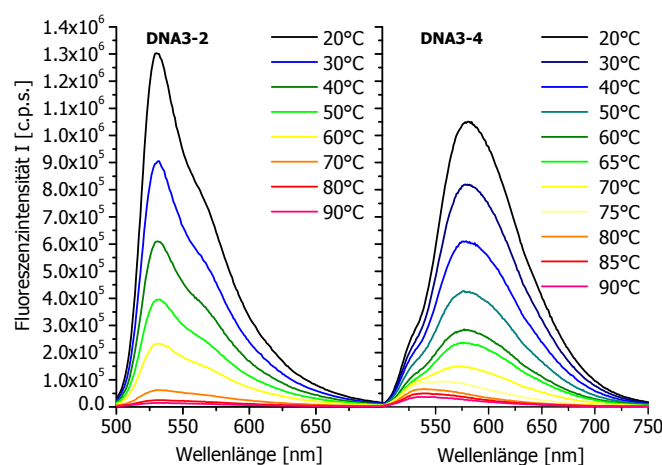


Abbildung 4-10: Temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA3-2 (links) und DNA3-4 (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20-90 °C.

Das Emissionsspektrum von DNA3-4 zeigt bei niedrigeren Temperaturen zunächst die charakteristische Dimeremissionsbande, die Intensität nimmt jedoch bei steigender Temperatur ab. Die Fluoreszenz nimmt schließlich die Gestalt der charakteristischen Emissionsbanden des TO-Monomers an. Die Fluoreszenzmaximumsverschiebung von 585 nm nach 530 nm wird in einem normierten Emissionsspektrum sehr deutlich (Abbildung 4-11, links). Bei einer Temperatur, die der Schmelztemperatur des gesamten Duplexes entspricht (70.5 °C), ist eine duale Fluoreszenz zu sehen (Abbildung 4-11, rechts). Diese weist eine breite Bande über beide Maxima auf und ist von gelber Emissionsfarbe.

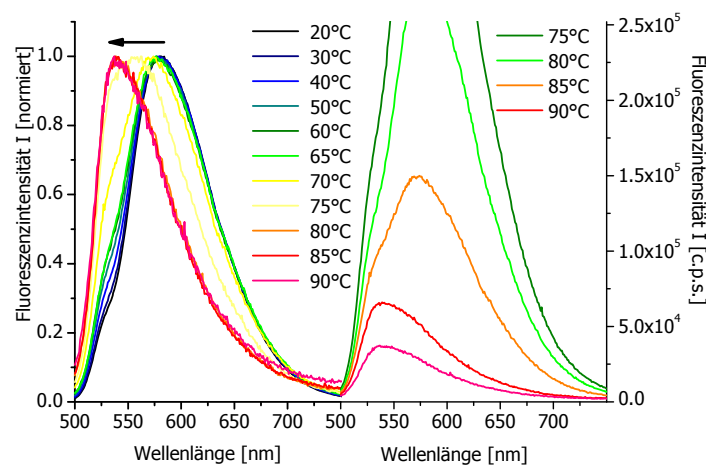


Abbildung 4-11: Normierte temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA3-4. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaPi}$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20-90 °C (links). Duale Fluoreszenz bei der Schmelztemperatur des Duplexes (rechts).

Diese Resultate zeigen, dass sowohl das Dimer als auch der gesamte Duplex bei nahezu identischer Temperatur dehybridisieren. Dies beweist die Notwendigkeit eines stabilen Rahmengerüsts für die TO-Dimerbildung, das durch den DNA-Duplex bereit gestellt wird.

Der unmodifizierte Duplex DNA1-2 zeigt eine Schmelztemperatur von 67.5 °C (Tabelle 4-1). Durch den Einbau eines Thiazol-Orange-Chromophors in den Duplex (DNA3-2), sinkt die Schmelztemperatur um 2 °C auf 65.5 °C. Dies stellt eine Destabilisierung des DNA-Doppelstranges dar, die allerdings nicht so stark ausgeprägt ist, wie man erwartet hätte, denn die Einführung eines azyklischen Glykollinkers destabilisiert einen Duplex normalerweise um ungefähr 10 °C.<sup>[207]</sup>

Offensichtlich trägt das Thiazol Orange durch die Anlagerung an die kleine Furche des DNA-Duplexes dazu bei, die durch den Linker verlorene Stabilität wiederzugewinnen. Werden zwei Thiazol-Orange-Chromophore in den Duplex als diagonales Basenpaar eingebaut (DNA3-4), zeigt sich sogar eine Stabilisierung des Doppelstranges gegenüber dem unmodifizierten Duplex (+1.9 °C).

Die CD Spektren von DNA1-2, DNA3-2 und DNA3-4 zeigen alle zwischen 260 nm und 300 nm einen positiven Cotton-Effekt, einen Nulldurchgang bei ca. 260 nm und einen negativen Cotton-Effekt zwischen 260 nm und 230nm. Dieses Signal deutet auf die B-Helix der DNA<sup>[220]</sup> hin. DNA1-2 und DNA3-2 zeigen im langwelligeren Bereich >300 nm keinen Cotton-Effekt, wohingegen DNA3-4 ein sehr starkes Signal mit einem Nulldurchgang bei 510 nm aufweist. Dieser Nulldurchgang entspricht der Wellenlänge, bei der im Absorptionsspektrum des Dimers eine Schulter zu sehen ist. Der langwelligere Cotton-Effekt ist negativ (zwischen 510 nm und 574 nm), der kurzwelligere ist positiv (zwischen 438 nm und 510 nm).

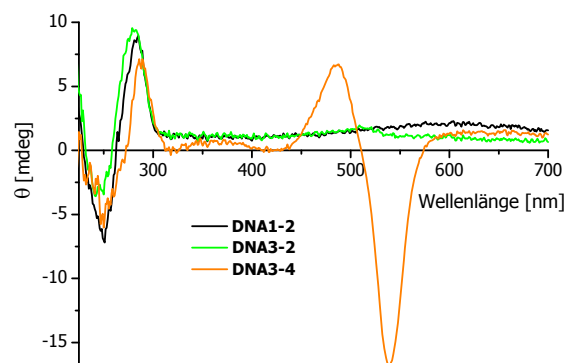


Abbildung 4-12: CD-Spektren von DNA1-2, DNA3-2 und DNA3-4. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Diese Beobachtungen können entsprechend der *Exciton-Chiralitäts-Methode der CD-Spektroskopie*<sup>[199]</sup> interpretiert werden, die besagt, dass die excitonischen Wechselwirkungen zweier identischer Chromophore mit ausgeprägtem  $\pi$ -System zu einer energetischen Aufspaltung des angeregten Zustandes führen. Diese sogenannte Davydov-Aufspaltung generiert Cotton-Effekte mit entgegengesetzten Signalen, der Abstand beider Extrema entspricht dem  $\Delta\lambda$  der Davydov-Aufspaltung,

diese beträgt hier 52 nm oder 23.84 eV ( $3.82 \cdot 10^{-18}$  Joule) (vergleiche dazu auch Kapitel 3.4).

### 4.2.2. Gegenbasenvariation

Um zu untersuchen, ob die Sensitivität der optischen Eigenschaften des Thiazol-Orange-Monomers auf seine Nachbar- und Gegenbasen auch beim TO-Dimer zu beobachten ist, wurde die sequentielle Basenumgebung variiert.

Zunächst wurde der Einfluss der Gegenbasen auf das spektroskopische Verhalten des TO-Dimers untersucht. Dazu wurden folgende DNA-Sequenzen synthetisiert:

**DNA5:** 3'-CAG-TCA-**TO**AT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA6:** 5'-GTC-AGT-**ATO**A-CTG-CAT-GC-3'

**DNA7:** 3'-CAG-TCA-**TO**CT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA8:** 5'-GTC-AGT-**CTO**A-CTG-CAT-GC-3'

**DNA9:** 3'-CAG-TCA-**TO**GT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA10:** 5'-GTC-AGT-**GTO**A-CTG-CAT-GC-3'.

Im Vergleich zu DNA3-4 mit Thymin als Gegenbase, weisen die nachfolgenden Sequenzen jeweils Adenin (DNA5-6), Cytosin (DNA7-8) oder Guanin (DNA9-10) als Gegenbase zu den beiden Thiazol-Orange-Chromophoren auf.

Im UV/VIS-Absorptionsspektrum (Abbildung 4-13) ist beispielhaft der Einzelstrang DNA10 zu sehen, um die hypsochrome Verschiebung der TO-Monomerabsorption zur TO-Dimerabsorption zu verdeutlichen, die alle Duplexe zeigen. DNA9-10 weist als einziger Duplex leichte Abweichungen von der typischen Dimerabsorption auf. Guanin scheint als Gegenbase zu TO eine Störung der Dimerbildung zu verursachen. Guanin ist dafür bekannt, starke Wechselwirkungen mit Chromophoren einzugehen, so wird diese Eigenschaft beispielsweise bei der Stabilisierung von Quadruplexen ausgenutzt, die aus gestapelten Guanin-Tetraden bestehen.<sup>[221-223]</sup>

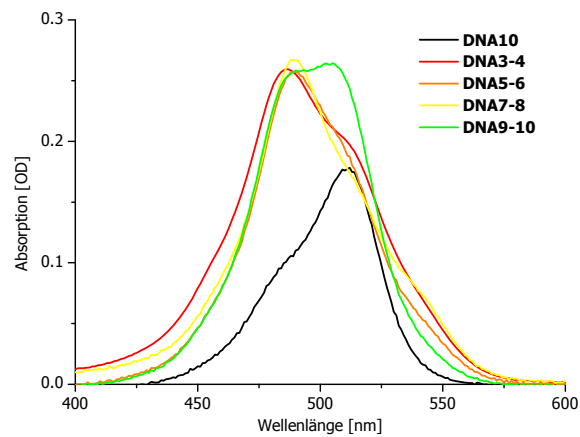


Abbildung 4-13: Absorptionsspektren von DNA10, DNA3-4, DNA5-6, DNA7-8 und DNA9-10. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Die Emissionsspektren (Abbildung 4-14) zeigen im Vergleich zum Einzelstrang DNA10, die Verschiebung von der Monomeremission zur Dimeremission. Alle Duplexe zeigen charakteristische Dimeremissionsbanden. Mit Guanin (DNA9-10) und Adenin als Gegenbase (DNA5-6) ist die geringste Fluoreszenzintensität zu beobachten. Die bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums bei DNA9-10 ist nicht so stark ausgeprägt (sie beträgt lediglich 37 nm) wie bei DNA3-4 (50 nm).

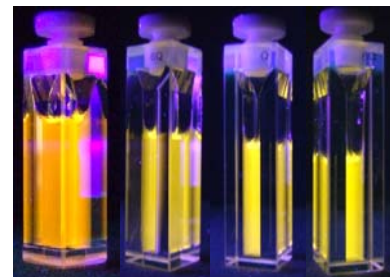
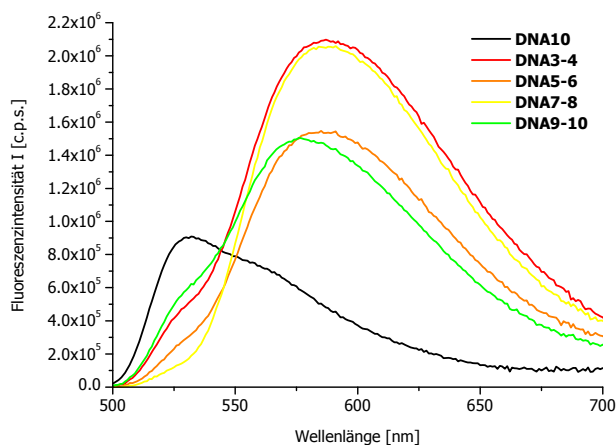


Abbildung 4-14: Emissionsspektren von DNA10, DNA3-4, DNA5-6, DNA7-8 und DNA9-10. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA3-4, DNA5-6, DNA7-8, DNA9-10. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Alle Duplexe zeigen gute thermische Stabilitäten (Tabelle 4-2). Die Schmelztemperaturen betragen zwischen 66.3 °C und 69.8 °C. Der Duplex DNA9-10, der sowohl im Absorptions- als auch im Emissionsspektrum Abweichungen von den typischen optischen Eigenschaften des TO-Dimers zeigt, weist auch die niedrigste Schmelztemperatur auf. Die  $R_{FI}$ -Werte von DNA3-4, DNA5-6 und DNA7-8 sind relativ niedrig und typisch für das TO-Dimer. DNA9-10 zeigt einen leicht erhöhten Wert (0.78), der aber immer noch deutlich unter dem des Monomers liegt (2.54 bei DNA3-2).

Tabelle 4-2: Charakteristische Daten der Duplexe DNA3-4, DNA5-6, DNA7-8 und DNA9-10. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{exc}$  = 490 nm, 20 °C.

DNA	$FI_{max}/nm$	$\Phi$	$R_{FI} (FI_{533nm}/FI_{585nm})$	$T_m/^\circ C$ [260 nm]	$T_m/^\circ C$ [508 nm]
<b>DNA3-4</b>	585	0.08	0.15	69.4	70.5
<b>DNA5-6</b>	578	0.15	0.49	67.3	66.4
<b>DNA7-8</b>	587	0.20	0.21	69.8	69.0
<b>DNA9-10</b>	569	0.20	0.78	66.3	65.0

Die CD-Spektren der Duplexe zeigen bei 260 nm das typische Signal einer B-Helix. Zwischen 420 nm und 580 nm ist ein deutliches CD-Signal zu beobachten, das von den excitonischen Wechselwirkungen der TO-Chromophore verursacht wird. Dabei ist die Intensität des Signals stark abhängig von der Gegenbase der Chromophore. Es zeigt sich auch hier eine Störung der Dimerbildung durch Guanin in DNA9-10, dieser Duplex zeigt die geringste Signalintensität. Bei DNA7-8 ist das stärkste CD-Signal zu beobachten, dieser Duplex zeigt auch im Emissionsspektrum die höchste Fluoreszenzintensität. Es scheint hier einen Zusammenhang zu geben: je intensiver das CD-Signal ist, desto höher ist die Intensität der Emissionsbande. Die Davydov-Aufspaltung ist mit 53 nm oder 23.4 eV wieder wie erwartet und für alle Duplexe ähnlich.



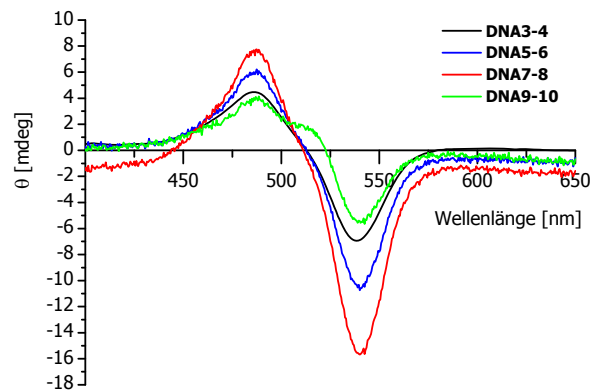


Abbildung 4-15: CD-Spektren der Duplexe DNA3-4, DNA5-6, DNA7-8 und DNA9-10. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

### 4.2.3. Nachbarbasenvariation

Um den Einfluss der Nachbarbasen auf die optischen Eigenschaften des Thiazol-Orange-Dimers zu untersuchen, wurden folgende DNA-Sequenzen synthetisiert.

**DNA11:** 3'-CAG-TCG-**TOTC**-GAC-GTA-CG-5'

**DNA12:** 5'-GTC-AGC-**TTOG**-CTG-CAT-GC-3'

**DNA13:** 3'-CAG-TCA-**TOTA**-GAC-GTA-CG-5'

**DNA14:** 5'-GTC-AGT-**TTOT**-CTG-CAT-GC-3'

**DNA15:** 3'-CAG-TCC-**TOTC**-GAC-GTA-CG-5'

**DNA16:** 5'-GTC-AGG-**TTOG**-CTG-CAT-GC-3'.

Im Vergleich zu DNA3-4 mit dem TO-Dimer in einer AT/TA-Basenumgebung, sind die beiden Chromophore bei DNA11-12 in einer GC/CG-Basenumgebung positioniert. Bei DNA13-14 und DNA15-16 sind die benachbarten Basen nochmals ausgetauscht zu AT/AT bzw. CG/CG. In allen Duplexen wurde Thymin als Gegenbase gewählt.

In Abbildung 4-16 ist das Absorptionsspektrum des Einzelstranges DNA14 als Referenz für die monomere Absorption von Thiazol Orange mit einem Maximum bei

507 nm und einer Schulter bei 486 nm abgebildet. Die Duplexe DNA3-4, DNA11-12, DNA13-14 und DNA15-16 zeigen eindeutig die Dimerabsorption, mit einem Maximum bei 490 nm und einer Schulter bei 512 nm. Es zeigen sich leichte Intensitätsunterschiede in Abhängigkeit der Nachbarbasen. Dies liegt an veränderten Extinktionskoeffizienten des Thiazol Orange in Abhängigkeit der Basenumgebung.<sup>[89]</sup>

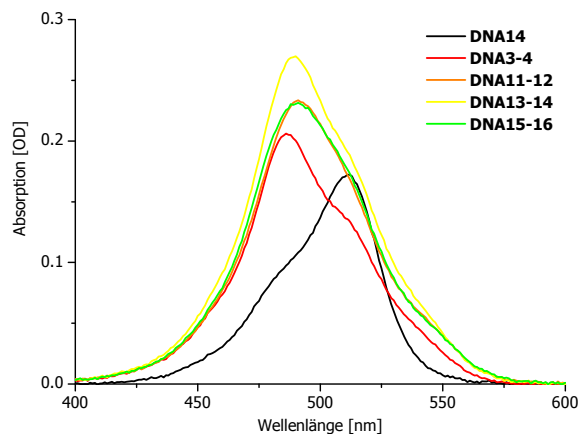


Abbildung 4-16: Absorptionsspektren von DNA14, DNA3-4, DNA11-12, DNA13-14 und DNA15-16. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

In Abbildung 4-17 ist das Spektrum des Einzelstranges DNA14 als Referenz für monomere Emission des Thiazol Oranges aufgetragen, mit einem Maximum von ca. 530 nm und einer Schulter bei 580 nm. DNA3-4, DNA11-12, DNA13-14 und DNA15-16 zeigen deutlich die bathochrom verschobene Fluoreszenz bei ca. 580 nm. Die Feinstruktur verschwindet fast vollständig. Auch hier sind Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zu sehen, die durch die Rahmenbedingungen der Nachbarbasen zustandekommen. Allerdings ist generell die Abhängigkeit der optischen Eigenschaften von den Gegenbasen größer als von den Nachbarbasen. Die Verschiebung der Fluoreszenz ist bei den Duplexen DNA11-12 und DNA13-14 noch etwas größer als im Referenzduplex DNA3-4, die Maxima liegen bei ungefähr 593 nm.

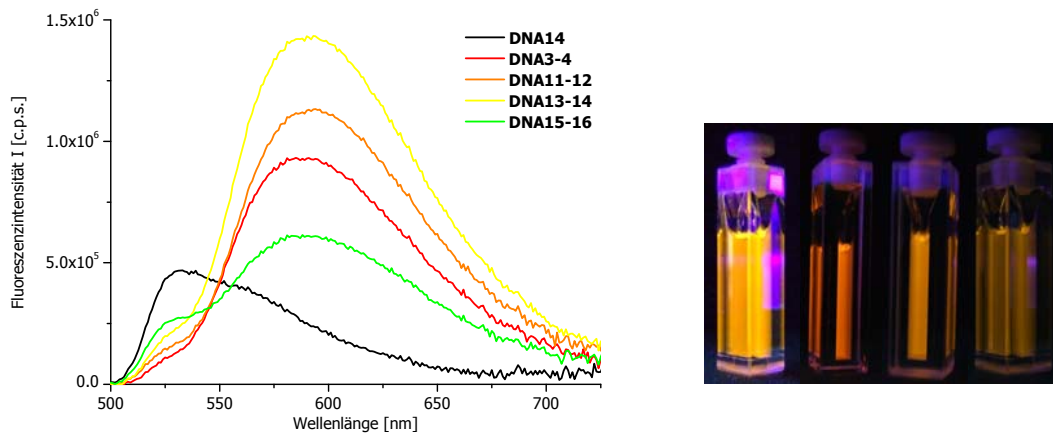


Abbildung 4-17: Emissionsspektren von DNA14, DNA3-4, DNA11-12, DNA13-14 und DNA15-16. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA3-4, DNA11-12, DNA13-14 und DNA15-16. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Es scheint für die Aggregation beider Chromophore günstiger zu sein, wenn sie von AT/AT-Nachbarbasen umgeben sind, statt von AT/TA, denn DNA13-14 zeigt eine höhere Emissionintensität als DNA3-4. Für die Dimerbildung scheint die Nachbarbasenkombination CG/CG ungeeigneter zu sein, als GC/CG, denn DNA15-16 zeigt eine deutlich niedrigere Emissionsintensität als DNA11-12. Beachtlich ist, dass eine Emissionsverschiebung in allen vier Fällen zu beobachten ist. Keiner der Duplexe weist die rein monomere Fluoreszenz auf. Das bedeutet, dass das TO-Dimer universell eingesetzt werden kann.

Auch die Fotos der mit einer UV-Lampe angeregten DNA-Lösungen zeigen alle eine entsprechend des TO-Dimers orangefarbene Emission (Abbildung 4-17, Foto). Die Farbintensitätsunterschiede hängen von der Distanz zwischen der Küvette und der UV-Lampe ab, sowie von den Einstellungen der verwendeten Kamera. Farb- und Intensitätsunterschiede der Fotos reflektieren also nicht unbedingt die oben gezeigten Emissionsspektren.

Die Fluoreszenzintensitätsverhältnisse  $R_{\text{FI}}$  (Tabelle 4-3) liegen bei den Duplexen DNA3-4, DNA11-12 und DNA13-14 bei recht ähnlichen Werten ( $\sim 0.16$ ), wohingegen Duplex DNA15-16 einen leicht erhöhten Wert von 0.45 zeigt. Die standardmäßig bei 260 nm gemessene Schmelztemperatur der Duplexe zeigen gute thermische Stabilitäten, mit Werten zwischen 69.4 °C und 72.7 °C. Die Schmelztemperaturen,

die bei 507 nm gemessen wurden, weisen eine gute Übereinstimmung mit denen bei 260 nm auf.

Tabelle 4-3: Charakteristische Daten der Duplexe DNA3-4, DNA11-12, DNA13-14 und DNA15-16. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>DNA3-4</b>	585	0.15	69.4	70.5
<b>DNA11-12</b>	594	0.16	72.7	71.0
<b>DNA13-14</b>	593	0.18	67.8	67.2
<b>DNA15-16</b>	588	0.45	72.4	69.6

Alle Duplexe weisen im CD-Spektrum deutliche Signale mit einem Nulldurchgang bei 510 nm auf. Die Duplexe mit unterschiedlichen Nachbarbasen zeigen geringere Unterschiede in der CD-Signalintensität, als die Duplexe mit unterschiedlichen Gegenbasen.

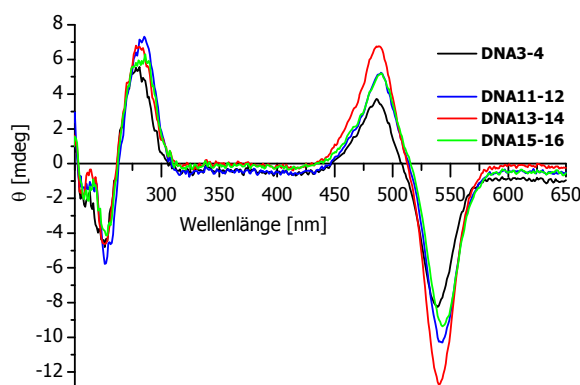


Abbildung 4-18: CD-Spektren der Duplexe DNA3-4, DNA11-12, DNA13-14 und DNA15-16. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Der Duplex mit der höchsten Fluoreszenzintensität, DNA13-14, zeigt auch das intensivste CD-Signal. Das geometrisch optimierte Modell von DNA13-14 veranschaulicht eine gute Wechselwirkung beider Chromophore, beide Farbstoffe stehen sich exakt gegenüber (Abbildung 4-19, rechts). Auf der Basis des Modells von

DNA3-4 ist anzunehmen, dass die Wechselwirkung der Chromophore nicht optimal ist. Die Modelldarstellungen zeigen jedoch nur eine mögliche Anordnung der Chromophore zur Illustration der experimentellen Ergebnisse, als Beweis sind sie nicht zu betrachten.

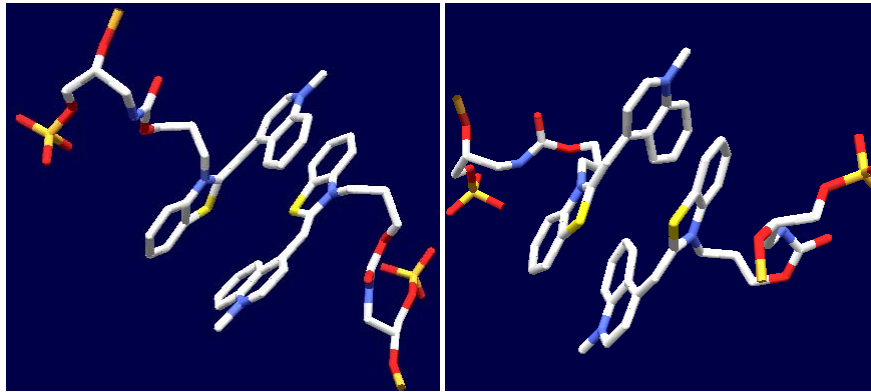


Abbildung 4-19: Geometrisch optimierte Darstellung der beiden Thiazol-Orange-Chromophore in DNA3-4 (links) und DNA13-14 (rechts).

## 4.3 Intrastrang-Dimere

### 4.3.1. Parallele Anordnung

Es hat sich herausgestellt, dass der antiparallele Intrastrang-Dimer nahezu universell in DNA eingebaut werden kann. Es ist in jeder sequentiellen Basenumgebung eine Emissionsverschiebung um ca. 50 nm im Vergleich zu den Emissionseigenschaften der Monomeren zu beobachten. Leichte Unterschiede in der Absorptions- und Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Nachbar- und Gegenbasen sind feststellbar. Viele analytische Oligonukleotidsysteme arbeiten jedoch mit einzelsträngigen Fluoreszenzsonden. Um zu untersuchen, ob sich auch ein Dimer ausbildet, wenn beide Thiazol-Orange-Chromophore in einem DNA Strang eingebaut sind, wurden folgende Sequenzen synthetisiert:

**DNA17:** 3'-CAG-TCA-**TO-TO**-TTG-ACG-TAC-5'

**DNA18:** 5'-GTC-AG**T**--T---T--**A**AC-TGC-ATG-3'

Im Vergleich zu DNA3-4 wurde in DNA17-18 Duplex ein Thiazol Orange mit seiner Gegenbase Thymin im komplementären Strang „ausgetauscht“.

**DNA19:** 3'-CAG-TCC**TO-TO**-GTG-ACG-TAC-5'

**DNA20:** 5'-GTC-AG**G**--T--T---CAC-TGC-ATG-3'

Dieser Duplex wurde synthetisiert, um eventuelle Einflüsse der Nachbarbasen CG/GC auf die optischen Eigenschaften der Chromophore im Vergleich zu AT/TA in DNA17-18 zu untersuchen.

Abbildung 4-20 zeigt die Absorptionsspektren. Die Einzelstränge DNA17 und DNA19 unterscheiden sich nicht von den Duplexen DNA17-18 und DNA19-20. Sie zeigen jedoch deutliche Unterschiede zu den Absorptionsspektren von DNA4 und DNA3-4. DNA17 und DNA19 und die entsprechenden Duplexe weisen ein Absorptionsmaximum von ca. 480 nm auf, also 10 nm hypsochrom verschoben im Vergleich zum Maximum von DNA3-4. Die Intensitäten sind zudem deutlich höher und die Schultern bei 506 nm sind ausgeprägter als im Referenzduplex. Diese Absorptionsspektren lassen sich dahin gehend interpretieren, dass die Chromophore in DNA17 und DNA19, sowie in den Duplexen DNA17-18 und DNA19-20 stark ausgeprägte excitonische Wechselwirkungen ausbilden.

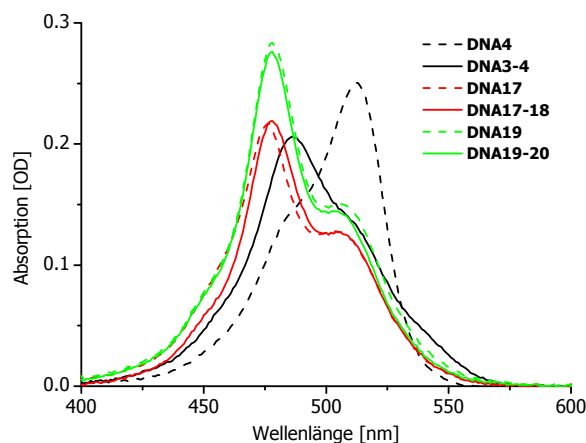


Abbildung 4-20: Absorptionsspektren von DNA4, DNA3-4, DNA17, DNA17-18, DNA19 und DNA19-20. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Diese starken excitonischen Wechselwirkungen stehen aber nicht automatisch in Zusammenhang mit einer Verschiebung des Emissionsmaximums. Im Vergleich zu DNA3-4 zeigen DNA17-18 und DNA19-20 eine nahezu vollständige Emissionslöschung (Abbildung 4-21). Die Einzelstränge DNA17 und DNA19

unterscheiden sich in der Emission nicht wesentlich von ihren Duplexen DNA17-18 und DNA19-20. Das Maximum der schwachen Emissionen liegt bei ungefähr 540 nm und damit näher beim Maximum der Monomeremission. Außerdem zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede im Fluoreszenzspektrum in Abhängigkeit der Nachbarbasen CG/GC im Vergleich zu AT/TA, es sind lediglich Unterschiede in den Intensitäten zu beobachten.

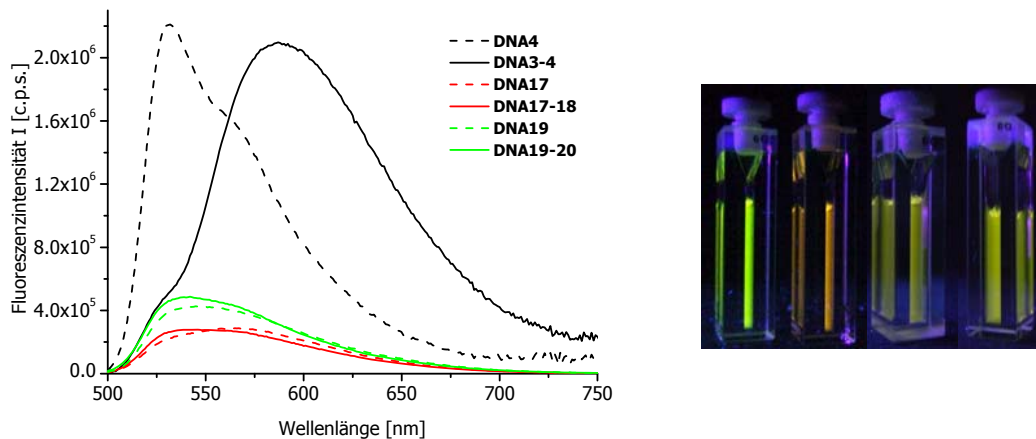


Abbildung 4-21: Emissionsspektren von DNA4, DNA3-4, DNA17, DNA17-18, DNA19 und DNA19-20. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490$  nm, 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA3-2, DNA3-4, DNA17-18 und DNA19-20. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Eines wird ganz deutlich: die Fluoreszenz beider Thiazol-Orange-Chromophore in DNA17-18 und DNA19-20 wird nahezu vollständig gelöscht. Diese Fluoreszenzlöschung ist eine Begleiterscheinung der Aggregation<sup>[224]</sup> beider Chromophore, damit wird klar, dass excitonische Wechselwirkungen nicht automatisch zu einer bathochromen Verschiebung im Emissionsspektrum führen. Die starke Fluoreszenzlöschung lässt sich auch mit dem Auge wahrnehmen. In Abbildung 4-21 (Foto) zeigen die Lösungen DNA17-18 und DNA19-20 im Vergleich zu DNA3-2 und DNA3-4 kaum Fluoreszenz, die Farbe entspricht eher grün als orange. Auch die  $R_{\text{FI}}$ -Werte liegen mit 1.2 für DNA17-18 und 1.44 für DNA19-20 näher beim charakteristischen Wert für Monomerfluoreszenz ( $R_{\text{FI}}=2.54$ ), als bei dem für dimere Fluoreszenz ( $R_{\text{FI}}=0.15$ , siehe Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Charakteristische Daten der Duplexe DNA3-4, DNA17-18 und DNA19-20. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20  $^\circ\text{C}$ .

DNA	$\text{FI}_{\text{max}}/\text{nm}$	$\Phi$	$\text{R}_{\text{FI}} (\text{FI}_{533\text{nm}}/\text{FI}_{585\text{nm}})$	$T_{\text{m}}/^\circ\text{C}$ [260 nm]	$T_{\text{m}}/^\circ\text{C}$ [508 nm]
<b>DNA3-4</b>	585	0.08	0.15	69.4	70.5
<b>DNA17-18</b>	546	0.04	1.20	60.5	-
<b>DNA19-20</b>	542	0.05	1.44	65.0	-

Im Modell von DNA3-4 sieht man (Abbildung 4-22, links), wie sich beide Chromophore antiparallel gegenüberstehen, es kommt zu den beobachteten drastisch veränderten optischen Eigenschaften. Das Modell von DNA17-18 (Abbildung 4-22, rechts) zeigt eine parallele Anordnung beider Chromophore. Das bedeutet, dass sich der Benzothiazolteil eines Chromophors gegenüber dem Benzothiazolteil des anderen Chromophors anlagert. Dies könnte der Grund für die Löschung der Fluoreszenz sein, da die Anordnung der Übergangsdipolmomente Einfluss auf die Elektronenübergänge und die daraus resultierenden optischen Eigenschaften hat.

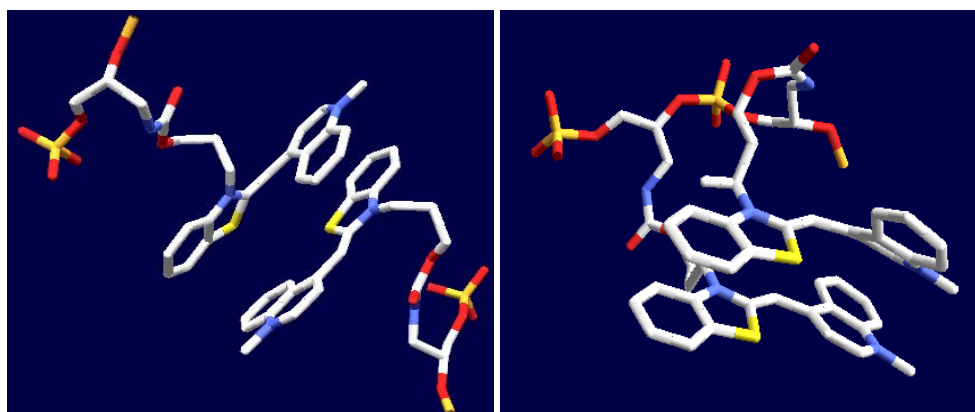


Abbildung 4-22: Geometrisch optimierte Modelldarstellung der beiden Thiazol-Orange-Chromophore in DNA3-4 (links) und in DNA17-18 (rechts).

#### 4.3.2. Antiparallele Anordnung

Werden zwei Thiazol-Orange-Chromophore nebeneinander in einen DNA-Duplex eingebaut, sind excitonische Wechselwirkungen im Absorptionsspektrum zu beobachten, ein Emissionsmaximum von 585 nm und eine damit verbundene orangefarbene Fluoreszenz ist jedoch nicht feststellbar. Vergleicht man DNA3-4 und DNA17-18 genau, kann man feststellen, dass der Einbau in beide Stränge die beiden



Chromophore dazu zwingt sich antiparallel zueinander anzuordnen. Eine Modelldarstellung verdeutlichte, dass jeweils der Chinolinteil eines Chromophors dem Benzothiazolteil des anderen Chromophores gegenüber steht. In DNA17-18 sind jedoch beide Chromophore parallel zueinander angeordnet. Um die antiparallele Anordnung beider TO-Chromophore in einem Strang zu erreichen, wurde eines der beiden Thiazol-Orange-Chromophore über den Chinolin-Stickstoff in den Einzelstrang eingebaut (TO'). Dadurch sollte es zu einer antiparallelen Anordnung beider Chromophore kommen (Abbildung 4-23). TO' wurde von Florian Menacher synthetisiert und freundlicherweise für den Einbau in DNA zur Verfügung gestellt.

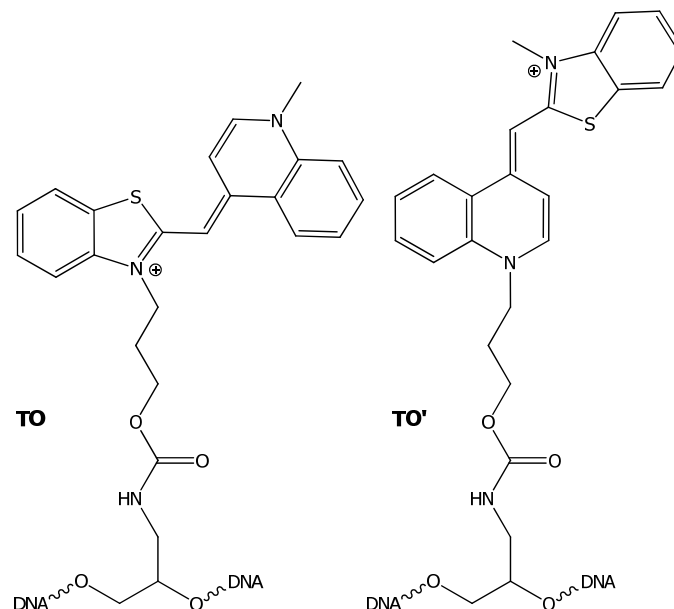


Abbildung 4-23: Unterschiedliche Anknüpfungsweisen von TO (links) und TO' (rechts) an DNA.

Es wurden folgende DNA-Sequenzen synthetisiert:

**DNA21:** 3'-CAG-TC**A-TO-TO'**-TTG-ACG-TAC-5'

**DNA18:** 5'-GTC-AG**T**--T---T---**A**AC-TGC-ATG-3'

**DNA22:** 3'-CAG-TC**C-TO-TO'**-**G**TG-ACG-TAC-5'

**DNA20:** 5'-GTC-AG**G**--T---T---**C**AC-TGC-ATG-3'

DNA21-18 und DNA22-20 sind sequenzidentisch zu DNA17-18 und DNA19-20, bis auf den Unterschied, dass das zweite Thiazol Orange über den Chinolin-Stickstoff (TO') in den Einzelstrang eingebaut wurde.

Im Absorptionsspektrum (Abbildung 4-24, links) sind sowohl in den Einzelsträngen DNA21 und DNA22, als auch in den Duplexen DNA21-18 und DNA22-20, starke excitonische Wechselwirkungen zu beobachten. Alle Oligonukleotide weisen ein Maximum von etwa 470 nm auf und eine sehr ausgeprägte Schulter bei 510 nm. Das Maximum ist im Vergleich zu DNA3-4 um ca. 10 nm weiter hypsochrom verschoben. Duplex DNA21-18 zeigt eine stärkere Absorptionsintensität als der Einzelstrang DNA21. Duplex DNA22-20 zeigt keine wesentlichen Unterschiede zu DNA22.

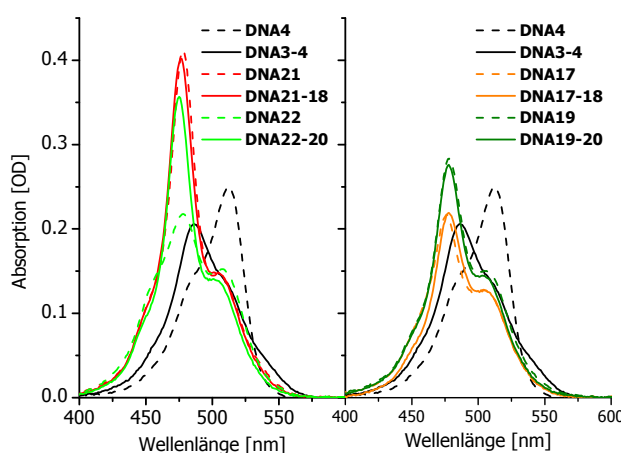


Abbildung 4-24: Absorptionsspektren von DNA4, DNA3-4, DNA21, DNA21-18, DNA22 und DNA22-20 (links), sowie DNA4, DNA3-4, DNA17, DNA17-18, DNA19 und DNA19-20 (rechts). 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20  $^{\circ}$ C.

Ähnlich stark ausgeprägte excitonische Wechselwirkungen wurden auch bei Duplexen DNA17-18 und DNA19-20 festgestellt (Abbildung 4-24, rechts). Wider Erwartens führen die excitonischen Wechselwirkungen auch bei DNA21-18 und DNA22-20 nicht zu einer typischen Dimeremission (Abbildung 4-25). Wie schon bei DNA17, DNA17-18, DNA19 und DNA19-20 ist auch mit DNA-Duplexen, in denen ein Thiazol Orange, das über den Chinolin-Stickstoff eingebaut worden ist (TO'), hauptsächlich eine Emissionslöschung zu beobachten.

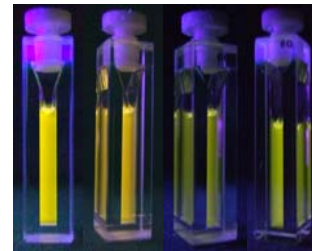
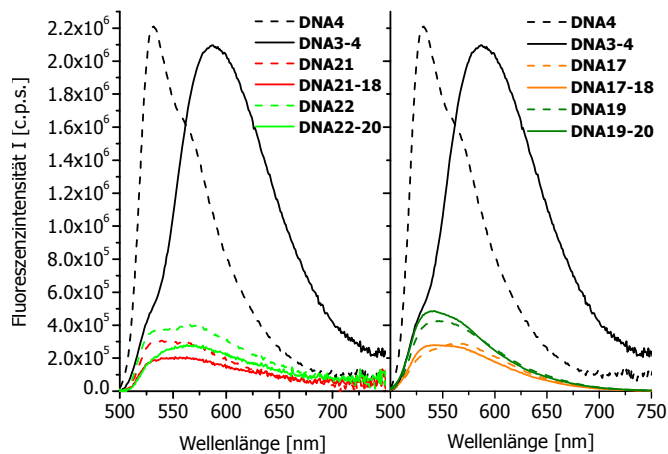


Abbildung 4-25: Emissionsspektren von DNA4, DNA3-4, DNA21, DNA21-18, DNA22 und DNA22-20 (links), sowie DNA4, DNA3-4, DNA17, DNA17-18, DNA19 und DNA19-20 (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA21-18, DNA22-20, DNA17-18 und DNA19-20. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Sowohl die Einzelstränge DNA21 und DNA22, als auch die entsprechenden Duplexe zeigen breite, aber sehr schwache Emissionsbanden. Das Maximum scheint dennoch mit ungefähr 560 nm leicht bathochrom verschoben zu sein, im Vergleich zur monomeren Thiazol-Orange-Emission. Dies könnte auf die antiparallele Anordnung der Chromophore zurückzuführen sein. Diese Beobachtung lässt sich auch mit dem Auge feststellen, denn die DNA-Lösungen, angeregt mit einer UV-Lampe, zeigen eine gelbe Farbe (Abbildung 4-25, Foto). Die Farbe der DNA-Lösungen von DNA17-18 und DNA19-20 ist grün. Auf dem Foto erscheinen die Emissionsfarben von DNA21-18 und DNA22-20 sehr hell, dies stünde in Kontrast zu den gemessenen Emissionsspektren. Daher ist auch hier wichtig zu erwähnen, dass die Intensität, die auf den Fotos zu sehen ist, abhängig ist von der Position der Küvette zur UV-Lampe und auch von den Einstellungen des Fotoapparats.

Die Schmelztemperaturen der Duplexe sind durchweg kleiner als die des Referenzduplexes DNA3-4 und der entsprechenden Duplexe zur Evaluation des Einflusses der Gegen- und Nachbarbasen. Sie betragen lediglich 59.5 °C und 69.4 °C, wohingegen alle zuvor diskutierten Duplexe eine Schmelztemperatur zwischen 66.3 °C und 72.7 °C aufweisen. Es scheint, dass der Einbau zweier Thiazol-Orange-Chromophore in denselben Strang die DNA-Helix in ihrer Stabilität stört und dass dies

nur mäßig durch die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren ausgeglichen werden kann. Die Fluoreszenz der Duplexe ist leider so gering, dass die Aussagekraft der  $R_{FI}$ -Werte nur als gering einzuschätzen ist. Sie bewegen sich in einem Bereich, der weder dem charakteristischen Monomerwert ( $<1.0$ ) noch dem Dimerwert ( $>2.0$ ) zuzuordnen ist.

Tabelle 4-5: Charakteristische Daten der Duplexe DNA3-4, DNA17-18, DNA19-20, DNA21-18 und DNA22-20. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{exc} = 490$  nm, 20 °C.

DNA	$FI_{max}/nm$	$R_{FI} (FI_{533nm}/FI_{585nm})$	$T_m/^\circ C [260\text{ nm}]$
<b>DNA3-4</b>	585	0.15	69.4
<b>DNA17-18</b>	546	1.20	60.5
<b>DNA19-20</b>	542	1.44	65.0
<b>DNA21-18</b>	558	1.08	59.5
<b>DNA22-20</b>	564	0.80	66.4

Wie bereits gezeigt, weist DNA3-4 einen sehr stark ausgeprägten negativen Cotton-Effekt bei 540 nm auf, gefolgt von einem Nulldurchgang bei 510 nm, dies entspricht dem Absorptionsmaximum der Dimerabsorptionsschulter. Zusammen mit dem intensiven positiven Cotton-Effekt bei 486 nm wird deutlich, dass die antiparallele Anordnung beider Thiazol-Orange-Chromophore zu einer negativen Chiralität beider Dipolmomente führt.

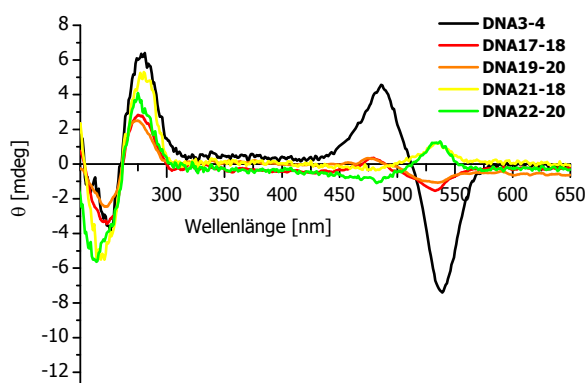


Abbildung 4-26: CD-Spektren der Duplexe DNA3-4, DNA17-18, DNA19-20, DNA21-18 und DNA22-20. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Ebenso bilden die Dipolmomente der Dimere in DNA21-18 und DNA22-20 eine negative Chiralität, ersichtlich anhand der Vorzeichenabfolge der CD-Signale. Die CD-Signale von DNA21-18 und DNA22-20 sind jedoch wesentlich schwächer als das CD-Signal von DNA3-4, zeigten aber gleichfalls einen langwelligeren negativen und einen kurzwelligeren positiven Cotton-Effekt. Dies deutet auf eine antiparallele Anordnung beider Chromophore in der kleinen Furche hin. DNA17-18 und DNA19-20 zeigen einen langwelligeren positiven und einen kurzwelligeren negativen Cotton-Effekt und dadurch inverse CD-Signale im Vergleich zu DNA21-18 und DNA22-20. Es zeigt sich ein Unterschied von paralleler und antiparalleler Anordnung beider Chromophore nicht nur in veränderten optischen Eigenschaften wie Fluoreszenz und Absorption, sondern auch in den CD-Spektren. Eine weitere wichtige Beobachtung ist die geringe Intensität der CD-Signale von DNA17-18, DNA19-20, DNA21-18 und DNA22-20. Betrachtet man die CD-Signalintensität der excitonisch gekoppelten Chromophore als eine Funktion von  $\sin(2\theta)$ , ( $\theta$  = Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten), so sind die geringsten Signalintensitäten bei Winkeln von  $\theta = 0^\circ$ ,  $90^\circ$  und  $180^\circ$  zu erwarten.<sup>[202]</sup> Die sehr niedrigen CD-Signalintensitäten deuten auf ein planares und geringfügig helikal verdrehtes Arrangement der Übergangsdipolmomente hin. Im Gegensatz dazu konnten bei der Evaluation der Basenumgebung des Dimers grundsätzlich starke CD-Signale beobachtet werden, was darauf hin deutet, dass die Übergangsdipolmomente der Chromophore nicht nur antiparallel, sondern auch deutlich helikal verdreht zueinander stehen müssen.

Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass ein Einbau des zusätzlichen Thiazol Oranges über seinen Chinolinstickstoffs tatsächlich zu einer antiparallelen Anordnung der Chromophore führt, da eine gelbe, wenn auch sehr schwache Emissionsfarbe zu beobachten ist und eine entsprechende Vorzeichenabfolge der Cotton-Effekte in den CD-Spektren. Die Emissionen sind jedoch stark gelöscht; dies könnte daran liegen, dass sich beide Chromophore im selben DNA-Strang befinden und sich dadurch nicht gegeneinander verdrehen können, so dass ein Winkel zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten entsteht. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Winkel der Übergangsdipolmomente ungefähr  $180^\circ$  aufweisen, da so die Intensität der CD-Signale nahezu null wird (vergleiche Kapitel 4.7). Die Strategie, einen Chromophor über seinen Chinolin-Stickstoff in DNA einzubauen und dadurch eine antiparallele Anordnung der Übergangsdipolmomente zu erzwingen, hat zwar zu

einer Emissionsverschiebung geführt, nicht jedoch zu einer analytischen Nutzbarkeit des Chromophorenpaars, da die Quantenausbeuten von <10 % viel zu gering sind.

#### **4.4 „Split Probes“**

Beide Thiazol-Orange-Chromophore scheinen trotz ihrer positiven Ladung relativ starke  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen auszubilden. So steigt die Schmelztemperatur eines Duplexes, der zwei TO als diagonales Basenpaar enthält, gegenüber einem unmodifizierten Duplex, deutlich an (vergleiche Kapitel 4). Um zu klären, ob diese intensiven hydrophoben Wechselwirkungen ausreichen, mit den sogenannten „Split Probes“ Basenfehlpaarungen zu detektieren, wurde die kovalente Bindung zwischen beiden Chromophoren in DNA17-18 eliminiert.

Das „Split Probe“ System („split“ aufgrund der Trennung der kovalenten Verknüpfung beider Chromophore) wurde bereits erfolgreich bei dem excimerbildenden Chromophor Pyren angewandt.<sup>[225]</sup> Beide Farbstoffe sollen durch die Ausbildung starker  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen einen Dimerkomplex ausbilden, der zur Detektion von Basenfehlpaarungen oder Basendeletionen genutzt werden soll. Durch das Hybridisieren unterschiedlich langer Gegenstränge DNA24 bis DNA28 wird die Distanz zwischen den Chromophoren variiert und die Auswirkungen auf die optischen Eigenschaften untersucht.

<b>DNA23a:</b>	3'-CAG-TCA-GT <b>TO TO</b> -GAC-GTA-CG-5'	<b>DNA23b</b>
<b>DNA24:</b>	5'-GTC-AGT-CA--T-A-T--CTG-CAT-GC-3'	(N+1)
<b>DNA25:</b>	5'-GTC-AGT-CA--T----T--CTG-CAT-GC-3'	(N+0)
<b>DNA26:</b>	5'-GTC-AGT-CA--T-----CTG-CAT-GC-3'	(N-1)
<b>DNA27:</b>	5'-GTC-AGT-CA-----CTG-CAT-GC-3'	(N-2)
<b>DNA28:</b>	5'-GTC-AGT-CA-----TG-CAT-GC-3'	(N-3)

Die Synthese von DNA23a kann standardmäßig von C-3' nach C-5' am Automaten durchgeführt werden, ohne die Notwendigkeit besonderer Vorgehensweisen. Die Synthese von DNA23b kann nicht standardmäßig durchgeführt werden. Es muss ein

speziell präpariertes CPG verwendet werden, das die Anknüpfung eines Thiazol Oranges an der 3'-Position des Oligonukleotids ermöglicht. Dies konnte mittels eines *Universal CPGs* der Firma Prologo ermöglicht werden (Vergleiche dazu Kapitel 9.3).

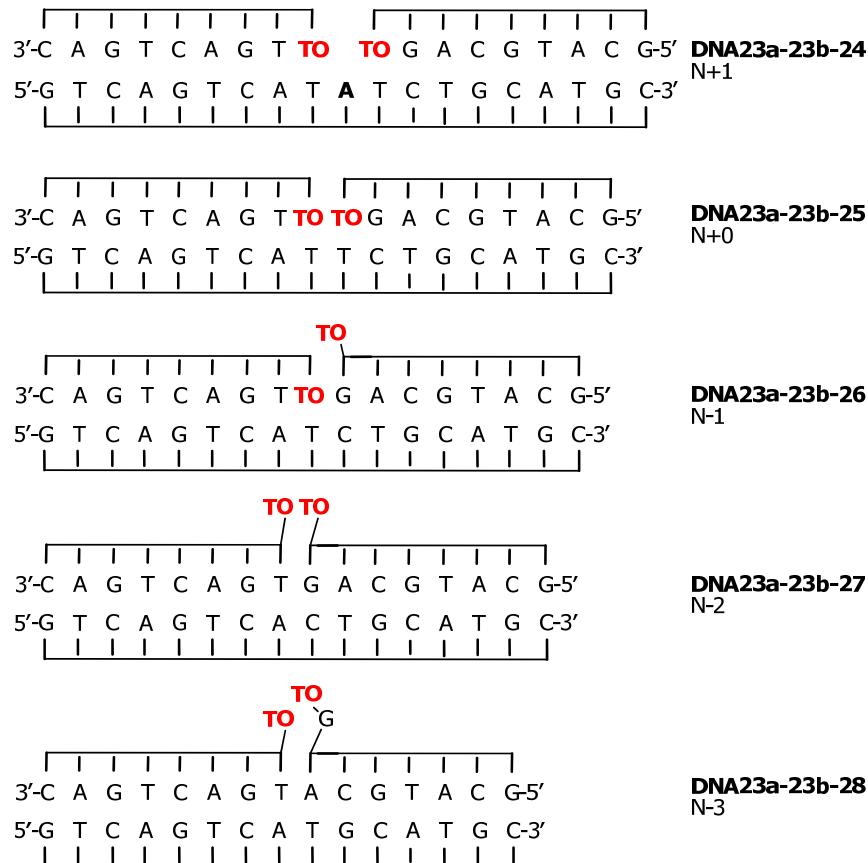


Abbildung 4-27: Schematische Darstellung der Duplexe DNA23a-23b-24 bis DNA23a-23b-28.  
N = Gesamtbasenanzahl inklusive beider Thiazol-Orange-Chromophore.

Abbildung 4-27 veranschaulicht, wie sich die Duplexe mit den unterschiedlichen Gegensträngen verändern. Durch den Gegenstrang DNA24 wird zunächst eine Base zusätzlich eingefügt (A, zwischen beiden Thiazol-Orange-Chromophoren), dann aber wird der Gegenstrang sukzessive um eine Base verkürzt, so dass beide Chromophore sich räumlich nähern müssen. N entspricht hierbei der Basenanzahl, die notwendig ist, um für jede Base des mit Thiazol Orange markierten Einzelstranges eine Gegenbase zu Verfügung zu stellen. Dabei wurden beide Chromophore mit berücksichtigt und Thymin als Gegenbase gewählt.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 4-28) der Einzelstränge DNA23a und DNA23b zeigt die Feinstruktur des Thiazol-Orange-Monomers, mit einem Maximum bei 507 nm und einer Schulter bei 490 nm. Nach der Hybridisierung mit den verschiedenen Gegensträngen ändern sich die Absorptionsspektren drastisch. Zunächst steigen alle Intensitäten an, wie es für die doppelte Anzahl absorbierender Moleküle erwartet würde. DNA23a-23b-24 und DNA23a-23b-25 weisen Maxima bei 490 nm und Schultern bei 510 nm, was auf eine Wechselwirkung beider Chromophore untereinander hindeutet. Dabei zeigt DNA23a-23b-25 eine deutlichere Dimerabsorption als DNA23a-23b-24. Beide Chromophore interagieren also am effektivsten miteinander, wenn ein Gegenstrang zu Verfügung gestellt wird, der genau so viel Basen aufweist, wie Basen in den markierten Strängen vorhanden sind, inklusive beider Chromophore.

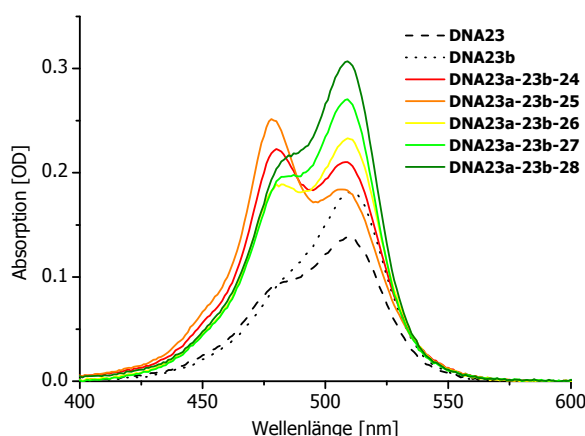


Abbildung 4-28: Absorptionsspektren von DNA23a, DNA23b und den Duplexen DNA23a-23b-24 bis DNA23a-23b-28. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

DNA23a-23b-26, DNA23a-23b-27 und DNA23a-23b-28 zeigen Absorptionen des monomeren Thiazol Oranges. DNA23a-23b-28 zeigt dabei die höchste Absorptionsintensität. Je mehr Basen von der Gesamtbasenanzahl N abgezogen werden, desto weniger interagieren beide Thiazol-Orange-Chromophore miteinander; das wird durch monomeres Absorptionsverhalten deutlich.

Dies spiegelt sich auch in den Fluoreszenzspektren (Abbildung 4-29) wider. Alle Duplexe weisen Emissionen auf, die der eines monomeren Thiazol Oranges gleichen. Die Duplexe, die im Absorptionsspektrum excitonische Wechselwirkungen zeigten (DNA23a-23b-24 und DNA23a-23b-25), weisen im Fluoreszenzspektrum lediglich eine



Löschung auf. Dies zeigt erneut, dass excitonische Wechselwirkungen nicht automatisch zu Emissionsverschiebungen führen, sondern es auch zu einer Fluoreszenzlöschung im Emissionsspektrum kommen kann.

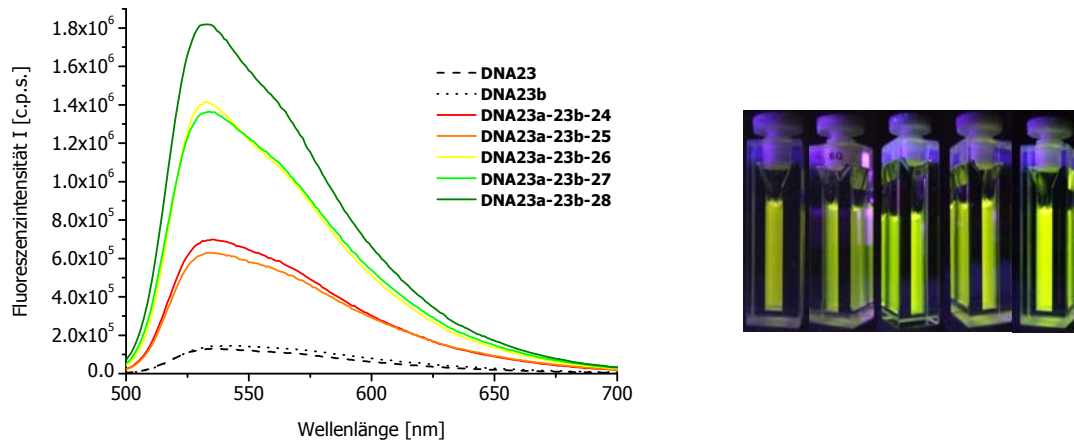


Abbildung 4-29: Emissionsspektren von DNA23a, DNA23b und den Duplexen DNA23a-23b-24 bis DNA23a-23b-28.  $2.5 \mu\text{M}$  DNA,  $10 \text{ mM NaP}_i$ , pH 7,  $250 \text{ mM NaCl}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ ,  $20^\circ\text{C}$ . Foto von links nach rechts: DNA23a-23b-24, DNA23a-23b-25, DNA23a-23b-26, DNA23a-23b-27, DNA23a-23b-28.  $2.5 \mu\text{M}$  DNA,  $10 \text{ mM NaP}_i$ , pH 7,  $250 \text{ mM NaCl}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Die höchste Emissionsintensität zeigt der Duplex, der den kürzesten Gegenstrang aufweist (DNA23a-23b-28). Das bedeutet, dass beide TO-Chromophore nicht mehr miteinander interagieren, sondern, dass sich einer der beiden Farbstoffe aus dem Doppelstrang herauswindet und sich an die kleine Furche legt. Dadurch kommt es zu einem Anstieg des monomeren Fluoreszenzsignals. Die  $R_{\text{FI}}$ -Werte liegen zwischen 1.34 für DNA23a-23b-24 und 1.98 für DNA23a-23b-28 und damit deutlich in einem typischen monomeren Bereich. Werden die DNA-Lösungen mit einer UV-Lampe angeregt, wird dies auch für das Auge sichtbar. Alle Lösungen emittieren grünes Licht. Duplex DNA23a-23b-28 weist die kleinste Schmelztemperatur auf ( $48.4^\circ\text{C}$ , Tabelle 4-6). Erstaunlicherweise besitzt DNA23a-23b-27 mit  $54.4^\circ\text{C}$  die höchste Schmelztemperatur, dies war so nicht zu erwarten. Dieser Duplex ist weder der längste, noch könnten die hydrophoben Wechselwirkungen beider Thiazol-Orange-Chromophore eine Auswirkung auf die Stabilität haben. Wie man im Absorptionsspektrum sehen kann, findet so gut wie keine Wechselwirkung statt. Dass die Schmelztemperaturen generell niedrig sind, liegt daran, dass im Vergleich zu

DNA17-18 die *Split Probes* aus Einzelsträngen bestehen und diese Konstruktion den Duplex zwangsläufig schwächen muss.

Tabelle 4-6: Charakteristische Daten der Duplexe DNA17-18 und DNA23a-23b-24 bis DNA23a-23b-28. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

DNA	FI <sub>max</sub> nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]
<b>DNA17-18</b>	546	1.20	60.5
<b>DNA23a-23b-24</b>	542	1.34	52.0
<b>DNA23a-23b-25</b>	538	1.49	50.0
<b>DNA23a-23b-26</b>	535	1.58	53.0
<b>DNA23a-23b-27</b>	534	1.63	54.5
<b>DNA23a-23b-28</b>	533	1.98	48.4

## 4.5 Thiazol Orange Chromophorenstapel in DNA

Durch den Mehrfacheinbau von organischen Fluorophoren in die DNA erhofft man sich, neuartige Systeme zu entwickeln, Basenfehlpaarungen nachzuweisen<sup>[226]</sup> oder optisch aktive Aggregate für die Nanotechnologie zu entwickeln.<sup>[227]</sup> Die Verstärkung und Modulation von Fluoreszenzeigenschaften<sup>[228]</sup>, vor allem der Wunsch nach helleren Sonden, spielen dabei eine wichtige Rolle.<sup>[229, 230]</sup> Chromophore können dabei in zwei unterschiedlichen Anordnungen an die DNA gebunden werden. Entweder werden sie an den Duplex gebunden, so dass sie sich außerhalb aneinander reihen, oder sie werden in den Basenstapel integriert und bilden  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu den Basen aus. In beiden Fällen dient DNA als Rückgrat zur sukzessiven Anordnung der Chromophore. Es wurden Chromophorenstapel aus Methyl Red<sup>[167]</sup>, Pyren<sup>[114, 226, 231]</sup>, Biphenyl<sup>[232]</sup>, Phenothiazin<sup>[228]</sup> und Perylenbisimid<sup>[119]</sup> untersucht.

Um herauszufinden, inwieweit Thiazol Orange für solche Chromophorenstapel geeignet ist, wurden folgende DNA-Sequenzen synthetisiert:

**DNA29:** 3'-CAG-TCA-**TO**TA-TAT-GTA-CG-5'

**DNA30:** 5'-GTC-AGT-T**TO**T-ATA-CAT-GC-3'

DNA29-30 dient als Referenzduplex, der das Thiazol-Orange-Dimer enthält. Die nachfolgenden Duplexe enthalten jeweils ein Thiazol Orange mehr.

**DNA31:** 3'-CAG-TCA-**TOTTO**-TAT-GTA-CG-5'

**DNA30:** 5'-GTC-AGT--**TOT**--ATA-CAT-GC-3'

**DNA31:** 3'-CAG-TCA-**TOTTO**--AT-GTA-CG-5'

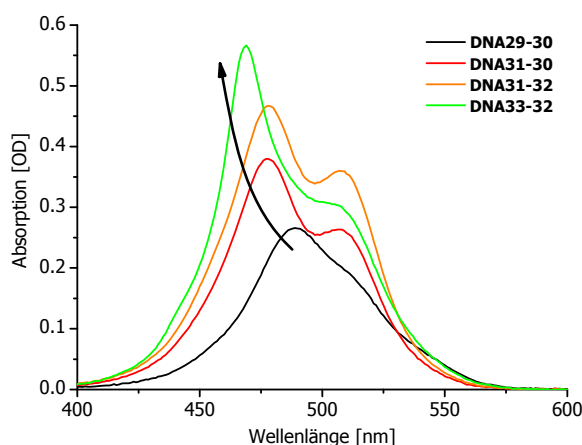
**DNA32:** 5'-GTC-AGT--**TOTTO**-TA-CAT-GC-3'

**DNA33:** 3'-CAG-TCA-**TOT** AT**TOT**-GTA-CG-5'

**DNA32:** 5'-GTC-AGT--**TOTTO**TA-CAT-GC-3'

Im Gegensatz zum Arrangement bei DNA31-32, werden durch die Versetzung des vierten Thiazol Oranges um eine weitere Base in 5'-Richtung, beide Thiazol-Orange-Dimere voneinander separiert.

In Abbildung 4-30 sind die Absorptionsspektren der Duplexe abgebildet. Es ist mit jedem zusätzlichen Thiazol Orange eine Zunahme der Absorptionsintensität zu verzeichnen, wie es zu erwarten war.



Abbildungung 4-30: Absorptionsspektren der Duplexe DNA29-30, DNA31-30, DNA31-32 und DNA33-32. 2.5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Grundsätzlich lässt sich folgendes feststellen: je höher die Anzahl der Thiazol-Orange-Chromophore im Duplex, desto stärker der hypsochrome Shift. Dies ist ein charakteristisches Merkmal eines Absorptionsspektrums von H-Aggregaten.<sup>[167]</sup>

Im Fluoreszenzspektrum (Abbildung 4-31) zeigt nur DNA29-30 die charakteristische Emission des Thiazol-Orange-Dimers. Sobald sich ein zusätzlicher Chromophor im Duplex befindet (DNA31-30), ist nur noch ein Emissionsmaximum bei 563 nm zu verzeichnen, dies entspricht einer gelben Emissionsfarbe.

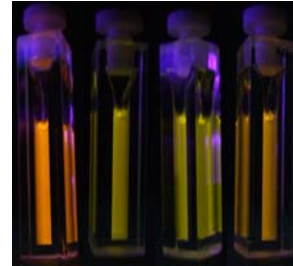
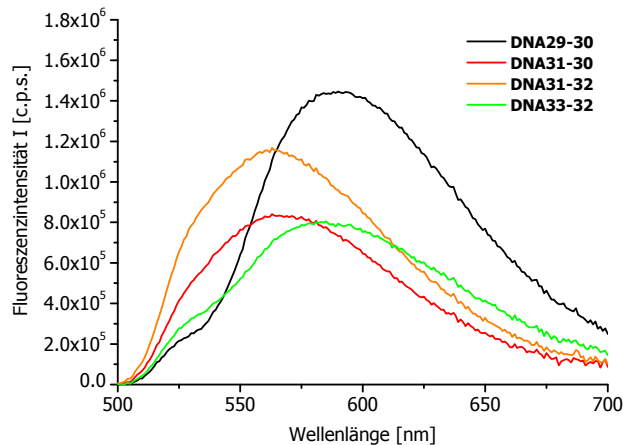


Abbildung 4-31: Emissionsspektren der Duplexe DNA29-30, DNA31-30, DNA31-32 und DNA33-32. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490$  nm, 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA29-30, DNA31-30, DNA31-32 und DNA33-32. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt durch eine herkömmliche UV-Lampe.

DNA31-30 und DNA31-32 unterscheiden sich nur durch unterschiedliche Emissionsintensitäten, die Gestalt der Emissionsbanden ist in beiden Fällen nahezu gleich. DNA33-32 hingegen zeigt ein Maximum von 583 nm und eine orangefarbene Emission, dies entspricht der Dimerfluoreszenz; allerdings ist die Fluoreszenzintensität deutlich geringer als die von DNA29-30. Diese Unterschiede lassen sich auch mit bloßem Auge erfassen (Abbildung 4-31, Foto). DNA31-30 und DNA31-32 zeigen eine gelbe Emissionsfarbe, DNA33-32 fluoresziert orange. Erwähnenswert ist auf jeden Fall, dass alle Duplexe eine Fluoreszenz aufweisen. Dies war für H-Aggregate so nicht zu erwarten.

Im CD-Spektrum wird deutlich, dass alle Duplexe eine B-DNA ausbilden, da alle Signale einen Nulldurchgang bei ungefähr 260 nm aufweisen. DNA29-30 weist ein sehr starkes CD-Signal im Bereich von 550 nm bis 450 nm auf. Dies wurde bei DNA3-4 ebenfalls beobachtet und war so zu erwarten. DNA31-30 und DNA31-32 zeigen hingegen kein oder nur ein sehr schwaches CD-Signal.

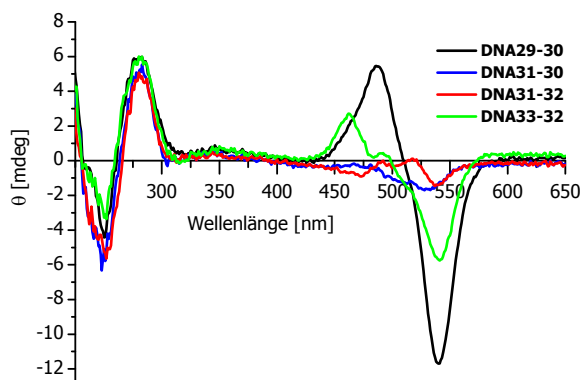


Abbildung 4-32: CD-Spektren der Duplexe DNA29-30, DNA31-30, DNA31-32 und DNA33-32. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20  $^{\circ}\text{C}$ .

Diese schwachen CD-Signale zeigen, dass die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren entweder sehr schwach ausgebildet sind, weil die Chromophore sich gegenseitig stören oder dass sich die Übergangsdipolmomente fast nicht helikal zueinander verdrehen. Interessanterweise zeigt DNA33-32 wieder ein stärkeres CD-Signal, dieses unterscheidet sich aber deutlich von dem, das bei DNA29-30 zu beobachten ist. Es zeigt eine kleine positive Schulter bei 490 nm und ein deutlich hypsochrom verschobenes Maximum bei 462 nm, im Vergleich zu DNA29-30. Es wird deutlich, dass die vier Thiazol-Orange-Chromophore miteinander excitonische Wechselwirkungen ausbilden, diese jedoch nicht einfach die Summe zweier Dimere darstellen, sondern die oben gezeigten optischen Eigenschaften das Resultat einer alternativen Chromophoranordnung sind.

Die spektroskopischen Untersuchungen eines sukzessiven Aufbaus des Chromophorenstapels aus Thiazol Orange hat ergeben, dass keine stärkere Helligkeit der Oligonukleotidsonde durch Erhöhung der Chromophorenanzahl im DNA-Duplex zu erreichen ist. Die Thiazol-Orange-Farbstoffe verhalten sich also im Emissionsspektrum nicht additiv, sondern es kommt durch zusätzliche benachbarte Chromophore zu alternativen Wechselwirkungen und damit zu unerwünschter Fluoreszenzlöschung und einer Minderung der CD-Signalintensität. Bei genauerer Untersuchung der vorliegenden spektroskopischen Daten wird jedoch deutlich, dass auch zwischen den zusätzlichen Farbstoffmolekülen eine Wechselwirkung stattfindet

(DNA33-32). Das CD-Signal weist signifikant veränderte Maxima, Minima und Nulldurchgang auf.

Auch die Schmelztemperaturen der Duplexe weisen auf zusätzliche, aber andersartige Wechselwirkungen der Chromophore hin (Tabelle 4-7). Duplex DNA29-30 zeigt eine Schmelztemperatur von 58.5 °C, die Duplexe DNA31-30 und DNA31-32 hingegen sind thermisch instabiler mit Schmelztemperaturen von 56.1 °C bzw. 50.6 °C, begleitet jeweils von einem zweiten Übergang bei 72.1 °C bzw. 70.1 °C, der durch die Dissoziation der Chromophore zustande kommen könnte.

Tabelle 4-7: Charakteristische Daten der Duplexe DNA29-30, DNA31-30, DNA31-32 und DNA33-32. 2.5 µM DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>DNA29-30</b>	590	0.19	58.5	58.0
<b>DNA31-30</b>	563	0.70	56.1 / 72.1	53.5
<b>DNA31-32</b>	563	0.83	50.6 / 70.1	48.0
<b>DNA33-32</b>	585	0.43	59.0	54.0

DNA33-32 zeigt eine Schmelztemperatur von 59.0 °C und damit einen ähnlichen Wert wie DNA29-30. Bei einer ausreichenden räumlichen Trennung beider Chromophorpaare scheint eine Störung der Wechselwirkungen verhindert werden zu können und beide Paare sorgen durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen für gute Stabilitäten der DNA-Duplexe. Da sich aber weder im Absorptionsspektrum noch im Fluoreszenzspektrum eine doppelte Intensitätshöhe abzeichnet, sondern eine deutlichere hypsochrome Verschiebung des Maximums im Absorptionsspektrum und sogar eine reduzierte Emissionsintensität, liegt die Vermutung nahe, dass in DNA33-32 das zweite Chromophorenpaar in 3'-5'-Richtung sich vom ersten Paar unterscheiden muss. Geometrisch optimierte Modelldarstellungen (Abbildung 4-33) der jeweiligen Thiazol-Orange-Paare lassen vermuten, dass es zu unterschiedlichen Anordnungen der Chromophoren kommt. Im Modell werden folgende DNA-Duplexe miteinander verglichen:

**DNA3:** 3'-CAG-TCA-**A-T**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT-**T-T**OA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA77:** 3'-CAG-TCA-**T-T**OT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA78:** 5'-GTC-AGT-**T-T**OA-CTG-CAT-GC-3'

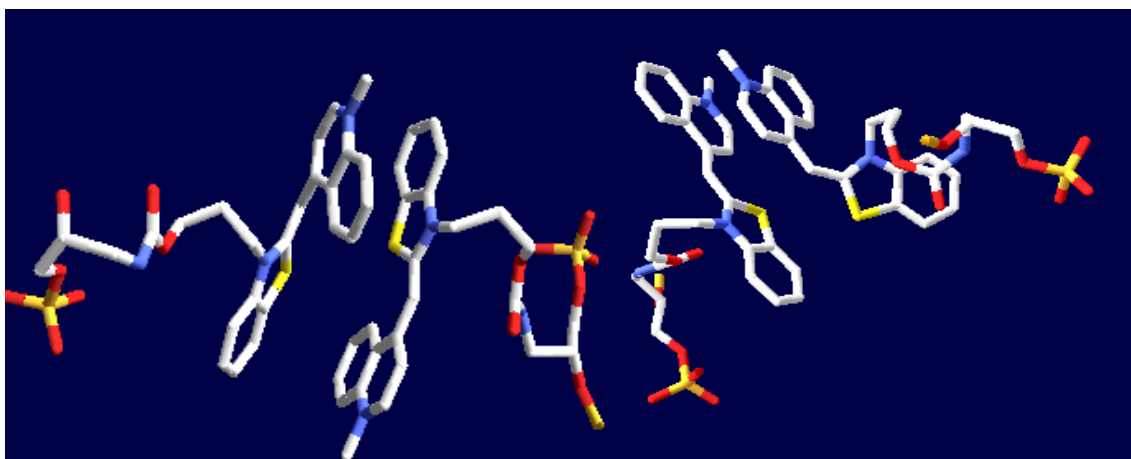


Abbildung 4-33: Geometrisch optimierte Modelldarstellung beider Thiazol-Orange-Chromophore in DNA3-4 (links) und DNA77-78 (rechts).

Die roten Pfeile sollen auf die unterschiedlichen Anordnungen beider Chromophorenpaare in den Duplexen hinweisen. Auf der Basis der Modelle scheint es, dass sich bei DNA73-74 die Chromophore nicht antiparallel anordnen, sondern parallel. Es stehen sich die Chinolinteile beider Chromophore gegenüber, wohingegen die Benzothiazolteile gar nicht miteinander zu wechselwirken scheinen. Diese parallele Anordnung hat schon bei DNA17-18 (siehe Kapitel 4.3.1) zu keiner Emissionsmaximumsverschiebung, sondern hauptsächlich zu einer Fluoreszenzlöschung geführt. Trotz des größeren Abstandes beider Dimerpaare voneinander in DNA33-32 scheint die räumliche Distanz noch immer nicht auszureichen, um eine gegenseitige Beeinflussung beider Chromophorenpaare voneinander zu verhindern. Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren scheinen also alle möglichen Wechselwirkungen der Thiazol-Orange-Moleküle untereinander widerzuspiegeln. Eine genauere Auflösung dieses Phänomens, z.B. durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, konnte im Rahmen der Promotionszeit nicht mehr bewerkstelligt werden. Es wurde der Fokus bevorzugt auf die Anwendbarkeit der Dimerbildung für

analytische Zwecke gelegt und darauf hingearbeitet, für dieses Phänomen eine photophysikalische Erklärung zu finden.

## 4.6 Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie

### 4.6.1. Einführung

Die *pump-probe*-Spektroskopie ermöglicht es, die Absorption von sehr kurzlebigen Zuständen zu messen. Durch die Zeitauflösung können Absorptions- und Relaxationsprozesse verfolgt werden und Rückschlüsse auf die tatsächlichen Vorgänge zwischen Molekülen während der Anregung gezogen werden. Die zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie ist im technischen Aufbau sehr viel aufwendiger als die stationäre Absorptionsspektroskopie. Durch einen kurzen Laserpuls der entsprechenden Wellenlänge wird der zu untersuchende Chromophor angeregt (*pump*). Durch weitere Laserpulse (*probe*) in definierten Abständen wird der elektronische Zustand des Chromophors zeitabhängig abgefragt.

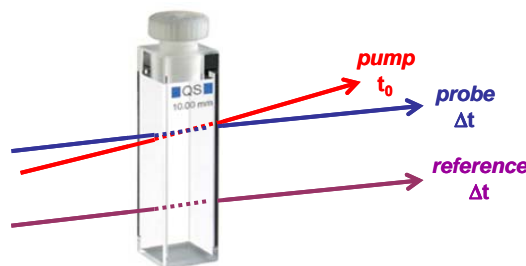


Abbildung 4-34: Schematische Darstellung einer zeitaufgelösten Transientenabsorptionsmessung.

Die durch den *pump*-Puls entstandenen intermediären Zustände können durch die Absorption des *probe*-Pulses detektiert werden. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde die Abfrage mit einem Weißlichtkontinuum durchgeführt, so kann das gesamte Spektrum zwischen 300 nm und 750 nm detektiert werden, das dann natürlich noch zeitkorrigiert werden muss.

1. Liegt der Abfragepuls außerhalb der Fluoreszenzbande, so kann die Besetzungswahrscheinlichkeit jedes beliebigen intermediären Zustands ermittelt werden.



2. Liegt der Abfragepuls innerhalb der Fluoreszenzbande, kommt es zur stimulierten Emission. Dadurch lässt sich die Entvölkerungsrate des angeregten Zustandes  $S_I$  ermitteln.
3. Liegt der Abfragepuls im Bereich der Grundzustandsabsorption, so lässt sich die Rückpopulation des Grundzustandes ermitteln.

Abhängig vom beobachteten Prozess, der Absorption, der stimulierten Emission oder Grundzustandsbleichung, können die Messsignale positiv oder negativ sein.

#### 4.6.2. Messungen

Um die Unterschiede zwischen monomerem und dimerem Thiazol Orange weiter zu untersuchen und den photophysikalischen Grund der Emissionsverschiebung des TO-Dimers im Vergleich zum Monomer zu erforschen, wurden DNA3-2, DNA3-4 und DNA17-18 zeitaufgelöst spektroskopiert.

Alle drei Duplexe wurden mit einem *pump*-Puls von 515 nm angeregt. Dabei sind bei allen drei Duplexen jeweils drei Prozesse zu beobachten:

- (i) bei  $\sim 370$  nm ist die Absorption des angeregten Zustandes zu beobachten, durch die fortwährende Anregung durch den *pump*-Puls ist das Signal positiv.
- (ii) im Bereich von 450 nm bis 550 nm ist die Depopulation des Grundzustandes zu beobachten (*Groundstate Bleaching*). Die Absorption des Grundzustandes hat durch die Anregung abgenommen, es ist daher ein negatives Signal zu verzeichnen.
- (iii) bei  $\sim 550$  nm bis  $\sim 600$  nm ist die stimulierte Emission zu beobachten. Dabei ist die Depopulation des  $S_I$ -Zustandes zu sehen, es entsteht daher ein negatives Signal.

Die Absorption des angeregten Zustandes bei  $\sim 370$  nm ist bei allen drei Duplexen ähnlich. Die aussagekräftigsten Unterschiede sind im Bereich der Grundzustandsbleichung und der stimulierten Emission zu beobachten. DNA3-2 zeigt die Depopulation des Grundzustandes bei 510 nm, dies entspricht dem Absorptionsmaximum des Thiazol-Orange-Monomers. DNA3-4 hingegen zeigt eine

Grundzustandsbleichung bei 490 nm, was die charakteristische Absorptionswellenlänge des Dimers ist. Zusätzlich ist die folgende Beobachtung wichtig: Das Signal der Grundzustandsbleichung entsteht augenblicklich mit der Anregung durch den *pump*-Puls. Das bedeutet, dass ein Grundzustand aus beiden Chromophoren angeregt wird. Das Thiazol-Orange-Dimer entsteht also nicht erst im angeregten Zustand eines oder beider Chromophore, sondern beide Chromophore aggregieren im Grundzustand und werden dann gemeinsam angeregt. Damit ist ganz deutlich geklärt: das Thiazol-Orange-Dimer ist kein Excimer.

DNA3-2 zeigt stimulierte Emission bei  $\sim 550$  nm. Bei DNA3-4 hingegen ist die Wellenlänge der stimulierten Emission leicht bathochrom nach  $\sim 600$  nm verschoben, dies entspricht ungefähr dem Emissionsmaximum des TO-Dimers. Die transiente Absorptionsspektroskopie zeigt also starke Unterschiede zwischen monomerem und dimerem Thiazol Orange.

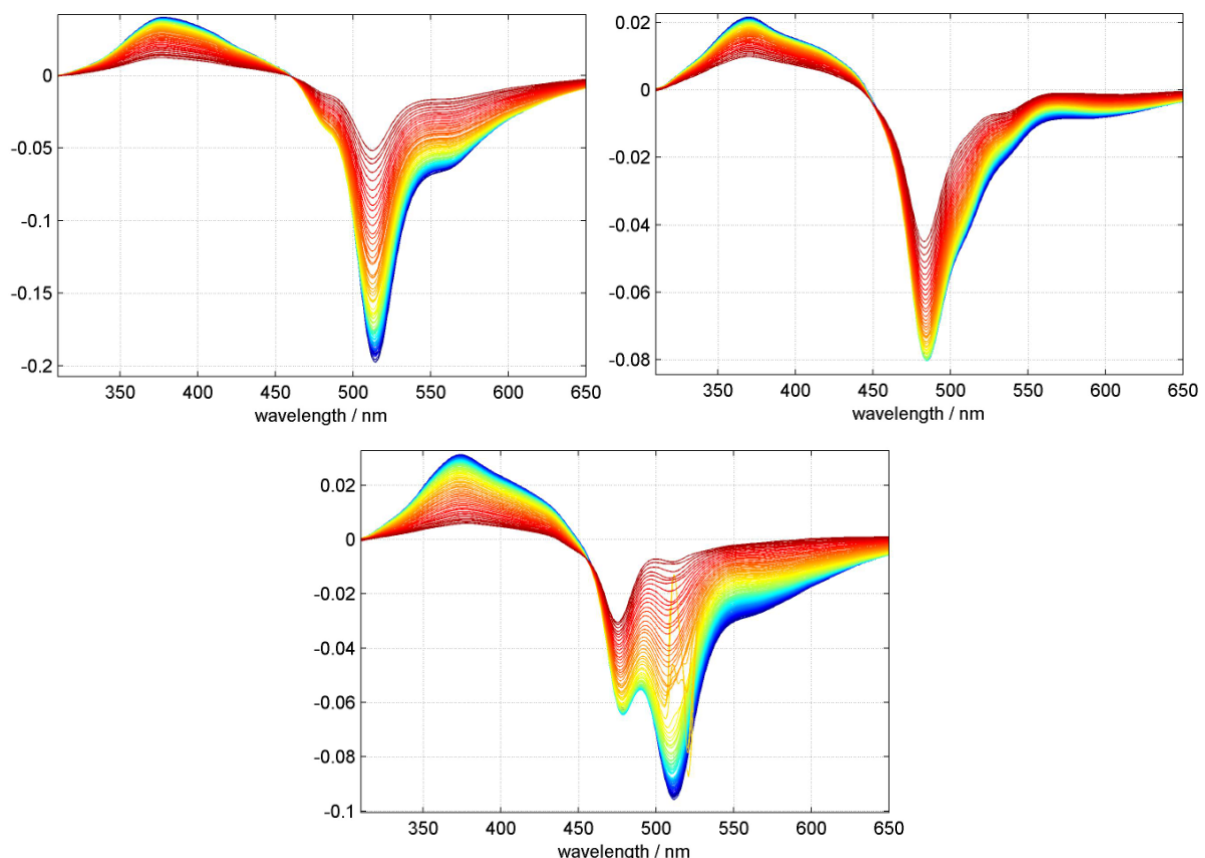


Abbildung 4-35: Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektren von DNA3-2 (oben, links, 0.2 mM DNA in 10 mM NaPi), DNA3-4 (oben, rechts, 0.05 mM DNA in 10 mM NaPi) und DNA17-18 (unten, 0.08 mM DNA in 10 mM NaPi).  $\lambda_{pump} = 515$  nm, dargestellt ist jeweils der Zeitabschnitt von 5 ps (blau) bis 1800 ps (rot), Y-Achse in  $\Delta OD$ .

Interessanterweise ist das zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektrum von DNA17-18 eine Kombination aus den zuvor beschriebenen Beobachtungen. Es ist eine Grundzustandsbleichung sowohl bei 475 nm als auch bei 510 nm zu beobachten. Dies entspricht sowohl dem Absorptionsmaximum der excitonischen Wechselwirkungen des Intrastrang-Dimers als auch dem des Thiazol-Orange-Monomers. Die stimulierte Emission ist relativ breit, jedoch bei ungefähr 550 nm zu beobachten. Dies entspricht ungefähr dem Emissionsmaximum des Thiazol-Orange-Monomers. Dieses Spektrum deutet darauf hin, dass sich das Thiazol-Orange-Dimer nicht vollständig mit einer parallelen Anordnung der Übergangsdipolmomente ausbildet.

#### ***4.7 Excimere oder fluoreszente H-Aggregate***

Das Thiazol-Orange-Dimer zeigt charakteristische Emissionseigenschaften:

1. bathochrome Wellenlängenverschiebung im Vergleich zum Thiazol-Orange-Monomer (von 530 nm zu 585 nm),
2. Verlust der Signalfinstruktur,
3. verlängerte Lebenszeit des angeregten Zustands (von  $\tau = 1.55$  ns für DNA3-2 zu  $\tau = 2.83$  ns für DNA3-4).

Diese Emissionsmerkmale sind auf den ersten Blick typisch für Excimere. So war der erste Verdacht, dass es sich bei den TO-Dimeren um Excimere handelt, die erst im angeregten Zustand aggregieren und dabei diese Emissionseigenschaften zeigen. Um dies zu überprüfen, wurden zeitaufgelöste Experimente der transienten Absorptionsspektroskopie an einigen ausgewählten Duplexen durchgeführt (vergleiche Kapitel 4.6). Dabei hat sich jedoch herausgestellt, dass nicht zunächst die Monomere angeregt werden und diese dann im angeregten Zustand aggregieren, sondern schon ein Komplex aus beiden Chromophoren im Grundzustand angeregt wird. Das Dimer bildet sich also nicht erst im angeregten Zustand, sondern schon im Grundzustand, und ist damit nicht als Excimer zu bezeichnen.

Die Absorptionsspektren der Dimerduplexe zeigen jedoch deutlich excitonische Wechselwirkungen (Abbildung 4-4). Das Absorptionsmaximum ist im Vergleich zu

monomerem Thiazol Orange hypsochrom verschoben, was nach *Kasha's* Exciton-Theorie<sup>[171]</sup> an der *Davydov*-Aufspaltung<sup>[165, 166]</sup> excitonischer Systeme liegt. Hypsochrom verschobene Absorptionsbanden sind charakteristisch für sogenannte H-Aggregate, die jedoch keine Emission aufweisen (vergleiche Kapitel 3.4). Betrachtet man das Absorptionsspektrum von DNA3-4 jedoch genau, ist eine zusätzliche Absorptionsbande im langwelligeren Bereich zu sehen, die bei DNA3-2 nicht zu beobachten ist. DNA3-4 weist zwei Thiazol-Orange-Chromophore auf, wenn man daher das Absorptionsspektrum von DNA3-2 mit dem Faktor 2 multipliziert, um so ähnliche Intensitäten zu erreichen und dieses mit dem Spektrum von DNA3-4 vergleicht, wird die zusätzliche Absorptionsbande von DNA3-4 bei ungefähr 540 nm unübersehbar.

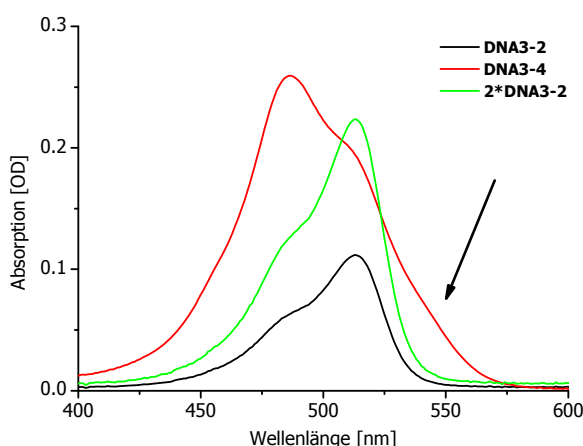


Abbildung 4-36: Absorptionsspektren von DNA3-2, DNA3-4 und berechnetes Absorptionsspektrum ( $2 \cdot \text{DNA3-2}$ ).

Sorgfältige Überprüfung der Literatur zeigt, dass *Würthner* und *Wortmann* 2006 fluoreszente H-Aggregate aus Merocyaninen publizierten, deren Emission sie auf eine zusätzliche, im langwelligeren Bereich auftretende Absorptionsbande zurück führten.<sup>[196]</sup> Dabei sind zwei Merocyanine so zueinander angeordnet, dass ihr Übergangsdipolmomente in entgegengesetzte Richtungen zeigen, also antiparallel. Die kleine zusätzliche Absorptionsbande kommt durch die Verdrehung beider Übergangsdipolmomente um  $10^\circ$  zustande. Eine geometrisch optimierte Modelldarstellung von DNA3-4 zeigt, dass beide Thiazol-Orange-Chromophore ebenfalls antiparallel aggregieren, daher sollten auch beide Übergangsdipolmomente

antiparallel zueinander stehen (Abbildung 4-7). Dass ebenfalls eine Verdrehung der Übergangsdipolmomente vorliegt, kann durch entsprechende CD-Spektren nachgewiesen werden. DNA3-4 zeigt bei 510 nm einen langwelligeren negativen und einen kurzwelligeren positiven Cotton-Effekt mit sehr starker Signalintensität (Abbildung 4-12). Das heißt zunächst, dass die Übergangsdipolmomente in negativer Chiralität vorliegen (vergleiche Kapitel 3.4). Die hohe Signalintensität zeigt deutlich, dass der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten nicht ca.  $0^\circ$ ,  $90^\circ$  oder  $180^\circ$  beträgt.<sup>[200, 201]</sup> Durch die helikale Architektur des DNA-Duplexes, die die excitonischen Wechselwirkungen der Chromophore erzwingt und zusätzlich eine rigide Anordnung der Chromophore bewirkt, und der antiparallelen und verdrehten Anordnung der Übergangsdipolmomente, wird laut *Kasha's Exciton Theorie* und den Resultaten von *Würthner* und *Wortmann* der verbotene Übergang in den niedrigeren excitonischen Zustand möglich. Die Population dieses Zustands ist im Absorptionsspektrum im langwelligeren Bereich ( $\sim 540$  nm) mit einer schwachen Bande zu sehen. Aus diesem niedrigeren Exciton-Zustand ist ein strahlender Übergang in den Grundzustand möglich, sichtbar durch strukturlose, bathochrom verschobene Fluoreszenz, wie sie beim Thiazol-Orange-Dimer auftritt. Es ist davon auszugehen, dass der Großteil der Elektronen weiterhin in den energetisch höher gelegenen Exciton-Zustand angeregt wird und nur ein kleiner Teil der Elektronen den niedrigeren Exciton-Zustand bevölkert. Das Thiazol-Orange-Dimer kann also als fluoreszentes H-Aggregat betrachtet werden. Fluoreszente H-Aggregate sind in der Literatur nahezu unbekannt, es gibt nur sehr wenige publizierte Beispiele, die oft nur unter extremen Bedingungen, wie gefrorenen Lösungen oder Einbettung in sogenannte Langmuir-Blodgett Schichten, beobachtet werden konnten.<sup>[187, 193]</sup> *Würthner* und *Wortmann* waren die ersten, die fluoreszente H-Aggregate in konzentrierten Lösungen präsentierten. Fluoreszente H-Aggregate in DNA sind unseres Wissens nach bisher unbekannt, das Thiazol-Orange-Dimer ist dafür ein einzigartiges Beispiel.

Im CD-Spektrum des parallelen und antiparallelen Dimers ist die unterschiedliche Anordnung der Übergangsdipolmomente beobachtbar. Die CD-Signale von DNA17-18 und DNA19-20 sind jeweils von entgegengesetzter Intensität im Vergleich zu DNA21-18 und DNA22-20 (Abbildung 4-26). Besonders interessant sind die geringen

Intensitäten der CD-Signale. Daraus lässt sich schließen, dass beide Chromophore nahezu perfekt übereinander liegen müssen und die jeweiligen Übergangsdipolmomente einen Winkel von ungefähr  $0^\circ$ ,  $90^\circ$  oder  $180^\circ$  einnehmen. Anhand der Fluoreszenzspektren von DNA17-18 und DNA19-20 konnte gezeigt werden, dass eine parallele Anordnung beider Chromophore zu einer Fluoreszenzlöschung führt. Diese ist jedoch nicht vollständig, denn die Lösungen zeigen eine geringe grüne Emissionsfarbe (Abbildung 4-25). In einer antiparallelen Anordnung der Chromophore ist zwar ebenfalls eine Fluoreszenzlöschung zu beobachten, die Lösungen zeigen aber immer noch eine schwache orangefarbene Emission und entsprechende optische Eigenschaften.

Für eine gute Quantenausbeute der TO-Dimere ist die Verdrehung der Übergangsdipolmomente notwendig, für eine bathochrome Verschiebung ist die antiparallele Anordnung der Dipolmomente essentiell.

Was ist also die strukturelle Voraussetzung zur Ausbildung fluoreszenter H-Aggregate?

1. ein stabiles DNA-Grundgerüst, um Chromophore in räumliche Nähe zueinander zu bringen und excitonische Wechselwirkungen zu erzwingen,
2. eine antiparallele Anordnung der Übergangsdipolmomente beider Chromophore und
3. eine helikale Verdrehung beider Übergangsdipolmomente, ohne die der eigentlich verbotene Übergang zum energetisch niedrigeren Exciton-Zustand nicht möglich ist.

Abbildung 4-37 gibt die schematische Darstellung des Zustandekommens fluoreszenter H-Aggregate wieder.

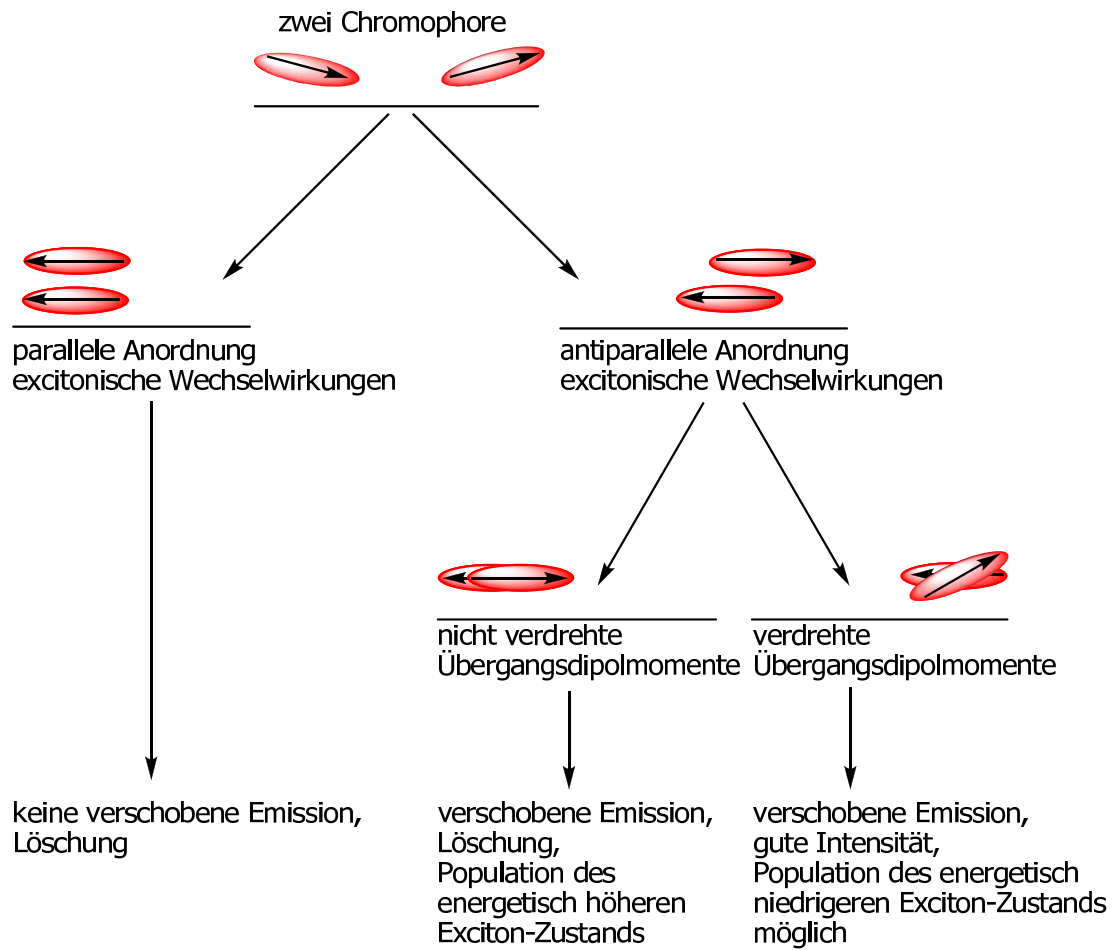


Abbildung 4-37: Schematische Darstellung des Zustandekommens fluoreszenter H-Aggregate.

## 5. Bioanalytische TO-Dimer Anwendungen

### 5.1 *SNP-Detektion*

Pyrene sind dafür bekannt, dass sie Excimere ausbilden. Dies wurde bereits zur Detektion von Basenfehlpaarungen in DNA Duplexen<sup>[233]</sup>, Molecular Beacons<sup>[234]</sup> und ähnlichen DNA-Konstrukten<sup>[235]</sup> ausgenutzt. In unserer Gruppe gelang es, mit Perylenbisimiden Basenfehlpaarungen in Duplexen nachzuweisen.<sup>[119]</sup> Dabei wurden zwei Perylenbisimide in einen Einzelstrang im Abstand eines Adenins eingebaut. Im Duplex kam es bei korrekter Adenin-Thymin-Paarung zu einer Separation der Chromophore, wodurch die optischen Eigenschaften des monomeren Perylenbisimids beobachtbar wurden.

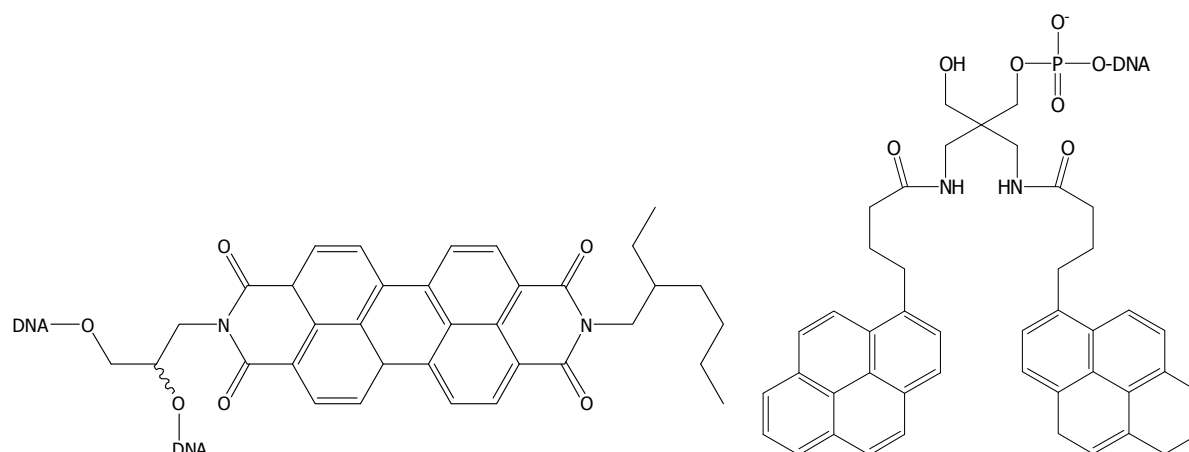


Abbildung 5-1: Perylenbismimid (links), Pyren-modifizierte DNA Sonde zur Detektion von Basenfehlpaarungen (rechts).

Wenn es mit dem Adenin zwischen den beiden Chromophoren durch einen entsprechenden Gegenstrang zu einer Basenfehlpaarung kam, wurde dies durch excitonische Absorption und excimere Fluoreszenz angezeigt. Entsprechend dieser Experimente sollte Thiazol Orange als potentiell wechselwirkendes Chromophorenpaar in einen entsprechenden Einzelstrang eingebaut werden, um Basenfehlpaarungen durch Dimerbildung und den bereits beschriebenen optischen Eigenschaften anzuzeigen. Folgende DNA-Sequenzen wurden synthetisiert:



**DNA34:** 5'-TG-CAT-GCA-**TO**TO-ACT-GAC-3'  
**DNA35:** 3'-AC-GTA-CGT---**C**AC---TGA-CTG-5'  
**DNA36:** 3'-AC-GTA-CGT---**CT**C---TGA-CTG-5'  
**DNA37:** 3'-AC-GTA-CGT---**CG**C---TGA-CTG-5'  
**DNA38:** 3'-AC-GTA-CGT---**CC**C---TGA-CTG-5'  
**DNA39:** 3'-AC-GTA-CGT---C---C---TGA-CTG-5'

DNA34 bildet mit DNA35 als Gegenstrang den richtig gepaarten Duplex; mit DNA36 bis DNA38 hingegen kommt es zu Basenfehlpaarungen des zentralen Adenins. DNA39 stellt keine Gegenbase zum Adenin zur Verfügung, dadurch sollte es aus dem DNA Duplex herausgedrängt und beide Thiazol-Orange-Chromophoren zur Wechselwirkung miteinander gezwungen werden.

Im Absorptionsspektrum (Abbildung 5-2) ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Einzel- und Doppelsträngen zu sehen.

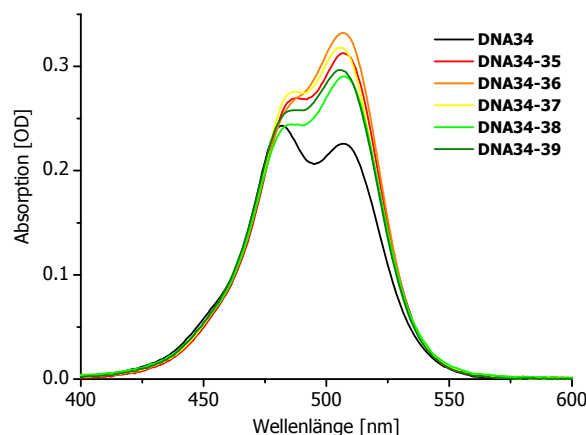


Abbildung 5-2: Absorptionsspektren von DNA34 und den Duplexen DNA34-35 bis DNA34-39. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Der Einzelstrang DNA34 weist excitonische Wechselwirkungen auf, mit einem Maximum bei 482 nm. Dies liegt daran, dass sich der Einzelstrang willkürlich faltet und sich in diesem DNA-Knäuel beide Thiazol-Orange-Chromophore räumlich nahe kommen können. Dadurch wechselwirken beide Farbstoffe miteinander, was an excitonischen Absorptionsbanden zu beobachten ist. Diese Absorptionsbande ist allerdings nicht so stark ausgeprägt, wie es beispielsweise bei den Duplexen DNA17-

18 und DNA19-20 (vergleiche Kapitel 4.3) zu beobachten war. Alle Duplexe DNA34-35 bis DNA34-39 zeigen Monomerabsorptionen mit einem Maximum bei 510 nm und einer Schulter bei 490 nm. Selbst Duplex DNA34-39, der das Adenin aus dem Duplex drängen und so optimale Wechselwirkungen zwischen beiden Chromophoren ermöglichen sollte, weist nur optische Eigenschaften auf, die denen des monomeren Thiazol Oranges entsprechen.

Auch im Fluoreszenzspektrum (Abbildung 5-3) sind hauptsächlich Banden zu sehen, die monomerem Thiazol Orange in DNA gleichen.

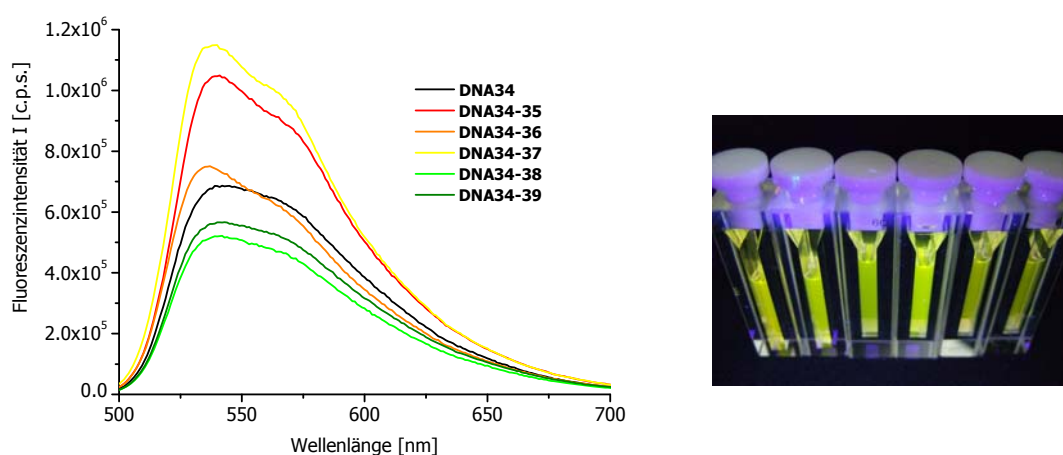


Abbildung 5-3: Emissionsspektren von DNA34 und den Duplexen DNA34-35 bis DNA34-39. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA34, DNA34-35, DNA34-36, DNA34-37, DNA34-38, DNA34-39. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Alle Fluoreszenzen unterscheiden sich lediglich in ihrer Intensität. Die intensivsten Emissionen sind bei Duplex DNA34-37 zu beobachten, dieser Duplex weist ein Guanin gegenüber Adenin auf. Die  $R_{\text{FI}}$ -Werte (Tabelle 5-1) liegen im Bereich 1.28 bis 1.63 und damit weder nahe am  $R_{\text{FI}}$ -Wert der monomeren Fluoreszenz (2.54) noch an dem  $R_{\text{FI}}$ -Wert der dimeren Emission ( $<1.0$ ).

Tabelle 5-1: Charakteristische Daten der Duplexe DNA34-35 bis DNA34-38. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )
<b>DNA34-35</b>	541	1.40
<b>DNA34-36</b>	535	1.63
<b>DNA34-37</b>	538	1.57
<b>DNA34-38</b>	542	1.33
<b>DNA34-39</b>	543	1.28

Werden diese DNA-Lösungen mit einer UV-Lampe angeregt (Abbildung 5-3, Foto), wird sichtbar, dass hauptsächlich grüne Emissionen vorliegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das Dimer aus beiden Thiazol-Orange-Chromophoren innerhalb dieser DNA-Sequenz nur zu einem geringen Anteil ausbildet. Selbst dann nicht, wenn man sie mit Gegenstrang DNA39 in räumliche Nähe zueinander zwingen möchte. Dies könnte daran liegen, dass das zentrale Adenin bereits als Spacer zu viel Raum einnimmt und schon von vornherein Wechselwirkungen beider Chromophore unterbindet.

Bei DNA21-18 und DNA22-20 konnte durch die antiparallele Anordnung beider Chromophore eine Emissionsverschiebung erreicht werden, wenngleich diese eine starke Löschung erfahren hat. Um eine mögliche Dimerausbildung bei antiparalleler Anordnung beider Chromophore zu überprüfen, wurden folgende DNA-Sequenz synthetisiert:

**DNA40:** 5'-TG-CAT-GCA-TOATO'-ACT-GAC-3'

**DNA39:** 3' AC-GTA-CGT--C----C---TGA-CTG 5'

Dabei wurde TO' über den Chinolin-Stickstoff in den Einzelstrang DNA40 eingebaut. Als Gegenstrang dient DNA39, der durch das Fehlen einer Gegenbase zu Adenin beide Chromophore in möglichst enge Nähe zueinander zwingt.

Im Absorptionsspektrum (Abbildung 5-5, links) sind nahezu keine Unterschiede zwischen Einzel- und

Doppelstrang zu erkennen, nur minimale Abweichungen in der Intensität. Allerdings zeigt die stark ausgeprägte Schulter bei 490 nm die excitonischen Wechselwirkungen der Chromophore an.

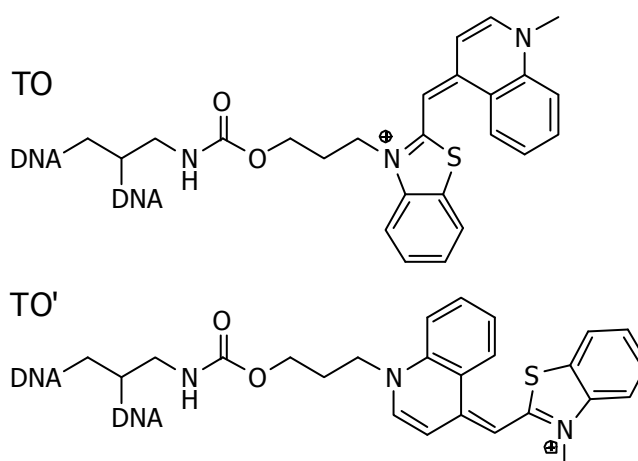


Abbildung 5-4: unterschiedliche Anknüpfung des Thiazol-Orange-Chromophors an DNA.

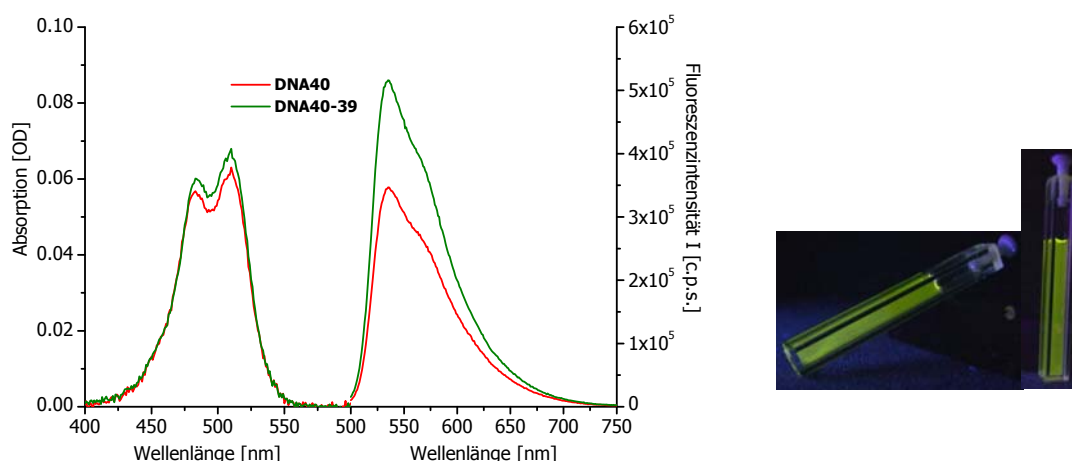


Abbildung 5-5: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von DNA40 und DNA40-39. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490$  nm, 20 °C. Foto DNA40 (links) und DNA40-39 (rechts), 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Das Emissionsspektrum (Abbildung 5-5, rechts) zeigt ein Maximum bei 530 nm mit einer Schulter bei 570 nm, dies ist die charakteristischen Fluoreszenz des Thiazol-Orange-Monomers. Das Dimer bildet sich also auch nicht bei antiparalleler Anordnung der Chromophore. Diese Resultate deuten darauf hin, dass das Adenin zwischen beiden Thiazol-Orange-Chromophoren eine Wechselwirkung verhindert.

Die mit einer UV-Lampe angeregten DNA-Lösungen zeigen eine grüne Emissionsfarbe (Abbildung 5-5, Foto). Auch die  $R_{FI}$ -Werte zeigen Werte in einem Bereich, die der monomeren Fluoreszenz zuzuordnen ist. (Tabelle 5-2). Leider eignet sich das Thiazol-Orange-Dimer nicht zur Detektion von Basenfehlpaarungen, wie es mit den Perylenbisimid-Excimeren möglich war.

Tabelle 5-2: Charakteristische Daten der Duplexe DNA34-35 bis DNA34-39. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{exc} = 490$  nm, 20 °C.

DNA	$FI_{max}/nm$	$R_{FI} (FI_{533nm}/FI_{585nm})$
<b>DNA34-35</b>	541	1.40
<b>DNA34-36</b>	535	1.63
<b>DNA34-37</b>	538	1.57
<b>DNA34-38</b>	542	1.33
<b>DNA34-39</b>	543	1.28
<b>DNA40-39</b>	535	1.82

## 5.2 Molecular Beacon

Das Thiazol-Orange-Dimer kann universell in einen DNA-Duplex eingebaut werden und zeigt die Hybridisierung beider Einzelstränge durch einen Farbumschlag der Emission an. Dies kann mit bloßem Auge verfolgt werden und verleiht dem Dimer daher die Vorteile einer sehr bequemen, unkomplizierten und verhältnismäßig günstigen Detektion von hybridisierten bzw. dehybridisierten Oligonukleotiden. Um das Potential des TO-Dimers hinsichtlich einer Anwendung als Molecular Beacon abschätzen zu können, wurden zunächst einige Vorversuchen durchgeführt.

### 5.2.1. Vorversuche

DNA4 besitzt eine Basenabfolge, die in acht Basen zu sich selbst komplementär ist. Das bedeutet, dass in 5'-Richtung und in 3'-Richtung des eingebauten Thiazol Oranges jeweils vier Basen sind, die zu einem weiteren DNA4 Einzelstrang komplementär sind, wie unten fett gedruckt gezeigt. Durch zehn minütiges Aufheizen auf 90 °C und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur, kann DNA4 mit sich selbst hybridisiert werden. Es bildet sich ein kurzer, acht Basenpaare langer

Duplex, der beide Thiazol-Orange-Chromophore dazu zwingt, miteinander zu wechselwirken.

**DNA4:** 3'-CGT-ACG-TCA-TOTT-GAC-TG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT-TTOA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA4:** 3'-CGT-ACG-TCA-TOTT-GAC-TG-5'

**DNA41:** 5'-GCA-TGC-AGT--C-AA-CTG-AC-3'

Gibt man zu DNA4-4 den vollkomplementären Gegenstrang DNA41 hinzu, dehybridisiert der kurze Duplex und die jeweiligen Einzelstränge DNA4 bilden mit dem vollkomplementären Gegenstrang DNA41 einen sehr viel stabileren Duplex (Abbildung 5-6).

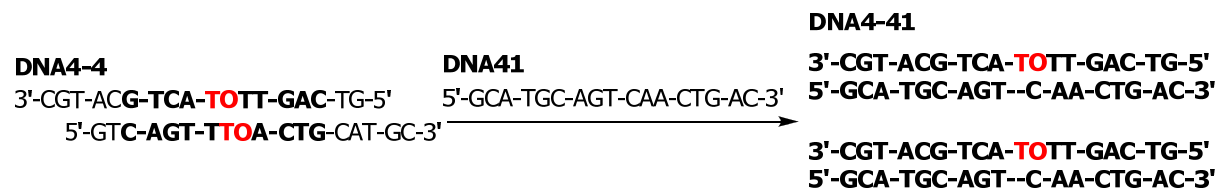


Abbildung 5-6: Schematische Darstellung der Öffnung des selbsthybridisierten Duplexes DNA4-4 durch DNA41 und die beiden vollständig komplementären Duplexen DNA4-41.

Diese Umhybridisierung ist thermodynamisch begünstigt, durch die Bildung des zweiten, sehr viel stabileren und längeren Duplex ( $T_m > 41.7\text{ °C}$  von DNA4-4). Durch die Dimerbildung in DNA4-4 sollte die DNA-Lösung orange fluoreszieren, wohingegen nach der Zugabe von Gegenstrang DNA41, die DNA-Lösung grünes Licht emittieren sollte, da die Thiazol-Orange-Chromophore voneinander separiert sind.

Zunächst wird DNA4-4 im Vergleich zu DNA3-4 spektroskopisch untersucht. Es fällt auf (Abbildung 5-7), dass sich die Spektren sowohl in Absorption, als auch in Emission voneinander unterscheiden.

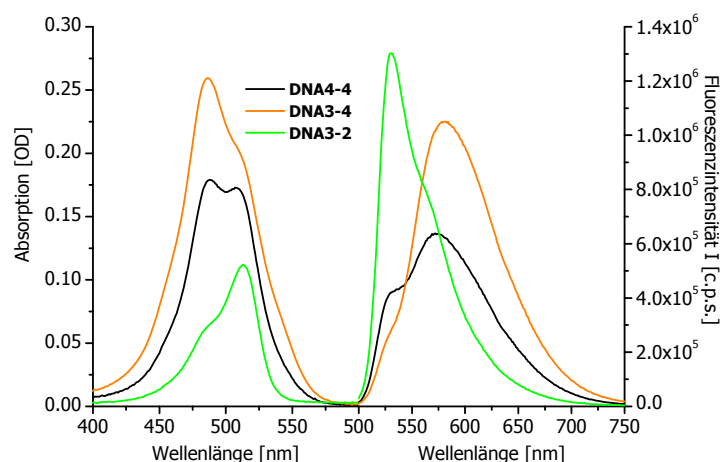


Abbildung 5-7: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Duplexe DNA4-4, DNA3-4 und DNA3-2. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20  $^\circ\text{C}$ .

Die Intensitäten von DNA4-4 sind jeweils geringer, die excitonischen Wechselwirkungen im Absorptionsspektrum sind nicht so stark ausgeprägt und auch die Emissionsverschiebung vom Monomer zum Dimer ist geringer als bei DNA3-4. Dies liegt vermutlich daran, dass ein Duplex von acht Basenpaaren zu kurz ist, um eine kleine Furche auszubilden, an die sich das TO-Dimer anlagern könnte. Dennoch sind sowohl Absorption, als auch Emission des DNA4-4 sehr deutlich von der Absorption und Emission des DNA3-2 zu unterscheiden. Um zu testen, ob sich das Thiazol-Orange-Dimer als Hybridisierungssonde für analytische Zwecke eignet, ist dieser kurze Duplex DNA4-4 durchaus ausreichend. Eine Optimierung der Hybridisierungssonde ist erst anschließend sinnvoll.

Temperaturabhängige Fluoreszenzspektren zeigen ein ähnliches Verhalten wie in Kapitel 4.2.1 für DNA3-4 gezeigt wurde. Die Fluoreszenzintensität mit einem Maximum bei 580 nm sinkt zunächst bei steigender Temperatur ab.

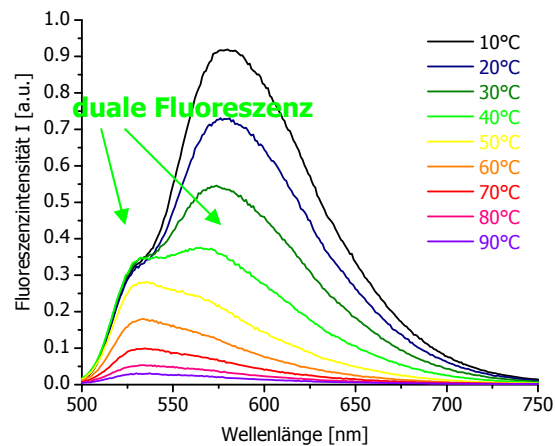


Abbildung 5-8: Temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA4-4 mit dualer Fluoreszenz bei ca. 40 °C. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 10 °C bis 90 °C.

Bei einer Temperatur von 40 °C, die ungefähr der Schmelztemperatur des kurzen Duplexes entspricht (41.7 °C), ist im Spektrum eine duale Fluoreszenz zu sehen, die auf die Koexistenz von monomerem und dimerem Thiazol Orange zurückzuführen ist. Anschließend findet eine vollständige Emissionsverschiebung zu einem Maximum bei 530 nm statt, dies entspricht der monomeren Fluoreszenz. Durch den weiteren Anstieg der Temperatur findet dann eine vollständige Löschung der Emission statt. Im normierten Spektrum ist die Fluoreszenzverschiebung nochmals verdeutlicht. Auch hier lässt sich die duale Fluoreszenz bei 40 °C mit zwei Maxima bei 580 nm und 530 nm erkennen.

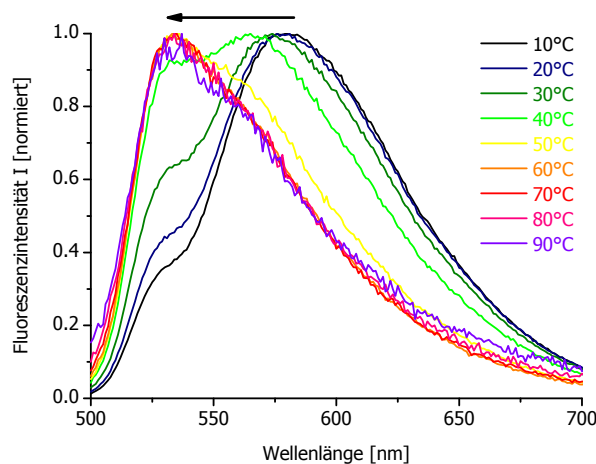


Abbildung 5-9: Normierte temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA4-4. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 10 °C bis 90 °C.



In einem ersten Experiment wurde zum kurzen Duplex DNA4-4 der vollständig komplementäre Gegenstrang DNA41 zutitriert. Im Absorptionsspektrum (Abbildung 5-10) nimmt bei 260 nm die Intensität wie erwartet kontinuierlich zu. Im Bereich der Thiazol-Orange-Absorption (Abbildung 5-10, rechts) ist eine Maximumverschiebung von 487 nm nach 513 nm zu erkennen. Aufgrund der neuen Duplexbildung mit DNA41 kommt es zu einer Separation beider Chromophore, die Dimerabsorption verschwindet und geht in die Monomerabsorption über.

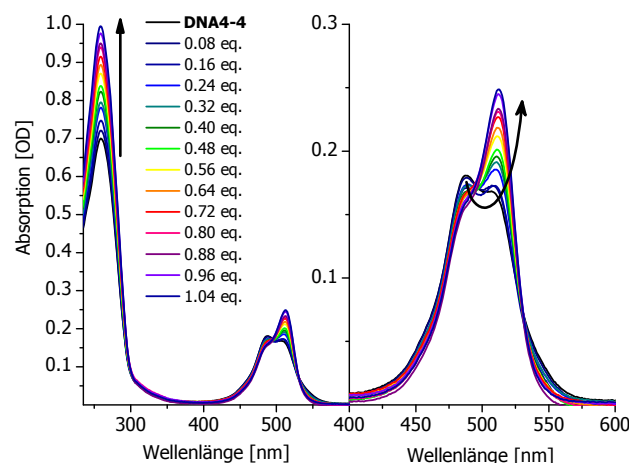


Abbildung 5-10: Absorptionsspektren jedes einzelnen Titrationschrittes der Titration von DNA4-4 mit DNA41 (links). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA4-4, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. Rechts: Vergrößerung des Absorptionsbereiches von Thiazol Orange.

Interessant ist, dass die Maximumverschiebung und damit die Duplexbildung von DNA4-41 nach Zugabe von ungefähr einem Äquivalent DNA41 vollendet zu sein scheint. Der isosbestische Punkt bei 531 nm deutet darauf hin, dass tatsächlich zwei verschiedenen DNA-Hybride in einem Gleichgewicht vorliegen, DNA4-4 und DNA4-41. Im Emissionsspektrum ist Ähnliches zu beobachten (Abbildung 5-11). Die Dimeremission mit geringer Intensität und einem Maximum bei 580 nm geht über in die monomere Emission mit Thiazol-Orange-typischer Feinstruktur, einem Maximum bei 530 nm und einer Schulter bei 565 nm. Die Fluoreszenzintensität der Monomere ist allerdings so hoch, dass die Dimeremission im Spektrum überlagert wird. Dadurch kommt es zu keiner deutlichen Unterscheidung beider Emissionsmaxima. Dies stellt ein Nachteil hinsichtlich einer eindeutigen Detektion dar.

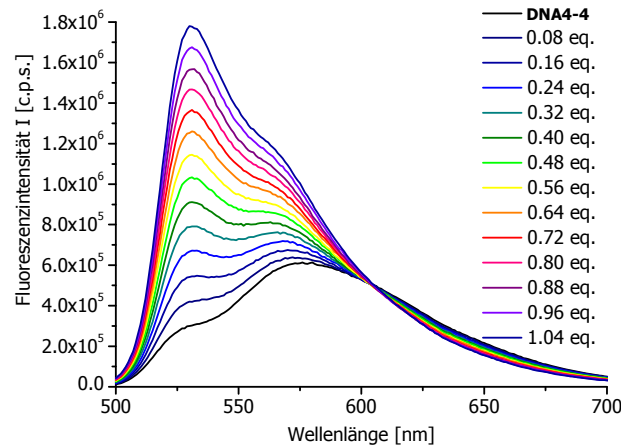


Abbildung 5-11: Emissionsspektren jedes einzelnen Titrationsschrittes der Titration von DNA4-4 mit DNA41. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA4-4, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

Auch das Emissionspektrum weist einen isosbestischen Punkt bei 605 nm auf. Die Umhybridisierung von DNA4 ist mit den Augen zu verfolgen. In Abbildung 5-12 sind Fotos von den mit einer UV-Lampe angeregten DNA-Lösungen zu sehen. Links ist Duplex DNA4-4 zu sehen, der die charakteristische orangefarbene Emission des Thiazol-Orange-Dimers zeigt. Mit der Zugabe von 0.5 eq. DNA41 wechselt die Farbe von orange nach gelb, was die Koexistenz von monomerem und dimerem Thiazol Orange anzeigt.

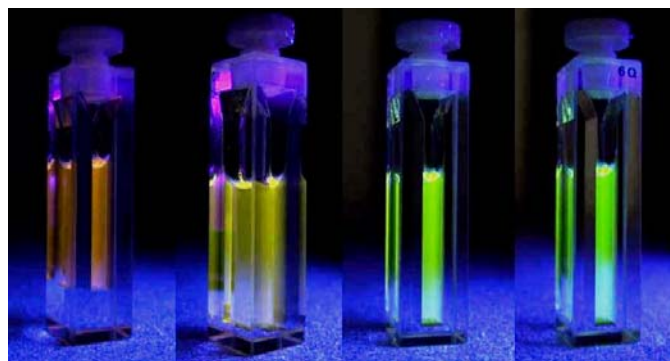


Abbildung 5-12: Von links nach rechts: DNA4-4 ohne DNA41, nach Zugabe von 0.5 eq. DNA41, nach Zugabe von 0.8 eq. DNA41, nach vollendeter Titration mit Zugabe von 1.04 eq. DNA41.

Wird die Zugabe von DNA41 auf 0.8 eq. erhöht, verändert sich die Emissionsfarbe weiter von gelb nach gelb-grün und schließlich, bei Zugabe von 1.04 eq. DNA41 zu

grün. Diese starken Farbveränderungen machen molekulare Vorgänge für die Augen sichtbar.

DNA4-4 weist einen  $R_{FI}$ -Wert von 0.49 auf und liegt damit deutlich bei einem charakteristischen Wert für dimere Thiazol-Orange-Fluoreszenz.

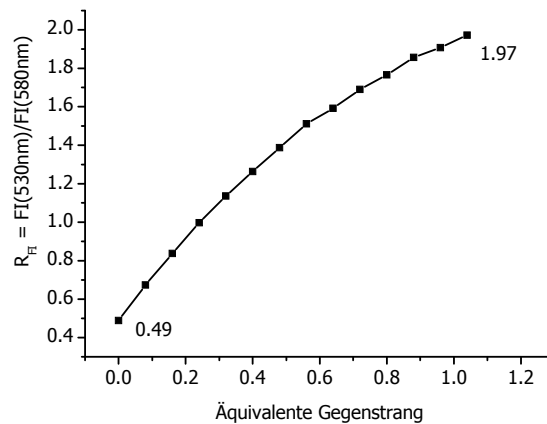


Abbildung 5-13: Auftragung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse  $R_{FI}$  gegen die Äquivalentzugabe von DNA41 zu DNA4-4.

Während der Titration steigt dieser Wert an und nimmt schließlich den Wert 1.97 an. Dieser  $R_{FI}$ -Wert liegt sehr nahe an dem  $R_{FI}$ -Wert, der für DNA3-2 bestimmt wurde (2.54) und ist damit charakteristisch für die monomere Thiazol-Orange-Fluoreszenz.

Es konnte durch diese Vorversuche gezeigt werden, dass die Öffnung eines kurzen Duplexes durch einen vollständig komplementären Gegenstrang und damit die Separation der TO-Chromophore mit bloßem Auge verfolgt werden kann.

Ziel der Optimierung dieses Systems ist es, durch die Wahl der Basensequenz eine bessere Unterscheidung zwischen dimerer und monomerer Emission zu erreichen. Dies kann dadurch geschehen, dass beide Thiazol-Orange-Chromophore nicht ein Teil des neuen Duplexes sind. Der neue Gegenstrang sollte so lang sein, dass er einen stabileren Duplex bildet, aber er sollte kurz genug sein, um beide TO-Chromophore von der Duplexbildung auszuschließen. Werden die Thiazol-Orange-Chromophore mit in den Duplex einbezogen, steigt ihre Fluoreszenz erheblich an. Im Einzelstrang ist die Fluoreszenz deutlich geringer.

### 5.2.2. Vollständig komplementäre Zielsequenz

Molecular Beacons sind eine der gebräuchlichsten Oligonukleotid-Konstrukte, um Hybridisierung bzw. Dehybridisierung aufgrund von richtig bzw. fehlgepaarten Basen durch Fluoreszenzintensitätssteigerungen oder Fluoreszenzlöschungen anzuzeigen. Zudem bietet ein Molecular Beacon optimale Möglichkeiten, die Basensequenz so anzupassen, dass eine bestmögliche Auslesung der Fluoreszenzsignale des Thiazol Oranges möglich wird.

**DNA42:** 3'-**GTC-ATOT-TGA-CCG**-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-**GTC-ATOT-TGA-C**-5'

bildet eine Haarnadel, die im Stamm den Dimer enthält und dadurch eine orangefarbene Emission aufweist. Der

Stamm ist im Vergleich zu anderen Molecular Beacons relativ lange, dies empfiehlt sich jedoch aufgrund der Beobachtungen in den Vorversuchen.

Diese legen die Vermutung nahe, dass ein längerer Duplex notwendig ist, um

eine kleine Furche auszubilden, in die sich das Dimer einlagern kann. Der Stamm darf allerdings auch nicht zu lang sein, weil die Haarnadel sonst zu stabil ist und durch einen entsprechenden Gegenstrang nicht mehr geöffnet werden kann (zur optimalen Stammlänge vergleiche hierzu bitte Kapitel 5.2.4). DNA42 besitzt eine Stammlänge von neun komplementären Basenpaaren.

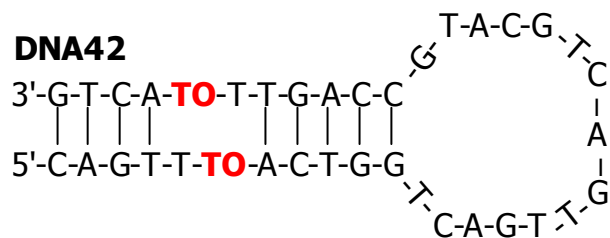


Abbildung 5-14: Haarnadel aus **DNA42**.

**DNA41:** 5'-GC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-3'

DNA41 ist komplementär zur Schleifenregion der Haarnadel,

**DNA43:** 5'-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-3'

DNA43 weist eine Basensequenz auf, die im Duplex jeweils bis zu einer Base vor dem Thiazol Orange reicht.

**DNA44:** 5'-CAG-T-T-A-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-T-A-ACT-G-3'

DNA44 ist voll komplementär zu DNA42.

**DNA45:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-3'

DNA45 weist eine Basensequenz auf, die im Duplex jeweils bis zu beiden Thiazol-Orange-Chromophoren reicht.

Abbildung 5-15 veranschaulicht die unterschiedlichen Duplexe, die bei der Öffnung der Haarnadel aus DNA42 entstehen, durch entsprechende Farbwahl. Grün zeigt den kürzesten Duplex mit Gegenstrang DNA41 an, blau zeigt den Duplex an, der mit DNA43 entsteht und jeweils eine Base vor den Thiazol-Orange-Chromophoren endet. In orange wird der Duplex mit DNA45 gezeigt, der jeweils vor den beiden Thiazol-Orange-Chromophoren endet. Dadurch, dass beide Thiazol-Orange-Basensurrogate bei einer Hybridisierung mit DNA41, DNA43 und DNA45 jeweils nicht Teil der Duplexe sind, sollte die Fluoreszenzintensität der monomeren Farbstoffe relativ gering bleiben und damit deutlicher von der TO-Dimerfluoreszenz in der Haarnadel zu unterscheiden sein. In schwarz wird der voll komplementäre Duplex mit DNA44 gezeigt, der beide Chromophore mit in den Duplex einschließt.

**DNA42** 3'-GTC-A**TO**-TGA-CCG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-GTC-A**TO**-TGA-C-5'  
**DNA41** 5'-GC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-3'  
**DNA43** 5'-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-3'  
**DNA45** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-3'  
**DNA44** 5'-CAG-T-T-A-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-T-A-ACT-G-3'

Abbildung 5-15: Jeweils durch gleiche Farbgebung, schematische Darstellung der entstehenden Duplexe DNA42-41, DNA42-43, DNA42-44 und DNA42-45.

Zunächst jedoch soll die Haarnadel DNA42 spektroskopisch untersucht werden. Im temperaturabhängigen Emissionsspektrum (Abbildung 5-16) ist bei 20 °C ein Signal bei 585 nm zu sehen, dies entspricht dem Dimermaximum.

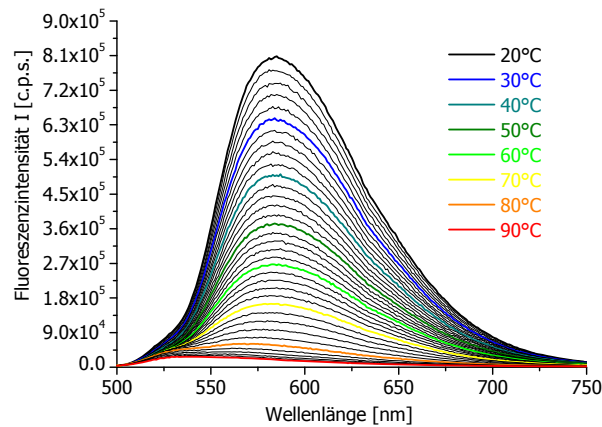


Abbildung 5-16: Temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA42. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20-90  $^{\circ}\text{C}$ .

Es bildet sich also trotz des relativ kurzen Stamms ein Thiazol-Orange-Dimer aus, das die charakteristische orangefarbene Emission zeigt. Wird nun die Temperatur schrittweise erhöht, sinkt die Emissionsintensität zunächst ab. Abbildung 5-17 zeigt deutlich, wie sich zwischen 78  $^{\circ}\text{C}$  und 90  $^{\circ}\text{C}$  das Maximum der Emission von etwa 580 nm nach ca. 530 nm verschiebt.

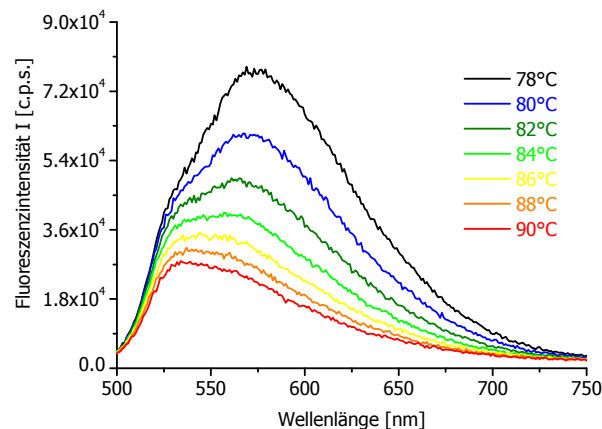


Abbildung 5-17: Temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA42. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 78-90  $^{\circ}\text{C}$ .

Bei 80  $^{\circ}\text{C}$  und 82  $^{\circ}\text{C}$  ist wieder eine duale Fluoreszenz aufgrund der Koexistenz von monomerem und dimerem Thiazol Orange zu erkennen. Nach der Emissionsverschiebung, ab ca. 86  $^{\circ}\text{C}$  liegt nur noch monomere Fluoreszenz vor, die

durch die weiter ansteigende Temperatur nahezu vollständig gelöscht wird. Die Emissionsverschiebung um ca. 50 nm wird im normierten Spektrum in Abbildung 5-18 deutlich. Hier wird noch mal ganz klar ersichtlich, wie wichtig der DNA-Duplex als Grundgerüst für das Dimer ist. Wird dieses durch erhöhte Temperatur schrittweise aufgelöst, zerfällt auch der Dimerkomplex der Chromophore und es sind nur noch die spektroskopischen Eigenschaften der Thiazol-Orange-Monomere zu beobachten.

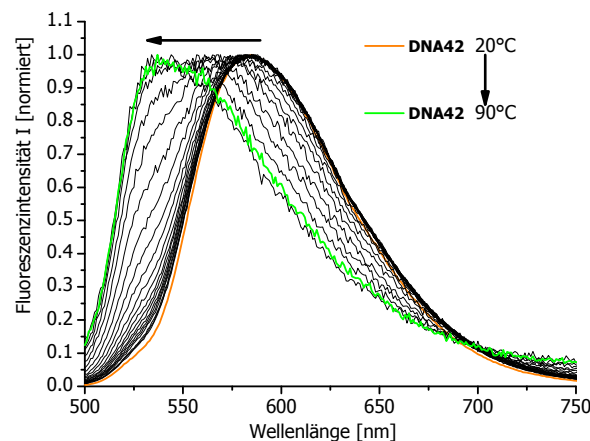


Abbildung 5-18: Normierte temperaturabhängige Emissionsspektren von DNA42. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20-90  $^{\circ}\text{C}$ .

Die Haarnadelform von DNA42 wurde mit den unterschiedlichen Gegensträngen DNA41, DNA43, DNA44 und DNA45 hybridisiert. Im Absorptionsspektrum (Abbildung 5-19) zeigen DNA42-43, DNA42-44 und DNA42-45 alle monomere Absorptionsbanden, mit einem Maximum von etwa 510 nm und nur sehr kleinen Intensitätsunterschieden.

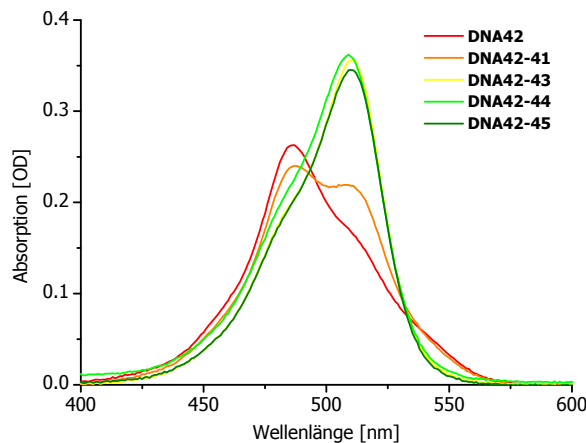


Abbildung 5-19: Absorptionsspektren von DNA42, DNA42-41, DNA42-43 bis DNA42-45. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaPi}$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Im Gegensatz dazu ist sofort zu erkennen, dass DNA41 nicht in der Lage zu sein scheint, die Haarnadel aus DNA42 vollständig zu öffnen. Der Duplex DNA42-41 zeigt ein Maximum von etwa 490 nm, das dem Maximum des Dimers entspricht. Man kann zwar eine Veränderung gegenüber DNA42 erkennen, aber keine vollständige Verschiebung zur Monomerabsorption. Damit ist der Gegenstrang DNA41 für weitere analytische Zwecke ungeeignet.

Dies wird auch im Emissionsspektrum (Abbildung 5-20) ersichtlich. DNA42 zeigt ein Maximum bei 586 nm ohne die TO-typische Feinstruktur. DNA42-41 zeigt ein Maximum, das sehr nahe an dem der Haarnadel liegt. Zwar ist eine Schulter bei 532 nm zu sehen, es ist aber deutlich, dass DNA41 zur Öffnung der Haarnadel aufgrund seiner kurzen Basensequenz ungeeignet ist.



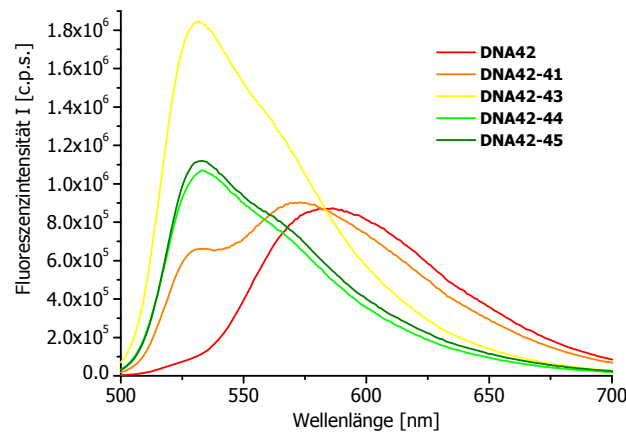


Abbildung 5-20: Emissionsspektren von DNA42, DNA42-41, DNA42-43 bis DNA42-45. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaPi}$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

DNA42-43 zeigt mit einem Maximum von 532 nm und einer Schulter bei 563 nm die TO-typische Feinstruktur der Emission, die aber in der Intensität zu hoch ist. Die Monomerfluoreszenz würde so die Dimerfluoreszenz im Emissionsspektrum eines Titrationsexperiments überlagern, wie in den Vorversuchen bei DNA4-4 und DNA41. DNA42-44 und DNA42-45 hingegen zeigen sowohl die typische Emissionsbanden des monomeren Thiazol Oranges, als auch eine geeignete Fluoreszenzintensität. Beide Fluoreszenzbanden (DNA42 und DNA42-44, DNA42-45) sind deutlich voneinander zu unterscheiden. Warum DNA42-43 die höchste Emissionsintensität zeigt und nicht DNA42-44, der eine voll komplementäre Basensequenz aufweist, liegt vermutlich an der individuellen Faltung der Chromophore in den Duplex oder an der unterschiedlichen Anlagerung in die kleine Furche. Genau konnte dies nicht geklärt werden. DNA45 weist eine geeignete Basensequenzlänge auf, schließt beide Chromophore aus der Duplexbildung aus und erreicht somit eine geeignete Fluoreszenzintensität, die die Dimeremission nicht überdeckt. Eine Titration von DNA42 mit DNA45 scheint am sinnvollsten:

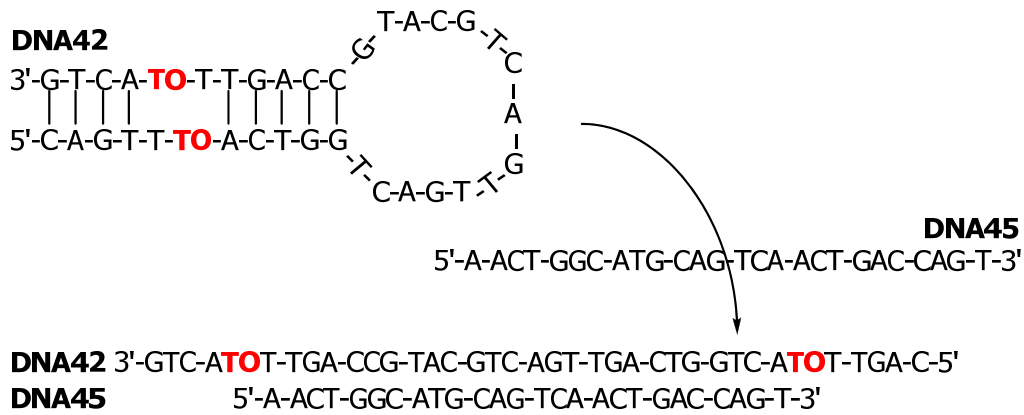


Abbildung 5-21: Schematische Darstellung der Öffnung der DNA42 Haarnadel durch DNA45 mit gleichzeitiger Duplexbildung von DNA42-45.

Im Absorptionsspektrum (Abbildung 5-22) kann beobachtet werden, wie die excitonischen Wechselwirkungen beider Chromophore unterbrochen werden und schrittweise in die Absorptionsbanden des monomeren Chromophors übergehen.

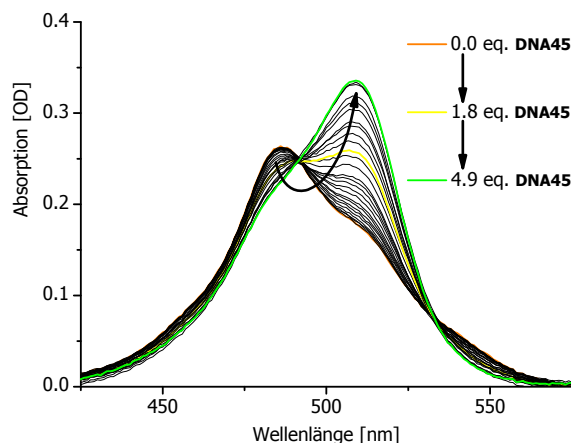


Abbildung 5-22: Absorptionsspektren der einzelnen Titrationsschritte der Titration von DNA42 mit Gegenstrang DNA45. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA42, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Das Maximum verschiebt sich von 486 nm zu 510 nm und die Intensität der Absorption steigt an. Es sind zwei isosbestische Punkte zu sehen, bei 492 nm und bei 533 nm.

Im Emissionsspektrum (Abbildung 5-23) sind beide Maxima deutlich voneinander separiert. Das bedeutet, dass die Monomerfluoreszenz nicht vollständig die Dimeremission überlagert, wie es bei der Titration von DNA4-4 mit DNA41 der Fall

war (vergleiche Abbildung 5-11). Die Intensität der Monomerfluoreszenz steigt leicht an, ist aber immer noch auf etwa gleicher Höhe wie die Emissionsintensität von DNA42. Es ist ein isosbestischer Punkt bei 567 nm zu sehen.

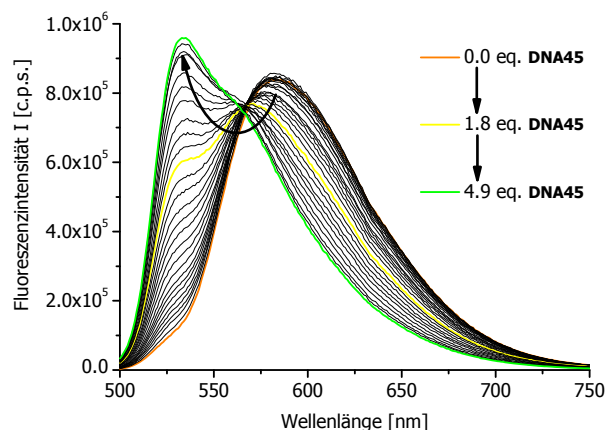


Abbildung 5-23: Emissionsspektren der einzelnen Titrationschritte der Titration von DNA42 mit Gegenstrang DNA45. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA42, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

Die Emissionsverschiebung ist mit bloßem Auge zu verfolgen (Abbildung 5-24). Die DNA-Lösung wurde nach den einzelnen Titrationschritten mit einer UV-Lampe angeregt und fotografiert. Die orangene Farbe der Haarnadel geht schrittweise in gelb über, aufgrund der Koexistenz von monomerem und dimerem Thiazol Orange.

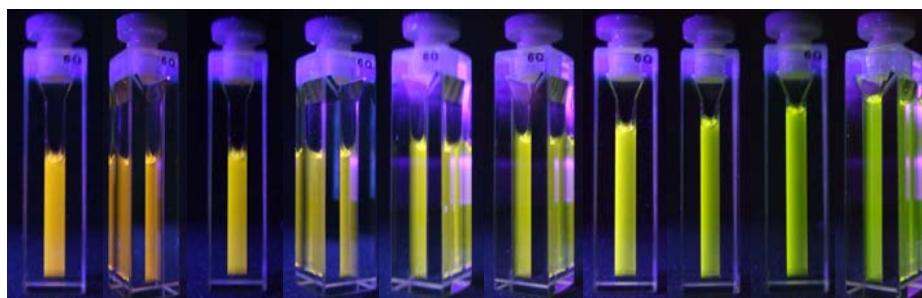


Abbildung 5-24: Die Fotos zeigen von rechts nach links folgende Titrationschritte: 0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.6, 2.3, 2.9, 3.7, 4.9 Äquivalente DNA45. Die DNA-Lösungen wurden mit einer herkömmlichen UV-Lampe angeregt. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA42, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20°C.

Bei weiterer Zugabe von DNA45 öffnet sich die Haarnadel vollständig, dies wird durch eine grüne Emissionsfarbe angezeigt.

Wird das Fluoreszenzintensitätsverhältnis  $R_{\text{FI}}$  gegen die Äquivalente des zugegebenen Gegenstrangs aufgetragen (Abbildung 5-25), fällt auf, dass die Haarnadel DNA42 im

Vergleich zu den Vorversuchen deutlich mehr Äquivalente Gegenstrang benötigt, um vollständig geöffnet zu werden. Dies liegt daran, dass der Stamm der Haarnadel länger und dadurch stabiler ist. Zusätzlich können die Basen in der Schleife ebenfalls miteinander wechselwirken und z.B. Wasserstoffbrücken zueinander ausbilden. Man geht davon aus, dass sich nicht wirklich eine Schleife ausbildet, sondern ein Knäuel vorliegt. Dies stabilisiert das Gleichgewicht zugunsten der Haarnadel. DNA42 weist einen  $R_{FI}$ -Wert von 0.18 auf, was fast exakt dem Wert von DNA3-4 entspricht (0.15). DNA4-4 erreichte in den Vorversuchen lediglich ein Wert von 0.49. Ist die DNA-Haarnadel vollständig von DNA45 geöffnet worden, ist ein  $R_{FI}$ -Wert von 1.6 zu errechnen, dies entspricht leider nicht ganz dem Wert von 2.54, der mit DNA3-2 erreicht wurde.

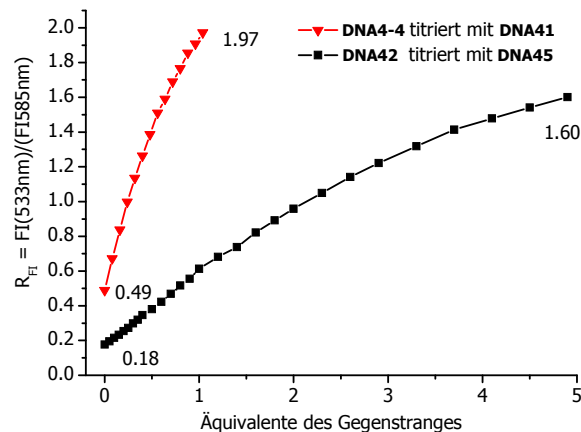


Abbildung 5-25: Auftragung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse  $R_{FI}$  gegen die Äquivalente der Titrationsexperimente von DNA42 im Vergleich zu DNA4-4.

### 5.2.3. Zielsequenz mit Basenfehlpaarungen

DNA42 kann als analytische Sonde verwendet werden, um die Existenz eines vollständig komplementären Oligonukleotids (DNA45) anzuzeigen. Von noch größerem Interesse ist jedoch, Mutanten durch Basenfehlpaarungen anzuzeigen. Um zu untersuchen, wie sensitiv die Haarnadel DNA42 ist, wurden zusätzlich drei weitere DNA-Sequenzen synthetisiert. DNA46, DNA47 und DNA48 enthalten jeweils eine unterschiedliche Base in der Mitte, mit der es zu einer Basenfehlpaarung im entstehenden Duplex kommt.

**DNA42:** 3'-GTC-ATOT-TGA-CCG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-GTC-ATOT-TGA-C-5'

**DNA45:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA46:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-ACA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA47:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-CCA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA48:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-GCA-ACT-GAC-CAG-T-3'

Die Basenfehlpaarung befindet sich in der Mitte der Schleifenregion, um zu gewährleisten, dass möglichst kurze komplementäre Teilsequenzen entstehen. Je kürzer diese Teilkomplementarität, desto kleiner die Triebkraft, die zur Öffnung der Haarnadel führt. In Abbildung 5-26 ist die Stelle, bei der mit DNA46, DNA47 und DNA48 im Duplex eine Basenfehlpaarung vorliegt, grün markiert.

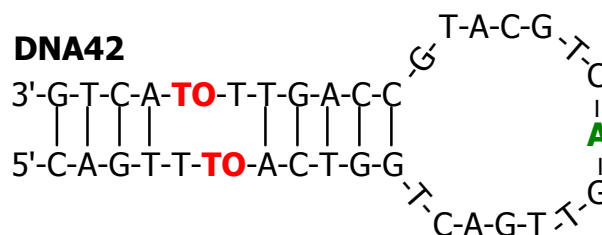


Abbildung 5-26: Haarnadel aus **DNA42**, in grün: Base Adenin, mit der es im Duplex zu einer Fehlpaarung kommt.

Abbildung 5-27 zeigt die Absorptionsspektren von DNA42 und DNA42-45 bis DNA42-48. Im Vergleich zum Spektrum der Haarnadel DNA42 weisen alle fehlgepaarten Duplexe veränderte Absorptionsbanden auf, sie unterscheiden sich jedoch auch deutlich vom Absorptionsspektrum von DNA42-45.

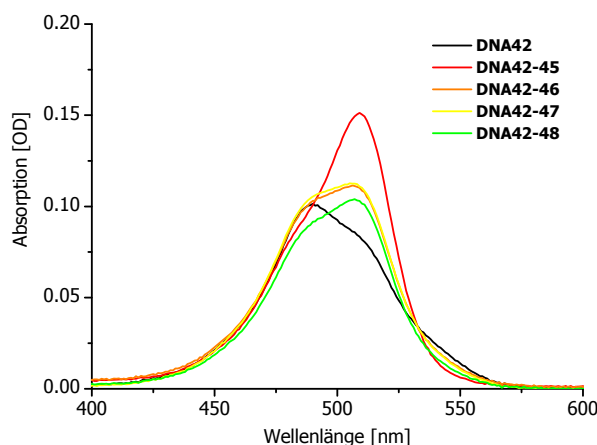


Abbildung 5-27: Absorptionsspektren von DNA42 und den Duplexen DNA42-45 bis DNA42-48. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaPi}$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20  $^{\circ}\text{C}$ .

DNA42-45 zeigt eine deutlich höhere Absorptionsintensität und die typischen Monomerabsorptionsbanden. Es scheint, dass DNA46 bis DNA48 nicht in der Lage sind, die Haarnadel aus DNA42 vollständig zu öffnen, da keine vollständige Verschiebung zur charakteristischen Monomerabsorption zu beobachten ist. Dies wird unterstützt durch die Emissionsspektren (Abbildung 5-28). DNA42 und DNA42-45 weisen jeweils die charakteristischen Emissionsbanden des monomeren bzw. dimeren Thiazol Oranges auf.

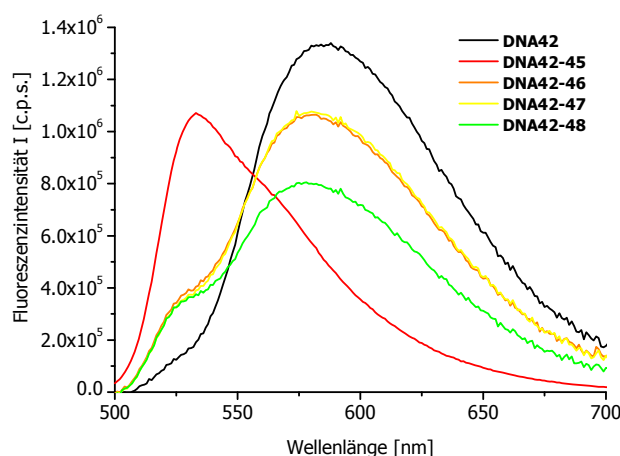


Abbildung 5-28: Emissionsspektren von DNA42 und den Duplexen DNA42-45 bis DNA42-48. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaPi}$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$ .

DNA42-46, DNA42-47 und DNA42-48 zeigen hingegen Emissionsbanden, die der dimeren Fluoreszenz ähnlich sind und sich deutlich von der Monomerfluoreszenz des Thiazol Oranges unterscheiden. Die Maxima liegen ungefähr bei 580 nm, die Fluoreszenzintensitäten sind im Vergleich zu DNA42 geringer.

DNA42 wird durch 4.9 eq. DNA45 vollständig geöffnet, dies wird durch die grüne Fluoreszenz beider Thiazol-Orange-Chromophore im Emissionsspektrum angezeigt. Werden 4.9 eq. DNA46, DNA47 und DNA48 jeweils zu DNA42 zugegeben, ist selbst bei so hohem Überschuss an Gegenstrang keine vollständige Öffnung der Haarnadel zu erkennen (Abbildung 5-29).

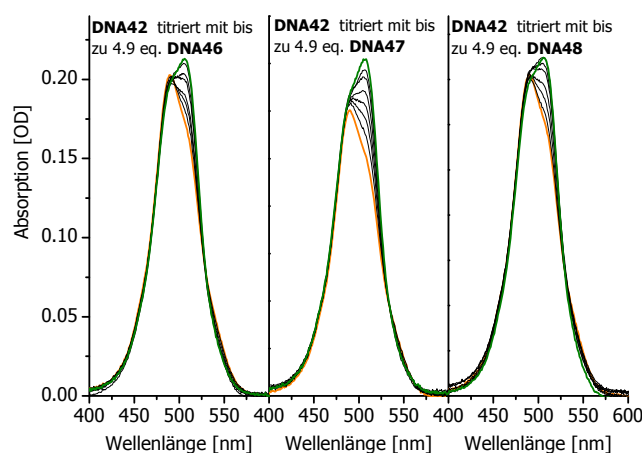


Abbildung 5-29: Absorptionsspektren von DNA42 titriert mit bis zu 4.9 Äquivalenten, in 0.7 Äquivalentschritten, DNA46 (links), DNA47 (Mitte) und DNA48 (rechts). 2.5  $\mu$ M DNA42, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

In allen drei Absorptionsspektren ist eine leicht bathochrome Verschiebung zu beobachten, die sich jedoch nicht vollständig zu einer charakteristischen Monomerabsorption verändert. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 5-30 die vollständige Verschiebung der Dimer- zur Monomerabsorptionsbande hervorgerufen durch die Öffnung der Haarnadel.

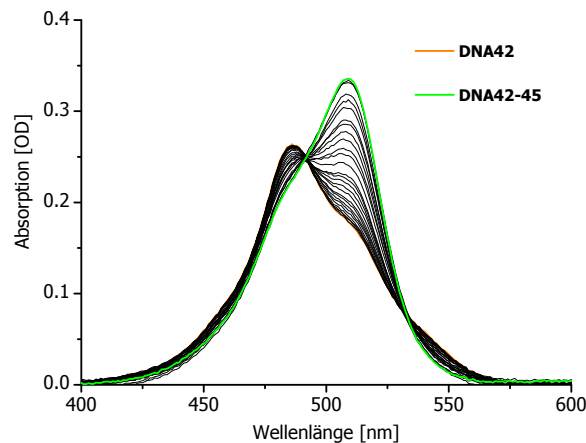


Abbildung 5-30: Absorptionsspektren der einzelnen Titrationsschritte der Titration von DNA42 mit Gegenstrang DNA45. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA42, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Auch in den Emissionsspektren der Titrations (Abbildung 5-31) ist nur eine sehr leichte hypsochrome Verschiebung zu erkennen. Die Fluoreszenz des Dimers im Stamm der Haarnadel wird durch die Zugabe der entsprechenden Gegenstränge leicht gelöscht, es findet jedoch keine vollständigen Öffnung der Haarnadel statt.

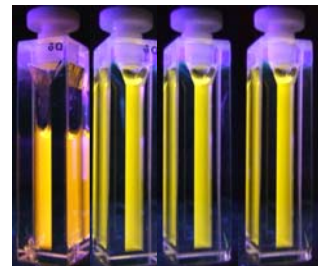
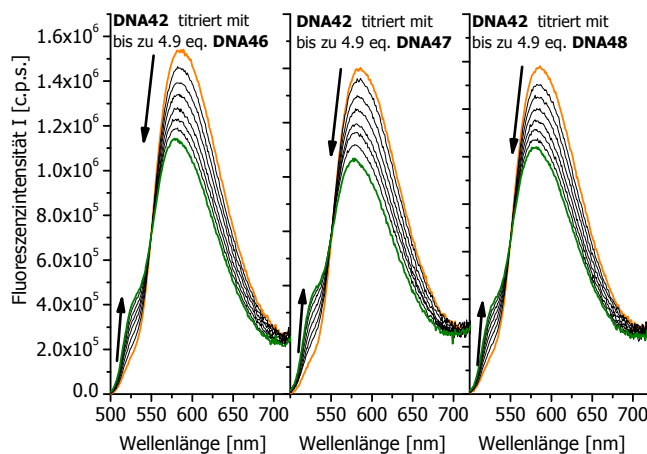


Abbildung 5-31: Emissionsspektren von DNA42 titriert mit bis zu 4.9 Äquivalente in 0.7 Äquivalentschritten, DNA46 (links), DNA47 (Mitte) und DNA48 (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA42, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA42, DNA42 titriert mit 4.9 eq. DNA46, DNA42 titriert mit DNA47, DNA42 titriert mit DNA48. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA42, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C.



Bei 530 nm ist ein leichter Anstieg der Emission zu erkennen. Dies führt zu der gelben Fluoreszenzfarbe der angeregten DNA-Lösungen. Es ist mit bloßem Auge zu erkennen, ob in der zu analysierenden DNA Sequenz eine Basenmutante vorliegt oder nicht. Ist keine Fehlpaarung vorhanden, verändert sich die Fluoreszenzfarbe von orange nach grün, liegt eine Mutante vor, ist lediglich eine Aufhellung der Lösung zu beobachten, die dem Auge gelb erscheint. Das Foto in Abbildung 5-31 zeigt die mit einer UV-Lampe angeregten DNA-Lösungen. Im Vergleich zu DNA42 zeigen alle eine gelbe Emissionsfarbe, wie sie bei einem Emissionsmaximum von 580 nm zu erwarten war. Auch hier sieht man, dass diejenigen DNA-Sequenzen, die zu einer Basenfehlpaarung im Duplex führen, nicht in der Lage sind, die Haarnadel DNA42 zu öffnen.

Abbildung 5-32 zeigt die normierten Emissionsspektren der einzelnen Titrationsschritte. Die Emissionsverschiebung von ca. 5 nm ist kaum zu erkennen, es ist lediglich ein leichter Anstieg bei 530 nm zu beobachten.

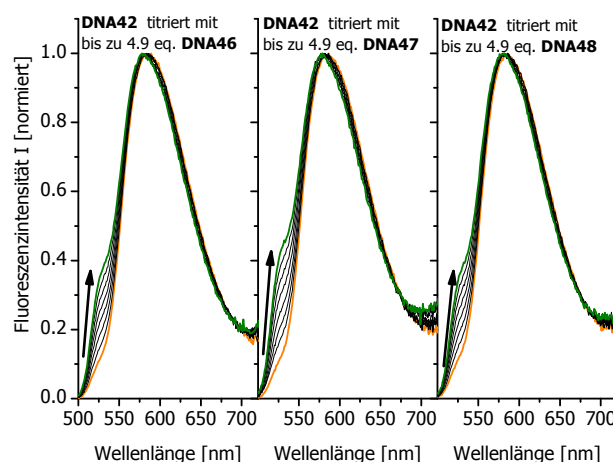


Abbildung 5-32: Normierte Emissionsspektren von DNA42 titriert mit bis zu 4.9 Äquivalente in 0.7 Äquivalentschritten, DNA46 (links), DNA47 (Mitte) und DNA48 (rechts). 2.5  $\mu$ M DNA42, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

Im Vergleich hierzu zeigt Abbildung 5-33 das normierte Emissionsspektrum der Titration von DNA42 mit DNA45, die Emissionsmaximumsverschiebung verdeutlicht die vollständige Öffnung der Haarnadel.

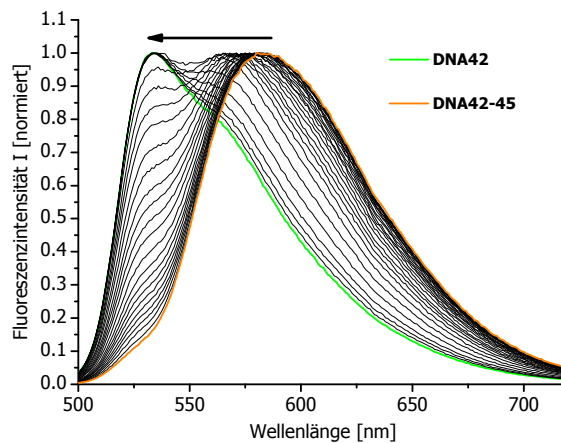


Abbildung 5-33: Normierte Emissionsspektren der einzelnen Titrationsschritte der Titration von DNA42 mit Gegenstrang DNA45. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA42, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

Durch die Auftragung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse gegen die Äquivalente jedes Titrationsschrittes, kann der Unterschied zwischen richtig und fehlgepaarten Duplexen quantifiziert werden (Abbildung 5-34).

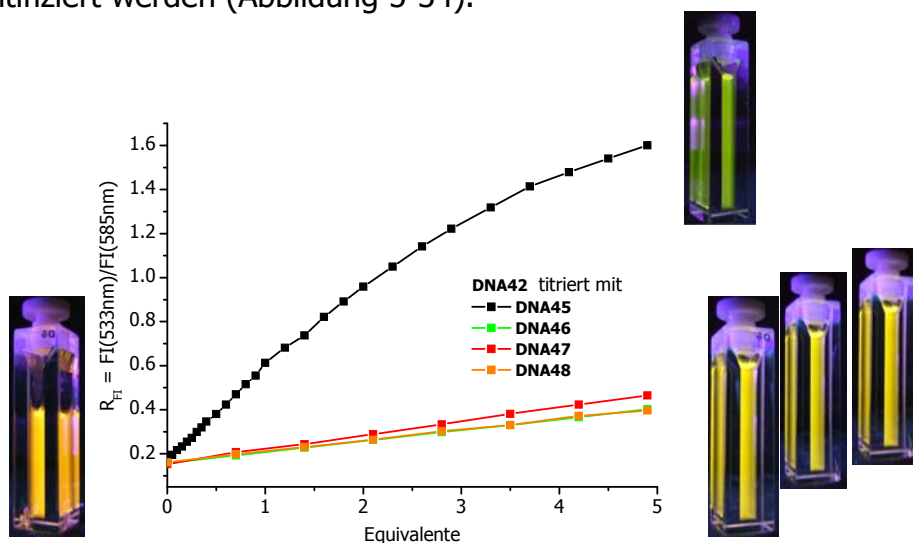


Abbildung 5-34: Auftragung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse  $R_{FI}$  gegen die Äquivalentzugabe von DNA45 zu DNA42 im Vergleich zur ausbleibenden Öffnung des DNA42 bei der Titration mit den DNA-Sequenzen DNA46, DNA47 und DNA48. Foto links: DNA42, Foto rechts oben: DNA42-45, Fotos rechts unten: DNA42-46, DNA42-47 und DNA42-48 (v.l.n.r.).

Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 533 nm und 585 nm steigt im richtig gepaarten Duplex von ca. 0.2 auf 1.6 deutlich an, wohingegen die fehlgepaarten

Varianten nur eine Zunahme von 0.2 auf ca. 0.5 bzw. 0.4 aufweisen, dies entspricht einer Diskriminierung zwischen richtig und fehlgepaartem Duplex von 1:4.

#### 5.2.4. Evaluation der Stammlänge

Optimierte Molecular Beacons weisen meist eine Stammlänge zwischen fünf und sieben Basenpaaren auf.<sup>[58]</sup> DNA42 bildet eine Haarnadel mit einer Stammlänge von 9 Basenpaaren aus, dadurch zeigt die Haarnadel hohe thermische Stabilität und braucht mehrere Äquivalente Gegenstrang, um vollständig geöffnet werden zu können. Folgende DNA-Sequenzen wurden synthetisiert, um systematisch die Stammlänge zu verkürzen, gleichzeitig die Schleife zu vergrößern und diese strukturelle Beeinflussung auf die optischen Eigenschaften des Thiazol-Orange-Dimers zu untersuchen:

**DNA49:** 3'-**GTC-ATOT-TGA**-CTG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-**GTC-ATOT-TGA**-C-5'

**DNA50:** 5'-A-ACT-GAC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-3'

Der Stamm wurde im Vergleich zu DNA42 um ein Basenpaar verkürzt und gleichzeitig die Schleife um ein Basenpaar erweitert. Die Stammlänge beträgt acht Basenpaare.

**DNA51:** 3'-**TCA-TOTT-GAC**-TGT-ACG-TCA-GTT-GAC-TGA-**TCA-TOTT-GA**-5'

**DNA52:** 5'-AA-CTG-ACA-TGC-AGT-CAA-CTG-ACT-AGT-3'

Im Vergleich zu DNA42 wurde ein Basenpaar am Terminus entfernt und ein weiteres Basenpaar durch Fehlpaarung der Schleife zugeordnet. Die Stammlänge beträgt sechs Basenpaare.

**DNA53:** 3'-**C-ATOT-TGG**-CTG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-ATC-**ATOT-TG**-5'

**DNA54:** 5'-A-ACC-GAC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-TAG-T-3'

Es wurde ein Basenpaar am Terminus entfernt und ein weiteres Basenpaar durch Basenfehlpaarung der Schleife zugeordnet. Die Stammlänge beträgt vier Basenpaare.

Abbildung 5-35 gibt einen Überblick über die synthetisierten Haarnadeln, es ist klar zu erkennen, dass die Stämme kürzer und die Schleifen größer werden.

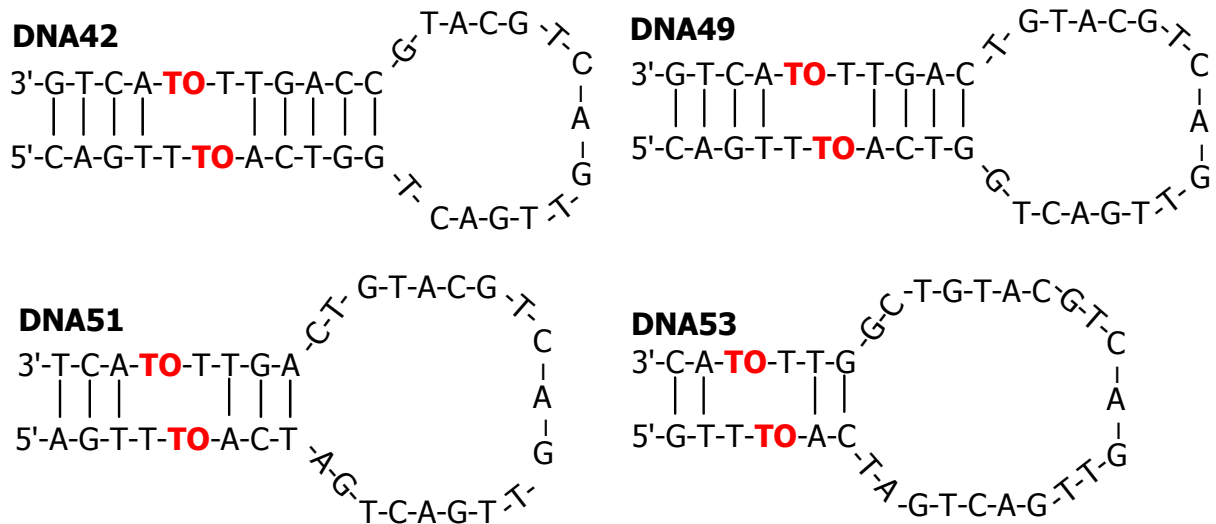


Abbildung 5-35: Haarnadeln aus DNA42, DNA49, DNA51 und DNA53.

Es können nun Haarnadeln mit den Stammlängen von neun, acht, sechs und vier Basenpaaren verglichen werden. In Abbildung 5-36 sind die Absorptionsspektren aller Haarnadeln aufgetragen. Nur DNA42 zeigt Absorptionsbanden, die charakteristisch für dimeres Thiazol Orange sind, mit einem Maximum bei 490 nm und einer Schulter bei 510 nm. DNA49 zeigt ebenfalls ein Maximum bei 490 nm, die Feinstruktur zeigt jedoch Veränderungen gegenüber DNA42.

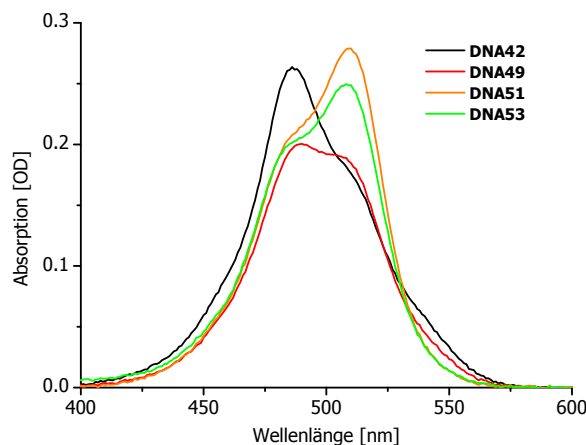


Abbildung 5-36: Absorptionsspektren der Haarnadeln aus DNA42, DNA49, DNA51 und DNA53. 2.5  $\mu$ M, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Die Haarnadeln DNA51 und DNA53 zeigen charakteristische Monomerabsorptionsbanden, mit einem Maximum bei 510 nm.

Obwohl DNA49 im Absorptionsspektrum keine deutliche Monomerabsorptionsbande aufweist, ist im Emissionsspektrum (Abbildung 5-37) die Dimerfluoreszenz zu sehen, die nahezu exakt mit dem Spektrum von DNA42 übereinstimmt.

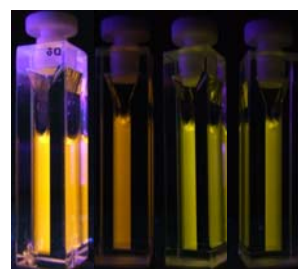
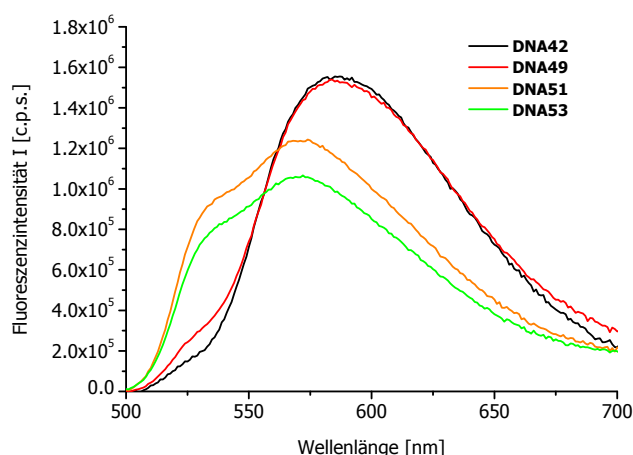


Abbildung 5-37: Emissionsspektren der Haarnadeln aus DNA42, DNA49, DNA51 und DNA53. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA42, DNA49, DNA51, DNA53. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

DNA51 und DNA53 zeigen ein bathochrom verschobenes Maximum im Gegensatz zur Thiazol-Orange-Monomeremission, die Emissionsspektren unterscheiden sich jedoch deutlich von den charakteristischen Emissionsbanden des Thiazol-Orange-Dimers. Die mit einer UV-Lampe angeregten DNA-Lösungen zeigen entsprechend ihrer Emissionsspektren orangefarbene (DNA42 und DNA49) und gelbe Emissionen (DNA51 und DNA53).

Trotz der unvollständigen Ausbildung der Thiazol-Orange-Dimere in den verkürzten Stämmen der Haarnadeln aus DNA49, DNA51 und DNA53, ist eine Unterscheidung zu den ausgebildeten Duplexen in den Emissionsspektren möglich (Abbildung 5-38). Die Duplexe zeigen alle die charakteristische Monomeremission mit einem Maximum bei 530 nm und einer Schulter bei 565 nm.

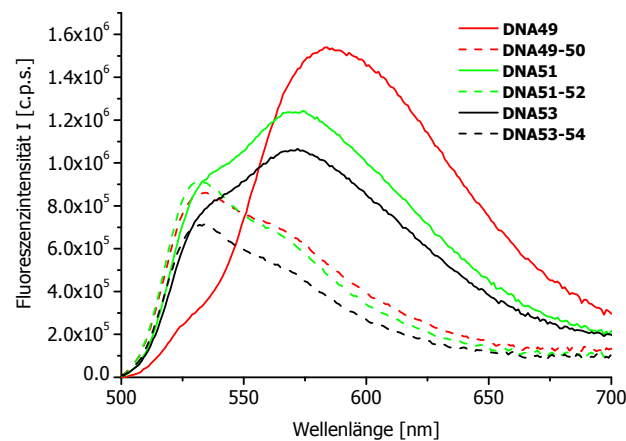


Abbildung 5-38: Emissionsspektren von DNA49, DNA49-50, DNA51, DNA51-52, DNA53 und DNA53-54. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$ .

Es wurden DNA49 und DNA51 mit ihren jeweiligen Gegensträngen DNA50 und DNA52 durch eine Titration geöffnet. Auf die Titration von DNA53 wurde verzichtet, da die spektroskopischen Eigenschaften denen von DNA 59 sehr ähnlich sind.

DNA49 wurde mit DNA50 titriert, eine vollständige Öffnung der Haarnadel ist mit ca. 2.6 Äquivalenten möglich (Abbildung 5-39). Im Absorptionsspektrum (links) ist ein Intensitätsanstieg zu beobachten, dabei ist die Absorptionsbande der Haarnadel Teil der Monomerabsorptionsbande. Es findet also effektiv keine klar zu unterscheidende Verschiebung des Maximums statt. Im Emissionsspektrum (rechts) hingegen sind beide Maxima deutlich voneinander zu unterscheiden.

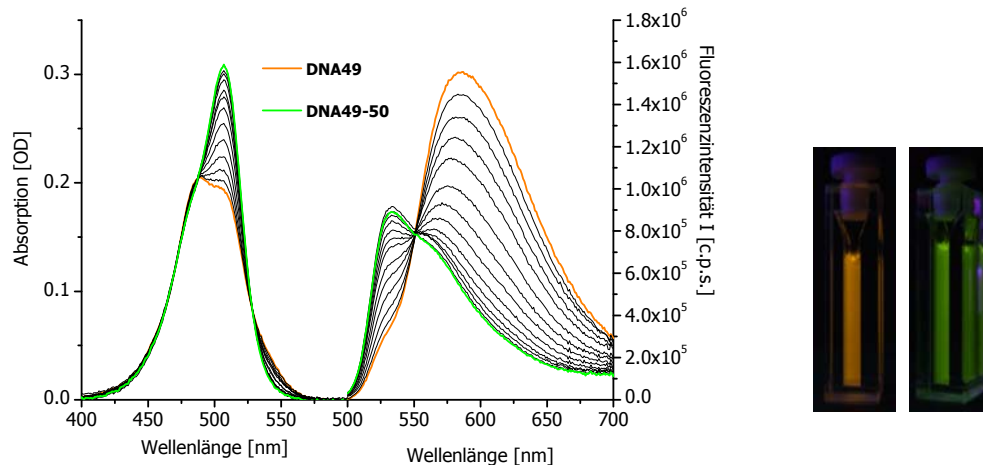


Abbildung 5-39: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) jedes Titrationsschrittes der Titration von DNA49 mit DNA50. 2.5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C. Foto: DNA49 (links), DNA49 titriert mit DNA50. 2.5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Die Emissionsbande, die durch die monomere Form von Thiazol Orange zustandekommt, zeigt eine kleinere Intensität als die Emissionsbande der dimeren Form. Die Emissionsfarbe der Haarnadel und des Duplexes sind auch mit dem Auge zu unterscheiden (Abbildung 5-39, Foto). Die Titration dieser Haarnadel zeigt, dass trotz der unzureichenden Unterscheidung beider Formen des Thiazol-Orange-Chromophors durch Absorption, eine Unterscheidung durch Fluoreszenz möglich ist.

Während der Titration von DNA51 ist im Absorptionsspektrum (links) keine Maximumverschiebung, lediglich ein Intensitätsanstieg ist zu beobachten. Bei DNA51 ist im Emissionsspektrum keine einfache Unterscheidung vom Duplex mehr möglich (Abbildung 5-40, rechts). Es ist eine hypsochrome Maximumverschiebung zu sehen; allerdings ist die Emissionsbande des monomeren Thiazol Oranges ebenfalls Teil der Emissionsbande der dimeren Form des Chromophors. Die optischen Eigenschaften von DNA51 während der Titration deuten darauf hin, dass der Stamm der Haarnadel zu kurz ist.

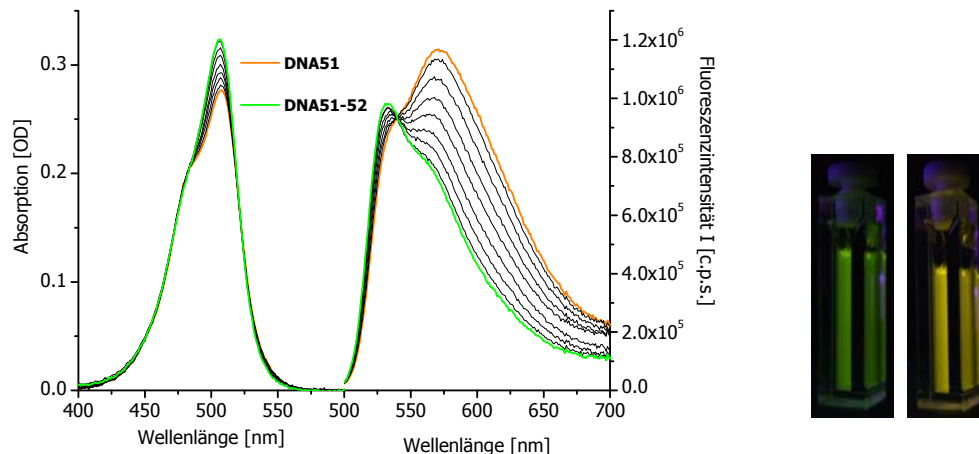


Abbildung 5-40: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) jedes Titrationsschrittes der Titration von DNA51 mit DNA52. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490$  nm, 20 °C. Foto: DNA51 (links), DNA51 auftitriert mit DNA52. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Auch mit bloßem Auge kann man erkennen, dass die Dimerausbildung beider Thiazol-Orange-Chromophore unvollständig sein muss (Abbildung 5-40). Die Emissionsfarbe von DNA51 ist gelb und nicht orange, wie bei DNA42. Die Titration ist bereits mit 1.6 Äquivalenten beendet, eine Folge des kurzen Stamms der Haarnadel.

Trägt man jeweils die Fluoreszenzintensitätsverhältnisse gegen die Äquivalente eines jeden Titrationsschrittes auf (Abbildung 5-41), wird deutlich, dass DNA51 nicht für analytische Zwecke geeignet ist. Die Haarnadel aus DNA51 weist einen  $R_{\text{FI}}$ -Wert von ca. 0.8 auf, wohingegen die beiden anderen Haarnadeln beide einen Wert von ca. 0.2 zeigen. Die  $R_{\text{FI}}$ -Werte liegen nach den Titrationen alle bei ungefähr 1.65. Die Titration von DNA49 mit DNA50 weist in Abbildung 5-41 einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf und liegt mit 2.6 Äquivalenten in einem für analytische Zwecke gut geeigneten Rahmen. Auch die Schmelztemperatur von 67.4 °C erscheint geeigneter, als die Schmelztemperatur von DNA42 (77.0 °C) (Tabelle 5-3). Zu hohe Schmelztemperaturen sorgen für zu hohe Stabilitäten der Haarnadeln und verringern die Sensitivität eines Molecular Beacons.



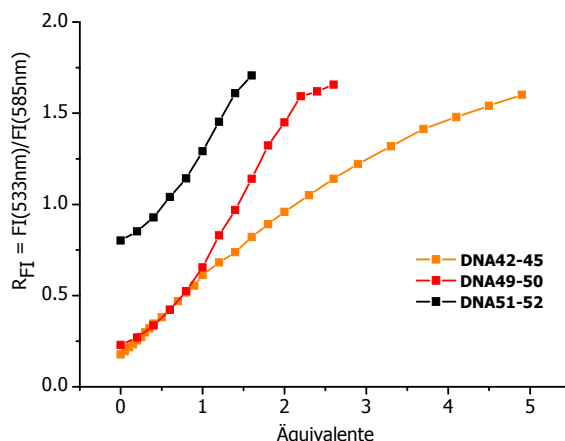


Abbildung 5-41: Auftragung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse  $R_{FI}$  gegen die Äquivalente der drei Titrationsexperimente mit DNA42, DNA49 und DNA51.

Die charakteristischen Daten (Tabelle 5-3) zeigen deutlich: Je kürzer die Stammlänge, desto instabiler die Haarnadel. Der  $R_{FI}$ -Wert nimmt mit abnehmender Schmelztemperatur zu.

Tabelle 5-3: Charakteristische Daten der Haarnadeln aus DNA42, DNA49 und DNA51. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{exc}$  = 490 nm, 20 °C.

DNA	Stammlänge	$R_{FI}$	Äquivalente	Schmelztemperatur
<b>DNA42</b>	9 bp	0.17	4.9	77.0 °C
<b>DNA49</b>	8 bp	0.23	2.6	67.4 °C
<b>DNA51</b>	6 bp	0.80	1.6	64.0 °C

Die Analyse verschiedener Stammlängen hat gezeigt, dass das Thiazol-Orange-Dimer längere und damit stabilere Stämme benötigt. Ist der Stamm zu kurz, ist es nicht möglich, ein excitonisch gekoppeltes Dimer auszubilden. Dies könnte daran liegen, dass beide Thiazol-Orange-Chromophore nicht interkalieren, sondern sich an die kleine Furche der DNA anlagern und dort miteinander wechselwirken. Ist es aufgrund einer zu kurzen Sequenz nicht möglich, dass sich der entstehende Duplex windet und eine kleine Furche ausbildet, ist auch keine Möglichkeit für die Ausbildung eines Thiazol-Orange-Dimers gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass für eine Anwendung des TO-Dimers in einem Molecular Beacon, eine Stammlänge von

mindestens acht Basenpaaren erforderlich ist. Die in der Literatur angegebene Stammlänge von fünf bis sieben Basenpaaren<sup>[87]</sup> kann also nur für herkömmliche Molecular Beacons gelten und nicht als generell gültig verstanden werden. In jedem Fall ist individuell zu entscheiden, welches Design für welche Fluoreszenzmarkierung eines Molecular Beacons zu wählen ist.

### 5.2.5. Molecular Beacons mit doppeltem TO-Dimer

Das Thiazol-Orange-Dimer weist mit einer Quantenausbeute von ungefähr 8 % nur eine geringe Helligkeit auf. Um die Fluoreszenzintensität zu erhöhen, wurde das Thiazol-Orange-Paar zweimal in den Stamm einer DNA-Haarnadel eingebaut. Folgende DNA-Sequenzen wurden synthetisiert:

**DNA55:** 3'-TCA-**TOTTO**-TAC-GTA-CGT-CAG-TTG-ACT-GT**TO**-**TO**T-TGA-5'

**DNA56:** 5'-ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CA-3'

**DNA57:** 5'-AGT-T--A-T---ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CAT—A-TA-ACT-3'

**DNA58:** 3'-CA**TO**-TT**TO**-TAC-GTA-CGT-CAG-TTG-ACT-GT**TO**-TA**TO**-TTG-5'

**DNA56:** 5'-ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CA-3'

**DNA59:** 5'-GT-T--AA-T--ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CAT—AT-T--AAC-3'

Die Haarnadeln wurden jeweils mit zwei verschiedenen Gegensträngen hybridisiert. DNA56 ist der kürzere von beiden, zu beiden Haarnadeln komplementär und reicht jeweils bis zu den ersten Thiazol-Orange-Chromophoren. DNA57 und DNA59 sind jeweils voll komplementär zu den Haarnadeln und bilden einen Duplex, der über alle vier Thiazol-Orange-Chromophore hinweg geht.

Wie in Abbildung 5-42 zu sehen ist, sind in DNA55 beide Chromophorenpaare direkt hintereinander in den Stamm eingebaut. In DNA58 hingegen befindet sich ein AT-Basenpaar zwischen den beiden Dimerpaaren, das in der Abbildung 5-42 grün markiert ist. DNA42 dient in der Messreihe als Referenz mit nur einem Dimer.

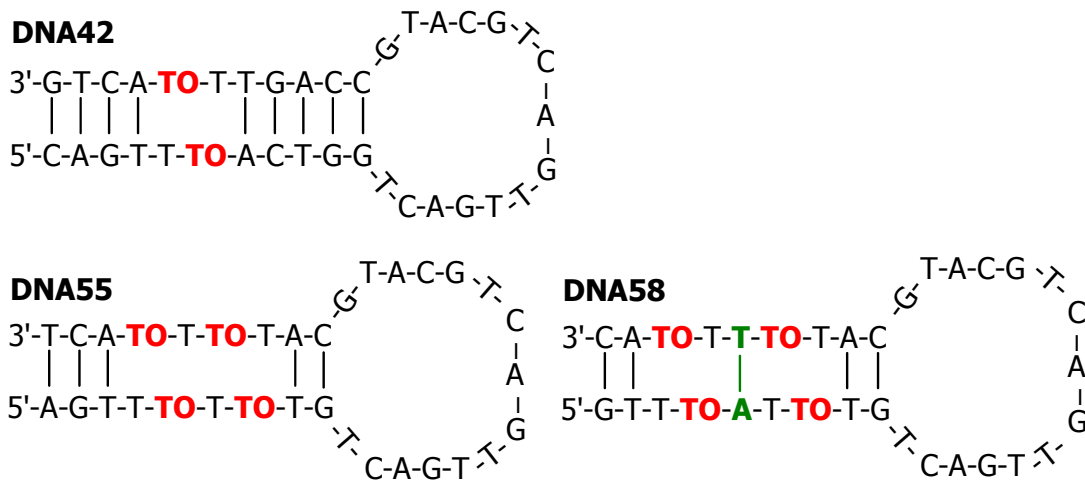


Abbildung 5-42: Haarnadeln aus DNA42, DNA55 und DNA58.

Es wird zunächst DNA55 in seiner Haarnadelform und als Duplex im Vergleich zu DNA42 betrachtet (Abbildung 5-43). DNA55 zeigt deutliche Unterschiede im Vergleich zu DNA42. Die Absorptionsintensität ist ungefähr doppelt so hoch, was aber bei der doppelten Anzahl an Chromophoren zu erwarten war.

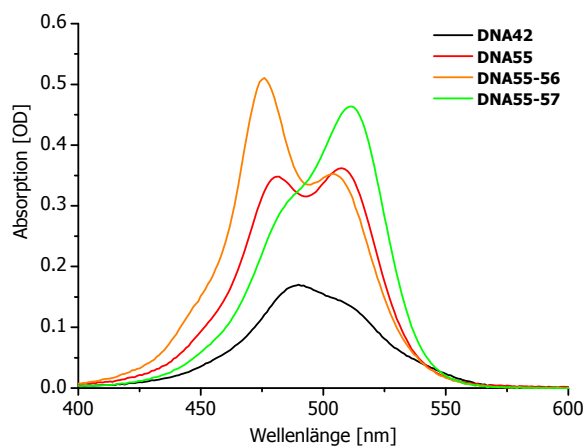


Abbildung 5-43: Absorptionsspektren der Haarnadeln aus DNA42 und DNA55, sowie der Duplexe DNA55-56 und DNA55-57. 2.5  $\mu$ M, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Das Absorptionsspektrum von DNA55 zeigt zwei Maxima, eines bei 480 nm, was im Vergleich zu DNA42 um knapp 10 nm hypsochrom verschoben ist, und ein weiteres Maximum bei 507 nm, was dem Absorptionsmaximum eines monomeren Thiazol Oranges entsprechen würde. Die starke hypsochrome Verschiebung, stärker als bei

DNA42, geht einher mit den typischen Eigenschaften eines H-Aggregates: Je größer dieses ist, desto stärker der hypsochrome Shift.<sup>[164, 167]</sup> Dies konnte so auch bei den Chromophorenstapeln in Kapitel 4.5 beobachtet werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass sich die Haarnadel nicht vollständig ausbildet und das Absorptionsspektrum eine Mischung aus Monomer- und Dimerabsorption widerspiegelt.

DNA55-56 zeigt ein Maximum bei 476 nm, dies ist noch einmal eine deutliche hypsochrome Verschiebung im Vergleich zur Absorptionsbande von DNA55-56, und eine Schulter bei 504 nm. Dieses Absorptionsverhalten deutet darauf hin, dass der kurze Gegenstrang DNA56 nicht in der Lage ist, das Gleichgewicht aus dimerer und monomerer Anordnung der Chromophore vollständig auf die Seite der Monomere zu verschieben. Es könnte möglich sein, dass sich zwar, wie in Abbildung 5-44 gezeigt, ein Duplex bildet, es jedoch den Chromophoren immer noch möglich ist miteinander zu wechselwirken.

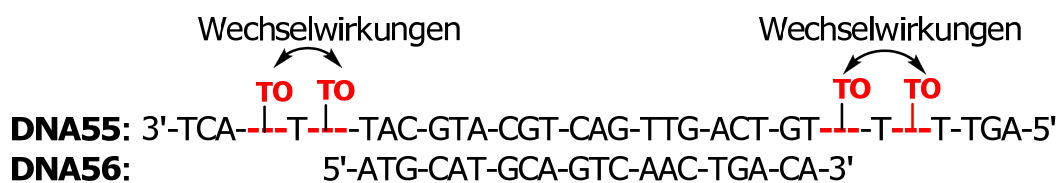


Abbildung 5-44: Schematische Darstellung des Duplexes DNA55-56. Pfeile deuten die Wechselwirkung der Thiazol-Orange-Chromophore untereinander an.

DNA55-57 hingegen zeigt die Absorptionsbanden, die charakteristisch sind für monomeres Thiazol Orange. Nur durch die vollständige Duplexausbildung über alle Chromophore hinweg ist eine Separation der Farbstoffe möglich und Wechselwirkungen werden verhindert.

DNA55 zeigt eine breite Emissionsbande, ohne Feinstruktur, das Maximum liegt jedoch in einem Bereich, der dem Monomermaximum zuzuordnen ist (Abbildung 5-45).

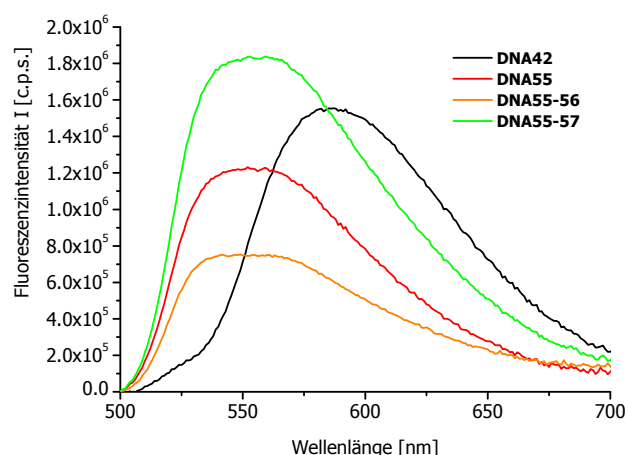


Abbildung 5-45: Emissionsspektren der Haarnadeln aus DNA42 und DNA55, sowie der Duplexe DNA55-56 und DNA55-57. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$ .

Es wird deutlich, dass es zu keiner vollständig ausgebildeten Haarnadel kommt oder dass ein benachbartes Thiazol-Orange-Chromophor die Dimerbildung stört. DNA55-56 zeigt lediglich eine Fluoreszenzlöschung, an der Emissionsbande mit Maximum und Struktur ändert sich nichts. DNA55-57 zeigt eine Steigerung der Emissionsintensität, allerdings ist auch hier im Maximum und der Struktur kein Unterschied im Vergleich zu DNA55 zu beobachten. Es ist also nicht möglich, eine Steigerung der Helligkeit der Sonde durch doppelten Einbau der TO-Dimere zu erreichen. Es scheint, als ob hier die Chromophore sich in ihrer Wechselwirkung untereinander beeinflussen, jedoch nicht auf additive Weise.

Die Haarnadel aus DNA58 weist zwischen beiden Thiazol-Orange-Dimeren ein zusätzliches AT-Basenpaar auf. Es wurde versucht, dadurch einen größeren Abstand zwischen den TO-Paaren zu erreichen, so dass eine Wechselwirkung und Störung untereinander vermieden wird. Das Absorptionsspektrum (Abbildung 5-46) zeigt keine Unterschiede im Vergleich zu DNA55. DNA58 weist ebenfalls zwei Absorptionsmaxima bei 482 nm und 508 nm auf, durch Hybridisierung mit DNA56 ist ein ähnlicher hypsochrome Shift zu 476 nm zu beobachten wie bei DNA55-56.

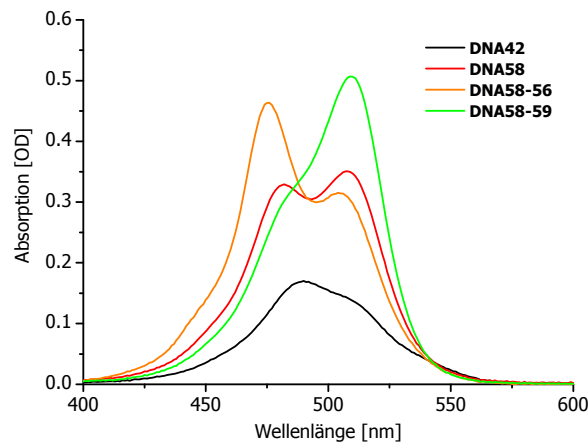


Abbildung 5-46: Absorptionsspektren der Haarnadeln aus DNA42 und DNA58, sowie der Duplexe DNA58-56 und DNA58-59. 2,5  $\mu$ M, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

DNA58-59 zeigt eine veränderte Absorption im Vergleich zu DNA58, dies deutet darauf hin, dass die Chromophore voneinander separiert sind und dadurch keine Wechselwirkungen mehr möglich sind. Es ist ein Maximum bei 510 nm zu verzeichnen, das charakteristisch für die Monomerabsorption ist.

DNA58 zeigt im Emissionspektrum (Abbildung 5-47) ein Maximum bei 564 nm, was auf dimere Wechselwirkungen der Chromophore hindeutet. Allerdings sind der bathochrome Shift und die Emissionsintensität nicht so stark ausgeprägt wie bei DNA42. Wird DNA58 mit DNA56 hybridisiert, ist eine Intensitätsabnahme zu verzeichnen, es ist auch kein deutliches Maximum mehr zu beobachten.

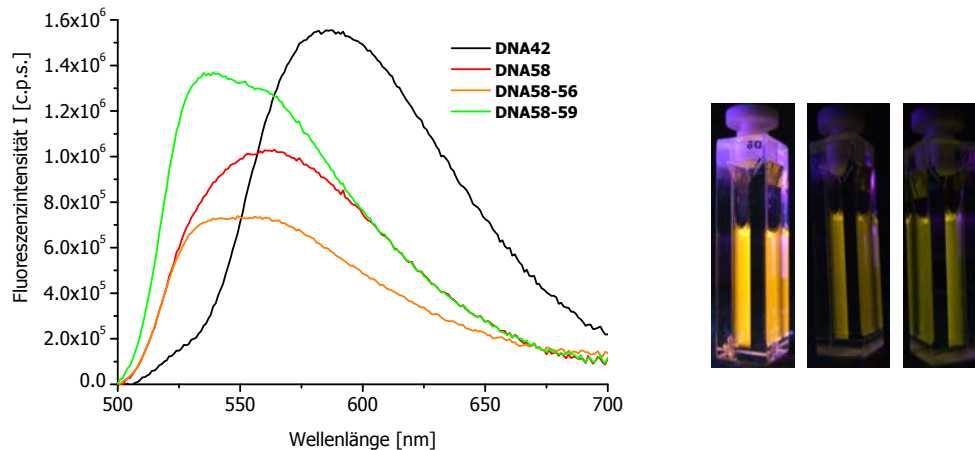


Abbildung 5-47: Emissionsspektren der Haarnadeln aus DNA42 und DNA58, sowie der Duplexe DNA58-56 und DNA58-59. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA42, DNA55 und DNA58. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

DNA58-59 zeigt eine Emissionsverschiebung zur charakteristischen Monomeremission. Diese Resultate verdeutlichen, dass ein Basenpaar zwischen den beiden Dimeren nicht ausreicht, um die Chromophore voneinander zu separieren. Ein doppelter Dimereinbau in den Stamm eines Molecular Beacon scheint nicht möglich zu sein, da zu viele Basenpaar für eine Separation der Chromophore benötigt würden und dadurch die Haarnadel eine zu hohe Stabilität aufweisen würde und nicht mehr geöffnet werden könnte. Die mit einer UV-Lampe angeregten DNA-Lösungen (Abbildung 5-47, Foto) von DNA55 und DNA58 zeigen zwar eine gelbe Emissionsfarbe, bei einem Vergleich mit DNA42 jedoch wird deutlich, dass ein doppelter Dimereinbau nicht die gewünschte Intensitätssteigerung erzielt.

## 6. Thiazol Orange in RNA

RNA unterscheidet sich in drei wesentlichen Teilen von DNA:

- Sie ist aus Ribose aufgebaut, DNA hingegen aus 2'-Deoxyribose,
- Adenin paart mit Uracil, statt mit Thymin wie in DNA,
- Sie kommt in Zellen hauptsächlich als Einzelstrang vor, DNA hingegen liegt meist als Doppelhelix vor.

Diese drei Unterschiede haben große Auswirkungen auf das Oligonukleotid. Durch die zusätzliche Hydroxygruppe an der 2'-Position der Riboseeinheit wird das Molekül chemisch instabiler. RNA ist beteiligt bei der Weitergabe genetischer Information und trägt entschieden zur Proteinbiosynthese bei. Da diese Informationen nicht dauerhaft in der Zelle vorliegen dürfen, ist es sinnvoll, dass RNA zügig wieder abgebaut werden kann, um beispielsweise Überexpressionen von Genen zu vermeiden.

Ein weiterer Effekt der zusätzlichen Hydroxygruppe ist, dass RNA keine C2'-endo, sondern eine C3'-endo Zuckerkonformation ausbildet (Abbildung 6-1).

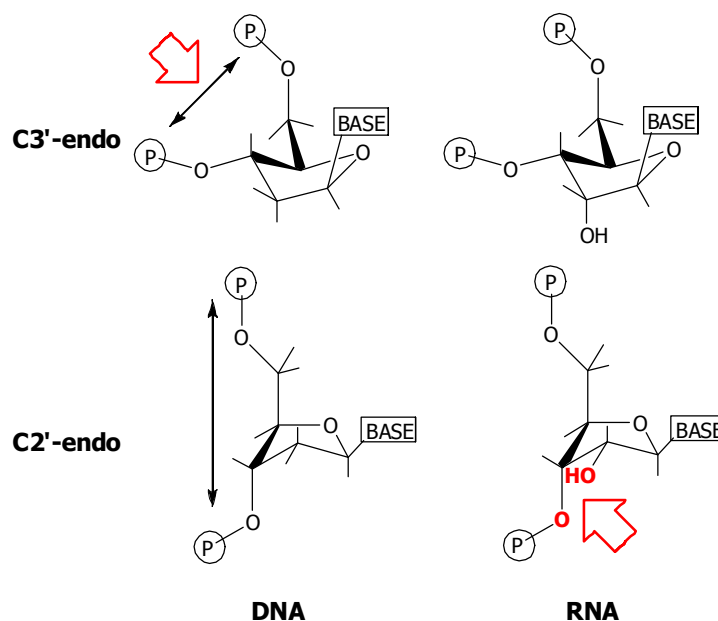


Abbildung 6-1: Vergleich der Zuckerkonformationen von DNA und RNA.

DNA besitzt eine C2'-endo Zuckerkonformation, weil hier die Phosphatgruppen weiter voneinander entfernt sind, als bei einer C3'-endo Zuckerkonformation (7.0 Å statt 5.9 Å), wodurch diese sich weniger stark abstoßen. RNA hingegen bevorzugt den C3'-end



---

Zuckerkonformation, weil hier die zusätzliche Hydroxygruppe und die C3'-Phosphatgruppe weiter voneinander entfernt sind und sich weniger abstoßen. Die C3'-endo Zuckerkonformation der RNA ist der Grund dafür, dass RNA keine B-Helix ausbildet, sondern eine A-Helix. Abbildung 6-2 zeigt links einen RNA-Duplex und rechts den entsprechenden DNA-Duplex mit vergleichbarer Sequenz. Es fällt sofort auf, dass die B-DNA deutlich gestreckter und schmaler ist als die A-RNA. Die A-Helix wirkt gedrungener, kompakter und ist deutlich breiter.

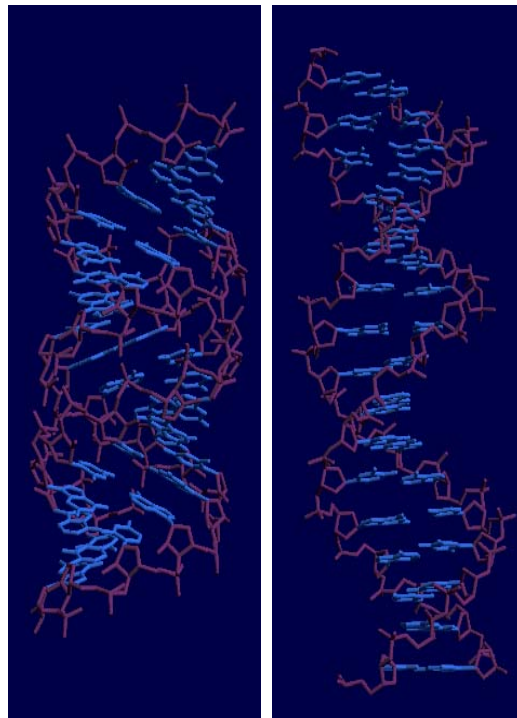


Abbildung 6-2: Geometrisch optimierte Modelldarstellung äquivalenter RNA- (links) und DNA-Sequenzen (rechts).

Für die Funktionen von RNA in der Zelle ist es von entscheidender Bedeutung, dass sie in mehrere, im Gleichgewicht befindliche Sekundärstrukturen falten kann. Sekundärstrukturen können sich wiederum zu Tertiärstrukturen zusammenlagern, diese können katalytisch aktiv sein (Ribozyme)<sup>[236-248]</sup> oder regulierend in Zellprozesse einzugreifen (Riboschalter).<sup>[249-256]</sup>

Damit erweist sich RNA als geeigneter Angriffspunkt, um in die Biochemie der Zelle einzugreifen, nicht nur, um Vorgänge in Zellen verstehen zu lernen, sondern auch um therapeutisch einzugreifen, wenn es zum Beispiel um die Expression von

Onkogenen geht. RNA ist inzwischen einfach zu synthetisieren und kann genau wie DNA mit organischen Chromophoren markiert werden, allerdings ist die Bandbreite fluoreszenter Analytik noch nicht so weit entwickelt wie bei DNA.<sup>[257]</sup> RNA wird meist durch „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“ (FISH) <sup>[258, 259]</sup> detektiert oder durch Molecular Beacons.<sup>[61]</sup> Fluoreszente Basenpaare reflektieren Hybridisierung oder Basenfehlpaarungen<sup>[260-262]</sup>, außerdem konnte RNA auch über Templatreaktionen<sup>[263]</sup> in lebenden Zellen abgebildet werden.

Um einen Beitrag zur Weiterentwicklung fluoreszenter RNA-Analytik zu leisten und neue Möglichkeiten zu eröffnen, die die duale Markierung mit Thiazol Orange eröffnet, wurde der Chromophor in RNA-Sequenzen eingebaut, die den Sequenzen der in Kapitel 4 diskutierten DNA-Sequenzen entsprechen. Dadurch ist ein genauer Vergleich zwischen Thiazol-Orange-markierter RNA und DNA möglich und eröffnet eventuell neue Möglichkeiten der Fluoreszenzmarkierungen für RNA-Analytik.

### ***6.1 TO-Monomer und TO-Dimer in RNA***

Folgende RNA Sequenzen wurden synthetisiert:

**RNA1:** 3'-CAG-UCA-GUU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA2:** 5'-GUC-AGU-CAA-CUG-CAU-GC-3'

Dieser Duplex dient als Referenzduplex für Schmelztemperature und für CD-Messungen.

**RNA3:** 3'-CAG-UCA-TOUU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA2:** 5'-GUC-AGU--C-AA-CUG-CAU-GC-3'

Dieser Duplex enthält das Thiazol Orange als Monomer und weist die gleiche Sequenz auf wie DNA3-2.

**RNA3:** 3'-CAG-UCA-TOUU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA4:** 5'-GUC-AGU-UTOA-CUG-CAU-GC-3'

Dieser Duplex enthält das Thiazol Orange als Dimer und weist die gleiche Sequenz auf wie DNA3-4.

**RNA4:** 5'-GUC-AGU-UTOA-CUG-CAU-GC-3'

**RNA1:** 3'-CAG-UCA-G-U-U-GAC-GUA-CG-5'

In Abbildung 6-3 sind die Absorptionsspektren der vergleichbaren RNA- und DNA-Sequenzen aufgetragen. RNA3 zeigt ein Maximum bei 510 nm und eine Schulter bei 490 nm, dies entspricht der charakteristischen Absorption von monomerem Thiazol Orange. RNA4 hingegen zeigt die charakteristischen Absorptionsbanden des Thiazol-Orange-Dimers. Dies liegt vermutlich daran, dass die Einzelstränge in kurzen Teilsequenzen selbstkomplementär sind und hybridisiert vorliegen, so dass beide Thiazol-Orange-Chromophore miteinander wechselwirken können.

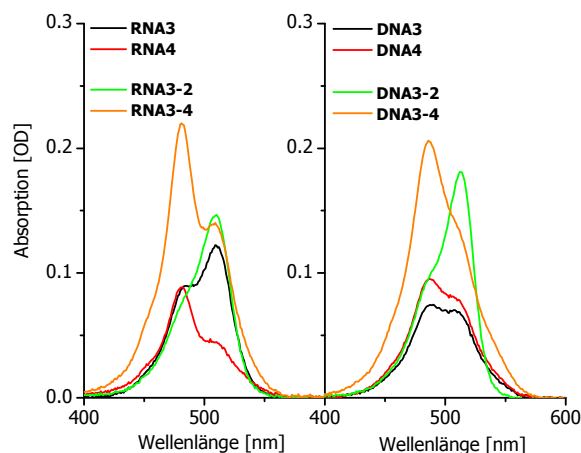


Abbildung 6-3: Absorptionsspektren von RNA3, RNA4, RNA3-2 und RNA3-4 (links), sowie DNA3, DNA4, DNA3-2 und DNA3-4 (rechts). 2.5  $\mu$ M, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Dies konnte durch Hybridisierungsexperimente nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6-4). Wird der Einzelstrang RNA4 auf 90 °C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, bildet sich ein kurzer teilkomplementärer Duplex, der zwei Thiazol-Orange-Chromophore in räumliche Nähe zueinander bringt. Es bildet sich ein Thiazol-Orange-Dimer, der die entsprechenden typischen optischen Eigenschaften bei 20 °C zeigt. Wird die Absorption dieses Duplexes bei 70 °C gemessen, zeigen sich die typischen optischen Eigenschaften des Thiazol-Orange-Monomers, da die Oligonukleotide bei hohen Temperaturen wieder dehybridisiert vorliegen und dadurch die Chromophore separiert werden.

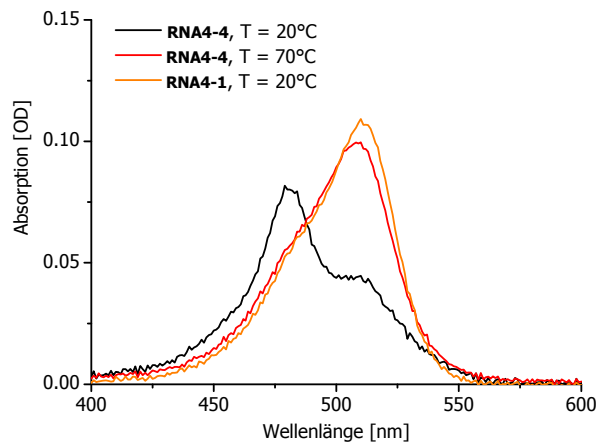


Abbildung 6-4: Hybridisierungsexperimente mit RNA4 bei unterschiedlichen Temperaturen.

Im Absorptionsspektrum (Abbildung 6-3) zeigt RNA3-2 die typischen Absorptionsbanden des Thiazol-Orange-Monomers. Die leichten Unterschiede in der Intensität im Vergleich zu den Absorptionsspektren der DNA-Sequenzen, lassen sich durch die Sensibilität des Chromophors auf seine Basenumgebung erklären.<sup>[213]</sup> Das Absorptionsspektrum von RNA3-4 zeigt die erwarteten Banden von dimerem Thiazol Orange mit einem Maximum bei 490 nm und einer deutlich ausgeprägten Schulter bei 510 nm. Diese Schulter ist stärker ausgeprägt im Vergleich zu den DNA-Sequenzen. Insgesamt lässt sich allerdings feststellen, dass die UV/VIS-Charakterisierung der synthetisierten RNA Sequenzen kaum Unterschiede im Vergleich zu den DNA-Sequenzen aufweisen.

Die Emissionen der RNA-Sequenzen hingegen weisen deutlichere Unterschiede im Vergleich zu den DNA-Sequenzen auf. RNA3 zeigt Monomeremission mit einem Maximum bei 490 nm, RNA4 hingegen weist die charakteristischen Dimeremissionsbande auf. Beide Einzelstrangemissionen sind deutlich geringer in der Intensität als die Duplexemissionen. RNA3-2 und RNA3-4 zeigen die erwarteten Emissionsbanden in ähnlicher starker Intensität, allerdings ist die Fluoreszenzintensität deutlich geringer als die der DNA-Sequenzen. Bei sorgfältigem Vergleich der Emissionsmaxima wird deutlich, dass die bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums vom Monomer zum Dimer der RNA-Sequenzen nicht so groß ist wie bei den DNA-Sequenzen. RNA3-4 besitzt ein Maximum von 574 nm, DNA3-4 zeigt ein Maximum bei 588 nm.

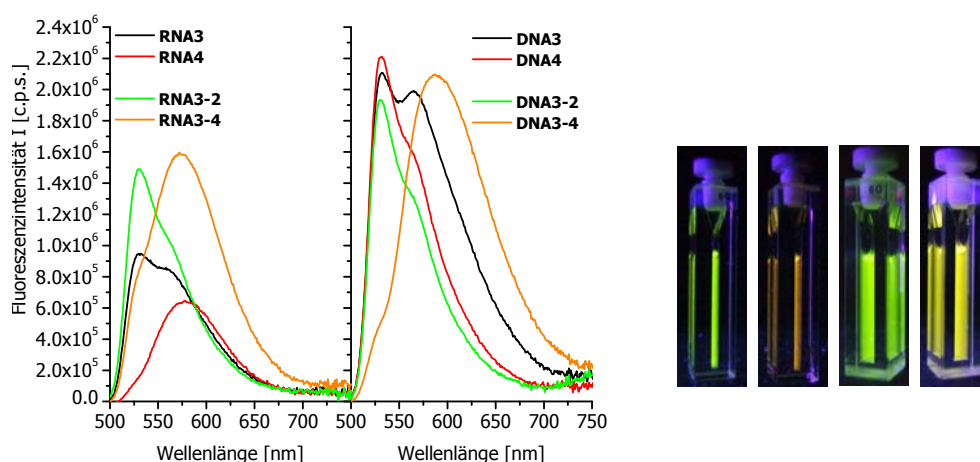


Abbildung 6-5: Emissionsspektren von RNA3, RNA4, RNA3-2 und RNA3-4 (links), sowie DNA3, DNA4, DNA3-2 und DNA3-4 (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ , 20 °C. Foto von links nach rechts: DNA3-2, DNA3-4, RNA3-2 und RNA3-4. 2.5  $\mu\text{M}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt mit einer herkömmlichen UV-Lampe.

Dieser Unterschied ist mit bloßem Auge zu erkennen. Die mit einer einfachen UV-Lampe angeregten RNA-Lösungen zeigen die grüne Emissionsfarbe des Thiazol-Orange-Monomers bei RNA3-2, jedoch eine gelbe Fluoreszenz bei Duplex RNA3-4, der das Thiazol-Orange-Dimer enthält. DNA3-2 zeigt die typische grüne Monomer Emissionsfarbe, sowie die orangefarbene Fluoreszenz bei DNA3-4.

Das geometrisch optimierte Modell von Duplex RNA3-4 (Abbildung 6-6) zeigt die weite und flache kleine Furche der A-Helix. Die Thiazol-Orange-Chromophore lagern sich antiparallel zueinander an, sie stehen sich jedoch nicht „genau gegenüber“. Dies könnte der Grund sein, warum die Emissionsverschiebung nur bis 574 nm geht und nicht bis 585 nm, wie es bei den DNA-Sequenzen zu beobachten war. Auf der Basis des Modells ist anzunehmen, dass für die typischen optischen Eigenschaften des TO-Dimers, eine Fixierung der beiden Chromophore durch die kleine Furche erforderlich ist, wie es bei einer DNA B-Helix der Fall ist. Die A-Helix der RNA scheint dies nur zu einem kleinen Teil zu

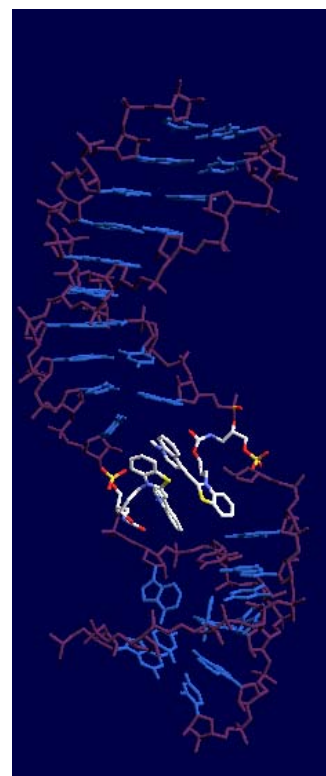


Abbildung 6-6: Geometrisch optimierte Modelldarstellung von RNA3-4.

gewährleisten.

Die Destabilisierung der RNA-Duplexe durch ein monomeres Thiazol Orange ist mit 7.7 °C relativ groß, die Schmelztemperatur des unmodifizierten Duplexes beträgt 75.9 °C. Die Inkorporation eines zweiten Thiazol-Orange-Chromophors führt hingegen nicht zu einer weiteren Destabilisierung des Duplexes. Offensichtlich kann durch die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen der Chromophore untereinander, die durch den eingesetzten Linker verlorene thermische Stabilität wiedergewonnen werden. Daher kann das Thiazol-Orange-Dimer als hydrophobes, diagonal interagierendes artifizielles Basenpaar betrachtet werden. Das Konzept der dualen Markierung von DNA-Duplexen mit Thiazol Orange lässt sich demnach auf RNA übertragen. Die Quantenausbeuten von bis zu 22 % mit einer Stokes-Verschiebung von ungefähr 100 nm machen dieses Fluoreszenzlabel zu einem interessanten Kandidaten für RNA-Analytik und für weitere Imaging-Experimente, wie im nächsten Kapitel beschrieben.

Tabelle 6-1: Charakteristische Daten der Duplexe RNA3-2 und RNA3-4. 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm, 20 °C.

RNA	FI <sub>max</sub> /nm	$\Phi$	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>RNA3-2</b>	531	0.22	2.22	68.2	-
<b>RNA3-4</b>	573	0.18	0.59	67.0	67.0

## 6.2 Cell Imaging

Die Bioanalytik von Zellen, die Visualisierung von Nukleinsäuren und deren Verteilung in lebenden Zellen, setzt die Markierung von Oligonukleotiden mit Fluorophoren, die kovalent an bestimmten Positionen innerhalb der Sequenz gebunden werden, voraus. Durch unerwünschte Fluoreszenzlöschungen, die beispielsweise durch Ladungstransfers oder durch Artefakte in der Emissionsanregung entstehen können, kann es zu falschen Messsignalen und damit zu verfälschten Ergebnissen kommen. Durch duale Fluoreszenzmarkierung können solche Probleme umgangen werden, da sich bei der Erkennung eines Zielstranges die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums ändert und damit die Farbe der Emission. Hier zeigen sich die Vorteile des Thiazol-Orange-Chromophors: Beide Emissionsmaxima sind mit bloßem Auge voneinander

unterscheidbar, das Monomer erscheint grün (533 nm), wohingegen das Dimer eine orangefarbene Emission aufweist (585 nm). Außerdem besitzt Thiazol Orange im angeregten Zustand ein Redoxpotential, das es unmöglich macht, eine der natürlichen Nukleobasen zu oxidieren oder zu reduzieren. Da das Thiazol-Orange-Dimer-Konzept von DNA auf RNA übertragbar ist (siehe Kapitel 6.1) und eine Anwendung im zellbiologischen Bereich sinnvoll erscheint, wurden folgende RNA-Duplexe in CHO-K1-Zellen mikroinjiziert, um zu sehen, ob die Unterscheidung beider Fluoreszenzmaxima und damit der Emissionsfarben unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich ist:

**RNA3:** 3'-CAG-UCA-**TO**UU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA4:** 5'-GUC-AGU-**U****TO**A-CUG-CAU-GC-3'

**RNA3:** 3'-CAG-UCA-**TO**UU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA2:** 5'-GUC-AGU--C-AA-CUG-CAU-GC-3'

Abbildung 6-7 zeigt Zellen, die mit RNA3-4 (oben) bzw. mit RNA3-2 (unten)

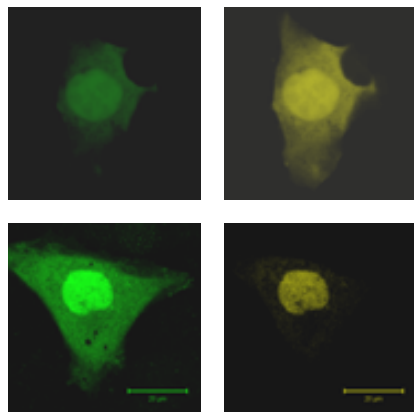


Abbildung 6-7: RNA3-4 (obere Reihe), RNA3-2 (untere Reihe).

mikroinjiziert worden sind. Die Fluoreszenz der markierten RNA in den Zellen wurde jeweils von 500 nm bis 550 nm (grüner Kanal) und von 570 nm bis 640 nm (gelber Kanal) aufgenommen. Es ist sehr schön zu sehen, dass die Zellen, die mit RNA3-4 injiziert worden sind (oben), eine intensive gelbe Emissionsfarbe aufweisen. Ebenso zeigen die Zellen, die mit RNA3-2 injiziert wurden, eine intensive grüne Farbe. Dass jeweils beide Fluoreszenzfarben zu sehen sind, liegt daran, dass die Fluoreszenz des Dimers die Fluoreszenz des Monomers teilweise überlagert und

umgekehrt. Es existieren also beide Farben in beiden Erscheinungsformen des Chromophors, nur ist jeweils eine Farbe stärker ausgeprägt. Die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten bei 533 nm und 585 nm betragen in den Zellen 0.8 für RNA3-4 und 2.4 für RNA3-2. Dies entspricht ungefähr den Werten, die für die RNA-Lösungen errechnet wurden (siehe Tabelle 6-1).

Um die beiden Emissionsmaxima weiter voneinander zu separieren, wurde in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* die Methinbrücke des Thiazol Oranges um zwei weitere Kohlenstoffe verlängert (siehe Abbildung 6-8).

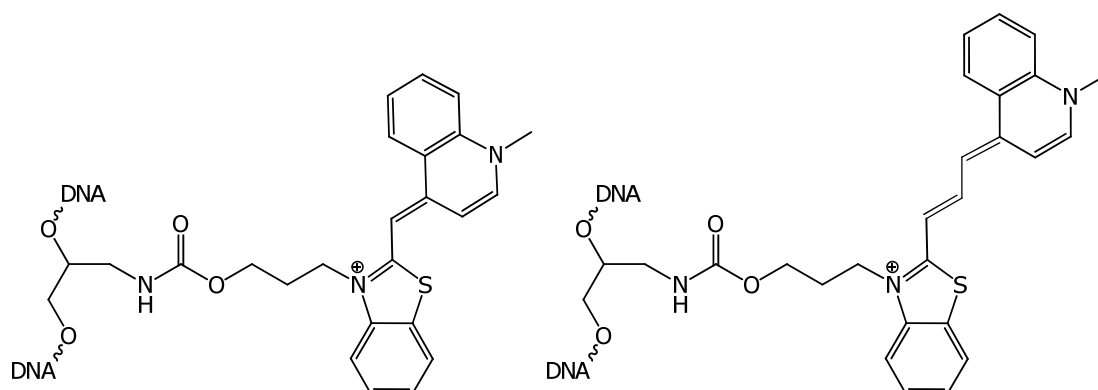


Abbildung 6-8: Thiazol Orange TO (links), Thiazol-Orange-Derivat TO3 (rechts).

Tatsächlich verschiebt sich das Maximum der Emission des Monomers von 530 nm um ca. 130 nm auf 660 nm.<sup>[211]</sup> Eine diagonale Anordnung zweier TO3-Chromophore führte jedoch nicht zu einer Dimerbildung mit entsprechend veränderten optischen Eigenschaften, wie es mit den TO-Chromophoren der Fall war.

**DNA60:** 3'-CAG-TCA-**TO3**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT--T-**TOA**-CTG-CAT-GC-3'

**DNA60** wurde von Carolin Holzhauser synthetisiert und zur Verfügung gestellt.<sup>[211]</sup>

Die Kombination von TO3 und TO (DNA60-4) resultiert in einem FRET von TO auf TO3, der zu einer Emissionsmaximumsverschiebung von 530 nm zu 668 nm führt (Abbildung 6-9). TO wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen als FRET-Donor verwendet.<sup>[148, 157]</sup>



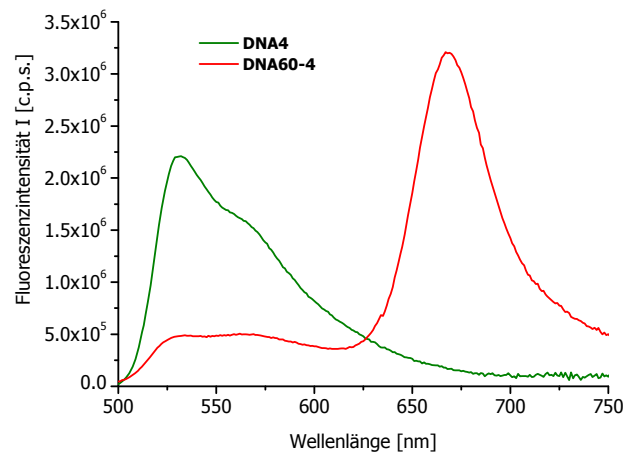


Abbildung 6-9: Emissionsspektrum von DNA4 und DNA60-4. 2.5  $\mu$ M, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C, angeregt bei 490 nm.

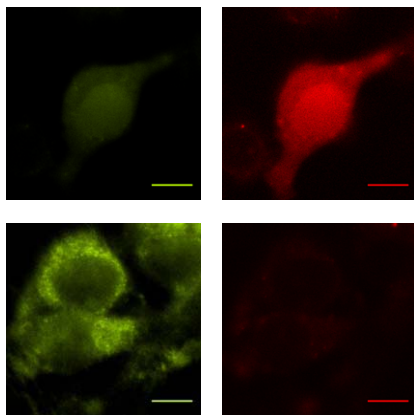


Abbildung 6-10: obere Reihe: RNA3-4, untere Reihe: RNA3-2.

Werden diese DNA-Sequenzen in CHO-K1 Zellen mikroinjiziert, kann man auch hier den Farbunterschied mit bloßem Auge erkennen. Die Fluoreszenz der markierten DNA in den Zellen wurde jeweils von 530 nm bis 600 nm (grüner Kanal) und <650 nm (roter Kanal) aufgenommen. Die Zellen, die mit dem FRET-Duplex mikroinjiziert wurden, zeigen eine intensive rote Farbe (Abbildung 6-10, oben), wohingegen die Zellen, die mit Einzelstrang DNA4 mikroinjiziert wurden, eine grüne Emissionsfarbe aufweisen (Abbildung 6-10, unten).

Die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten  $R_{FI} = FI(531 \text{ nm}) / FI(668 \text{ nm})$  betragen für DNA60-4 0.5, sowie für DNA4 2.9. Beide Emissionsmaxima sind voneinander separiert, was die Detektion der Dehybridisierung von Interferenz-RNA erleichtern wird. Dies stellt eine vielversprechende Möglichkeit zur Entwicklung neuer RNA-Fluoreszenzmarker für die zellbiologische Analytik dar.

### 6.3 Gene Silencing

Als *Gene Silencing* (Gen-Stilllegung) wird der Vorgang bezeichnet, bei dem die Genexpression aktiv abgeschaltet wird. Dabei kann sogenannte siRNA (*small interfering RNA*) zum Einsatz kommen. siRNA wird aus einem 21-28 Basenpaare langem RNA-Duplex mittels des Dicers (Helikase) herausgeschnitten<sup>[264]</sup>, kann aber auch synthetisch hergestellt werden (Abbildung 6-11). Diese kurze, synthetisierte siRNA wird mit sogenannten Transfektionsreagenzien in Zellen eingeschleust. Dort wird sie von einem Protein-Komplex gebunden, dem **RNA-induced silencing complex** (RISC), der dadurch in der Lage ist, an die Ziel-mRNA zu binden, die komplementär zur siRNA-Sequenz ist. So kommen mRNA und die RNA-Helikase und Nuclease in räumliche Nähe, die mRNA wird entwunden und abgebaut. Sie steht der Genexpression nun nicht mehr zur Verfügung, das zugehörige Gen ist damit ausgeschaltet. Mit siRNA kann so auch Fremd-RNA abgebaut werden, beispielsweise von Viren.

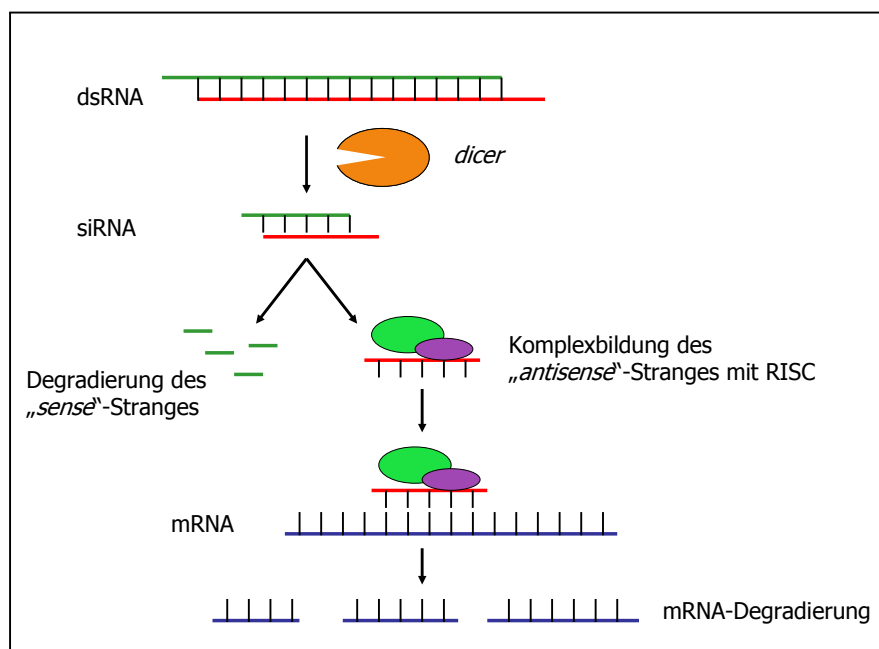


Abbildung 6-11: Schematische Darstellung des *Gene Silencing* Prozesses mit siRNA.

Es wurden folgende RNA-Oligonukleotide synthetisiert, die die unmodifizierte *Antisense*-Sequenz tragen, mit der die Genexpression des EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) herabreguliert werden kann:

**RNA5:** 3'-UAC-UU**TO**-AAG-UCC-CAG-UCG-AAC-G-5'

**RNA6:** 5'-G-AA-C--UUC-AGG-GUC-AGC-UUG-CCG-3'

**RNA7:** 3'-UAC-UUG-AAG-UC**TO**-CAG-UCG-AAC-G-5'

**RNA6:** 5'-G-AAC-UUC-AG-G--GUC-AGC-UUG-CCG-3'

**RNA7:** 3'-UAC-UUG-AAG-UC**TO**-CAG-UCG-AAC-G-5'

**RNA8:** 5'-G-AAC-UUC-A**TOG**-GUC-AGC-UUG-CCG-3'

Es wurden Thiazol-Orange-Chromophore in die Sequenzen eingebaut, die im Duplex entweder in monomerer oder dimerer Form vorliegen. Erste Tests sollten zeigen, ob das Thiazol Orange im *Silencing*-Prozess als Monomer oder Dimer toleriert wird und die Expressierung des EGFP in CHO-K1/EGFP Zellen trotz des großen Chromophors innerhalb der Sequenz still gelegt werden kann. Die RNA-Duplexe wurden mit Lipofectamin™ 2000 inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Es fand eine Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen statt und es konnte mit RNA5-6 und RNA7-6 die Expression des EGFP tatsächlich auf weniger als 20 % reduziert werden (Abbildung 6-12). Nicht überraschend jedoch ist, dass eine duale Markierung der Duplexe mit zwei Thiazol-Orange-Chromophoren nicht mehr toleriert wird, das EGFP wurde weiterhin mit knapp 90 % exprimiert.

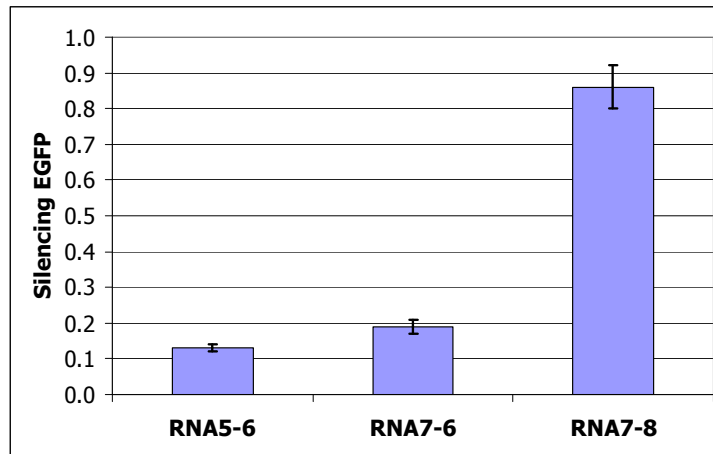


Abbildung 6-12: *Gene Silencing* des EGFP in CHO-K1/EGFP Zellen nach der Inkubation der Zellen mit RNA5-6, RNA7-6 und RNA7-8. Die RNA wurde mit Transfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 in einer Konzentration von 100 nM in Kulturmedium eingeschleust.

Die Toleranz eines so großen Chromophors im *Sense*-Strang ist jedoch beachtlich und zeigt vielfältige Perspektiven auf, wie zum Beispiel die Markierung eines Duplexes mit dem Dimer außerhalb der *Silencing*-Sequenz. In Kombination des TO mit TO3 wäre auch hier eine deutlichere Unterscheidung zwischen Einzel- und Doppelstrang möglich und würde zu einer größeren Bandbreite fluoreszenter RNA-Analytik in lebenden Zellen beitragen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Einbau von Thiazol Orange in RNA relativ einfach ist und dass der Chromophor sowohl als Monomer als auch als Dimer trotz der veränderten RNA-Helix nahezu dieselben optischen Eigenschaften zeigt wie in DNA. Das Konzept des dimeren Thiazol Oranges lässt sich von DNA auf RNA übertragen und erweitert dadurch das Spektrum fluoreszenter RNA-Analytik. So konnte der Farbunterschied nicht nur in RNA-Lösung gezeigt werden, sondern auch in Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Herabregulierung des für EGFP codierenden Genabschnittes in CHO-K1/EGFP-Zellen war möglich, allerdings nur in Anwesenheit des Thiazol-Orange-Monomers. Damit erweist sich Thiazol Orange als fluoreszente Sonde sowohl in DNA als auch in RNA, in dimerer oder monomerer Form, als universell einsetzbar und für analytische Zwecke äußerst interessant. Es lässt sich sogar für Untersuchungen innerhalb von Zellen einsetzen und erweitert damit die Bandbreite fluoreszenter biochemischer und zellulärer Analysemethoden.

---

## 7. Zusammenfassung

Der asymmetrische Cyaninfarbstoff Thiazol Orange konnte über das azyklische Linkersystem (S)-3-Amino-1,2-propandiol als Basensurrogat in DNA eingebaut werden. Bei Duplexen, die den Chromophor als Monomer bergen, ist eine grüne Fluoreszenzfarbe mit einem Maximum bei 530 nm und der TO-typischen Feinstruktur zu beobachten. Wird das Thiazol Orange als diagonales Basenpaar in DNA eingebaut, ändern sich die optischen Eigenschaften drastisch. Im Absorptionsspektrum sind excitonische, hypsochrom verschobene Banden zu sehen, wie sie typischerweise bei H-Aggregaten zu beobachten sind. Die excitonischen Wechselwirkungen führen auch im CD-Spektrum zu einem deutlichen Signal bei 510 nm. Im Emissionsspektrum ist jedoch keine Fluoreszenzlöschung zu sehen, wie es für H-Aggregate zu erwarten gewesen wäre, sondern es ist eine bathochrom verschobene, strukturlose Emissionsbande zu beobachten, die mit einem Maximum bei 585 nm eine orangefarbene Emission aufweist. Dieses Phänomen ist nach sorgfältiger Literaturrecherche seither unbekannt. Es konnte eine deutliche Stabilisierung des Duplexes durch das TO-Dimer beobachtet werden, so wie eine längere Fluoreszenzlebenszeit im Vergleich zum TO-Monomer. Durch thermische Dehybridisierungsstudien konnte gezeigt werden, dass für die Dimerbildung ein rigides Gerüst notwendig ist, wie es durch die DNA-Doppelhelix gewährleistet wird. Die sorgfältige Evaluation der Sensitivität des TO-Dimers auf unterschiedliche Nachbar- und Gegenbasen hat gezeigt, dass das Dimer universell in Oligonukleotide einsetzbar ist. Es wurden kleine, zu vernachlässigende Intensitätsunterschiede in Abhängigkeit der Nachbar- und Gegenbasen festgestellt, es ist jedoch in allen Fällen eine dimere Emissionsbande bei 585 nm festzustellen.

Im Gegensatz dazu konnte beim Einbau der beiden Chromophore in denselben DNA-Strang nur eine Emissionslöschung festgestellt werden. Bei antiparalleler Anordnung der Chromophore, im Gegensatz zur parallelen Anordnung, ist ein Maximum bei ungefähr 560 nm zu beobachten, das für eine schwache, gelbe Emissionsfarbe der DNA-Lösungen sorgt. Die schwachen Intensitäten der CD-Signale deuten darauf hin, dass es bei einer (anti-)parallelen Anordnung der Chromophore

im selben DNA-Strang zu keiner Verdrehung der Übergangsdipolmomente der Farbstoffe kommt. Dadurch ist der Übergang in den eigentlich verbotenen, niedrigeren Exciton-Zustand nicht möglich und die Fluoreszenz der Chromophore wird gelöscht.

Durch die zeitaufgelösten, transienten Absorptionsmessungen der Arbeitsgruppe *Fiebig* konnte gezeigt werden, dass das TO-Dimer bereits aggregiert vorliegt, wenn es durch den *pump*-Puls angeregt wird. Dadurch ist bewiesen, dass es sich beim Thiazol-Orange-Dimer nicht um Excimere handelt. Unterstützt durch die charakteristischen Absorptions-, Emissions- und CD-Spektren und den Resultaten von *Würthner* und *Wortmann* 2006<sup>[196]</sup>, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Thiazol-Orange-Dimeren um fluoreszente H-Aggregate handelt. In der Literatur sind seither nur H-Aggregate bekannt, die keine Emission aufweisen und wenn doch, dann nur unter speziellen Bedingungen, wie zum Beispiel der Einbettung in *Langmuir-Blodgett*-Schichten oder in gefrorenen Lösungen. Fluoreszente H-Aggregate in DNA sind unseres Wissens nach unbekannt, Thiazol Orange ist hierfür ein einzigartiges Beispiel.

Um die typischen optischen Eigenschaften des TO-Dimers im Vergleich zum TO-Monomer für analytische Zwecke auszunutzen, wurden beide Chromophore in den Stamm einer Haarnadel eingebaut. In geschlossenem Zustand aggregieren die Farbstoffe, wodurch die Haarnadel eine orangefarbene Emission aufweist, wie sie für das TO-Dimer typisch ist. Während der Titration mit dem komplementären Gegenstrang ändert sich die Emissionsfarbe über gelb nach grün. Durch die Zugabe des komplementären Zielstranges öffnet sich die Haarnadel und beide Chromophore werden voneinander separiert, es zeigen sich dadurch die optischen Eigenschaften des TO-Monomers. Dieser Vorgang lässt sich mit bloßem Auge verfolgen. Werden Gegenstränge zur Haarnadel zugegeben, mit denen es zu einer Basenfehlpaarung im entstehenden Duplex kommen würde, öffnet sich die Haarnadel nicht. Die Emissionsfarbe der DNA-Lösungen wird ein wenig heller und erscheint gelb, ist aber deutlich von der grünen Farbe der geöffneten Haarnadel zu unterscheiden. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit dem Thiazol-Orange-Dimer eine SNP-Detektion möglich ist, die ohne aufwändige Geräte durchgeführt werden kann. Es kann schlicht anhand der Emissionsfarbe der DNA-Lösungen erkannt werden, ob eine Basenfehlpaarung vorliegt oder nicht.

---

Die ausführliche Evaluation der Stammlänge der mit Thiazol Orange modifizierten Haarnadeln hat gezeigt, dass mindestens eine Länge von acht Basenpaaren notwendig ist, um das TO-Dimer mit der Molecular-Beacon-Technik analytisch nutzen zu können.

Das Konzept der dualen Markierung von DNA mit Thiazol Orange lässt sich auf RNA übertragen. Das TO-Dimer zeigt im Gegensatz zum TO-Monomer auch in einem RNA-Duplex deutlich veränderte optische Eigenschaften, wie sie in DNA beobachtet werden konnte. Es sind kleine, jedoch zu vernachlässigende Unterschiede festzustellen, die vermutlich aus der unterschiedlichen Struktur der A-RNA-Helix im Vergleich zu einer B-DNA-Helix resultieren. Werden mit Thiazol Orange modifizierten RNA-Duplexe in CHO-K1-Zellen mikroinjiziert, ist eine Unterscheidung der monomeren und dimeren Emission unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich. Es konnte eine Stilllegung des für EGFP codierenden Gens in CHO-K1/EGFP-Zellen mit siRNA erreicht werden, die mit monomerem Thiazol Orange markiert war. Trotz der Größe des Chromophors konnte eine reduzierte Expression des EGFPs auf knapp 20 % erreicht werden. Durch die duale Markierung von RNA mit Thiazol Orange wird die fluoreszente Bandbreite der Zellanalytik erweitert und eröffnet neue Perspektiven in der Grundlagenforschung.

## 8. Klick-Chemie

### ***8.1 Einführung in die Klick-Chemie***

Klick-Chemie beschreibt die Möglichkeit, Moleküle schnell und zielgerichtet aus kleineren Einheiten zu synthetisieren. Klick-Reaktionen<sup>[265]</sup> zeichnen sich dabei aus durch:

- vielfältige und breite Anwendungsmöglichkeiten,
- hohe Ausbeuten,
- unbedenkliche und nicht störende Nebenprodukte,
- oft hohe Spezifität,
- einfache Reaktionsbedingungen,
- leicht verfügbare und kostengünstige Reagenzien,
- Lösungsmittel, die eine einfache Produktisolierung ermöglichen (vorzugsweise Wasser).

Als Klick-Reaktionen kommen folgende Reaktionstypen in Frage:

- Cycloadditionsreaktionen, Diels-Alder-Reaktionen,
- Nucleophile Substitutionen, insbesondere mit kleinen gespannten Ringen (Epoxiden, Aziridinen),
- Bildung von Carbamiden und Amiden, nicht jedoch Aldolreaktionen aufgrund der zu geringen Bildungsenthalpie,
- Additionsreaktionen an Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen, wie beispielsweise Epoxidierungsreaktionen.

In den letzten Jahren hat sich die *Huisgen-Meldal-Sharpless Klick-Reaktion* als eine der Wichtigsten in diesem Feld entwickelt.<sup>[266, 267]</sup> *Huisgen* beschrieb als erster die [2+3]-Cycloaddition zwischen Acetylenen und Aziden zu 1,2,3-Triazolen.<sup>[268]</sup> Die Anwendung dieser Reaktion stieg erheblich an, nachdem *Meldal*<sup>[269]</sup> and *Sharpless*<sup>[270]</sup> publizierten, dass die Zugabe von Cu(I) zu einer signifikanten Erhöhung der Reaktionsrate und der Regioselektivität führt. In Abbildung 8-1 ist der von *Sharpless* postulierte Reaktionszyklus der Additionsreaktion zu sehen.<sup>[271]</sup>



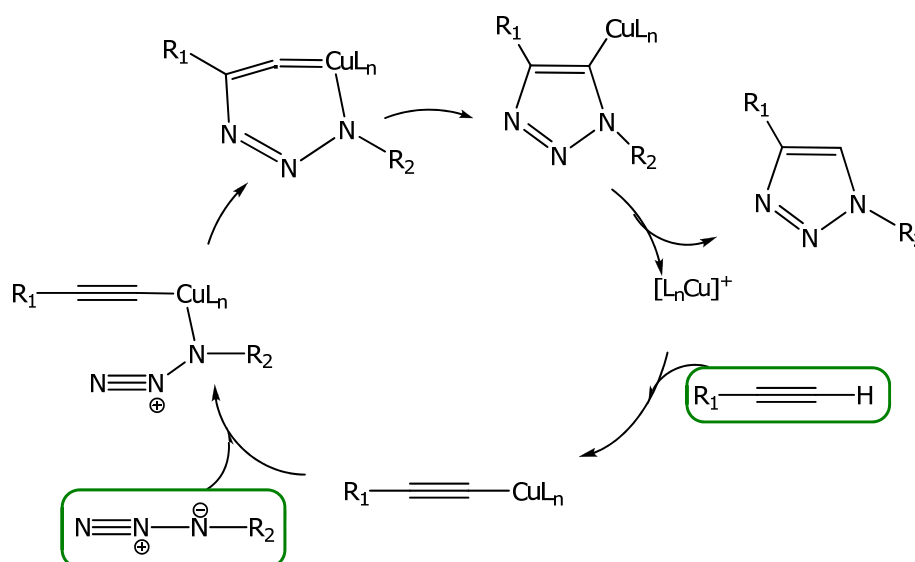


Abbildung 8-1: Reaktionszyklus der Klick-Reaktion, wie er von *Sharpless et al.* 2002 postuliert wurde.<sup>[271]</sup>

Die fluoreszente Bioanalytik setzt die synthetische Inkorporation von Fluorophoren in Oligonukleotide voraus.<sup>[52, 58, 87, 88, 91, 272-275]</sup> Viele unterschiedliche organische Chromophore wurden bereits über die standardisierte Phosphoramiditstrategie und automatisierter Oligonukleotidsynthese in DNA eingebaut, viele sind kommerziell erhältlich. Es ist jedoch nicht jeder Chromophor chemisch stabil unter den sauren, basischen und oxidativen Reaktionsbedingungen der Nukleinsäuresynthese. Sogenannte postsynthetische Modifikationen können es trotzdem ermöglichen, solche Chromophore für die Oligonukleotidanalytik nutzbar zu machen. Dabei werden bereits synthetisierte Oligonukleotide, die eine spezielle bioorthogonale funktionelle Gruppe<sup>[276]</sup> besitzen, selektiv mit dem entsprechenden Chromophor verknüpft, der ebenfalls eine bioorthogonale funktionelle Gruppe besitzen muss. Bioorthogonalität bedeutet dabei, dass die funktionellen Gruppen nicht auch Bestandteil des Oligonukleotids sind, da sonst keine selektive Markierung möglich ist. Im Fall von Nukleinsäuren dürfen die Chromophore keine freien Hydroxygruppen oder Aminfunktionen aufweisen.<sup>[277]</sup>

Die **kupferkatalysierte Acetylen Azid Cycloaddition** (CuAAC), wie sie von *Huisgen* und *Sharpless* entwickelt wurde, hat als Bioligationsmethode im Laufe der letzten Jahre enorm an Bedeutung gewonnen. So wurde diese nicht nur an DNA<sup>[278-289]</sup>

Zur Modifizierung von Oligonukleotiden mittels der CuAAC konnte bisher nur das Acetylen in den Einzelstrang eingebaut werden (Abbildung 8-2), da das Azid während der automatisierten Festphasensynthese durch die Phosphor-(III)-amidite leicht reduziert werden kann und dann nicht mehr für die Klick-Reaktion zur Verfügung steht.

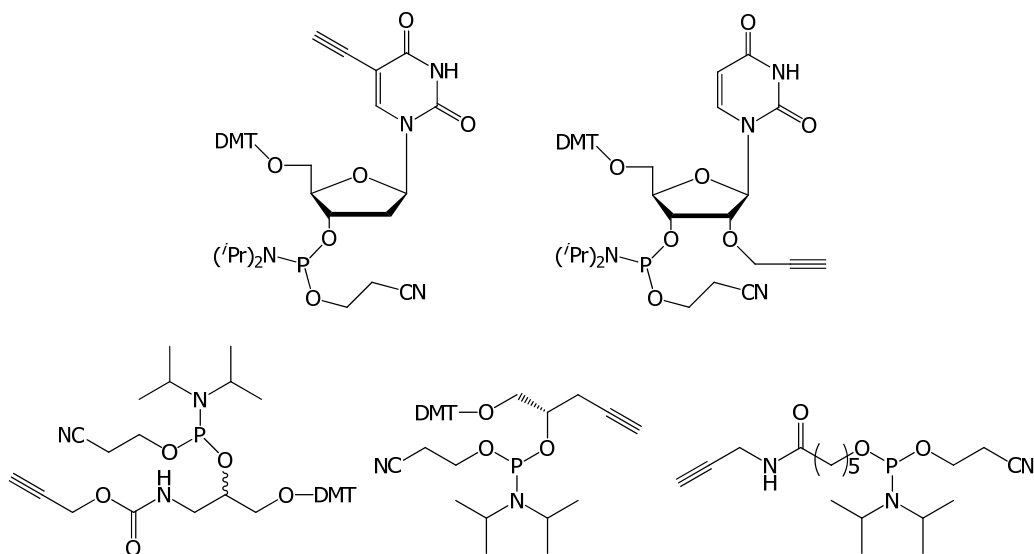


Abbildung 8-2: Einige Beispiele für acetylenmodifizierte Oligonukleotidbausteine, glykosidisch (oben), azyklisch (unten).

Wagenknecht *et al.* konnten eine neue Strategie zur *in-situ* Erzeugung des Azids entwickeln, bei der eine Iodspezies mittels Phosphoramiditstrategie in das Oligonukleotid eingebaut wird<sup>[300]</sup> und anschließend durch die Zugabe von ionischem Azid substituiert wird.

Bei der Verwendung von Cu(I)-Verbindungen im Zusammenhang mit Sauerstoff und Nukleinsäuren kann es zu Strangbrüchen<sup>[301, 302]</sup> kommen, durch Cu(I)-Stabilisatoren wie TBTA **11** kann dies jedoch verhindert werden.<sup>[303]</sup> Seither war es *Seela*<sup>[278, 282, 283, 288, 304-309]</sup>, *Carrell*<sup>[286, 287, 310-317]</sup> und *Wagenknecht*<sup>[203, 204]</sup> möglich, die CuAAC zu nutzen, um verschiedene Chromophore in DNA einzubauen. So konnten bis zu sechs Modifikationen gleichzeitig<sup>[310]</sup>, sowie drei Modifikation sukzessive in ein Oligonukleotid eingebaut werden.<sup>[312]</sup> Zudem gelang die Entwicklung kupferfreier Klick-Ligationen durch den Einsatz gespannter Ringsysteme.<sup>[318-325]</sup>

## 8.2 Aufgabenstellung

Aufgabe war es, einen azyklischen Linker zu entwickeln, mit dem es möglich ist, schnell und einfach postsynthetisch Chromophore an Oligonukleotide anzuknüpfen, um dadurch die zeitaufwendigen und teuren Phosphoramiditsynthesen der jeweilige Fluorophorderivate zu umgehen. Die Klick-Chemie stellte durch ihre bioorthogonalen funktionellen Gruppen, schnelle, einfache und unkomplizierte postsynthetische Ligationen in Aussicht. Nach Entwicklung einer möglichst einfachen Synthese eines mit einem Acetylen modifizierten Linkers, sollte dessen Chiralität variiert (Abbildung 8-3) und dessen Einfluss auf die optischen Eigenschaften von Chromophoren untersucht werden. Um ein optimales Anbindungssystem für Chromophore an DNA zu finden, sollte das azyklische Klick-Linkersystem mit einer glykosidischen Anknüpfungsart verglichen werden. Dazu wurde ein Uridin an der 2'-Position mit einem Acetylen modifiziert. Als Fluorophor wurde Nilblau gewählt, da es beispielhaft für basenlabile Chromophore steht, die standardmäßig nicht via automatisierte Phosphoramiditstrategie in Oligonukleotide eingebaut werden können. Nilblau wird bei der stark basischen Aufarbeitung der DNA-Sequenzen hydrolysiert. Der Fluorophor interkaliert sehr gut in Duplexe und sein Redoxpotential reicht aus, Guanin zu oxidieren. Daraus resultiert eine Fluoreszenzlöschung des Nilblau, sobald ein Guanin in unmittelbarer Nähe des Chromophors positioniert ist. Dies stellt eine sehr sensitive Methode dar, mit dem die Interkalationsfähigkeit des Nilblau in Abhängigkeit der Chiralität des Linkers, untersucht werden kann. Die Nilblau-Azide wurden freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe *Wolfbeis* synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

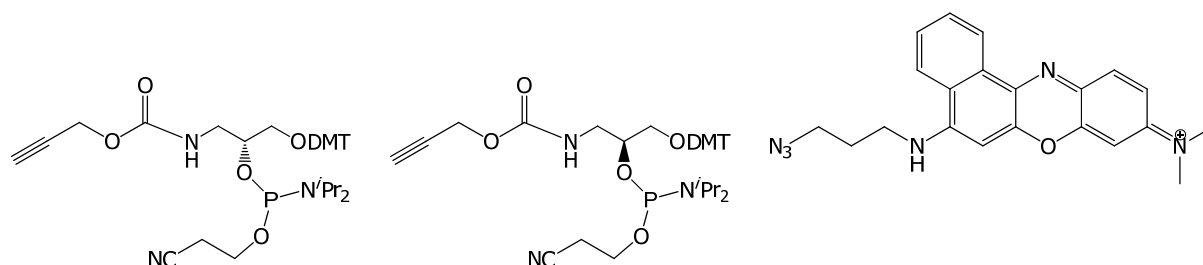


Abbildung 8-3: Zielmoleküle (*R*)-Klick-Linker, (*S*)-Klick-Linker und Nilblau-Azid (v.l.n.r.).

## 8.3 Klick-Linker

Die *Wagenknecht*-Forschungsgruppe verwendet zum Einbau von Chromophoren in DNA standardmäßig das azyklische Linkersystem (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol, das den Riboseteil zwischen den Phosphordiestern des Zucker-Phosphat-Rückgrats ersetzt.<sup>[119, 124, 134, 205-209, 212]</sup> Dadurch erreicht man eine höhere chemische Stabilität und ausreichend konformationelle Flexibilität für den Chromophor, in den Duplex zu interkalieren. Ähnliche Propandiolderivate werden auch von anderen Arbeitskreisen verwendet.<sup>[326-333]</sup>

### 8.3.1. (*R*)- vs. (*S*)-Klick-Linker

Der größte Unterschied des 3-Amino-1,2-propandiol-Linkers (neben dem Fakt, dass er azyklisch ist), ist die Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen den Phosphatbrücken (Abbildung 8-4), die bei der Ribose drei und beim azyklischen Linker nur zwei beträgt. Es konnte gezeigt werden<sup>[334]</sup>, dass die Anknüpfung des Ethidium-Farbstoffes an einen D-Threoninol-Linker keine Änderungen an den optischen Eigenschaften im Vergleich zur Anknüpfung durch den 3-Amino-1,2-propandiol-Linker verursacht (Abbildung 8-4).

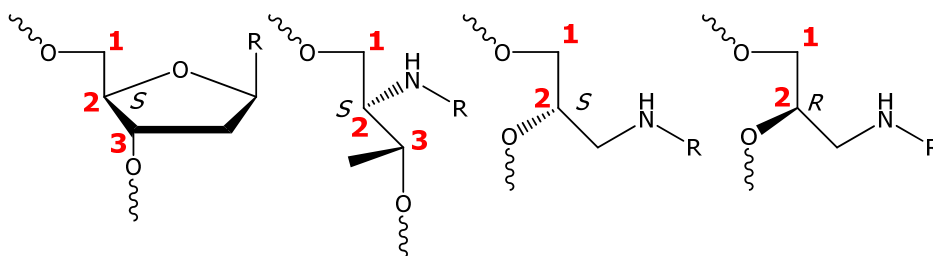


Abbildung 8-4: Chiralität des C3' des natürlichen 2'-Deoxyribofuranosids (links) im Vergleich zum D-Threoninol-Linker (Mitte links), so wie dem (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol-Linkers (Mitte, rechts) und dem (*R*)-3-Amino-1,2-propandiol-Linkers (rechts). Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen den Phosphordiesterbrücken in rot.

Ausführliche Untersuchungen mit den Threoninol-Linkern haben gezeigt, dass die Chiralität des Linkers Einfluss haben kann auf die Interkalation des angekoppelten Chromophors<sup>[335, 336]</sup>, auf Oligonukleotidfunktionen<sup>[337]</sup> und die Duplexbildung.<sup>[338]</sup> *Komiyama et al.* wiesen unterschiedliche Chromophor-Interkalationsmodi in Abhängigkeit eines D- bzw. L-Threoninol-Linkers nach.<sup>[338]</sup> Daher war es wichtig, zu

untersuchen, ob die unterschiedliche Chiralität des 3-Amino-1,2-propandiol-Linkers ebenfalls zu veränderten optischen Eigenschaften von Chromophoren führen würde. Der bisher standardmäßig genutzt Linker **3** kann relativ einfach zum Klick-Linker weiterentwickelt werden, indem man über eine Carbamatfunktion das Amin von **3** mit der Hydroxygruppe eines Propargylalkohols zu **9** koppelt. Abbildung 8-5 und Abbildung 8-6 geben den Syntheseweg der beiden Klick-Linker wieder.

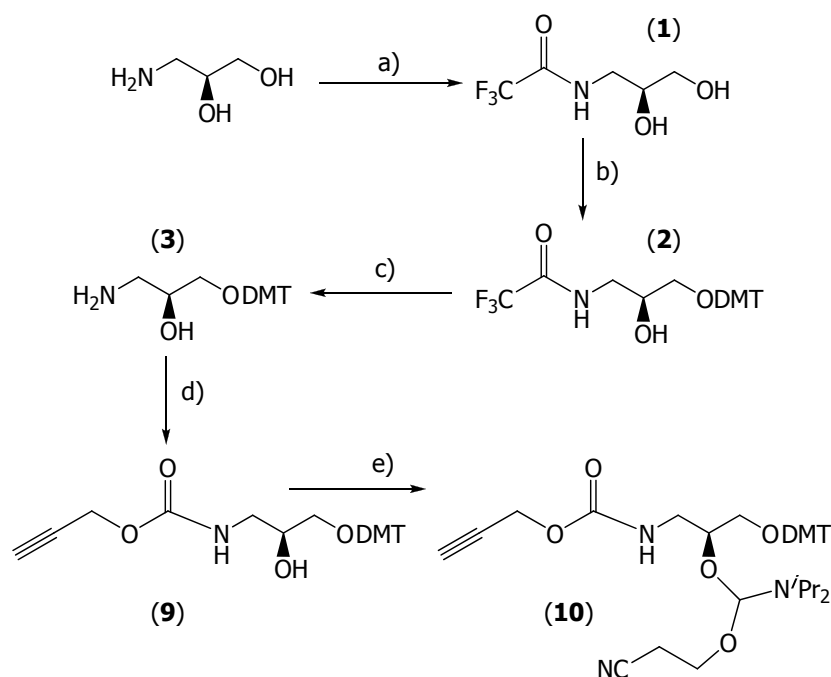


Abbildung 8-5: Syntheschema zur Darstellung des (S)-Klick-Linkers.

- Trifluoressigsäureethylester, über Nacht, RT, 91 %.
- DMT-Cl, 12 h, RT, 87 %.
- NH<sub>3</sub>, über Nacht, RT, 95 %.
- 2-Propin-1-ol, 1,1'-Carbonyldiimidazol, DMF, RT, 27 h, 44 %.
- 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, EtN(iPr)<sub>2</sub>, DCM, RT, 3 h.

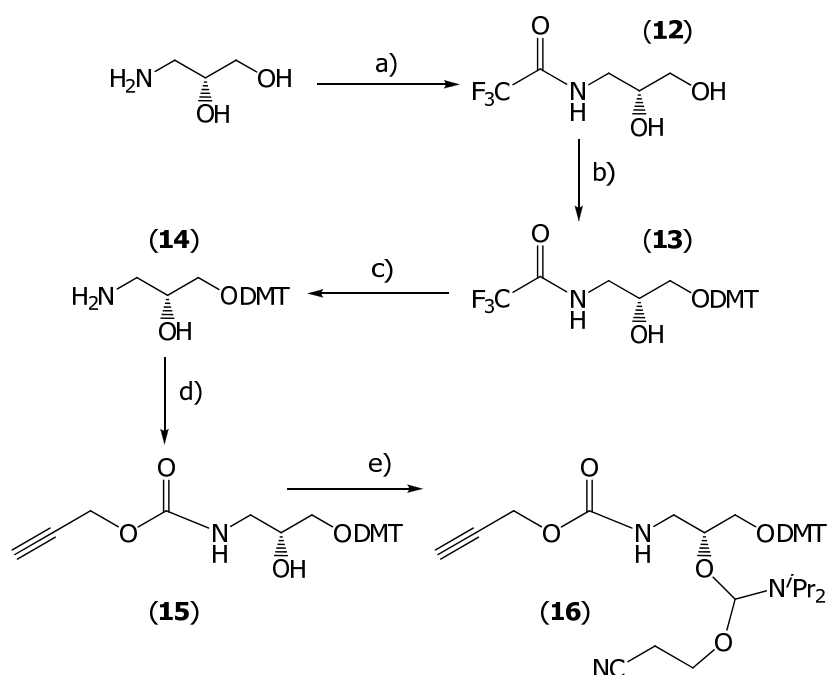


Abbildung 8-6: Syntheseschema zur Darstellung des (R)-Klick-Linkers.

- Trifluoressigsäureethylester, über Nacht, RT, 91 %.
- DMT-Cl, 12 h, RT, 87 %.
- $\text{NH}_3$ , über Nacht, RT, 95 %.
- 2-Propin-1-ol, 1,1'-Carbonyldiimidazol, DMF, RT, 27 h, 44 %.
- 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit,  $\text{EtN}(\text{iPr})_2$ , DCM, RT, 3 h.

Der DNA Baustein **10** bzw. **16** trägt die Propargylgruppe, die über eine Carbamatfunktion an das azyklische Linkersystem gebunden wurde. Durch die Carbamatfunktion wird im Vergleich zur vorherigen Variante, die von *Wagenknecht et al.* verwendet wurde, ein Syntheseschritt gespart (vergleiche Kapitel 4.1). Der DMT-geschützte (S)- Linker **3** wurde gemäß Literatur synthetisiert<sup>[205, 210]</sup>, der (R)-Linker **14** analog dazu. Die freie Hydroxygruppe des kommerziell erhältlichen 2-Propin-1-ol wurde mit 1,1'-Carbonyldiimidazol aktiviert und anschließend mit der Aminfunktion des Linkers (**3** bzw. **14**) verknüpft. Die Synthese des Phosphoramidits (**10** bzw. **16**) erfolgte unter Standardbedingungen und wurde im Anschluss sofort für die automatisierte Oligonukleotidsynthese verwendet. Die so mit der Propargylgruppe modifizierten Oligonukleotide wurden mit dem Nilblau-Azid gemäß des Klick-Protokolls (Kapitel 9.4.4) umgesetzt.

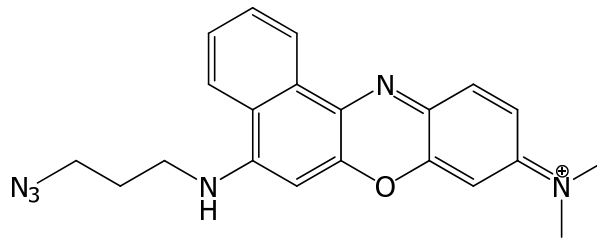


Abbildung 8-7: Nilblau-Azid.

Es wurden zwei verschiedene DNA-Serien synthetisiert, die den Chromophor entweder in einer TA/TA-Nachbarbasenumgebung oder in einer GC/GC-Nachbarschaft einbetten. Innerhalb jedes Duplex-Sets wurden alle natürlichen Basen als Gegenbasen variiert (A, G, T, C).

Oligonukleotidsequenzen, die den (S)-Klick-Linker (X) enthalten:

**DNA61:** 3'-AGT-CAC-T**TX**-TTC-TGA-CG-5'

**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AAC**C**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AAG**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA66:** 3'-AGT-CAC-T**GX**-GTC-TGA-CG-5'

**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Oligonukleotide, die den (R)-Klick-Linker (X) enthalten:

**DNA71:** 3'-AGT-CAC-T**TX**-TTC-TGA-CG-5'

**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AAC**C**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AAG**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA72:** 3'-AGT-CAC-T**GX**-GTC-TGA-CG-5'  
**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Der Vergleich der Schmelztemperatur der Duplexe DNA71-62, DNA61-62, DNA72-67 und DNA66-67 mit dem jeweiligen unmodifizierten Duplex, der anstatt des Chromophors ein Thymin enthält, zeigt eine relativ geringe Destabilisierung (Tabelle 8-1). Auch der Vergleich der Schmelztemperatur von Duplexen mit (*S*)- bzw. (*R*)-konfigurierten Linkern zeigt nur einen geringen Unterschied von <2.5 °C. Offensichtlich induzieren beide azyklischen Linker eine kleine Destabilisierung, es ist jedoch keine klare Abhängigkeit der Duplexstabilität von der einen oder anderen Konfiguration zu beobachten. Im Vergleich zur Literatur sind diese Ergebnisse erstaunlich, da zum einen bei Threoninol die D- bzw. L-Konfiguration erheblichen Einfluss auf die Duplexstabilität aufwies.<sup>[338]</sup> Zum anderen, weil Glycolmodifikationen normalerweise zu einer Destabilisierung der Duplexe von bis zu ~10 °C führen.<sup>[326, 327, 329-331]</sup> Unsere Resultate deuten darauf hin, dass der Stabilitätsverlust, der normalerweise mit der Einführung eines Linkersystems einhergeht, offensichtlich durch die hydrophoben Wechselwirkungen des Chromophors mit dem Basenstapel wiedergewonnen werden kann. Die Schmelztemperaturen innerhalb einer Duplex-Serie sind weitgehend ähnlich. Dies ist jedoch normal für ein Chromophor, der keine präferierte Basenpaarung eingeht.



Tabelle 8-1: Schmelztemperatur und Quantenausbeuten der Oligonukleotide, die dem Vergleich des (*S*)- mit dem (*R*)-Linkers dienen. <sup>a</sup>Differenz zum unmodifizierten Duplex, der ein T statt des Chromophors enthält ( $T_m = 62.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). <sup>b</sup>Differenz zum unmodifizierten Duplex, der ein T statt des Chromophors enthält ( $T_m = 68.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

DNA	$T_m / ^{\circ}\text{C}$	$\Phi$	DNA	$T_m / ^{\circ}\text{C}$	$\Phi$	$\Delta T_m / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta \Phi$
<b>DNA71</b>	-	0.15	<b>DNA61</b>	-	0.16	-	-1
<b>DNA71-62</b>	59.1 (-3.4) <sup>a</sup>	0.17	<b>DNA61-62</b>	56.6 (-5.9) <sup>a</sup>	0.15	2.5	2
<b>DNA71-63</b>	58.5	0.22	<b>DNA61-63</b>	60.4	0.19	-1.9	3
<b>DNA71-64</b>	60.7	0.21	<b>DNA61-64</b>	58.5	0.22	2.2	-1
<b>DNA71-65</b>	59.1	0.05	<b>DNA61-65</b>	59.8	0.06	-0.7	-1
<b>DNA72</b>	-	0.04	<b>DNA66</b>	-	0.05	-	-1
<b>DNA72-67</b>	66.7 (-1.3) <sup>b</sup>	0.02	<b>DNA66-67</b>	65.5 (-2.5) <sup>b</sup>	0.02	1.2	<1
<b>DNA72-68</b>	64.2	0.02	<b>DNA66-68</b>	66.5	0.02	-2.3	<1
<b>DNA72-69</b>	67.0	0.02	<b>DNA66-69</b>	67.5	0.01	-0.5	<1
<b>DNA72-70</b>	66.8	0.01	<b>DNA66-70</b>	67.7	0.01	-0.9	<1

Die UV/VIS Absorptionsspektren (Abbildung 8-8) der Nilblau-modifizierten Einzelstränge zeigen charakteristische Absorptionen zwischen 600 nm und 550 nm. Nach der Duplexhybridisierung ist ein schwacher bathochromer Shift von etwa 5 nm zu beobachten, der durch die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen des Chromophors mit dem Basenstapel zu erklären ist. Die Gegenbasen zu Nilblau (A, C, G, T) scheinen keinen signifikanten Einfluss auf die optischen Eigenschaften des Chromophors auszuüben, egal ob dieser über einen (*S*)- oder (*R*)-konfigurierten Linker in den Duplex eingebaut wurde. Zusammen mit den thermischen Dehybridisierungsstudien lassen sich die optischen Eigenschaften auf die Interkalation des Chromophors in den Duplex zurückführen. Die starken  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen des Nilblau-Chromophors mit den benachbarten Basen stabilisieren den Duplex derart, dass die Chiralität des Linkers keinen Einfluss hat.

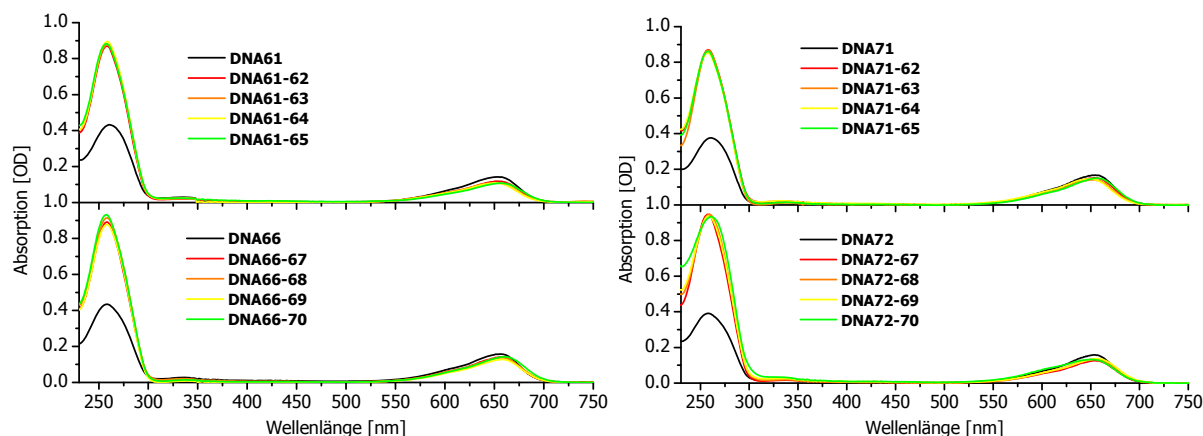


Abbildung 8-8: Absorptionsspektren der Oligonukleotide zum Vergleich des (*S*)- (links) mit dem (*R*)-Linker (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl, 20  $^{\circ}\text{C}$ .

Um die optischen Eigenschaften der Nilblau-modifizierten Oligonukleotide weiter zu untersuchen, wurden die stationären Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenlänge von 610 nm aufgenommen. Das Emissionsmaximum der Nilblau-modifizierten Einzel- und Doppelstränge liegt zwischen 677 nm und 679 nm. Im Gegensatz zu den Absorptionsspektren, die für alle modifizierten Oligonukleotide ähnlich waren, zeigen die Fluoreszenzspektren deutliche Unterschiede in Abhängigkeit zur sequentiellen Nachbarschaft des Chromophors (Abbildung 8-9).

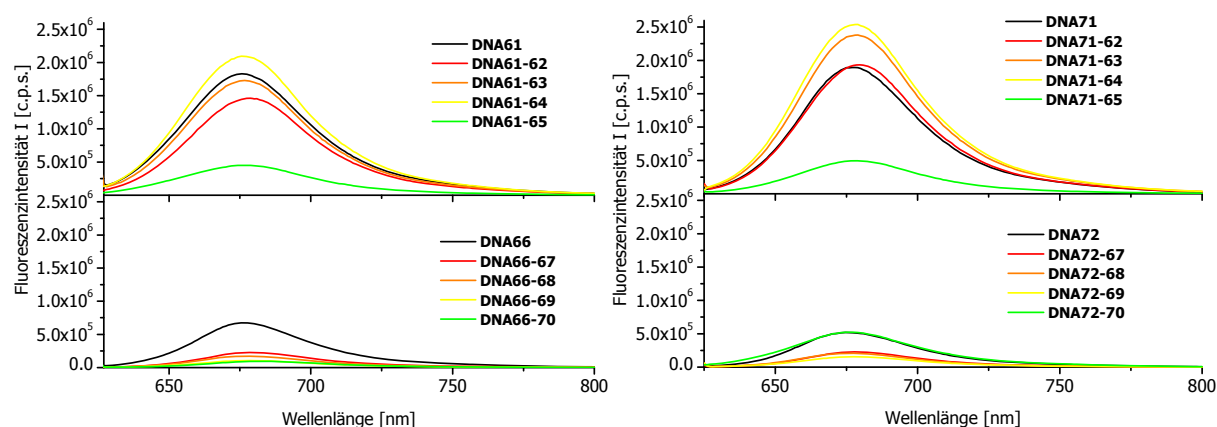


Abbildung 8-9: Emissionsspektren der Oligonukleotide zum Vergleich des (*S*)- (links) mit dem (*R*)-Linker (rechts). 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 610$  nm, 20  $^{\circ}\text{C}$ .

Die Fluoreszenz des Nilblau wird signifikant gelöscht, wenn Guanin als Gegenbase im Duplex vorhanden ist (DNA61-65, DNA71-65, DNA66-70 und DNA72-70) bzw. eine der Nachbarbasen darstellt (DNA66 und DNA72). Dies wird bei Betrachtung des Redoxpotentials des angeregten Chromophors deutlich. Wenn die Singulett-Singulett-Übergangsenergie  $E_{00} = 1.9 \text{ eV}$  zum Reduktionspotential von  $E_{\text{red}}^* = -0.3 \text{ eV}$  (vs. NHE) addiert wird, beträgt das Potential im angeregten Zustand  $E_{\text{red}}^* = 2.2 \text{ eV}$ .<sup>[203]</sup> Es findet eine Oxidation von Guanin statt, da diese ein Oxidationspotential von lediglich  $\sim 1.3 - 1.4 \text{ eV}$  besitzen.<sup>[339]</sup> Es ist erstaunlich, dass die Fluoreszenzspektren der über (*S*)- oder (*R*)-Linker verknüpften Nilblau-Chromophore nahezu identisch sind. Die Quantenausbeuten (Tabelle 8-1) weisen nur geringfügige Unterschiede auf, die im Fehlerbereich der Messungen liegen. Es ist überraschend, dass im Gegensatz zu den Experimenten mit D- und L-Threoninol die Chiralität des 3-Amino-1,2-propandiol-Linkers keinen Einfluss auf die optischen Eigenschaften des Fluorophors haben. Um diese Ergebnisse zu veranschaulichen, wurden geometrisch optimierte Modelldarstellungen der Duplexe DNA61-62 und DNA71-62 erstellt (Abbildung 8-10).

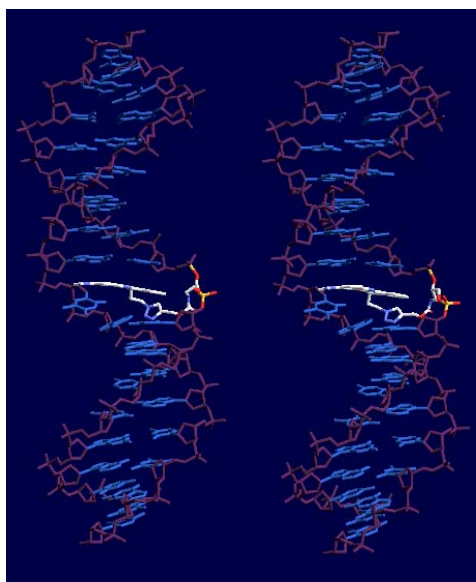


Abbildung 8-10: Geometrisch optimierte Modelldarstellung von DNA61-62 (links) und DNA71-62 (rechts).

Der kritischste Teil des Systems, der die Interkalation des Fluorophors beeinträchtigen könnte, ist das azyklische Linkersystem 3-Amino-1,2-propandiol in

Kombination mit dem Triazolpart und der Alkylkette, an die der Chromophor gebunden ist. Die Modelldarstellungen jedoch zeigen deutlich, dass dieses Linkersystem lang und flexibel genug ist und der Chromophor nahezu perfekt in den Duplex interkaliert. Nilblau bildet starke  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu den benachbarten Basen aus, unabhängig von der (*S*)- oder (*R*)-Konfiguration des Linkers. Diese Modelldarstellungen helfen, die Ergebnisse dieser Experimente zu veranschaulichen und unterstützen die Resultate, die bei der Untersuchung der optischen Eigenschaften erhalten wurden.

### 8.3.2. Klick-Uridin vs. (*S*)-Klick-Linker

Um ein optimales Anbindungssystem für Chromophore an DNA zu finden, wurde das azyklische Klick-Linkersystem (*S*)-1-Amino-3-1,2-propandiol mit einem Uridin verglichen, das an der 2'-Position mit einem Acetylen modifiziert wurde („Klick-Uridin“). Die Synthese des Klick-Uridins wurde von Nadine Herzig durchgeführt und für die nun im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Als Chromophor wurde Nilblau gewählt, weil dieser sich durch sehr gutes Interkalationsverhalten auszeichnet. Nilblau ist durch sein Redoxpotential im angeregten Zustand in der Lage Guanin zu oxidieren, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird. Dies dient als sensitives Werkzeug zur Evaluation der Abhängigkeit der Interkalation des Chromophors von der Anknüpfungsart an das Oligonukleotid.

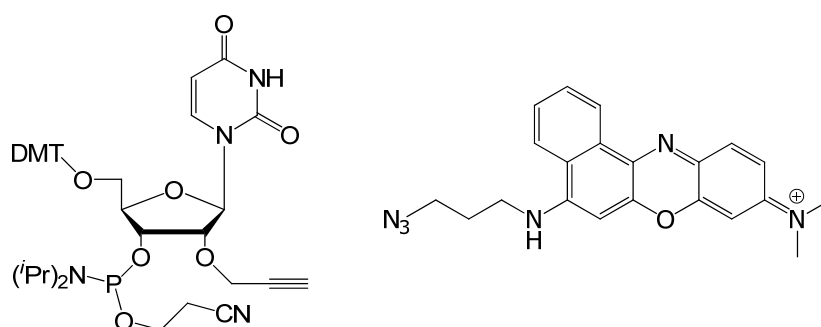


Abbildung 8-11: Klick-Uridin (links) und Nilblau-Azid (rechts).

Der (*S*)-Klick-Linker wurde wie in Kapitel 8.3.1 beschrieben hergestellt, das Klick-Uridin wurde gemäß Literatur synthetisiert.<sup>[340]</sup> Die erste DNA-Serie enthält als

Acetylenmodifikation den azyklischen (*S*)-Klick-Linker, die zweite DNA-Serie enthält das Klick-Uridin jeweils in einer Thymin-Umgebung bzw. in einer Guanin-Umgebung. Als Gegenbase zum Chromophor wurden alle vier natürlichen Basen variiert und die optischen Eigenschaften der Duplexe untersucht.

Oligonukleotide, die den (*S*)-Klick-Linker (X) enthalten:

**DNA61:** 3'-AGT-CAC-T**TX**-TTC-TGA-CG-5'

**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AA**C**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AAG**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA66:** 3'-AGT-CAC-T**GX**-**G**TC-TGA-CG-5'

**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Oligonukleotide, die das Klick-Uridin (X) enthalten:

**DNA73:** 3'-AGT-CAC-T**TX**-TTC-TGA-CG-5'

**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AA**C**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AAG**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA74:** 3'-AGT-CAC-T**GX**-**G**TC-TGA-CG-5'

**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Als Referenz wurden folgende Sequenzen verwendet, die statt des Nilblau-Chromophors ein Adenin enthalten:

**DNA75:** 3'-AGT-CAC-T**TA**-TTC-TGA-CG-5'

**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AAC**C**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AAG**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA76:** 3'-AGT-CAC-T**GA**-**G**TC-TGA-CG-5'

**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'

**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Die Duplex-Serien aus DNA61, DNA66, DNA73 und DNA74 enthalten den Nilblau-Chromophor in drei unterschiedlichen strukturellen Varianten:

- i. Anknüpfung an das Oligonukleotid entweder über das azyklische Klick-Linkersystem (DNA61 oder DNA66) oder über das Klick-Uridin (DNA73 oder DNA74).
- ii. Die Nachbarbasen zum Chromophor sind entweder Thymin (DNA61 und DNA73) oder Guanin (DNA66 und DNA74).
- iii. Die Gegenbasen sind die vier natürlichen Basen A, C, T oder G (Gegenstränge DNA70, DNA67, DNA68, DNA69, DNA65, DNA62, DNA63 oder DNA64).

Zunächst wurde die Schmelztemperatur der Duplexe bei 260 nm gemessen (Tabelle 8-2 und Tabelle 8-3, sowie Abbildung 8-12). Folgende Effekte konnten beobachtet werden: Bei nichtnukleosidischer Verknüpfung des Nilblau-Chromophors (DNA61 und DNA66) besteht keine bevorzugte Basenpaarung mit einer der Gegenbasen A, G, T oder C. Im Gegensatz dazu bevorzugen die Duplexe mit nukleosidischer Anknüpfung ganz klar die Gegenbase Adenin. Es scheint, dass das Uridin trotz des großen Chromophors immer noch in der Lage ist, Adenin zu erkennen. Ungeachtet der unterschiedlichen Anknüpfung und des sequentiellen Kontexts zeigen alle „fehlgepaarten Duplexe“ (mit Gegenbasen T, C und G) eine höhere Stabilität als die

entsprechenden unmodifizierten Referenzduplexe DNA75-65, DNA75-63, DNA75-64 und DNA76-70, DNA76-68, DNA76-69. Dies deutet darauf hin, dass die durch die Fehlpaarung entstandene Instabilität durch die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen des Chromophors mit dem Basenstapel zurückgewonnen werden kann. Die Duplexe, die das Linkersystem enthalten, zeigen im Vergleich zu DNA75-62 bzw. DNA76-67 lediglich eine Destabilisierung von 5.9 °C (DNA61-62) bzw. 4.0 °C (DNA66-67). Im Gegensatz dazu zeigen die Duplexe DNA73-62 und DNA74-67 keine Destabilisierung bzw. sogar eine Stabilisierung von 2.0 °C.

Tabelle 8-2: Charakteristische Daten der Einzelstränge und Duplexe zur Untersuchung des Chiralitätseinflusses des azyklischen Linkersystems.

DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$
	$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C
<b>DNA61</b>	0.16	<b>DNA73</b>	0.18	<b>DNA75</b>	-
<b>DNA61-62</b>	0.15	<b>DNA73-62</b>	0.12	<b>DNA75-62</b>	-
	56.6		64.5		62.5
<b>DNA61-63</b>	0.19	<b>DNA73-63</b>	0.15	<b>DNA75-63</b>	-
	60.4		58.5		53.2
<b>DNA61-64</b>	0.22	<b>DNA73-64</b>	0.16	<b>DNA75-64</b>	-
	58.5		58.5		52.8

Tabelle 8-3: Charakteristische Daten der Einzelstränge und Duplexe zur Untersuchung des Chiralitätseinflusses des azyklischen Linkersystems.

DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$
	$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C
<b>DNA66</b>	0.05	<b>DNA74</b>	0.04	<b>DNA76</b>	-
<b>DNA66-67</b>	0.02	<b>DNA74-67</b>	0.03	<b>DNA76-67</b>	-
	65.5		68.0		68.0
<b>DNA66-68</b>	0.02	<b>DNA75-68</b>	0.03	<b>DNA76-68</b>	-
	66.5		63.5		60.3
<b>DNA66-69</b>	0.01	<b>DNA76-69</b>	0.01	<b>DNA76-69</b>	-
	67.5		64.0		58.3
<b>DNA66-70</b>	0.01	<b>DNA85-70</b>	0.02	<b>DNA76-70</b>	-
	67.7		66.5		63.8

Es ist erstaunlich, dass die Destabilisierung durch den Einsatz eines azyklischen Linkers nicht sehr groß ist. Normalerweise würde pro Einsatz eines Gykolinkers eine thermische Destabilisierung von etwa 10 °C erwartet werden.<sup>[208, 209, 341]</sup> Die Werte der Nilblau-modifizierten Duplexe sind jedoch signifikant kleiner und im Zusammenhang mit Guaninen als Nachbarbasen besonders klein. Offensichtlich liegt das an den  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen des Chromophors mit seinen Nachbarbasen, die so zu einer Stabilisierung des Duplexes beitragen.



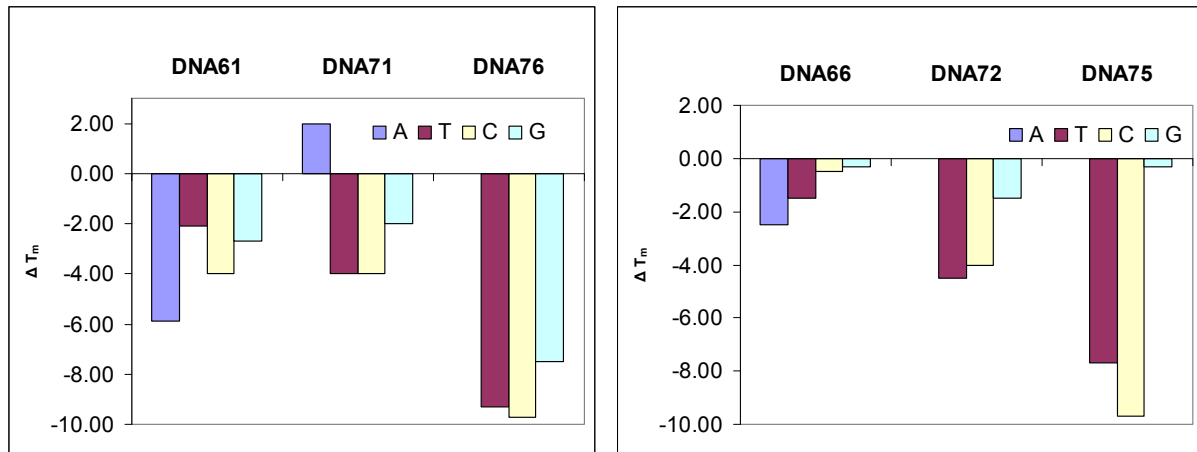


Abbildung 8-12: Schmelztemperaturunterschiede im Vergleich zu DNA75-62 und DNA76-67 als Referenzduplexe.

Die Absorptionsspektren (Abbildung 8-13) aller modifizierter Einzelstränge und der entsprechenden Duplexe zeigen die typischen Absorptionsbanden des Nilblau-Chromophors mit einem Maximum zwischen 652 nm und 661 nm. Die Absorptionseigenschaften spiegeln keinen der drei Strukturvariationen i-iii wider.

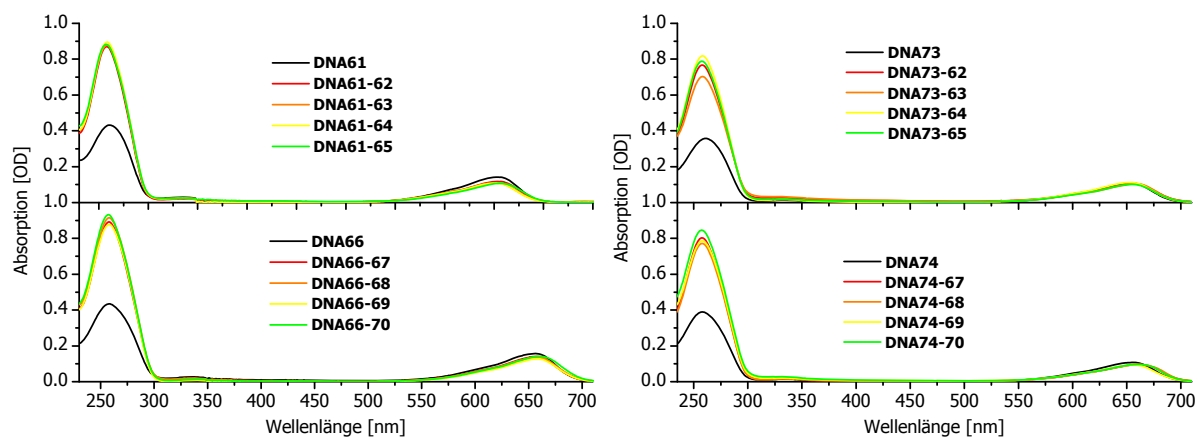


Abbildung 8-13: Absorptionsspektren der Oligonukleotide zum Vergleich des (S)-Linkers (links) mit dem Klick-Uridin (rechts). 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaPi, pH 7, 250 mM NaCl, 20  $^{\circ}$ C.

In den Fluoreszenzspektren ist, im Gegensatz zu den Absorptionsspektren, ein Einfluss der sequentiellen Nachbarschaft zu verzeichnen (Abbildung 8-14). Die Quantenausbeuten der Nilblau-modifizierten Oligonukleotide betragen zwischen 12 % und 22 %, wenn kein Guanin in unmittelbarer Umgebung des Chromophors positioniert ist (Abbildung 8-15).

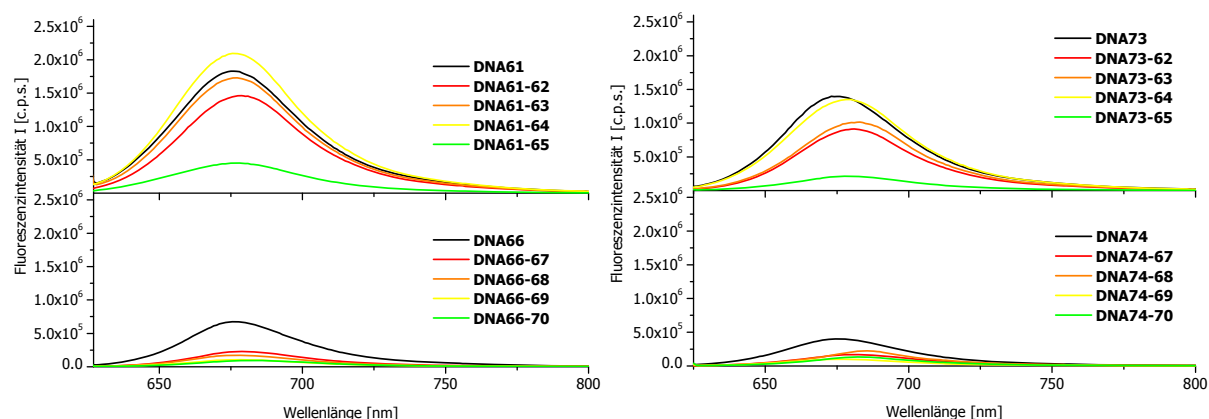


Abbildung 8-14: Emissionsspektren der Oligonukleotide zum Vergleich des (S)-Linkers (links) mit dem Klick-Uridin (rechts). 2.5  $\mu$ M DNA, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 610 nm, 20 °C.

Die Fluoreszenz wird signifikant gelöscht, wenn ein Guanin als Nachbar- oder Gegenbase fungiert, wobei die Quantenausbeuten nicht größer als 6 % sind. Hierbei ist ganz besonders hervorzuheben, dass dieses Emissionsprofil ungeachtet der strukturellen Anknüpfungsart in Erscheinung tritt. Es scheint egal zu sein, ob der Chromophor über die 2'-Position des Uridins oder über ein azyklisches Linkersystem in die DNA eingebaut wird. Tatsächlich sind die Quantenausbeuten jeweils nahezu identisch, das bedeutet, dass die Wechselwirkungen des Chromophors mit den Nachbar- bzw. Gegenbasen elektronisch ähnlich sind und unabhängig von der Art der Anknüpfung des Chromophors an das Oligonukleotid auftreten.

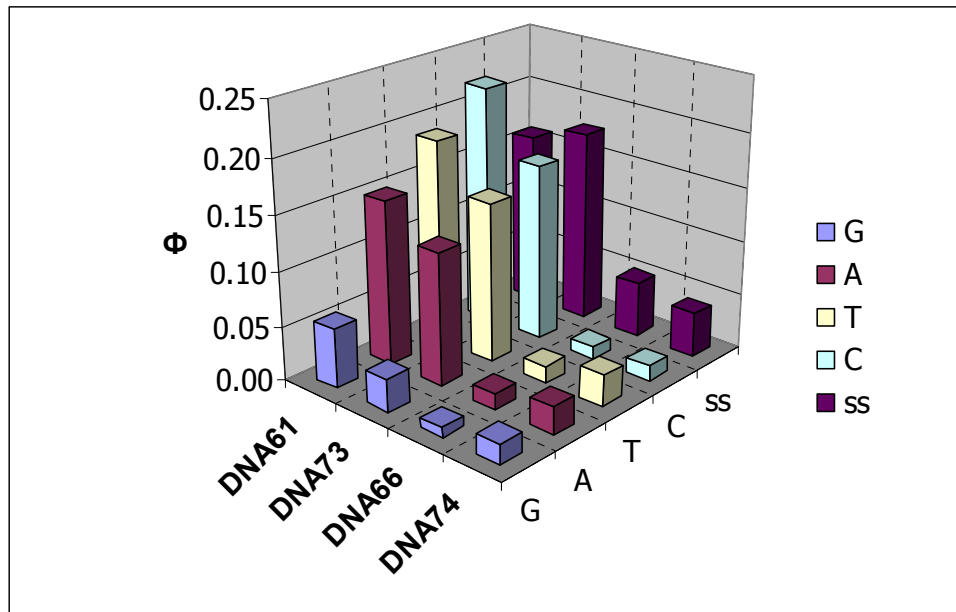


Abbildung 8-15: Graphische Darstellung der Quantenausbeuten  $\Phi$  der Nilblau-modifizierten Oligonukleotide. 2.5  $\mu\text{M}$  DNA, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7, 250 mM NaCl,  $\lambda_{\text{exc}} = 610 \text{ nm}$ , 20 °C.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die unterschiedlichen Anknüpfungsarten des Chromophors an die Oligonukleotide keinen Einfluss auf die optischen Eigenschaften haben. Durch die bevorzugte Basenpaarung des Klick-Uridins mit Adenin sind stabilere Duplexe möglich, dies kann insbesondere bei kurzen DNA-Sequenzen von Vorteil sein.

## 8.4 Zusammenfassung

Für die Bioanalytik von Nukleinsäuren werden möglichst helle Fluoreszenzsonden verwendet. Die Phosphoramiditstrategie automatisierter DNA-Synthese ermöglicht den Einbau einer Vielzahl organischer Fluorophore in Oligonukleotide an spezifischen Stellen der Sequenz. Das Potential dieser Methode wird jedoch stark eingeschränkt, wenn Chromophore den harschen Bedingungen der stark sauren, basischen und oxidativen DNA-Synthese und -Aufarbeitung nicht standhalten und durch diese zerstört werden. Eine Alternative hierzu bietet die sogenannte Klick-Chemie, genauer die kupferkatalysierte Acetylen Azid Cycloaddition, mit der eine postsynthetische Ligation solcher Chromophore möglich ist. Ein repräsentativer Vertreter basenlabiler

Chromophore ist Nilblau, der mit guten Quantenausbeuten und sehr gutem Interkalationsverhalten für die Nukleinsäureanalytik von großem Interesse wäre.

Ziel war es, das in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* standardmäßig verwendete Linkersystem basierend auf (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol für die Klick-Chemie weiterzuentwickeln. So sollte das Linkersystem um eine Acetylenfunktion erweitert werden, um ein Nilblau-Azid als repräsentativer, basenlabiler Chromophor an den bereits synthetisierten DNA-Strang anzufügen. Nilblau besitzt ein geeignetes Redoxpotential, um im angeregten Zustand Guanin in unmittelbarer Umgebung zu oxidieren, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird. Diese Eigenschaft sollte ausgenutzt werden, um weitere Untersuchung durchzuführen. So sollte der Einfluss der Chiralität des Linkers auf die optischen Eigenschaften des Chromophors untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss eines glykosidischen Anknüpfungssystem auf die optischen Eigenschaften des Chromophors im Vergleich zum azyklischen Klick-Linkersystem untersucht werden. Dazu wurde in der Arbeitsgruppe ein Uridin an der 2'-Position mit einem Acetylen modifiziert und für die Vergleichsexperimente zur Verfügung gestellt.

Die Synthesen des azyklischen (*R*)-Linkers konnten analog zu den Synthesen des (*S*)-Linkers durchgeführt werden. Anstatt des (*S*)-Amino-1,2-propandiols wurde das (*R*)-Amino-1,2-propandiol-Enantiomer für die Synthesen verwendet. Die Weiterentwicklung zu den entsprechenden Klick-Linkern konnte sehr einfach durch die carbamatvermittelte Kopplung der Aminfunktion der Linker mit einem Propargylalkohol erreicht werden. Der Einbau der Linkersysteme in verschiedene Oligonukleotide erfolgte über die Standardphosphoramiditstrategie.

Durch die CuAAC gelang die postsynthetische Ligation von Nilblau an bereits synthetisierten, mit Acetylen modifizierten Oligonukleotiden.

Die unterschiedliche Chiralität der Klick-Linker hat nur einen kleinen und zu vernachlässigenden Einfluss auf die Duplexstabilität und die optischen Eigenschaften des Chromophors Nilblau. Die Schmelztemperatur der Duplexe, die UV/VIS-Absorptionsspektren und die Emissionsprofile zeigen deutlich, dass der Chromophor sehr gut in die Doppelhelix interkaliert, ungeachtet der Chiralität der verwendeten Linker. Dies konnte durch geometrisch optimierte Modelldarstellungen der Duplexe veranschaulicht werden. Tatsächlich ist es für die optischen

Eigenschaften des Nilblau-Fluorophors und für die Schmelztemperatur der Duplexe unerheblich, ob der (*R*)- oder (*S*)-Linker verwendet wird.

Erstaunlicherweise sind die optischen Eigenschaften des Nilblau-Chromophors ebenfalls unabhängig von der Art der Anknüpfung an das Oligonukleotid. Es ist für die optischen Eigenschaften unerheblich, ob der Chromophor über die 2'-Position eines Uridins oder über das azyklische (*S*)-Linkersystem an die DNA gebunden wird. Das Klick-Uridin erkennt jedoch Adenin als Gegenbase und kann daher bevorzugt als Ligationsmodifikation verwendet werden, wenn Duplexstabilität und Sequenzerkennung eine wichtige Rolle spielen.

## 9. Experimenteller Teil

### 9.1 *Materialien und Geräte*

#### Reagenzien und Lösungsmittel

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

#### Reaktionsführung

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

#### Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden DC-Alufolien der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0.25 mm verwendet, die mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtet sind. Die Auswertung der Platten erfolgte optisch über die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm bzw. Fluoreszenzanregung bei 366 nm, sowie chemisch mittels Anfärbereagenzien. Routinemäßig wurde MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Reagenz (3 Vol.-% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) verwendet. Zum Erhitzen diente ein Heißluftfön.
- *Flash*-Säulenchromatographie (FC): Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40 – 63 µm verwendet. Es wurde nass gepackt

und nach dem Verfahren von *W. C. Still*<sup>[342]</sup> bei ca. 0.4 bar Überdruck chromatographiert. Die Auftragung der zu reinigenden Substanz erfolgte aufgezogen auf Kieselgel.

## NMR

Kernresonanzspektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln an einem *Bruker Avance 300, Avance 400* oder *Avance 600* durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, NMR-Spektroskopie der Universität Regensburg gemessen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalteten ca. 10 mg Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz dient das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels (DMSO- $d_6$ :  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 2.49$  ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta = 39.4$  ppm). Kopplungskonstanten  $J$  werden in Hz angegeben.

## Massenspektrometrie (MS)

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

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

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

## Oligonukleotid-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese wurde an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Als Träger dienten CPGs mit 1  $\mu\text{mol}$  Belegung (500 Å). Phosphoramidite, Synthesizer-Chemikalien und CPG-Säulen stammten von *Glen Research* und *Proligo*.

## Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

*Reversed-Phase* HPLC wurde mit einem *Shimadzu* HPLC-System durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL). Nachfolgende Tabelle gibt die Säulenwahl entsprechend der Oligonukleotidlänge und Art der HPLC-Läufe wieder:

Tabelle 9-1: Übersicht über die verwendeten HPLC-Säulen für die entsprechenden Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Analytik	semi-präparativ
17mer	<i>Supelcosil</i> LC-318-Säule (25 cm x 4.6 mm, <i>Supelco</i> )	<i>Supelcosil</i> LC-318 (25 cm x 10.0 mm ID, 5 µm, <i>Supelco</i> )
>17mer	<i>Discovery® Bio Wide Pore</i> C5 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm, <i>Supelco</i> )	<i>Discovery® Bio Wide Pore</i> C5 (25 cm x 10 mm, 5 µm, <i>Supelco</i> )

Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5, Laufmittel A) equilibriert und anschließend mit verschiedenen Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) eluiert. Die Elution erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min (analytisch) bzw. 2.5 mL/min (semi-präparativ). Die Detektion mittels Absorption der unmodifizierten bzw. der Acetylen enthaltenden Sequenzen erfolgte bei 260 nm und 290 nm, sowie bei 260 nm und 512 nm für TO-enthaltende Sequenzen und 260 nm bzw. 641 nm für Nilblau-modifizierte DNA.

Eine Zusammenfassung der verwendeten Methoden gibt folgende Tabelle wieder:

Tabelle 9-2: Übersicht über die verwendeten Trennmethode und Detektionswellenlängen.

	Laufzeit	Gradient 17mer	Gradient >17mer	Detektionswellenlängen
unmodifiziert	65 min	0-15 % B	0-10 % B	260 nm; 290 nm
acetylenmodifiziert				
Thiazol Orange	70 min	0-20 % B	0-15 % B	260 nm; 512 nm
Nilblau	50 min	0-30 % B	-	260 nm; 641 nm



**Lyophilisation**

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

**Optische Spektroskopie**

Soweit nicht anders angegeben, enthielten alle Lösungen folgende Konzentrationen und wurden bei 20 °C spektroskopisch untersucht:

$c(\text{DNA bzw. RNA}) = 2.5 \mu\text{M}$

$c(\text{NaP}_i) = 10 \text{ mM}$

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

Alle spektroskopischen Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Quarzküvetten (Firma *Starna*) mit einer Schichtdicke 1 cm durchgeführt.

- Absorption: UV/Vis-Spektren wurden an einem *Varian Cary 100 Bio* mit temperierbarem Küvettenhalter 6 x 6 aufgenommen und gegen das Lösungsmittelsignal korrigiert. Einstellungen: SBW 1.0 nm, Average Time 2 s, Light source changeover: 350 nm. Schmelztemperaturmessungen wurden im Programm „Thermal“ mit den identischen Einstellungen durchgeführt. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min.
- Temperaturabhängige Absorption: Absorptionsspektren wurden von 20 °C bis 90 °C im Abstand von 10 °C aufgenommen. Vor jeder Messung wurde die Temperatur 3 min konstant gehalten.
- Fluoreszenz: Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgte an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter (Jobin-Yvon)* mit Peltier-Element zur Temperatursteuerung (*LFI-3751*). Folgende Software-Einstellungen wurden verwendet: *Integration time* 0.2 s, *Inkrement* 1.0 nm. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert.
- Temperaturabhängige Fluoreszenz: Fluoreszenzspektren wurden von 10 °C oder 20 °C bis 90 °C aufgenommen. Die Zieltemperatur wurde über ein Peltier-Element

LFI-3751 (*Wavelength Electronics*) angesteuert. Vor der Messung wurde die Temperatur mit einer Toleranz von 0.1 °C 5 min konstant gehalten.

- **Fluoreszenzlebenszeiten:** Fluoreszenzlebenszeiten wurden an einem *ISS K2 Fluorometer* gemessen. Die Bestimmung erfolgte über die Phasenmodulationsmethode. Diese Methode verwendet zur Anregung der Fluorophore eine kontinuierlich strahlende Lichtquelle mit sinusförmig moduliertem Licht. Aus Phasenunterschied und Amplitudenveränderung kann die Lebenszeit bestimmt werden.
- **Fluoreszenzquantenausbeute:** Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute erfolgte gemäß Literatur, mit basischer Fluoresceinlösung. Die Fluoreszenzquantenausbeute von Fluorescein beträgt 98 %.<sup>[343]</sup>
- **Zirculardichroismus (CD):** CD-Messungen wurden an einem *Jasco J-715 Spektropolarimeter* mit PTC-150J Thermostat durchgeführt. Die Basislinienkorrektur erfolgte gegen das Lösungsmittel. Folgende Messparameter wurden verwendet: *Sensitivity: 100 mdeg, Data Pitch: 1 nm, Scanning Mode: continous, Scanning Speed: 50 nm/min, Response: 0.5 s, Band Width: 1 nm, Accumulation: 10.*
- **Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsmessung:** Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen wurden von der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. T. Fiebig (Boston College, USA, jetzt Northwestern University, Evanston)* durchgeführt.
- **Fluoreszenzmikroskopie:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von CHO-K1/EGFP-Zellen, die mit markierten DNA-/RNA-Lösungen mikroinjiziert bzw. inkubiert wurden, wurden von der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. Achim Göpferich, Dr. Miriam Breunig (Pharmazeutische Technologie, Universität Regensburg)* durchgeführt.

### **EGFP Gene Silencing Experimente**

EGFP *Gene Silencing* Experimente wurden von der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. Achim Göpferich, Dr. Miriam Breunig (Pharmazeutische Technologie, Universität Regensburg)* durchgeführt.

## Mikroinjektion von DNA-/RNA-Lösungen in CHO-K1-Zellen

Mikroinjektion von DNA-/RNA-Lösungen in CHO-K1-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. Achim Göpferich, Dr. Miriam Breunig (Pharmazeutische Technologie, Universität Regensburg)* durchgeführt.

### RNase-freies Arbeiten

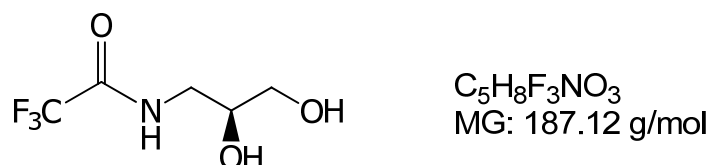
- Verwendung von DEPC-Wasser: 0.13 % wässrige Diethylpyrocarbonatlösung wurde über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag autoklaviert.
- Ausheizen von Glaswaren: Glaswaren und Spatel, sowie feuerfeste Plastikgegenstände, wurden vier Stunden im Trockenschrank bei 180 °C ausgeheizt. Bei Verpackung der Gegenstände in Alufolie konnten diese anschließend keimfrei transportiert werden.

### Entsalzen der DNA

Die Entsalzung der DNA wurde mit NAP-5-Säulen der Firma *GE-Healthcare* durchgeführt. Als Equilibrierungs- und Eluierungspuffer diente 5 mM NH<sub>4</sub>OAc.

## 9.2 Organisch-chemische Synthesen

### (1) (S)-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-2,2,2-trifluoroacetamid

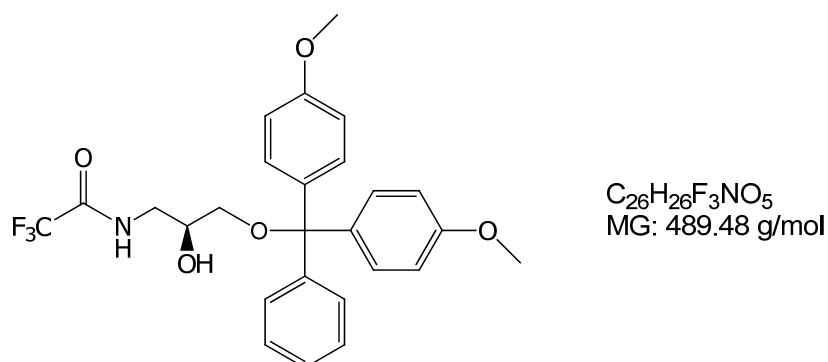


Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. 1.35 g (2.85 mmol) (S)-1-Amino-propan-2,3-diol wurden in einen 100 mL Rundkolben gegeben und in 6.4 mL Trifluoressigsäuremethylester gelöst. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und am nächsten Tag bis zur Trockene am Rotationsverdampfer<sup>[344]</sup> eingengt. Das Produkt wurde dreimal mit je 30 mL Toluol koevaporiert und anschließend an der Hochvakuumpumpe getrocknet. Man erhielt 2.52 g (90.9 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 4.75 (bs, 2H, OH), 3.58 (m, 1H, CHOH), 3.30 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.26 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.09 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75.4 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 156.4 (q,  $J$  = 36 Hz, CO), 116.2 (q,  $J$  = 288 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 69.6 (CHOH), 64.1 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 43.2 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ).

## (2) (*S*)-N-(3-(bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-2,2,2-trifluoroacetamid



2.52 g (13.5 mmol) (*S*)-N-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoroacetamid **1** wurden in einer Lösung aus 70 mL Tetrahydrofuran und 3.5 mL (25.2 mmol) Triethylamin gelöst. Unter Rühren wurden portionsweise 4.8 g (13.5 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid zur Lösung gegeben. Es wurde mit Argon überschichtet und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 1.5 mL Methanol und einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion abgebrochen. Anschließend wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 mL Essigsäureethylester gelöst und dreimal mit je 70 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend zweimal mit je 70 mL Wasser gewaschen. Die wässrige Phase sollte einen pH-Wert zwischen 7 und 8 haben. Das Produkt wurde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde unter Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 5.8 g (86.6 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit.

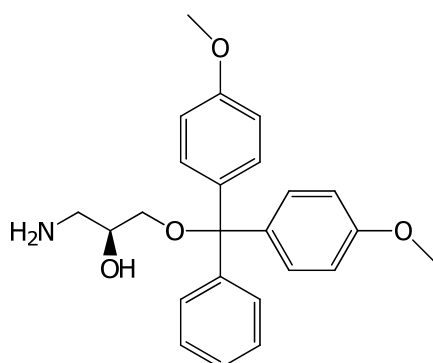
**DC** (DCM/MeOH 100:2)  $R_f = 0.33$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.18 (m, 7H, arom.), 6.86 (m, 4H, arom.), 5.11 (s, 1H, OH), 3.82 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 3.15 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 2.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 2.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75.4 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 158.2 (arom.), 156.4 (q,  $J = 36$  Hz, CO), 145.2, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8 (arom.), 116.2 (q,  $J = 288$  Hz, CF<sub>3</sub>), 113.3 (arom.), 85.5 (OCPh<sub>3</sub>), 69.6 (CHOH), 64.1 (CH<sub>2</sub>OH), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 43.2 (CH<sub>2</sub>NH).

**ESI-MS**  $m/z$  (%): gefunden: 488.3 (100)  $[\text{M-H}^+]^-$ , berechnet: 489.48.

### (3) (*S*)-1-Amino-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)propan-2-ol



$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_4$   
MG: 393.48 g/mol

Es wurden 5.8 g (1.9 mmol) (*S*)-N-(3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl)-trifluoracetamid **2** in einer Mischung aus 75 mL Methanol, 75 mL konz. Ammoniaklösung und 30 mL Tetrahydrofuran gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden Methanol und Tetrahydrofuran im Vakuum entfernt, der wässrige Rückstand dreimal mit je 150 mL Dichlormethan extrahiert und anschließend die organische Phase zweimal mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Das Produkt wurde über Natriumsulfat getrocknet

und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach anschließender Lyophilisation entstehen 4.44 g eines weißen Schaums in 94.5 % Ausbeute.

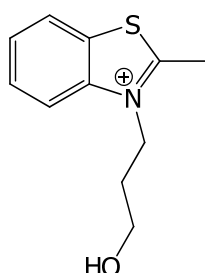
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.17 (m, 7H, arom.), 6.87 (m, 4H, arom.), 4.67 (bs, 1H, OH), 3.72 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.56 (m, 1H, CHOH) 3.30 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.93 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.83 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.66 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.45 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75.4 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 158.2, 145.4, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8, 113.3 (arom.), 85.3 ( $\text{OCPh}_3$ ), 71.5 (CHOH), 65.9 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 43.2 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ).

**ESI-MS** m/z (%): gefunden: 303.0 (100) [ $\text{DMT}^+$ ], 787.5 [ $2\text{MH}^+$ ], berechnet: 393.48.

**CI-MS** m/z (%): gefunden: 92.0 [ $\text{M-DMT}^+$ ], 303.0 (100) [ $\text{DMT}^+$ ], 393.0 [ $\text{M}$ ], berechnet: 393.48.

#### (4) 3-(3-Hydroxypropyl)-2-methylbenzo[d]thiazol-3-ium



$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NOS}^+$   
MG: 208.30 g/mol

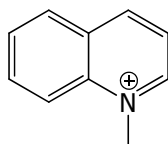
13.7 mL (107.5 mmol) 2-Methyl-benzothiazol und 10.0 g (53.8 mmol) 3-Iodo-1-propanol wurden in 30 mL Acetonitril gelöst. Die Reaktionslösung wurde unter Rückfluss 91 Stunden erhitzt, abgekühlt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Der ausfallende Niederschlag wurde abgesaugt und dreimal mit 15 mL kaltem Diethylether gewaschen. Anschließend wurde das Produkt unter Vakuum getrocknet. Es entstand ein weißer Niederschlag (90 % d. Th.)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.46 – 8.29 (m, 2H, arom.), 7.93 – 7.78 (m, 2H, arom.), 4.83 (m, 1H, OH), 4.78 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{NCH}_2-$ ), 3.53 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{O}$ ), 3.22 (s, 3H, Me), 2.06 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.8 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 177.2, 140.8, 129.3, 129.0, 128.0, 124.6, 116.7 (Benzothiazol arom.), 57.3, 45.8, 30.4 (Propyl), 16.7 (2-Me).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) gefunden: 208.1 (100)  $[\text{M}]^+$ , berechnet: 208.30.

## (5) 1-Methylchinolinium



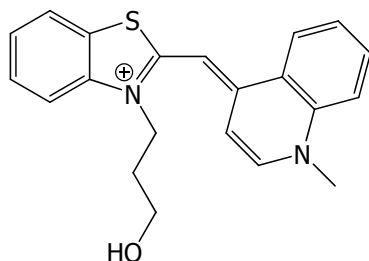
$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}^+$   
MG: 144.19 g/mol

Es wurden 2.3 mL (19 mmol, 1 eq.) Chinolin und 3.9 mL Iodmethan (62 mmol, 3.3 eq.) in 40 mL 1,4-Dioxan unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Es wurde eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, anschließende Abkühlung auf RT. Das ausgefallene Produkt wurde filtriert, dreimal mit 10 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  und dreimal mit 10 mL Petrolether gewaschen. Man erhielt 5.04 g (18.6 mmol) eines senfgelben Feststoffes (98 % d. Th.).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 9.53 (m, 1H, arom.), 9.33 (m, 1H, arom.), 8.53 (m, 2H, arom.), 8.36 – 8.08 (m, 3H, arom.), 4.67 (s, 3H, Me).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 150.1, 146.0, 138.2, 135.4, 130.2, 129.9, 129.1, 121.9, 119.1 (Chinolin), 45.3 (Me).

**ESI-MS:**  $m/z$  (%) gefunden: 144.1 (100)  $[\text{M}]^+$ , berechnet: 144.19.

**(6) (E)-3-(3-Hydroxypropyl)-2-((1-methylquinolin-4(1H)-ylidene)methyl)benzo[d]thiazol-3-ium**

C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup>  
MG: 349.47 g/mol

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.17 g (3.5 mmol) **4** und 1.2 g (4.2 mmol) N-methylchinolin **5** in 20 mL einer Mischung aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:1 v:v) gelöst. Bei Zugabe von trockenem Et<sub>3</sub>N (1.2 mL, 8.575 mmol) verfärbte sich die Reaktionslösung augenblicklich tiefrot. Die Reaktionslösung wurde unter Rückfluss erhitzt und über Nacht gerührt, anschließend ließ man auf Raumtemperatur abkühlen. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt, dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es entstand ein roter Feststoff in 31 % Ausbeute.

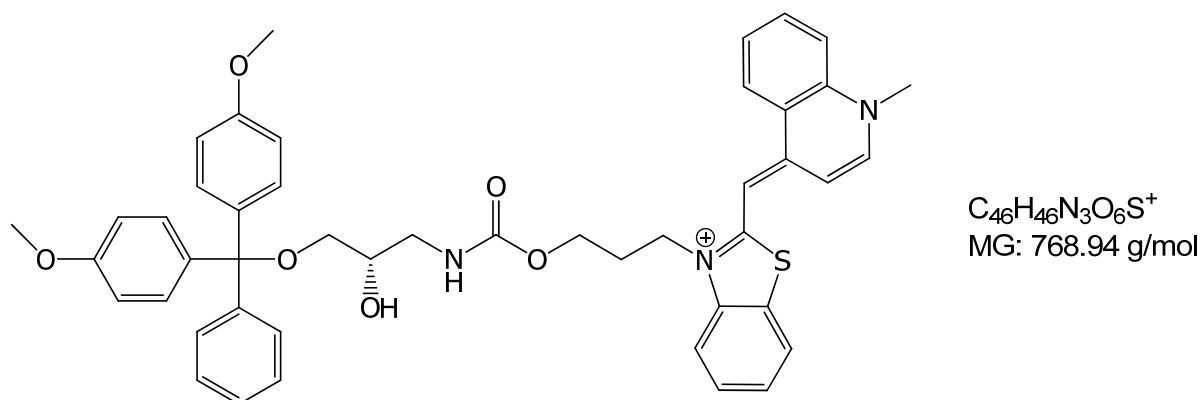
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.75 (m, 1H, arom.), 8.43 (m, 1H, arom.), 8.09 – 7.99 (m, 3H, arom.), 7.79 – 7.74 (m, 2H, arom.) 7.64 – 7.58 (m, 1H, arom.), 7.44 – 7.37 (m, 2H, arom.), 7.05 (s, 1H, Olefin-H), 5.05 (t, 1H, *J* = 4.67 Hz, OH), 4.63 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-), 4.18 (s, 3H, N-Me), 3.58 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-O), 2.00 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 159.2, 148.6, 145.0, 139.9, 138.0, 133.1, 128.1, 126.9, 125.2, 124.4, 124.0, 123.8, 122.9, 118.2, 112.7, 107.8, 87.4 (Thiazole Orange), 57.3 (Propyl), 45.6 (N-Me), 42.3, 30.1 (Propyl).

**MS (ESI):** m/z (%) gefunden: 349.0 (100) [M]<sup>+</sup>, berechnet: 349.47.

**HR-MS (FAB):** gefunden: m/z = 349.1380 [M]<sup>+</sup>, berechnet: 349.1375.





175

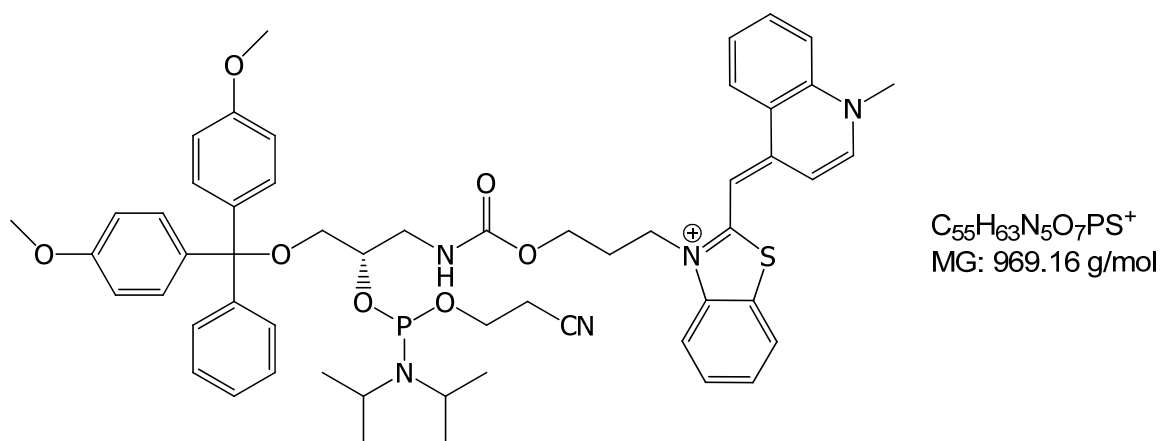
**$^{13}\text{C}$ -NMR** (125.8 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 166.8, 157.9, 148.8, 145.0, 139.8, 137.9, 135.6, 133.0, 131.5, 130.2, 129.6, 128.6, 128.3, 127.6, 126.9, 126.4, 123.8, 112.9, 85.1 (O-C-(PhOMe) $_2$ Ph), 68.6, 65.6 (CH $_2$ O), 54.9 (OMe), 42.4 (Propyl), 28.8 (Propyl).

**MS (ESI):** m/z (%) gefunden: 768.3 (100)  $[\text{M}]^+$ , berechnet: 768.3.

**HR-MS (FAB):** gefunden: m/z = 768.3096  $[\text{M}]^+$ , berechnet: 768.3107.

**MS (MALDI-TOF):** gefunden: m/z = 768.2  $[\text{M}]^+$ , berechnet: 768.3.

**(8) 3-((6*S*)-6-((bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-methyl)-4-(2-cyanoethoxy)-3-*is*opropyl-2-methyl-9-oxo-5,10-dioxo-3,8-diaza-4-phosphatridecan-13-yl)-2-((*Z*)-(1-methylchinolin-4(1*H*)-ylidene)methyl)benzo[*d*]thiazol-3-ium**



Unter Argonatmosphäre wurden 60 mg (0.067 mmol) **7** in 4 mL trockenem CH $_2$ Cl $_2$  gelöst und 35  $\mu\text{L}$  (0.2 mmol) trockenes Di*is*opropylamine und 21  $\mu\text{L}$  (0.094 mmol) 2-Cyanoethyl-*N,N*-di*is*opropylchlorophosphoramidit zugegeben. Kontrolle mittels DC ergab einen quantitativen Umsatz nach 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wurde mit frisch zubereiteter gesättigter NaHCO $_3$ -Lösung gewaschen, über Na $_2$ SO $_4$  getrocknet und anschließend im Vakuum bis zur Trockenen

eingengt. Man erhielt einen dunkelroten Schaum, der in trockenem MeCN (0.6 mL) gelöst und direkt für die automatische DNA-Synthese eingesetzt wurde.

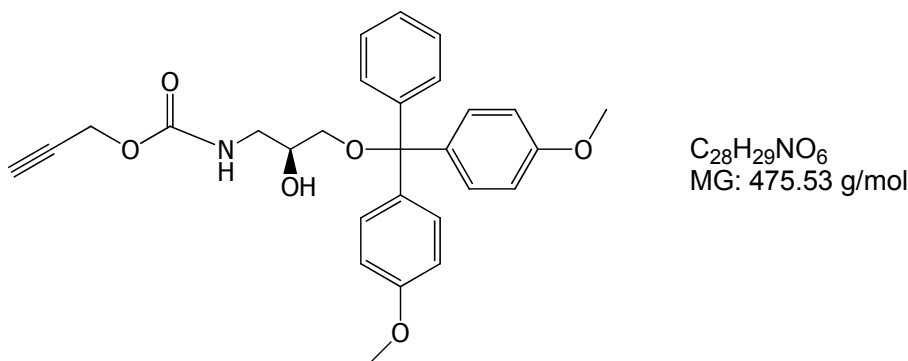
**DC** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$ )  $R_f = 0.5$ .

**$^{31}\text{P}$ -NMR** (121 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 149.59, 149.06$  ppm.

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) gefunden: 968.6 (100)  $[\text{M}]^+$ , berechnet: 968.4.

**MS (MALDI-TOF):** gefunden:  $m/z = 845.3, 899.6$  Hydrolyseprodukte ( $\text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_8\text{PS}^+$ ,  $\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_8\text{PS}^+$ ) von 8 in Methanol.

**(9) (S)-Prop-2-ynyl 3-(bis(4-methoxyphenyl)-(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropylcarbamate**



2-Propin-1-ol (40  $\mu\text{L}$ , 700  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 5 mL DMF gelöst. Es wurden 12 mg (700  $\mu\text{mol}$ ) 1,1-Carbonyldiimidazol zugefügt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 3 Stunden gerührt. Anschließend wurden 268 mg (700  $\mu\text{mol}$ ) (S)-1-amino-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)propan-2-ol **3** zugefügt und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde bis zur Trockene eingengt und über Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0.1 %  $\text{NEt}_3$ ). Man erhielt einen gelben Feststoff (76 %).

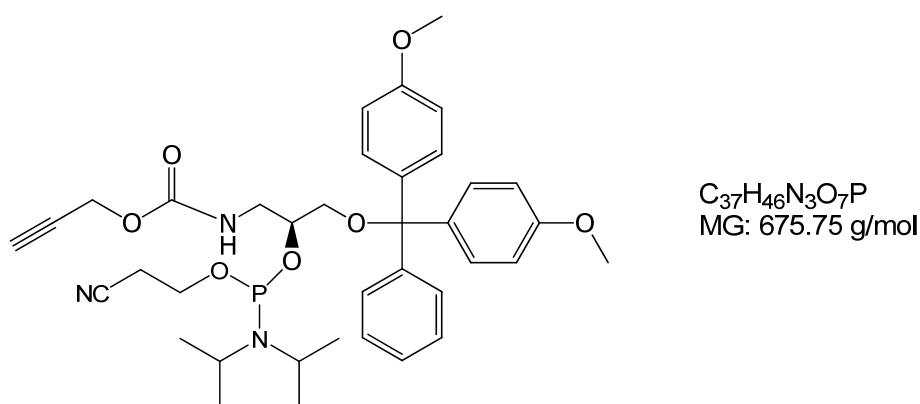
**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2)  $R_f = 0.3$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.51 - 7.48 ppm (m, 2H, arom. DMT), 7.37 - 7.28 (m, 7H, arom. DMT), 6.89 - 6.86 (m, 4H, arom. DMT), 6.26 (m, 1H, NH), 4.64 (d,  $J = 2.47$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CCH), 4.17 (d,  $J = 5.21$  Hz, 1H, OH), 3.92 - 3.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 6H, OMe), 3.45 - 3.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.22 - 3.15 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.13 - 3.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 2.98 (t,  $J = 2.47$  Hz, 1H, CCH).

**MS (FAB):**  $m/z$  (%) gefunden: 303.1 (100) [DMT]<sup>+</sup>, 475.5 [MH<sup>+</sup>], berechnet: 476.2.

**HRMS (FAB):** gefunden: 476.2085, berechnet: 476.2073.

**(10) (2S)-3-(bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-((2-cyanoethoxy)(di*s*opropylamino)methoxy)propylcarbamate**



350 mg (0.74 mmol) (*S*)-Prop-2-ynyl-3-(bis(4-methoxyphenyl)-(phenyl)-methoxy)-2-hydroxy-propyl-carbamate **9** wurden unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Es wurden 380  $\mu$ L (2.21 mmol) trockenes Ethyldi*s*opropylamine und 181  $\mu$ L (0.81 mmol) 2-cyanoethyl-*N,N*di*s*opropylchlorophosphoramidite zugegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur drei Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit frisch zubereiteter gesättigter NaHCO<sub>3</sub> gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels *Flash*-Säulenchromatographie gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2, 0.1 %

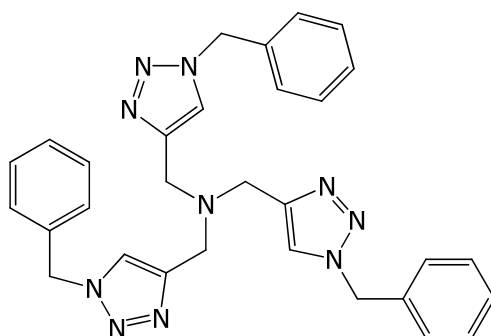
(*i*Pr)<sub>2</sub>NEt). Der in 80 % Ausbeute entstehende gelbe Schaum wurde in 6.1 mL trockenem MeCN gelöst und direkt für die automatisierte DNA Synthese eingesetzt.

**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2):  $R_f = 0.6$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.46 - 7.49 (m, 2H, arom.), 7.25 - 7.35 (m, 7H, arom.), 6.83 - 6.88 (m, 4H, arom.), 6.20 (m, 1H, NH), 4.60 (dd,  $J = 2.47$  Hz, CH<sub>2</sub>≡), 4.10 (m, 1H), 3.75 (s, 6H, 2\*OMe), 3.85 (m, 1H), 3.61 (m, 2H), 3.54 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.22 (m, 1H), 3.07 (m, 1H), 2.95 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 2.58 (t,  $J = 6.04$  Hz, 1H, ≡H), 1.06 - 1.19 (m, 12H, 4\*Me (*i*Prop)).

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta = 150.6$  ppm.

## (11) Tris((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin



C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>N<sub>10</sub>  
MG: 530.63 g/mol

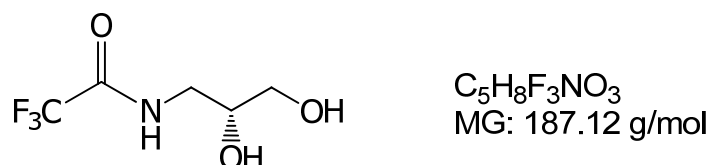
Es wurden 730 mg (5.56 mmol) Tripropargylamin, 3.325 g (25 mmol) Benzylazid, 647  $\mu$ L (5.56 mmol) 2,6-Lutidin, 208 mg (1-5 mol%) CuSO<sub>4</sub> (gelöst in Wasser) und 661 mg (10-20 mol%) Natriumascorbat (gelöst in Wasser) zusammengegeben und in Acetonitril gelöst. Es entstehen zwei Phasen, die während drei Tagen bei Raumtemperatur heftig gerührt wurden. Die Phasentrennung hebt sich auf, das Rohprodukt wurde bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeeengt und anschließend über Säulenchromatographie gereinigt (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 % MeOH).

**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1):  $R_f = 0.7$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.10 (s, 3H, =CHN-), 7.39 – 7.31 (m, 9H, arom.), 7.29 – 7.26 (m, 6H, arom.), 5.59 (s, 6H, Ph-CH<sub>2</sub>), 3.62 (br. s, 6H, N-CH<sub>2</sub>).

**MS (ESI):** m/z (%) gefunden: 531.3 (100)  $[\text{M}]^+$ , berechnet: 530.64.

## (12) (*R*)-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-2,2,2-trifluoroacetamid

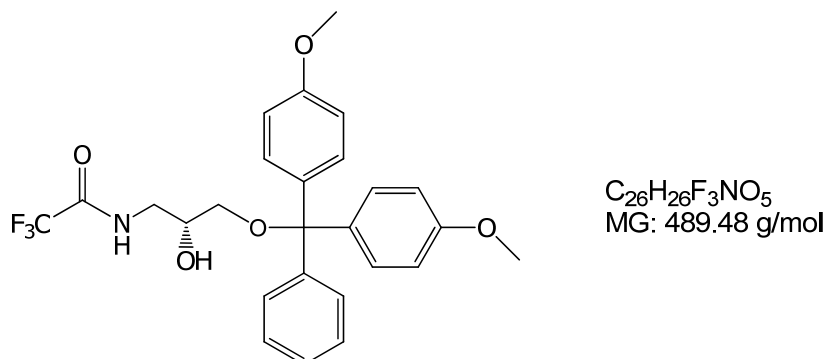


Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. 1.35 g (2.85 mmol) (*R*)-1-Amino-propan-2,3-diol wurden in einen 100 mL Rundkolben gegeben und in 6.4 mL Trifluoressigsäuremethylester gelöst. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und am nächsten Tag bis zur Trockene am Rotationsverdampfer<sup>[344]</sup> eingeengt. Das Produkt wurde dreimal mit je 30 mL Toluol koevaporiert und anschließend an der Hochvakuumpumpe getrocknet. Man erhielt 2.52 g (90.9 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 4.75 (bs, 2H, OH), 3.58 (m, 1H, CHOH), 3.30 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 3.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75.4 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 156.4 (q,  $J$  = 36 Hz, CO), 116.2 (q,  $J$  = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 69.6 (CHOH), 64.1 (CH<sub>2</sub>OH), 43.2 (CH<sub>2</sub>NH).

**(13) (*R*)-N-(3-(bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropyl)-2,2,2-trifluoroacetamid**



2.52 g (13.5 mmol) (*R*)-N-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoroacetamid **12** wurden in einer Lösung aus 70 mL Tetrahydrofuran und 3.5 mL (25.2 mmol) Triethylamin gelöst. Unter Rühren wurden portionsweise 4.8 g (13.5 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid zur Lösung gegeben. Es wurde mit Argon überschichtet und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 1.5 mL Methanol und einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion abgebrochen. Anschließend wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 mL Essigsäureethylester gelöst und dreimal mit je 70 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend zweimal mit je 70 mL Wasser gewaschen. Die wässrige Phase sollte einen pH-Wert zwischen 7 und 8 haben. Das Produkt wurde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde unter Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 5.8 g (86.6 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit.

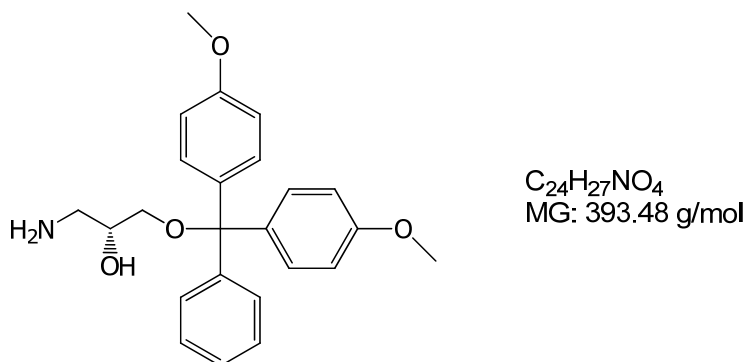
**DC** (DCM/MeOH 100:2)  $R_f = 0.33$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.18 (m, 7H, arom.), 6.86 (m, 4H, arom.), 5.11 (s, 1H, OH), 3.82 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 3.15 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 2.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 2.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75.4 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 158.2 (arom.), 156.4 (q,  $J$  = 36 Hz, CO), 145.2, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8 (arom.), 116.2 (q,  $J$  = 288 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 113.3 (arom.), 85.5 ( $\text{OCPh}_3$ ), 69.6 (CHOH), 64.1 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 43.2 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ).

**ESI-MS**  $m/z$  (%): gefunden: 488.3 (100)  $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ , berechnet: 489.48.

**(14) (*R*)-1-Amino-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)propan-2-ol**



Es wurden 5.8 g (1.9 mmol) (*R*)-N-(3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl)-trifluoracetamid **13** in einer Mischung aus 75 mL Methanol, 75 mL konz. Ammoniaklösung und 30 mL Tetrahydrofuran gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden Methanol und Tetrahydrofuran im Vakuum entfernt, der wässrige Rückstand dreimal mit je 150 mL Dichlormethan extrahiert und anschließend die organische Phase zweimal mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Das Produkt wurde über Natriumsulfat getrocknet und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach anschließender Lyophilisation entstehen 4.44 g eines weißen Schaums in 94.5 % Ausbeute.

**$^1\text{H}$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31 – 7.17 (m, 7H, arom.), 6.87 (m, 4H, arom.), 4.67 (bs, 1H, OH), 3.72 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.56 (m, 1H, CHOH) 3.30 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.93 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.83 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.66 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.45 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ).

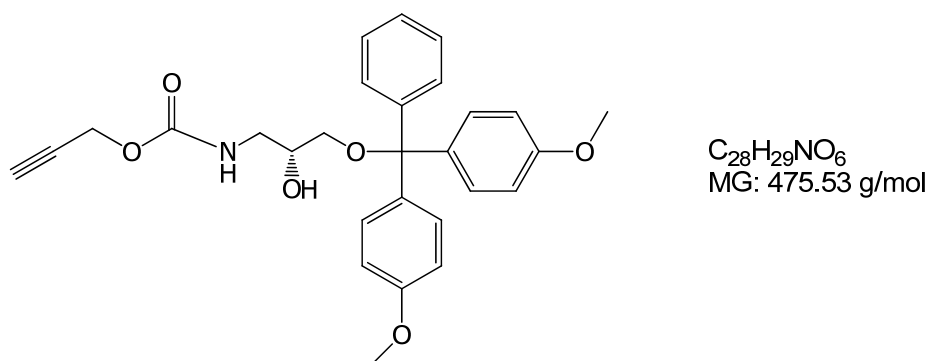


**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75.4 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 158.2, 145.4, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8, 113.3 (arom.), 85.3 (OCPh $_3$ ), 71.5 (CHOH), 65.9 (CH $_2$ O), 55.2 (OCH $_3$ ), 43.2 (CH $_2$ NH).

**ESI-MS** m/z (%): gefunden: 303.0 (100) [DMT $^+$ ], 787.5 [2MH $^+$ ], berechnet: 393.48.

**CI-MS** m/z (%): gefunden: 92.0 [M-DMT $^+$ ], 303.0 (100) [DMT $^+$ ], 393.0 [M], berechnet: 393.48.

**(15) (*R*)-Prop-2-ynyl 3-(bis(4-methoxyphenyl)-(phenyl)methoxy)-2-hydroxypropylcarbamate**



2-Propin-1-ol (40  $\mu\text{L}$ , 700  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 5 mL DMF gelöst. Es wurden 12 mg (700  $\mu\text{mol}$ ) 1,1-Carbonyldiimidazol zugefügt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 3 Stunden gerührt. Anschließend wurden 268 mg (700  $\mu\text{mol}$ ) (*R*)-1-Amino-3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)propan-2-ol **14** zugefügt und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde bis zur Trockene eingengt und über Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt (CH $_2$ Cl $_2$ , 0.1 % NEt $_3$ ). Man erhielt einen gelben Feststoff (76 %).

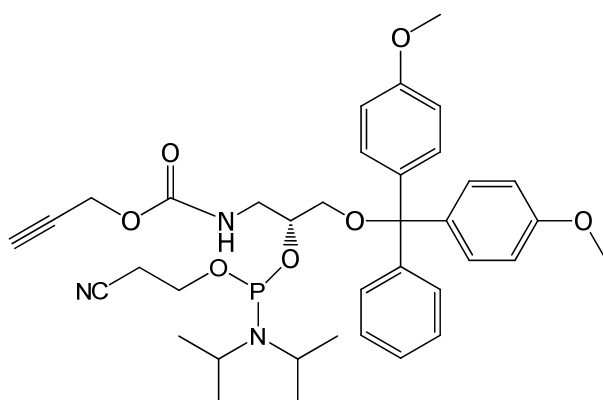
**DC** (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH=100:2)  $R_f$  = 0.3.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $[\text{d}_6]$ -Aceton):  $\delta$  = 7.51 – 7.48 ppm (m, 2H, arom. DMT), 7.37 – 7.28 (m, 7H, arom. DMT), 6.89 – 6.86 (m, 4H, arom. DMT), 6.26 (m, 1H, NH), 4.64 (d,  $J$  = 2.47 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 4.17 (d,  $J$  = 5.21 Hz, 1H, OH), 3.92 – 3.86 (m, 1H,  $\text{H}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.79 (s, 6H, OMe), 3.45 – 3.37 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.22 – 3.15 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.13 – 3.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 2.98 (t,  $J$  = 2.47 Hz, 1H, CCH).

**MS (FAB)**  $m/z$  (%): 303.1 (100)  $[\text{DMT}]^+$ , 475,5  $[\text{MH}^+]$ .

**HRMS (FAB)** gefunden: 476.2085, berechnet:  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{NO}_6$   $[\text{MH}^+]$ : 476.2073.

**(16) (2R)-3-(bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-((2-cyanoethoxy)(di*is*opropylamino)methoxy)propylcarbamate**



$\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$   
MG: 675.75 g/mol

350 mg (0.74 mmol) (*R*)-prop-2-ynyl-3-(bis(4-methoxyphenyl)-(phenyl)-methoxy)-2-hydroxy-propyl-carbamate **15** wurden unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Es wurden 380  $\mu\text{L}$  (2.21 mmol) trockenes Ethyldi*is*opropylamine und 181  $\mu\text{L}$  (0.81 mmol) 2-Cyanoethyl-*N,N*-di*is*opropylchlorophosphoramidit zugegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur drei Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit frisch zubereiteter gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und anschließend bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels *Flash*-Säulenchromatographie gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  100:2, 0.1 %

(*i*Pr)<sub>2</sub>NEt). Der in 80 % Ausbeute entstehende gelbe Schaum wurde in 6.1 mL trockenem MeCN gelöst und direkt für die automatisierte DNA Synthese eingesetzt.

**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=100:2): R<sub>f</sub> = 0.6.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O): δ = 1.06 – 1.19(m, 12H, 4\*Me (Prop)), 2.58 (t, J = 6.04 Hz, 1H, ≡H), 2.76 (m, 2H), 2.95 (m, 1H), 3.07 (m, 1H), 3.22 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.61 (m, 2H), 3.85 (m, 1H), 3.75 (s, 6H, 2\*OMe), 4.10 (m, 1H), 4.60 (dd, J = 2.47 Hz, CH<sub>2</sub>≡), 6.20 (m, 1H, NH), 6.83 – 6.88 (m, 4H, arom.), 7.25 – 7.35 (m, 7H, arom.), 7.46 – 7.49 (m, 2H, arom.).

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, [d<sub>6</sub>]-Aceton): = 150.6.

## **9.3 DNA Synthesen**

### 9.3.1. Kopplungsprotokolle

Die Nukleotidsynthesen erfolgten an einem PerSeptive Expedite 8909 Syntheseautomaten von *Applied Biosystems (ABI)*. Alle Reagenzien zum Betrieb des Automaten wurden entweder von *Proligo*, *ABI* oder *GlenResearch* bezogen, das Gerät wurde unter Argon als Schutzgasatmosphäre betrieben. Als Trägermaterial dienten CPG-Säulen mit 500 Å Porengröße und 1 µmol Belegung (*ABI*). Die 5'-terminale DMT-Schutzgruppe wurde an sämtlichen DNA-Strängen durch den Syntheseautomaten abgespalten (*trityl-off-Synthese*). Artificielle DNA-Bausteine wurden in Acetonitril (*amidite diluent*) aufgenommen und als 0.1 M Lösung in den Syntheseautomaten eingesetzt.

Der Syntheseautomat fördert Flüssigkeiten aus seinen Reservoirs in Pulsen zu je 16 µL durch die Reaktionsgefäße. Ein Kopplungsprotokoll besteht aus Einzelschritten, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer (in Sekunden) des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet ein schnellstmögliches Durchlaufen des Einzelschrittes. Ein Standardkopplungsprotokoll wird nachfolgend gezeigt, für den Einbau artifizierlicher Bausteine wird dieses nur im Bereich „\$ Coupling“ verändert. Unmarkierte DNA-Sequenzen wurden von der Firma *Metabion* geordert.

Dblk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan

Wsh: Acetonitril

Act: 0.45 M Tetrazol in Acetonitril

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

Ox: Iod in Wasser / THF/ Pyridin

Tabelle 9-3: Standardkopplungsprotokoll zum Einbau von Adenosin in DNA.

<b>Codierung</b>	<b>Funktion</b>	<b>Modus</b>	<b>Menge / Arg1</b>	<b>Zeit / Arg2</b>
\$ Deblocking				
24	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
21	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dblk	PULSE	10	0
16	Dblk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
21	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
24	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	2	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Zur Synthese Thiazol Orange bzw. Acetylen modifizierter Oligonukleotide wurde folgendes Protokoll verwendet:

Tabelle 9-4: Modifiziertes Protokoll zum Einbau des Thiazol-Orange-Phosphoramidits **8**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	7	0
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>6</b>	<b>0</b>
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>2</b>	<b>500</b>
2	Act	PULSE	3	300
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>3</b>	<b>50</b>
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>1</b>	<b>500</b>
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	30	0
2	Act	PULSE	7	0
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>6</b>	<b>0</b>
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>2</b>	<b>500</b>
2	Act	PULSE	3	300
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>3</b>	<b>50</b>
23	<b>6 + Act</b>	PULSE	<b>1</b>	<b>500</b>
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	15	0

Die Kopplungszeit wurde auf 61 min ausgedehnt, dabei wurde nach der Hälfte der Zeit die Phosphoramidit- und Aktivatorlösung erneuert.

### 9.3.2. Reinigung und Aufarbeitung

#### Aufarbeitung

Die CPG-Säulen wurden im Hochvakuum getrocknet. Die Kunststoffgefäße wurden geöffnet, das CPG-Granulat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µL konzentrierter Ammoniaklösung (>25 %, *trace select*, Fluka) versetzt. Die Deckel wurden mit Kunststoffkappen gesichert und es wurde mindestens 10 h auf 55

°C erhitzt. Im Falle von 3'-modifizierten Sequenzen, die mit Hilfe eines „*Universal CPG*“ der Firma *Proligo* synthetisiert worden sind, wurde zur Entschützung des Oligonukleotids konz. Ammoniak / 0.5 M Natriumchlorid Lösung (5/1, v/v), bei 75 °C für 6 Stunden zugegeben. Nach dem Abkühlen wurde das CPG mittels Zentrifugenfilter abgetrennt und mit 300 µL Wasser gewaschen. Das Ammoniak der vereinigten Filtrate wurden in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (30 min, Heizung 25 min, 35 °C, 100 mbar) entfernt, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Die gefriergetrockneten Proben wurden in 300 µL Wasser aufgenommen und über HPLC gereinigt, Identifikation erfolgte mittels ESI-MS.

### Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-Stammlösung wurde über die Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  bestimmt (*Lambert-Beer'sches Gesetz*). Dazu wurden 5 µL der Stammlösung mit 995 µL Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{260}$  eines unmodifizierten DNA-Oligonukleotids errechnet sich nach:

$$\epsilon = (A * \epsilon_A + C * \epsilon_C + G * \epsilon_G + T * \epsilon_T) * 0.9$$

A, C, G, T: Anzahl der entsprechenden Nukleobasen A, C, G, T

$$\epsilon_A = 15\,400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$\epsilon_C = 7\,300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$\epsilon_G = 11\,700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$\epsilon_T = 8\,800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

Für artifizielle Nukleobasen wurden folgende Extinktionskoeffizienten zur Berechnung verwendet:

$$\text{Thiazol Orange } \epsilon_{260} = 9\,400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ [345]}$$

$$\text{Nilblau } \epsilon_{260} = 12\,090 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ [346]}$$

**Duplexhybridisierung**

Der modifizierte Einzelstrang wurde mit 1.2 eq. des (un-)modifizierten Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer und 250 mM Natriumchloridlösung 10 min auf 90 °C erhitzt und langsam abgekühlt.

**Fotos der angeregten DNA-Lösungen**

Die DNA-Lösungen wurden mit einer herkömmlichen UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm angeregt und mit einer *Finepix F30* Kamera von *Fujifilm* fotografiert.

### 9.3.3. Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide

**Monomer - Dimer - Vergleich**

**DNA1:** 3'-CAG-TCA-GTT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA2:** 5'-GTC-AGT-CAA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA3:** 3'-CAG-TCA-**TO**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA2:** 5'-GTC-AGT-CAA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA3:** 3'-CAG-TCA-**TO**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT-**TTO**A-CTG-CAT-GC-3'

Tabelle 9-5: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA3 und DNA4.

DNA	$\epsilon_{260\text{nm}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA3</b>	164 900	5407.45	1802.2 $[\text{M}^+-4\text{H}^+]^3$ ; 1351.3 $[\text{M}^+-5\text{H}^+]^4$
<b>DNA4</b>	159 000	5398.44	1798.8 $[\text{M}-3\text{H}^+]^3$ ; 1349.2 $[\text{M}-4\text{H}^+]^4$



Tabelle 9-6: Charakteristische Daten der Monomer- und Dimerduplexe.

DNA	$FI_{\max}/nm$	$\tau / ns$	$\Phi$	$R_{FI} (FI_{533nm}/FI_{585nm})$	$T_m/^\circ C$ [260 nm]	$T_m/^\circ C$ [508 nm]
<b>DNA3-2</b>	530	2.31	0.22	2.54	65.5	-
<b>DNA3-4</b>	585	3.10	0.08	0.15	69.4	70.5

### Gegenbasenvariationen

**DNA3:** 3'-CAG-TCA-**TO**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT-**TT**OA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA5:** 3'-CAG-TCA-**TO**AT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA6:** 5'-GTC-AGT-**AT**OA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA7:** 3'-CAG-TCA-**TO**CT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA8:** 5'-GTC-AGT-**CT**OA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA9:** 3'-CAG-TCA-**TO**GT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA10:** 5'-GTC-AGT-**GT**OA-CTG-CAT-GC-3'

Tabelle 9-7: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA3, DNA4 bis DNA10.

DNA	$\epsilon_{260nm}/M^{-1}cm^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA3</b>	159 000	5407.45	1802.2 $[M^+-4H^+]^{3-}$ ; 1351.3 $[M^+-5H^+]^4$
<b>DNA4</b>	164 900	5398.44	1798.8 $[M-3H^+]^{3-}$ ; 1349.2 $[M-4H^+]^4$
<b>DNA5</b>	164 900	5416.46	1352.9 $[M-4H^+]^4$ ; 1805.4 $[M-3H^+]^{3-}$
<b>DNA6</b>	170 900	5407.45	1351.0 $[M-4H^+]^4$ ; 1802.0 $[M-3H^+]^{3-}$
<b>DNA7</b>	157 600	5392.45	1347.3 $[M-4H^+]^4$ ; 1796.5 $[M-3H^+]^{3-}$
<b>DNA8</b>	163 600	5383.44	1345.0 $[M-4H^+]^4$ ; 1793.7 $[M-3H^+]^{3-}$
<b>DNA9</b>	161 600	5432.46	1359.2 $[M-4H^+]^4$
<b>DNA10</b>	167 500	5423.45	1084.0 $[M-5H^+]^{5-}$

Tabelle 9-8: Charakteristische Daten der Duplexe zur Evaluation der Gegenbasenabhängigkeit des TO-Dimers.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	Φ	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>DNA3-4</b>	585	0.08	0.15	69.4	70.5
<b>DNA5-6</b>	578	0.16	0.49	67.3	62.5
<b>DNA7-8</b>	587	0.20	0.21	69.8	65.5
<b>DNA9-10</b>	569	0.17	0.78	66.3	64.5

### Nachbarbasenvariationen

**DNA3:** 3'-CAG-TCA-**TO**TT-GAC-GTA-CG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT-**TT**OA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA11:** 3'-CAG-TCG-**TO**TC-GAC-GTA-CG-5'

**DNA12:** 5'-GTC-AGC-**TT**OG-CTG-CAT-GC-3'

**DNA13:** 3'-CAG-TCA-**TO**TA-GAC-GTA-CG-5'

**DNA14:** 5'-GTC-AGT-**TT**OT-CTG-CAT-GC-3'

**DNA15:** 3'-CAG-TCC-**TO**TC-GAC-GTA-CG-5'

**DNA16:** 5'-GTC-AGG-**TT**OG-CTG-CAT-GC-3'

Tabelle 9-9: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA3, DNA4 und DNA11 bis DNA16.

DNA	ε <sub>260nm</sub> /M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA3</b>	159 000	5407.45	1802.2 [M <sup>+</sup> -4H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1351.3 [M <sup>+</sup> -5H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA4</b>	164 900	5398.44	1798.8 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1349.2 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA11</b>	154 300	5408.45	1802.1 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1351.2 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA12</b>	160 200	5399.44	1799.1 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1349.1 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA13</b>	153 000	5416.46	1804.8 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1353.2 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA14</b>	170 900	5389.43	1795.7 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1346.5 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA15</b>	158 300	5368.44	1751.3 [M-2H <sup>+</sup> ] <sup>2-</sup> ; 1166.6 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup>
<b>DNA16</b>	156 300	5439.44	1812.6 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1359.1 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>

Tabelle 9-10: Charakteristische Daten der Duplexe zur Evaluation der Nachbarbasenabhängigkeit des TO-Dimers.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [507 nm]
<b>DNA3-4</b>	585	0.15	69.4	70.5
<b>DNA11-12</b>	594	0.16	72.7	71.0
<b>DNA13-14</b>	593	0.18	67.8	67.2
<b>DNA15-16</b>	588	0.45	72.4	69.6

**Paralleler Dimer****DNA3:** 3'-CAG-TCA-**TO**-TT-GAC-GTA-CG-5'**DNA4:** 5'-GTC-AGT-T**TOA**-CTG-CAT-GC-3'**DNA17:** 3'-CAG-TCA-**TO-TO**-TTG-ACG-TAC-5'**DNA18:** 5'-GTC-AGT---T--T--**AAC**-TGC-ATG-3'**DNA19:** 3'-CAG-TCC-**TO-TO**-GTG-ACG-TAC-5'**DNA20:** 5'-GTC-AGG---T--T--**CAC**-TGC-ATG-3'**DNA21:** 3'-CAG-TCA-**TO-TO'**-TTG-ACG-TAC-5'**DNA18:** 5'-GTC-AGT---T--T---**AAC**-TGC-ATG-3'**DNA22:** 3'-CAG-TCC-**TO-TO'**-GTG-ACG-TAC-5'**DNA20:** 5'-GTC-AGG---T--T---**CAC**-TGC-ATG-3'

Tabelle 9-11: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA3, DNA4 und DNA17, DNA19, DNA21 und DNA22.

DNA	$\epsilon_{260nm}/M^{-1}cm^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA3</b>	159 000	5407.45	1802.2 [M <sup>+</sup> -4H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1351.3 [M <sup>+</sup> -5H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA4</b>	164 900	5398.44	1798.8 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1349.2 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA17</b>	163 800	5606.98	1868.3 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 2006. [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA19</b>	159 100	5607.97	1868.6 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 201.3 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA21</b>	163 800	5606.98	1868.1 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 200.5 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA22</b>	159 100	5606.97	1868.2 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 200.8 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>

Tabelle 9-12: Charakteristische Daten der Duplexe zur Untersuchung einer parallelen Anordnung der TO Chromophore.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	Φ	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]
<b>DNA3-4</b>	585	0.08	0.15	69.4
<b>DNA17-18</b>	546	0.04	1.20	60.5
<b>DNA19-20</b>	542	0.05	1.44	65.0
<b>DNA21-18</b>	558	-	1.08	59.5
<b>DNA22-20</b>	564	-	0.80	66.4

### „Split Probe“

**DNA17:** 3'-CAG-TCA-**TO-TO**-TTG-ACG-TAC-5'

**DNA18:** 5'-GTC-AGT---T--T--AAC-TGC-ATG-3'

**DNA23a:** 3'-CAG-TCA-GT**TO TO**-GAC-GTA-CG-5' **DNA23b**

**DNA24:** 5'-GTC-AGT-CA--T---T--CTG-CAT-GC-3' (N+0)

**DNA25:** 5'-GTC-AGT-CA--T-A-T--CTG-CAT-GC-3' (N+1)

**DNA26:** 5'-GTC-AGT-CA--T-----CTG-CAT-GC-3' (N-1)

**DNA27:** 5'-GTC-AGT-CA-----CTG-CAT-GC-3' (N-2)

**DNA28:** 5'-GTC-AGT-CA-----TG-CAT-GC-3' (N-3)

Tabelle 9-13: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA17, DNA23a und DNA23b.

DNA	ε <sub>260nm</sub> /M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA17</b>	163 800	5606.98	1868.3 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 2006. [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA23a</b>	87 200	2937.04	267.6 [M-2H <sup>+</sup> ] <sup>2-</sup>
<b>DNA23b</b>	97 700	2962.04	280.2 [M-2H <sup>+</sup> ] <sup>2-</sup>

Tabelle 9-14: Charakteristische Daten der Split-Probe-Duplexe.

DNA	$FI_{\max}/nm$	$R_{FI} (FI_{533nm}/FI_{585nm})$	$T_m/^\circ C [260 nm]$
<b>DNA17-18</b>	546	1.20	60.5
<b>DNA23a-23b-24</b>	542	1.34	52.0
<b>DNA23a-23b-25</b>	538	1.49	50.0
<b>DNA23a-23b-26</b>	535	1.58	53.0
<b>DNA23a-23b-27</b>	534	1.63	54.5
<b>DNA23a-23b-28</b>	533	1.98	48.4

### SNP-Detektion

<b>DNA34:</b>	5'-TG-CAT-GCA- <b>TOATO</b> -ACT-GAC-3'
<b>DNA35:</b>	3'-AC-GTA-CGT---C- <b>A</b> -C--TGA-CTG-5'
<b>DNA36:</b>	3'-AC-GTA-CGT---C- <b>T</b> -C--TGA-CTG-5'
<b>DNA37:</b>	3'-AC-GTA-CGT---C- <b>G</b> -C--TGA-CTG-5'
<b>DNA38:</b>	3'-AC-GTA-CGT---C- <b>C</b> -C--TGA-CTG-5'
<b>DNA39:</b>	3'-AC-GTA-CGT---C- <b>---</b> C--TGA-CTG-5'
<b>DNA40:</b>	5'-TG-CAT-GCA- <b>TOATO'</b> -ACT-GAC-3'
<b>DNA39:</b>	3'-AC-GTA-CGT--C- <b>---</b> C---TGA-CTG-5'

Tabelle 9-15: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA34 und DNA40.

DNA	$\epsilon_{260nm}/M^{-1}cm^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA34</b>	169 700	5615.99	1871.2 $[M^{2+}-5H^+]^{3-}$ ; 203.1 $[M^{2+}-6H^+]^{4-}$
<b>DNA40</b>	169 700	5615.99	1871.4 $[M-3H^+]^{3-}$

Tabelle 9-16: Charakteristische Daten der Duplexe zur Detektion von SNP.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )
<b>DNA34-35</b>	541	1.40
<b>DNA34-36</b>	535	1.63
<b>DNA34-37</b>	538	1.57
<b>DNA34-38</b>	542	1.33
<b>DNA34-39</b>	543	1.28
<b>DNA40-39</b>	535	1.82

**Molecular Beacon**

**DNA4:** 3'-CGT-ACG-TCA-**T**TT-GAC-TG-5'

**DNA4:** 5'-GTC-AGT-**T**OA-CTG-CAT-GC-3'

**DNA4:** 3'-CGT-ACG-TCA-**T**TT-GAC-TG-5'

**DNA41:** 5'-GCA-TGC-AGT--C-AA-CTG-AC-3'

**DNA42:** 3'-GTC-**A****T****O****T**-TGA-CCG-TAC-GTC-**A**GT-TGA-CTG-GTC-**A****T****O****T**-TGA-C-5'

**DNA41:** 5'-GC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-3'

**DNA43:** 5'-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-3'

**DNA44:** 5'-CAG-T-T-A-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-T-A-ACT-G-3'

**DNA45:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-**T**CA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA46:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-**A**CA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA47:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-**C**CA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA48:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-**G**CA-ACT-GAC-CAG-T-3'

Tabelle 9-17: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen des Oligonukleotids DNA42.

DNA	$\epsilon_{260\text{nm}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA42</b>	350 300	11804.99	2360.3 [M-5H <sup>+</sup> ] <sup>5-</sup> ; 1966.8 [M-6H <sup>+</sup> ] <sup>6-</sup>

Tabelle 9-18: Charakteristische Daten der Duplexe zur Entwicklung eines Molecular Beacons.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )
<b>DNA42</b>	580	0.16
<b>DNA42-41</b>	575	0.78
<b>DNA42-43</b>	531	2.21
<b>DNA42-44</b>	533	1.99
<b>DNA42-45</b>	535	1.72
<b>DNA42-46</b>	582	0.37
<b>DNA42-47</b>	580	0.39
<b>DNA42-48</b>	578	0.48

**Stem-Variationen**

**DNA42:** 3'-GTC-**ATOT**-TGA-CCG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-GTC-**ATOT**-TGA-C-5'

**DNA45:** 5'-A-ACT-GGC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA49:** 3'-GTC-**ATOT**-TGA-CTG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-GTC-**ATOT**-TGA-C-5'

**DNA50:** 5'-A-ACT-GAC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-CAG-T-3'

**DNA51:** 3'-TCA-**TOTT**-GAC-TGT-ACG-TCA-GTT-GAC-TGA-TCA-**TOTT**-GA-5'

**DNA52:** 5'-AA-CTG-ACA-TGC-AGT-CAA-CTG-ACT-AGT-3'

**DNA53:** 3'-C-**ATOT**-TGG-CTG-TAC-GTC-AGT-TGA-CTG-ATC-**ATOT**-TG-5'

**DNA54:** 5'-A-ACC-GAC-ATG-CAG-TCA-ACT-GAC-TAG-T-3'

Tabelle 9-19: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA42, DNA49, DNA51 und DNA53.

DNA	$\epsilon_{260\text{nm}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA42</b>	350 300	11804.99	2360.3 [M-5H <sup>+</sup> ] <sup>5-</sup> ; 1966.8 [M-6H <sup>+</sup> ] <sup>6-</sup>
<b>DNA49</b>	351 600	11819.99	2363.1 [M <sup>+</sup> -6H <sup>+</sup> ] <sup>5-</sup> ; 1969.2 [M <sup>+</sup> -7H <sup>+</sup> ] <sup>6-</sup>
<b>DNA51</b>	337 900	11185.90	2236.4 [M <sup>+</sup> -6H <sup>+</sup> ] <sup>5-</sup> ; 1863.7 [M <sup>+</sup> -7H <sup>+</sup> ] <sup>6-</sup>
<b>DNA53</b>	312 700	10584.79	2116.1 [M <sup>+</sup> -6H <sup>+</sup> ] <sup>5-</sup> ; 1763.2 [M <sup>+</sup> -7H <sup>+</sup> ] <sup>6-</sup>

Tabelle 9-20: Charakteristische Daten der Haarnadeln und der entsprechenden Duplexe zur Evaluierung der geeigneten Stammlänge eines Molecular Beacons.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>DNA42</b>	580	0.16	77.0	76.0
<b>DNA42-45</b>	535	1.72	52.0, 83.0	-
<b>DNA49</b>	585	0.22	71.0	70.0
<b>DNA49-50</b>	534	1.65	79.5	-
<b>DNA51</b>	571	0.78	67.1	65.1
<b>DNA51-52</b>	532	1.93	77.5	-
<b>DNA53</b>	571	0.78	59.1	59.2
<b>DNA53-54</b>	533	1.93	78.0	-

## Double Beacons

**DNA55:** 3'-TCA-**TOTTO**-TAC-GTA-CGT-CAG-TTG-ACT-GT**TO**-**TO**T-TGA-5'

**DNA56:** 5'-ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CA-3'

**DNA57:** 5'-AGT-T--A-T---ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CAT—A-TA-ACT-3'

**DNA58:** 3'-CA**TO**-TT**TO**-TAC-GTA-CGT-CAG-TTG-ACT-GT**TO**-TA**TO**-TTG-5'

**DNA56:** 5'-ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CA-3'

**DNA59:** 5'-GT-T--AA-T--ATG-CAT-GCA-GTC-AAC-TGA-CAT—AT-T--AAC-3'

Tabelle 9-21: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA55 und DNA58.

DNA	ε <sub>260nm</sub> /M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA55</b>	311 800	10998.83	2198.8 [M-5H <sup>+</sup> ] <sup>5-</sup> ; 1832.1 [M-6H <sup>+</sup> ] <sup>6-</sup>
<b>DNA58</b>	311 800	10998.83	2198.4 [M-5H <sup>+</sup> ] <sup>5-</sup> ; 1832.0 [M-6H <sup>+</sup> ] <sup>6-</sup>



Tabelle 9-22: Charakteristische Daten der Duplexe und Haarnadeln zur Evaluierung einer möglichen Doppelmarkierung eines Molecular Beacons mit dem TO-Dimer.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>DNA55</b>	561	0.90	67.4	66.1
<b>DNA55-56</b>	547	1.20	76.6	-
<b>DNA55-57</b>	559	1.06	-	-
<b>DNA58</b>	568	0.65	64.0	68.0
<b>DNA58-56</b>	554	1.16	75.5	-
<b>DNA58-59</b>	535	1.38	-	-

### Chromophorenstapel

**DNA29:** 3'-CAG-TCA-**TO**TA-TAT-GTA-CG-5'

**DNA30:** 5'-GTC-AGT-T**TO**T-ATA-CAT-GC-3'

**DNA31:** 3'-CAG-TCA-**TOTTO**-TAT-GTA-CG-5'

**DNA30:** 5'-GTC-AGT--T**TO**T--ATA-CAT-GC-3'

**DNA31:** 3'-CAG-TCA-**TOTTO**T--AT-GTA-CG-5'

**DNA32:** 5'-GTC-AGT--T**TOTTO**-TA-CAT-GC-3'

**DNA33:** 3'-CAG-TCA-**TO**T AT**TO**T-GTA-CG-5'

**DNA32:** 5'-GTC-AGT--T**TO**T**TO**TA-CAT-GC-3'

Tabelle 9-23: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA29 bis DNA33.

DNA	$\epsilon_{260\text{nm}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA29</b>	169 600	5406.46	1801.6 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1350.9 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA30</b>	163 700	5397.44	1798.4 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1348.6 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA31</b>	165 100	5621.97	1872.7 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 204.2 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA32</b>	159 200	5612.93	1869.6 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 202.1 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>DNA33</b>	165 100	5621.97	1872.9 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 204.3 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>

Tabelle 9-24: Charakteristische Daten der Duplexe zur Untersuchung eines Chromophorenstapels aus Thiazol Orange.

DNA	FI <sub>max</sub> /nm	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>DNA29-30</b>	590	0.19	58.5	58.0
<b>DNA31-30</b>	563	0.70	56.1 / 72.1	53.5
<b>DNA31-32</b>	563	0.83	50.6 / 70.1	48.0
<b>DNA33-32</b>	585	0.43	59.0	54.0

## 9.4 RNA Synthesen

### 9.4.1. Kopplungsprotokolle

Die Synthese erfolgte an einem *PerSeptive Biosystems Expedite 8909* von *ABI* genauso wie unter 8.3.1 beschrieben. Das Profil wurde am Gerät von DNA auf RNA geändert. Verwendung folgender Chemikalien, alle von *Proligo*:

Basen: *Fast Deprotection* DMT-2'-O-TBDMS-rC(tac), -rG(tac), -rA(tac), -rU Amidite

CPG: *Fast Deprotection* CPG rC(tac), rG(tac), rU

Act: 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol

Caps: *Fast Deprotection* CapA (Tac<sub>2</sub>O) in THF / Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF / Pyridin (CapB)

Das Standardprotokoll für die Kopplung einer RNA Base weist Unterschiede auf im Vergleich zu dem eines DNA Zykluses:

Tabelle 9-25: Standardprotokoll zum Einbau eines Adenosins in RNA.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
\$ Deblocking				
24	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
21	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dblk	PULSE	10	0
16	Dblk	PULSE	50	<b>60</b> (49 bei DNA)
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
21	trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
21	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	<b>6</b> (5 im DNA Zyklus)	0
18	A + Act	PULSE	<b>9</b> (2 im DNA Zyklus)	402
1	Wsh	PULSE	<b>8</b> (zuvor zusätzl. Act bei DNA)	357
1	Wsh	PULSE	7	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	<b>7</b> (8 im DNA Zyklus)	0
13	Caps	PULSE	<b>6</b> (fehlt im DNA Zyklus)	15
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	2	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	<b>20</b> (15 im DNA Zyklus)	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Zunächst dauert der Deblocking-Schritt einer RNA-Base länger als der einer DNA-Base. Es werden pro Kopplungszyklus 15 Pulse des Amidits statt 7 Pulse wie im

DNA-Protokoll gepumpt. Zudem dauert ein Kopplungsschritt für eine RNA Base 759 s, wohingegen die Kopplung einer DNA-Base nur 96 s dauert. Die Menge an Caps und Oxidizer ist größer als in einem DNA-Kopplungszyklus und das Capping dauert 15 s länger.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an TO-modifizierter RNA zu erreichen, wurde dementsprechend das Kopplungsprotokoll des Thiazol Orange Bausteins modifiziert:

Tabelle 9-26: Modifiziertes Protokoll zum Einbau eines Thiazol-Orange-Phosphoramidits **8** in RNA.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	6	0
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>6</b>	<b>0</b>
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>2</b>	<b>1000</b>
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>2</b>	<b>1000</b>
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>5</b>	<b>50</b>
2	Act	PULSE	1	1000
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	15	0
2	Act	PULSE	6	0
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>6</b>	<b>0</b>
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>2</b>	<b>1000</b>
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>2</b>	<b>1000</b>
26	<b>9 + Act</b>	PULSE	<b>5</b>	<b>50</b>
2	Act	PULSE	1	1000
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	15	0

Das Thiazol-Orange-Phosphoramidit wurde hier auf Position 9 geschraubt, die Gesamtkopplungszeit beträgt 7100 s, zusätzlich wurde der Deblocking-Schritt auf 60 s verlängert und der Capping-, Oxidizing und Washing-Schritt verlängert bzw. die Anzahl der Pulse erhöht, so dass sie dem Standardprotokoll entsprechen.

### 9.4.2. Reinigung und Aufarbeitung

Nach erfolgter RNA Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet und bei Bedarf bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde das Granulat in RNase freie Eppendorf-*Cups* überführt und 1 mL einer Lösung aus 1:1 (v/v) Ammoniak (konz.) / Methylamin zugegeben. Man ließ 20 min bei 65 °C stehen, um anschließend auf Raumtemperatur abkühlen zu lassen. Der Überstand wurde abzentrifugiert und die CPGs zweimal mit einer Lösung aus Ethanol / Wasser (1:1 v/v) gewaschen. Die Lösungen wurden vereinigt und lyophilisiert. Die RNA wurde in 300 µL Ethanol gelöst und wieder lyophilisiert. Anschließend wurden 300 µL DMSO und 300 µL Triethylamintrihydrofluorid zugegeben und 2.5 Stunden bei 65 °C stehen gelassen. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen und gab anschließend 1 mL Trimethyl(propoxy)silan hinzu. Nach ca. 10 min fiel die RNA aus, der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag zweimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Die RNA wurde lyophilisiert und anschließend in 700 µL Wasser gelöst, um sie mittels HPLC zu reinigen.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zur DNA-Aufarbeitung wie in Kapitel 9.3.2 beschrieben.

### 9.4.3. Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide

#### DNA – RNA - Vergleich

**RNA1:** 3'-CAG-UCA-GUU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA2:** 5'-GUC-AGU-CAA-CUG-CAU-GC-3'

**RNA3:** 3'-CAG-UCA-**TO**UU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA2:** 5'-GUC-AGU--C-AA-CUG-CAU-GC-3'

**RNA3:** 3'-CAG-UCA-**TO**UU-GAC-GUA-CG-5'

**RNA4:** 5'-GUC-AGU-**UTO**A-CUG-CAU-GC-3'

Tabelle 9-27: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide RNA1 bis RNA4.

RNA	$\epsilon_{260\text{nm}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>RNA1</b>	175 500	5426.29	1807.5 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1355.4 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>RNA2</b>	171 500	5386.26	1794.2 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1345.3 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>RNA3</b>	164 900	5609.62	1868.2 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 200.7 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>RNA4</b>	159 000	5586.58	1862.7 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1396.9 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>

Tabelle 9-28: Charakteristische Daten der RNA Duplexe zur Untersuchung des TO-Monomers und Dimers in RNA.

RNA	FI <sub>max</sub> /nm	$\Phi$	R <sub>FI</sub> (FI <sub>533nm</sub> /FI <sub>585nm</sub> )	T <sub>m</sub> /°C [260 nm]	T <sub>m</sub> /°C [508 nm]
<b>RNA3-2</b>	531	0.22	2.22	68.2	-
<b>RNA3-4</b>	573	0.18	0.59	67.0	67.0

### EGFP – *Silencing* - Sequenzen

**RNA5:** 3'-UAC-UU**TO**-AAG-UCC-CAG-UCG-AAC-G-5'

**RNA6:** 5'-G-AA-C--UUC-AGG-GUC-AGC-UUG-CCG-3'

**RNA7:** 3'-UAC-UUG-AAG-UC**TO**-CAG-UCG-AAC-G-5'

**RNA6:** 5'-G-AAC-UUC-AG-G--GUC-AGC-UUG-CCG-3'

**RNA7:** 3'-UAC-UUG-AAG-UC**TO**-CAG-UCG-AAC-G-5'

**RNA8:** 5'-G-AAC-UUC-A**TO**G-GUC-AGC-UUG-CCG-3'

Tabelle 9-29: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide RNA5 bis RNA8.

RNA	$\epsilon_{260\text{nm}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>RNA5</b>	213 700	7184.60	2395.3 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1796.8 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>RNA6</b>	217 600	7033.22	2343.4 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup> ; 1757.1 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup>
<b>RNA7</b>	217 700	7224.62	2408.3 [M+3H <sup>+</sup> ] <sup>3+</sup> ; 1806.5 [M+4H <sup>+</sup> ] <sup>4+</sup>
<b>RNA8</b>	207 000	7216.60	2406.2 [M+3H <sup>+</sup> ] <sup>3+</sup> ; 1804.4 [M+4H <sup>+</sup> ] <sup>4+</sup>

Tabelle 9-30: Charakteristische Daten der *Gene-Silencing*-Duplexe.

<b>RNA</b>	<b>FI<sub>max</sub>/nm</b>	<b>R<sub>FI</sub> (FI<sub>533nm</sub>/FI<sub>585nm</sub>)</b>	<b>T<sub>m</sub>/°C [260 nm]</b>
<b>RNA5-6</b>	529	2.19	82.1
<b>RNA7-6</b>	526	2.81	78.0
<b>RNA7-8</b>	546	1.26	78.5

## ***Klick-DNA Synthesen***

Die Synthese acetylenmodifizierter DNA erfolgte wie unter 8.3 ausführlich beschrieben.

### 9.4.4. Klick-Ligation

Das Azid des Nilblau wurde gemäß Publikation synthetisiert.<sup>[290, 347]</sup> Es wurden das Azid (12 µL, 10 mM), Cu(I) (17 µL, 100 mM), TBTA (34 µL, 100 mM), alle gelöst in DMSO/<sup>t</sup>BuOH = 3:1, und Natriumascorbat (25 µL, 400 mM), in Wasser, zum Oligonukleotid gegeben (1 µmol). Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur mithilfe eines Rotationsverdampfers rotiert und am nächsten Tag bis zur Trockene an einer *SpeedVac* eingedampft. Es wurde Natriumacetatlösung (100 µL, 0.15 mmol) zugegeben und die Lösung 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde Ethanol zugegeben (1 mL), gevortext und bei -20 °C über Nacht aufbewahrt. Die Suspension wurde am nächsten Tag zentrifugiert (13 000 rpm, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit Ethanol (500 µL) gewaschen und dann in Wasser (500 µL) gelöst. Vor der Reinigung mittels HPLC wurde die DNA mit Hilfe einer NAP-5 Säule der Firma *GE Healthcare* entsalzt.

### 9.4.5. Charakterisierung der synthetisierten Klick-DNA-Sequenzen

Oligonukleotide, die den (S)-Klick-Linker (X) enthalten

**DNA61:** 3'-AGT-CAC-T**TX**-TTC-TGA-CG-5'

**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AA**C**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AA**G**-AAG-ACT-GC-3'



**DNA66:** 3'-AGT-CAC-T**GX**-GTC-TGA-CG-5'  
**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Oligonukleotide, die den (*R*)-Klick-Linker (X) enthalten:

**DNA71:** 3'-AGT-CAC-T**TX**-TTC-TGA-CG-5'  
**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AAC**C**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AA**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA72:** 3'-AGT-CAC-T**GX**-GTC-TGA-CG-5'  
**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Oligonukleotide, die das Klick-Uridin (X) enthalten:

**DNA73:** 3'-AGT-CAC-T**TX**-TTC-TGA-CG-5'  
**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AAC**C**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AA**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA74:** 3'-AGT-CAC-T**GX**-GTC-TGA-CG-5'  
**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Als Referenz wurden folgende Sequenzen verwendet, sie enthalten statt des Nilblau-Chromophors ein Adenin:

**DNA75:** 3'-AGT-CAC-T**TA**-TTC-TGA-CG-5'  
**DNA62:** 5'-TCA-GTG-AA**A**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA63:** 5'-TCA-GTG-AAT**T**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA64:** 5'-TCA-GTG-AAC**C**-AAG-ACT-GC-3'  
**DNA65:** 5'-TCA-GTG-AA**G**-AAG-ACT-GC-3'

**DNA76:** 3'-AGT-CAC-T**GA**-**G**TC-TGA-CG-5'  
**DNA67:** 5'-TCA-GTG-AC**A**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA68:** 5'-TCA-GTG-ACT**T**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA69:** 5'-TCA-GTG-ACC**C**-CAG-ACT-GC-3'  
**DNA70:** 5'-TCA-GTG-AC**G**-CAG-ACT-GC-3'

Tabelle 9-31: Extinktionskoeffizienten und ESI-Massen der Oligonukleotide DNA61 bis DNA74.

DNA	$\epsilon_{260\text{nm}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Masse in g/mol berechnet	Masse in g/mol gefunden
<b>DNA61</b>	159 090	5453	1819.5 $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$ ; 1364.8 $[\text{M}-4\text{H}^+]^{4-}$
<b>DNA66</b>	164 290	5503	1833.9 $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$
<b>DNA71</b>	159 090	5455	1362.9 $[\text{M}-4\text{H}^+]^{4-}$ ; 1817.7 $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$
<b>DNA72</b>	164 290	5503	1375.1 $[\text{M}-4\text{H}^+]^{4-}$ ; 1833.8 $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$
<b>DNA73</b>	181 650	5562	1853.8 $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$ ; 1390.0 $[\text{M}-4\text{H}^+]^{4-}$
<b>DNA74</b>	186 850	5612	1869.9 $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$ ; 202.3 $[\text{M}-4\text{H}^+]^{4-}$

Tabelle 9-32: Quantenausbeuten und Schmelztemperatur der Einzelstränge und entsprechender Duplexe zum Vergleich des (*S*)-Klick-Linkers mit dem Klick-Uridin.

DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$
	$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C
<b>DNA61</b>	0.16	<b>DNA73</b>	0.18	<b>DNA75</b>	-
<b>DNA61-62</b>	0.15	<b>DNA73-62</b>	0.12	<b>DNA75-62</b>	-
	56.6		64.5		62.5
<b>DNA61-63</b>	0.19	<b>DNA73-63</b>	0.15	<b>DNA75-63</b>	-
	60.4		58.5		53.2
<b>DNA61-64</b>	0.22	<b>DNA73-64</b>	0.16	<b>DNA75-64</b>	-
	58.5		58.5		52.8

Tabelle 9-33: Quantenausbeuten und Schmelztemperatur der Einzelstränge und entsprechender Duplexe zum Vergleich des (*S*)-Klick-Linkers mit dem Klick-Uridin.

DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$	DNA	$\Phi$
	$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C		$T_m$ (260 nm)/°C
<b>DNA66</b>	0.05	<b>DNA74</b>	0.04	<b>DNA76</b>	-
<b>DNA66-67</b>	0.02	<b>DNA74-67</b>	0.03	<b>DNA76-67</b>	-
	65.5		68.0		68.0
<b>DNA66-68</b>	0.02	<b>DNA75-68</b>	0.03	<b>DNA76-68</b>	-
	66.5		63.5		60.3
<b>DNA66-69</b>	0.01	<b>DNA76-69</b>	0.01	<b>DNA76-69</b>	-
	67.5		64.0		58.3
<b>DNA66-70</b>	0.01	<b>DNA85-70</b>	0.02	<b>DNA76-70</b>	-
	67.7		66.5		63.8

Tabelle 9-34: Quantenausbeuten und Schmelztemperatur der Einzelstränge und zugehöriger Duplexe zum Vergleich des (*S*)-Klick-Linkers mit dem (*R*)-Klick-Linkers.

<b>DNA</b>	<b>T<sub>m</sub> / °C</b>	<b>Φ</b>	<b>DNA</b>	<b>T<sub>m</sub> / °C</b>	<b>Φ</b>	<b>ΔT<sub>m</sub> / °C</b>	<b>ΔΦ</b>
<b>DNA71</b>	-	0.15	<b>DNA61</b>	-	0.16	-	-0.01
<b>DNA71-62</b>	59.1 (-3.4) <sup>a</sup>	0.17	<b>DNA61-62</b>	56.6 (-5.9) <sup>a</sup>	0.15	2.5	0.02
<b>DNA71-63</b>	58.5	0.22	<b>DNA61-63</b>	60.4	0.19	-1.9	0.03
<b>DNA71-64</b>	60.7	0.21	<b>DNA61-64</b>	58.5	0.22	2.2	-0.01
<b>DNA71-7</b>	59.1	0.05	<b>DNA61-7</b>	59.8	0.06	-0.7	-0.01
<b>DNA72</b>	-	0.04	<b>DNA66</b>	-	0.05	-	-0.01
<b>DNA72-67</b>	66.7 (-1.3) <sup>a</sup>	0.02	<b>DNA66-67</b>	65.5 (-2.5) <sup>a</sup>	0.02	1.2	<0.01
<b>DNA72-68</b>	64.2	0.02	<b>DNA66-68</b>	66.5	0.02	-2.3	<0.01
<b>DNA72-69</b>	67.0	0.02	<b>DNA66-69</b>	67.5	0.01	-0.5	<0.01
<b>DNA72-70</b>	66.8	0.01	<b>DNA66-70</b>	67.7	0.01	-0.9	<0.01

---

## 10. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
8-oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
Å	Angström
A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
abs.	absolut
Ak	Akzeptor
a. u.	<i>arbitrary units</i>
br.s.	breites Singulett
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CI	chemische Ionisation
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CT	Ladungstransfer ( <i>charge transfer</i> )
CV	Cyclovoltammetrie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett, Tag
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCM	Dichlormethan
DETEQ	<i>Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching</i>
d. h.	das heißt
DIPEA	Di <i>is</i> opropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Deoxyribonucleinsäure
Do	Donor

ds	Doppelstrang
dU	2'-Desoxyuridin
E <sub>00</sub>	Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs
EI	elektrische Ionisation
em	Emission
E <sub>ox</sub>	Oxidationspotential
E <sub>ox</sub> <sup>*</sup>	Oxidationspotential des angeregten Zustands
eq.	Äquivalent
E <sub>red</sub>	Reduktionspotential
E <sub>red</sub> <sup>*</sup>	Reduktionspotential des angeregten Zustands
ESI	Elektrosprayionisation
ET	Elektronentransfer
Et	Ethidium
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
exc	Anregung ( <i>excitation</i> )
Φ	Quantenausbeute
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FC	<i>Flash</i> -Säulenchromatographie
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin
GNA	<i>glycol nucleic acid</i>
h	Stunde
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum
IC	<i>Internal conversion</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
λ	Wellenlänge
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	molar, mol/L
m	Multipllett

---

MB	Molecular Beacon
mbar	Millibar
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mdeg	<i>millidegree</i>
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Flugzeit-Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min.	Minute
mM	millimolar
μM	mikromolar
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ppm	<i>parts per million</i>
ps	Pikosekunde
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett, Sekunde
SNP	Einzelbasen-Punktmutation ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
sog.	sogenannt
ss	Einzelstrang
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
t	Triplett
TO	Thiazol Orange
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UV/Vis	Ultraviolette und sichtbares Spektrum (190 – 800 nm)

V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v.l.n.r.	von links nach rechts
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil



---

## 11. Literaturverzeichnis

- [1] I. M. Verma, *Sci. Am.* **1990**, 263, 68-84.
- [2] *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Übersichtsdatenbank über die bisher durchgeführten und laufenden Gentherapiestudien*, <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>.
- [3] M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 1456-1465.
- [4] G. M. Blackburn, M. J. Gait, Editors, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. 2. Ausg.; 1996; p 528.
- [5] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158.
- [6] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737 - 738.
- [7] F. Sanger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 5463-5467.
- [8] R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3045-3046.
- [9] R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [10] M. Caruthers, *Methods Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [11] R. Higuchi, *Nature* **1988**, 332, 543-546.
- [12] F. S. Collins, M. Morgan, A. Patrinos, *Science* **2003**, 300, 286-290.
- [13] P.-Y. Kwok, X. Chen, *Curr. Iss. Mol. Biol.* **2003**, 5, 43-60.
- [14] J. Yokota, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 497-503.
- [15] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 770-772.
- [16] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1623-1633.
- [17] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7842-7849.
- [18] T. Caspersson, J. Schultz, *Nature* **1939**, 143, 602-603.
- [19] P. Cramer, D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, R. D. Kornberg, *Science* **2000**, 288, 640-649.
- [20] C. Guerrier-Takada, N. Lumelsky, S. Altman, *Science* **1989**, 246, 1578-1584.
- [21] W. H. McClain, C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Science* **1987**, 238, 527-530.
- [22] T. R. Cech, *Biochem. Int.* **1989**, 18, 7-14.
- [23] T. R. Cech, *Science* **1987**, 236, 1532-1539.
- [24] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, 391, 806-811.
- [25] G. Meister, M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, T. Tuschl, *Mol. Cell* **2004**, 15, 185-197.
- [26] D. H. Kim, J. J. Rossi, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8, 173-184.
- [27] M. Hallek, *Internist* **2001**, 42, 1306-1313.
- [28] J. Yokota, *Carcinogenesis* **2002**, 21, 197-503.
- [29] M. Strerath, J. Gaster, D. Summerer, A. Marx, *ChemBioChem* **2004**, 5, 333-339.
- [30] D. G. Wang, J.-B. Fan, C.-J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E. S. Lander, *Science* **1998**, 280, 1077-1082.

- [31] A. J. Schafer, J. R. Hawkins, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 33-39.
- [32] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, *234*, 177-186.
- [33] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 505-508.
- [34] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nature Rev. Cancer* **2001**, *1*, 68-76.
- [35] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, *408*, 307-310.
- [36] K. J. Livak, *PCR Methods Appl.* **1995**, *4*, 357-362.
- [37] R. W. Kwiatkowski, V. Lyamichev, M. De Arruda, B. Neri, *Mol. Diagn.* **1999**, *4*, 353-364.
- [38] A.-C. Syvänen, *Human Mut.* **1999**, *13*, 1-10.
- [39] R. K. Saiki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6230-6234.
- [40] W. J. Kim, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 815.
- [41] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4820-4827.
- [42] A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 958-963.
- [43] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Chem. Commun.* **2004**, *15*, 1704-1705.
- [44] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7827-7831.
- [45] A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatami, I. Saito, *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 122-127.
- [46] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2203-2206.
- [47] O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938-2939.
- [48] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2004**, 2674-2675.
- [49] D. V. Jarikote, O. Koehler, E. Socher, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187-3195.
- [50] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.
- [51] V. Karunakaran, J. L. P. Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954-2962.
- [52] H.-A. Wagenknecht, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 122-130.
- [53] S. Hanash, *Nature* **2003**, *422*, 226-232.
- [54] F. Macgregor Pascale, A. Squire Jeremy, *Clin Chem* **2002**, *48*, 1170-1177.
- [55] O. Noya, M. E. Patarroyo, F. Guzman, B. A. De Noya, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, *4*, 299-308.
- [56] B. Solomon, *Immunization Against Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders* **2003**, 11-19.
- [57] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [58] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 856-870.
- [59] L. G. Kostrikis, S. Tyagi, M. M. Mhlana, D. D. Ho, F. R. Kramer, *Science* **1998**, *279*, 1228-1229.
- [60] S. S.-M. Sum, D. K.-H. Wong, M.-F. Yuen, H.-J. Yuan, J. Yu, C.-L. Lai, D. Ho, L. Zhang, *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 3438-3440.
- [61] D. P. Bratu, B.-j. Cha, M. M. Mhlana, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13308-13313.
- [62] J. Perlette, J. Li, X. Fang, S. Schuster, J. Lou, W. Tan, *Rev. Anal. Chem.* **2002**, *21*, 1-14.
- [63] A. Tsourkas, G. Bao, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **2003**, *1*, 372-384.

- 
- [64] K. Wang, J. Li, X. Fang, S. Schuster, M. Vicens, S. Kelley, H. Lou, J. J. Li, T. Beck, R. Hogrefe, W. Tan, *Biomed. Photonics Handb.* **2003**, *23*, 1-57.
- [65] T. Foerster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.
- [66] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 187-191.
- [67] T. Foerster, *Annalen der Physik* **1948**, *6*, 55.
- [68] D. M. J. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 507-517.
- [69] K. Boerjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.
- [70] G. Gavory, M. F. Symmons, Y. K. Ghosh, D. Klenerman, S. Balasubramanian, *Biochemistry* **2006**, *45*, 13304-13311.
- [71] G. Vamosi, R. M. Clegg, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13136-13148.
- [72] P. Miranda, D. G. Manso, F. Barros, L. Carretero, T. E. Hughes, C. Alonso-Ron, P. Dominguez, P. de la Pena, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2008**, *1783*, 1681-1699.
- [73] T. D. Christian, L. J. Romano, *Biochemistry* **2009**, *48*, 5382-5388.
- [74] A. Hassibi, H. Vikalo, J. L. Riechmann, B. Hassibi, *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, e132/131-e132/112.
- [75] J. Zhu, C. Deng, G. Huang, S. Xu, K. Mitchelson, J. Cheng, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1426-1432.
- [76] J. R. Epstein, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 3-36.
- [77] Y. Saito, Y. Shinohara, S. S. Bag, Y. Takeuchi, K. Matsumoto, I. Saito, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 934-939.
- [78] H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 7044-7047.
- [79] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2 Ausg.; New York, 1999.
- [80] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
- [81] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-846.
- [82] R. F. Khairutdinov, N. Serpone, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2602-2610.
- [83] M. K. Johansson, H. Fidder, D. Dick, R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6950-6956.
- [84] M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466-3471.
- [85] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30*, 4208-4215.
- [86] T. Heyduk, E. Heyduk, *Nature Biotechnol.* **2002**, *20*, 171-176.
- [87] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547-553.
- [88] R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, *44*, 5487-5502.
- [89] V. Jarikote Dilip, N. Krebs, S. Tannert, B. Roder, O. Seitz, *Chemistry* **2007**, *13*, 300-310.
- [90] E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Roeglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 318-330.
- [91] N. Venkatesan, J. Seo Young, H. Kim Byeang, *Chem Soc Rev* **2008**, *37*, 648-663.
- [92] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.
- [93] A. A. Marti, S. Jockusch, N. Stevens, J. Ju, N. J. Turro, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 402-409.
- [94] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 402-405.
- [95] X. Li, Z. Li, A. A. Marti, S. Jockusch, N. Stevens, D. L. Akins, N. J. Turro, J. Ju, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 896-902.

- [96] T. Foerster, *Exciplex, Proc. Meet.* **1975**, 1-21.
- [97] H. Braun, T. Förster, *Z. Phys. Chem.* **1972**, *78*, 40-49.
- [98] H. Braun, T. Förster, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 1091-1095.
- [99] T. Foerster, H. P. Seidel, *Z. Phys. Chem.* **1965**, *45*, 58-71.
- [100] A. Gilbert, J. Baggot, *Essentials of Molecular Photochemistry*. 1991; p 538 pp.
- [101] T. Foerster, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1969**, *8*, 333-343.
- [102] R. Katoh, S. Sinha, S. Murata, M. Tachiya, *J. Photochem. Photobiol., A* **2001**, *145*, 23-34.
- [103] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules (Wiley Monographs in Chemical Physics)*. 1970; p 704 pp.
- [104] A. Penzkofer, Y. Lu, *Chem. Phys.* **1986**, *103*, 399-405.
- [105] A. Penzkofer, W. Leupacher, *J. Lumin.* **1987**, *37*, 61-72.
- [106] M. Kawahigashi, S. Hirayama, *J. Lumin.* **1989**, *43*, 207-212.
- [107] W. H. Melhuish, *J. Phys. Chem. A* **1961**, *65*, 229-235.
- [108] N. K. Petrov, A. V. Starostin, G. K. Chudinova, M. V. Alfimov, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1990**, 1918-1920.
- [109] R. J. Hartley, L. R. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3436-3442.
- [110] J. Hinatu, H. Masuhara, N. Mataga, Y. Sakata, S. Misumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 1032-1036.
- [111] G. N. Taylor, E. A. Chandross, A. H. Schiebel, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2693-2697.
- [112] H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2006**, 2768-2770.
- [113] I. Trkulja, R. Häner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7982-7989.
- [114] V. L. Malinovskii, F. Samain, R. Häner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4464-4467.
- [115] K. V. Balakin, V. A. Korshun, I. I. Mikhalev, G. V. Maleev, A. D. Malakhov, I. A. Prokhorenko, Y. A. Berlin, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 771-778.
- [116] K. Yamana, T. Iwai, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, H. Nakano, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1266-1273.
- [117] M. Nakamura, Y. Ohtoshi, K. Yamana, *Chem. Commun.* **2005**, 5163-5165.
- [118] K. Seio, M. Mizuta, K. Tasaki, K. Tamaki, A. Ohkubo, M. Sekine, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8287-8293.
- [119] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2612-2614.
- [120] K. Fujimoto, H. Shimizu, M. Inouye, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3271-3275.
- [121] Y. Chen, C. J. Yang, Y. Wu, P. Conlon, Y. Kim, H. Lin, W. Tan, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 355-359.
- [122] P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336-342.
- [123] H. Kashida, M. Komiyama, H. Asanuma, *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 934-935.
- [124] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [125] T. A. Zeidan, R. Carmieli, R. F. Kelley, T. M. Wilson, F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13945-13955.
- [126] R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, DOI: 10.1002/anie.200905829.
- [127] S. Dähne, *Z. Chem.* **1965**, *5*, 441.
- [128] H. H. Johannes, *Cyanine: direkte Funktionalisierung, Oligomerisierung, linearer und nichtlinearer Eigenschaften*. Dissertation: TU Braunschweig, 2000.

- 
- [129] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, *46*, 39-51.
- [130] M. Massey, W. R. Algar, U. J. Krull, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 181-189.
- [131] G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5710-5718.
- [132] H. S. Rye, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *11*, 2803-2812.
- [133] J. R. Carreon, J. Kerry P. Mahon, S. O. Kelley, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 517-519.
- [134] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndt, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4263-4266.
- [135] C. Chen, B. Zhou, G. Xu, *J. Photoch. Photobio. A* **1995**, *89*, 25-29.
- [136] J. R. Carreon, K. P. Mahon, Jr., S. O. Kelley, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 517-519.
- [137] J. Kerry P. Mahon, M. D. Roy, J. R. Carreon, E. G. Prestwich, J. L. Rouge, S. Shin, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 766-773.
- [138] L. M. Wittenhagen, J. R. Carreon, E. G. Prestwich, S. O. Kelley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2542-2546.
- [139] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861-9870.
- [140] B. A. Jackson, V. Y. Alekseyev, J. K. Barton, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4655-4662.
- [141] M. E. Nunez, K. T. Noyes, D. A. Gianolio, L. W. McLaughlin, J. K. Barton, *Biochemistry* **2000**, *39*, 6190-6199.
- [142] M. Magzoub, A. Gräslund, *Q. Rev. Biophys.* **2004**, *37*, 147 - 195.
- [143] J. Brunner, J. K. Barton, *Biochemistry* **2006**, *45*, 12295-12302.
- [144] N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.
- [145] N. Svanvik, J. Nygren, G. Westman, M. Kubista, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 803-809.
- [146] R. Lartia, U. Asseline, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2270-2281.
- [147] U. Asseline, M. Chassignol, Y. Aubert, V. Roig, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1949-1957.
- [148] W. R. Algar, M. Massey, U. J. Krull, *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 555-567.
- [149] X. Wang, U. J. Krull, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1725-1729.
- [150] S. Ikeda, A. Okamoto, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 958-968.
- [151] X. Wang, U. J. Krull, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *470*, 57-70.
- [152] E. Privat, T. Melvin, F. Merola, G. Schweizer, S. Prodhomme, U. Asseline, P. Vigny, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 201-210.
- [153] E. Privat, U. Asseline, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 757-769.
- [154] E. Privat, T. Melvin, U. Asseline, P. Vigny, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 532-541.
- [155] S. M. Yarmoluk, *Spectrochimica Acta Part A* **2001**, *57*, 1525 - 1532.
- [156] S. M. Yarmoluk, *Biopolymers (Biospectroscopy)* **2001**, *62*, 219 - 227.
- [157] E. Socher, L. Bethge, A. Knoll, N. Jungnick, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9555-9559.
- [158] S. Ikeda, T. Kubota, K. Kino, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1719-1725.
- [159] S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, A. Okamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6480-6484.
- [160] S. Ikeda, M. Yuki, H. Yanagisawa, A. Okamoto, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7191-7195.
- [161] T. Kubota, S. Ikeda, A. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, 110-117.

- [162] T. Kubota, S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1256-1261.
- [163] S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, H. Yanagisawa, S. Tsuruma, A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 546-551.
- [164] N. Purdie, H. G. Brittain, Editors, *Analytical Applications of Circular Dichroism*. 1994; Vol. 14, p 348 pp.
- [165] A. S. Davydov, *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* **1948**, *18*, 210-218.
- [166] A. S. Davydov, *Theory of Molecular Excitons. Translated from the Russian by Michael Kasha and Max Oppenheimer*. 1962; p 174.
- [167] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2217-2223.
- [168] A. Eisfeld, J. S. Briggs, *Chem. Phys.* **2006**, *324*, 376-384.
- [169] A. H. Herz, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1977**, *8*, 237-298.
- [170] F. Dietz, *J. Signalaufzeichnungsmaterialien* **1973**, *1*, 157-180; (154), 237-152; (155), 381-152 *ibid*.
- [171] M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- [172] V. Czikkely, H. D. Försterling, H. Kuhn, *Chem. Phys. Lett.* **1970**, *6*, 207-210.
- [173] H. Kuhn, C. Kuhn, *Chromophore coupling effects*. World Scientific Ausg.; Singapor, 1996; p 1-40.
- [174] G. Scheibe, *Z. Elektrochem. Angew. Phys. Chem.* **1948**, *52*, 283-292.
- [175] D. Moebius, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **1995**, *7*, 437-444.
- [176] T. Kobayashi, Editor, *J-Aggregates*. World Scientific Ausg.; Singapor, 1996; p 228 pp.
- [177] A. Nagai, K. Kokado, J. Miyake, Y. Cyujo, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 627-634.
- [178] H. K. Cho, S. Lone, D. D. Kim, J. H. Choi, S. W. Choi, J. H. Cho, J. H. Kim, I. W. Cheong, *Polymer* **2009**, *50*, 2357-2364.
- [179] B. Jancy, S. K. Asha, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 169-181.
- [180] H. Langhals, J. Gold, O. Krotz H-aggregates of perylene dyes with high fluorescence quantum yields and strong CD-effects. 2005-102005037406 102005037406, 20050808., 2007.
- [181] F. C. Spano, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *331*, 7-13.
- [182] A. K. Mandal, M. K. Pal, *Chem. Phys.* **2000**, *253*, 115-124.
- [183] E. Rabinowitch, L. F. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 69-78.
- [184] T. Foerster, E. Koenig, *Z. Elektrochem.* **1957**, *61*, 344-348.
- [185] K. Bergmann, C. T. O'Konski, *Z. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 2169-2177.
- [186] W. West, S. Pearce, *J. Phys. Chem. B* **1965**, *69*, 1894-1903.
- [187] N. Cooper, N. B. Liebert, *Photogr. Sci. Eng.* **1972**, *16*, 25.
- [188] R. W. Chambers, T. Kajiwara, D. R. Kearns, *J. Phys. Chem. B* **1974**, *78*, 380-387.
- [189] K. Teuchner, B. Bornowski, W. Becker, S. Dähne, *Z. Chem.* **1976**, *16*, 449-450.
- [190] S. K. Rentsch, D. Fassler, P. Hampe, R. Danielius, R. Gadonas, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *89*, 249-253.
- [191] V. Sundstroem, T. Gillbro, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 2733-2743.
- [192] M. Van der Auweraer, G. Biesmans, F. C. De Schryver, *Chem. Phys.* **1988**, *119*, 355-375.

- 
- [193] M. Van der Auweraer, B. Verschuere, F. C. De Schryver, *Langmuir* **1988**, *4*, 583-588.
- [194] L. Lu, R. J. Lachicotte, T. L. Penner, J. Perlstein, D. G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8146-8156.
- [195] S. Zeena, K. G. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7859-7865.
- [196] U. Roesch, S. Yao, R. Wortmann, F. Wuerthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7026-7030.
- [197] R. Wortmann, U. Rosch, M. Redi-Abshiro, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2080-2083.
- [198] N. Harada, K. Nakanishi, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257-263.
- [199] N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroic Spectroscopy. Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*. 1983; p 460.
- [200] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8206-8215.
- [201] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12729-12731.
- [202] Y. Zheng, H. Long, G. C. Schatz, *Chem. Commun.* **2005**, 4795-4797.
- [203] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [204] D. Lachmann, S. Berndl, O. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *accepted*.
- [205] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.
- [206] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1845-1847.
- [207] J. Barbaric, C. Wanninger-Weiss, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 364-370.
- [208] C. Wanninger, H. A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, *13*, 2051-2054.
- [209] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 48-50.
- [210] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4977-4986.
- [211] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 10.1002/ejoc.200901423.
- [212] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418 - 2421.
- [213] D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2006**, *13*, 300-310.
- [214] W. J. Harrison, D. L. Mateer, G. J. T. Tiddy, *J. Phys. Chem. B* **1996**, *100*, 2310-2321.
- [215] A. Fuerstenberg, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8600-8609.
- [216] T. Sagawa, H. Tobata, H. Ihara, *Chem. Commun.* **2004**, 2090-2091.
- [217] L. D. Simon, K. H. Abramo, J. K. Sell, L. B. McGown, *Biospectroscopy* **1998**, *4*, 17-25.
- [218] A. Fuerstenberg, M. D. Julliard, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7661-7669.
- [219] L. G. Lee, C. H. Chen, L. A. Chiu, *Cytometry* **1986**, *7*, 508-517.
- [220] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. 3 Ausg.; Springer Verlag: New York, 1984.
- [221] Z. A. E. Waller, S. A. Sewitz, S.-T. D. Hsu, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12628-12633.

- [222] S. Mueller, G. D. Pantos, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2009**, 80-82.
- [223] S. Ladame, R. J. Harrison, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Org. Lett.* **2002**, 4, 2509-2512.
- [224] T. Foerster, *Proc. Int. Conf. Lumin.* **1968**, 1, 160-165.
- [225] P. L. Paris, J. M. Langenhan, E. T. Kool, *Nucl. Acids Res.* **1998**, 26, 3789-3793.
- [226] E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 3372-3375.
- [227] J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2088-2090.
- [228] E. Mayer-Enthart, C. Wagner, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron* **2007**, 63, 3434-3439.
- [229] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11590-11591.
- [230] J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12748-12749.
- [231] S. M. Langenegger, R. Haener, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 9273-9276.
- [232] C. Brotschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1911-1923.
- [233] K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2005**, 2509-2511.
- [234] I. Trkulja, S. M. Biner, S. M. Langenegger, R. Häner, *ChemBioChem* **2007**, 8, 25-27.
- [235] K. Yamana, Y. Ohshita, Y. Fukunaga, M. Nakamura, A. Maruyama, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 78-83.
- [236] A. Berzal-Herranz, A. Barroso Del Jesus, *Ars Pharm.* **1997**, 38, 177-190.
- [237] S. A. Gibson, E. J. Shillitoe, *Mol. Biotechnol.* **1997**, 7, 125-137.
- [238] M. Amarzguoui, H. Prydz, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 1175-1202.
- [239] H. A. James, I. Gibson, *Sci. Med.* **1998**, 5, 26-35.
- [240] J. J. Rossi, *Science* **1999**, 285, 1685.
- [241] Z. Huang, *Front. Biotechnol. Pharm.* **2000**, 1, 40-58.
- [242] H. Kawasaki, K. Taira, *Jikken Igaku* **2000**, 18, 381-386.
- [243] L. A. Phylactou, *Methods Mol. Biol.* **2001**, 175, 521-529.
- [244] H. Kawasaki, R. Wadhwa, K. Taira, *Differentiation* **2004**, 72, 58-64.
- [245] A. U. Khan, *Clin. Chim. Acta* **2006**, 367, 20-27.
- [246] M. Sioud, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, 173, 223-242.
- [247] Q.-X. Li, P. Tan, N. Ke, F. Wong-Staal, *Adv. Cancer Res.* **2007**, 96, 103-143.
- [248] D. M. J. Lilley, F. Eckstein, *Ribozymes RNA Catal.* **2008**, 1-10.
- [249] J. E. Weigand, B. Suess, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 85, 229-236.
- [250] A. Serganov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 251-259.
- [251] J. E. Weigand, B. Suess, *BIOSpektrum* **2009**, 15, 42-44.
- [252] T. M. Henkin, *Genes Dev.* **2008**, 22, 3383-3390.
- [253] S. A. Strobel, J. C. Cochrane, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 636-643.
- [254] J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Sci. Am.* **2006**, 296, 50-57.
- [255] S. D. Gilbert, R. T. Batey, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 805-807.
- [256] R. R. Breaker, *Riboswitches and the RNA world*. 3 Ausg.; 2006; Vol. 43, p 89-107.
- [257] R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Methods* **2003**, 29, 51-57.
- [258] H. J. Tanke, R. W. Dirks, T. Raap, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 49-54.
- [259] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, 280, 585-590.



- 
- [260] K.-Y. Lin, R. J. Jones, M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873-3874.
- [261] S. G. Srivatsan, H. Weizman, Y. Tor, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1334-1338.
- [262] R. Kawai, M. Kimoto, S. Ikeda, T. Mitsui, M. Endo, S. Yokoyama, I. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17286-17295.
- [263] Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492-6497.
- [264] T. Tuschl, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 239-245.
- [265] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [266] F. Amblard, H. Cho Jong, F. Schinazi Raymond, *Chem Rev* **2009**, *109*, 4207-4220.
- [267] M. E. Gramlich Philipp, T. Wirges Christian, A. Manetto, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [268] R. Huisgen, H. Stangl, H. J. Sturm, H. Wagenhofer, *Angew. Chem.* **1962**, *74*, 31-32.
- [269] W. Tornoe Christian, C. Christensen, M. Meldal, *J Org Chem* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [270] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053-1057.
- [271] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [272] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.
- [273] A. Sassolas, D. Leca-Bouvier Beatrice, J. Blum Loic, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 109-139.
- [274] N. Wilson James, T. Kool Eric, *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 4265-4274.
- [275] A. Waggoner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 62-66.
- [276] H. Weisbrod Samuel, A. Marx, *Chem Commun* **2008**, 5675-5685.
- [277] M. Sletten Ellen, R. Bertozzi Carolyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [278] F. Seela, S. A. Ingale, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 284-295.
- [279] O. Plietzsch, C. I. Schilling, M. Tolev, M. Nieger, C. Richert, T. Muller, S. Braese, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4734-4743.
- [280] A. H. El-Sagheer, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2009**, *28*, 315-323.
- [281] S. Berndt, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [282] V. R. Sirivolu, P. Chittepup, F. Seela, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2305-2316.
- [283] X. Ming, P. Leonard, D. Heindl, F. Seela, *Nucl. Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 471-472.
- [284] T. Ami, H. Matsumura, K. Fujimoto, *Nucl. Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 247-248.
- [285] P. Kocalka, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1280-1285.
- [286] C. T. Wirges, P. M. E. Gramlich, K. Gutsmedl, J. Gierlich, G. A. Burley, T. Carell, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1159-1164.
- [287] M. Fischler, A. Sologubenko, J. Mayer, G. Clever, G. Burley, J. Gierlich, T. Carell, U. Simon, *Chem. Commun.* **2008**, 169-171.
- [288] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2007**, *26*, 597-601.
- [289] T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609-612.
- [290] H. Mader, X. Li, S. Saleh, M. Link, P. Kele, O. Wolfbeis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 218 - 223.

- [291] J.-F. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018-1025.
- [292] S. Iida, N. Asakura, K. Tabata, I. Okura, T. Kamachi, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1853-1855.
- [293] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507.
- [294] T. Ten Brink Hefziba, T. Meijer Joris, V. Geel Remon, M. Damen, W. P. M. Lowik Dennis, C. M. van Hest Jan, *J Pept Sci* **2006**, *12*, 686-692.
- [295] A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598-10602.
- [296] E. Speers Anna, F. Cravatt Benjamin, *Chem Biol* **2004**, *11*, 535-546.
- [297] T. Liebert, C. Haensch, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 208-213.
- [298] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [299] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165.
- [300] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Comm.* **2010**, 10.1039/b924471a.
- [301] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.
- [302] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. Narducci Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7003-7008.
- [303] R. Chan Timothy, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. Fokin Valery, *Org Lett* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [304] F. Seela, H. Xiong, P. Leonard, S. Budow, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1374-1387.
- [305] P. Chittepu, V. R. Sirivolu, F. Seela, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8427-8439.
- [306] F. Seela, X. Ming, *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1181-1200.
- [307] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1674-1687.
- [308] F. Seela, V. R. Sirivolu, P. Chittepu, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 211-224.
- [309] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 535-552.
- [310] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [311] K. Gutsmedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405-2408.
- [312] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [313] J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486-9494.
- [314] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, J. Gierlich, T. Carell, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 249-251.
- [315] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1997-2002.
- [316] D. M. Hammond, A. Manetto, J. Gierlich, V. A. Azov, P. M. E. Gramlich, G. A. Burley, M. Maul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4184-4187.
- [317] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, D. M. Hammond, T. Carell, *Collect. Symp. Ser.* **2005**, *7*, 229-232.
- [318] P. Kele, X. Li, M. Link, K. Nagy, A. Herner, K. Lorincz, S. Beni, O. S. Wolfbeis, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3486-3490.
- [319] S. G. Gouin, J. Kovensky, *Synlett* **2009**, 1409-1412.
- [320] I. Singh, J. S. Vyle, F. Heaney, *Chem. Commun.* **2009**, 3276-3278.

- 
- [321] C. R. Bertozzi, N. J. Agard, J. A. Prescher, J. M. Baskin, E. M. Sletten Preparation of cyclooctynes and azacyclooctynes for modification of biomolecules in vivo and in vitro by their copper-free strain-promoted [3+2] cycloaddition with azides. 2008-49034  
2009068738, 20080314., 2009.
- [322] S. Sawoo, P. Dutta, A. Chakraborty, R. Mukhopadhyay, O. Bouloussa, A. Sarkar, *Chem. Commun.* **2008**, 5957-5959.
- [323] L. Campbell-Verduyn, P. H. Elsinga, L. Mirfeizi, R. A. Dierckx, B. L. Feringa, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3461-3463.
- [324] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.
- [325] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097-3099.
- [326] K. C. Schneider, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 453-455.
- [327] D. Zhou, I. M. Lagoja, J. Rozenski, R. Busson, A. V. Aerschot, P. Herdewijn, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2298-2304.
- [328] L. Zhang, A. E. Peritz, P. J. Carroll, E. Meggers, *Synthesis* **2006**, 645-653.
- [329] O. L. Acevedo, R. S. Andrews, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3931-3934.
- [330] P. Nielsen, F. Kirpekar, J. Wengel, *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 703-710.
- [331] P. Nielsen, L. H. Dreier, J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 19-28.
- [332] M. K. Schlegel, L.-O. Essen, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8158-8159.
- [333] K. Schlegel Mark, X. Xie, L. Zhang, E. Meggers, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 960-963.
- [334] L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2007**, 2111-2115.
- [335] Y. Shi, K. Machida, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 306-311.
- [336] Y. Shi, A. Kuzuya, K. Machida, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3703-3706.
- [337] T. Takarada, D. Tamaru, X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2001**, 732-733.
- [338] H. Asanuma, T. Takarada, T. Yoshida, D. Tamaru, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2671-2673.
- [339] S. Steenken, S. V. Jovanovic, L. P. Candeias, J. Reynisson, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2829-2833.
- [340] M. Grotli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899-5914.
- [341] M. K. Schlegel, A. E. Peritz, K. Kittigowittana, L. Zhang, E. Meggers, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 927-932.
- [342] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923 - 2925.
- [343] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991 - 1024.
- [344] D. Ackermann, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 2790-2804.
- [345] D. V. Jarikote, O. Köhler, E. Socher, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187-3195.
- [346] L. Cincotta, J. W. Foley, A. H. Cincotta, *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 751-758.
- [347] P. Kele, G. Mezo, D. Achatz, O. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *48*, 344-347.