Technische Universität München
Department Chemie
Lehrstuhl II für Organische Chemie

Darstellung und Untersuchung von Modellsystemen für den Ladungstransfer in DNA und zwischen Peptiden und Oligonukleotiden

Elke Mayer-Enthart

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H.-A. Wagenknecht, Universität Regensburg
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf
3. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Die Dissertation wurde am 09.03.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 27.04.2006 angenommen.

meiner Familie

There is no sadder sight in the world than to see
a beautiful theory killed by a brutal fact.
Thomas Henry Huxley (1825-1895)

Quamquam ridentem dicere verum, quid vetat.
Horaz (65-8 v. Chr.)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2002 bis September 2005 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht, den ich noch als Dr. Wagenknecht kennen und schätzen lernen durfte, möchte ich besonders danken für die wissenschaftliche Freiheit, die er mir ließ und das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte. Trotz aller Widrigkeiten einer kleinen Habilitanden-Nachwuchsgruppe gelang es, sich durch Ausdauer und intensiven wissenschaftlichen Austausch gegen etablierte Gruppen zu behaupten. Es war eine sehr wertvolle Erfahrung für mich, diese Entwicklung mitmachen zu dürfen.
Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Horst Kessler, der unsere Arbeitsgruppe stets mitversorgte.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- meinen Laborkollegen Janez Barbaric, Linda Valis, Clemens Wagner, Claudia Wanninger, Nicole Amann, Robert Huber, Peter Kaden, Peter Kaiser, Stefan Mitschke und Manuela Rist für die sehr gute und erfolgreiche Zusammenarbeit in einer unglaublichen Laboratmosphäre, in der wir auch viel Spass hatten.
- Linda, Clemens, Peter Kaden, Stefan, Janez und Manu, die z. T. seit meiner Studienzeit meine Leidensgenossen waren und im Laufe der Zeit mehr als nur Kollegen wurden, v. a. Linda, die mir durch zahlreiche Telefonate half, die Zeit in der Diaspora besser zu ertragen.
- Nicole Amann und Robert Huber, die mir die alttestamentarische Theologie nahe brachten.
- den Mitgliedern des AK Kessler für die freundliche Aufnahme und besonders Mona Wolff, die mich in die Welt der SPPS einführte.
- Alexander Frenzel, der mir ein Dach über dem Kopf anbot und meine Selbstgespräche am Computer tapfer ertrug.
- Silke Peters für das geduldige Korrekturlesen meiner Arbeit und die willkommene Abwechslung am Nachmittag.
- Peter Kaden für seine kritische Betrachtung der Welt.
- Dr. Burkhard Luy und Andreas Enthart für ihre NMR-Begeisterung und Freundschaft.
- Dr. Torsten Fiebig und seinen Mitarbeitern für die zeitaufgelösten Transientenabsorptions-Messungen und die wissenschaftliche Diskussion.

- Burghard Cordes für die unzähligen ESI-MS-Spektren und die Bereitschaft, die Intaktheit seines Gerätes mit meinen DNA-Proben aufs Spiel zu setzen.
- Helmut Krause für die Einführung in die MALDI-TOF-MS und die viele Messzeit, die ich belegen durfte.
- all meinen Praktikanten, die geduldig gesäult und getüpfelt haben.
- den Mitgliedern der mittäglichen Kaffeerunde Beate Diaw, Andreas Enthart, Alexander Frenzel, Gerd Gemmecker, Rainer Häßner und Peter Kaden für Kost, Logis und befreiende Diskussionen.
- Evelyn Bruckmaier und Marianne Machule für ihre Sekretariatsdienste, sowie Beate Diaw für ihre hervorragende Organisation.

Sollte ich jemanden vergessen haben, so möchte ich mich dafür entschuldigen und betonen, dass es ein Versehen gewesen sein muss. Auf jeden Fall sage ich „Danke!“

Mein besonderer Dank gilt Andreas, der mit seiner Geduld und Ausdauer meine Arbeit unterstützt hat, und der mir stets als ruhender Pol zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

1 Motivation und Themenstellung 1

2 Hintergrund 4

2.1 Spektroskopische Methoden 4

2.1.1 UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie 4

2.1.1.1 Molekulare Grundlagen 4

2.1.1.2 Wichtige Begriffe 6

2.1.1.3 Fluoreszenzlöschung 7

2.1.1.4 Experimentelle Methoden 10

2.1.2 Energie- und Ladungstransfer in DNA 12

2.1.2.1 Biologische Relevanz des Ladungstransfers in DNA 13

2.1.2.2 Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren 17

2.1.2.3 Untersuchung des Ladungstransfers in DNA 18

2.1.2.4 Mechanistische Modelle für den oxidativen Lochtransfer 21

2.1.2.5 Bisherige Studien zum oxidativen Lochtransfer 23

2.1.2.6 Der reduktive Elektronentransfer in DNA 27

2.1.2.7 Verwendete Systeme 35

2.1.3 Ladungstransfer zwischen Oligonukleotiden und Peptiden 37

2.1.3.1 Biologische Relevanz 37

2.1.3.2 Bisherige Studien zum Ladungstransfer zwischen Peptiden und DNA 39

2.1.3.3 Geplante Experimente 41

2.1.4 Chiroptische Spektroskopie 42

2.1.4.1 Grundlagen 42

2.1.4.2 Charakterisierung von DNA und Peptiden 46

2.1.4.3 Das Differenz-CD-Experiment 48

2.2 Synthetische Methoden 49

2.2.1 DNA-Festphasensynthese 49

2.2.2 Synthese PydU-modifizierter Oligonukleotide 51

2.2.2.1 Darstellung von PydU 51

2.2.2.2 Darstellung der PydU-modifzierten Oligonukleotide 52

2.2.3 Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) 55

2.2.3.1 Peptid-Kupplung nach der Fmoc-Strategie 55

2.2.3.2 Aktivestermethode 57

2.2.4 Synthese und Charakterisierung pNB-modifizierter Oligopeptide 59

2.2.4.1 Wahl der Peptidsequenzen 59

2.2.4.2 Synthese und Charakterisierung ... 60

3 Ladungstransfer in Oligonukleotiden ... 62

3.1 PydU-modifizierte DNA-Oligonukleotide ... 62
3.1.1 Hintergrund ... 62
3.1.2 Spektroskopische Charakterisierung der Duplexe ... 63

3.2 *Abasic-site*-Duplexe von PydU und dem Ethidiumnukleosid ... 67
3.2.1 Hintergrund ... 67
3.2.2 *Abasic-site*-Duplexe von PydU-modifizierten Oligonukleotiden ... 67
3.2.2.1 Absorptions- und CD-Spektren ... 68
3.2.2.2 Emissionsspektren und Schmelzpunkte ... 70
3.2.3 *Abasic-site*-Duplexe des Ethidiumnukleosids ... 73
3.2.3.1 Absorptions- und CD-Spektren ... 74
3.2.3.2 Emissionsspektren ... 75

3.3 Zusammenfassung der Untersuchung des Ladungstransfers in Oligonukleotiden ... 76

4 Ladungstransfer zwischen Oligonukleotiden und Peptiden ... 79

4.1 Wahl des Elektronenakzeptors ... 79
4.1.1 Methylviologen als Elektronenakzeptor ... 80
4.1.2 Vorversuche ... 81
4.1.3 Methylviologen in DNA ... 83
4.1.4 Methylviologen in Peptiden ... 86
4.1.5 *Para*-Nitrobenzoesäure als Elektronenakzeptor ... 88

4.2 Untersuchung der Fluoreszenzlöschung in nicht kovalenten Peptid-DNA-Komplexen ... 90
4.2.1 PydU als Elektronendonor ... 91
4.2.1.1 Vorversuche mit para-Nitroenzoesäure-Methylester ... 91
4.2.1.2 Einfluss von Oligolysinen ... 92
4.2.1.3 Peptide mit aromatischen Aminosäuren ... 94
4.2.1.4 Experimente mit Threonin- und Cystein-haltigen Peptiden ... 97
4.2.2 Das Ethidium-Nukleosid als Elektronendonor ... 99
4.2.2.1 Experimente mit Oligolysinen ... 99
4.2.2.2 Experimente mit aromatische Aminosäuren enthaltenden Peptiden ... 101
4.2.3 PydG als Lochdonor ... 103
4.2.3.1 Experimente mit Peptiden ... 103
4.2.4 Duplexe mit *abasic-sites* ... 107
4.2.4.1 Experimente mit Abasic-Site-Duplexen des PydUs ... 107
4.2.4.2 Experimente mit Abasic-Site-Duplexen des Ethidiumnukleotids ... 112

4.2.5 Zusammenfassung der Untersuchung des Ladungstransfers in nicht kovalenten Peptid-DNA-Systemen ... 114

4.3 Untersuchung der Fluoreszenzlöschung in spezfischen Peptid-DNA-Komplexen ... 116

4.3.1 Spezifische Oligonukleotid- und Peptid-Sequenzen ... 116

4.3.2 Charakterisierung der Peptide ... 117

4.3.3 Charakterisierung der Oligonukleotid-Duplexe ... 118

4.3.4 Spektroskopische Untersuchung ... 119

4.3.5 Zusammenfassung der Untersuchungen des Ladungstransfers in spezifischen Peptid-DNA-Komplexen ... 124

4.4 Strangbruchexperimente ... 125

4.4.1 Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen ... 125

4.4.2 Methode: Piperidinspaltung und Bestrahlungsexperiment ... 126

4.4.3 PydU-Systeme mit und ohne BrdU ... 127

4.4.3.1 Einfluss von Oligolysinen ... 128

4.4.3.2 Einfluss aromatischer Aminosäureseitenketten ... 130

4.4.3.3 Crosslinking ... 132

4.4.4 Strangbruchexperimente mit PtzdU als Elektronendonor ... 134

4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente ... 135

4.5 Kovalente Peptid-DNA-Konjugate (POCs) ... 137

4.5.1 Synthetische Möglichkeiten zur kovalenten Verknüpfung von Peptiden mit Oligonukleotiden ... 137

4.5.2 Bestimmung des Donor-Akzeptor-Abstands ... 141

4.5.2.1 Vorversuche ... 142

4.5.2.2 Synthese der pNB-Oligonukleotid-Konjugate ... 143

4.5.2.3 Spektroskopische Untersuchung der pNB-Oligonukleotid-Konjugate ... 144

4.5.2.4 Bestimmung des Abstands ... 148

4.5.3 Kovalente Anknüpfung ... 150

4.5.3.1 Synthese ... 150

4.5.3.2 Probleme ... 152

4.5.3.3 Ergebnisse ... 152

4.6 Zusammenfassung der Resultate zur Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Peptiden und Oligonukleotiden ... 154

5 Entwicklung neuer DNA-basierter Fluoreszenzsonden ... 156

5.1 Nukleinsäuren in der Nanotechnologie ... 156

5.2 Zweifach-modifizierte Oligonukleotide ... 158

5.2.1 Hintergrund und Design ... 158

5.2.2 Spektroskopische Untersuchungen am zweifach-markierten Oligonukleotid ... 159

5.2.3 Zusammenfassung ... 161

5.3 Fünffach-PydU-modifizierte Oligonukleotide ... 162

5.3.1 Hintergrund und Design ... 162

5.3.2 Spektroskopische Untersuchung am fünffach-markierten Oligonukleotid ... 162

5.3.2.1 Messungen am Einzelstrang ... 162

5.3.2.2 Absorption und Emission im Doppelstrang ... 164

5.3.2.3 CD-Spektroskopie des Duplexes ... 165

5.3.2.4 Temperaturabhängige Messungen ... 166

5.4 Fünffach-PydU- und PtzdU-modifizierte Oligonukleotide ... 169

5.4.1 Hintergrund und Design ... 169

5.4.2 Spektroskopische Untersuchung der fünffach-modifizierten Duplexe ... 170

5.4.2.1 Absorption, CD und Schmelzpunkte ... 170

5.4.2.2 Fluoreszenzeigenschaften ... 172

5.5 Mismatch-Duplexe fünffach-modifizierter Oligonukleotide ... 174

5.5.1 Hintergrund und Design ... 174

5.5.2 Spektroskopische Untersuchung des Ladungstransfers ... 175

5.5.3 Zusammenfassung und Ausblick ... 177

5.6 PyindC-modifizierte DNA-Oligonukleotide ... 179

5.6.1 Hintergrund ... 179

5.6.2 Sonogashira-Kupplung an der festen Phase ... 181

5.6.3 Spektroskopische Untersuchung Py*ind*C-modifizierter Oligonukleotide ... 182

5.6.3.1 Absorptions- und CD-Spektren ... 182

5.6.3.2 Emissionsspektren ... 185

5.6.4 Das Py*ind*X-Chromophor als neue Fluoreszenzsonde in der DNA-Analytik ... 187

5.6.5 Zusammenfassung ... 188

6 Zusammenfassung ... 189

7 Materialien und Methoden ... 194

7.1 Materialien und Geräte ... 194

7.2 Durchführung und Auswertung der Bestrahlungsexperimente ... 197

7.3 Synthese des PydU-Phosphoramidits ... 199

7.3.1 Darstellung von 1-Brompyren ... 199

7.3.2 Darstellung von 1-Pyrenylboronsäure ... 199

7.3.3 Darstellung von 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin ... 200

7.3.4 Darstellung von 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenyl)- 2'-desoxy-uridin ... 201

7.3.5 Darstellung von 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenyl)-2'-desoxy-uridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-di*iso*propyl)-phosphoramidit] ... 202

7.4 Synthese der Bipyridinverbindungen ... 203

7.4.1 Darstellung von N-Methyl-4,4'-bipyridinium-Iodid ... 203

7.4.2 Darstellung von N-Carboxymethyl-N'-methyl-4,4'-bipyridinium-Bromid ... 203

7.4.3 Darstellung von N,N'-Di(carboxymethyl)-4,4'-bipyridinium-Bromid ... 204

7.4.4 Darstellung von N-Carboxyethyl-4,4'-bipyridinium-Bromid ... 204

7.4.5 Darstellung von N-Carboxyethyl-N'-methyl-4,4'-bipyridinium-Iodid ... 205

7.4.6 Darstellung von N,N'-Di(carboxyethyl)-4,4'-bipyridinium-Bromid ... 205

7.4.7 Darstellung von N-(1-Hydroxypropyl)-4,4'-bipyridinium-Bromid ... 206

7.4.8 Darstellung von N-(1-Brompropyl)-N'-methyl-4,4'-bipyridinium-Bromid ... 206

7.4.9 Darstellung von N-(1-Iodpropyl)-4,4'-bipyridinium-Iodid ... 207

7.4.10 Darstellung von NN'-Di(1-iodpropyl)-4,4'-bipyridinium-Iodid ... 207

7.5 Synthese von Peptiden ... 208

7.5.1 Allgemeines ... 208

7.5.2 Charakterisierung der synthetisierten Peptide ... 211

7.5.2.1 Oligolysine ... 211

7.5.2.2 Tripeptide mit aromatischer Aminosäure ... 212

7.5.2.3 Tripeptide mit nukleophiler Aminosäure ... 213

7.5.2.4 Längere Oligopeptide ... 214

7.5.2.5 Oligopeptide für die Synthese von Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten ... 219

7.6 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden ... 220

7.6.1 Verwendete Oligonukleotidsequenzen ... 220

7.6.2 Allgemeines ... 224

7.6.3 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden mit einem PydU-Nukleotid ... 227

7.6.4 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden mit mehreren PydU-Nukleotiden ... 227

7.6.5 Synthese und Charakterisierung *abasic-site*-modifizierter Oligonukleotide ... 229

7.6.6 Synthese und Charakterisierung Py*in*dC-modifizierter Oligonukleotide ... 230

7.6.7 Synthese und Charakterisierung *pNB*-modifizierter Oligonukleotide ... 231

7.6.8 Synthese und Charakterisierung von Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten ... 233

8 Literaturverzeichnis ... 235

Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Å	Angström
A	Adenin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Alloc	Allyloxycarbonyl
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
a. u.	*arbitrary units*
Boc	*tert*-Butoxycarbonyl
bp	Basenpaare
BrdA	8-Brom-2'-desoxyadenosin
BrdG	8-Brom-2'-desoxyguanosin
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BuLi	*n*-Buthyllithium
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C	Cystein
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CDI	*N,N'*-Carbonyldiimodazol
CPG	*Controlled Pore Glas*
CT	Ladungstransfer (C*harge Transfer*)
Cys	Cystein
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett, Tag
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dubletts
dG	2'-Desoxyguanosin
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
d. h.	das heißt
dI	2'-Desoxyinosin
DIPEA	Di*iso*propylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dT	2'-Desoxythymidin
dU	2'-Desoxyuridin
E^0	Redoxpotential

EDCI	*N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
eq	Äquivalent
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
F	Phenylalanin
FC	*Flash*-Säulenchromatographie
FISH	Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
fs	Femtosekunde
G	Guanin
G	Glycin
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
h	Stunde
HFIP	1,1,1,6,6,6-Hexafluor*iso*propanol
HK	Hauptkonformation
HMBC	*HeteronuclearMultipleBond Coherence*
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
hp	Haarnadel-
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
hpts.	hauptsächlich
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Correlation*
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
I	Inosin
IC	*Internal Conversion*
ISC, ST	*Intersystem Crossing* (Singulett-Triplett- Übergang)
J	Kopplungskonstante
K	Lysin
Lys	Lysin
M	Molar
m	Multiplett
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mdeg	*millidegree*
MALDI-TOF-MS	Matrix unterstützte Flugzeit-Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
mM	millimolar
µM	mikromolar
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
$\mathbf{MV^{2+}}$	Methylviologen
N_a	Avogadro-Konstante (6.022×10^{23} mol^{-1})

NaP_i	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
NMP	*N*-Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinmagnetresonanz (N*uclear Magnetic Resonance*)
NWE	Normalwasserstoffelektrode
OD	Optische Dichte
ORD	Optische Rotationsdispersion
P	Prolin
PCET	Protonen-gekoppelter Elektronentransfer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
pNB	*para*-Nitrobenzoyl
POC	Peptid-Oligonukleotid-Konjugat
ppm	*parts per million*
Pro	Prolin
ps	Pikosekunde
Py	Pyren(yl)
PydA	8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyadenosin
PydC	5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxycytidin
PydG	8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin
PydU	5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin
Py*in*	Ethinylpyren(yl)
PyindA	8-(1-Ethinylpyrenyl)-2'-desoxyadenosin
PyindC	5-(1-Ethinylpyrenyl)-2'-desoxycytidin
PyindG	8-(1-Ethinylpyrenyl)-2'-desoxyguanosin
PyindU	5-(1-Ethinylpyrenyl)-2'-desoxyuridin
PtzdU	5-(10-Methyl-phenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin
R	Arginin
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROESY	*Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
RP	*Reversed Phase*
RT	Raumtemperatur
rx	Rückfluss
S	Serin
s	Singulett
s.	siehe
Ser	Serin
SNP	*Single nucleotide polymophism*
SPPS	Peptidfestphasensynthese
sog.	sogenannt
ss	Einzelstrang-
ST, ISC	*Intersystem Crossing* (Singulett-Triplett- Übergang)
T	Thymin
T	Threonin
t	Triplett
TBTU	2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat

TCP	Tritylchloridharz
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TIPS	Tri*iso*propylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TOCSY	*Total Correlation Spectroscopy*
Trp	Thryptophan
Trt	Trityl
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UV-Vis	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190-800 nm)
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*[1] und an den von der *IUPAC-IUB*-Kommission[2] empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen wurden *kursiv* gedruckt.

[1] Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

[2] a) IUPAC Comission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Joint Comission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1971**, *10*, 3983-4004.

b) IUPAC-IUB (CBN); Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *21*, 455-477.

c) J.H. Johns; Abbreviations and symbols in peptide science: a revised guide and commentary, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 1-12.

1 Motivation und Themenstellung

Als 1871 der Schweizer Friedrich Miescher als erster die Isolation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus menschlichen Zellen beschrieb, konnte noch niemand die Tragweite dieser bedeutenden Entdeckung abschätzen. Erst wenige Jahre zuvor waren von Gregor Mendel die auf Empirie beruhenden Vererbungsregeln gefunden worden, der molekulare Träger der Erbinformation blieb lange Zeit unbekannt. Bis in die 1950er Jahre wurden Proteine für die Träger der Erbinformation gehalten. Erst 1944 gelang es Oswald Avery[1] zweifelsfrei nachzuweisen, dass die DNA die genetische Information enthält. Mit der Aufklärung der doppelhelikalen Struktur durch James Watson und Francis Crick 1953[2] setzte sich die Entwicklung der modernen Molekularbiologie in Gang, die als eine der Schlüsseltechnologien unseres Jahrhunderts angesehen werden kann. Diese Entwicklung gipfelte 2001 in der Aufklärung des menschlichen Genoms[3]. Vor allem die Medizin erhofft sich dadurch revolutionäre Fortschritte in der Behandlung und Diagnostik verschiedenster systemischer Erkrankungen. Mittlerweile gehört es zum Standardrepertoire wissenschaftlicher Forschung, DNA gezielt zu synthetisieren[4-7], zu sequenzieren[8] und gentechnisch veränderte Organismen zu produzieren[9].

Doch nicht nur die Biologie und die Medizin wurden durch die Erkenntnisse der Molekularbiologie grundlegend verändert. Das Arbeiten mit genetischem Material in biologischen Labors erforderte die Entwicklung verschiedenster Nachweisverfahren und bioanalytischer Methoden. Mittlerweile hat sich daraus sogar ein eigener Zweig entwickelt, der sich mit den technischen Anwendungen u. a. von Nukleinsäuren beschäftigt. Die sog. Nanobiotechnologie[10] beschränkt sich nicht mehr auf die Bioanalytik und die Medizin, sondern geht bis in den Bereich der Entwicklung von elektronischen Bauteilen aus Makromolekülen. Die DNA stellt dabei ein sehr wichtiges Material dar. Ein Grund dafür liegt in ihrer Fähigkeit Ladungen zu transportieren.

Die Diskussion um die Möglichkeit des Ladungstransportes in DNA begann bereits wenige Jahre nach der Aufklärung der DNA-Struktur[11]. Das Interesse an Ladungstransferprozessen in DNA wuchs mit der Erkenntnis, dass oxidative Schädigungen unseres Erbgutes eine zentrale Rolle bei Mutagenese, Apoptose und Krebsentstehung spielen[12-14]. Mittlerweile kennt

man einige grundlegende Prinzipien, die für den Transport von Ladungen durch DNA gelten. Ein Teil dieser Erkenntisse lässt sich heute bereits in der Analytik nutzen.

Ein Aspekt blieb bei den bislang durchgeführten Studien allerdings weitgehend unbeachtet. Die Kenntnisse über den Einfluss DNA-bindender Proteine auf die Ladungstransfereigenschaften in der Doppelhelix sind lückenhaft, obwohl der Ladungs- und Energietransfer zwischen Peptiden und DNA große biologische Relevanz besitzt. Bislang erfolgte noch keine systematische Untersuchung der zugundeliegenden Prozesse.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Ladungstransferprozessen in DNA und zwischen Oligonukleotiden und Peptiden. Durch die Entwicklung und Anwendung einfacher Modellsysteme sollen Grundlagen für Anwendungen in der Bioanalytik und der Nanotechnologie geschaffen und Erkenntnisse über fundamentale Prinzipien des Ladungstransfers zwischen DNA und Proteinen geliefert werden. Die dargestellten Ergebnisse gliedern sich dabei in drei Themengebiete:

- Ein Schwerpunkt liegt in der Untersuchung von Struktureinflüssen auf die Fluoreszenz- und Ladungstransfereigenschaften von modifizierten DNA-Duplexen. Zu diesem Zweck werden DNA-Sequenzen synthetisiert, die mit photochemisch anregbaren Gruppen modifizierte Nukleotide tragen. Diese Stränge werden mithilfe spektroskopischer Methoden charakterisiert. Aufbauend auf bereits veröffentlichten Resultatenliefern diese Ergebnisse einen weiteren wichtigen Beitrag zum grundlegenden Verständnis von Ladungstransferprozessen in DNA in den von unserer Arbeitsgruppe untersuchten Donor-Akzeptor-Systemen[15-32].
- Das am intensivsten bearbeitete Themengebiet stellt die Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Peptiden und modifizierten DNA-Duplexen dar. Dafür werden verschiedene fluoreszente Ladungsdonoren in Oligonukleotide integriert und mit Akzeptor-modifizierten Peptiden versetzt. Diese nicht kovalenten DNA-Peptid-Systeme werden spektroskopisch und chemisch untersucht. Die Charakterisierung kovalenter DNA-Peptid-Konjugate beschließt diesen Themenbereich. Diese Untersuchungen erbringen grundlegende Kenntnisse über die fundamentalen Prozesse, die an einem Ladungstransfer zwischen Peptiden und Oligonukleotiden beteiligt sind.
- Die Entwicklung neuer molekularer Fluoreszenzsonden bildet das dritte Arbeitsgebiet. Mithilfe der Kombination mehrerer Chromophore in Oligonukleotiden sollen Systeme mit

neuen spektroskopischen Eigenschaften erhalten werden, die sich als Struktursonden im Bereich der Bioanalytik und der Nanobiotechnologie einsetzen lassen.

Die Darstellung der im Folgenden verwendeten modifizierten Oligonukleotide orientiert sich an Synthesemethoden, die in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* im Verlauf der letzten Jahre entwickelt wurden. Die Synthese Pyren-[27, 28, 30-32] und Pyrenethinyl-modifizierter[23, 33, 34] Nukleotide, sowie der Phenothiazin[15]-tragenden Nukleoside erfolgt durch Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen in Lösung oder an der festen Phase im Verlauf der DNA-Festphasensynthese. Die Integration des Ethidiumnukleosidanalogons[24, 25, 29] wurde ebenfalls in dieser Arbeitsgruppe entwickelt. Für die Darstellung der modifizierten Peptide wurde auf Methoden der konventionellen Peptidfestphasensynthese nach der *Fmoc*-Strategie[35-37] zurückgegriffen. Die Synthese der Peptid-DNA-Konjugate erfolgte unter dem Aspekt der Entwicklung eines Festphasenprotokolls für die kovalente Anknüpfung von Peptiden an Oligonukleotide.

2 Hintergrund

2.1 Spektroskopische Methoden

Spektroskopische Methoden stellen eine einfache und effiziente Art dar, die elektronischen Eigenschaften eines Systems zu überprüfen. Im Rahmen dieser Arbeit sind sie das wichtigste Verfahren zur Untersuchung des Ladungstransferverhaltens der Oligonukleotidsysteme. Dabei spielen die UV-Vis- und die Fluoreszenzspektroskopie die wichtigste Rolle. Die CD-Spektroskopie dient zur schnellen und globalen Strukturbestimmung v. a. in den DNA-Peptid-Systemen. Eine echte Strukturaufklärung ist allerdings nur mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie möglich.

2.1.1 UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

2.1.1.1 Molekulare Grundlagen

Wird ein Molekül in einen höher gelegenen elektronischen Zustand angeregt, so kann es durch Aussendung von Licht in den Grundzustand relaxieren. Dieser Vorgang wird als Lumineszenz bezeichnet. Die elektronische Anregung kann dabei durch die Absorption von Licht geschehen. Der Elektronenübergang folgt dabei dem *Franck-Condon*-Prinzip des vertikalen Übergangs.[38]
Besonders wichtig für die UV-Vis-Spektroskopie sind $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ und intramolekulare Ladungstransferübergänge aromatischer Moleküle, da sich diese elektronischen Übergänge zum Teil im sichtbaren Bereich des Spektrums und im nahen UV (200-800 nm) anregen lassen[39].

Während die Absorption mit 10^{-15} s sehr schnell ist, verlaufen die Prozesse, die zur Relaxation in den Grundzustand führen, deutlich langsamer. Dabei zählt die Lumineszenz zu den langsamsten Vorgängen elektronisch angeregter Zustände (10^{-10} bis mehrere Sekunden), während die thermische Relaxation durch den Abbau vibronischer Energie, *internal conversion* (IC)

und *intersystem-crossing* (ISC, ST) zwischen Singulett- und Triplett-Zuständen sehr viel schneller verlaufen (10^{-14}-10^{-12} s). Das führt dazu, dass normalerweise Lumineszenz von elektronisch angeregten Molekülen ausgeht, die sich im thermischen Gleichgewicht befinden[39]. Ein Jablonski-Diagramm zeigt die typischen Prozesse, die bei Absorption und Emission ablaufen[39, 40].

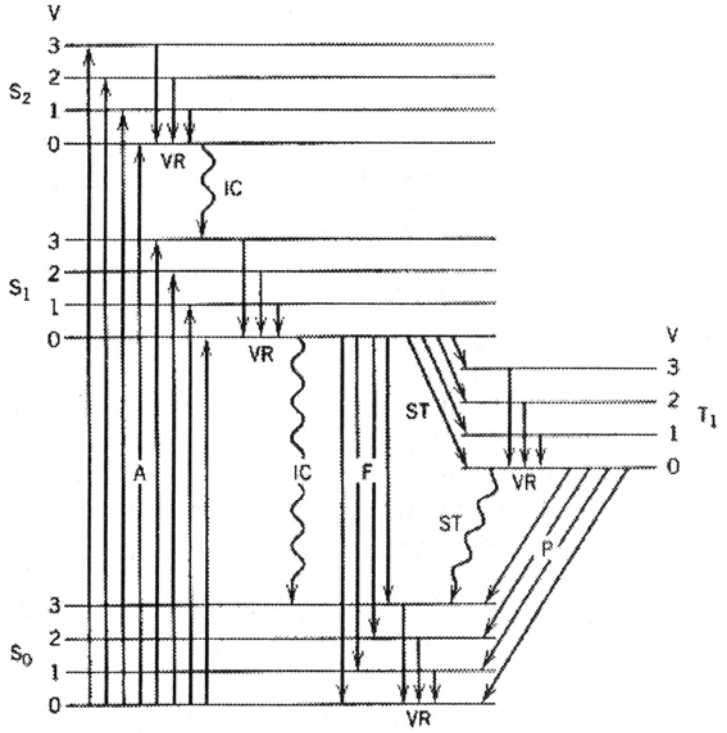


Abbildung 2-1: Perrin-Jablonski-Diagramm der wichtigsten Elementarschritte mit ihren typischen Raten. A = elektromagnetische Absorption, F = Fluoreszenz, P = Phosphoreszenz; S = elektronischer Singulett-Zustand, T = Triplett-Zustand, V = Schwingungsniveau; VR = Schwingungsrelaxation, ST = *intersystem-crossing* (Singulatt-Triplett-Übergang), IC = *internal conversion* (entnommen aus *Sharma und Shulman*).

Es gibt zwei Arten von Lumineszenz. Als Phosphoreszenz bezeichnet man den strahlenden Übergang vom Triplettzustand in den Singulett-Grundzustand des Moleküls. Dieser Prozess ist sehr langsam, da er Spin-verboten ist und ST erfordert (10^{-4}- 10^{-9} s). Bei der Fluoreszenz handelt es sich um den strahlenden Relaxationsweg aus einem angeregten Zustand in den Grundzustand gleicher Multiplizität. Dieser Vorgang ist sehr schnell und verläuft über IC-Prozesse (10^{-12} s)[38, 39].

Die Fluoreszenz ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig. Dazu zählen neben Lösungsmitteleffekten, der Temperatur und dem pH-Wert auch Konzentrationseffekte und die Anwesenheit wechselwirkender Fremdmoleküle. Die Beeinflussung der Fluoreszenzeigenschaften kann sowohl im Grundzustand des Moleküls als auch im angeregten Zustand stattfinden. Da-

bei ist zu beachten, dass sich die physikochemischen Eigenschaften eines Moleküls im Grundzustand von denen im angeregten Zustand oft sehr deutlich unterscheiden[38].

2.1.1.2 Wichtige Begriffe

Zwei Grundprinzipien der Fluoreszenz, die sich sehr einfach aus der Betrachtung des *Jablonski*-Termschemas ableiten lassen, sind die empirischen Regeln von *Kasha*[41] und *Stokes*[42]. Die Regel von *Kasha* besagt, dass die Emission aus dem niedrigsten Schwingungszustand des niedrigsten angeregten Zustands erfolgt. Dabei wird pro aufgenommenem Lichtquant auch eines abgegeben. Die Regel von *Stokes* besagt, dass das emittierte Licht immer energieärmer als das absorbierte Licht ist, d. h. die Fluoreszenz erscheint gegen die Absorption immer rotverschoben.

Zwei wichtige Charakteristika der Fluoreszenz eines Moleküls sind die *Quantenausbeute* Φ_F und die *Fluoreszenzlebensdauer* τ[38, 39]. Die Quantenausbeute ist definiert als der Anteil der Fluoreszenzintensität an der Summe aller strahlenden und strahlungslosen Relaxationsprozesse des angeregten Chromophors. Experimentell wird sie bestimmt durch die Messung der eingestrahlten und der emittierten Lichtintensität.

$$\Phi_F = \frac{k_{\text{Fluoreszenz}}}{\sum k_{\text{Relaxation}}} = \frac{I_{\text{emittiert}}}{I_{\text{eingestrahlt}}} \qquad \text{(Gleichung 2.1)}$$

Die Lebensdauer ist der reziproke Wert der Ratenkonstanten der Fluoreszenzemission und repräsentiert die mittlere Lebensdauer eines Moleküls im angeregten Zustand.

$$\tau = \frac{1}{k_{\text{Fluoreszenz}}} \qquad \text{(Gleichung 2.2)}$$

Bei hoher Konzentration an Fluorophor kommt es zu Aggregationseffekten, die die Konstanz der Quantenausbeute stören. Von einem *Exciplex* spricht man, wenn ein Molekül im angeregten Zustand mit einem anderen Molekül im Grundzustand in Wechselwirkung tritt. Sind bei dieser Interaktion beide Moleküle von derselben Sorte, so spricht man von einem *Excimer*. Ein Excimer zeichnet sich durch sehr starke Orbitalwechselwirkungen und Coulombinteraktionen aus und kann als einfacher *charge-transfer*-Komplex betrachtet werden. In einem Exciplex teilen sich ein Donor- und ein Akzeptormolekül Anregungsenergie und Ladung. Da-

durch entstehen Intermediate, die sich in ihren elektronischen Eigenschaften grundlegend von den isolierten Molekülen unterscheiden[39].

2.1.1.3 Fluoreszenzlöschung

Einem photoangeregten Molekül stehen neben der Lumineszenz und dem internen strahlungslosen Energietransfer (IC, ST) noch weitere Relaxationswege zur Verfügung. So kann die Anregungsenergie z. B. zu einer chemischen Reaktion führen oder auf Nachbarmoleküle übertragen werden. Jeder Vorgang, der zu einem Rückgang in der Fluoreszenzintensität führt, wird als Lösch- oder Quenchprozess bezeichnet. Im Rahmen dieses Projektes spielten vor allem Energie- und Ladungstransfervorgänge als Fluoreszenzlöschprozesse eine zentrale Rolle. Diese können sowohl intermolekular als auch intramolekular zwischen verschiedenen Molekülteilen verlaufen.

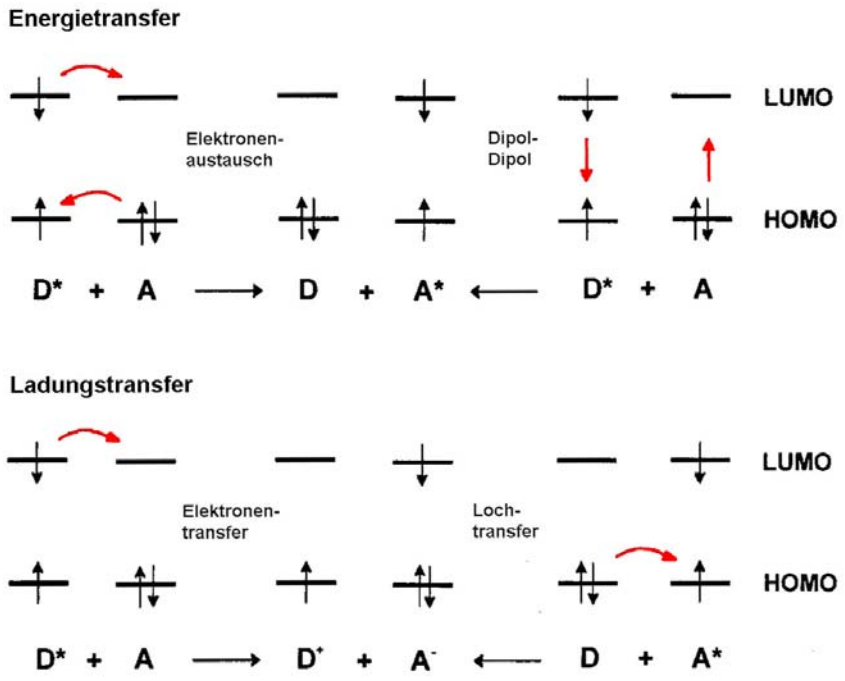


Abbildung 2-2: Schematische Übersicht über bimolekulare Energie- und Ladungstransfer-Prozesse. Der Energietransfer kann entweder durch Elektronenaustausch (Dextertransfer) oder durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Förstertransfer) erfolgen. Beim Ladungstransfer gibt der angeregte Zustand entweder ein Elektron ab (Elektronentransfer) oder nimmt eines auf (Lochtransfer). Dabei bildet sich eine Ladungstrennung aus. **D** ist der Elektronendonor, **A** der Elektronenakzeptor.

Fluoreszenz kann sowohl im Grundzustand als auch im angeregten Zustand durch die Wechselwirkung mit einem Nachbarteilchen gelöscht werden. Man unterscheidet zwischen *dynamischer* und *statischer* Fluoreszenzlöschung[38]. Beim dynamischen Prozess wird die Energie durch einen Stoßprozess zwischen Quenchermolekül und Fluorophor übertragen, beim statischen Vorgang findet der Austausch der Anregungsenergie im Quencher-Fluorophor-Komplex statt. Dieser Komplex kann entweder durch Grundzustandswechselwirkungen entstehen, oder durch Ausbildung einer Hülle von Quenchermolekülen um den angeregten Zustand des Fluorophors gebildet werden.

Der dynamische Quenchprozess hängt von der Wahrscheinlichkeit eines bimolekularen Stoßereignisses und damit von der Konzentration der beteiligten Komponenten ab. Die Löschung kann dabei nur während der Lebenszeit des angeregten Zustands erfolgen, so dass die Rate der Emission in Konkurrenz zur Geschwindigkeit der Quenchreaktion tritt.

$$\mathrm{M}^* \xrightarrow{k_1} \mathrm{M} + h\nu \qquad \text{(Gleichung 2.3)}$$

$$\mathrm{Q} + \mathrm{M}^* \xrightarrow{k_2} \mathrm{M} + \mathrm{Q}^* \qquad \text{(Gleichung 2.4)}$$

M : Fluorophor, Q : Quencher

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F berechnet sich gemäß den Gleichungen 2.3 und 2.4 zu:

$$\Phi_F = \frac{k_1[\mathrm{M}^*]}{k_1[\mathrm{M}^*] + k_2[\mathrm{M}^*]\cdot[\mathrm{Q}]} \qquad \text{(Gleichung 2.5)}$$

bzw.

$$\frac{1}{\Phi_F} = 1 + \frac{k_2}{k_1}[\mathrm{Q}] \qquad \text{(Gleichung 2.6)}$$

Durch Umformen der Quantenausbeuten in einen Ausdruck der relativen beobachteten Fluoreszenzintensitäten erhält man die Stern-Volmer-Gleichung, die das Löschverhalten eines Quenchermoleküls charakterisiert:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k\tau_0[\mathrm{Q}] = 1 + k_{SV}[\mathrm{Q}] \qquad \text{(Gleichung 2.7)}$$

mit F_0: beobachtete Fluoreszenzintensität ohne Quencher

F : beobachtete Fluoreszenzintensität mit Quencher

k_{SV} : Stern-Volmer-Konstante

k : bimolekulare Lösch-Konstante

τ_0 : Fluoreszenzlebenszeit

Mithilfe der Stern-Volmer-Konstante lässt sich der Einfluss der Diffusion auf die Fluoreszenz abschätzen. Bei einem rein dynamischen Quenchprozess ergibt die Stern-Volmer-Auftragung eine Gerade.

Bei rein statischer Fluoreszenzlöschung ist das Verhältnis F_0/F eine Exponentialfunktion, die vom Volumen V der Hülle an Quenchermolekülen um den Fluorophor und der Konzentration [Q] an Quencher abhängt.

$$\frac{F_0}{F} = e^{VN_a[\mathrm{Q}]} \qquad \text{(Gleichung 2.8)}$$

Bei niedrigem [Q] ist die Gleichung annähernd linear und gleicht der Stern-Volmer-Geraden.

Jeder Quenchprozess führt zu reaktiven Intermediaten. Wird bei einem Energietransfer das Quenchermolekül in einen energetisch höheren Zustand angeregt, so relaxiert es wie ein durch direkte Einstrahlung angeregtes Molekül. Der Energietransfer von einem Molekül auf ein anderes kann über Elektronenaustausch oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen erfolgen (vgl. Abbildung 2-2). Für den Elektronenaustausch ist eine Überlappung der Orbitale von angeregtem Donor und Akzeptor notwendig. Dementsprechend ist die Reichweite dieses Prozesses sehr gering. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung hingegen ist ein räumlich vermittelter Prozess, der keinen direkten Kontakt der beteiligten Spezies erfordert.
Ein photoinduzierter Ladungstransferprozess führt zu einer Ladungstrennung, indem ein angeregter Zustand ein Elektron an einen Grundzustand abgibt bzw. von diesem aufnimmt.

Im Gegensatz zu den genannten strahlungslosen Übertragungsprozessen zwischen Molekülen, gibt es den Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Hier macht man sich die Überlappung von Emissions- und Absorptionsspektren zweier Moleküle zunutze. Dabei absorbiert der FRET-Akzeptor die Emission des FRET-Donors und gelangt so in den angeregten Zustand. Der Transfer nach *Förster*[43] ist abhängig von der Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor und vom Abstand der FRET-Partner. Für die Transferrate k_T gilt:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^{-6} \qquad \text{(Gleichung 2.9)}$$

mit τ_D : Fluoreszenzlebenszeit des Donor in Abwesenheit des Akzeptors

r : Abstand zwischen Donor und Akzeptor

R_0 : Abstand mit 50 % Energietransfereffizienz (Förster-Radius)

Damit erlauben FRET-Paare die Bestimmung des Abstands im Bereich zwischen 10 und 90 Å (je nach Förster-Radius des verwendeten Systems). Diese Methode wird benutzt, um Makromoleküle zu charakterisieren oder die Bindung großer Moleküle an andere Strukturen zu untersuchen[44].

2.1.1.4 Experimentelle Methoden

Absorptionsspektroskopie

Die Messung eines Absorptionsspektrums erfolgt nach einer indirekten Methode. Hier wird nicht direkt die Absorption (auch optische Dichte genannt, OD) gemessen, sondern der Anteil an verbleibendem Licht (Transmission) ermittelt. Die Absorption A einer Spezies ist nach *Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon c d \qquad \text{(Gleichung 2.10)}$$

mit ε : molarer Extinktionskoeffizient
c : Konzentration
d : Schichtdicke der durchstrahlten Probe

Die Extinktion ε und somit auch die Absorption sind von der Wellenlänge abhängige Größen. Das Lambert-Beersche-Gesetz gilt über einen großen Konzentrationsbereich. Deshalb stellt die UV-Vis-Spektroskopie eine wichtige Methode u. a. zur Ermittlung der Konzentration von Peptiden und Nukleinsäuren dar. Da sich die Spektren im Allgemeinen additiv verhalten, kann die Absorption einer gelösten Spezies durch die Subtraktion des Lösungsmittelspektrums vom Spektrum der Lösung ermittelt werden.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung der Fluoreszenz ist eine direkte Methode, da das emittierte Licht der Probe unmittelbar detektiert wird. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist sehr hoch. Die Fluoreszenz kann im zeitlichen Mittel (*steady state*) und zeitaufgelöst beobachtet werden. Da die Fluoreszenz eines bestimmten Zustandes selektiv angeregt werden kann, ist sie eine sehr spezifische Methode mit hohem Informationsgehalt. In der Regel werden die absoluten Fluores-

zenzintensitätswerte durch den Wert der Absorption bei der Anregungswellenlänge korrigiert, um Konzentrationseffekte auszugleichen. Dies ist bei nur kleinen Variabilitäten der Konzentrationen zulässig. Als Anregungswellenlänge dient im Allgemeinen der Wert des Absorptionsmaximums der gesuchten Spezies.

Die Messung von Anregungsspektren stellt eine Ergänzung der Informationen aus einem Absorptionsspektrum dar. Dabei wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge gemessen. Dadurch wird das Anregungsprofil eines bestimmten fluoreszenten Zustandes sichtbar. Das ist v. a. interessant, wenn diese Anregungsbanden bei einer Wellenlänge liegen, in der mehr als nur der gewünschte Chromophor absorbieren. Dort kommt es im Absorptionsspektrum zu Überlagerungen, die keine genaue Zuordnung erlauben.

Die Messung der Fluoreszenzlöschung eines Systems geschieht durch sukzessive Zugabe eines Quenchers und den Vergleich der jeweiligen korrigierten Emissionsspektren miteinander.

***Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie*[45]**

Diese Methode, die auch als *Pump-Probe*-Spektroskopie bezeichnet wird, ist weit weniger empfindlich als die Fluoreszenzspektroskopie. Allerdings erlaubt sie die Beobachtung sowohl der Anregungs- als auch der Relaxationsprozesse des Farbstoffs. Es wird die Absorption auftretender Intermediate abgefragt.

Der Chromophor wird über einen kurzen Laserpuls mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt (*pump*). Ein zweiter, unabhängiger Laserpuls beliebiger Wellenlänge (*probe*) wird in kurzen Zeitabständen durch die Probe geschickt und kann von entstehenden intermediären Zuständen absorbiert werden.

- Liegt der *Probe*-Puls im Bereich der Grundzustandsabsorption, läßt sich analog der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie die Rate des Ladungsrücktransfers (k_{BCT}) bestimmen. Aus den erhaltenen zeitabhängigen Spektren kann die Lebenszeit des angeregten Zustands ermittelt werden.

- Liegt er innerhalb der Fluoreszenbande, kommt es zu stimulierter Emission des angeregten Zustands, und es läßt sich die Entvölkerungsrate dieses Zustands ermitteln.
- Liegt der Abfragepuls außerhalb der Fluoreszenzbande, kann die Besetzungswahrscheinlichkeit jedes beliebigen intermediären Zustands ermittelt werden.

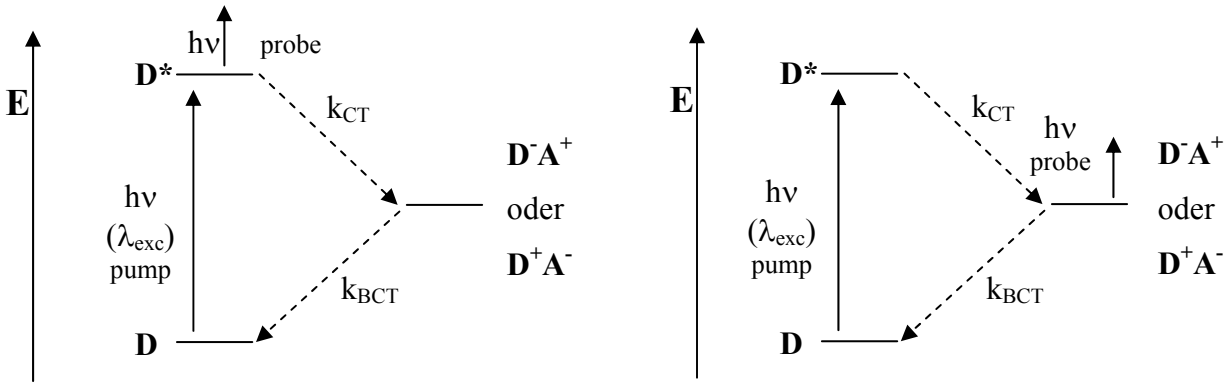


Abbildung 2-3: Mit der zeitaufgelösten *Pump-Probe*-Laserspektroskopie ist es möglich, jedes beliebige Intermediat abzufragen und Geschwindigkeiten unterschiedlicher Transferschritte zu ermitteln.

Durch den Einsatz eines Weißlichtkontinuums für den Abfragepuls konnten bei den zeitaufgelösten Messungen im Rahmen dieses Projekts gleichzeitig alle Wellenlängen abgefragt werden.

2.1.2 Energie- und Ladungstransfer in DNA

Die Diskussion um die Möglichkeit des Ladungstransportes in DNA begann bereits wenige Jahre nach der Aufklärung der DNA-Struktur. 1962 wurde von *Eley et al.*[11] erstmals der Ladungstransfer durch die eindimensionale Anordnung der über π-π-Wechselwirkungen interagierenden Nukleobasen in B-DNA vorgeschlagen. Das Interesse an Ladungstransferprozessen in DNA wuchs mit der Erkenntnis, dass oxidative Schädigungen unseres Erbgutes eine zentrale Rolle bei Mutagenese, Apoptose und Krebsentstehung[12-14] spielen.

Es wurde eine Vielzahl von Techniken verwendet, um Ladungstransportprozesse in der DNA zu untersuchen[46], aber erst die Entwicklung der automatisierten Festphasensynthese Mitte der 1980er Jahre[4-7] ermöglichte die umfangreiche und systematische Untersuchungen an definierten Basensequenzen. Zu Beginn dieser Studien reichte die Bandbreite experimenteller und theoretischer Arbeiten von der Vorstellung der DNA als „molekularer Draht“[47] bis hin

zur DNA als Isolator[48]. Mittlerweile wird die Vorstellung vom Ladungstransport durch DNA allgemein akzeptiert und die Diskussion darüber hat sich auf den Mechanismus und in jüngster Zeit auch auf die biologische Bedeutung und die technische Anwendbarkeit verlagert.
Heute ist man sich weitgehend darüber einig, dass der Transport von Ladungen in der DNA innerhalb von Femtosekunden erfolgen und noch in großer Entfernung vom ursprünglichen Entstehungsort der Ladung zu Folgereaktionen führen kann. Viele Experimente haben zudem gezeigt, dass der Ladungstransport sehr empfindlich auf die π-π-Wechselwirkung der Nukleobasen und die Störung der DNA-Struktur reagiert[49-77].

2.1.2.1 Biologische Relevanz des Ladungstransfers in DNA

Viele Schäden am Erbgut entstehen durch das Auftreten radikalischer Ladung in der DNA. Diese Radikale können durch verschiedene Faktoren erzeugt werden, so z. B. durch Bestrahlung (Röntgen, UV), Sauerstoff- oder organische Radikale und Alkylierungsreagentien[13]. Der Organismus kann sich gegen auftretende Veränderungen in seinem Erbmaterial auf verschiedene Arten wehren. An mehreren Kontrollstellen im Zellzyklus wird die Intaktheit des Genoms überprüft. Bei Veränderungen wie Basenfehlpaarungen, Pyrimidin-Dimeren, Strangbrüchen, chemisch veränderten Basen u. a. kann über verschiedene Reparaturmechanismen der Schaden behoben bzw. bei irreparablen Schädigungen die Apoptose herbeigeführt werden. Verläuft die Kontrolle oder die Reparatur fehlerhaft, kann es zu permanenten Mutationen kommen, die beispielsweise in Somazellen zu Krebs oder in Keimzellen zu vererbbaren Krankheiten führen können.
Ein wichtiges Intermediat bei radikalischen DNA-Schädigungen ist das $G^{\bullet+}$-Radikalkation[78]. Über Reaktion mit anderen Molekülen seiner Umgebung (z. B. O_2, H_2O) können sich verschiedene Oxidationsprodukte des Guanins bilden[79, 80]. Diese Verbindungen können verantwortlich für mutative Veränderungen sein. Als Beispiel sei hier das 8-Oxoguanosin (8-oxo-dG) genannt[14]. Liegt es in der *anti*-Konformation vor, so paart es wie das Guanosin mit Cytidin. Kommt es allerdings zu einer Konformationsänderung in die *syn*-Form, wird ein Hoogsteen-Basenpaar mit Adenosin gebildet. Während der Replikation wird das urprüngliche GC-Paar durch ein AT-Paar ausgetauscht, eine Mutation hat sich manifestiert (s. Abbildung 2-4). Mechanistische Details, wie es zu diesem Fehler bei der Replikation kommt, wurden von *Carell et al.*[81] aufgeklärt.

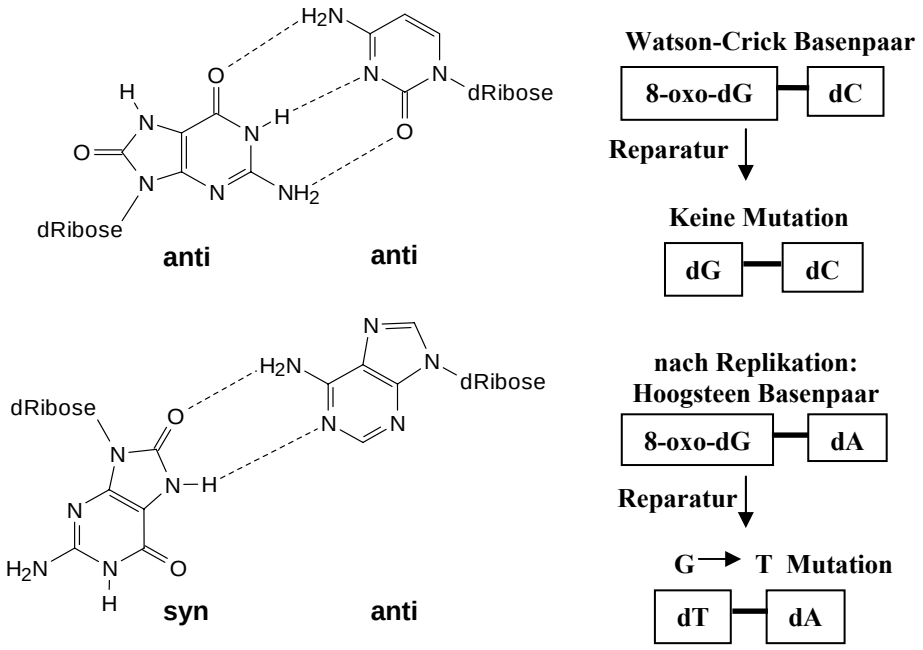


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung einer durch G-Oxidation ausgelösten Mutation von dG-dC nach dA-dT. Der oxidative DNA-Schaden wird erst nach der Replikation repariert.

Die meisten Studien zum Ladungstransfer wurden bisher mit nackter DNA in Pufferlösungen durchgeführt. Experimente mit DNA-bindenden Proteinen zeigen jedoch, daß sich die Ladungstransfereffizienz durch die Bildung von DNA-Protein-Komplexen positiv wie negativ beeinflussen läßt[82-84].

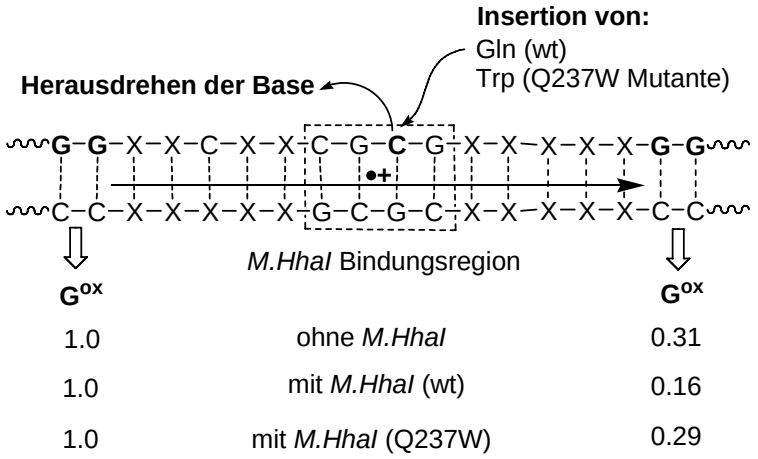


Abbildung 2-5: Vergleich der Ladungstransfereffizienzen in DNA ohne Zugabe von HhaI, unter dem Einfluss von Wildtyp HhaI und der Q237W-Mutante. Die Anzahl der Oxidationsereignisse in 5'-Richtung (Werte normiert gegen Anzahl der $\mathbf{G^{ox}}$-Ereignisse in 3'-Richtung) korreliert mit der Ladungstransfereffizienz ($\mathbf{G^{ox}}$ = Oxidationsprodukte von dG).

So sorgt die Cytosin-Methyltransferase HhaI beim Andocken an die DNA für eine deutliche Verringerung der Leitfähigkeit des Polynukleotidstrangs[46, 85]. Dieses Protein erkennt die Se-

quenz 5'-GCGC-3'. Während der Methylierung wird ein Protein-DNA-Komplex gebildet, in dem das zu methylierende Cytosin aus der DNA-Helix herausgedreht wird. Die entstehende Lücke im Basenstapel schließt eine Glutamin-Seitenkette des Proteins. Durch die Störung im Basenstapel wird der oxidative Lochtransport behindert. Untersucht man den oxidativen Lochtransport mit einer Mutante, die statt dieses Glutamins ein Tryptophan besitzt und dieses im Protein-DNA-Komplex in den Basenstapel schiebt, so findet wieder Ladungstransport statt (s. Abbildung 2-5). Die Indolseitenkette kann also beim Ladungstransport eine Lücke im DNA-Basenstapel schließen.

Der DNA-Proteinkomplex aus BamHI und der Ziel-DNA zeigt eine komplette Unterbindung des Lochtransportes.[87] Dafür wurde die Guaninoxidation als Folge eines oxidativen Lochtransports untersucht. Vor allem der direkte Kontakt der positiv geladenen Guanidinium-Gruppe einer Argininseitenkette des Proteins mit dem Guanin der Erkennungssequenz der DNA führte zur Ausbildung eines komplexen Netzwerkes aus Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen, die den Ladungstransport vollständig unterdrückten und die Effizienz der Guaninoxidation dadurch deutlich verminderten (s. Abbildung 2-6).

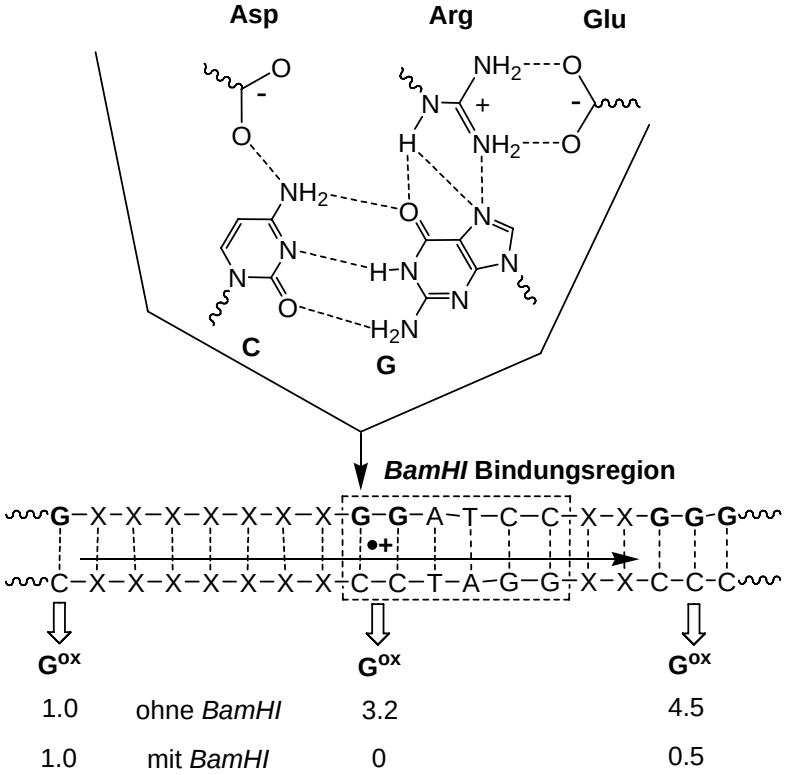


Abbildung 2-6: Vergleich der Ladungstransfereffizienzen in DNA ohne und mit BamHI. Die Anzahl der Oxidationsereignisse in 5'-Richtung (Werte normiert gegen Anzahl der $\mathbf{G^{ox}}$-Ereignisse in 3'-Richtung) korreliert mit der Ladungstransfereffizienz ($\mathbf{G^{ox}}$ = Oxidationsprodukte von dG).

Das TATA-*Box-Binding* Protein (TBP)[86] bewirkt eine Minderung der Ladungstransfereffizienz, indem es den Doppelstrang zweimal um 90° knickt und so die π-Wechselwirkungen der Basen stört.

Andere Proteine wie das Restriktionsenzym R. PvuII oder der Transkriptionsfaktor ANTP bewirken keine Konformationsänderung der DNA. Sie binden in der großen Furche und erhöhen die Effizienz des Ladungstransports, indem sie die Struktur des Polymeren an den Bindungsstellen versteifen[86]. So wird die konformationelle Beweglichkeit der DNA eingeschränkt und der oxidative Ladungstransport erleichtert.

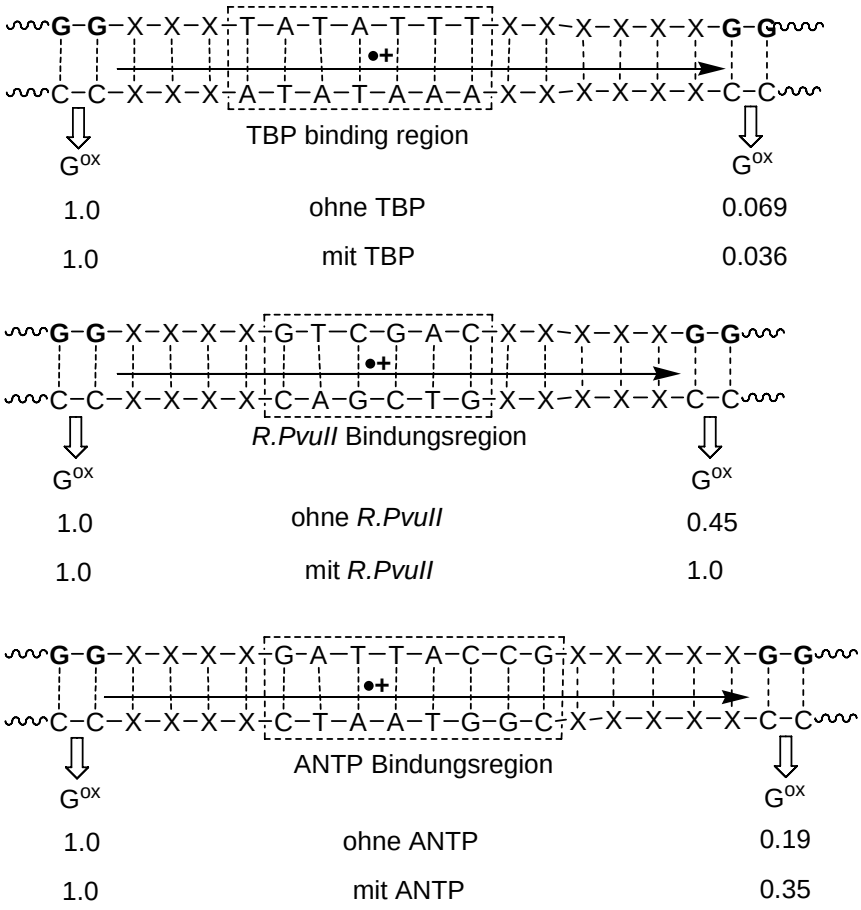


Abbildung 2-7: Vergleich der Ladungstransfereffizienzen in DNA ohne und mit TBP, R. PvuII und ANTP. Die Anzahl der Oxidationsereignisse in 5'-Richtung (Werte normiert gegen Anzahl der $\mathbf{G^{ox}}$-Ereignisse in 3'-Richtung) korreliert mit der Ladungstransfereffizienz ($\mathbf{G^{ox}}$ = Oxidationsprodukte von dG).

2.1.2.2 Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren

Native Nukleinsäuren enthalten mit den natürlichen Nukleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil (dA, dG, dC, dT bzw. dU) nur extrem schwache intrinsische Fluorophore[88]. Die Fluoreszenz der Basen klingt typischerweise innerhalb weniger Pikosekunden ab und liefert nur wenig strukturelle Information, da das Fluoreszenzsignal normalerweise den Mittelwert aller Nukleobasen einer Sequenz darstellt[89-91]. Diese kurze Lebenszeit der Nukleobasen im angeregten Zustand bildet einen zusätzlichen Schutz der Nukleinsäuren vor photochemischen Schädigungen.[92] Im Gegensatz dazu besitzen Proteine mit den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin deutlich effizientere intrinsische Fluorophore.

Durch das Fehlen natürlicher Fluorophore in DNA bietet sich die Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden mit artifiziellen Fluoreszenzsonden an. Deren Emission kann so ohne störende Hintergrundfluoreszenz detektiert werden. Eine geeignete extrinsische Fluoreszenzsonde besitzt eine hohe Quantenausbeute und reagiert sensibel auf ihre mikroskopische Umgebung. Während der Photoanregung sollte sie nicht zu schnell ausbleichen und die beobachtete Struktur bzw. den beobachteten Prozess nicht stören. Die Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren findet eine Reihe von Anwendungen in der Bioanalytik. Durch diese Technik wird teilweise der Einsatz von Radioisotopen-markierten Proben überflüssig. Standardmäßig wird die Fluoreszenzmarkierung zum Beispiel bei der DNA-Sequenzierung[93, 94], der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)[95-98] und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)[99, 100] eingesetzt. Auch die Detektion von Punktmutationen (SNP = *single nucleotide polymorphism*) erfolgt häufig mittels Fluoreszenzmarkierung. Dabei existiert eine Reihe von Systemen.[101-103] Veränderungen in den Fluoreszenzeigenschaften (Intensität, Lebenszeit, Anisotropie) des Fluorophors in freiem und in Komplex-gebundenem Zustand können zur Untersuchung makromolekularer Wechselwirkungen dienen. Dafür wurden Nukleobasen-Analoga v. a. zur Messung von Bindungs- und Gleichgewichtskonstanten verschiedener Molekülinteraktionen mit Nukleinsäuren[104-112], zur Aufklärung von Faltungsprozessen[113-115] und zur Untersuchung des Energie-[116, 117] und Ladungstransfers[73, 118] durch DNA genutzt.

2.1.2.3 Untersuchung des Ladungstransfers in DNA

Das Ziel verschiedener experimenteller und theoretischer Studien der letzten Jahrzehnte bestand darin, die elektronischen Eigenschaften von DNA zu erforschen. Motiviert waren diese Untersuchungen durch die biologischen Folgen von Redoxprozessen in der DNA. Das Hauptaugenmerk der meisten Forschergruppen lag dabei auf der Erforschung der Wanderung von Ladungen durch den Basenstapel.

Für das Redoxverhalten der einzelne Nukleobasen wurde festgestellt, dass sich in der Rangfolge dG > dA > dC ≈ dT dG am leichtesten oxidieren und dT (und dC) am leichtesten reduzieren lassen.[69, 119, 120]

Die meisten Arbeitsgruppen arbeiten mit photochemischen oder photophysikalischen Systemen, um eine wandernde radikalische Ladung in der DNA zu erzeugen. Dafür wird in der Regel die DNA mit einer photochemisch anregbaren redoxaktiven Sonde versehen. Diese kann entweder kovalent gebunden sein und/oder interkalieren. Nach der Initiierung des Ladungstransferprozesses durch photochemische oder elektrochemische Methoden werden die ablaufenden elektronischen Veränderungen mit spektroskopischen, elektrochemischen oder biochemischen Mitteln verfolgt.[121]

Obwohl der photoinduzierte Ladungstransfer durch die Anregung eines elektronischen Zustands ausgelöst wird, existiert bis heute keine klare Vorstellung darüber, was mit der Anregungsenergie in Duplex-DNA im Einzelnen geschieht. Führt die zugeführte Anregungsenergie zu einem Ladungstransferprozess, so lässt sich dieser bei geeigneter experimenteller Vorgehensweise verfolgen.

Für den Ladungstransfer in DNA gibt es zwei Möglichkeiten:

- Die DNA wird oxidiert. Ein Elektron wird vom angeregten Molekül- oder Molekülteil aus der DNA aufgenommen und ein Radikalkation, also ein Elektronenloch, entsteht im Basenstapel. Dieses positive Radikal kann während seiner Wanderung durch den π-Stapel mit Molekülen in seiner Umgebung reagieren (z. B. Wasser, Sauerstoff) und führt zu oxidativen Schäden, die potentiell mutagen bzw. kanzerogen sind. Aufgrund der biologischen Relevanz dieses Prozesses beschäftigt sich die Mehrzahl der Studien zum Ladungstransfer in DNA mit dem oxidativen Lochtransfer.

- Die DNA wird reduziert. Ein Elektron wird vom photoangeregten Chromophor an die DNA abgegeben, es bildet sich ein negativ geladenes Radikalanion. Diese Ladung kann durch den Basenstapel wandern. Obwohl der reduktive Elektronentransfer bereits in der Chip- und Nanotechnologie[122-130] verwendet wird und sehr viel über seine Anwendung in der Bioanalytik und der Medizin bekannt ist, fehlen noch detailierte Informationen über das Verhalten von Überschuss-Elektronen in DNA.

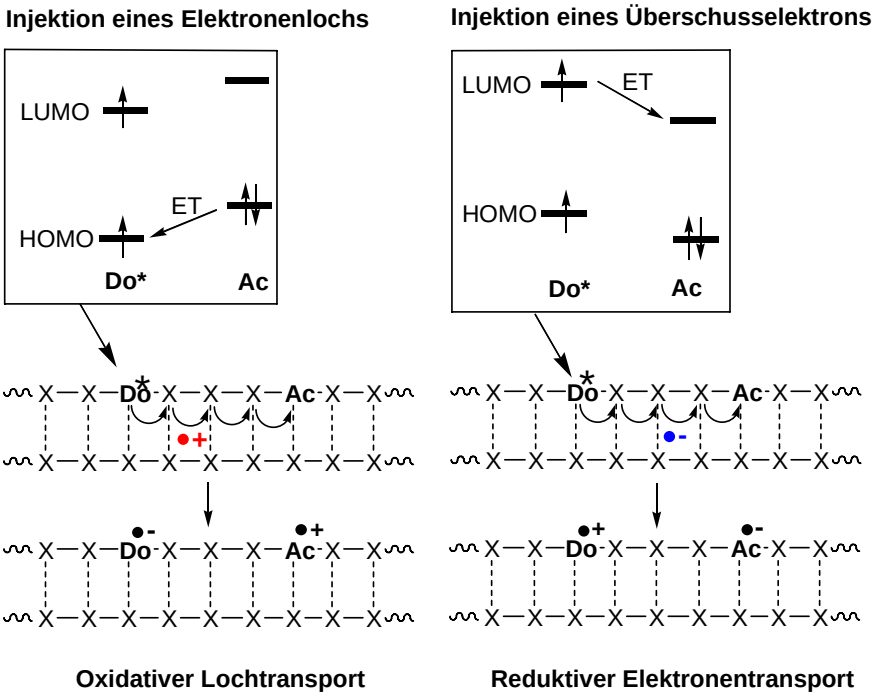
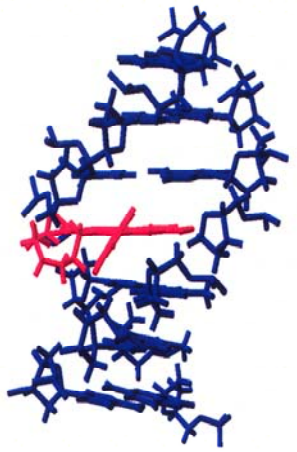


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung des Prinzips des Ladungstransfers in DNA. Beim Lochtransfer nimmt das HOMO des photoangeregten Donors **Do** ein Elektron aus dem HOMO des Lochakzeptors **Ac** auf, die DNA wird oxidiert (*links*); beim Elektronentransfer gibt das LUMO des Elektronendonors ein Elektron an das LUMO des Elektronenakzeptors ab, die DNA wird reduziert (*rechts*).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Oligonukleotide kovalent mit redoxaktiven Sonden zu versehen. Die Art der Anknüpfung hängt dabei von der verwendeten aktiven Gruppe, der gewünschten sterischen Anordnung und der synthetischen Zugänglichkeit des entsprechenden Oligonukleotidbausteins ab.

- Artifizielle Nukleoside sind vollsynthetische Nukleotidanaloga, die über Linkereinheiten in das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat integriert werden können.[17, 24, 25, 29, 131-133] Das redoxaktive Nukleobasenanalogon kann wie eine natürliche Base mit dem Basenstapel wechselwirken und gibt seine Anregungsenergie direkt in den Basenstapel.



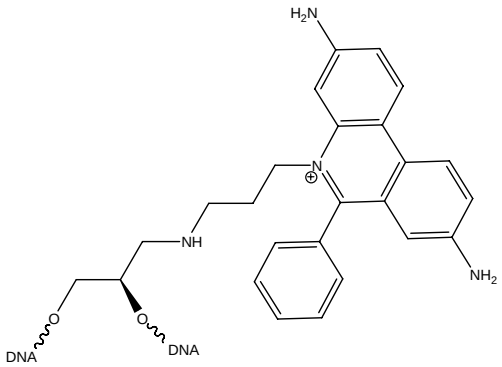
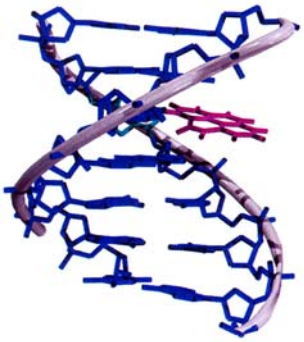


Abbildung 2-9: Das Nukleotidanalogon des Ethidiums in DNA (*links*) und als Strukturformelbild (*rechts*). Der Chromophor interkaliert in den Basenstapel.

- Die Modifikation natürlicher Nukleotide mit redoxaktiven Gruppen kann durch den Einbau bereits vollständig modifizierter Nukleotide (z. B. PydU[27, 31, 32, 134, 135], PydG[27], PtzdU[15]) während der DNA-Festphasensynthese geschehen oder durch chemische Umsetzung von Vorläufermolekülen an der festen Phase (z. B. Py*in*-Nukleotide[23, 33, 34, 136]). Die redoxaktive Gruppe ragt im Idealfall in die große Furche und kann außerhalb des Basenstapels angeregt werden. Die Anregungsenergie wird nicht unmittelbar in den Basenstapel abgegeben.



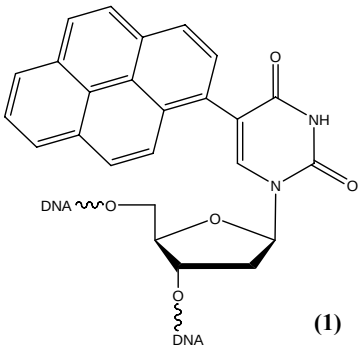


Abbildung 2-10: Pyren-modifiziertes 2'-Desoxyuridin (PydU, **1**) in DNA (*links*) und als Strukturformelbild (*rechts*). Die Pyrengruppe ragt in die große Furche.

- In Haarnadelstrukturen befindet sich die redoxaktive Gruppe über einen Linker kovalent verknüpft zwischen zwei komplementären DNA-Sequenzen. Bildet sich ein Doppelstrang aus, so kommt die reaktive Gruppe auf dem Basenstapel zu liegen. Diese Art der Anknüpfung stellt häufig die synthetisch am leichtesten zu verwirklichende Methode dar.[137-142]
- Für die Anknüpfung eines Interkalators ist es ausreichend, einen DNA-Strang des Duplexes mit der redoxaktiven Gruppe zu versehen.[143, 144] Über die Länge des Linkermoleküls kann die Position der Einlagerung bestimmt werden. Diese Anknüpfung kann terminal am

5'-[145-149] oder 3'-Ende,[150-153] aber auch intern[154-157] über spezielle kommerziell erhältliche Nukleotide erfolgen (vgl. Kapitel 4.5.1).

2.1.2.4 Mechanistische Modelle für den oxidativen Lochtransfer

Für den Ladungstransfer in DNA wurden verschiedene mechanistische Modelle wie der Superaustausch- und der Hopping-Mechanismus vorgeschlagen und teilweise auch durch Experimente bestätigt.[121, 158-161] Nachdem sich zu Beginn der Untersuchungen das Interesse an Ladungstransferprozessen hauptsächlich auf die oxidative Schädigung der DNA konzentrierte, wurde zuerst hauptsächlich der oxidative Lochtransfer untersucht. Mittlerweile ist aber auch einiges über die Mechanismen des reduktiven Elektronentransfers bekannt.

Bei den ersten spektroskopischen Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer wurden alle Ergebnisse gemäß der *Marcus*-Theorie[162] gedeutet. So wurde der Ladungstransfer als Superaustausch beschrieben, in dem die Ladung in einem Schritt vom Ladungsdonor (**D**) zum Akzeptor (**A**) wandert ohne dazwischen jemals auf einer DNA-Base lokalisiert zu sein. In diesem Fall ist die Rate k_{HT} zum einen vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor und zum anderen von β abhängig. Der Parameter β selbst wird durch die Eigenschaften der Brücke **B** auf die Kopplung zwischen **D** und **A** bestimmt. Typische β-Werte liegen bei Proteinen zwischen 1.0-1.4 $Å^{-1}$ [163, 164], für den Lochtransport in DNA bei $\beta < 0.1$ $Å^{-1}$ bis $\beta = 1.5$ $Å^{-1}$.[165, 166]

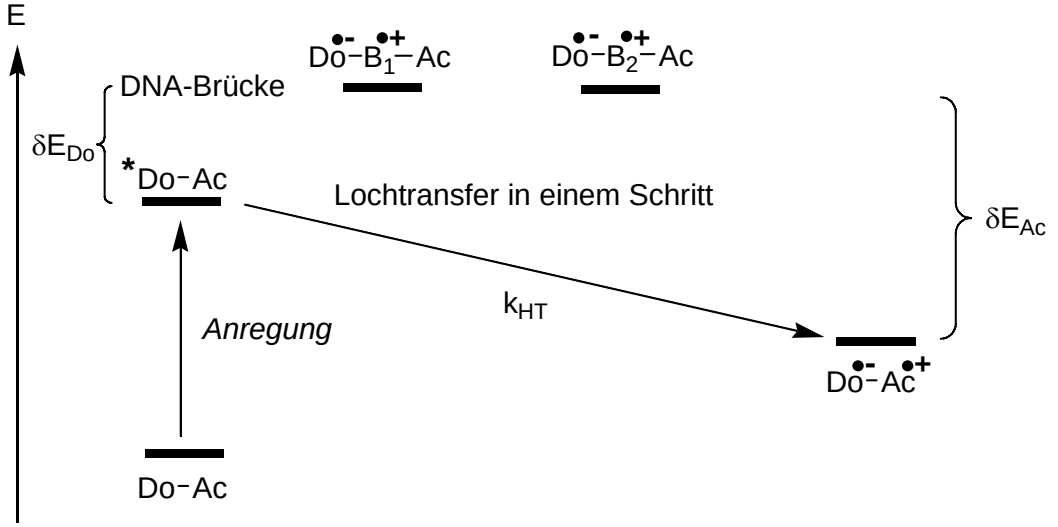


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung des Superaustausch-Mechanismus beim oxidativen Lochtransfer. Die Ladung wird vom Donor zum Akzeptor in einem Tunnelprozess übertragen. Die Abhängigkeit der Ladungstransferrate k_{HT} vom Abstand zwischen **Do** und **Ac** ist hoch. **B** bezeichnet Nukleobasen des dazwischenliegenden Basenstapel.

Die ersten Ladungsdonoren mit denen spektroskopische Untersuchungen des Ladungstransfers gemacht wurden, waren organische und anorganische Interkalatoren, die nicht kovalent an Oligonukleotiden binden. Diese Experimente lieferten nur wenig Information über die Abstandabhängigkeit der Ladungstransferrate, da eine genaue Bestimmung des Abstands zwischen **A** und **D** nicht möglich war. Aufschlussreicher waren Untersuchungsergebnisse, die mit kovalent angeknüpften Interkalatoren erzielt wurden. Diese Experimente ließen eine systematiche Untersuchung der Abstandsabhängigkeit und der Abhängigkeit von der Basensequenz zu. Man stellte fest, dass der Ladungstransfer ein sehr schneller Prozess mit Raten zwischen $k_{HT} = 10^9\text{-}10^{12}\ s^{-1}$ sein kann, und dass die Interkalation von Donor und Akzeptor wesentlich für den Erfolg des Ladungstransports sind. Typische β-Werte liegen hier zwischen 0.6-0.8 $Å^{-1}$.

Die deutlich geringere Distanzabhängigkeit in einigen Experimenten zum langreichweitigen Ladungstransfer machte die Revision des Modells vom Superaustausch erforderlich. Als alternativer Mechanismus wurde das *Hopping* vorgeschlagen.[167] Im Gegensatz zum vorherigen Mechanismus springt beim Hoppingmechanismus die Ladung vom Donor zum Akzeptor über einen intermediären Ladungsträger. In einem oxidativen Lochtransferprozess wäre das Radikalkation des Guanins der wahrscheinlichste intermediäre Ladungsträger, da Guanin im Vergleich mit den anderen natürlichen Nukleobasen am leichtesten oxidiert werden kann.

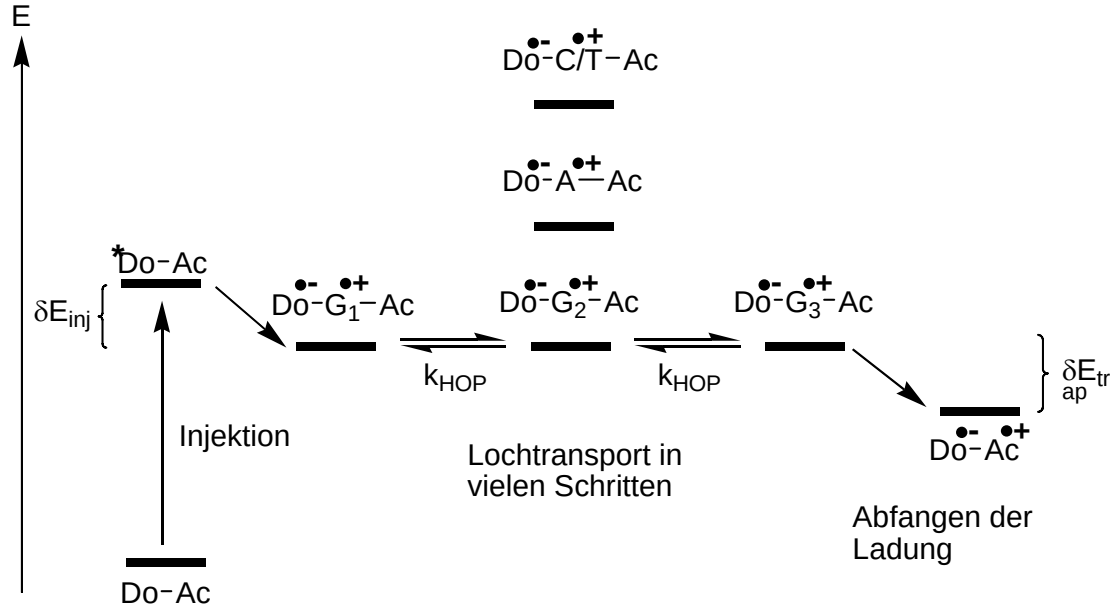


Abbildung 2-12: Schematische Darstellung des G-Hopping-Mechanismus beim oxidativen Lochtransfer. Die Ladung wird vom Donor zum Akzeptor in mehreren Schritten übertragen. Die Abhängigkeit der Ladungstransferrate vom Abstand zwische **Do** und **Ac** ist gering, $k_{HOP} = 5 \cdot 10^7\ s^{-1}$.

Jeder Hoppingschritt selbst stellt einen Tunnelprozess durch dazwischen liegende AT-Paare dar. Beim Hoppingmechanismus ist für die Rate nicht der Abstand zwischen Donor und Akzeptor entscheidend, sondern die Anzahl der dazwischen liegenden Hoppingschritte. *Lewis et al.* konnten die Rate eines einzelnen Schrittes von dG zu GG bestimmen, sie liegt bei k_{HOP}= $5 \cdot 10^7$ s^{-1}.[78]

Allmählich beginnt man, die strenge Unterscheidung zwischen Hopping- und Superaustauschmechanismus nicht mehr als vom System abhängige Eigenschaft des entsprechenden Donor-Akzeptor-Systems zu sehen. Vielmehr scheint es so zu sein, dass in den meisten Donor-Akzeptor-Systemen über kurze Distanzen der Ladungstransfer über einen Superaustausch-Mechanismus erfolgt.[168] Bei größerer Entfernung zwischen Donor und Akzeptor kann dann ein Hopping-Prozess beobachtet werden, dessen einzelne Schritte aus Tunnelprozessen bestehen. Während man anfangs von einem weitgehend statischen System ausgegangen ist, wird nun die Dynamik der Basenstapelung der DNA in die Modelle mit einbezogen. Neuere Studien[70] zeigen, dass ein effizienter Ladungstransfer über eine längere Distanz nur auf einer Zeitskala möglich ist, in der sich auch die Bewegung der Nukleobasen im Basenstapel vollzieht (10-100 ps). Es wird angenommen, dass beide Vorgänge miteinander gekoppelt sind bzw. dass sich der Ladungstransferschritt bis zur nächsten Potentialsenke nur vollziehen kann, wenn sich gerade eine effektive Überlappung der Orbitale der dazwischenliegenden Nukleobasen ausbildet. Dieser Vorgang wird als „*base gating*“ bezeichnet. Dieses revidierte mechanistische Modell gilt gleichermaßen für den reduktiven wie den oxidativen Ladungstransfer in DNA.

2.1.2.5 Bisherige Studien zum oxidativen Lochtransfer

Bei Untersuchungen des oxidativen Ladungstransfers wird oft Guanin als Ladungsakzeptor verwendet. Aufgrund seiner leichten Oxidierbarkeit, die in G-Dubletts und Tripletts sogar noch ausgeprägter ist,[169, 170] eignet sich diese Base als biochemischer Marker. Biochemische Experimente arbeiten mit indirekten Nachweismethoden für den Ladungstransfer in DNA. Da als Vorläufer zahlreicher oxidativer DNA-Schäden das G-Radikalkation ermittelt wurde, basieren diese Methoden auf dem Nachweis seiner Folgeprodukte.

Durch die photochemische oder photophysikalische Oxidation der DNA durch einen geeigneten Ladungsdonor wird dG oxidiert. Das entstehende Radikal kann dann mit H_2O und O_2 reagieren und führt zu oxidierten Produkten von dG (G^{ox}), von denen einige identifziert werden konnten.[79, 80] Derartig behandelte DNA-Stränge lassen sich an der Position der modifizierten Base G^{ox} durch die Behandlung mit Base bei erhöhter Temperatur spalten. Die erhaltenen Fragmente können anschließend über Gelelektrophorese getrennt und über Markierung mit radioaktivem ^{32}P sichtbar gemacht werden.[171]

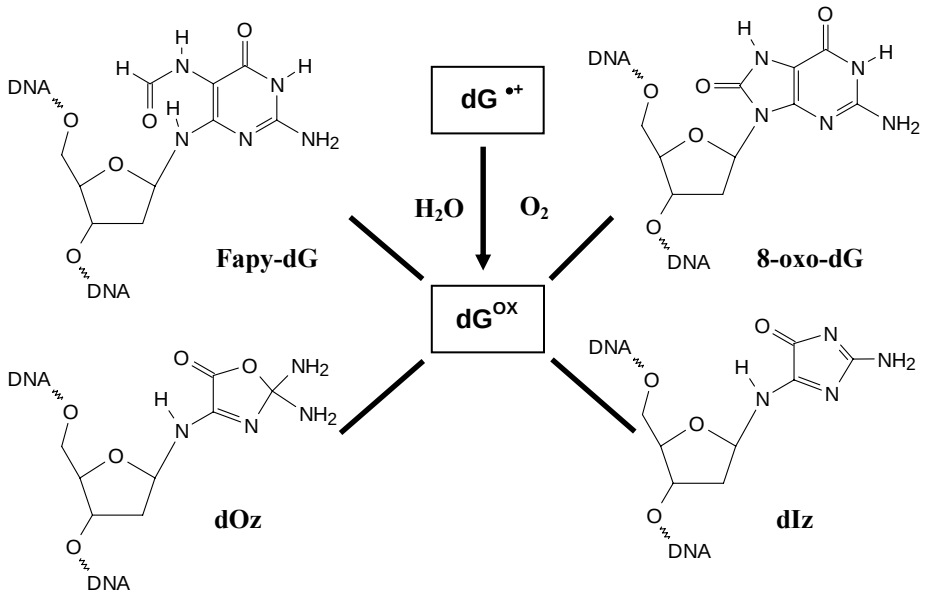


Abbildung 2-13: Schematische Darstellung identifizierter Oxidationsprodukte des Guanins (**dG^{ox}**).
Fapy-dG = Formamidopyrimidin, **8-oxo-dG** = 8-Oxo-Guanin, **dOz** = Oxazolon, **dIz** = Imidazolon

Biochemische Studien

Die gebräuchlichsten Photooxidantien für DNA sind Metallkomplexe von Rh(III)[172] und Rh(II)[59] und organische Interkalatoren wie Derivate des Ethidiums[161] und des Anthrachinons,[173] sowie mit Cyanobenzochinonen modifizierte Uridine[174] und an 4'-Position mit einer photoreaktiven Gruppe versehene Desoxyriboside.[82] Diese Systeme unterscheiden sich grundlegend in ihren strukturellen Eigenschaften, ihren Redoxpotentialen und dem Absorptionsspektrum. Dennoch hat sich in allen Experimenten gezeigt, dass die positive Ladung mit hoher Effizienz bis zu 200 Å transportiert werden kann. Dabei hängt die Ladungstransfereffizienz stark vom Abstand der GC-Paare und der dazwischen liegenden Basensequenz ab. So kann dA als intermediärer Ladungsträger dienen.[82, 175, 176] Dieses A-Hopping kann stattfinden, wenn mindestens vier AT-Basenpaare in der Sequenz zwischen zwei Guaninen liegen.

Im Gegensatz zum G-Hopping ist der Ladungstransfer über dA schneller, effizienter und weniger distanzabhängig, obwohl es sich bei der Oxidation des Adenin durch das Guaninradikalkation um einen endothermen Prozess handelt.

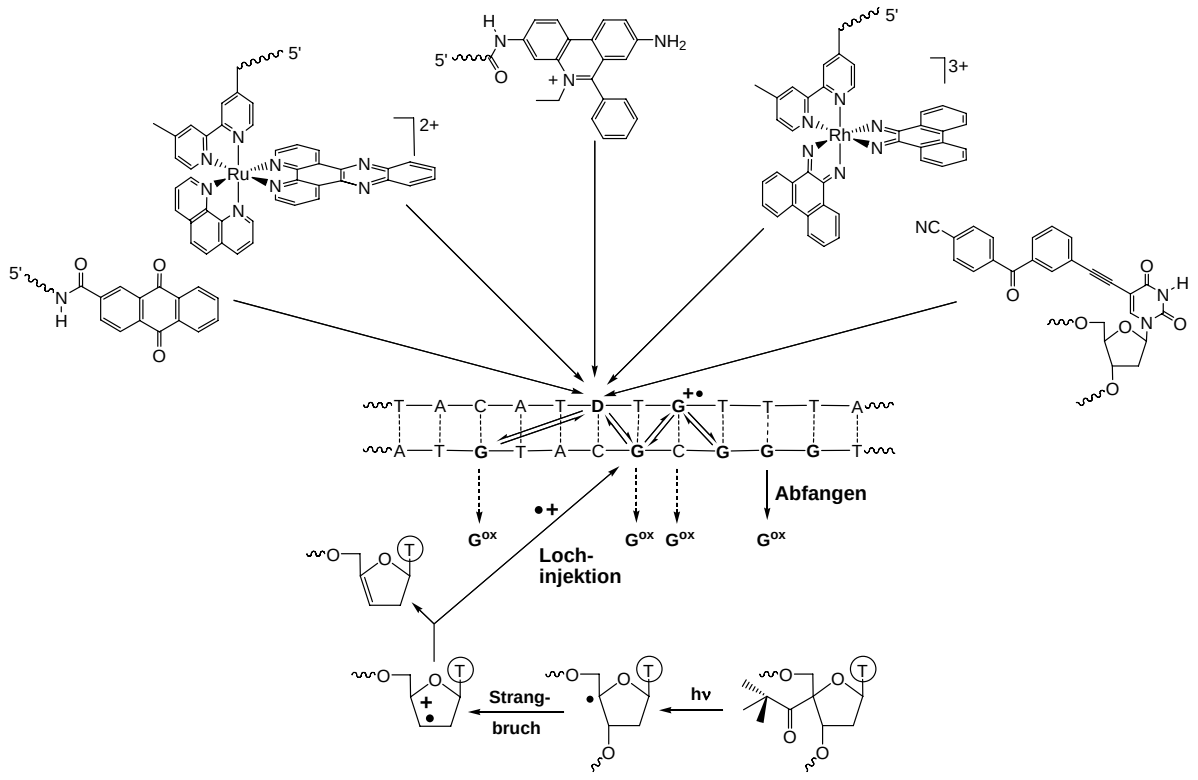


Abbildung 2-14: Übersicht über verwendeten Ladungsdonorsysteme in Studien zum oxidativen Lochtransfer.

Spektroskopische Untersuchungen

Eine Kurzzusammenfassung von spektroskopischen Studien zum oxidativen Ladungtransport findet sich in Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1: Übersicht über wichtige Experimente zum oxidativen Ladungstransfer in DNA

Ladunsdonor / Akzeptor	**β [s^{-1}]**	**k_{CT} [s^{-1}]**	**Arbeitsgruppe**	**Jahr**
E / MV	-	10^5	*Fromherz*[177]	1986
E / MV, Ac / DAP	1.0	10^8	*Harriman*[178]	1992
Ru(II) / Rh(III) Komplexe	0.2	10^9	*Barton*[58]	1993
Ru(II) / Rh(III) Komplexe	1.0-1.5	10^6	*Meade*[179]	1995
St / G	0.64	10^8-10^{12}	*LewisWasielewskii*[139]	1997
E / Rh(III) Komplex	-	10^{10}	*Barton*[180]	1997
Ac / G	1.4	10^5-10^{10}	*Tanaka*[181]	1998
E / Z	-	10^{12}	*Barton/Zewail*[70]	1999
Ap / G	0.1-1.0	10^9-10^{10}	*Barton/Zewail*[182]	1999
Ap / G	0.75	10^6-10^7	*Shafirovich*[183]	2000
Ap / G	0.6	10^9-10^{11}	*Barton/Zewail*[73]	2000
Ac / G, Ac / Z	0.8-2.0	10^7-10^{12}	*Michel-Beyerle*[184]	2001
Py / Ptz	0.2-0.3	10^4	*Majima/Kawai*[185]	2001
Ru(II)Komplex / In	-	$\geq 10^7$	*Barton*[186]	2002
St / Sto	0.4	10^8	*Lewis/Wasielewski*[187]	2004
Et / G	0.4	10^{10}-10^{11}	*Fiebig/Wagenknecht*[188]	2005

Abkürzungen: **A** = Adenin, **Ac** = Acridin, **Ap** = 2-Aminopurin, **DAP** = *N*,*N*'-Dimethyl-2,7-diazapyren, **E** = Ethidium, **G** = Guanin, **In** = 4-Methylindol, **MV** = Methylviologen, **N** = Naphthalin, **St** = Stilbendicarboxamid, **Z** = 7-Deazaguanin, **Py** = Pyren, **Ptz** = Phenothiazin, **STo** = Stilbenether .

2.1.2.6 Der reduktive Elektronentransfer in DNA

Die chemischen Folgen des oxidativen Ladungstransports sind intensiv erforscht, und es existiert eine Reihe von Nachweisverfahren dafür. Für den reduktiven Transfer sind keine Folgerektionen in der DNA unter natürlichen Bedingungen bekannt. Deswegen stand zu Beginn der Erforschung des Ladungstransfers in DNA der oxidative Prozess im Vordergrund. Der reduktive Elektronentransfer wird gegenwärtig in der DNA-Chiptechnologie und Nanotechnologie angewendet.[122-130] Dabei wird die Empfindlichkeit des Ladungstransfers gegenüber Störungen der Integrität des Basenstapels ausgenutzt.

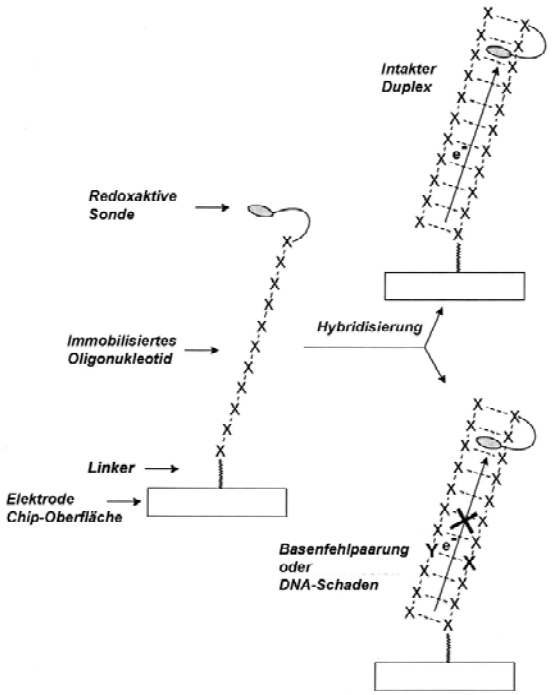


Abbildung 2-15: Prinzip eines DNA-Chips mit elektrochemischem Auslesen. Der Elektronentransfer findet nur statt, wenn ein vollständiger und intakter Duplex gebildet werden kann.

Basenfehlpaarungen oder Basenschäden können den Ladungstransfer unterbinden. Dementsprechend eignet sich der reduktive Elektronentransfer durch DNA für Chips, die elektrochemisch ausgelesen werden können.[73, 189-193] Die Grundidee besteht darin, dass eine interessante DNA-Sequenz, z. B. ein Teil eines mutationsanfälligen Gens, mit einer redoxaktiven Sonde versehen und als Einzelstrang auf einer Trägerelektrode bzw. einem Chip immobilisiert wird. Gibt man nun komplementären Gegenstrang aus einer zu untersuchenden Probe hinzu, so kann Elektronentransfer erfolgen, findet sich keine Komplementär-Sequenz, so findet kein Elektronentransfer statt. Da diese Methode extrem empfindlich auf DNA-Schäden und Fehlpaarungen reagiert, eignet sie sich hervorragend für die Detektion von Punktmutationen (SNP = *singe nucleotide polymorphism*) und Abweichungen in der genetischen Sequenz. Es herrscht großer Bedarf an derartigen Analyseverfahren, z. B. in der Onkologie, der Genetik oder der Virologie, sowie zunehmend in der Pharmakogenetik.

γ-Puls-Radiolyse Studien

Die ersten Erkenntnisse über den reduktiven Elekronentransport in DNA stammten aus γ-Radiolysestudien von *M.D. Sevilla et al.* und *R. F. Anderson et al.*[83, 84, 194]. Dazu wurde native DNA mit verschiedenen Elektronenakzeptorsystemen versehen. Der Ladungstransfer wird durch γ-Bestrahlung initiiert, die Elektronen aus dem wässrigen Lösungsmittel freisetzt. Als Elektronenakzeptoren dienten Interkalatoren wie Acridine, Chinoline[194], Ethidium[84] und andere polykondensierte Aromaten. Durch ESR-Spektroskopie lassen sich sowohl die Abnahme der Signalintensität des primär entstehenden Nukleobasen-Radikalanions als auch die Zunahme des Signals des durch Ladungstransfer entstehenden Interkalatorradikals verfolgen.

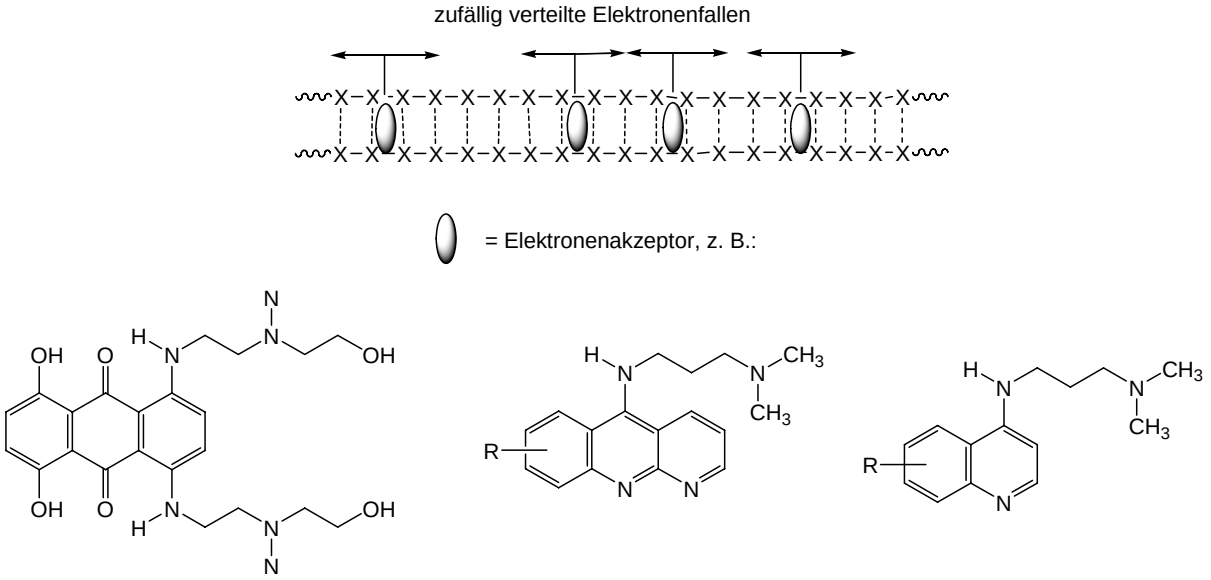


Abbildung 2-16: Typischer Aufbau eines γ-Puls-Radiolyse-Experiments.

Tieftemperaturmessungen DNA-haltiger Gläser belegen einen Tunnelprozeß, wie er durch einen Superaustauschmechanismus beschrieben wird, mit einem β-Wert von 0.8-1.2 $Å^{-1}$. Dieser deckt sich mit theoretischen Berechnungen und liegt im Bereich der Leitfähigkeit von Proteinen. Bei höheren Temperaturen bzw. in Lösung decken sich die gemessenen Transferraten und Reichweiten mit einem *Hopping*-Mechanismus bzw. mit den nach der Dichtefunktionaltheorie berechneten Elektronenaffinitäten der Interkalatoren. Als intermediäre Ladungsträger beim Hopping können sowohl $dC^{\bullet-}$ als auch $dT^{\bullet-}$ auftreten, da das Reduktionspotential von dC und dT sehr ähnlich ist (1.6 V bzgl. NWE, dT: 1.7 V).[119]

Chemisches Abfangen von Überschusselektronen

Von *Carell et al.* wurde ein photochemisches DNA-Experiment vorgestellt, das die durch Licht induzierte Spaltung von Thymindimeren durch Flavin-Derivate aus der Distanz erlaubt.[195, 196] Dafür wurde ein Flavin kovalent als artifizielle Nukleobase in das Oligonukleotid eingebracht. Die Spaltung des Dimers wurde als chemische Folge des reduktiven Elektronentransfers durch den DNA-Basenstapel gedeutet, basierend auf den bekannten Redoxpotentialen des Flavins. Aufgrund des verwendeten Elektronenakzeptors konnte keine charakteristische Abhängigkeit dieser Spaltungsreaktion von der Basensequenz beobachtet werden, da die Spaltung des Thymidindimers den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellte (10^6 s^{-1}).

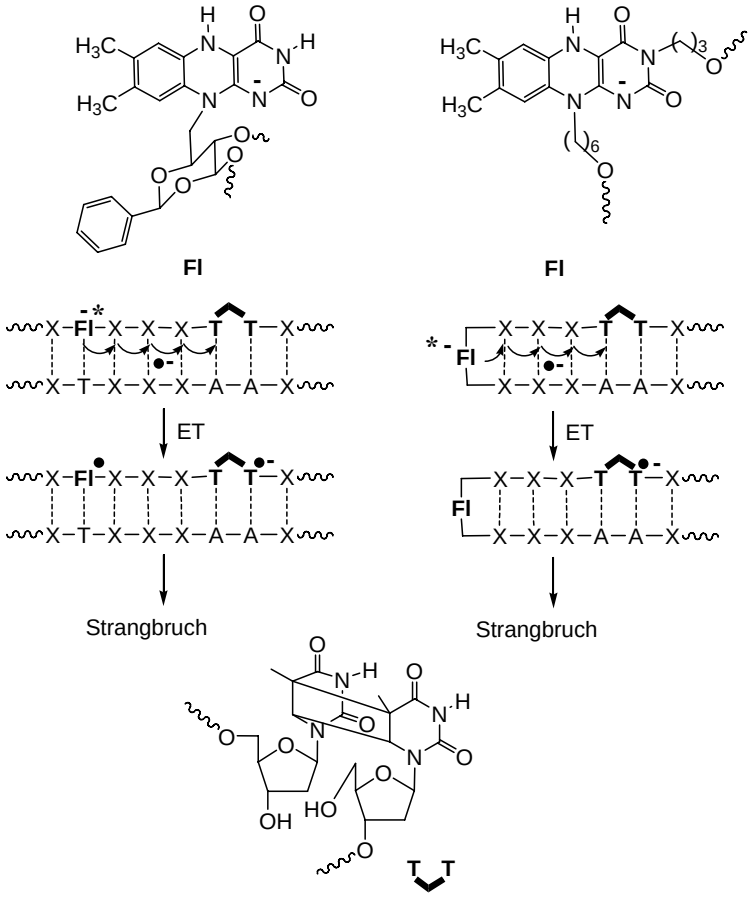


Abbildung 2-17: Spaltung eines Thymidin-Dimers (**T^T**) durch Reduktion mit einem photoangeregten Flavin (**Fl**) aus der Distanz. Die Spaltung der DNA-Läsion ist die chemische Folge eines reduktiven Elektronentransfers (ET).

Die Arbeitsgruppe *Rokita*[197-200] entwickelte ein System mit einem Naphthalendiamid-Derivat als Elektronendonor und 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) als chemischem Elektronenakzeptor. Dazu wurde das Naphthalendiamid-Derivat kovalent in Oligonukleotide eingebunden. Bei Bestrahlung reduzierte es BrdU, das daraufhin ein Bromidion abspaltete und zu einem basen-

labilen Schaden in der DNA führte. Diese Läsion konnte als Strangbruch nachgewiesen werden. Die Abspaltung des Bromidions verläuft deutlich schneller als der Elektronentransfer (10^{10} s^{-1}). Dementsprechend zeigte sich in diesen Studien eine signifikante Abstands- und Sequenzabhängigkeit für den Elektronentransport. So verminderten GC-Paare die Effizienz des Ladungstransfers deutlich. Als Grund dafür wurde die Protonierung des Cytidinradikalanions angenommen.

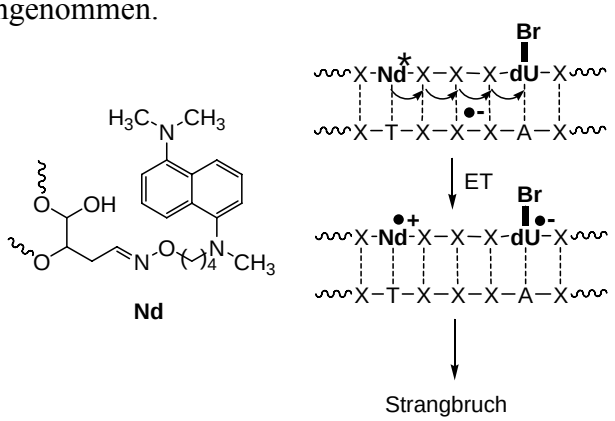


Abbildung 2-18: Strangbruchexperiment von *Rokita et al.* Die Abspaltung des Bromidions aus BrdU ist die unmittelbare chemische Folge eines Elektronentansfers (**Nd** = Naphthalendiamid).

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden Studien mit BrdU als kinetischem Elektronenakzeptor durchgeführt. Wurde 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (PtzdU) als Elektronendonor verwendet, so konnte auch hier gezeigt werden, dass der Elektronentransport über AT-Paare deutlich effizienter verläuft als über GC-Paare.[15]

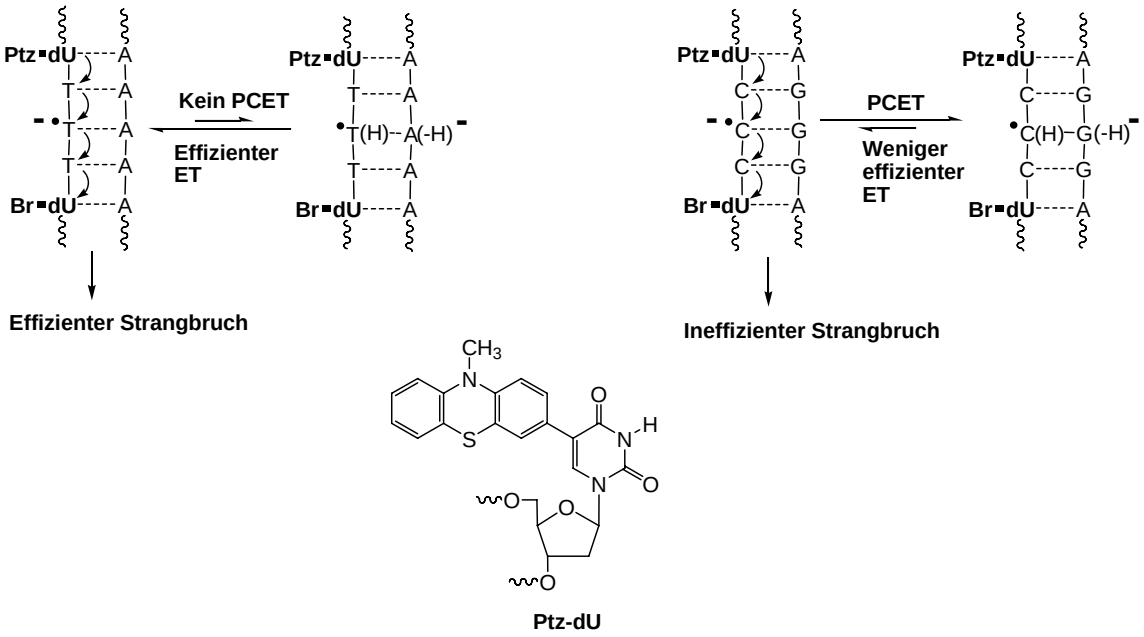


Abbildung 2-19: Strangbruchexperiment mit PtzdU als Elektronendonor. Durch die unterschiedliche Basizität der Radikalanionen $dT^{\bullet-}$ und $dC^{\bullet-}$ findet in AT-Basenpaaren im Gegensatz zu GC-Paaren kein Protonen-gekoppelter Elektronentransfer (PCET) statt.

In vor kurzem veröffentlichten Studien mit 8-Brom-2'-desoxyguanosin (BrdG), 8-Brom-2'-desoxyadenosin (BrdA) und BrdU als Elektronenakzeptoren und Flavin-modifizierten DNA-Haarnadeln konnten *Carell et al.* zeigen, dass sich BrdG und BrdA ebenfalls als kinetische Elektronenakzeptoren eignen, wobei BrdU die höchste Reaktionsgeschwindigkeit zeigte.[201] Sie konnten nachweisen, dass die Elektronentransfereffizienz um 50 % pro GC-Paar nachließ. Zusätzlich wurde eine Abhängigkeit der Elektronentransfereffizienz von der Position des GC-Paars in der zwischen Donor und Akzeptor liegenden Sequenz festgestellt, was darauf hinweist, dass hier das Redoxpotential durch aromatische Wechselwirkungen im Basenstapel beeinflusst wird.

Giese und *Carell et al.* konnten zeigen, dass ein einzelnes in den Basenstapel injiziertes Elektron in der Lage ist, mehr als ein Thymdin-Dimer im selben Duplex zu spalten („*catalytic electron*").[202] Dafür verwendeten sie einen Elektronendonor, der über eine Norrish-Photoreaktion eines tertiären Butylketons an einem Thymidinderivat zu einer Elektronenübertragung auf den Thymidinrest führte.

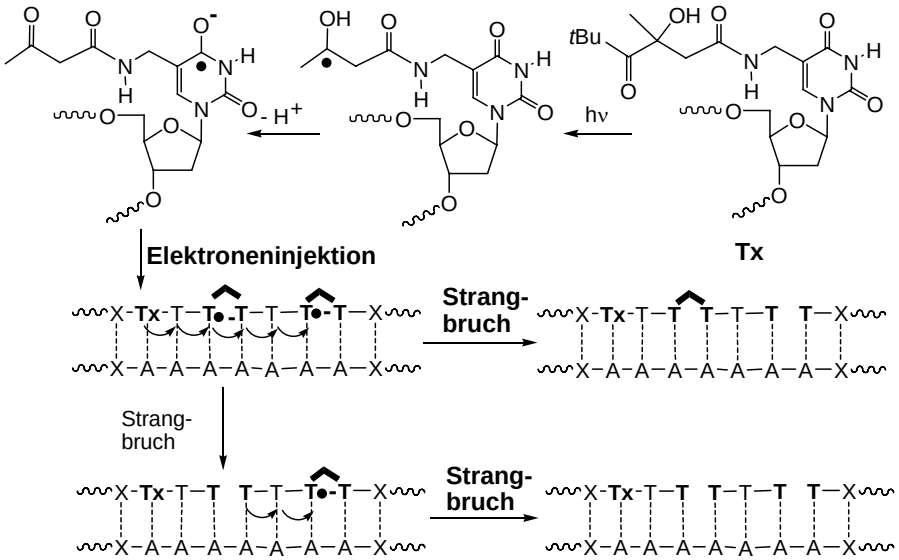


Abbildung 2-20: Schematische Darstellung des Experiments von *Giese und Carell et al.* Ein sog. „katalytisches Elektron" ist in der Lage, mehr als ein Thymidindimer zu spalten (**Tx** = Elektronendonor).

Spektroskopische Studien

Zewail et al. veröffentlichte eine Studie, die mit Femtosekundenspektroskopie 2-Aminopurin-modifizierte DNA-Duplexe untersuchte.[118] Darin zeigte sich, dass 2-Aminopurin bei

photochemischer Anregung je nach entsprechender Umgebung als Elektronendonor oder Akzeptor dienen kann: dG wird oxidiert, dT und dC werden reduziert.

Lewis et al. untersuchte den photoinduzierten Elektronentransfer in DNA-Haarnadeln, die synthetisch durch ein Stilbendiether-Derivat überbrückt waren, das als Elektronendonor diente.[142] Ist dT der Elektronenakzeptor, so sind die Elektroneninjektionsraten deutlich größer (> $2 \cdot 10^{12}$ s^{-1}) als im Fall von dC ($3.3 \cdot 10^{11}$ s^{-1}). Das liefert einen Hinweis auf das niedrigere Reduktionspotential von dT in B-DNA im Vergleich zu dC. Interessanterweise unterscheidet sich die Injektionsrate ein wenig, abhängig ob dC ein dG als Gegenbase enthält oder ein Inosin. Da das GC-Paar eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung verglichen zum IC-Paar aufweist, wird die Rate der Elektroneninjektion in das GC-Paar kleiner als in das IC-Paar ($1.4 \cdot 10^{12}$ s^{-1}). Das zeigt, dass dC ein unterschiedliches Reduktionspotential in Abhängigkeit von der Basenpaarung besitzen kann.

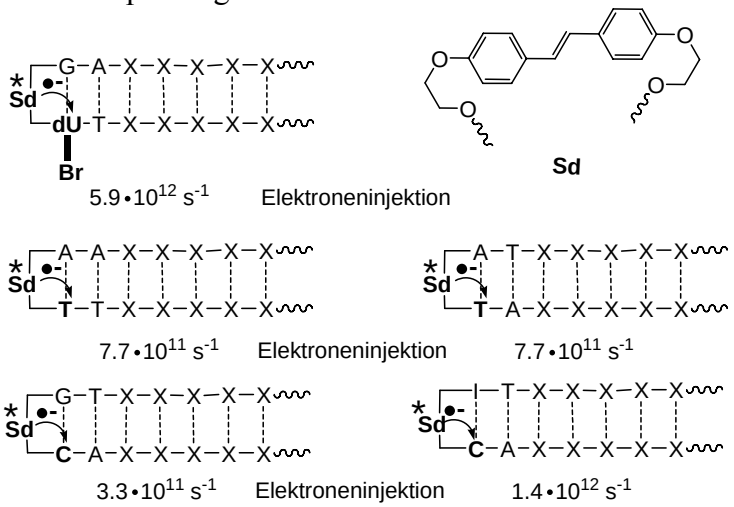


Abbildung 2-21: Elektronentransfer in DNA-Haarnadeln mit Stilbendiethylethern als Ladungsdonoren (**Sd**).

Vor Kurzem veröffentlichte die Arbeitsgruppe *Netzel* Ladungstransferstudien mit 5-(2-pyren-1-yl-ethylenyl)-2'-desoxyuridin (PedU) als Elektronendonor und BrdU als thermodynamischem Elektronenakzeptor.[203] Zu diesem Zweck synthetisierten sie DNA-Haarnadeln, die in ihrem Stamm Donor und Akzeptor enthielten. Die Untersuchung des Ladungstransfers durch Fluoreszenzmessungen zeigte, dass Überschusselektronen sowohl extern über den Pyrenrest in Pyrimidinbasen im Stamm injiziert werden können als auch über die Ausbildung eines ladungsgetrennten Zustands des PedU.

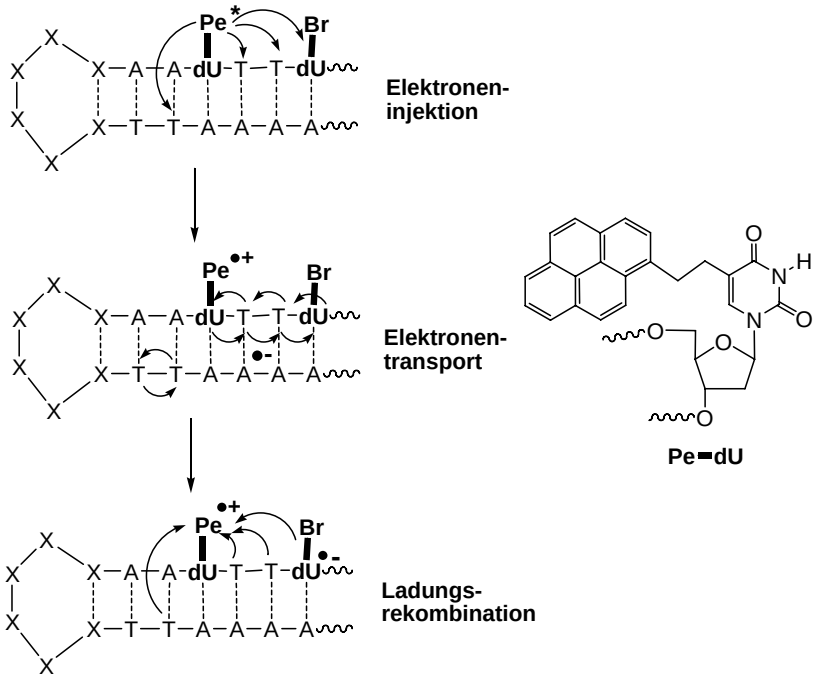


Abbildung 2-22: Ladungstransferstudien von *Netzel et al.* mit PedU. Die kovalente Anknüpfung des Pyrens über einen Ethylenlinker führt zu einer konformationellen Flexibilität, die dazu führt, dass Überschusselektronen sowohl extern über den Pyrenrest injiziert werden können als auch über die Ausbildung eines ladungsgetrennten Zustands des PedU.

Die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konzentrierten sich anfänglich auf 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (PydU) und 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxycytidin (PydC)[22, 26-28, 30-32] als Modellnukleoside für den Elektronentransfer in DNA. Die Anregung der Pyrengruppe mit Licht führt zu einem intramolekularen Elektronentransfer vom Pyren auf die Pyrimidinbase. Dabei entstehen das Pyren-Radikalkation und das Pyrimidin-Radikalanion.

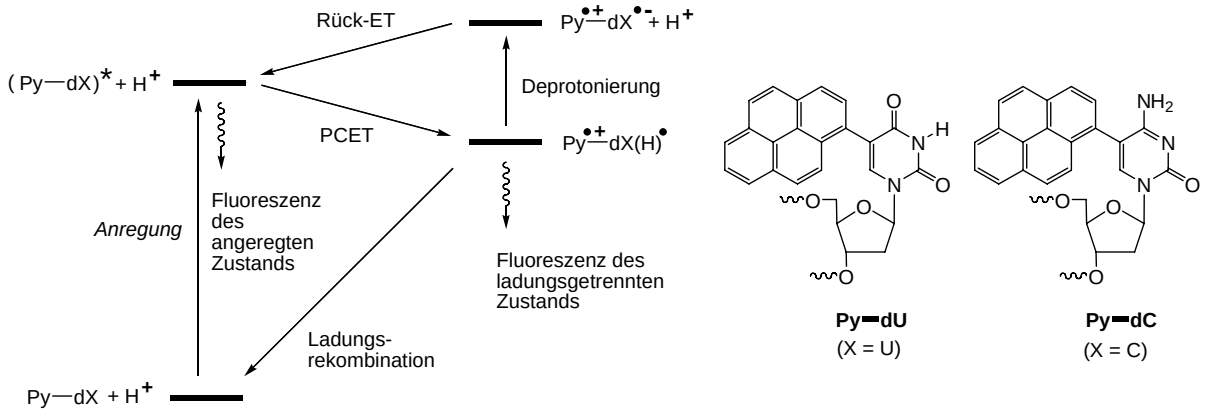


Abbildung 2-23: Intramolekularer Elektronentransfer in PydU und PydC. Photoangeregtes PydX kann durch Fluoreszenz wieder in den Grundzustand zurückkehren, findet aber eine Folgereaktion statt, so wird die Fluoreszenz gelöscht. Aufgrund der unterschiedlichen Basizität der Radikalanionen kommt nur $dT^{\bullet-}$ als intermediärer Ladungsträger in einem Hopping-Mechanismus in Betracht, $dC^{\bullet-}$ wird protoniert (PCET = Protonen-gekoppelter ET).

Die Ergebnisse zeigten, dass die unterschiedliche Basizität der erzeugten Radikalanionen einen wichtigen Faktor in Bezug auf die Ladungstransfereigenschaften darstellt. Der pK_a-Wert des protonierten $Py^{\bullet+}$-dU(H)$^{\bullet}$-Biradikals wurde durch Fluoreszenztitration zu 5.5 bestimmt. Weder Wasser noch die komplementäre Nukleobase A können dieses Radikalanion protonieren. Im Gegensatz dazu konnte das unprotonierte Radikalanion $Py^{\bullet+}$-$dC^{\bullet-}$ in wässriger Lösung überhaupt nicht nachgewiesen werden. Da die Verhältnisse in Wasser ähnlich sind wie innerhalb der DNA, kann von einer sofortigen Protonierung des C-Radikalanions im Duplex ausgegangen werden. Ein derartiger Protonierungsprozess beschränkt oder unterbindet die Elektronenwanderung durch den Basenstapel. Aus diesem Grund kommt $dC^{\bullet-}$ im Gegensatz zu $dT^{\bullet-}$ nicht als intermediärer Ladungsträger für einen reduktiven Hopping-Prozess in Betracht. Durch die systematische Untersuchung des Einflusses der Basenumgebung des PydUs auf die Fluoreszenzeigenschaften konnte gezeigt werden, dass tatsächlich ein Elektron aus dem gebildeten Radikalanion des photoangeregten PydU in den Basenstapel abgegeben werden kann. Das führt zu einer Löschung der Fluoreszenz des photoangeregten Pyrens, die besonders stark auftritt, wenn dem PydU ein dT oder dC benachbart ist. Das Auftreten eines ladungsgetrennten Zustands und der Elektronentransfer auf die nächste Base wurden durch zeitaufgelöste Femtosekunden-*Pump-Probe*-Laser-Spektroskopie bestätigt.

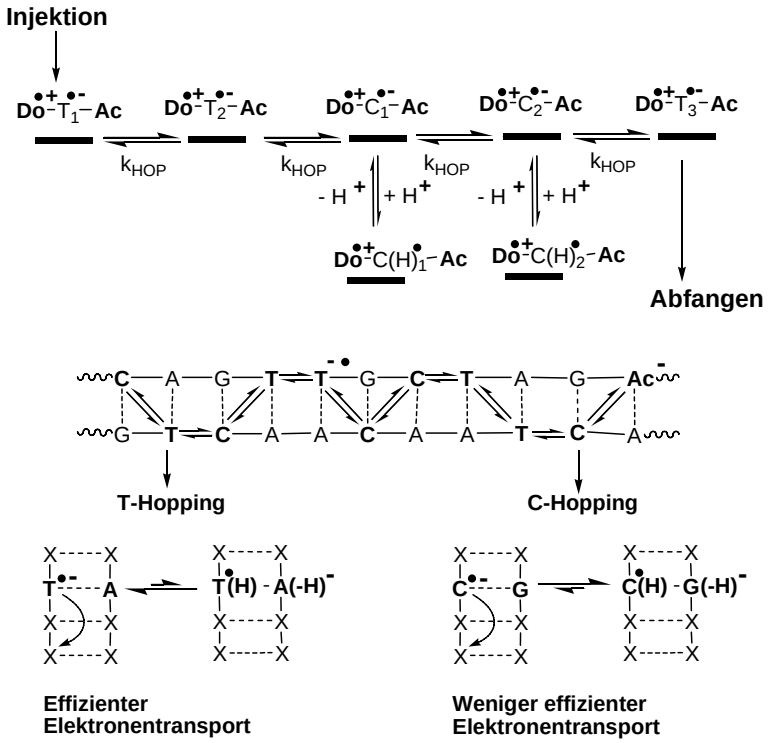


Abbildung 2-24: Zusammenfassung der Prozesse bei reduktiven Elektronentransfer. Die durch den Elektronendonor **Do** injizierte Ladung kann vom Elektronenakzeptor **Ac** abgefangen werden. Der Ladungstransfer verläuft über einen Hopping-Mechanismus und lässt sich spektroskopisch oder chemisch verfolgen. Als intermediäre Ladungsträger dienen $dT^{\bullet-}$ und $dC^{\bullet-}$, die sich in ihrer Basizität unterscheiden. Mit $dC^{\bullet-}$ findet ein Protonen-gekoppelter Elektronentransfer (PCET) statt, der weniger effizient verläuft als der Elektronentransfer über $dT^{\bullet-}$.

2.1.2.7 Verwendete Systeme

Auf dem Gebiet des reduktiven Elektronentransfers in DNA existiert noch großer Forschungsbedarf. Als geeignete Fluoreszenzsonden zur Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers haben sich in unserer Arbeitsgruppe Pyren-modifizierte Nukleoside bewährt. Die Synthese aller vier modifizierten DNA-Basen ist mittlerweile veröffentlicht.[27] Pyren eignet sich als photoreaktive Gruppe durch seine hohe Fluoreszenzquantenausbeute und die Möglichkeit der selektiven Anregung (bei ca. 340-360 nm) ausserhalb der Absorptionsbanden der Nukleobasen.

Photoangeregtes Pyren kann sowohl ein Elektron einer Purinbase (z. B. $E^0(G^{\bullet+}/G) \approx 1.3$ V)[119] aufnehmen ($E^0(Py/Py^{\bullet-}) \approx -2.1$ V)[204] als auch ein Elektron an eine Pyrimidinbase ($E^0(T/T^{\bullet-}) \approx -1.4$ V)[205] abgeben ($E^0(Py^{\bullet+}/Py) \approx 1.28$ V).[204] Die Anregung kann durch Fluoreszenz relaxieren oder zum Ladungstransfer führen. Je nach Umgebung des modifizierten Nukleotids kann nun ein Ladungstransfer auf eine Nachbarbase stattfinden. Makroskopisch wird dieser Prozess als Löschung der Fluoreszenz sichtbar. Zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen eignen sich am besten PydU für den reduktiven Elektronentransfer und PydG für den Lochtransfer.

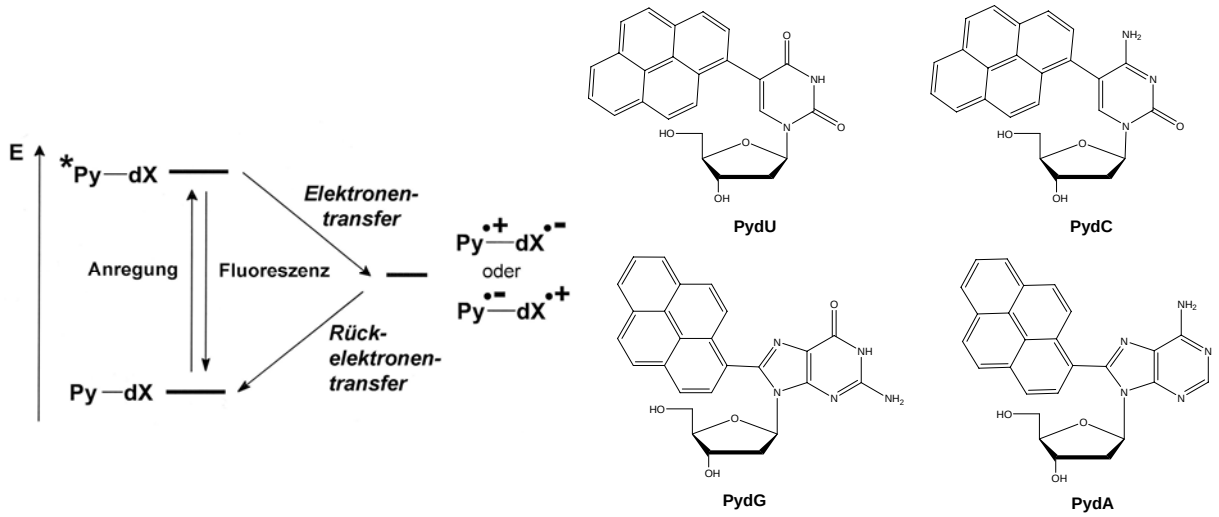


Abbildung 2-25: Schematische Darstellung aller vier PydX-Nukleoside und ihrer Anregung. Bei PydU und PydC wird das Radikalanion des Pyrimidins erzeugt, das potentiell einen Elektronentransfer in die DNA bewirkt. Bei PydG und PydA wird das Radikalkation des Purins generiert, das zu einem Lochtransfer in DNA führen kann.

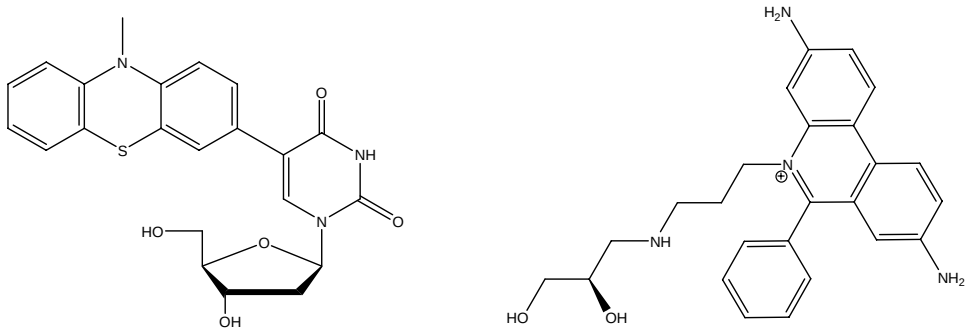
Mithilfe der *Rehm-Weller*-Gleichung[206, 207] lässt sich anhand der Redoxpotentiale abschätzen, in welche Richtung der Ladungstransfer verläuft. Dabei gilt:

$$\Delta G = e\left[E_{ox}(D) - E_{red}(A)\right] - E_{00} + C \qquad \text{(Gleichung 2.11)}$$

mit: ΔG : freie Enthalpie
e : Elementarladung
$E_{ox}(D)$: Oxidationspotential des Elektronendonors **D**
$E_{red}(A)$: Reduktionspotential des Elektronenakzeptors **A**
E_{00} : Energie des HOMO-LUMO-Übergangs des Donors
C : Coulombenergie, *hier*: näherungsweise = 0

Die Bestimmung der Redoxpotentiale der modifizierten Nukleotide bzw. der natürlichen Nukleotide in DNA ist experimentell schwierig, da sie durch die starke Wechselwirkung aller Nukleobasen untereinander von der bestehenden DNA-Sequenz abhängen. Somit liefern isoliert betrachtete Redoxpotentiale der Nukleotide nur einen Anhaltspunkt für die erfolgenden Redoxvorgänge, der tatsächliche Ablauf zeigt sich aber erst im Experiment.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den Pyren-modifizierten Nukleosiden auch Phenothiazin-modifiziertes Desoxyuridin (PtzdU)[15] und das Nukleosidanalogon des Ethidiums (E)[24, 25, 29] verwendet.



PtzdU **E**

Abbildung 2-26: Die modifizierten DNA-Bausteine PtzdU und das Ethidiumnukleosid. Mit PtzdU lässt sich der reduktive, mit E der oxidative Ladungstransfer in DNA induzieren.

Phenothiazin besitzt im angeregten Zustand ein Reduktionspotential von $E^0(Ptz^{\bullet+}/Ptz^*) \approx -2.0$ V.[208, 209] Somit ist es in der Lage, Uridin zu reduzieren. Phenothiazin wurde als Alternative zu Pyren als Chromophor getestet, da sich Letzteres als schwächerer Elektronendonor als aufgrund der Redoxpotentiale erwartet herausstellte.[22, 28] Bislang wurde es als Ladungsakzeptor in Versuchen zum oxidativen Lochtransfer in DNA verwendet.[210-214] Als PtzdU dient es nun der Initiation des reduktiven Elekronentransfers.

Das Ethidiumnukleosidanalogon kann als Lochdonor ($E^0(E^{2+\bullet}/E^+) \approx 1.2$ V)[215] in DNA dienen. Dabei ist photoangeregtes Ethidium nicht in der Lage, dG zu oxidieren. Erst wenn ein Lochakzeptor mit einem niedrigeren Oxidationspotential bereitgestellt wird wie z. B. 7-Deazaguanin ($E^0 \approx 1.0$ V)[215] kann ein Ladungstransfer stattfinden. Mit Ethidium lässt sich jedoch auch ein Elektronentransfer induzieren, wenn ein entsprechend reduzierender Elektronenakzeptor angeboten wird. Ähnlich wie Pyren besitzt Ethidium eine hohe Grundfluoreszenz, die bei ca. 520-540 nm angeregt werden kann. Der Ladungstransfer lässt sich wiederum anhand der ausbleibenden Fluoreszenz beobachten. Durch die abweichende Struktur und die anderen elektronischen Verhältnisse bietet sich ein Vergleich des Fluoreszenzverhaltens in Anwesenheit von Quenchern zwischen Pyren-modifizierten Oligonukleotiden und Ethidium-haltiger DNA an. Somit erhält man ein umfassendes Bild von den Ladungstransferprozessen bei unterschiedlichen Bedingungen.

2.1.3 Ladungstransfer zwischen Oligonukleotiden und Peptiden

2.1.3.1 Biologische Relevanz

Der Schutz und die Übersetzung der Erbinformation in der Zelle sind von fundamentaler Bedeutung in der Biologie. Eine entscheidende Rolle bei der Erkennung, Behebung und Prävention von DNA-Schäden, sowie bei der Steuerung der Transkription spielen dabei DNA-bindende Proteine. An vielen dieser Protein-DNA-Interaktionen sind vermutlich auch Ladungstransferprozesse zwischen den Proteinen und der DNA beteiligt.

Bislang ist es eine offene Frage der Zellbiologie, wie Proteine das Genom überprüfen und nach schadhaften Stellen absuchen. Mittlerweile existieren zahlreiche Modellvorstellungen darüber. Einige gehen davon aus, dass Ladungstransferprozesse in der DNA und zwischen den Proteinen und den Nukleinsäuren bei der Funktionsweise der Reparaturproteine eine zentrale Rolle spielen.[71] Ein hypothetisches mechanistisches Modell besteht darin, dass die Überprüfung des Genoms mithilfe zweier kooperierender redoxaktiver Proteine funktioniert, die entlang der DNA-Helix wandern. Findet zwischen ihnen ein Ladungstransfer durch den Basenstapel statt, so handelt es sich um einen intakten DNA-Abschnitt. Durch die erfolgreiche Oxidation bzw. Reduktion der entsprechenden Komponente, kommt es zu einer Konfor-

mationsänderung, die die Dissoziation des Protein-DNA-Komplexes verursacht. Nach der Freisetzung des Proteins aus dem ursprünglichen Komplex und der Rückreaktion zur aktiven Form kann das Protein an einer anderen Stelle der DNA erneut binden und gegebenenfalls an einer weiteren Redoxreaktion teilnehmen. In intakter DNA ist ein Ladungstransfer über längere Distanzen möglich. Störungen in der DNA-Struktur behindern den Ladungstransfer, was dazu führt, dass das Protein bei seiner Wanderung entlang des Duplexes nicht mehr abdisozieren kann, sobald die Redoxreaktion mit seinem Partnerprotein unterbleibt. So markiert es die Umgebung der schadhaften DNA-Stelle. Dieser Protein-DNA-Komplex kann von anderen Proteinen erkannt werden und löst den Reparaturmechnismus der Zelle aus. Ein Zyklus aus Bindung-Redoxreaktion-Ladungstransfer-Dissoziation-Rückreaktion stellt somit eine sehr effektive Art der Genomüberprüfung dar.

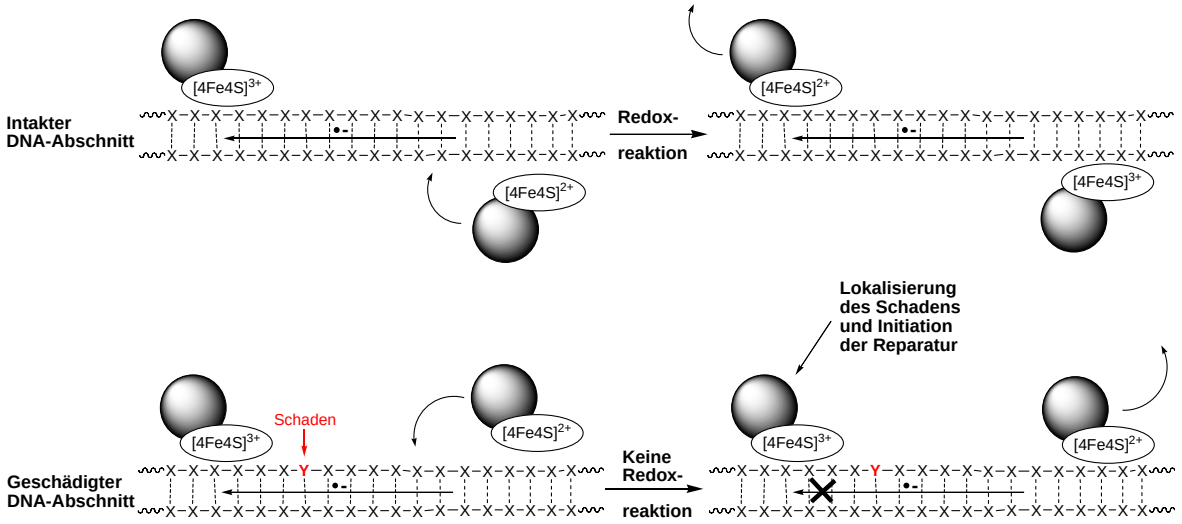


Abbildung 2-27: Hypothetischer Mechanismus der Überprüfung von DNA auf Unversehrtheit mittels redoxaktiver Proteine.

Es gibt zahlreiche Beispiele für DNA-Reparaturenzyme, die redoxaktive Cofaktoren besitzen. Ein sehr bekanntes Beispiel dafür ist die Photolyase.[216] Sie bewirkt die Reparatur von Thymin-Dimeren, indem sie den reduzierten Cofaktor $FADH^-$ als Elektronenquelle nutzt.[217]

Weitere Beispiele sind die Enzyme Endonuklease III (Endo III) und MutY, die fehlerhafte Basen aus der DNA-Sequenz ausschneiden. Beide Proteine enthalten $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Cluster, die sich in der Nähe der vermuteten DNA-Enzym-Bindungsstelle befinden.[218-220] Eisen-Schwefel-Cluster sind weit verbreitet und dienen häufig als Elektronenquelle bei biologischen Redoxprozessen.[221] Mittlerweile gelang es, durch Lochtransfer in der DNA das DNA-gebundene MutY zu oxidieren. Dabei ermöglicht die Bildung des Guaninradikalkations die Oxidation des Proteins. Liegt das Protein in Lösung vor, läßt sich der $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Cluster nicht oxi-

dieren. Erst durch die Bindung an DNA wird dies möglich.[222] Dass es bei diesem Redoxprozess zu einer Änderung der Konformation kommt, ist nicht unwahrscheinlich. Man weiß von MutY, dass es auch ohne den $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Cluster aus der denaturierten Form in eine der natürlichen Form sehr ähnliche stabile Konformation rückfalten kann.[223] Gerade die Tatsache, dass die Rolle dieses redoxaktiven Bestandteils der Enzyme bezüglich der Struktur nicht ganz geklärt ist, macht sie so interessant in Hinblick auf den Ladungstransfer zwischen Proteinen und DNA.

Neben der Reparatur von DNA wird auch die Regulation der Transkription von proteinvermittelten Redoxprozessen gesteuert. Oft hängt die Transkription von den Redoxzuständen der beteiligten Proteine (SoxR, FNR)[224-226] ab. Redoxsensitive Bindung wird auch bei anderen Transkriptionsfaktoren beobachtet (Jun/Fos, CREB/ATF, p53, NF-Y und Nf-κB), die häufig mit einen Thiol-Disulfid-Austausch gekoppelt wird.[227] Zudem ist bekannt, dass die Transkription durch redoxaktive DNA-Reparatur-Enzyme wie die apurinische Endonukleose (AP-Endo)[228] verlangsamt wird.

2.1.3.2 Bisherige Studien zum Ladungstransfer zwischen Peptiden und DNA

Bislang erfolgte noch keine umfangreiche systematische Erforschung von Ladungstransferprozessen zwischen Peptiden und DNA. Die meisten dieser Studien, die als Vorarbeiten zu diesem Thema gelten können, arbeiten entweder mit großen Protein-DNA-Komplexen, bei denen der Ladungstransfer als mechanistisches Detail eruiert und die beteiligten Aminosäuren identifiziert werden konnten oder beschäftigen sich hauptsächlich mit der Entwicklung neuer Donor-Akzeptorsysteme für den Ladungstransfer in DNA.

Verschiedene Fragen sind noch ungeklärt:

- Wie effizient sind Ladungstransferreaktionen an der Schnittstelle von Peptiden und Oligonukleotiden?
- Welche strukturellen Parameter (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen, Interkalation aromatischer Aminosäureseitenketten) bestimmen die Transfereffizienz?
- Welche Aminosäuren beteiligen sich am Ladungsaustausch?
- Wie weit kann die Ladung aus dem DNA-Stapel in das Peptid wandern?
- Gibt es chemische Folgen des Ladungstransfers an der Kontaktstelle der beiden Komponenten (z. B. *crosslinks*)?

Man weiß, dass DNA-bindende Proteine den Ladungstransfer durch den Basenstapel sowohl positiv wie negativ beeinflussen können (vgl. Kapitel 2.1.2.1).[46] Diese sehr globale Aussage lässt es zumindest zu, aus der Diversität der beobachteten Protein-DNA-Komplexe abzuleiten, dass eine Reihe von Faktoren auf den Ladungstransfer zwischen DNA und Peptiden Einfluss nimmt.

Proteine selbst sind aufgrund ihrer Komplexität und ihrer eingeschränkten Verfügbarkeit und Stabilität keine geeigneten Substrate für eine systematische Untersuchung. Zudem ist die chemische Modifikation mit Ladungsakzeptorgruppen eine synthetische Herausforderung. Aus diesem Grund bietet sich die Verwendung kleiner modifizierter Peptidsysteme an, die synthetisch einfach zugänglich und relativ wenigen intramolekularen Einflüssen unterworfen sind.

In Vorarbeiten der Gruppe *Barton et al.*[229-231] wurden u. a. die kurzen DNA-bindenden Tripeptide Lys-Trp-Lys und Lys-Tyr-Lys[232] als Lochakzeptoren verwendet. Diese Peptide lagern ihre aromatische Seitenkette bevorzugt in AT-reiche Sequenzen ein.[233-241] Es gelang, über einen kovalent an ein Oligonukleotid angeknüpften Lochdonor radikalische Ladung von der DNA auf die aromatische Seitenkette der Peptide zu übertragen. Dazu wurde der interkalierende Ru(II)-Komplex *in situ* mittels der *Flash-Quench*-Technik[64] zum Ru(III)-Komplex oxidiert, der seinerseits Lochtransfer in der DNA induzierte. Sowohl die Bildung von Guaninradikalkationen als auch von Tryptophan- und Tyrosinradikalkationen konnte durch Emissions- und Transientenabsorptionsspektroskopie nachgewiesen werden. Oxidationsfolgeprodukte der beteiligen Radikalkationen wurden mittels Gelelektrophorese und HPLC analysiert.

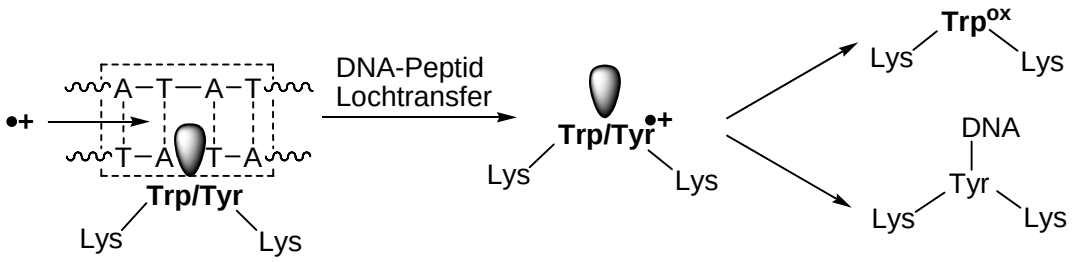


Abbildung 2-28: Schematische Darstellung der Versuche von *Barton et al.* zum oxidativen Lochtransfer in DNA von einem Ru(III)-Komplex zu interkalierendem Tryptophan oder Tyrosin. Ru(III) injiziert ein Elektronenloch im DNA-Basenstapel.

Der Vorteil der *Flash-Quench*-Technik liegt darin, dass keine chemische Modifikation an dem verwendeten Peptid durchgeführt werden muss. So können auch Proteine für die Untersuchungen verwendet werden. Diese Methode wurde in dieser Gruppe auch angewendet, um

gezielt Verknüpfungen zwischen DNA und Peptiden (sog. *crosslinks*) zu erzeugen.[242] Dabei reagieren durch den Ladungstransfer generierte Intermediate der Nukleobasen mit Aminosäureseitenketten.

2.1.3.3 Geplante Experimente

Für die Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Oligonukleotiden und Peptiden bieten sich prinzipiell zwei Vorgehensweisen an:

- Durch nicht kovalente Bindung von modifizierten Peptiden an DNA lassen sich Sättigungswerte für die Ladungstransfereffizienz ermitteln.
- Durch die kovalente Anknüpfung eines Akzeptor-modifizierten Peptids an Donor-substituierte Oligonukleotide kann die Distanz- und Sequenzabhängigkeit des Ladungstransfers zwischen den beiden Komponenten untersucht werden.

Die Verwendung sequenzspezifischer, nicht kovalent bindender Peptide[243-250] bzw. die Integration von Peptidbindungsstellen innerhalb einer Oligonukleotidsequenz stellen eine Kombination beider Untersuchungsverfahren dar, da in diesen Fällen bei geringer Peptidkonzentration eine spezifische Bindung vorliegt, die bei steigender Konzentration in eine unspezifische übergeht.

Für die Markierung von Oligonukleotiden steht eine Reihe verschiedener redoxaktiver und fluoreszenter Nukleotide zur Verfügung. Ein Ladungstransfer von der DNA auf das Peptid zeigt sich im einfachsten Fall in einer Löschung der Fluoreszenz des modifizierten Nukleotids. Um die Effizienz des Ladungstransfers zu erhöhen, wird eine zweite redoxaktive Gruppe am Peptid angebracht.

Im Rahmen dieser Arbeit wird mit Elektronenakzeptor-modifizierten Peptiden gearbeitet. Als redoxaktive Gruppen kommen dafür Derivate des Methylviologens (**MV^{2+}**) und der *para*-Nitrobenzoesäure (**pNB**) in Frage. Es wird der reduktive Elektronentransfer von einem modifizierten Nukleotid auf das derivatisierte Peptid untersucht. **pNB** und **MV^{2+}** besitzen ein hinreichend starkes Reduktionspotential ($E^0(MV^{2+}/MV^{\bullet+}) \approx$ -0.3 V[251], $E^0(pNB/pNB^{\bullet-}) \approx$ -0.46 V)[252, 253], um sowohl photoangeregtes Ethidium ($E^0(*E^{2+\bullet}/*E^+) \approx$ -0.8 V)[180] als auch das Pyrenradikalanion (E^0 $(Py/Py^{\bullet-}) \approx$ -2.1 V) und Pyrimidinradikalanionen ($E^0(T/T^{\bullet-}) \approx$ -1.9 V, E^0 $(C/C^{\bullet-}) \approx$ -1.8 V)[205] zu oxidieren.

Es ist geplant, nach entsprechenden Vorversuchen mit nicht peptidisch gebundenen Elektronenakzeptoren Fluoreszenztitrationen mit verschiedenen modifizierten DNA-Oligomeren und Peptiden durchzuführen. Bei den Studien werden diverse **pNB**-modifizierte Oligopeptide verwendet, die unspezifisch und spezifisch an DNA binden.
Der Elektronentransfer lässt sich nicht nur fluoreszenzspektroskopisch, sondern ebenso über chemische Folgereaktionen untersuchen. Auch in diesem Fall können modifizierte Peptide Einfluss nehmen. Diese Untersuchungen der bestrahlungsinduzierten Strangbruchreaktion bilden einen zweiten Schwerpunkt.
Den Abschluss der Studien zum Ladungstransfer zwischen DNA und Peptiden bildet die Synthese und Charakterisierung von modifizierten Peptid-DNA-Konjugaten, bei denen durch die kovalente Verknüpfung von Oligonukleotiden und Peptiden Informationen über die Abstandsabhängigkeit erhalten werden sollen.

2.1.4 Chiroptische Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit ist die chiroptische Spektroskopie das wichtigste Mittel zur Bestimmung der Struktur von Oligonukleotiden. Sie ermöglicht die Verfolgung von Strukturänderungen in Oligonukleotid-DNA-Komplexen und liefert somit eine wertvolle Ergänzung zu den spektroskopischen Untersuchungsmethoden.

2.1.4.1 Grundlagen

Optische Phänomene [254-259]

Der chiroptischen Spektroskopie optisch aktiver Verbindungen liegen zwei Phänomene zugrunde: Die *zirkulare Doppelbrechung* und der *Zirkulardichroismus*. Der Zirkulardichroismus beschreibt das Vorhandensein unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$). In einem Dichrographen wird dafür abwechselnd links und rechts zirkular polarisiertes Licht durch die Probe geschickt. Gemessen wird die Differenz der Absorption ($\Delta A = A_L - A_R$) in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Aus histo-

rischen Gründen wird die Größe des CD-Effekts oftmals als molare Elliptizität ($\Theta_\lambda = \frac{\Theta_{obs} \cdot M}{10 \cdot lc}$) angegeben, da frühe Dichrographen die Exzentrizität der Ellipse statt der Absorptionsdifferenz ermittelten. Beide Größen sind einfach ineinander umzurechnen ($\Delta A = \Theta/3298$).

CD-Banden lassen sich nur bei Wellenlängen beobachten, wo auch eine Absorption auftritt. Dabei muss nicht jede Absorptionsbande eine CD-Bande erzeugen. Die Signalintensitäten der beiden Spektrentypen können bei einer Wellenlänge stark unterschiedlich sein: So kann z. B. eine in der Absorption kaum sichtbare Bande einen sehr starken CD-Effekt hervorrufen.

Optische Aktivität [255]

Optische Aktivität ist eine intrinsische Eigenschaft chiraler Moleküle. Chiralität bezeichnet die Abwesenheit einer Drehspiegelachse im Molekül: Bild und Spiegelbild einer Verbindung lassen sich nicht zur Deckung bringen. Die CD- und ORD-Spektren von Enantiomeren verhalten sich entsprechend spiegelbildlich bezüglich der x-Achse der Kurven. Die Chiralität eines Moleküls kann z. B. durch ein einziges asymmetrisch substituiertes Kohlenstoffatom hervorgerufen werden, sie kann aber ebenso durch größere Strukturen wie beispielsweise eine Helix bedingt sein.

Optische Aktivität kann auch durch äußere Faktoren erzeugt werden: So kann beispielsweise ein gerichtetes Magnetfeld über den Faraday-Effekt in symmetrischen Molekülen optische Aktivität bewirken. Dieses Verhalten wird in der magnetisch induzierten ORD- und CD-Spektroskopie genutzt (MORD, MCD).

Ebenso lassen sich intrinsisch chirale Verbindungen in unterschiedlichem Ausmaß von Magnetfeldern beeinflussen, so dass zusätzliche Informationen aus dem Vergleich mit konventionellen ORD- bzw. CD-Spektren gewonnen werden können. So zeigt beispielsweise Tryptophan einen deutlichen Unterschied zwischen seinem CD- und MCD-Spektrum. Durch einfachen Vergleich können die für Tryptophan typischen Banden identifiziert werden, selbst wenn sie in einem der beiden Spektren von anderen Signalen überlagert sind. Mit der gleichen

Methodik lassen sich die Signale von Purinen und Pyrimidinen unterscheiden, da Purine stark, Pyrimidine aber nur schwach von einem externen Magnetfeld beeinflusst werden.

Auch eine asymmetrische elektronische Umgebung kann einen intrinsisch achiralen Chromophor erzeugen. So kann z.B. durch eine sehr feste und spezifische Assoziation eines Chromophors mit einem Protein lokal ein optisch aktiver Komplex entstehen. Dieser Effekt erstreckt sich allerdings typischerweise nicht über mehr als 10 Å. Diese induzierte optische Aktivität lässt sich u. a. für die Bestimmung der Wechselwirkungen in Peptid-DNA-Komplexen nutzen.

Cotton-Effekt [256]

Der Brechungsindex optisch nicht aktiver Verbindungen nimmt mit abnehmender Wellenlänge des einfallenden Lichtes zu. Als Funktion des Brechungsindexes wird der Betrag des Drehwinkels einer optisch aktiven Verbindung ebenfalls größer, der Wert kann jedoch entweder ein positives oder ein negatives Vorzeichen aufweisen. Dieses Verhalten bezeichnet man als normalen ORD.

Im Bereich der Absorptionsbanden der Verbindung wird der normale ORD gestört, hier spricht man vom anomalen ORD. Im Bereich der Wellenlänge des Absorptionsmaximums zeigt die reale ORD-Kurve einen Nulldurchgang. Durchläuft sie dabei bei zunehmender Wellenlänge zuerst ein Minimum und dann ein Maximum, so spricht man von einem positiven, anderenfalls von einem negativen *Cotton*-Effekt.

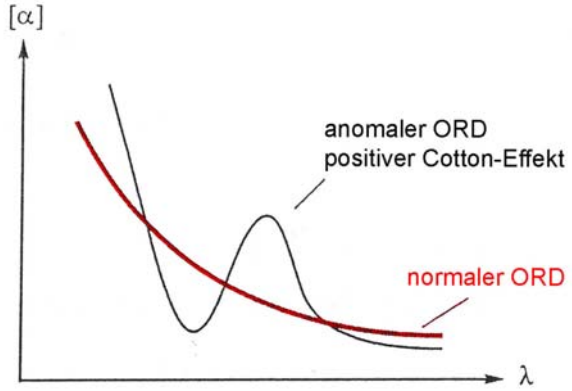


Abbildung 2-29: Schematische Darstellung des positiven Cotton-Effekts im ORD.

Wendet man die *Kronig-Kramers*-Transformation auf eine ORD-Kurve mit positivem *Cotton*-Effekt an, so erhält man eine CD-Kurve, die ein Maximum bei der Wellenlänge des Wendepunktes der ORD-Kurve zeigt (ε_L-ε_R > 0). Bei einem negativen *Cotton*-Effekt im ORD erhält man im CD entsprechend ein Minimum($\Delta\varepsilon$ < 0).

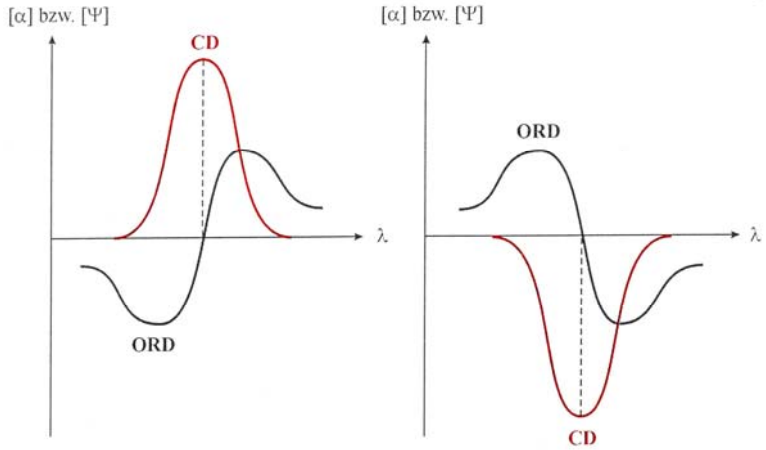


Abbildung 2-30: Darstellung des Zusammenhangs zwischen ORD- und CD-Spektren.
links: ORD mit positivem Cotton-Effekt, *rechts*: ORD mit negativem Cotton-Effekt

Vor- und Nachteile der CD-Spektroskopie [254]

CD und ORD sind die einzigen spektroskopischen Methoden, die direkt auf die Asymmetrie eines Moleküls ansprechen. Somit sind sie bestens geeignet, um Aussagen über die absolute Konfiguration zu machen und weitergehende Strukturinformationen zu liefern.
Obwohl beide Spektrentypen im Grunde dieselbe Information enthalten, zeigt sich die CD-Spektroskopie in der Praxis der Spektropolarimetrie überlegen. Zwar ist die Aufnahme von ORD-Spektren vom technischen Aspekt her leichter zu verwirklichen, dafür sind CD-Spektren deutlich einfacher zu interpretieren. CD-Spektren sind absorptiv und liefern im Gegensatz zu den dispersiven Signalen im ORD-Spektrum relativ schmale Banden. Dadurch ist der Anteil an Überlagerungen im Spektrum deutlich reduziert. Die Spektren verhalten sich additiv und sind bei der Aufnahme weniger anfällig gegen Streuung und Doppelbrechung.

Ein großer Nachteil der CD-Spektroskopie im Vergleich zu anderen Methoden zur Strukturbestimmung liegt darin, dass die gewonnene Information sehr allgemeiner Natur ist. So lässt sich z.B. in Proteinen sehr einfach und schnell der Gehalt an α-Helices ermitteln, eine Aussage über deren Lage innerhalb der Sequenz enthält das CD-Spektrum jedoch nicht.

Ein zweiter Nachteil besteht in der weitgehend auf Empirie und Vergleich beruhenden Auswertung der Spektren. Eine Vorhersage der CD-Banden ist zwar mit Hilfe der Rosenfeldformel in der Theorie möglich, in der Praxis aber extrem schwierig: So existiert ein Vielzahl mathematischer Modelle zur Lösung dieser Formel. Den richtigen Ansatz daraus für das jeweilige reale System auszuwählen, bedarf allerdings vieler Erfahrung und Intuition und kann trotzdem zu einer Diskrepanz zwischen Theorie und Experiment führen. In diesen Punkten ist die CD-Spektroskopie der NMR und der Röntgenkristallographie deutlich unterlegen, die Strukturinformationen wesentlich detaillierter und exakter liefern können.

Der große Vorteil gegenüber diesen Analysemethoden liegt jedoch in der finanziell günstigeren technischen Ausstattung für Aufnahme und Auswertung der Spektren, der schnellen und einfachen Spektrenaufnahme, sowie der zeitlich wenig aufwändigen Auswertung. Zudem ist durch die Messung der CD-Spektren in Lösung v. a. im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse die Probenvorbereitung viel unkomplizierter, und die erforderliche Probenmenge ist deutlich niedriger als für die NMR-Spektroskopie. Ein weiterer wichtiger Vorteil liegt darin, dass die Verwertbarkeit der Spektren nicht durch die Molekülgröße limitiert ist. Selbst bei Proteinen, die für die NMR-Spektroskopie zu groß sind, lassen sich über CD-Messungen quantitativ und in kurzer Zeit die Strukturelemente ermitteln, solange das Molekül sich in Lösung bringen lässt.
Trotz der wenig detaillierten Strukturaussage ist die CD-Spektroskopie eine nahezu ideale Methode, Strukturänderungen zu verfolgen. Sie reagiert sehr empfindlich auf strukturelle Veränderungen der zu untersuchenden Probe und kann diese schnell und einfach detektieren.

2.1.4.2 Charakterisierung von DNA und Peptiden

CD-Spektren von DNA [257-259]

Es gibt drei Hauptkonformationen von DNA-Duplexen: A-, B- und Z-DNA. In der Literatur existieren noch weitere Konformationen unterschiedlicher Bezeichnung, die z. T. leicht verzerrte Formen der Hauptkonformationen darstellen. Da sich alle Formen längerer gemischter DNA-Sequenzen durch geeignete Bedingungen ineinander überführen lassen, ist eine allzu feine Unterscheidung der Konformationen nur bedingt sinnvoll. Zudem existiert eine gewisse

Sequenzabhängigkeit für die exakten geometrischen Daten der einzelnen Formen, so dass auch hier eine detailliertere Klassifizierung als in die drei Formen A, B und Z schwierig wird.

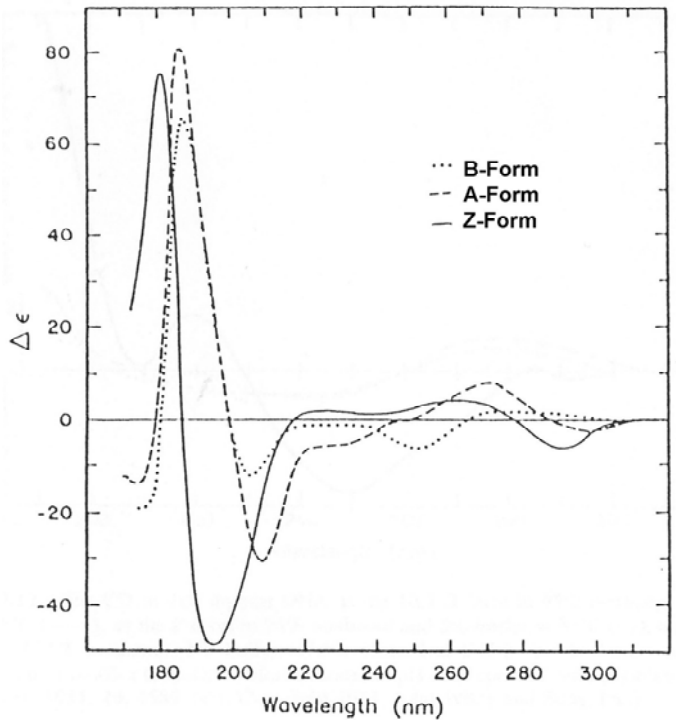


Abbildung 2-31: CD von poly(dGdC) in 10 mM NaP_i (pH 7) als B-Form, in 0.67 mM NaP_i mit 80 % Trifluorethanol (pH 7) als A-Form, in 2 M $NaClO_4$ mit 10 mM NaP_i (pH 7) als Z-Form.

CD-Spektren von Peptiden [254]

Die Sekundärstrukturelemente in Peptiden sind entsprechend der größeren Anzahl und Diversität der natürlichen Monomere vielfältiger als in den Nukleinsäuren. Das kann jedoch auch dazu führen, dass die einzelnen Strukturelemente nicht mehr so eindeutig aus den CD-Spektren eruiert werden können. Die häufigsten Sekundärstrukturelemente und ihre typischen Signale im CD-Spektrum sind in Abbildung 2-32[260] dargestellt.

Die CD-Spektroskopie wird in der Praxis zur Ermittlung des quantitativen Anteils von α-Helices und β-Faltblättern in Proteinen verwendet, um eine erste Strukturvorstellung zu gewinnen.

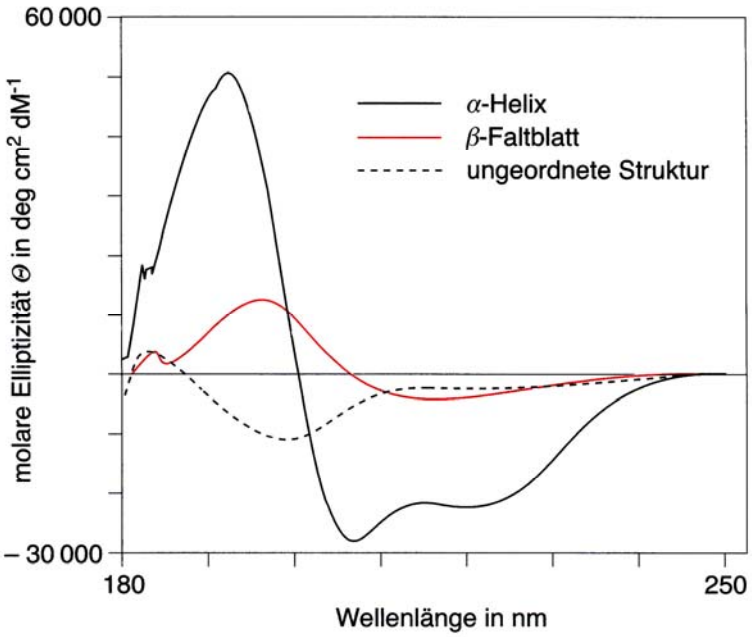


Abbildung 2-32: Typische CD-Spektren der angegebenen häufigen Sekundärstrukturelemente von Peptiden.

2.1.4.3 Das Differenz-CD-Experiment

Da sich CD-Spektren additiv verhalten, ist zu erwarten, dass sich das reale Spektrum eines Komplexes aus mehreren Verbindungen als Summe der einzelnen Komponenten darstellen lässt bzw. dass durch entsprechende Subtraktion von einem Komplexspektrum die jeweiligen Einzelbeiträge erhalten werden können. So bekommt man im einfachsten Fall das CD-Spektrum einer Verbindung durch die Subtraktion der Lösungsmittelsignale vom Spektrum der vermessenen Lösung.[20]

Tritt eine strukturelle Änderung durch die Wechselwirkung zwischen den vorhandenen Komponenten ein, so erhält man ein reales Spektrum, das mehr Informationen enthält als die Summe der Einzelbeiträge. Dies macht man sich bei Differenz-CD-Spektren zunutze. Will man beispielsweise Informationen über die Wechselwirkung eines Peptids mit Duplex-DNA erhalten, so vermisst man DNA und Peptid jeweils einzeln und subtrahiert deren Spektren vom Spektrum der Probe mit DNA und Peptid.
Würde keine Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten auftreten, ergäbe das Differenzspektrum eine Nulllinie, nehmen DNA und Peptid jedoch in irgendeiner Weise strukturell Einfluss aufeinander, so ist das Differenzspektrum von Null verschieden. Somit bietet die

Aufnahme von Differenz-CD-Spektren eine einfache und schnelle Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen Molekülen zu detektieren.

Die Differenz-CD-Spektren sind keine direkten Abbilder der Interaktion der Moleküle untereinander, vielmehr sind sie ein Auswertemittel, das rein qualitativ die Einflüsse der beiden Komponenten aufeinander zeigt.

2.2 Synthetische Methoden

2.2.1 DNA-Festphasensynthese

Die in den 1980er Jahren von *Letsinger* entwickelte DNA-Festphasensynthese[4, 5] zählt heute zu den routinemäßig angewendeten Methoden der Oligonukleotid-Darstellung. Das Prinzip der von *Merrifield* in den 1960er Jahren entwickelten Peptid-Festphasensynthese (SPPS)[37] wurde auf die Oligonukleotiddarstellung übertragen. Die neue Synthesemethode war gegenüber der früher in Lösung durchgeführten DNA-Synthese in Hinblick auf Zeit- und Arbeitsaufwand, Zuverlässigkeit und benötigte Substanzmenge deutlich überlegen.

Als Träger der festen Phase wird sog. *Controlled Pore Glass* (CPG) eingesetzt, das auf seiner Oberfläche mit primären Aminogruppen funktionalisiert ist. Über einen Linker, meist Succinat, ist das erste Nukleosid an der 3'-OH mit dem CPG verbunden. Derartig belegtes CPG ist kommerziell erhältlich. Das Nukleosid ist an der 5'-OH-Gruppe trityliert und gegebenenfalls an der exocyclischen Aminofunktion der Nukleobase geschützt.

Das am häufigsten durchgeführte Protokoll für die automatisierte Festphasensynthese von Oligonukleotiden ist die Phosphoramidit-Methode.[6, 7] Diese Mitte der 1970er bis Anfang der 1980er entwickelte Methode arbeitet mit Phosphittriestern. Als Alternativen existieren die Phosphotriester- und die H-Phosphonat-Methode, die nur selten angewendet werden.
Die Phosphoramidit-Synthese erfolgt entsprechend des im Folgenden dargestellten Zyklus (vgl. Abbildung 2-33): Der erste Schritt beinhaltet die Detritylierung des terminalen Nukleosids. Die Abspaltung der Schutzgruppe am 5'-Ende wird mit 2 % Dichloressigsäure in DCM

durchgeführt. Die Kupplung erfolgt im nächsten Schritt mit dem Phosphoramidit des nächsten Bausteins in wasserfreiem Acetonitril mit Tetrazol als schwach saurem Aktivator. Es folgt ein Capping-Schritt mit Essigsäureanhydrid und 2,6-Lutidin in THF mit Zusatz von DMAP, der noch vorhandene OH-Gruppen, die bei der Kupplung nicht reagiert haben, durch Acylierung blockiert. Auf diese Weise werden Oligonukleotide, die nicht korrekt verlängert wurden, aus dem Zyklus entfernt und können nach der DNA-Aufarbeitung gut abgetrennt werden. Anschließend erfolgt die Oxidation des Phosphittriesters zum Phosphotriester mit Iod in wässrigem THF. 2,6-Lutidin wird als Base zugesetzt, um das entstehende HI abzufangen. An die Oxidation schließt sich die nächste Detritylierung an.

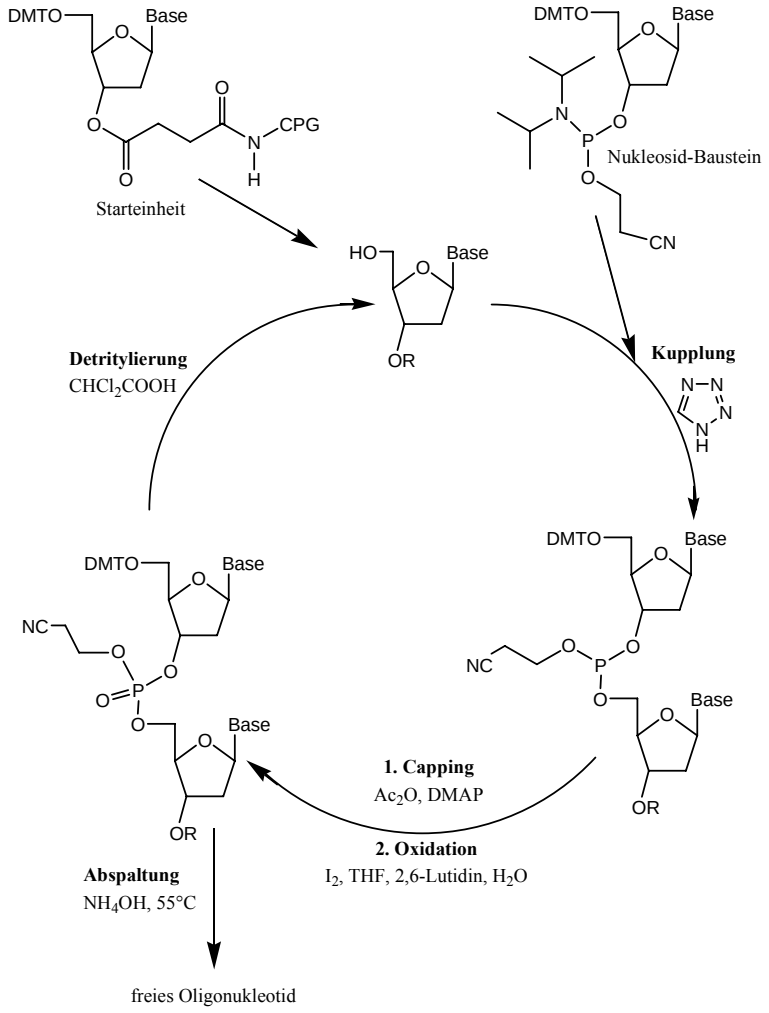


Abbildung 2-33: Schematische Darstellung des Synthese-Zyklus der automtisierten DNA-Festphasensynthese.

Nach erfolgter Synthese werden die Oligonukleotide mit wässriger konzentrierter NH_4OH-Lösung bei 55°C vom CPG abgespalten. Dabei werden zugleich die Schutzgruppen an den exocyclischen Aminofunktionen der Basen und die Cyanoethoxy-Schutzgruppen an den Phosphaten mit entfernt. Die Reinigung der Oligonukleotide kann je nach Menge über präparative Gelelektrophorese oder präparative HPLC erfolgen.

2.2.2 Synthese PydU-modifizierter Oligonukleotide

In der Mehrzahl der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente werden mit 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (PydU, **1**) modifizierte Oligonukleotide eingesetzt. PydU dient dabei als photochemisch anregbarer Elektronendonor, der sich mittels konventioneller DNA-Festphasensynthese in Oligonukleotide einbauen lässt. Die Synthese des modifizierten Nukleosids über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktion[261] verläuft in guten Ausbeuten und hat sich bewährt.[15, 16, 27, 32]

2.2.2.1 Darstellung von PydU

Die Darstellung des für die DNA-Festphasesynthese modifizierten Nukleosids erfolgt über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktion. Diese Art der C-C-Verknüpfung gehört zu einer Reihe Palladium katalysierter Kreuzkupplungen, zu der u.a. die Stille-[262-265], Negishi-[266] und Sonogashira-Reaktion[266-271] zählen. Die Suzuki-Miyaura-Kupplung folgt dem für Palladium katalysierte Reaktionen typischen katalytischen Zyklus (vgl. Abbildung 5-23). In der Regel werden Boronsäurederivate mit Aryl-, Alkenyl- oder Alkinylhalogeniden (Iodide und Bromide) gekuppelt. Als Katalysator wird häufig Tetrakis-triphenylphosphan-Palladium ($Pd(PPh_3)_4$) eingesetzt. Die Transmetallierung kann nur stattfinden, wenn durch eine Base eine tetravalente anionische Borspezies gebildet wird, die eine stark erhöhte Nukleophilie aufweist.
Im Gegensatz zur Stille-Kupplung sind keine wasserfreien Bedingungen erforderlich. Auch eignet sie sich besser für wenig reaktive Elektrophile, da die Borverbindungen thermisch sehr stabil sind. Viele ungeschützte funktionelle Gruppen werden toleriert. Für die Darstellung des 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (PydU) ist ebenfalls ein Syntheseweg über eine Stille-Kupplung in der Literatur bekannt.[134] Im Vergleich zu dieser Kupplungsreaktion sind die Edukte der Suzuki-Miyaura-Kupplung leichter zugänglich, sowie thermisch und gegen Hydrolyse stabil.

Die Anknüpfung des Pyrenrestes an das 2'-Desoxyuridin geschieht über die Reaktion von 1-Pyrenylboronsäure (**2**) mit 5-Iod-2'-Desoxyuridin.[31, 32]

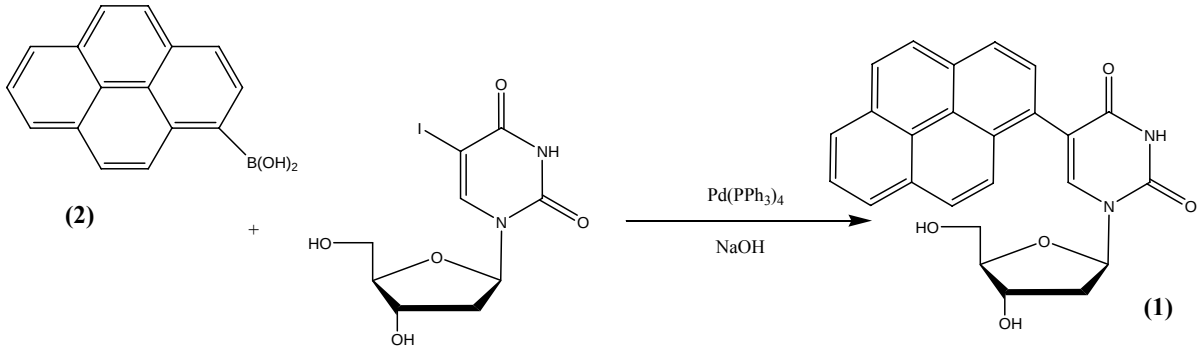


Abbildung 2-34: Synthese von 5-(1-Pyrenyl-)-2'-desoxyuridin über die Suzuki-Miyaura-Kupplungsreaktion. Die Reaktion erfolgt in THF/H_2O/MeOH (2:2:1) bei 80°C, Reaktionszeit 30 h, Ausbeute 70 %.

Die Darstellung der 1-Pyrenylboronsäure[272, 273] (**2**) gelingt über die Bromierung des Pyrens[274], den anschließenden Brom-Lithium-Austausch, die Umsetzung mit Borsäuretrimethylester und saurer Aufarbeitung.

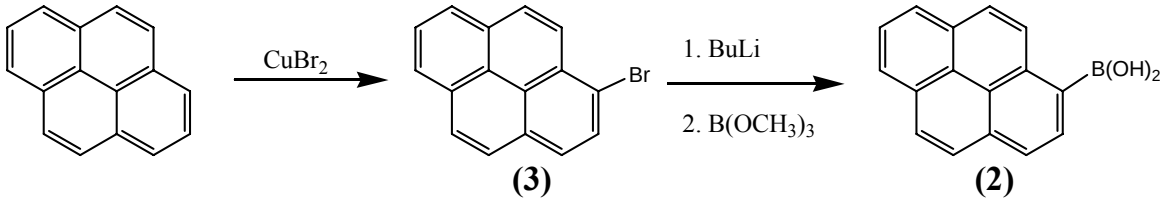


Abbildung 2-35: Synthese von 1-Pyrenylboronsäure (**2**) in zwei Stufen. Die Bromierung wird in Chlorbenzol durchgeführt, 1-Brompyren (**3**) wird auskristallisiert. Die Lithiierung findet bei 0°C, die Borierung bei -78°C in Diethylether statt.

Bei den Reaktionen zur Darstellung von **1**, **2** und **3** ist auf Lichtschutz zu achten, um photochemische Nebenreaktionen zu vermeiden.

2.2.2.2 Darstellung der PydU-modifzierten Oligonukleotide

Um PydU als Synthesebaustein in der automatischen DNA-Festphasensynthese einzusetzen, müssen die 5'-OH-Funktion der 2'-Desoxyribose mit der 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe und die 3'-OH-Gruppe mit der β-Cyanoethyl-*N,N*-di*iso*propyl-phosphoramiditgruppe versehen werden. Die Einführung einer Schutzgruppe an der Nukleobase ist nicht erforderlich. Die Synthese erfolgt nach Standardmethoden der Literatur.[31, 32]

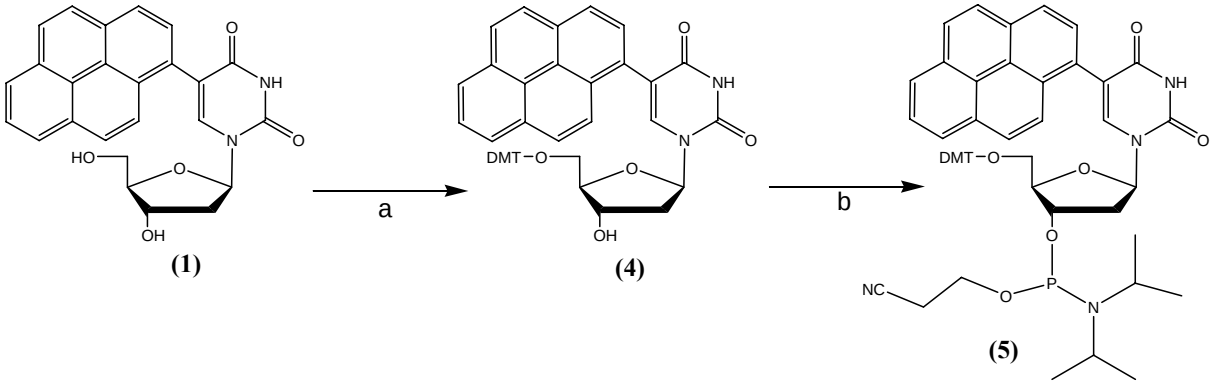


Abbildung 2-36: Darstellung des Phosphoramidits des PydU(**5**).
a: DMT-Cl in Pyridin, RT, 20 h (65%), **b**: ($^{i}Pr_2N)P(OCH_2CH_2CN)(Cl)$ in DCM, RT, 2 h (100 %)

Das Phosphoramidit **5** wird unter den Standardbedingungen der DNA-Festphasensynthese eingebaut, eine Modifikation des Kupplungsprotokolls (z. B. längere Kupplungszeit, größeres Volumen an Reaktionslösung) ist für den Einbau eines einzelnen PydU-Bausteins nicht erforderlich. Bei einem Mehrfacheinbau wird die Kupplungszeit von 1.5 auf 15 min erhöht.

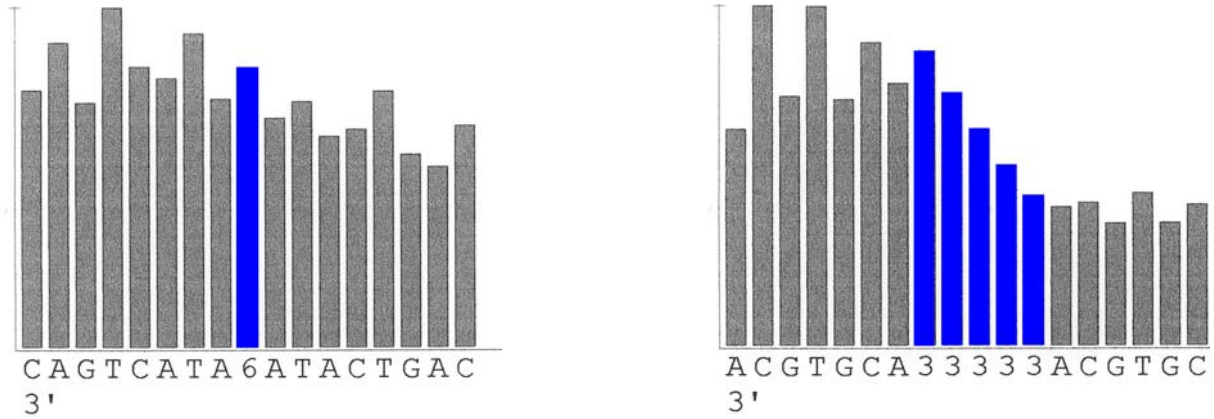


Abbildung 2-37: Die Auftragung zeigt die Absorption des Tritylkations bei der Abspaltung der DMT-Gruppe während der DNA-Festphasensynthese. Selbst bei mehrfachem Einbau bleibt die Kupplungseffizienz gut.
links: Sequenz **N1** (6 = PydU), *rechts*: Sequenz **N2** (3 = PydU)

Die Abspaltung und Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide erfolgt wie bei unmodifizierten Strängen. Bereits im HPLC-Spektrum des ungereinigten Oligonukleotids sieht man die Reaktion zu einem Hauptprodukt, das eine Absorption bei 340 nm, also im Bereich der Absorption des Pyrenchromophors, zeigt.

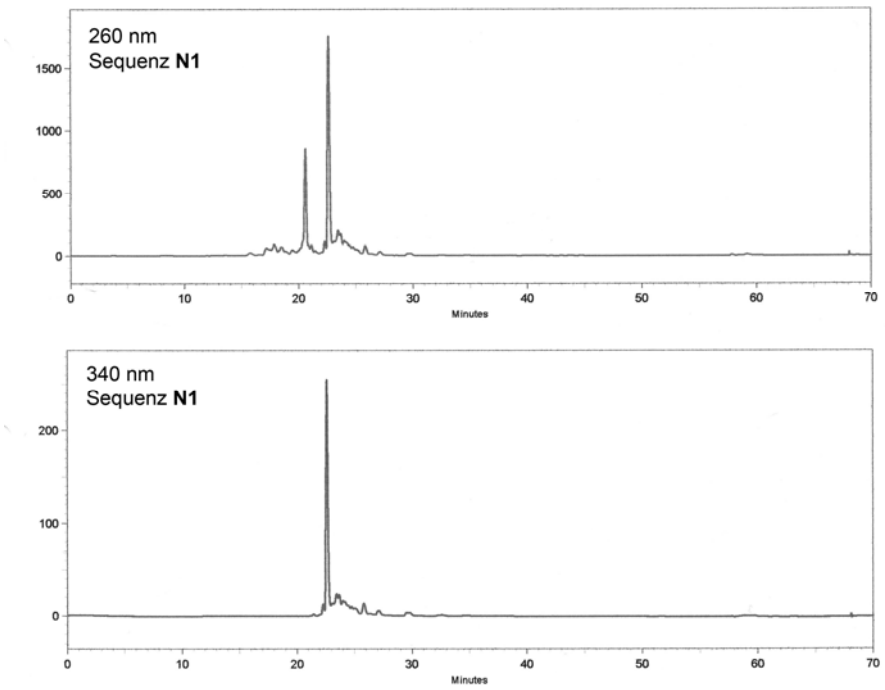


Abbildung 2-38: HPLC-Spektrum des PydU modifizierten Stranges **N1** vor der präparativen Trennung. Deutlich ist das Hauptprodukt **N1** mit einer Retentionszeit von 23 min zu erkennen, das Pyrenabsorption zeigt. Gradient 0-30% MeCN in 50 mM NH_4OAc über 50 min.

Mehrfach PydU-modifizierte Oligonukleotide zeigen im HPLC-Spektrum vor der Aufreinigung mehrere Peaks in der Pyrenabsorption. Diese stammen von den Abbruchfragmenten nach dem Einbau eines PydUs während der Festphasensynthese.

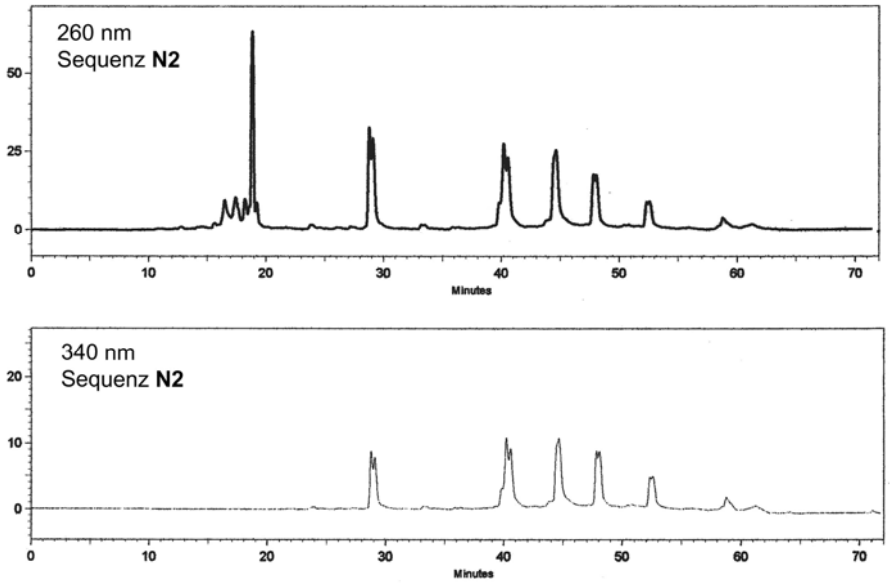


Abbildung 2-39: HPLC-Spektrum des PydU modifizierten Stranges **N2** vor der präparativen Trennung. Deutlich sind die Abbruchfragmente nach dem PydU-Einbau zu erkennen. **N2** besitzt eine Retentionszeit von 45 min (Gradient 0-40% MeCN in 50 mM NH_4OAc über 50 min).

Die massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-TOF belegt den erfolgreichen Einbau des PydU-Nukleosids in ein Oligonukleotid.

2.2.3 Festphasensynthese von Peptiden (SPPS)

Die Synthese der linearen Peptide wird nach der von Merrifield 1963[37] entwickelten Festphasensynthese an einem unlöslichen, polymeren Träger durchgeführt. Für die Durchführung der SPPS gibt es zwei Synthesestrategien, die jeweils mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie arbeiten. Bei der *Boc*-Stratgie erfolgt die Abspaltung der *Boc*-Schutzgruppe an der α-Aminofunktion der Aminosäure im Sauren, während die Seitenketten mit basenlabilen Schutzgruppen versehen sind. Die SPPS nach der *Fmoc*-Strategie[35, 275], bei der die α-Aminofunktionen der Aminosäuren im Basischen und die Seitenkettenschutzgruppen im Sauren entschützt werden, ist aufgrund der weniger aggressiven Reagenzien heute die bevorzugte Methode.

2.2.3.1 Peptid-Kupplung nach der Fmoc-*Strategie*

Beim Material der festen Phase handelt es sich um Polystyrol, das mit 1 % *m*-Divinylbenzol quervernetzt ist. Über einen Tritylchloridlinker kann die erste Aminosäure mit ihrem C-Terminus an das TCP-Harz gebunden werden. Dieser Linker ist im Sauren leicht abspaltbar.

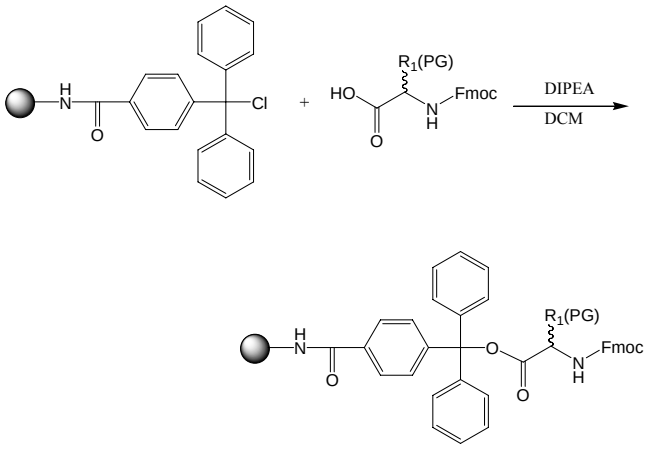


Abbildung 2-40: Anknüpfung der ersten Aminosäure an das TCP-Harz.

Der eigentliche Zyklus der SPPS beginnt mit der Abspaltung der N^{α}-*Fmoc*-Schutzgruppe. Dazu wird das belegte Harz mit Piperidin behandelt.

Bei der Entschützungsreaktion handelt es sich um einen zweistufigen Prozess, bei dem im ersten Schritt eine baseninduzierte β-Eliminierung zur Abspaltung von CO_2 und Dibenzofulven führt und im zweiten Schritt das gebildete Dibenzofulven mit Piperidin abreagiert. Polare Lösungsmittel wie NMP und DMF beschleunigen diese Entschützungsreaktion.

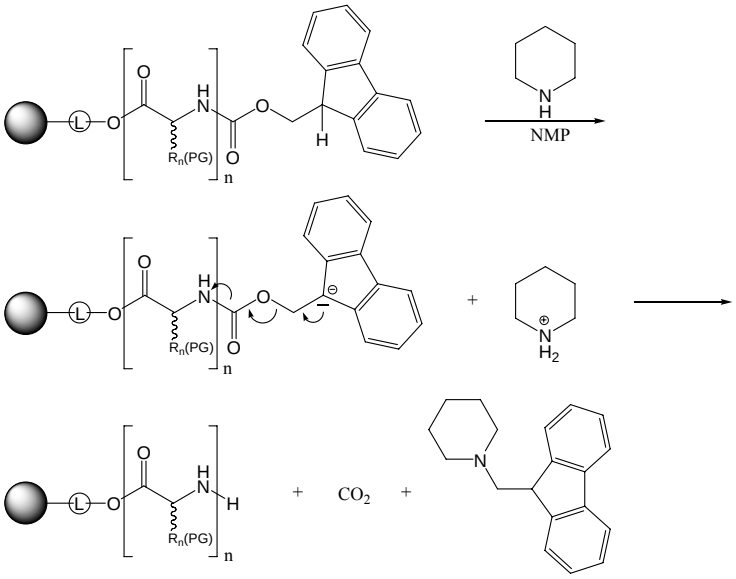


Abbildung 2-41: Schematische Darstellung der Abpaltung der *Fmoc*-Schutzgruppe mit Piperidin.

Die eigentliche Kupplungsreaktion erfolgt oft nach der HOBt/TBTU-Methode[276], als Base wird DIPEA zugesetzt. Dabei wird zuerst der OBt-Aktivester der freien Fmoc-Aminosäure gebildet, der anschließend mit der terminalen Aminofunktion der am Harz befindlichen Sequenz reagiert. Das dabei entstehende Proton wird durch den Zusatz von DIPEA neutralisiert.

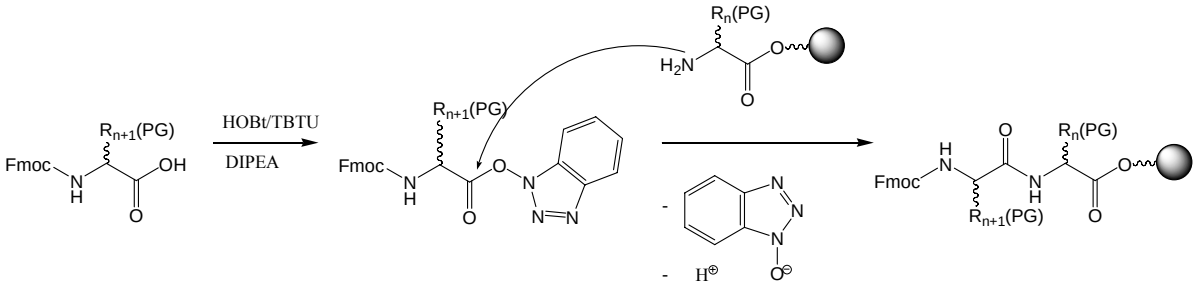


Abbildung 2-42: Prinzip der Peptidkupplungsreaktion mit der HOBt/TBTU-Aktivester-Methode am TCP-Harz.

An den Kupplungsschritt schließt sich eine erneute Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe an. Der Erfolg der Kupplungsreaktion hängt stark vom sterischen Anspruch der am Harz befindlichen Aminosäure ab (z. B. Prolin). Eine Doppelkupplung, d. h. eine wiederholte Kupplungsreaktion mit frischer Reagenslösung kann dabei die Ausbeute der Reaktion beträchtlich erhöhen.

Die Abspaltungsbedingungen vom Trägerharz und die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen orientieren sich an den eingesetzen Aminosäuren.[277, 278] Beide Schritte können gemeinsam erfolgen oder hintereinander.

Die Standardmethode zur Abspaltung ist die Verwendung 95 % wässriger TFA. Dabei fällt das vollentschützte Peptid als Acetat an. Eine Behandlung mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluor*iso*propanol (HFIP) oder Essigsäure-Trifluorethanol (TFE) (3:1) führt zum abgespalteten, vollgeschützten Peptid.

Der Zusatz von Trialkylsilanen (*hier*: TIPS) und Thiolen verhindert die Alkylierung aktivierter aromatischer Seitenketten durch bei der Abspaltung intermediär entstehende Kationen (^{t}Butylkation, Tritylkation).

Tabelle 2-2: Bedingungen, die zur Abspaltung und Entschützung verwendet wurden.

Aminosäure	**Schutzgruppe der Seitenkette**	**Abspaltbedingungen zur Entschützung**
Arginin	*Pmc*	85.5 % TFA, 5 % Phenol, 5 % Thioanisol, 2.0 % H_2O, 2.5 % Ethandithiol
Cystein	*Trt*	95 %TFA, 4 %TIPS, 1 % H_2O
Glycin	-	95 % TFA in H_2O
Lysin	*Boc*	95 % TFA in H_2O
Lysin	*Alloc*	Pd-Kat/Allylakzeptor; dann 95 % TFA in H_2O
Phenylalanin	-	95 % TFA in H_2O
Prolin	-	95 % TFA in H_2O
Serin	^{t}*Bu*	95 % TFA in H_2O
Threonin	^{t}*Bu*	95 % TFA in H_2O
Tryptophan	*Boc*	95 %TFA, 4 %TIPS, 1 % H_2O
Tyrosin	^{t}*Bu*	95 % TFA in H_2O

2.2.3.2 Aktivestermethode

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HOBt/TBTU-Methode[276] zur Kupplung von Peptiden verwendet. Die Bildung des OBt-Aktivesters geschieht in mehreren Schritten. TBTU (2-(1-H-

Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat) dient als primäres Aktivierungsreagenz der Aminosäure. Das gebildete Acyluronium-Derivat ist bereits kupplungsaktiv.

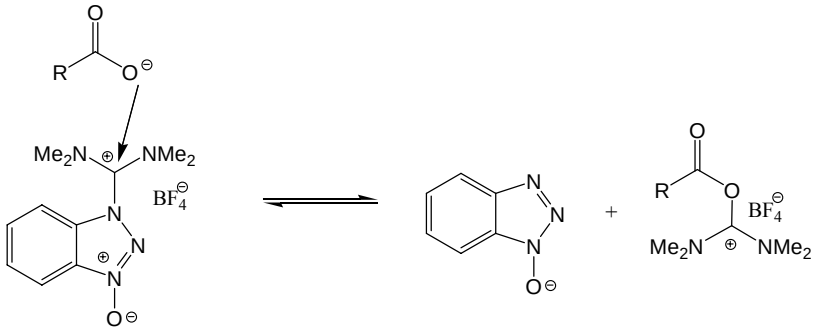


Abbildung 2-43: Reaktionsgleichgewicht der Aktivierungsreaktion einer Aminosäure mit TBTU.

Durch intramolekulare Cyclisierung unter Beteiligung des Urethan-Carbonylsauerstoffs der *Fmoc*-Gruppe an der Aminosäure wird ein 5-(4H)-Oxazolon gebildet, das basenkatalysiert epimerisiert.

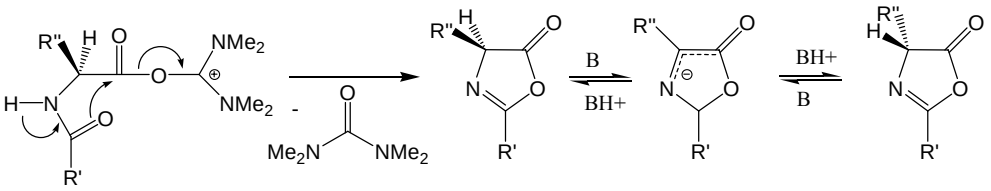


Abbildung 2-44: Oxazolonbildung und basenkatalysierte Epimerisierung der aktivierten *Fmoc*-Aminosäure.

Um die Racemisierung zu unterdrücken, wird das Gleichgewicht der Aktivierungsreaktion mit TBTU durch Zugabe von HOBt (1-Hydroxy-benzotriazol) auf die Produktseite verschoben und das reaktive Acyluronium-Derivat sofort abgefangen.

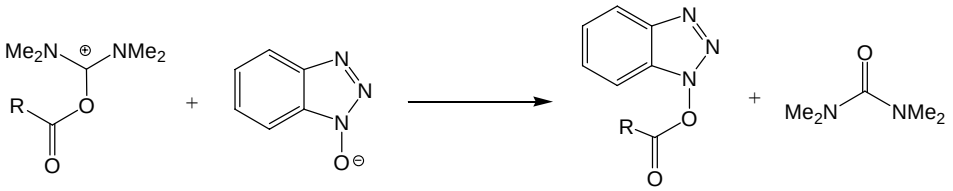


Abbildung 2-45: Reaktion von HOBt mit dem Acyluronium-Derivat unter Bildung des OBt-Aktivesters.

Dadurch lässt sich zum einen die Reaktionsrate der Aktivesterbildung stark erhöhen und zum anderen die Racemisierungsreaktion vermeiden.

Neben der HOBt/TBTU-Methode gibt es noch eine Reihe anderer Kupplungsreagenzien für die Peptidkupplung mit Aktivestern.[279-285] Als Alternative zu DIPEA wird häufig auch Collidin eingesetzt. Je nach Reaktivität und sterischem Anspruch der eingesetzten Kupplungspartner wird eine Reihe verschiedener Reagenzien verwendet.

Die Aktivierung der Carbonsäurekomponente kann auch mithilfe von Carbodiimiden wie EDCI (*N*-Ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid)[286-288] oder DCC (*N,N*'-Dicyclohexylcarbodiimid)[289] erreicht werden. Diese Kupplungsreagenzien werden hauptsächlich in der Synthese von Peptiden in Lösung eingesetzt, in der SPPS werden sie nur in Ausnahmefällen verwendet.

2.2.4 Synthese und Charakterisierung pNB-modifizierter Oligopeptide

In den vorgestellten Experimenten zur Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Oligonukleotiden und Peptiden werden kurze DNA-bindende Peptidsequenzen eingesetzt, die gegebenenfalls N-terminal eine *para*-Nitrobenzoyl-Gruppe (**pNB**) als Elektronenakzeptor tragen.

2.2.4.1 Wahl der Peptidsequenzen

Prinzipiell können Peptide auf verschiedenen Arten nicht kovalent an Oligonukleotide binden:

- Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren (Lys, Arg) und den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats
- Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleobasen und Aminosäureseitenketten (Asn, Gln)
- Interkalation einer aromatischen Aminosäureseitenkette (Trp, Tyr, Phe) in den Basenstapel

Die aromatischen Seitenketten von Aminosäuren spielen bei DNA-Protein-Wechselwirkungen eine besondere Rolle, da sie nicht nur in den Basenstapel eines Duplexes eingschoben werden können, sondern auch mit den benachbarten Nukleobasen in π-π-Wechselwirkungen treten.[232, 234-241] Interkalierende Aminosäureseitenketten üben somit einen starken Einfluss auf den Ladungstransport in der DNA aus, was an einigen Protein-DNA-Komplexen bereits untersucht wurde.

Um diese elektronischen Interaktionen zu untersuchen, sollen möglichst einfache DNA-bindende Modellpeptide verwendet werden, die nur einen aromatischen Aminosäurerest besitzen. Von den Tripeptiden Lys-Trp-Lys und Lys-Tyr-Lys ist bekannt, dass sie zum einen durch elektrostatische Wechselwirkung der positiv geladenen Aminogruppen der Lysinseitenketten und des N-Terminus an die negativ geladenen Phosphodiestergruppen des DNA-Rückgrates binden. Zum anderen interkalieren die Indol- bzw. die Phenol-Gruppe in den DNA-Duplex. Dabei sind für die Interkalation beide Lysine in den Tripeptiden erforderlich. Diese aromatischen Seitenketten interkalieren besonders gut in AT-reichen Sequenzen. Die Bindungskonstante für poly(dAdT) beträgt $1.25 \cdot 10^4$ M^{-1}.[233, 234]

Tryptophan und Tyrosin sind in der Lage, positive radikalische Ladung aus der DNA abzufangen[233, 290-292] ($E^0(W^{\bullet+}/W) \approx 1.0$ V, $E^0(Y^{\bullet+}/Y) \approx 0.9$ V; $E^0(Py^{\bullet+}/Py) \approx 1.28$ V, $E^0(G^{\bullet+}/G) \approx 1.3$ V). Somit ist zu erwarten, dass diese beiden Aminosäuren einen großen Einfluss auf den Ladungstransfer zwischen Oligonukleotiden und Peptiden ausüben. Das Redoxpotential des Phenylalanins reicht nicht aus, als Lochakzeptor zu fungieren. Deshalb dient es in den Versuchen als Kontrolle für einen nicht redoxaktiven Aromaten.

Verschiedene nukleophile Aminosäureseitenketten wie Cystein oder Threonin können zur chemischen Verknüpfung mit DNA führen.[293, 294] Sie stellen somit potentielle Kandidaten für chemische Folgereaktionen mit während eines Ladungstransports gebildeten Elektrophilen (hpts. Radikalkationen) dar. Aus diesem Grund werden Versuche mit Peptiden durchgeführt, die diese Aminosäuren enthalten.

2.2.4.2 Synthese und Charakterisierung

Für die Versuche mit nicht kovalent bindenden Peptiden wird eine Reihe **pNB**-modifizierter Peptide unterschiedlicher Länge synthetisiert. Die Messungen werden mit diesen modifizierten Molekülen und zur Kontrolle mit sequenzgleichen Peptiden ohne **pNB**-Gruppe durchgeführt. Die Peptide gliedern sich in verschiedene Versuchsgruppen.

- Mithilfe von Mono-, Di- und Trilysinen soll der Einfluss der elektrostatischen Bindung auf die Fluoreszenz- und Ladungstransfereigenschaften der verwendeten modifizierten DNA-Sequenz untersucht werden. Durch die Modifikation dieser Peptide mit **pNB** erhält

man Kontrollpeptide, die den Einfluss einer unterschiedlichen Anzahl elektrostatischer Bindungen in Abwesenheit einer aromatischen Aminosäureseitenkette zeigen.

- **KXK**-Sequenzen (X = W, Y, F) stellen interkalierende Peptide dar. Ohne **pNB**-Gruppe dienen sie als Peptide, die mit ihren Indol- bzw. Phenolseitenketten als Lochakzeptoren fungieren, mit Elektronenakzeptor-Gruppe handelt es sich um zweifach redoxaktive Peptide. Phenylalanin-haltige Peptide dienen als Kontrolle.
- **KXK**-Sequenzen (X = Cys, Thr) enthalten nukleophile Aminosäureseitenketten, die unter Bildung von Peptid-DNA-Konjugaten zur chemischen Verknüpfung als Folge eines Ladungstransfers führen können. Ihre Modifikation mit **pNB** soll zeigen, ob die Anwesenheit eines Elektronenakzeptors auf die Reaktivität Einfluss nimmt.
- Sequenzspezifisch an DNA-bindende Peptide[243, 244], die mit **pNB** versehen sind, sollen den Einfluss der spezifischen DNA-Peptid-Bindung auf das Fluoreszenzverhalten zeigen.

Die Verknüpfung der Aminosäuren und der *para*-Nitrobenzoesäure erfolgte mittels der HOBt/TBTU-Methode[276] auf dem TCP-Harz. Die Abspaltung vom Träger und die Entschützung kann nach den Standardmethoden (s. Tabelle 2-2) durchgeführt werden. Die Wahl der Bedingungen richtet sich dabei nach der Aminosäure, die die meisten Additive neben wässriger TFA benötigt. Die **pNB**-Gruppe ist unter den verwendeten Bedingungen auf jeden Fall stabil. Die Ausbeuten der Kupplungsreaktionen sind bei den kurzen synthetisierten Peptidsequenzen so hoch, dass eine nachträgliche Reinigung über HPLC nicht erforderlich ist.
Bei der Synthese der längeren, sequenzspezifisch-bindenden Peptide **P1-P3** (s. Kapitel 4.3)[243, 244] konnte durch Doppelkupplung aller Aminosäuren und der **pNB**-Gruppe ebenfalls auf eine Reinigung verzichtet werden.

Die Überprüfung der Reinheit erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. Die Konzentrationen der Peptidstammlösungen wurden über die Extinktion bei 280 nm bestimmt bzw. bei Abwesenheit eines Chromophors (**pNB**, W, Y, F)[295, 296] über die Einwaage der getrockneten Peptide.

3 Ladungstransfer in Oligonukleotiden

3.1 PydU-modifizierte DNA-Oligonukleotide

3.1.1 Hintergrund

Pyren stellt aufgrund seines Redoxpotentials und seiner bekannten spektroskopischen Eigenschaften ein geeignetes Chromophor für die Ladungstransferchemie mit DNA dar. Wird es photochemisch angeregt, ist es energetisch in der Lage, Guanin zu oxidieren oder Thymin zu reduzieren. Das bedeutet, dass bei diesem Aromaten die kovalente Anknüpfung an das entsprechende Nukleotid einen kritischen Parameter darstellt, da sowohl dG oxidiert als auch dT reduziert werden kann. Der stattfindende Ladungstransfer lässt sich mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgen (s. Kapitel 2.1.1).

Von der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurden die Syntheseprotokolle der Pyrenmodifikationen aller vier natürlichen Nukleoside (PydA, PydC, PydG, PydU **1**) entwickelt. Das Pyren ist dabei über eine Einfachbindung an die 5- (Pyrimidine) bzw. 8-Position (Purine) der Nukleobase angeknüpft. Der Schlüsselschritt in der Darstellung ist die Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung zwischen der 1-Pyrenylboronsäure (**2**) und dem entsprechenden iodierten oder bromierten Nukleosid. Durch eine geeignete Schutzgruppenchemie lässt sich das Phosphoramidit des modifizierten Nukleosids herstellen, das in der konventionellen DNA-Festphasensynthese eingesetzt werden kann.[16, 19, 22, 26-28, 30-32, 171, 297-299]

In den meisten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten werden PydU-modifizierte Duplexe als spektroskopierbare Elektronendonor-Systeme verwendet. Sie eignen sich besonders gut für Studien zum Elektronentransfer, da sie bereits spektroskopisch sehr detailliert charakterisiert wurden.

Die PydU-enthaltenden Oligonukleotidsequenzen **D1-D4** sind statistisch gewählt und enthalten die Modifikation in der Mitte des Stranges, um das PydU in eine stabil ausgebildete Duplexstruktur einzubinden. In den Sequenzen wird die Nachbarbasenumgebung des künstlichen Nukleotids variiert. Als Gegenbase wird dA eingebaut, in der Annahme, dass sich trotz

der Modifikation am C-5 des Uridins eine reguläre Watson-Crick-Basenpaarung ausbilden kann.

D1	3'-TCA-GTC-AC**X**-TAC-TGA-CT-5'	**X** = PydU
C1	5'-AGT-CAG-TGA-ATG-ACT-GA-3'	
D2	3'-TCA-GTC-AT**X**-CAC-TGA-CT-5'	
C2	5'-AGT-CAG-TAA-GTG-ACT-GA-3'	
D3	3'-TAG-TCA-CA**X**-ATA-CTG-AC-5'	
C3	5'-ATC-AGT-GTA-TAT-GAC-TG-3'	
D4	3'-TAG-TCA-TA**X**-ACA-CTG-AC-5'	
C4	5'-ATC-AGT-ATA-TGT-GAC-TG-3'	

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind teilweise bekannt. Da die Erfassung der spektroskopischen Daten im Rahmen dieser Arbeit wiederholt wurde und die erhaltenen Daten typisch für PydU-haltige DNA sind, werden sie hier gesammelt gezeigt.

3.1.2 Spektroskopische Charakterisierung der Duplexe

Die Duplexe **D1/C1-D4/C4** zeigen das typische Absorptionsverhalten PydU-haltiger DNA. Die UV-Vis-Spektren sind sich sehr ähnlich. Sie weisen alle eine breite und unstrukturierte Absorptionsbande bei ca. 350 nm auf, die dem Pyrenrest des PydU zuzuordnen ist.

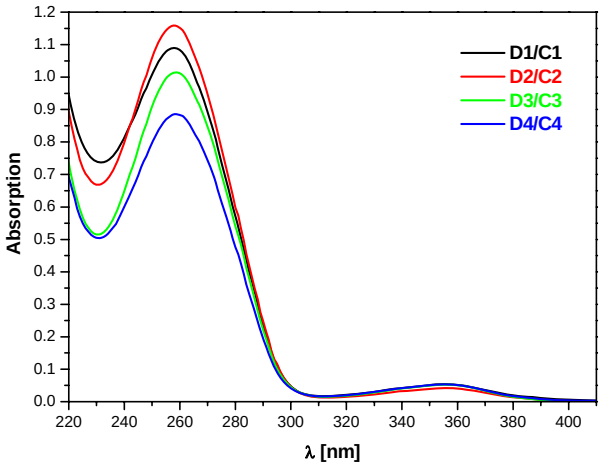


Abbildung 3-1: Absorption von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die CD-Spektren zeigen die Unterschiede der einzelnen Duplexe. Ihnen gemeinsam ist der für B-DNA typische Verlauf zwischen 220-300 nm mit einem Verlauf vom Negativen ins Positive, der einen Nulldurchgang bei etwa 260 nm aufweist. Die Duplexe **D3/C3** und **D4/C4** zeigen den Nulldurchgang bei 255 nm, während er bei **D1/C1** und **D2/C2** bei 270 nm liegt. Auch die Lage des Maximums ist entsprechend verschoben (220 bzw. 230 nm). Das Minimum befindet sich in **D2/C2** bei 250 nm, in den drei anderen Duplexen bei 240 nm, wobei **D1/C1** eine Verbreiterung der Bande zu größeren Wellenlängen aufweist. Der Pyrenchromophor erzeugt keine deutliche CD-Bande.

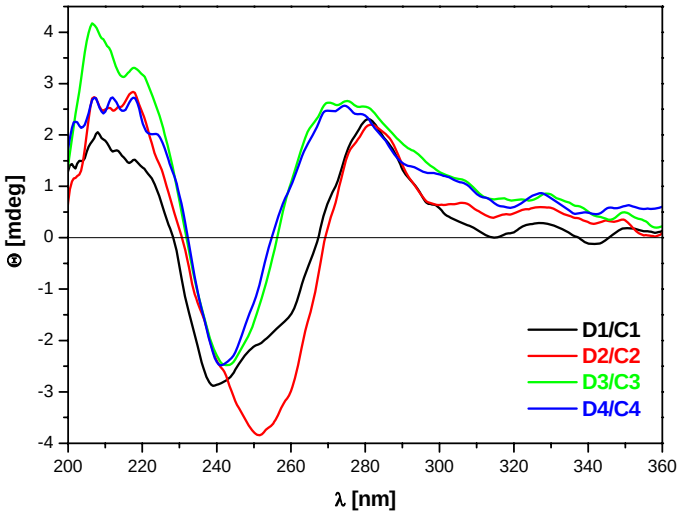


Abbildung 3-2: CD-Spektren von 1.25µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.

Ein Vergleich der CD-Spektren verdeutlicht die Abhängigkeit der Duplexstruktur von der direkten Basenumgebung des PydU-Nukleotids. Wird das PydU von zwei dA flankiert, wie in **D3/C3**und **D4/C4**, so führt das zu einer anderen strukturellen Anordnung und somit einem veränderten Spektrum im Vergleich zu **D1/C1** und **D2/C2,** wo zwei Pyrimidine dem PydU benachbart sind. Die Ursache dafür liegt im unterschiedlichen Raumbedarf von Purinen und Pyrimidinen. Die übernächste Base nimmt keinen großen Einfluss mehr auf die lokale Struktur, die CD-Signale von **D3/C3**und **D4/C4** sind nahezu identisch.

Die Spektren von **D1/C1** und **D2/C2** sind sich zwar sehr ähnlich, unterscheiden sich aber dennoch etwas in der Bandenform (240-260 nm). In diesem Fall wirkt sich die Direktionalität der DNA-Stränge aus. Während sich in **D1/C1** dT in 5'-Richtung und dC in 3'-Richtung von PydU aus gesehen befindet, ist es in **D2/C2** genau umgekehrt. Das führt zu leicht unterschiedlichen Konformationen im Duplex. Neben den Reduktionspotentialen wirken sich derartige strukturelle Einflüsse auf den Ladungstransfer in der DNA aus, was anhand der Fluoreszenzspektren untersucht werden kann.

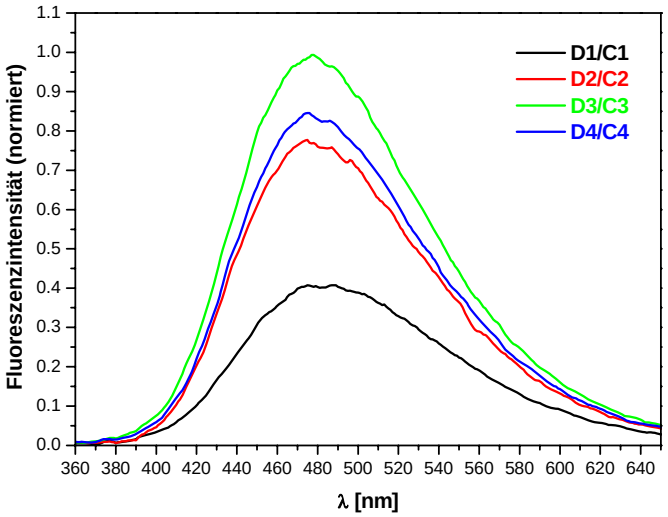


Abbildung 3-3: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz (λ_{exc}= 340 nm) von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Allen Emissionsspektren gemeinsam ist die Lage des Fluoreszenzmaximums bei 475 nm. Eine Betrachtung der absorptionskorrigierten Emission zeigt stark unterschiedliche Quantenausbeuten für die Duplexe. **D3/C3**, **D2/C2** und **D4/C4** zeigen eine ähnliche Fluoreszenzintensität, während **D1/C1** nur etwa die Hälfte an Intensität aufweist. Der Grund dafür liegt in der Richtungsabhängigkeit des Elektronentransfers im Basenstapel. In **D1/C1** ist in 5'-Position ein dT, das die überschüssige negative Ladung des Uridinrestes aufnehmen kann. Deshalb kommt es zu einer Löschung der Fluoreszenz. Befindet sich dT in 3'-Richtung vom PydU wie in **D2/C2**, so findet weit weniger Elektronentransfer statt, und die Fluoreszenzintensität ist höher. Offensichtlich findet eine stärkere Interaktion des PydU mit der Nachbarbase in 5'-Position statt als mit der in 3'-Richtung. Der Ladungstransferprozess läuft in **D3/C3** und **D4/C4** in weitaus geringerem Umfang ab. Hier liegt jeweils ein dA zwischen PydU und einem benachbarten Pyrimidin, was zu einer verringerten Ladungstransfereffizienz führt.

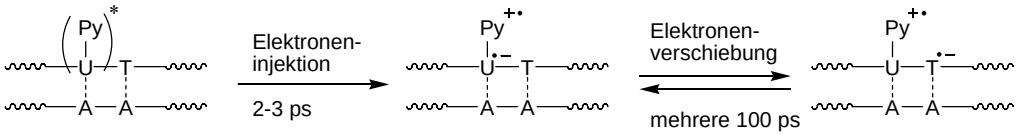


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des reduktiven ET auf eine dem PydU benachbarte Pyrimidinbase.

Mit zeitaufgelöste Messungen der transienten Absorption lassen sich die am Elektronentransfer von PydU auf eine Nachbarbase beteiligten Zustände identifizieren und die Elektronentransferraten bestimmen. Der ladungsgetrennte Zustand mit einem Absorptionsmaximum von 485 nm bildet sich innerhalb von 2-3 ps. Die Besetzung des Grundzustands (364 nm) nimmt dabei ab (ausbleichen).

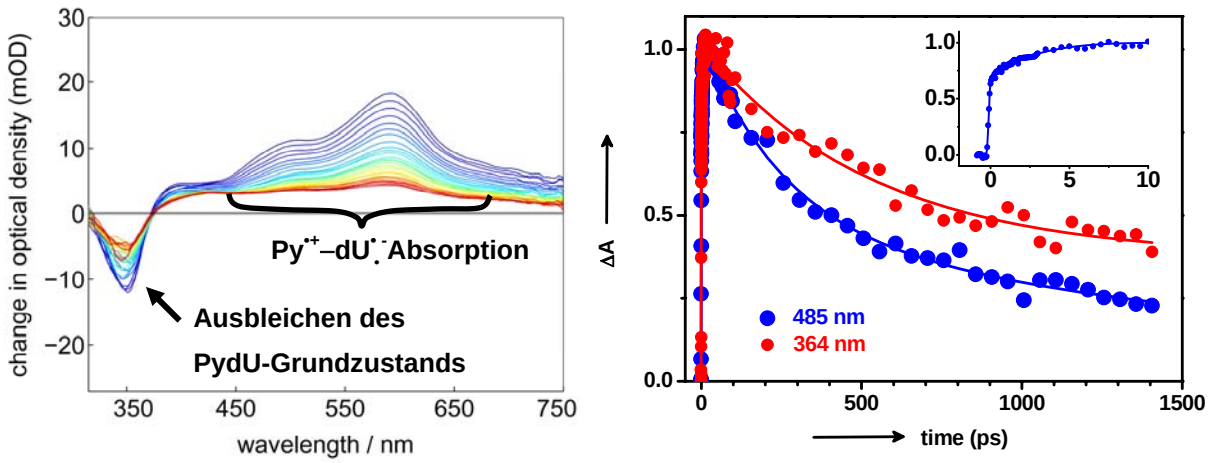


Abbildung 3-5: Zeitaufgelöste Messungen von 350 µM **D1/C1** (10 mM NaP_i, 250 mM NaCl, pH 7). Die zeitaufgelösten *pump-probe*-Spektren von 150 (blau) bis 1500 ps (rot) nach der Anregung (*links*) und die transienten *pump-probe*-Spektren (*rechts*) bei 485 nm ($Py^{+\bullet}$) und 364 nm (Py*). Das Signal der Wiederbesetzung des Grundzustands (rot) wurde invertiert, um es visuell der transienten Absorption des ladungsgetrennten Zustands (blau) anzugleichen. Der Einschub zeigt den Anstieg der transienten Absorption bei 485 nm innerhalb von 3 ps, was der Geschwindigkeit der Elektroneninjektion entspricht.

Die Dynamik der Wiederpopulation des Grundzustandes korreliert nicht mit der Lebenszeit des ladungsgetrennten Zustandes wie die unterschiedliche Steigung der roten und blauen Kurve in Abbildung 3-5 (rechts) zeigt. Das lässt auf einen von der Ladungsrekombination verschiedenen Reaktionsweg schließen. Dabei handelt es sich um den Transfer eines Elektrons auf ein benachbartes Pyrimidin. Dieser Prozess benötigt in Abhängigkeit von der Basensequenz mehrere 100 ps. Anhand dieser Messungen konnten die Vorstellungen vom Ladungstransfer nach dem Modell (s. Abbildung 3-4) bestätigt werden.

3.2 *Abasic-site*-Duplexe von PydU und dem Ethidiumnukleosid

3.2.1 Hintergrund

Die Einführung des *abasic site*-Analogons[300, 301] 1',2'-Didesoxyribose (kurz: *abasic site* oder *Spacer* genannt), führt durch die fehlende Nukleobase zu einem „Loch" im DNA-Basenstapel. Dieser freie Raum wird von den umgebenden Basen in Anspruch genommen und führt zu einer Verzerrung der lokalen Struktur. Das Phosphoramidit dieser Verbindung ist kommerziell erhältlich und lässt sich mit dem Standardprotokoll der DNA-Festphasensynthese einführen.

Der freie Raum an der Stelle der *abasic site* kann z. B. von einem modifizierten Nukleotid mit einem erhöhten Platzbedarf in Anspruch genommen werden. Somit gelangt diese Modifikation in eine Konformation, in der sie mit dem Basenstapel in Wechselwirkung treten kann. In einem regulären Duplex würde für dieselbe Interaktion die Gegenbase aus dem Stapel herausgedreht, oder der Chromophor müsste sich in den bestehenden Stapel interkalieren. Beides führt zu einer starken Strukturstörung im lokalen Umfeld des Chromophors. Die Anwesenheit einer Gegenbase kann auch verhindern, dass der modifizierte Baustein sich vollständig in den Basenstapel einlagert. In jedem Fall bewirkt der Ersatz eines Nukleotids mit einem *Spacer* eine sterische Veränderung im unmittelbaren Umfeld eines künstlichen DNA-Bausteins. Somit kann es zu einer Änderung der elektronischen Wechselwirkungen des Chromophors mit den übrigen Nukleotiden kommen, was in den spektroskopischen Eigenschaften sichtbar wird. Im Folgenden werden die spektroskopischen Eigenschaften von *abasic-site*-Duplexen mit PydU und dem Nukleosidanalogon des Ethidiums betrachtet.

3.2.2 *Abasic-site*-Duplexe von PydU-modifizierten Oligonukleotiden

In den anfänglichen Modellen zum Ladungstransfer in PydU-modifizierten Oligonukleotiden wurde davon ausgegeangen, dass die Pyrengruppe aus dem Basenstapel herausragt und sich der Uridinrest wie ein gewöhnliches Thymidin durch Ausbildung von zwei Wasserstoffbrükken in den DNA-Duplex integriert. Wie die spektroskopische Untersuchung sehr bald zeigte,

sind die Interaktionen des PydUs innerhalb der DNA jedoch in der Realität weitaus komplexer als ursprünglich angenommen. Die Wechselwirkung des Pyrenrestes mit dem Basenstapel führt zu einer Verzerrung der lokalen DNA-Umgebung. Der sterische Anspruch des modifizierten Nukleotids ist also höher als erwartet.

Der Einsatz einer *abasic site* bietet sich an, um die Struktureinflüsse, die durch den Einbau von PydU auf ein Oligonukleotid wirken, besser zu verstehen. Die *Spacer*gruppe hinterlässt freien Platz, der vom PydU zu einer Umorientierung genutzt werden kann. Eine derartige Änderung in der Konformation des Nukleotids in der DNA lässt sich spektroskopisch verfolgen. Als fluoreszierender Strang wird **D3** eingesetzt, da hier die Grundfluoreszenz vergleichsweise hoch ist (vgl. Kapitel 3.1), was die Spektroskopie vereinfacht.

D3	5'-CAG-TCA-TA**X**-ACA-CTG-AT-3'	**X** = PydU
C3	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-TA-5'	
A1	3'-GTC-AGT-AT**S**-TGT-GAC-TA-5'	**S** = *abasic site*
A2	3'-GTC-AGT-A**S**A-TGT-GAC-TA-5'	
A3	3'-GTC-AGT-ATA-**S**GT-GAC-TA-5'	
A4	3'-GTC-AGT-**S**TA-TGT-GAC-TA-5'	
A5	3'-GTC-AGT-ATA-T**S**T-GAC-TA-5'	

Da die genaue Art und somit auch der Umfang der Strukturstörung durch das PydU nicht bekannt sind, werden verschiedene Komplementärstränge zu **D3** synthetisiert, die die *abasic site* in unterschiedlichem Abstand zum PydU tragen. Weil, wie bereits gezeigt, das modifizierte Nukleotid asymmetrisch mit den Nachbarbasen interagiert (vgl. Kapitel 3.1), werden die Modifikationen in unterschiedlichen Richtungen vom PydU in die DNA eingebaut.

3.2.2.1 Absorptions- und CD-Spektren

Die UV-Vis-Spektren der Duplexe **D3/C3** und **D3/A1** stimmen sehr gut überein. Sie haben beide ein breites Maximum der Pyrenabsorption bei 356 nm. Der Duplex **D3/A3** weist dasselbe Maximum auf, zeigt aber eine schmalere Bande. Die Duplexe **D3/A2**, **D3/A4** und **D3/A5** absorbieren am stärksten bei 350 nm und weisen dieselbe schmale Bandenform auf wie **D3/A3**.

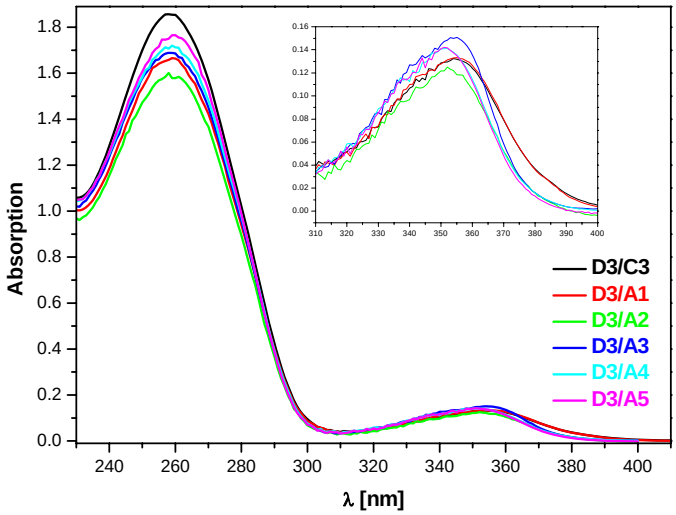


Abbildung 3-6: Absorptionsspektrum von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Diese Unterschiede in der Pyrenabsorption geben einen Hinweis auf eine unterschiedliche Orientierung des Pyrenrestes bezüglich des Basenstapels. Wie von PydG-Duplexen her bekannt ist[16], weist eine schmale hypsochrom verschobene Bandenform auf einen Pyrenrest hin, der wenig mit den Nachbarbasen interagiert. **D3/C3** und **D3/A1** hingegen lassen durch die breitere Bande bei größerer Wellenlänge vermuten, dass die Pyrengruppe teilweise in den Basenstapel interkaliert.

Die CD-Spektren unterscheiden sich in mehreren Merkmalen, was in Tabelle 3-1 zusammengefasst ist. Die Lage des Minimums bei kleinen Wellenlängen variiert von ca. 240 nm bei **D3/C3**, **D3/A1**, **D3/A2** und **D3/A4** bis ca. 250 nm bei den Duplexen **D3/A3** und **D3/A5**. Beide tragen die *abasic site* in 3'-Richtung vom PydU aus gesehen.

Tabelle 3-1: Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale aus den CD-Spektren der *abasic-site* Duplexe von **D3**

Duplex	1. Null-durchgang [nm]	Minimum B-DNA [mdeg/nm]	2. Null-durchgang [nm]	Maximum B-DNA [mdeg/nm]	zusätzliche Signale	Relative Position *abasic site**
D3/C3	227	-6.5/241	261	2.9/275	-	-
D3/A1	229	-4.0/240	**253**	4.2/275	-	0
D3/A2	229	-4.4/243	259	5.3/275	-	+1
D3/A3	229	-3.7/**252**	262	4.2/275	-1.9/238	-1
D3/A4	227	-3.3/237	261	6.3/**280**	-1.5/**255**	+2
D3/A5	227	-4.4/**249**	262	4.0/275	-	-2

* Die Zahl bezeichnet den Abstand der *abasic site* von der regulären Gegenbase.
Das Vorzeichen gibt die Richtung des *mismatches* vom PydU aus gesehen an (+ = 5', - = 3').

Die Bandenform bei **D3/A3** und **D3/A4** weicht durch eine zusätzliche Schulter im Minimum ab. In **D3/A3** liegt diese bei 238 nm, in **D3/A4** bei 255 nm. Somit zeigt nur **D3/A5** kein Signal um 240 nm. Dieses Signal kann somit dem GC-Paar in 3'-Richtung zugeordnet werden.
Der Nulldurchgang des B-DNA-Signals liegt bei ca. 260 nm. Eine Ausnahme stellt der direkte Fehlpaarungsduplex **D3/A1** mit 253 nm dar. Das Maximum liegt in allen Duplexen bis auf **D3/A4** bei 275 nm, in letztgenanntem bei 280 nm.

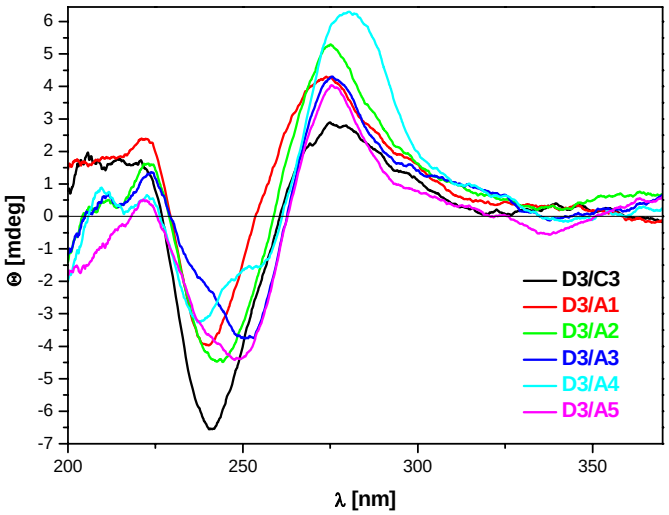


Abbildung 3-7: CD-Spektren von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.

Die CD-Spektren beweisen die strukturelle Vielfalt dieser Doppelstränge. Offenbar befinden sich alle *abasic sites* in einem hochsensiblen Bereich der DNA-Struktur. Das PydU reagiert sehr empfindlich auf die Anwesenheit derartiger Basenfehlpaarungen, selbst wenn sich diese zwei Basen entfernt befinden.

3.2.2.2 Emissionsspektren und Schmelzpunkte

Für die Emissionsspektren würde man theoretisch erwarten, dass der Einbau einer dem PydU Raum schaffenden Modifikation in unmittelbarer Nähe des artifiziellen Nukleotids die Ladungstransfereigenschaften verbessert und die Fluoreszenz dieser Doppelstränge somit abnimmt. Eine *Spacer*gruppe in größerer Entfernung sollte keinen großen Einfluss mehr auf das Fluoreszenzverhalten nehmen und dementsprechend wieder zu einer höheren Emission führen. Tatsächlich weisen die Fluoreszenzen kein derart einheitliches Verhalten auf.

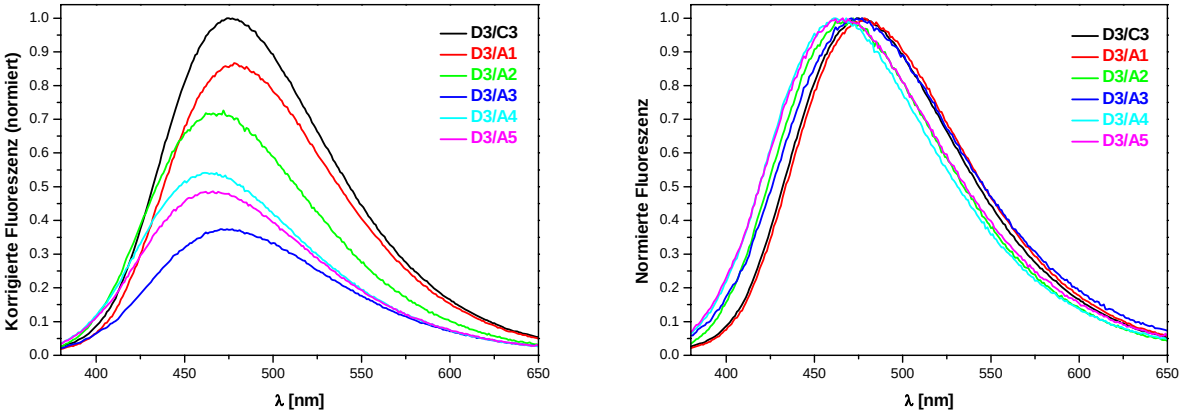


Abbildung 3-8: Emissionsspektren (λ_{exc}= 360 nm) von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) (*links*: absorptionskorrigiert, *rechts*: normiert).

Bei dem am stärksten fluoreszierenden Duplex handelt es sich um den *match*-Duplex **D3/C3**. Alle anderen fluoreszieren weniger. Neben der Löschung der Fluoreszenz ist auch eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu beobachten. Dabei weisen **D3/C3**, **D3/A1** und **D3/A3** ein Maximum bei 475 nm auf, während **D3/A2**, **D3/A4** und **D3/A5** ihre maximale Fluoreszenz bei 465 nm zeigen. Diese Daten sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Daten aus den Fluoreszenzspektren der *abasic-site* Duplexe von **D3**

Duplex	Fluoreszenzmaximum [nm]	Fluoreszenzintensität [%]	Relative Position *abasic site**	Schmelztemperatur [°C]**
D3/C3	475	100	-	54
D3/A1	475	85	0	50
D3/A2	**465**	65	+1	50
D3/A3	475	40	-1	46
D3/A4	**465**	55	+2	44
D3/A5	**465**	50	-2	37

* siehe Tabelle 3-1

**gemessen: 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i, 250 mM NaCl

Im Wesentlichen gibt es zwei Gründe für eine Löschung der Fluoreszenz in einem dieser Duplexe. Erstens kann Ladungstransfer innerhalb der DNA zu einer Löschung führen, zweitens können Strukturparameter die Emission verringern. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Strukturänderungen, denen das PydU-Nukleotid nach photochemischer Anregung unterliegt. Aus zeitaufgelösten Messungen am Nukleosid ist bekannt, dass sich der Winkel zwischen dem Pyrenrest und dem Uridinrest im photoangeregten Zustand verkleinert.[19] Dadurch vergrößert sich die elektronische Kopplung und der ladungsgetrennte Charakter nimmt zu.

Wasserstoffbrücken begünstigen dabei die Koplanarisierung und somit die Ladungstrennung im System. Ähnliches passiert mit PydU in DNA. Dabei spielt die Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerkes mit Nachbarbasen oder Wassermolekülen der Solvathülle eine entscheidende Rolle für die Ladungstransfereffizienz.

Die Schmelzpunkte von **D3/A4** und **D3/A5** liegen deutlich niedriger als in den anderen Duplexen (s. Kapitel 7.6.5). Es scheint hier eine strukturelle Störung vorzuliegen, die das Netzwerk aus Wasserstoffbrücken in der PydU-Umgebung stark beeinflusst. Die elektronische Kopplung im PydU ist hier bei photochemischer Anregung stärker als in den anderen Duplexen und somit findet mehr Ladungstransfer statt. Die Verschiebung des Emissionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen, sowie die im Vergleich zu **D3/C3** schmalere Absorptionsbande liefern Hinweise darauf, dass der Pyrenrest wenig mit dem Basenstapel wechselwirkt. Möglicherweise kommt es hier zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit der Hydrathülle, die den Ladungstransfer begünstigen.
Im Fall des Duplexes **D3/A1** deutet die Fluoreszenzlöschung auf eine Verbesserung des Ladungstransfers durch einen Abbau sterischer Spannungen im Vergleich zum Duplex **D3/C3** hin. Deshalb bleiben auch die Absorptionseigenschaften und das CD-Spektrum, sowie die Lage des Fluoreszenzmaximums sehr ähnlich.

Eine Beurteilung der Duplexe **D3/A2** und **D3/A3** muss unter dem Gesichtspunkt der Richtungsabhängigkeit des Ladungstransfers erfolgen. Wie bereits bei den Duplexen in Kapitel 3.1 erwähnt, fluoresziert ein PydU-Duplex, der in 5'-Richtung ein dT als Elektronenakzeptor trägt weniger, als wenn es sich in 3'-Position befindet. Der Elektronentransfer läuft also bevorzugt in Richtung 5'-Ende vom PydU aus betrachtet. Die *abasic site* in 3'-Richtung im Gegenstrang von Duplex **D3/A3** scheint diesen zu begünstigen und bewirkt somit eine starke Löschung der Emission, während die Sequenz in **D3/A2** durch die fehlende Nukleobase in 5'-Position von PydU zu einer deutlichen Störung des Elektronentransfers und somit einer hohen Restfluoreszenz führt. Offensichtlich ist das Vorhandensein eines intakten Basenpaars in 5'-Richtung von PydU von großer Bedeutung für den Ladungstransfer.
Diese Effekte werden durch die asymmetrische Wechselwirkung des PydU-Nukleotids mit den Nachbarbasen hervorgerufen. Da seine Struktur im Doppelstrang noch nicht bekannt ist, sind weiterführende Interpretationen jedoch spekulativ. Der einzige zuverlässige und deutbare Hinweis auf die veränderte Oligonukleotid-Architektur in **D3/A2** und **D3/A3** ist die unterschiedliche Lage des Fluoreszenzmaximums, das im Falle des schlechter löschenden Duple-

xes bei 465 nm liegt, was auf ein wenig mit dem Basenstapel interagierendes Pyren verweist, während in **D3**/**A3** die Pyrenemission mit einem Maximum von 475 nm von einem weitgehend in den Basenstapel integrierten Aromaten zeugt.

3.2.3 *Abasic-site*-Duplexe des Ethidiumnukleosids

Bei dem Ethidiumnukleosid handelt es sich um einen artifiziellen Phenanthridinium-Baustein, der über einen Diol-Linker in die DNA eingebaut wird. Dieses künstliche Nukleosid kann in Abhängigkeit seines Reaktionspartners sowohl als ein photochemisch anregbarer Lochdonor als auch als Elektronendonor dienen. Die Synthese dieses Nukleosidanalogons und dessen Einbau in DNA wurden ebenfalls in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelt. Ethidium zeigt in DNA eine charakteristische Fluoreszenz bei hoher Quantenausbeute.[24, 25, 29]

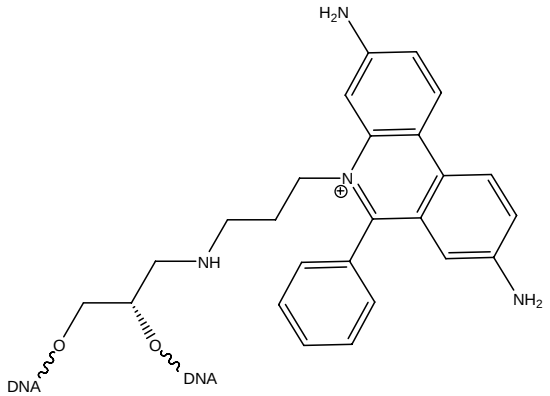


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung des Ethidiumnukleosids in DNA.

Mit dem Ethidiumbaustein verfügt man über einen Chromophor, der ohne Zugabe eines starken Elektronen- oder Lochakzeptors keinen Ladungstransfer in DNA erzeugt. Mit diesem System lassen sich deshalb sehr gut die sterischen Einflüsse dieses kationischen Nukleotids auf die Fluoreszenzeigenschaften des Interkalators untersuchen. Da der sterische Anspruch des artifiziellen Nukleosids sehr groß ist, sind Untersuchungen des Fluoreszenzverhaltens mit *abasic site*-Duplexen vielversprechend.

Auch hier wird auf die bereits beim PydU erfolgreiche Synthesestrategie für die mit einem *Spacer* modifizierten Gegenstränge zurückgegriffen.

E	5'-CAG-CAT-GTT-**E**AT-GCT-G-3'	**E** = Ethidiumnukleotid
C5	3'-GTC-GTA-CAA-CTA-CGA-C-5'	
A6	3'-GTC-GTA-CAA-**S**TA-CGA-C-5'	**S** = *abasic site*
A7	3'-GTC-GTA-CA**S**-CTA-CGA-C-5'	
A8	3'-GTC-GTA-CAA-C**S**A-CGA-C-5'	
A9	3'-GTC-GTA-C**S**A-CTA-CGA-C-5'	
A10	3'-GTC-GTA-CAA-CT**S**-CGA-C-5'	

3.2.3.1 Absorptions- und CD-Spektren

Die Ethidium enthaltenden Duplexe verhalten sich in ihren optischen Eigenschaften wesentlich einheitlicher als die zuvor besprochenen PydU-Duplexe und erfordern deshalb keine detaillierte Aufschlüsselung der wirksam werdenden Einflüsse durch den Einbau der *abasic sites*. Das Absorptionsspektrum zeigt die für Ethidium modifizierte DNA typische Bande mit einem Maximum bei 540 nm in **E/C5** und **E/A6** und bei ca. 530 nm in den restlichen Duplexen.

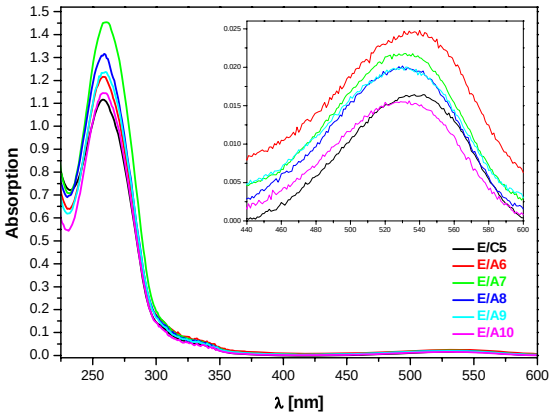


Abbildung 3-10: UV-Vis-Spektren von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

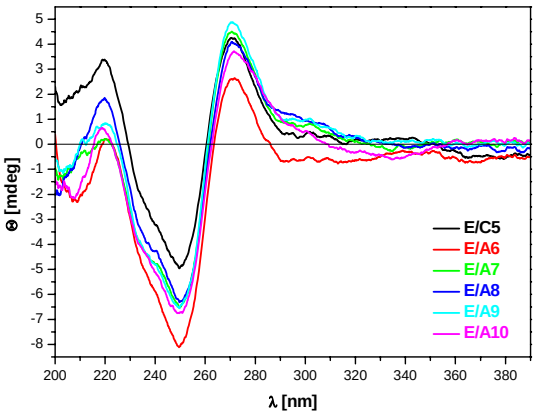


Abbildung 3-11: CD-Spektren von 2.5µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.

Die CD-Spektren sind sich alle sehr ähnlich. Sie zeigen den typischen Verlauf von B-DNA und weisen bei ca. 238 nm eine leichte Schulter auf. Der Ethidiumchromophor erzeugt keine CD-Bande. Die größten Abweichungen zeigt der Duplex **E/C5**, was auf eine Struktur hinweist, die die Interkalation des Ethidiums verändert. Diese Interkalation kann durch das An-

bieten einer *abasic site* verändert werden. Wie aus den Daten der Duplexe **E/A6- E/A10** ersichtlich ist, handelt es sich um eine sehr einheitliche Struktur.

3.2.3.2 Emissionsspektren

Weitere Aufschlüsse über die sterischen Einflüsse auf das spektroskopische Verhalten lassen sich aus den Fluoreszenzspektren gewinnen.

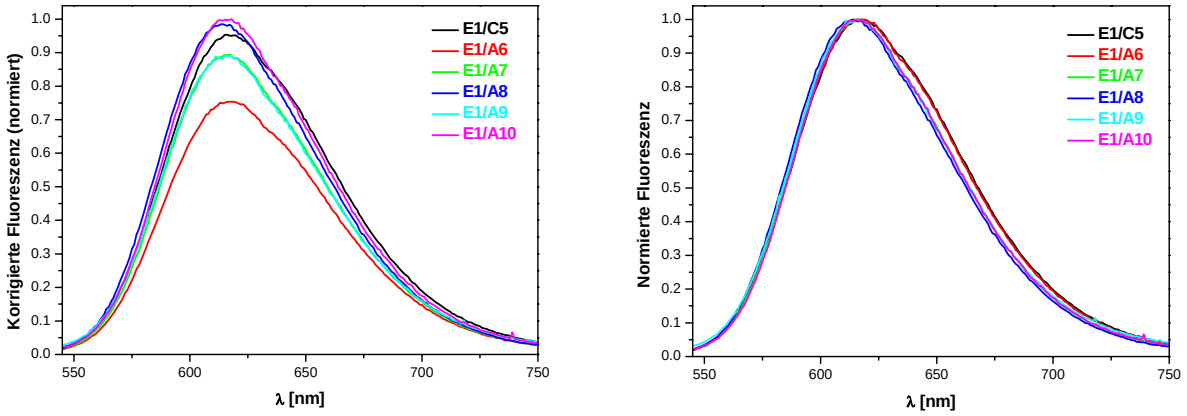


Abbildung 3-12: Emissionsspektren (λ_{exc}= 530 nm) von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) (*links*: absorptionskorrigiert, *rechts*: normiert).

Die Fluoreszenzdaten sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Daten aus den Fluoreszenzspektren der *abasic-site* Duplexe von **E**

Duplex	Fluoreszenzmaximum [nm]	Fluoreszenzintensität [%]	Relative Position *abasic site**
E/C5	617	100	-
E/A6	617	79	0
E/A7	616	94	+1
E/A8	615	104	-1
E/A9	615	95	+2
E/A10	616	105	-2

* siehe Tabelle 3-1

Das Fluoreszenzmaximum zeigt kaum eine Verschiebung in den einzelnen Duplexen, das Löschverhalten zeigt folgende Tendenzen: Die größte Löschung der Fluoreszenz findet sich

bei **E/A6**, der die *mismatch site* als Gegenbase zum Ethidium trägt. Für die übrigen Duplexe gilt: Befindet sich die *abasic site* in 5'-Richtung vom artifiziellen Nukleotid aus betrachtet, so ist die Fluoreszenz schwächer als in **E/C5**, liegt die Modifikation in 3'-Richtung vom Ethidiumbaustein, so erhöht sich die Emission im Vergleich zum *match*-Duplex. Dabei spielt es keine Rolle, ob sich die fehlende Nukleobase in unmittelbarer Nachbarschaft zum Chromophor oder weiter davon entfernt findet.

3.3 Zusammenfassung der Untersuchung des Ladungstransfers in Oligonukleotiden

Der Elektronentransfer in PydU-haltigen Oligonukleotiden vollzieht sich in einem mehrstufigen Prozess. Aus zeitaufgelösten Messungen konnte gezeigt werden, dass sich nach der photochemischen Anregung des PydUs ein ladungsgetrennter Zustand ausbildet, der aus dem Pyrenylradikalkation und dem elektronisch stark gekoppelten Uridinradikalanion besteht. Das Überschusselektron des Uridinradikalanions kann auf ein im Basenstapel benachbartes Thymidin übertragen werden. Dieser Elektronentransferprozess führt zu einer Löschung der Fluoreszenz des PydU-Nukleotids.

Der Einbau einer *abasic site* in den Komplementärstrang zu einer PydU-haltigen DNA-Sequenz führt zu einer Verbesserung der Ladungstransfereigenschaften des modifizierten Oligonukleotids im Vergleich zu einem herkömmlichen Duplex. Das zeigt die Komplexität der Wechselwirkungen des PydUs mit den Nukleotiden der DNA, die eine Revision der ursprünglichen Modellvorstellung notwendig machen. Vor allem die Beobachtung der Fluoreszenzeigenschaften hilft dabei zu verstehen, wie sich PydU tatsächlich in der DNA verhält.
Die durch das künstliche Nukleotid hervorgerufene Störung erstreckt sich mindestens über zwei Basenpaare in jede Richtung. Dabei scheint die Störung an der Stelle der direkten Gegenbase selbst sehr gering zu sein. Das zeigen die großen Ähnlichkeiten in den UV-Vis-, CD- und Fluoreszenzdaten von **D3/A1** und **D3/C3**.
Die Auswirkungen in der Entfernung von zwei Basenpaaren sind ein wenig schwächer als in direkter Nachbarschaft zum PydU. Das Fehlen eines intakten Basenpaares an diesen beiden Positionen führt zu einer Destabilisierung der Duplexe **D3/A4** und **D3/A5**, was sich in einem

erniedrigten Schmelzpunkt zeigt. Die Absorptionsbande der Duplexe wird schmaler und das Emissionsmaximum verschiebt sich zu kleineren Wellenlängen. Das deutet darauf hin, dass zum einen in der Absorption im regulären Duplex Grundzustandswechselwirkungen von PydU mit benachbarten Basenpaaren in größerer Entfernung eine Rolle spielen und zum anderen, dass die Pyrengruppe nicht durch eine (teilweise) Interaktion mit dem Basenstapel in ihrer Dynamik eingeschränkt ist.

In direkter Nachbarschaft zum PydU wird die stark asymmetrische Ausrichtung des artifiziellen Bausteins sichtbar. Ein intaktes Basenpaar in 5'-Richtung ist Voraussetzung für einen effizienten Ladungstransfer. Deswegen ist die Fluoreszenzlöschung in **D3/A2** im Vergleich zu **D3/A3** um einiges geringer. Befindet sich in 3'-Richtung freier Platz, so führt das zu einer sprunghaften Verbesserung der Elektronentransfereffizienz wie an der Fluoreszenzintensität von **D3/A3** abgelesen werden kann. Auch hier gehen die schlechteren Ladungstransfereigenschaften mit einer Verschiebung des Emissionsmaximums zu kleineren Wellenlängen einher.

Die schmalen Absorptionsbanden der Duplexe **D3/A2** und **D3/A3** zeigen, dass auch hier ein gewisser Anteil an Grundzustandswechselwirkung durch die Interaktion von PydU mit dem Nachbarbasenpaar fehlt. Interessanterweise weist dabei die Lage des Absorptionsmaximums bei höherer Wellenlänge (**D3/A3**) direkt auf die Anwesenheit einer intakten Umgebung in 5'-Richtung und somit indirekt auf die Effizienz des Elektronentransfers hin.

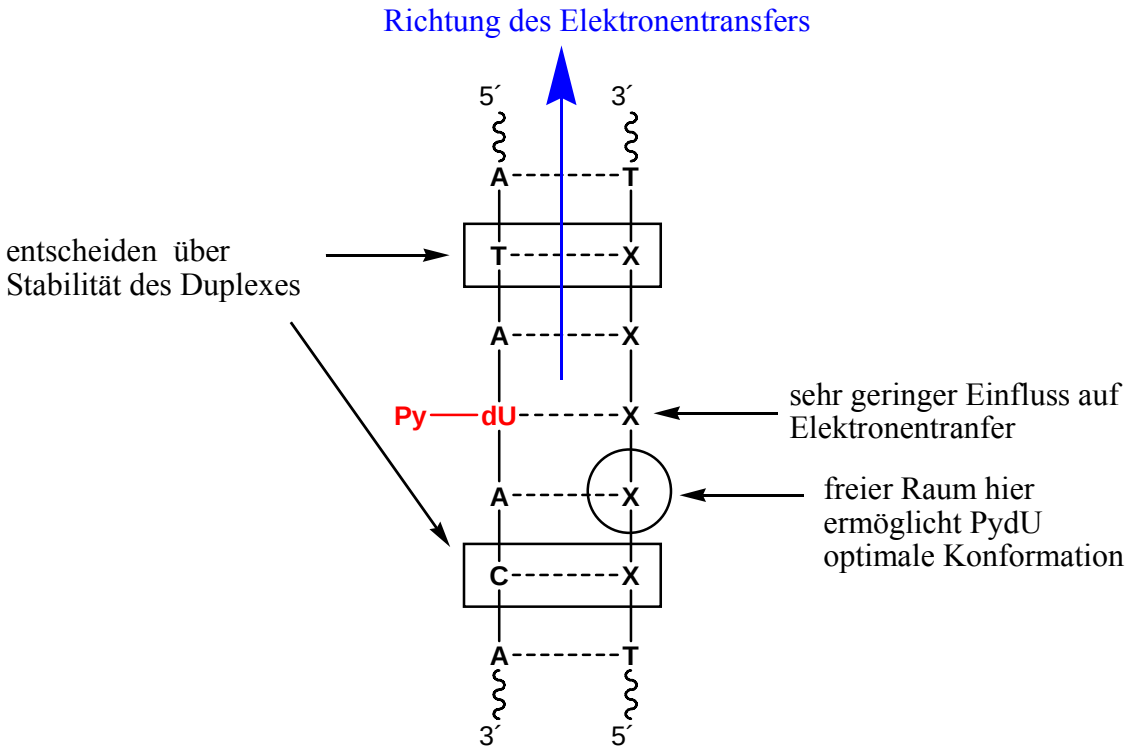


Abbildung 3-13: Schematische Zusammenfassung der wichtigsten Strukturparameter von PydU in DNA.

Die Erkenntnisse über die Struktur der Ethidium-Duplexe lassen sich kurz zusammenfassen. Komplexe Grundzustandswechselwirkungen mit benachbarten Basenpaaren spielen hier die entscheidende Rolle. Die Fluoreszenzeigenschaften werden im Wesentlichen bestimmt durch das unterschiedliche Ausmass an Interkalation in den Basenstapel. Dabei hat die Gegenbase diesbezüglich den größten Einfluss. Vermutlich wird in diesen Duplexen die Gegenbase herausgedreht und dadurch die Struktur lokal stark gestört. Befindet sich dagegen freier Platz an dieser Stelle, so kann das Ethidium besser interkalieren. Das Ethidiumnukleosid liegt unsymmetrisch zwischen den beiden Nachbarbasen und wechselwirkt mit den Basen in 5'-Richtung stärker. Insgesamt betrachtet ist der Einfluss einer *abasic site* auf die spektroskopischen Eigenschaften des Ethidiumnukleosids jedoch sehr gering.

4 Ladungstransfer zwischen Oligonukleotiden und Peptiden

Zur Untersuchung des Ladungstransfers in Peptid-DNA-Systemen benötigt man ein Donor-Akzeptor-System, in dem der Ladungsdonor in die DNA integriert und der Ladungsakzeptor an ein Peptid gebunden wird oder umgekehrt. Dabei müssen die Veränderungen mindestens eines Teils des gewählten Systems mit möglichst einfachen Methoden verfolgt werden können.

Das erste Ziel im Rahmen dieser Arbeit bestand darin, einen Elektronenakzeptor zu finden, der sich an ein Peptid anknüpfen und eventuell auch in DNA einbauen lässt. Diese Peptid-DNA-Systeme werden dann mit verschiedenen Methoden untersucht. In einem zweiten Schritt soll der Ladungsakzeptor schliesslich in Form eines Peptid-DNA-Konjugates kovalent an ein Oligonukleotid geknüpft werden. Im Sinne einer modernen Synthesestrategie ist es dabei wünschenswert, wenn sich sowohl die modifizierten Peptide mittels SPPS als auch die Peptid-DNA-Konjugate mit einem Festphasenprotokoll darstellen lassen können.

4.1 Wahl des Elektronenakzeptors

Für die Modifikation von Oligonukleotiden stehen in unserer Arbeitsgruppe eine Reihe von photochemisch anregbaren Ladungsdonoren (sowohl oxidative als auch reduktive) zur Verfügung, mithilfe derer der Ladungstransport untersucht werden kann (vgl. Kapitel 2.1.2.7). Dabei stellen das PydU (**1**) als synthetisch gut zugänglicher Baustein für den Elektronentransport und das Ethidiumnukleosid als potentieller Loch- und Elektronendonor die wichtigsten DNA-Modifikationen dar.
Der Elektronenakzeptor soll deshalb ein Reduktionspotenial besitzen, dass es ihm ermöglicht, Elektronen von diesen vorhandenen modifizierten Nukleotiden aufzunehmen. Sein Absorptionsspektrum soll sich deutlich von dem des Ladungsdonors unterscheiden, damit letzterer selektiv angeregt werden kann. Der Akzeptor soll synthetisch leicht zugänglich und für den Einbau in Peptide und Peptid-DNA-Konjugate geeignet sein.

Methylviologen erfüllt die spektroskopischen Anforderungen. Entsprechende Vorversuche sollen nun zeigen, ob es tatsächlich als Elektronenakzeptor für modifizierte Oligonukleotide geeignet ist und in den geplanten Versuchen zum Ladungstransfer zwischen Oligonukleotiden und Peptiden eingesetzt werden kann.

4.1.1 Methylviologen als Elektronenakzeptor

Methylviologen (*N,N*'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid, Handelsname: *Paraquat*) und seine Derivate stellen sehr potente Herbizide dar. Durch ihr starkes Oxidationsvermögen führen sie bereits in geringen Dosen innerhalb kurzer Zeit zum Absterben von Pflanzen. Durch ihre einfache synthetische Zugänglichkeit und die kostengünstigen Ausgangsstoffe entwikkelten sie sich zu sehr begehrten Pflanzenschutzmitteln.[302-305]
Ihre Wasserlöslichkeit und ihre Toxizität auch für höhere Organismen macht sie zu sehr stark wassergefährdenden Stoffen. Diese extrem umweltgefährdenden Verbindungen werden deshalb heute in den Industriestaaten nicht mehr eingesetzt. Methylviologen und seine Derivate können beim Menschen Parkinson auslösen. Die genauen Mechanismen dafür sind bislang unbekannt.[306, 307]

N,N'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid stellt aufgrund seines Redoxpotentials (-0.3 V)[252] einen starken Elektronenakzeptor dar. Es reagiert oxidierend genug, um sowohl von PydU als auch vom Ethidiumnukleosid ein Elektron aufzunehmen.

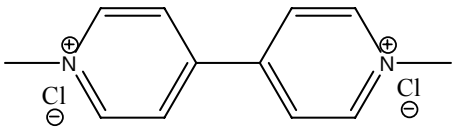


Abbildung 4-1: Struktur des Methylviologens. Das Kation wird als MV^{2+} abgekürzt, die Art des Anions wir in der Regel nicht angegeben.

Durch die elektrostatische Anziehung zwischen dem Dikation des Methylviologens und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA bindet der Elektronenakzeptor sehr stark an das Molekül. Die beiden Pyridinium-Ringe im Dikation stehen etwa in einem 40°-Winkel zueinander, des Monoradikalkation ist planar.[308, 309] Diese Struktur verhindert ein Interkalieren des Dikations in den Basenstapel.

Das Bipyridinium-Salz besitzt gute Voraussetzungen, um als Elektronenakzeptor in einem Peptid-DNA-System eingesetzt zu werden. Methylviologen wurde bereits in zahlreichen Arbeiten als nicht kovalenter Elektronenakzeptor in DNA-Systemen verwendet. Als Elektronendonor diente dabei interkaliertes Ethidiumbromid. Wurde dieses photochemisch angeregt, so kam es zu einem Elektronentransfer auf das am Phopshatrückgrat der DNA sitzende Methylviologen.[177, 178, 310, 311]

4.1.2 Vorversuche

Vorversuche mit nicht kovalent gebundenem Methylviologen und donorsubstituierter DNA sollen zeigen, ob sich der Elektronentransfer in der erwarteten Löschung der Fluoreszenz des Elektronendonors auswirkt.[177] Die Auswertung der Fluoreszenzlöschexperimente erfolgt mittels der sog. Stern-Volmer-Auftragung. Dabei wird in doppelt logarithmischer Auftragung das Verhältnis der maximalen Fluoreszenzintensität des Elektronendonors (I_0) zur Fluoreszenzintensität mit der entsprechenden Elektronenakzeptormenge (I) gegen die zugegebene Menge an Quencher dargestellt.

Eine erste Versuchsreihe benutzt den nicht kovalent gebundenen Elektronendonor Ethidiumbromid, der in eine statistische DNA-Sequenz interkaliert und nicht kovalent gebundenes Methylviologen, das sich an das Rückgrat der DNA anlagert. Beobachtet wird der Rückgang der Ethidiumfluoreszenz.

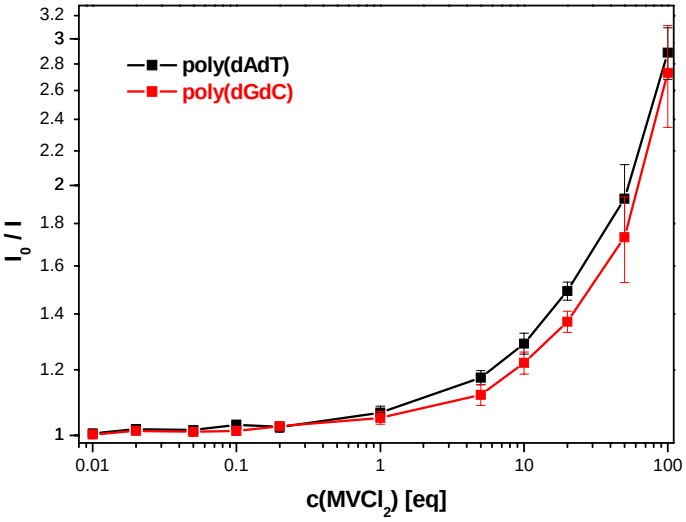


Abbildung 4-2: Stern-Volmer-Auftragung von Ethidiumbromid-dotierter DNA in 10 mM NaP_i (pH 7) mit Methylviologendichlorid als Fluoreszenzquencher (λ_{exc} =500 nm). Als DNA-Sequenzen werden poly(dAdT) (0.5 mM) und poly(dGdC) (0.6 mM) verwendet. Diese werden mit 0.1 bis 5 µM Ethidiumbromid versetzt und anschließend mit Methylviologendichlorid titriert.

Das System aus Ethidiumbromid als Elektronendonor und Methylviologendichlorid als Elektronenazeptor wirkt auf GC- und AT-reiche Oligonukleotidsequenzen leicht unterschiedlich. Das dichtere Wasserstoffbrückennetz begünstigt in GC-reichen Sequenzen den Elektronentransfer zwischen dem interkalierenden Ethidiumbromid und dem am DNA-Rückgrat sitzenden Elektronenakzeptor.

Eine zweite Reihe von Versuchen testet, welche vorhandenen Donor-modifizierten Oligonukleotide sich prinzipiell für Fluoreszenzlöschexperimente mit Methylviologenderivaten eignen. Exemplarisch wurden dafür die PydU-enthaltenden Duplexe **D1/C1, D2/C2, D3/C3** und **B/C8** sowie der PtzdU-enthaltender Duplex **Z1/C9** untersucht. Mit allen verwendeten modifizierten Oligonukleotiden lässt sich ein Elektronentransfer auf das nicht kovalent gebundene Methylviologen nachweisen. Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4 enthalten dieselbe Information, links als Stern-Volmer-Plot, rechts als Auftragung der Restfluoreszenz. Aus Gründen der Anschaulichkeit werden die Daten aus den Fluoreszenz-Experimenten in den folgenden Abschnitten nicht als Stern-Volmer-Diagramme, sondern als Fluoreszenzintensitäten gegen zugegebene Quenchermenge aufgetragen. Um diese beiden Auftragungsmethoden im direkten Vergleich zu sehen, sind sie an dieser Stelle gegenübergestellt.

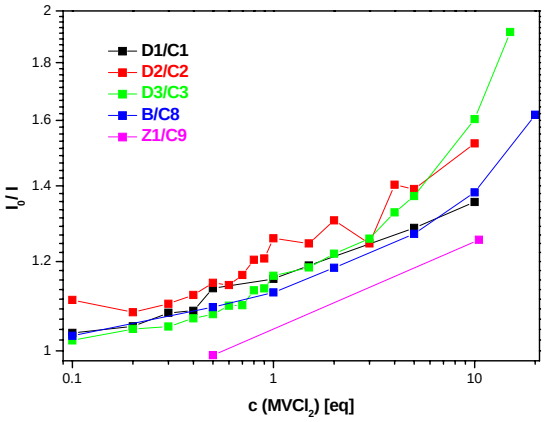


Abbildung 4-3: Stern-Volmer-Auftragung von 5 µM Duplexen in 10 mM NaP_i

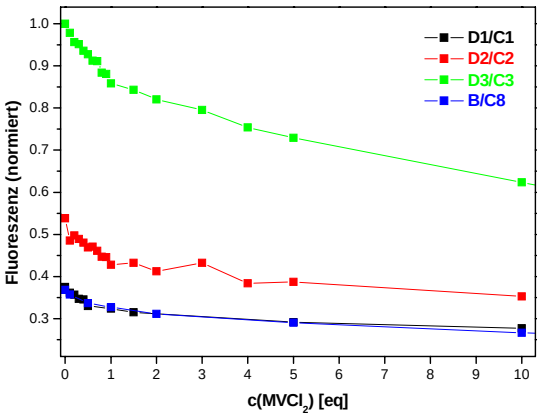


Abbildung 4-4: Normierte Fluoreszenz von 5 µM Duplexen in 10 mM NaP_i (**Z1/C9** fehlt aufgrund der geringen absoluten Fluoreszenz)

Die Untersuchungen ergeben, dass Methylviologen unabhängig von der Art des Elektronendonors als Akzeptor eingesetzt werden kann. An der Steigung beider Graphen erkennt man deutlich, dass das PydU-haltige System **D3/C3** am besten für die Untersuchung der Fluoreszenzlöschung geeignet ist. Zum einen besitzt es eine sehr hohe Grundfluoreszenz und zum anderen spricht es sehr sensibel auf die Anwesenheit des Elektronenakzeptors an.

4.1.3 Methylviologen in DNA

Da zum einen in den Vorversuchen die Eignung des Methylviologens als Elektronenakzeptor unter Beweis gestellt wurde, und zum anderen durch Alkylierung von 4,4'-Bipyridin sehr einfach verschiedene Derivate vom Methylviologentyp[312, 313] dargestellt werden können, wurde der Versuch unternommen, ein artifizielles Nukleosid des Methylviologens zu synthetisieren. Damit ließe sich das vorhandene Repertoire an im Sichtbaren spektroskopierbaren Elektronendonoren in der DNA erweitern, da Methylviologen selbst im Sichtbaren kaum absorbiert. Sobald es aber ein Elektron aufnimmt und zum radikalischen Monokation wird, färbt es sich tiefblau (λ_{max}= 603 nm, ε_{603nm} =12000 $M^{-1}cm^{-1}$)[314]. Dieses Radikal ist aufgrund seiner Mesomeriestabilisierung sehr langlebig und unter geeigneten Bedingungen (v. a. Sauerstoffausschluss) über mehrere Tage in Lösung stabil. Dieses Reaktionsprodukt würde sich auch in einem Oligonukleotid zeitaufgelöst beobachten lassen.

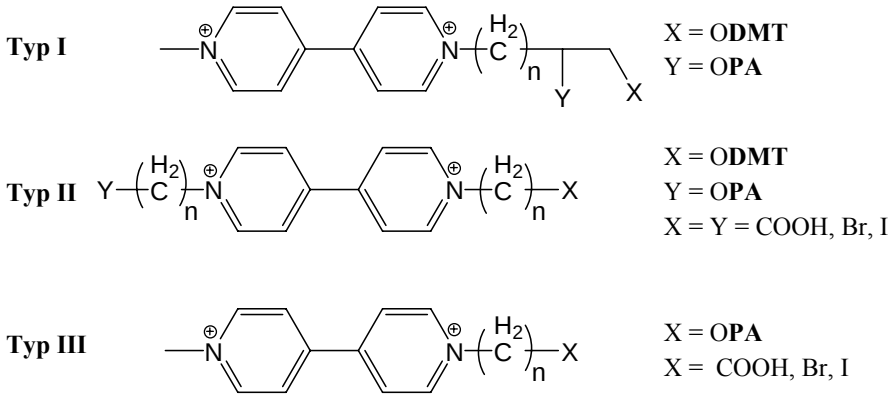


Abbildung 4-5: Klassifizierung der Methylviologenbausteine zum Einbau in die DNA. Typ I enthält eine Diol-Einheit, die als Mimetikum für die 2'-Desoxyriboseeinheit eines natürlichen Nukleotids dient. Über die Länge n des Linkers lässt sich die Flexibilität des Moleküls bei der Interaktion mit dem Basenstapel beeinflussen. Typ II stellt eine an beiden Pyridinringen funktionalisierte Variante von Typ I dar. Als Alternative zur direkten Inkorporation des artifiziellen Nukleotids dient die symmetrische Substitution mit Carboxylfunktionen oder Halogeniden, die an 5'-terminal aminomodifizierte Oligonukleotide angeknüpft werden können. Die zweite Funktionalität kann dabei zur kovalenten Anbindung des N-Terminus eines Peptids dienen und somit die Synthese eines Oligonukleotid-Peptid-Konjugates ermöglichen. Typ III ist eine Variante von Typ II, die nur eine terminalen Anknüpfung an DNA erlaubt.

Es ist eine Reihe von Ansätzen zur Darstellung Methylviologen-modifizierter Oligonukleotide denkbar. Die zweifache N-Alkylierung des Bipyridins ist notwendig, um die leichte Reduzierbarkeit des Methylviologenderivats zu erhalten.[315, 316] Das Ziel besteht darin, an ein N,N'-dialkyliertes Bipyridin reaktive Gruppen anzubringen, die die direkte Kupplung während der

DNA-Festphasensynthese erlauben. Alternativ können Funktionalitäten an dem Bipyridinderivat eingeführt werden, die eine Kupplung mit 5'-OH-modifizierter DNA[148, 317-320] an der festen Phase ermöglichen. Für diese 5'-terminale Anknüpfung ist nur eine funktionelle Gruppe an einem Derivat des N-Methyl-4,4'-bipyridin (**6**) nötig.

Es gelang die Darstellung verschiedener Derivate. [321, 322] Da sich bei der schrittweisen Alkylierung des Bipyridins die Polarität von Edukt und Produkt sehr stark unterscheiden, lässt sich bei geschickter Wahl des Lösungsmittels ein Ausfallen des Produkts aus der Reaktionslösung erreichen. Dies verhindert eine Zweifach-Alkylierung an beiden Pyridinringen und führt zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auf die Produktseite. In der Regel spielt es kaum eine Rolle, in welcher Reihenfolge die Alkylsubstituenten an den N-Positionen eingeführt werden. Methylsubstituiertes Bipyridin ist ein hinreichend reaktives Edukt für eine weitere Alkylierung.

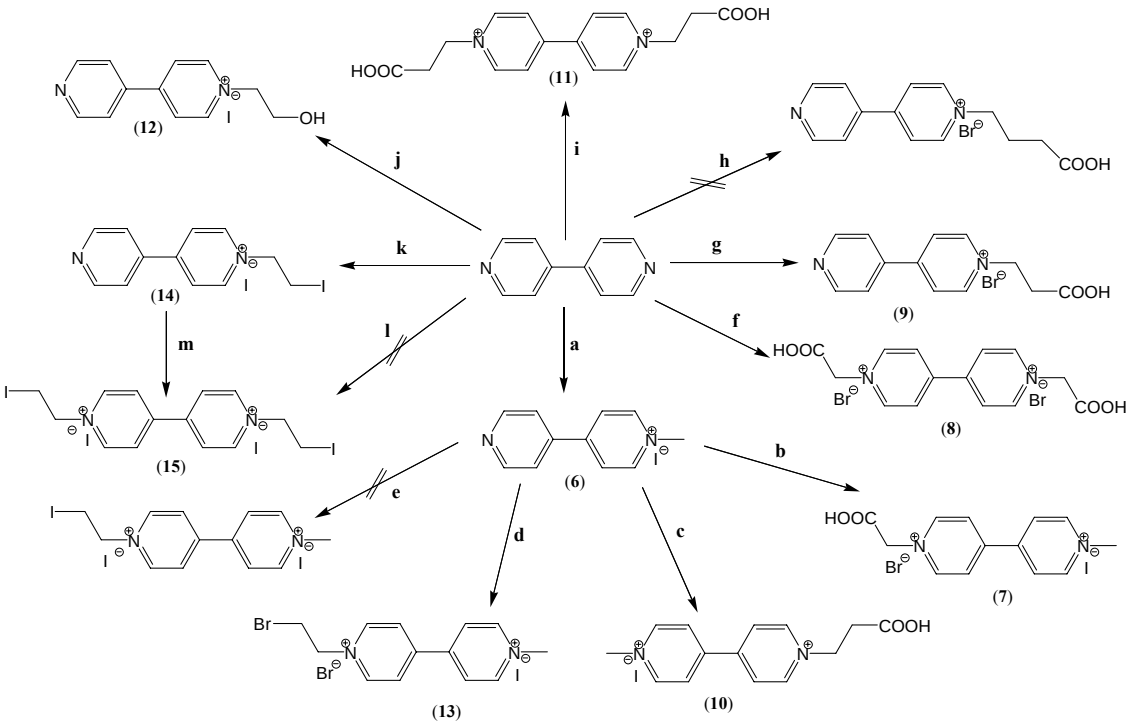


Abbildung 4-6: Übersicht über die dargestellten Verbindungen. **a**: CH_3I, DCM, 24 h, RT (76%), **b**: $CH_2BrCOOH$, Ethanol, 3 d, RT (6%), **c**: $CH_2CHCOOH$, $CHCl_3$, 48 h, RT (63%), **d**: $CH_2BrCH_2CH_2Br$, MeCN, 48 h, rx (22%), **e**: $CH_2ICH_2CH_2I$, MeCN, 48 h, rx (0%), **f**:1. $CH_2BrCOOH$, $CHCl_3$, 60 h, RT, 2. HCl/Aceton (6:1) (40%), **g**: CH_2BrCH_2COOH, DCM, 30 h, rx (27%), **h**: $CH_2BrCH_2CH_2COOH$, DCM, 48 h, rx (0%), **i**: 1. $CH_2CHCOOH$, $CHCl_3$, 60 h, RT, 2. HCl/Aceton (6:1) (100%), **j**: $CH_2BrCH_2CH_2OH$, MeCN, 7 d, RT (47%), **k**: $CH_2ICH_2CH_2I$, 60 h, RT (96%), **l**: $CH_2ICH_2CH_2I$, 60 h, RT (0%), **m**: $CH_2ICH_2CH_2I$, MeCN, 18 h, RT (59%).

Die Verbindungen zeichnen sich durch einen ausgeprägten Salzcharakter aus, v. a. die dialkylierten Verbindungen sind in stark polaren Lösungsmitteln löslich (DMSO, H_2O). Die ersten Verbindungen, mit denen versucht wurde, sie für den Einbau in DNA zu modifizieren, waren hydroxylierte Verbindungen vom Typ I und II. Bei der Tritylierung dieser Bausteine traten jedoch erstmals schwerwiegende Probleme mit der Stabilität der Verbindungen auf. Da diese Reaktionen in Pyridin durchgeführt wurden, Methylviologenderivate unter basischen Bedingungen aber instabil sind, kam es zu unerwünschten Nebenreaktionen.

Die aus der Literatur bekannten Zerfallsreaktionen der Bipyridinderivate im Basischen[314, 323] sind in Abbildung 4-7 zusammengefasst. Bei einem pH > 8 finden zwei Nebenreaktionen statt. Dabei handelt es sich um die Dealkylierung (**I**) und die Hydroxylierung (**II**) der Dialkylverbindung **A**. Durch Disproportionierung bilden sich dann das tiefblaue Monoradikalkation der Bipyridinderivate und chinoide Verbindungen. Diese Reaktionen lassen sich nicht verhindern und führen selbst bei Sauerstoffausschluss innerhalb kurzer Zeit zu unerwünschten Folgeprodukten. Die chinoiden Nebenprodukte zeigen eine sehr charakteristische intensiv blaue Fluoreszenz.

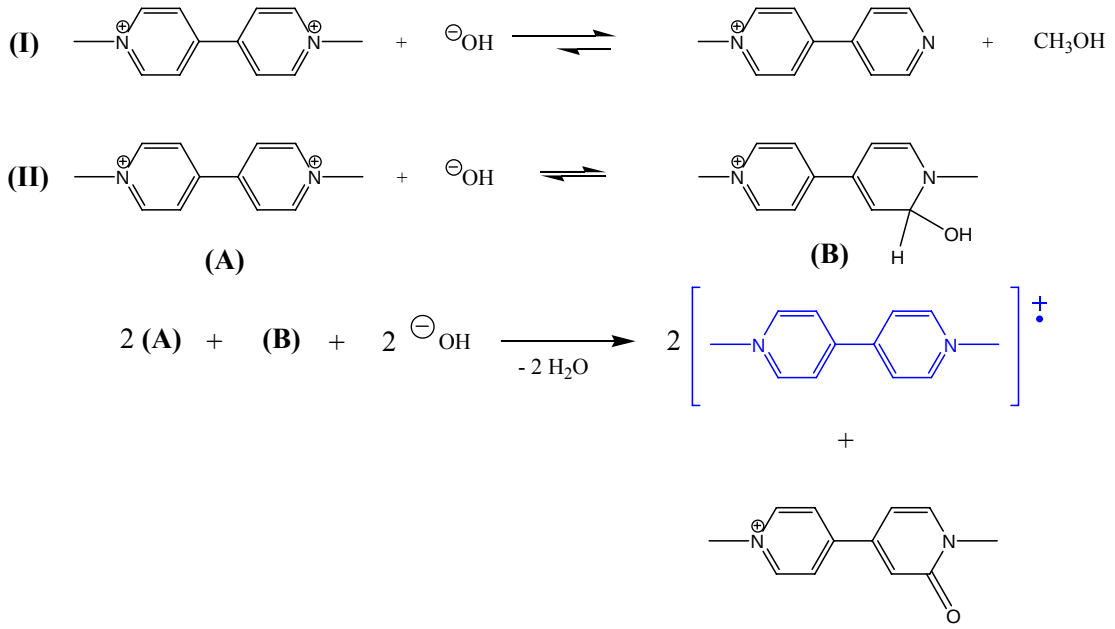


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung der im Basischen ablaufenden Zerfallsreaktionen dialkylierter Bipyridine. Reaktion **I** führt zur Dealkylierung, Reaktion **II** zur Hydroxylierung der dikationischen Verbindung. Das hydroxylierte Produkt **B** disproportioniert mit **A** zu dem tiefblau gefärbten Monoradikalkation und chinoiden Bipyridinderivaten.

Diese Zerfallsreaktionen lassen sich bei allen synthetisierten Verbindungen beobachten. Das deutlichste Anzeichen für Nebenreaktionen stellt dabei die Blauverfärbung der Reaktionslö-

sung bei Zugabe einer Base dar. Diese Farbreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit sogar als zuverlässige Nachweismethode für zweifach alkyliertes Bipyridin genutzt. Bipyridin selbst und die monoalkylierte Verbindung **6** zeigen bei Zugabe einer Base, z. B. Piperidin keine Reaktion. Durch Entnahme eines Tropfens Reaktionslösung und Hinzufügen einer Base lässt sich ermitteln, ob z. B. bei einer Alkylierungsreaktion schon gewünschtes zweifach alkyliertes Produkt entstanden ist oder ob die Reaktionslösung während der SPPS noch intaktes Methylviologenderivat enthält (s. Abschnitt 4.1.4). Dabei reicht schon eine geringe Menge an Molekülen, um eine sichtbare Blaufärbung hervorzurufen.

Wie bei *Netzel et al.* beschrieben[324], wird aufgrund der extremen Instabilität im Basischen der Einbau von Methylviologen-Derivaten als artifizielle Nukleoside in der konventionellen DNA-Festphasensynthese unmöglich. Veröffentlichungen, die derartig modifizierten DNA-Stränge synthetisiert haben wollen, lassen eine eindeutige massenspektrometrische Analytik der dargestellten modifizierten Oligonukleotide vermissen.[325, 326] Methylviologenderivate sind als künstliche DNA-Bausteine nur zu realisieren, wenn sie z.B. an bereits abgespaltene, säurelabil geschützte DNA-Oligomere 3'- oder 5'-terminal gebunden werden, bzw. in einer alternativen Form der DNA-Festphasensynthese terminal angeknüpft und anschließend unter sauren Bedingungen abgespalten werden. Die synthetischen Voraussetzungen für den kovalenten Einbau in Oligonukleotide sind extrem schwierig, da sie nur einen sehr begrenzten pH-Bereich zulassen: Ist der pH-Wert zu niedrig, setzt man die DNA der Depurinierung aus, ist er ein wenig über neutral, so bildet sich das Monoradikalkation, das sich der beschriebenen Folgechemie unterzieht. Die beobachtete Basenintoleranz ist der Grund, warum auf die Darstellung dieses Elektronenakzeptors zur Modifikation von DNA verzichtet wurde.

4.1.4 Methylviologen in Peptiden

Bei der Anknüpfung von Methylviologenderivaten an Peptide lassen sich extrem basische Bedingungen vermeiden. Dazu sollten diese N-terminal an kurze Peptide gekuppelt werden. Diese Verknüpfung lässt sich am einfachsten durch eine Amidbindung mit einem carboxylierten Derivat realisieren (vgl. Typ I in Abbildung 4-5). Durch den Einsatz einer an beiden Pyridinringen reaktive Bipyridinverbindung (Typ II) ist auch die Darstellung eines Peptid-DNA-Konjugates denkbar: Oligonukleotide lassen sich an der festen Phase mit einem Ami-

nolinker versehen, an den eine Carbonsäure bzw. der C-Terminus eines Peptids gekuppelt werden kann.[148, 317-320] Gelingt diese Reaktion auch mit einem Oligonukleotid in Lösung, so wäre damit die Synthese methylviologenhaltiger Peptid-DNA-Konjugate möglich. Auch die Aktivierung einer primären Alkoholfunktion mit CDI ließe sich verwenden, um eine kovalente Anknüpfung an eine aminomodifizierte DNA zu erreichen.[143, 327]

Die Zielmoleküle für die Modifikation von Peptiden und für die Darstellung von Peptid-DNA-Konjugaten gliedern sich in zwei Gruppen:

- N-Methylierte Bipyridine, die eine Carboxyl-, Halogenid- oder Hydroxygruppe tragen, lassen sich über Amidkupplung, Alkylierung oder Aktivierung des Alkohols mit CDI an den N-Terminus eines Peptids an der festen Phase kuppeln.
- Tragen diese Peptid-Methylviologenderivate statt einer Methylgruppe eine funktionalisierte Seitenkette (COOH, NH_2, OH, Halogenid), so lassen sich damit Peptid-DNA-Konjugate darstellen.

Die in Abbildung 4-6 abgebildeten Verbindungen eignen sich prinzipiell alle für die Darstellung modifizierter Peptide. Die wichtigste Rolle spielen jedoch die carboxylierten Verbindungen **7-11**. Die Synthese der Propylsäurederivate **10** und **11** durch die Umsetzung mit Acrylsäure erwies sich als besonders effizient. Die unterschiedlich langen Alkylketten verleihen den Molekülen verschiedene Flexibilität, was in der SPPS zu geringerem sterischen Anspruch bei der Kupplung und somit höherer Ausbeute führen kann.
Ein Problem bei der Einführung von Carboxylgruppen in Bipyridinderivate ist die Protonierung und damit die Inaktivierung Stickstoffatoms des Bipyridinringes, an dem die Substitution stattfinden soll. Aus diesem Grund kann nicht mit zu hohem Überschuss an Carbonsäure gearbeitet werden. Die Darstellung veresterter Carboxylderivate des Bipyridins umgeht das Protonierungsproblem. Allerdings erfordert die Esterspaltung in der Regel basische Bedingungen. Auf die Optimierung dieser Syntheseroute wurde vorerst verzichtet, da zuerst die erfolgreiche Anknüpfung eines carboxylierten Methylviologenderivats wie **10** oder **11** in der SPPS gezeigt werden sollte.

In ersten Versuchen wurden die Peptide **KKK**, **KYK** und **KWK** für die terminale Anknüpfung nach der *Fmoc*-Strategie synthetisiert. Die *Fmoc*-Gruppe der letzten Aminosäure wurde im Basischen abgespalten und gewaschen, dann wurde versucht, **10** oder **11** über die HOBt/TBTU-Methode an den freien N-Terminus des Peptids zu kuppeln. Die Abspaltung

vom TCP-Harz erfolgte im Sauren und gefährdete somit die Stabilität des Bipyridinium-Salzes nicht.

Die kovalente Anknüpfung der carboxylierten Methylviologenderivats an die terminale Aminofunktion gelang nicht. Das hat zwei Gründe:

- **10** und **11** sind nur noch in sehr polaren Lösungsmitteln löslich, in diesen quillt jedoch das verwendete TCP-Harz nicht mehr ausreichend. Auch der Versuch, die Kupplungseffizienz durch andere Reagenzien zu erhöhen (Wechsel von HOBt/TBTU in NMP auf EDCI in DMF/H_2O), um den Oberflächenverlust am TCP-Harz zu kompensieren, brachte keinen Erfolg.
- Das Design des angestrebten DNA-Peptid-Assays erfordert die Einführung mindestens eines Lysinrestes (bzw. einer basischen Aminosäure) in das Peptid. Dessen Basizität reicht jedoch aus, um den Methylviologenrest zu zerstören.

Obwohl sich Methylviologen in ersten nicht kovalenten Vorversuchen als Eletronenakzeptor für donormodifizierte Oligonukleotide erwiesen hat, eignet es sich aufgrund seiner extremen Instabilität im Basischen weder für den Einsatz in der DNA-Festphasensynthese noch für die Derivatisierung des N-Terminus kurzer basischer Peptide.

4.1.5 *Para*-Nitrobenzoesäure als Elektronenakzeptor

Methylviologenderivate lassen sich nicht kovalent mit Oligonukleotiden verknüpfen, und ihre Derivate von Lysin-haltigen Peptiden sind in Lösung nicht stabil. Aus diesen Gründen wurde auf einen anderen Elektronenakzeptor ausgewichen.

Die Voraussetzungen für einen geeigneten Elektronenakzeptor zur Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Peptiden und DNA sind also nicht nur das richtige Reduktionspotential, sondern auch ausreichende chemische Stabilität und Kompatibilität bezüglich der Bedingungen der SPPS und der DNA-Festphasensynthese. Eine Verbindung, die diese Voraussetzungen erfüllt, ist die *para*-Nitrobenzoesäure (4-Nitrobenzoesäure, **pNB**) mit einem Reduktionspotential von -0.46 V.[252, 253]

Diese kommerziell erhältliche Verbindung ist in einem großen pH-Bereich beständig und zeigt unter den Bedingungen der SPPS keine Tendenz zu Nebenreaktionen. Sie ist in wässrigen Peptidlösungen stabil, unabhängig davon, ob basische Aminosäureseitenketten vorhanden sind oder nicht. Da sie ebenfalls unter den Abspaltbedingungen der DNA-Synthese intakt bleibt, eignet sie sich auch zur Darstellung von Peptid-DNA-Konjugaten. Für die Entwicklung eines artifiziellen Nukleotids zur Ergänzung des bestehenden Arsenals ist sie allerdings nicht geeignet, da sie nicht fluoresziert.

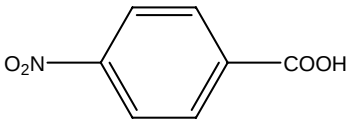


Abbildung 4-8: Struktur der *para*-Nitrobenzoesäure (**pNB**)

In den im Folgenden beschriebenen Experimenten zur Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Peptiden und Oligonukleotiden werden mit der **pNB**-Gruppe N-terminal modifizierte Peptide eingesetzt, die sich ohne Probleme über konventionelle SPPS herstellen lassen. Ihre Synthese ist in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

4.2 Untersuchung der Fluoreszenzlöschung in nicht kovalenten Peptid-DNA-Komplexen

Ein Ladungstransfer zwischen einem Oligonukleotid und einem Peptid kann nur erfolgen, wenn beide Komponenten miteinander in Wechselwirkung treten. Dabei reichen nicht kovalente Interaktionen aus. So bewirken Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten (Lys, Arg) die Bindung eines Peptids an das Zucker-Phosphatrückgrat der DNA. Aromatische Aminosäuren (z.B. Phe, Trp, Tyr), die von zwei Lysinen flankiert sind, interkalieren mit ihren Seitenketten in den Basenstapel von Oligonukleotiden. [232-241] Diese Schnittstelle zwischen Peptid und DNA muss an einem intermolekularen Transport der Ladung vom Donor zum Akzeptor beteiligt sein. Da sowohl die Geometrie des Peptids als auch die Struktur des Donors in der DNA über die Qualität der Bindung und somit auch die Ladungstransfereigenschaften entscheiden, werden verschiedene Donoren in den Oligonukleotiden mit akzeptormodifizierten und unmodifizierten Peptiden untersucht. Dabei werden Versuchsreihen mit Oligolysinen, mit aromatischen Seitenketten tragenden Peptiden und schliesslich mit eventuell zu einer kovalenten Verknüpfung führenden Peptiden unternommen.

Messungen der Absorption und Fluoreszenz eines Chromophors stellen einfache und schnelle Mittel dar, die elektronischen Veränderungen eines Peptid-DNA-Systems zu beobachten. Wie bereits in Kapitel 2.1.2 dargestellt, führen Ladungstransferprozesse in der Regel zu einer Löschung der Fluoreszenz eines entsprechend modifizierten Oligonukleotids.

Im Folgenden werden verschiedene Donor-Akzeptor-Systeme untersucht. Beim Ladungsakzeptor handelt es sich entweder um *para*-Nitrobenzoesäure-Gruppen oder um Aminosäureseitenketten, die jeweils nicht kovalent an die DNA gebunden sind.

Bei den Experimenten zur Fluoreszenzlöschung wird einer DNA-Duplexlösung eine Lösung des Akzeptors in der entsprechenden Menge zugegeben und anschließend die Absorption und die Emission bestimmt. Für die Bestimmung des Bindungsmodus mittels CD-Spektroskopie wird analog verfahren. Eine Auftragung der integrierten und absorptionskorrigierten Fluoreszenz gegen die zugegebenen Quenchermenge ermöglicht den Vergleich der Löscheffizienz und lässt somit Rückschlüsse auf die Ladungstransfereigenschaften des Donor-Akzeptor-

Systems zu. Um die Zuverlässigkeit der Messungen zu erhöhen, wird über mehrere Titrationsreihen gemittelt.

4.2.1 PydU als Elektronendonor

Für Fluoreszenzquenchexperimente mit peptidischen und nicht peptidischen Elektronenakzeptoren eignet sich PydU aufgrund seiner optischen Eigenschaften sehr gut als Elektronendonor in der DNA. Die modifizierten Duplexe sind thermisch ähnlich stabil wie unmodifizierte DNA und die Fluoreszenz des Pyrenrestes lässt sich bei hoher Quantenausbeute selektiv anregen (λ_{exc} = 360 nm). Um von einer möglichst hohen Grundfluoreszenz des DNA-Stranges für die Titrationen ausgehen zu können, wird der Duplex **D3/C3** verwendet (s. Kapitel 3.1). Als externer Elektronenakzeptor, der nicht kovalent an die DNA bindet, wird die **pNB**-Gruppe eingesetzt.

4.2.1.1 Vorversuche mit para-*Nitroenzoesäure-Methylester*

Um zu überprüfen, wie stark nicht peptidisch gebundenes **pNB** die Fluoreszenz des PydU-haltigen Duplexes löscht, wird **D3/C3** mit dem Methylester der Säure (**pNBMe**) titriert. Der Ester wird verwendet, um den pH-Wert neutral zu halten. Sein Redoxpotential und das der freien Säure sind annähernd gleich.[252, 253]

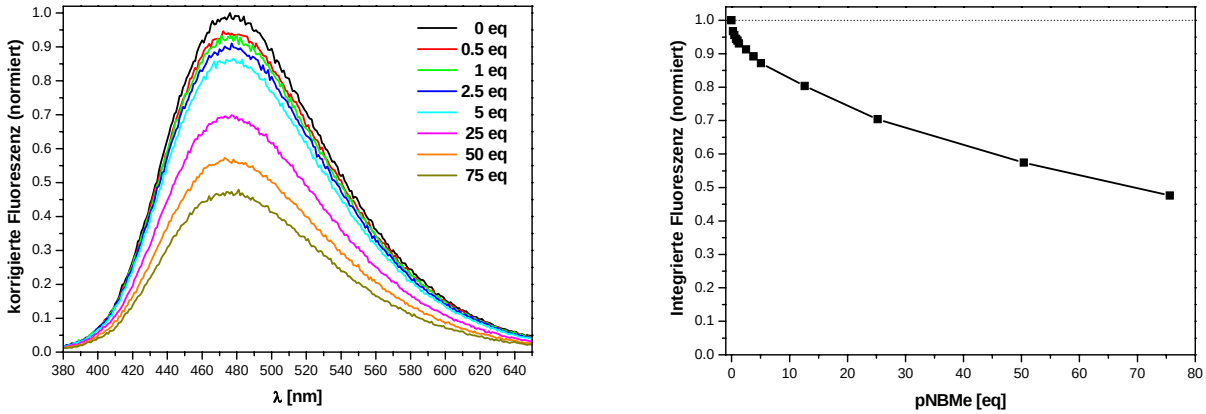


Abbildung 4-9: Auftragung der absorptionskorrigierte Fluoreszenz (*links*) und der integrierten Fluoreszenzintensität von 5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm). Die gestrichelte Linie bezeichnet den Wert der Fluoreszenzintensität ohne Quencherzugabe.

Deutlich ist eine zunehmende Löschung der Fluoreszenz mit steigender Konzentration an Elektronenakzeptor zu erkennen. Eine Duplexkonzentration von 5 µM reicht aus, um den Effekt in der Emission klar zu erkennen. Ein Problem dieser Messreihe stellt die schlechte Löslichkeit des Methylesters in wässrigen Lösungsmedien dar, so dass nicht bei mehr als 0.5 mM Konzentration von **pNBMe** (100 eq) gemessen werden kann.

Die einzelnen Fluoreszenzspektren werden durch die jeweilige Absorption bei der Anregungswellenlänge (360 nm bei PydU) korrigiert. So werden Volumeneffekte durch die bei der Zugabe erfolgte Verdünnung kompensiert. Die Auftragung der integrierten korrigierten Emission (von 390-630 nm) reduziert Effekte, die bei der Verwendung des Maximums der Emissionsintensität als Maß für die Fluoreszenzlöschung stören, wie z. B. leichte Verschiebungen des Maximums oder eine Veränderung der Bandenbreite. Diese Effekte treten beispielsweise bei der Interkalation einer Seitenkette des Peptids auf. Die integrierte Fluoreszenz summiert letztendlich über sämtliche die Fluoreszenz betreffenden Einflüsse der Peptid-DNA-Bindung.

Da dieser Vorversuch die erwarteten Resultate zeigt, werden Titrationsreihen mit Peptiden durchgeführt, die zum Teil eine **pNB**-Gruppe kovalent an den N-Terminus gebunden tragen. Die entsprechenden nicht modifizierten Peptide dienen jeweils als Kontrolle für nicht durch den Elektronenakzeptor hervorgerufene Effekte.

4.2.1.2 Einfluss von Oligolysinen

Um den Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung auf die Löscheigenschaften der Peptide zu klären, werden Fluoreszenztitrationen mit **pNB**-modifiziertem Mono-, Di- und Trilysin, sowie unmodifiziertem Trilysin als Kontrolle durchgeführt. Die erhaltenen Fluoreszenzdaten zeigen zwei Effekte:

- Die Effizienz der Fluoreszenzlöschung steigt mit einer zunehmenden Zahl an positiv geladenen Lysinseitenketten an.
- Unmodifiziertes Trilysin wirkt als effektiver Verstärker der Fluoreszenz. Dieser Anstieg in der Emission rührt von einer Versteifung der DNA-Konformation durch die Anlagerung von Lysinseitenketten her.

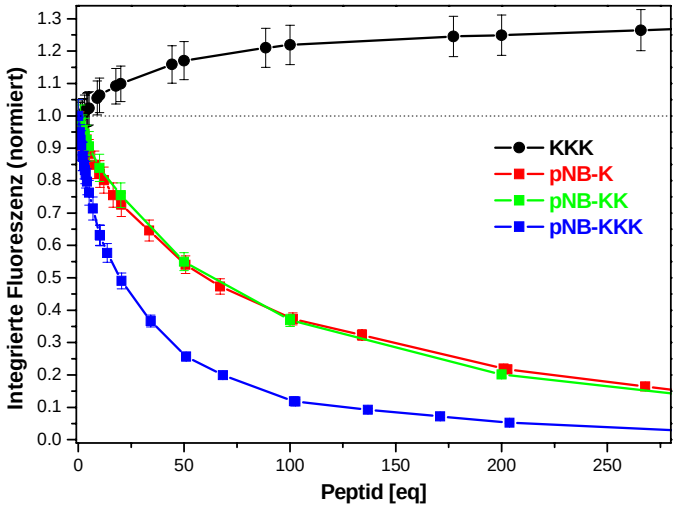


Abbildung 4-10: Fluoreszenzlöschung von 5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm).

Zum Verständnis dieser Graphen ist eine Betrachtung des Bindungsmodus der eingesetzten Peptide erforderlich. Dieser lässt sich mittels Differenz-CD-Spektroskopie ermitteln. Das Spektrum des Trilysins weist ein schwaches excitonisches Signal mit einem Nulldurchgang bei 210 nm auf. Die unspezifische Wechselwirkung der geladenen Lysinseitenketten mit dem entgegengesetzt geladenen Phosphatrückgrat der DNA ruft einen schwachen, aber eindeutigen CD-Effekt hervor, der im Bereich der Absorption der Amidbindung liegt und über die Summe der CD-Signale der Einzelsubstanzen hinaus geht. Wie bei den Fluoreszenzspektren bereits vermutet, bindet Trilysin effektiv an das Rückgrat des Duplexes und führt dadurch zu einem starken Anstieg in der Emission.

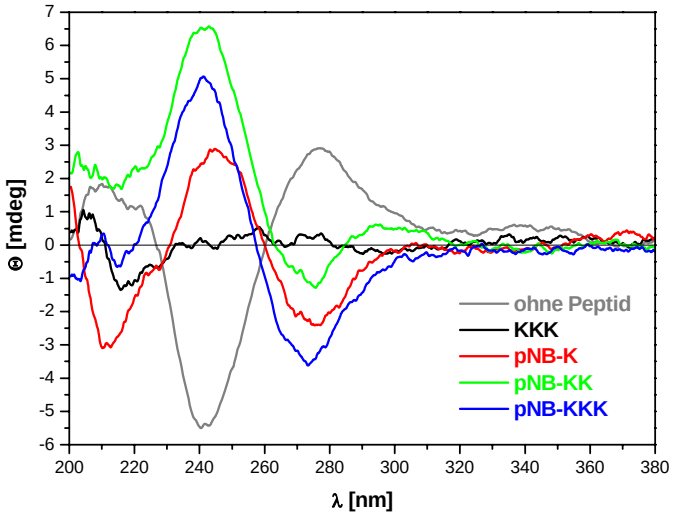


Abbildung 4-11: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM Peptid.

Die mit **pNB** modifizierten Oligolysine zeigen starke Signale im Bereich der Absorption der **pNB**-Gruppe mit einem Nulldurchgang bei ca. 260 nm. Der aromatische Elektronenakzeptor

bewirkt eine deutliche Veränderung des Bindungsmodus im Vergleich zum unmodifizierten Trilysin. Den Hauptanteil an der im CD-Spektrum sichtbaren Peptid-DNA-Wechselwirkung trägt offensichtlich die **pNB**-Gruppe. Das ist ein Hinweis auf eine mögliche Interkalation des Aromaten in den Basenstapel.

Die drei Akzeptor-modifizierten Peptide interagieren unterschiedlich mit dem Duplex, was auf das unterschiedliche Verhältnis von elektrostatischer zu aromatischer Wechselwirkung zurückzuführen ist. Im Fall des modifizierten Monolysins ist die Bindung an den Duplex sehr unspezifisch und schwach. Die Differenz-CD-Spektren legen nahe, dass die Wechselwirkung des Aromaten mit dem Duplex gegenüber einer elektrostatischen mittels der geladenen Seitenkette begünstigt wird, da ein Nulldurchgang um die 210 nm (wie im Spektrum des Trilysins) fehlt. Das Dilysin mit der **pNB**-Gruppe zeigt ein weitaus ausgeprägteres CD-Signal um 260 nm als **pNB-K**. Die Wechselwirkung des Aromaten mit der DNA wird durch die zusätzliche geladene Seitenkette weiterhin begünstigt. Der Bindungsmodus liefert somit eine Erklärung für das ähnliche Löschverhalten der beiden Peptide. Im Fall des **pNB-KKK** zeigen sich über die Interaktion des Aromaten hinaus noch Anteile einer elektrostatischen Bindung durch das Auftreten eines schwachen Signals um 210 nm. Die dritte geladene Seitenkette verstärkt die **pNB**-vermittelte Peptid-DNA-Wechselwirkung durch eine zusätzliche mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat. Dadurch löscht dieses Peptid wesentlich stärker als die vorher genannten. Das Zusammenspiel hydrophober und elektrostatischer Interaktionen ist also wesentlich für den reduktiven Ladungstransfer in Duplex-DNA.

4.2.1.3 Peptide mit aromatischen Aminosäuren

Nach den Ergebnissen aus den Fluoreszenz- und CD-Spektren der Oligolysine werden nun die zugrunde liegenden Mechanismen für den Ladungstransfer zwischen **D3/C3** und Peptiden untersucht, die aromatische Aminosäuren enthalten. Aromatische Aminosäuren interkalieren in den DNA-Basenstapel, wenn sie von zwei Lysinen flankiert sind. Ein derartiges aromatisches *interface* beeinflusst den Ladungstransport in einem DNA-Doppelstrang. Der Einfluss ist besonders stark, wenn das Redoxpotential der Seitenkette ausreicht, in den Ladungstransport einzugreifen. Tryptophan und Tyrosin erfüllen diese Voraussetzung. Sie sind potentielle Lochakzeptoren für die positive Ladung am Pyrenrest des PydUs (s. Kapitel 2.1.3).

Um einen Vergleich zum Einfluss eines nicht redoxaktiven Aromaten ziehen zu können, werden als Kontrolle Peptide mit Phenylalanin als aromatischer Aminosäure herangezogen. Die Abschätzung der Löscheffizienz erfolgt mit der experimentell ermittelten Kurve des **pNB**-modifizierten Dilysins, da hier die Anzahl der elektrostatischen Wechselwirkungen identisch ist zu den aromatische Seitenketten tragenden Peptiden.

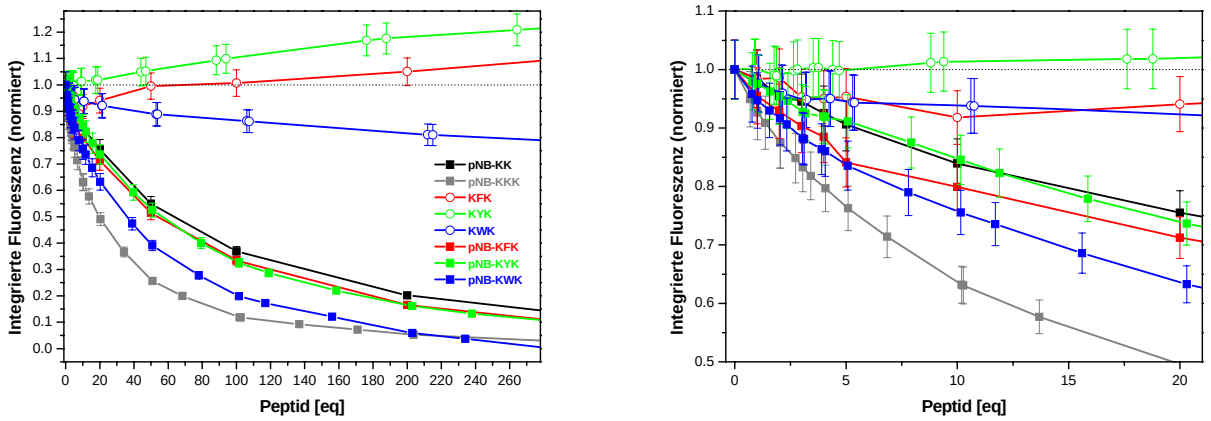


Abbildung 4-12: Fluoreszenzlöschung von 5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm).
links: Übersicht, *rechts*: Vergrößerung (Peptid < 20 eq)

Ihrem Redoxpotential nach sind sowohl Tryptophan als auch Tyrosin in der Lage, die positive Ladung des Pyrens abzufangen und somit die Fluoreszenz von **D3/C3** zu löschen. Allein **KWK** bewirkt einen Rückgang der Emission. **KYK** beteiligt sich nicht an einem Ladungstransfer und führt bei höheren Konzentrationen zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Dieser ist wie beim Trilysin auf eine Stabilisierung der Duplexstruktur zurückzuführen. **KFK** dagegen, dessen Redoxpotential nicht ausreichen sollte, ein Elektron an das Pyren abzugeben, führt in niedriger Konzentration zu einer Fluoreszenzlöschung und erst bei mehr als 20 Äquivalenten zugegebenem Peptid bewirkt es einen Anstieg in der Emissionsintensität ähnlich dem **KYK** und **KKK**.

KWK, KYK und **KFK** bewirken eine Blauverschiebung der beobachteten Emission von 476 zu 469 nm, was auf ein Herausdrehen der Pyrengruppe des PydU in **D3/C3** durch die Wechselwirkung mit der Seitenkette hinweist. Diese Konformationsänderung des Pyrens bewirkt eine Veränderung der elektronischen Kopplung zwischen dem Pyren- und dem Uridinrest und somit auch eine Veränderung im Elektronentransferverhalten. Mit **pNB** als Akzeptor verschwindet dieser Effekt wieder, das Emissionsmaximum bleibt bei 476 nm.

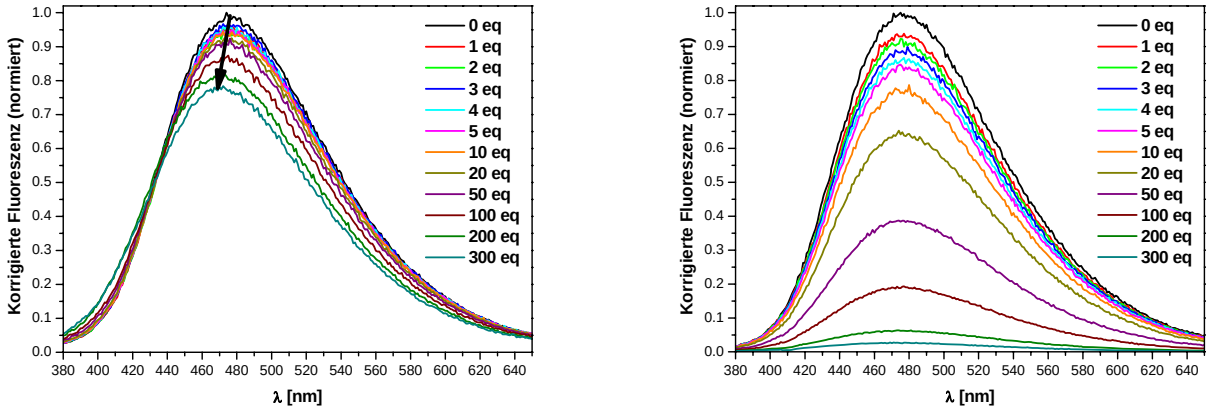


Abbildung 4-13: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz von 5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm). Titration mit **KWK** (*links*) und **pNB-KWK** (*rechts*)

Das gibt einen Hinweis darauf, dass in den modifizierten Peptiden eine Konkurrenzsituation zwischen der Einlagerung der aromatischen Aminosäureseitenkette und der Interkalation des **pNB**-Restes entsteht.

Alle **pNB**-tragenden Peptide führen ab dem ersten zugegebenen Äquivalent zu einer Löschung der Fluoreszenz. **pNB-KYK** und **pNB-KFK** löschen geringfügig besser als **pNB-KK**. **pNB-KWK** löscht mehr als diese, aber weniger als **pNB-KKK**. Das Verhalten des Tryptophan-haltigen Peptids erklärt sich durch die doppelte Beteiligung am Ladungstransfer. Zum einen wirkt die Indolgruppe der Aminosäureseitenkette als Lochakzeptor und zum anderen besitzt das Peptid mit **pNB** einen Elektronenakzeptor.

Eine Betrachtung der Differenz-CD-Spektren hilft bei der Interpretation der aus der Fluoreszenzlöschung erhaltenen Daten weiter.

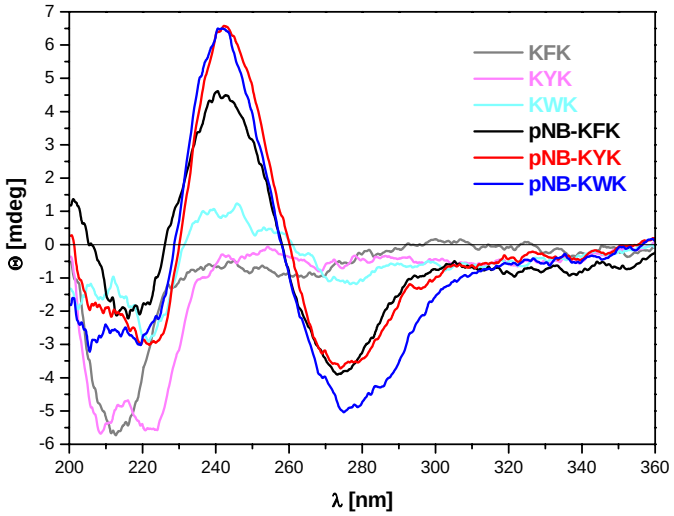


Abbildung 4-14: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM Peptid.

Wie bereits bei den Oligolysinen gesehen, zeigen die **pNB**-modifizierten Peptide ein starkes CD-Signal im Bereich der **pNB**-Absorption mit einem Nulldurchgang bei 260 nm. Die Absorption der aromatischen Seitenketten der Aminosäuren liegt ebenfalls in diesem Bereich, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieses Signal von der Aminosäure stammt. Ein Vergleich der Spektren mit denen der Oligolysine liefert aber eine sehr gute Übereinstimmung, so dass man den Hauptanteil des jeweiligen CD-Signals der entsprechenden **pNB**-Gruppe zurechnen kann.

Die unmodifizierten Tripeptide **KFK** und **KYK** sind sich in den Differenz-CDs ähnlich und weisen keinen Nulldurchgang auf. Eine auf die Interkalation der aromatischen Seitenkette hindeutende CD-Bande ist nicht erkennbar. Zwischen 200-225 nm zeigt sich ein starkes negatives Signal, dass bei **KYK** eine Schulter aufweist. Dabei handelt es sich um Banden, die von der Wechselwirkung des entsprechenden Peptids mit dem Phosphatrückgrat des Duplexes herrühren. Lediglich **KWK** zeigt ein excitonisches Signal mit einem Nulldurchgang bei 260 nm, das einer in den Basenstapel interkalierenden Indolgruppe zugeordnet werden kann.

Offensichtlich sind in den **pNB**-modifizierten Peptiden sowohl die aromatischen Seitenketten als auch der Elektronenakzeptor **pNB** in der Lage, sich in den Basenstapel einzulagern. Eine genaue Aussage darüber ist aber anhand der vorliegenden Differenz-CD-Spektren nicht möglich, da diese nur die Bindungsverhältnisse bei 20 eq Peptid pro DNA zeigen, während für ein umfassenderes Bindungsmodell auch Differenz-CD-Spektren bei geringeren Konzentrationen an Peptid notwendig wären.

4.2.1.4 Experimente mit Threonin- und Cystein-haltigen Peptiden

Für Strangbruchexperimente, die den chemischen Nachweis der Folgeprodukte des Elektronentransfers nutzen (s. Kapitel 4.4), wird eine Gruppe von Tripeptiden wichtig, die Threonin und Cystein flankiert von zwei Lysinen tragen. Sie sollen, ebenfalls jeweils mit und ohne **pNB**-Modifikation als potentielle Nukleophile in Verknüpfungsreaktionen mit modifizierter DNA dienen. Um vor diesem Hintergrund Informationen über die Ladungstransfereigenschaften dieser Peptide mit dem Duplex **D3/C3** zu gewinnen, werden mit diesen Oligopeptiden Fluoreszenztitrationen durchgeführt.

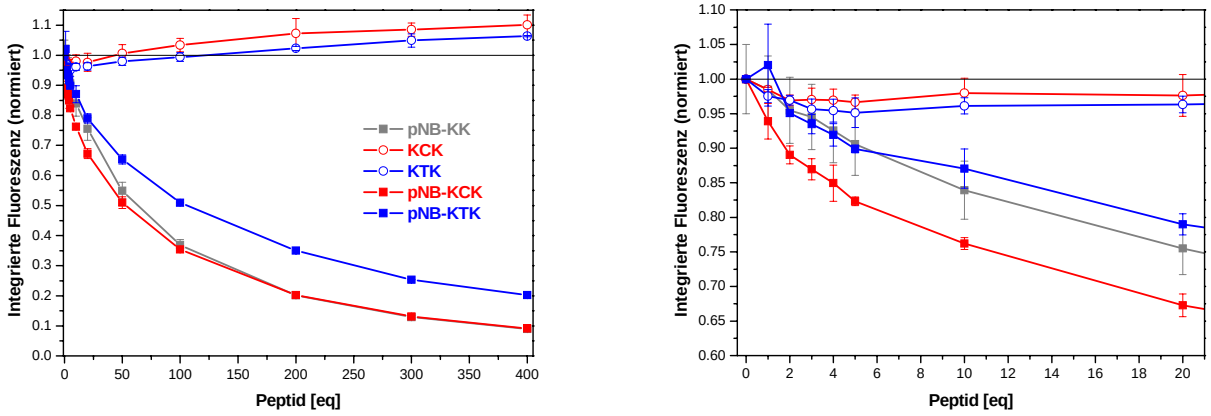


Abbildung 4-15: Fluoreszenzlöschung von 5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm).
links: Übersicht, *rechts*: Vergrößerung (Peptid < 20 eq)

Die nicht **pNB**-modifizierten Peptide führen in höherer Konzentration zu einer Stabilisierung des DNA-Duplexes, was sich wiederum in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität zeigt. Die **pNB**-tragenden Peptide **pNB-KCK** und **pNB-KTK** löschen die Fluoreszenz, wobei sich der Kurvenverlauf des Cystein-haltigen Peptids mit der von **pNB-KK** weitestgehend deckt. Das Fluoreszenzverhalten mit **pNB-KTK** zeigt einen flacheren Kurvenverlauf und löscht entsprechend ein wenig schlechter. Die Threonin-haltigen Peptide binden offensichtlich etwas weniger gut an die DNA als die Cystein-haltigen. Ein zusätzlicher Effekt der Threonin- und Cystein-Seitenketten auf den Ladungstransfer konnte nicht nachgewiesen werden.

Beide Differenz-CD-Spektren zeigen einen ähnlichen Verlauf, wie er von den Oligolysinen her bereits bekannt ist.

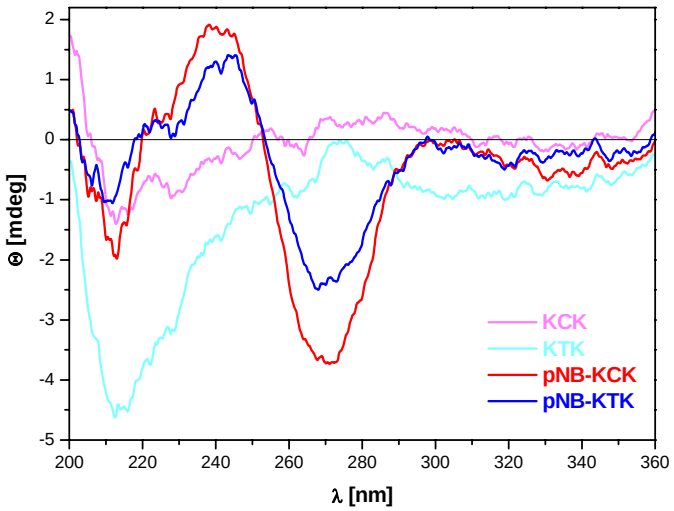


Abbildung 4-16: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM Peptid.

Um weiteren Aufschluss über den Elektronentransfer zwischen Peptiden und Oligonukleotiden zu erhalten, werden weitere Löschexperimente und CD-Bindungsstudien mit anderen Ladungsdonoren durchgeführt.

4.2.2 Das Ethidium-Nukleosid als Elektronendonor

Ein weiterer fluoreszierender Elektronendonor, der in Experimenten mit **pNB**-haltigen Peptiden eingesetzt werden kann, ist das Ethidium-Nukleosidanalogon. Das Reduktionspotential der **pNB**-Gruppe reicht aus, um das Ethidium-Kation durch den Entzug eines Elektrons zu oxidieren. Während es sich im System PydU-**pNB** um einen Elektronentransferprozess nach dem Hopping-Mechanismus handelt, kann für den Ladungstransfer zwischen Ethidium und **pNB** ein Tunnelprozess angenommen werden, der einer weitaus größeren Distanzabhängigkeit unterliegt.[188] Somit erlaubt der Vergleich der beiden Donor-Akzeptor-Systeme einen direkten Vergleich der mechanistischen Modelle.

Sämtliche Versuche werden mit Duplex **E/C5** durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.3), als Gegenbase für das Nukleosidanalogon dient dC.

4.2.2.1 Experimente mit Oligolysinen

Der Ethidium-Chromophor wird in den Fluoreszenztitrationen bei 530 nm Wellenlänge angeregt. Zur Auswertung der Quench-Kurven wird die Emissionsintensität von 550-730 nm integriert. Es wird bei einer Konzentration von 5 µM Duplex gemessen. Wie beim Duplex **D3/C3** wird zunächst der Einfluss der elektrostatischen Bindung auf das Fluoreszenzlöschverhalten von **E/C5** untersucht.

Nur **pNB-KKK** und **pNB-KK** können die Fluoreszenz des Ethidiumduplexes wirksam löschen. Die Löscheffizienz ist aber wesentlich geringer als beim PydU-Duplex **D3/C3**. Während **pNB-KKK** die Emission um ca. 40 % reduziert (300 eq), liegt der Anteil für **pNB-KK** bei knapp 10 % (im Vergleich dazu bei **D3/C3**: 95 % bzw. 80 %). **KKK** und **pNB-K** verstärken beide die Fluoreszenz des Chromophors. Der Effekt ist dabei für das **pNB-K** höher

als für das **KKK**. Obwohl die **pNB**-Gruppe mit einem Di- und Trilysinrest redoxaktiv ist, führt die Zugabe von **pNB-K** zu **E/C5** nicht zu einer Löschung der Fluoreszenz.

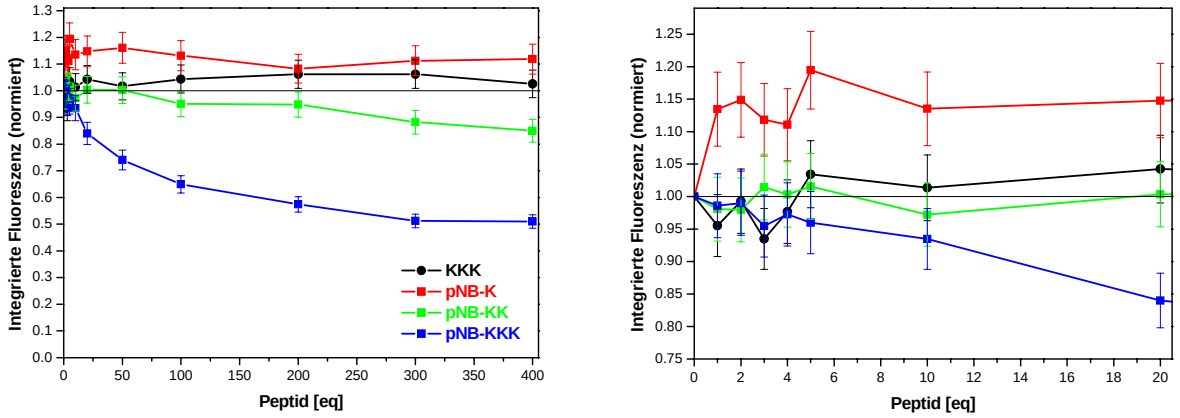


Abbildung 4-17: Fluoreszenzlöschung von 5 µM Duplex **E/C5** in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 530 nm). *links*: Übersicht, *rechts*: Vergrößerung (Peptid < 20 eq)

pNB-K interkaliert in den Basenstapel von **D3/C3** und führt somit zu einer Fluoreszenzlöschung. In **E/C5** scheint dies nicht zu funktionieren. Möglicherweise trägt die positive Ladung des Ethidiumnukleosids zu einer Schwächung der elektrostatischen Bindung zwischen den Lysinseitenketten und den Phosphatgruppen der DNA in der Umgebung des Chromophors bei. Darin könnte die Ursache für den geringeren Fluoreszenzanstieg im Vergleich zu **D3/C3** bei der Anwesenheit von **KKK** zu suchen sein. Bei **pNB-KK** und **pNB-KKK** hingegen kann die **pNB**-Gruppe interkalieren und als Elektronenakzeptor fungieren.

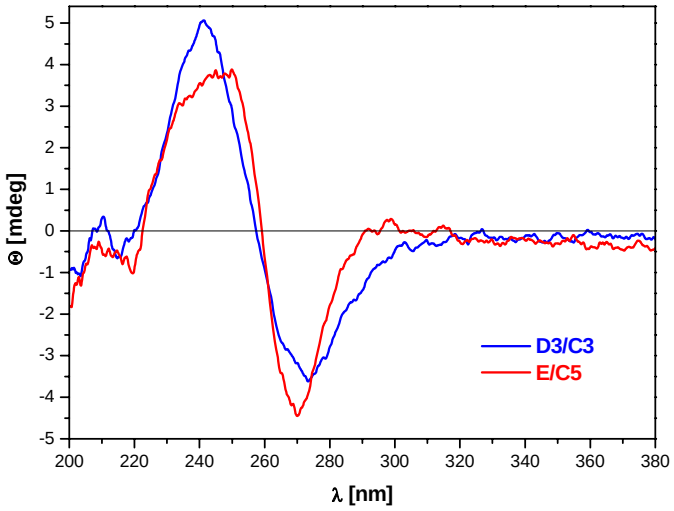


Abbildung 4-18: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM **pNB-KKK.**

Eine Betrachtung des Differenz-CD-Spektrums von **E/C5** mit **pNB-KKK** zeigt die Änlichkeit zu dem von **D3/C3**. Die Bindung des größeren Trilysins wird durch die Anwesenheit der kat-

ionischen Ladung am Ethidium-Nukleosid nicht mehr so stark gestört, so dass die **pNB**-Gruppe wie im PydU-modifizierten Duplex interkalieren und am Ladungstransfer teilnehmen kann. Trotz des gleichen Bindungsmodus führt die Zugabe von Peptiden zu unterschiedlichen Resultaten in Abhängigkeit vom Ladungsdonor in der DNA. Der beobachtete Effekt der Fluoreszenzlöschung fällt in **E/C5** absolut gesehen geringer aus, weil aufgrund des Elektronentransfers nach dem Superaustauschmechanismus die Abhängigkeit des Ladungstransfers vom Donor-Akzeptor-Abstand größer ist. Da die verwendeten Peptide unspezifisch binden, befindet sich der Elektronenakzeptor in unterschiedlichem Abstand vom Donor. Eine Fuoreszenzlöschung findet aber nur bei geringer Distanz statt, so dass weitaus weniger Peptid-DNA-Interaktionen zu einem Ladungstransfer führen als im Fall des PydU-Oligonukleotids, das keine so starke Distanzabhängigkeit zeigt. Dieser mechanistische Unterschied kann auch die Ursache für die starke Temperaturabhängigkeit der Messungen mit **E/C5** sein. Bei höherer Temperatur herrscht eine größere Dynamik im Basenstapel und dadurch kommt es zu geringeren Ladungstransferraten als bei tieferer Temperatur.

4.2.2.2 Experimente mit aromatische Aminosäuren enthaltenden Peptiden

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von **D3/C3** löschen bei **E/C5** alle aromatischen Peptide, die eine **pNB**-Gruppe tragen, die Fluoreszenz des Ethidiums während alle unmodifizierten keinen oder einen leicht verstärkenden Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten ausüben.

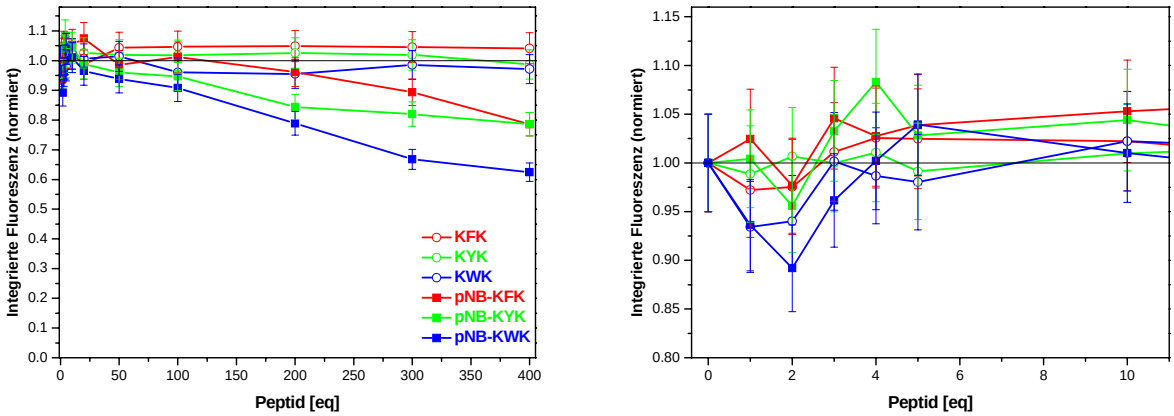


Abbildung 4-19: Fluoreszenzlöschung von 5 µM Duplex **E/C5** in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 530 nm).
links: Übersicht, *rechts*: Vergrößerung (Peptid < 12 eq)

Anders als beim PydU-Duplex führt **KWK** nicht zu einer Löschung der Fluoreszenz. Die Wechselwirkung des Tryptophans mit dem Ethidiumnukleotid reicht nicht aus, als Lochak-

zeptor für das Ethidium-Nukleotid zu funktionieren, obwohl es laut der Redoxpotentiale möglich ist ($E^0(W^{\bullet+}/W) \approx 1.0$ V, $E^0(E^{2+\bullet}/E^+) \approx 1.2$ V). Das Peptid verhält sich im Löschverhalten neutral. Hier ist keine Verschiebung des Emisionsmaximums zu beobachten, wie bei **D3/C3**. Die Unterschiede in der Löscheffizienz der **pNB**-haltigen Peptide erklären sich durch ihre unterschiedliche Bindungsstärke.

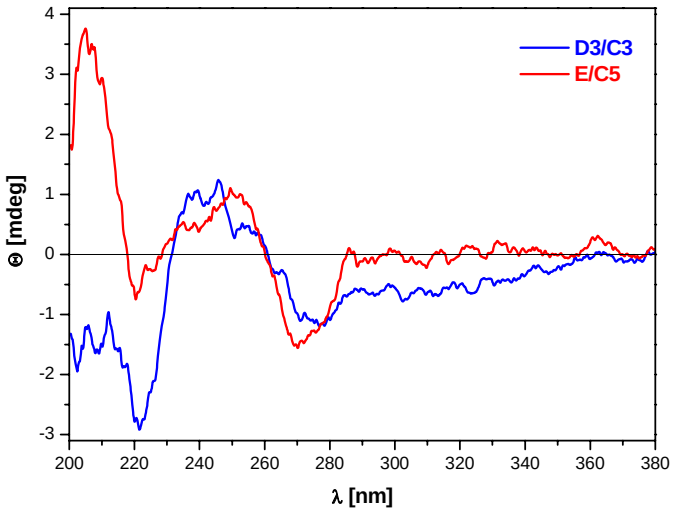


Abbildung 4-20: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM **KWK.**

Das Differenz-CD-Spektrum zeigt, dass die Peptide in **D3/C3** und **E/C5** ähnlich gebunden werden. Am den Spektren von **KWK** erkennt man eindeutig im Bereich von 260- 280 nm die Interkalation der Indolseitenkette in beide Duplexe. Die positive Ladung des Ethidium-Chromophors wirkt sich aber auch hier aus, indem es die Anlagerung der flankierenden Lysinreste stört, wie an dem starken positiven Signal bei ca. 205 nm abgelesen werden kann.

Insgesamt betrachtet wurde die Fluoreszenzlöschung im Ethidium-**pNB**-System weniger intensiv untersucht als im PydU-**pNB**-System, da durch die sehr hohe Temperaturabhängigkeit die Ergebnisse der Messungen bei Raumtemperatur mit einem großen Fehler behaftet sind und der beobachtete Effekt der Fluoreszenzlöschung absolut gesehen geringer ausfällt, d. h. die Kurven ein deutlich schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen.

4.2.3 PydG als Lochdonor

Um auch Erkenntnisse über den oxidativen Lochtransport zwischen Peptiden und DNA zu erhalten, werden Fluoreszenzlöschexperimente mit PydG-modifizierter DNA durchgeführt. PydG dient dabei als Lochdonor.

G	3'-AGT-CAC-TA**Y**-ATC-TGA-CG-5'	**Y** = PydG
C6	5'-TCA-GTG-ATC-TAG-ACT-GC-3'	

Hier wird auf das in der Arbeitsgruppe vorhandene Arsenal an modifizierten Oligonukleotiden zurückgegriffen, die Stränge für Duplex **G/C6** werden von einer Kollegin zur Verfügung gestellt. Als Gegenbase im Komplementärstrang dient dC, in der Annahme, dass sich eine weitgehend normale Watson-Crick-Paarung ausbilden kann.

In den Fluoreszenzlöschexperimenten wird wie bei den PydU-Duplexen bei 360 nm Wellenlänge angeregt und die absorptionskorrigierte Fluoreszenzintensität von 390-630 nm integriert.

4.2.3.1 Experimente mit Peptiden

Die Experimente zu Fluoreszenzlöschung konzentrieren sich bei **G/C6** auf den Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung **pNB**-modifizierter und unmodifizierter Oligolysine und das Eingreifen aromatischer Aminosäureseitenketten in den Ladungstransport. Tryptophan ($E^0(W^{\bullet+}/W) \approx 1.0$ V) sollte in **G/C6** in der Lage sein, die positive radikalische Ladung vom Guaninrest des PydG abzufangen ($E^0(G^{\bullet+}/G) \approx 1.3$ V) und somit zu einer effizienten Löschung der Fluoreszenz zu führen.

Ein Vergleich der mit **G/C6** erhaltenen Daten mit den Ergebnissen des PydU-haltigen Duplexes **D3/C3** vereinfacht die Interpretation des Fluoreszenzverhaltens des PydG-modifizierten Doppelstrangs.

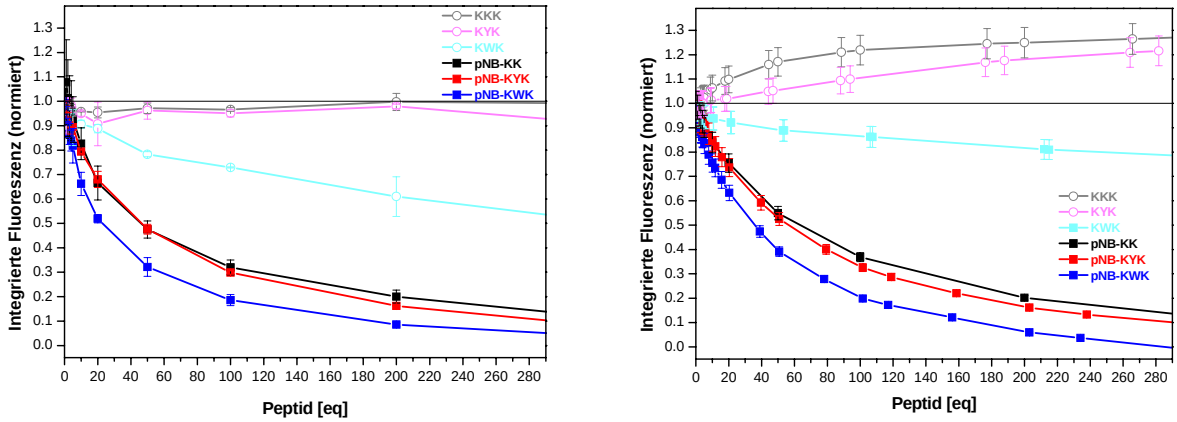


Abbildung 4-21: Fluoreszenzlöschung von 1.25 µM Duplex **E/C5** (*links*) und 5 µM Duplex **D3/C3** (*rechts*) in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm).

Am auffälligsten ist das Fehlen eines Fluoreszenzanstiegs von **G/C6** bei der Zugabe von unmodifiziertem **KKK** und **KYK**. Offensichtlich ist die Wechselwirkung dieser Peptide mit **G/C6** eine andere als mit **D3/C3**.

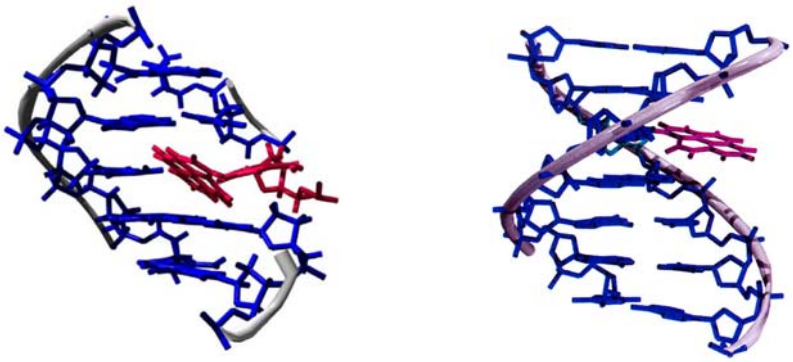


Abbildung 4-22: Schematische Darstellung der Strukturen von PydG (*links*) und PydU (*rechts*) in DNA. Die Pyrengruppe des PydG interkaliert partiell durch die *syn*-Konformation des Nukleotids. Die Pyrengruppe des PydU ragt dagegen aus dem Basenstapel heraus in die große Furche.

Durch die *syn*-Konformation des PydG-Nukleosids im Gegensatz zu der *anti*-Konformation des unmodifizierten Purins kommt es zu einer starken lokalen Strukturstörung der B-DNA im Bereich der Modifikation.[16] Der Pyrenrest interkaliert partiell in den Basenstapel und ist somit den Einflüssen anlagernder Peptide nicht so stark ausgesetzt. Beim PydU hingegen befindet sich der Pyrenrest außerhalb des Basenstapels. Dieser kann durch gebundene Peptide z. B. zu einer Interkalation gezwungen werden. Somit nehmen DNA-bindende Peptide Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten von PydU.

Eine Betrachtung der Differenzspektren im Vergleich zu denen des Duplexes **D3/C3** zeigt annähernd denselben Bindungsmodus von **KKK** und **KYK** an **G/C6** wie in **D3/C3**. In Anbetracht der Tatsache, dass die Spektren des PydG-Duplexes mit 100 eq Peptid denen des PydU-

Duplexes bei 20 eq ähnlicher sind als bei der gleichen Anzahl, kann von einer geringeren Bindungstendenz ausgegangen werden. Zusammen mit dem beobachteten Löschverhalten in den Fluoreszenzexperimenten spricht dies für eine starke lokale Störung der DNA-Struktur im Bereich des PydG-Chromophors.

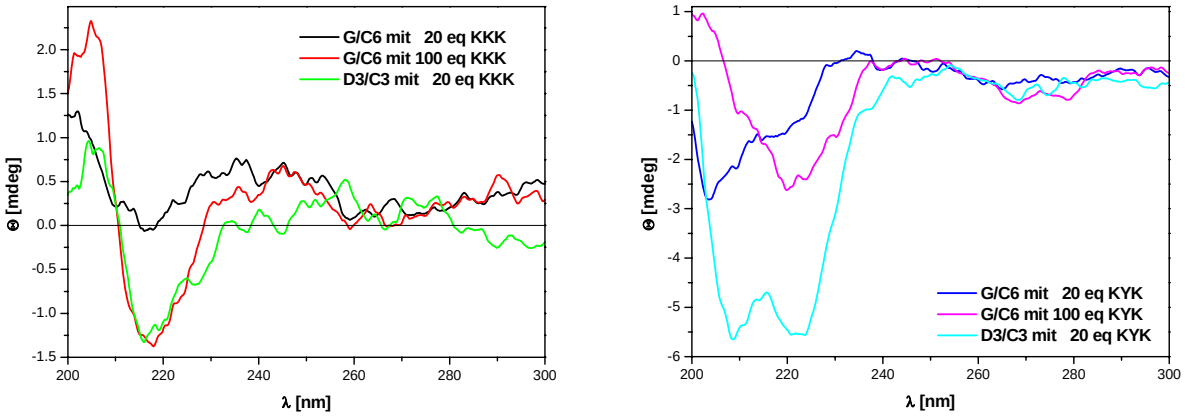


Abbildung 4-23: Differenz-CD-Spektrum von 1.25 µM **G/C6** bzw. 2.5 µM **D3/C3** in 10 mM NaP_i (pH 7) mit **KKK** (*links*) und **KYK** (*rechts*).

Im weiteren Vergleich der Spektren erkennt man den nahezu identischen Verlauf der Fluoreszenzkurven von **pNB-KK** und **pNB-KYK** bei **D3/C3** und **G/C6**. Die **pNB**-Gruppe an den Peptiden fungiert auch im PydG-Duplex als Elektronenakzeptor. Der Elektronendonor ist in diesem Fall allerdings der Pyrenrest. Die Tyrosinseitenkette ist trotz ihres Redoxpotentials ($E^0(Y^{\bullet+}/Y) \approx 0.9$ V) nicht in der Lage, die positive radikalische Ladung vom Guaninrest des PydG abzufangen. Offensichtlich reicht die elektronische Kopplung der Phenol-Seitenkette (im Gegensatz zum Indolrest) mit PydG nicht aus.

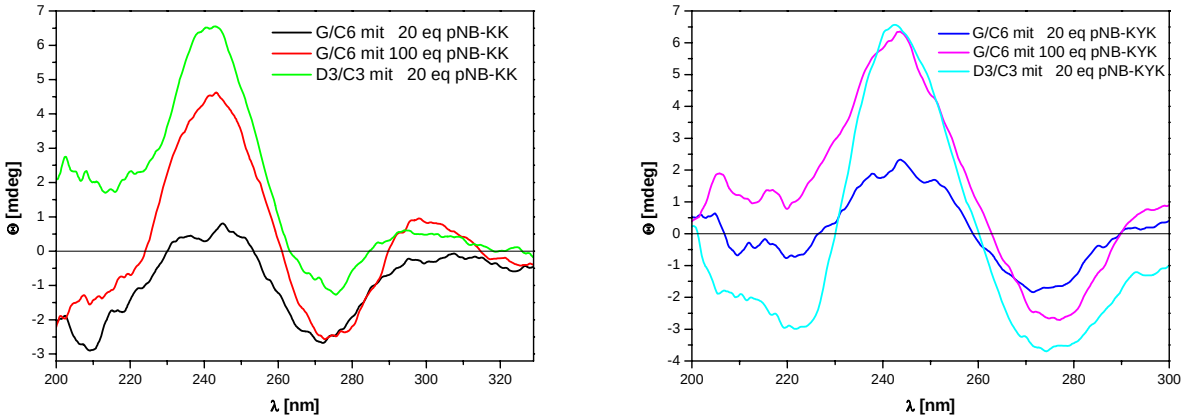


Abbildung 4-24: Differenz-CD-Spektrum von 1.25 µM **G/C6** bzw. 2.5 µM **D3/C3** in 10 mM NaP_i (pH 7) mit **pNB-KK** (*links*) und **pNB-KYK** (*rechts*).

Auch hier gilt für die Differenz-CD-Spektren, dass sie eine große Ähnlichkeit mit denen des PydU-Duplexes bei 100 eq aufweisen. Das Differenz-CD-Spektrum wird von den Signalen

der **pNB**-Gruppe dominiert, so dass keine Aussage über das Stattfinden einer Interkalation des Tyrosins gemacht werden kann.

Der größte Unterschied im Fluoreszenzverhalten im Vergleich der Duplexe **D3/C3** und **G/C6** ist bei den Tryptophan-haltigen Peptiden erkennbar. Das unmodifizierte **KWK** löscht die Fluoreszenz von **G/C6** deutlich stärker als im Fall von **D3/C3**. Die Indolseitenkette ist also bei PydG in der Lage, die kationische radikalische Ladung vom Guaninrest des PydG effektiv abzufangen. Das modifizierte Tripeptid **pNB-KWK** weist keine Steigerung der Löscheffizienz auf. Das Peptid **pNB-KWK** kann also mit der **pNB**-Gruppe das Überschusselektron des Pyrenradikalanions und mit dem Tryptophanrest das Loch am Guaninradikalkation abfangen.

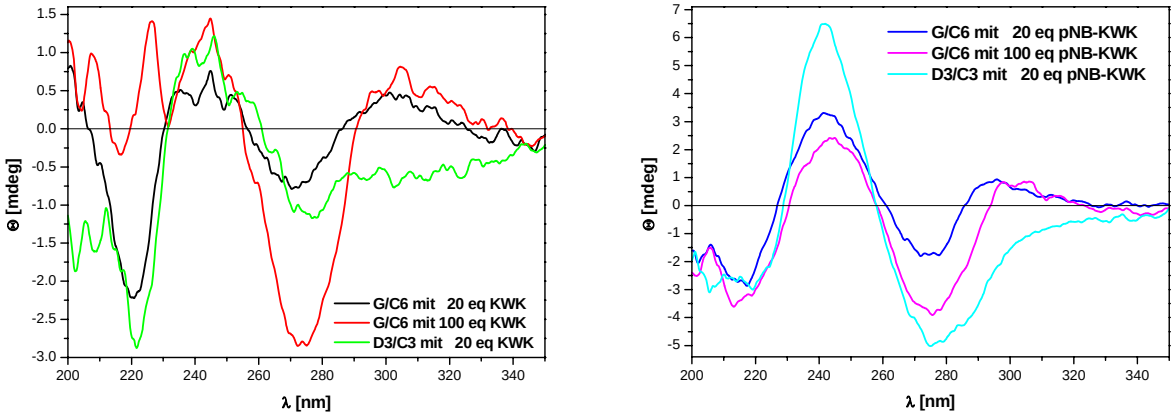


Abbildung 4-25: Differenz-CD-Spektrum von 1.25 µM **G/C6** bzw. 2.5 µM **D3/C3** in 10 mM NaP_i (pH 7) mit **KWK** (*links*) und **pNB-KWK** (*rechts*).

Das Differenz-CD-Spektrum von **KWK** mit **G/C6** mit 20 eq ist dem von **D3/C3** sehr ähnlich. Bei 100 eq nimmt die Intensität der von der Interkalation des Tryptophans stammenden negativen Bande mit einem Minimum von 275 nm deutlich zu, während die von der Lysin-Phopsphat-Wechselwirkung stammende Bande bei 220 nm verschwindet. Das weist auf eine sehr intensive Interaktion des Tryptophans mit **G/C6** hin. Das Differenz-CD-Spektrum von **pNB-KWK** wird von den Signalen des Elektronenakzeptors bestimmt. Die Intensität der Banden in **G/C6** im Vergleich **D3/C3** ist geringer. Die Interkalation des Elektronenakzeptors wird durch die lokal gestörte Struktur in der Nähe des PydG erschwert.

4.2.4 Duplexe mit *abasic-sites*

Wie sich in den bisherigen Fluoreszenzlösch-Experimenten gezeigt hat, nehmen Struktureffekte bei den Untersuchungen zum Ladungstransfer eine bestimmende Rolle ein. Eine *abasic site* kann auf verschiedene Arten die Strukturparameter und somit die Bindungseigenschaften von Peptiden an Duplex-DNA beeinflussen. Zum einen steht dem Chromophor durch die fehlende Nukleobase im Gegenstrang an dieser Stelle vermehrt Platz zur Verfügung, was zu einer Umorientierung des modifizierten Nukleotids führt (vgl. Kapitel 3.2.2). Zum anderen ist bekannt, dass an *abasic sites* aromatische Gruppen, wie z. B. aromatische Aminosäureseitenketten, bevorzugt interkalieren.[233, 328, 329] Lagern sich die verwendeten Peptide tatsächlich bevorzugt an diesen Positionen in den DNA-Duplex ein, wird die Bindung zwischen Oligonukleotid und Peptid regiospezifischer. Somit ließe sich der Abstand zwischen Ladungsdonor und peptidisch gebundenem Akzeptor steuern. Dies sollte Veränderung im Ladungstransferverhalten bewirken.

Um nun weitere Informationen über den Ladungstransfer zwischen Peptiden und DNA zu erhalten, werden Fluoreszenztitrationen mit den in Kapitel 3.2 besprochenen PydU- und Ethidiumduplexen, die im Gegenstrang eine *abasic site* tragen, durchgeführt.

4.2.4.1 Experimente mit Abasic-Site-*Duplexen des PydUs*

Die PydU-haltigen Duplexe **D3/A1-D3/A5** sind für die Fluoreszenzlöschexperimente von großem Interesse, da sie, wie bereits gezeigt, eine sehr hohe Struktursensibilität aufweisen. Dabei spielen die beiden Duplexe **D3/A2** und **D3/A3** eine besonders wichtige Rolle, weil sie trotz ihrer ähnlichen Sequenz bereits ohne Zugabe eines externen Ladungsakzeptors stark unterschiedliche Ladungstransfereigenschaften zeigen.

Abbildung 4-26 zeigt die Übersicht über die durchgeführten Messreihen. Auffällig ist der frühe Übergang der **KWK**-Kurven der Duplexe **D3/A3** (> 100 eq), **D3/A4** (> 20 eq) und **D3/A5** (> 20 eq) in ein Sättigungsplateau. Der Sättigungsbereich aller anderen DNA-Peptid-Systeme liegt bei über 150 eq. Der sehr rasch erreichte Punkt, an dem die Zugabe weiteren Peptids keine Löschung der Fluoreszenz mehr bewirkt, spricht für eine relativ starke und

möglicherweise spezifische Bindung des Peptids an den Doppelstrang, bzw. dafür, dass nur ein bestimmter Bindungsmodus zu einer Fluoreszenzlöschung führt, wenn man von einem Übergang von spezifischer zu unspezifischer Bindung bei entsprechend hoher Peptidkonzentration ausgeht.

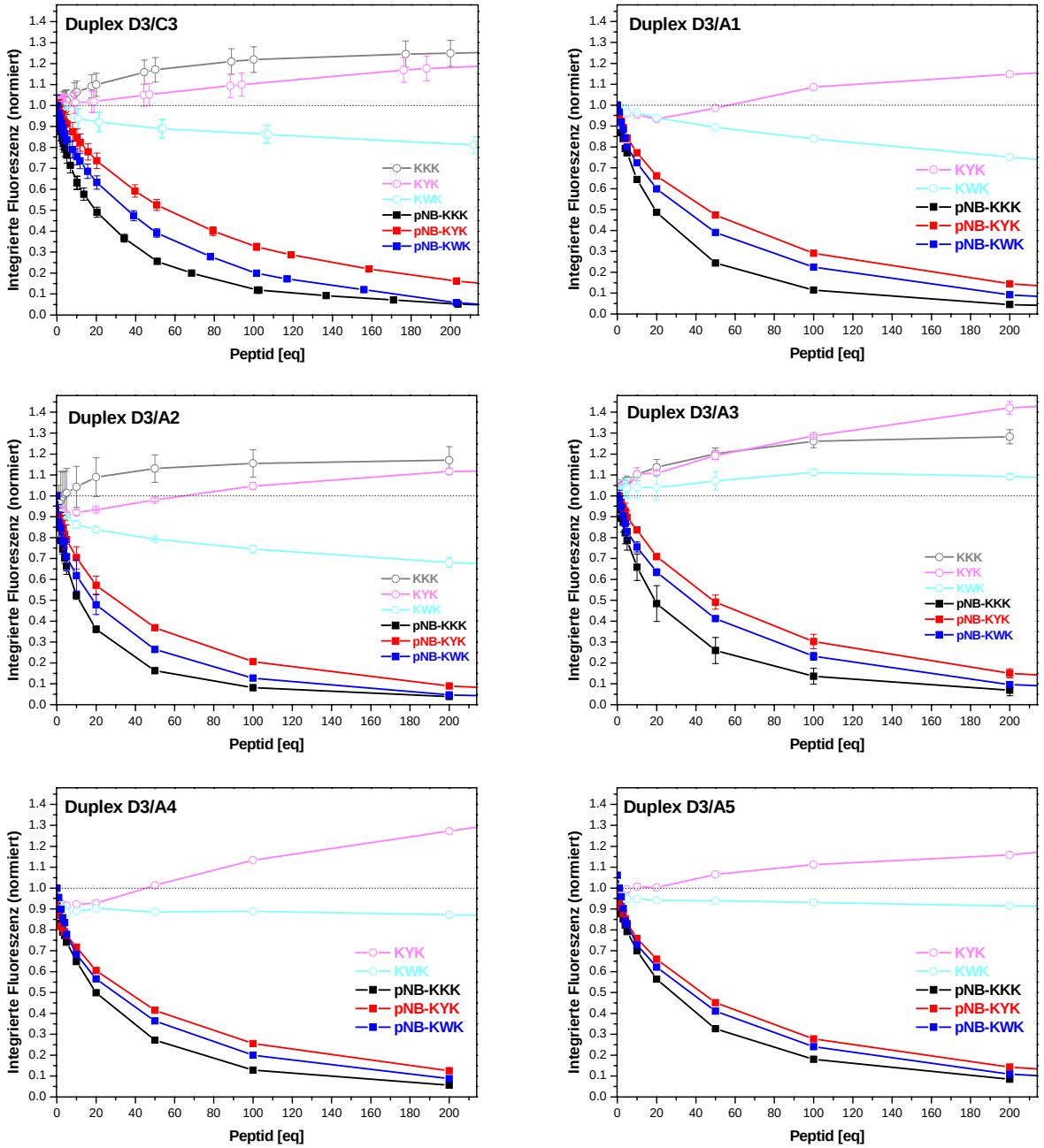


Abbildung 4-26: Fluoreszenzlöschung von 5 µM Duplexen in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm).

Unterschiede im Bindungsmodus werden in den Differenz-CD-Spektren sichtbar. Die Differenz-CD-Spektren von **D3/A4** und **D3/A5** unterscheiden sich von denen der übrigen *abasic site* Duplexe. In der Auftragung fehlt **D3/A3**, da sein abweichendes Fluoreszenzverhalten auf eine differierende Art der Peptid-DNA-Interaktion hinweist. Das Differenz-CD von **D3/A5**

weist ein sehr intensives Minimum bei 220 nm auf, das in den anderen Doppelsträngen weniger ausgeprägt ist.

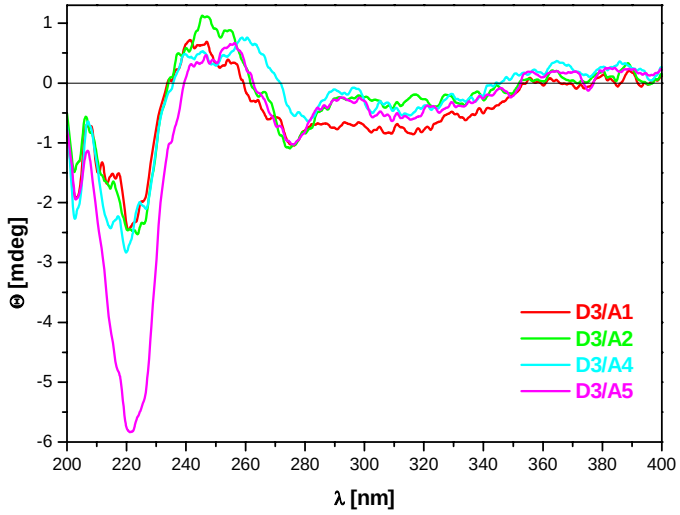


Abbildung 4-27: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM **KWK.**

Eine Ausnahme in den Fluoreszenzgraphen stellt der Verlauf der **KWK**-Kurve in **D3/A3** dar. Im Gegensatz zu allen anderen Duplexen löscht hier das Peptid die Fluoreszenz nicht. Das Differenz-CD-Spektrum von **D3/A3** macht den Unterschied im Bindungsverhalten von **KWK** mit diesem Duplex offensichtlich. Möglicherweise kommt in **D3/A3** die signifikante Bande bei 230 nm durch eine Wechselwirkung der Indolseitenkette des Tryptophans mit dem Pyrenrest des PydU zustande. Das würde eine stark veränderte Bindung des **KWK** an den Doppelstrang **D3/A3** bedeuten. Somit würden sich auch die Ladungstransfereigenschaften in diesem Peptid-DNA-System von den bisher betrachteten deutlich unterscheiden, was die unterdrückte Fluoreszenzlöschung bereits nahe legt.

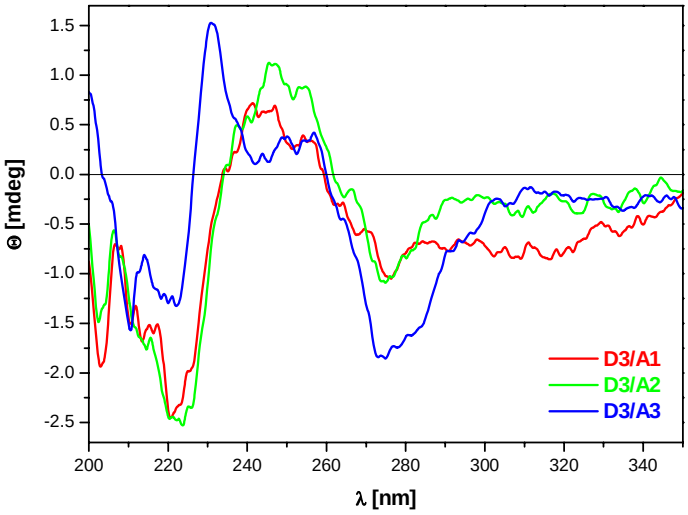


Abbildung 4-28: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM **KWK.**

Die Frage, die mithilfe dieser Löschexperimente und den *abasic site*-Duplexen in erster Linie beantwortet werden soll, ist die nach der Modulation der Ladungstransfereigenschaften des Peptid-DNA-*Interfaces*. Sollte eine bevorzugte Interkalation an den Stellen einer fehlenden Nukleobase stattfinden, müsste sich das in einer gesteigerten Löscheffizienz auswirken. Diese wird sich erwartungsgemäß bereits bei niedriger Peptidkonzentration zeigen. Um einen besseren Vergleich zwischen den Daten zu ermöglichen, sind in folgenden Diagrammen die Werte des normierten Fluoreszenzintensitätsintegrals als „Absolute Fluoreszenzänderung“ und die auf die Beträge von **D3/C3** normierten Werte als „Relative Fluoreszenzänderung in Prozent“ angegeben.

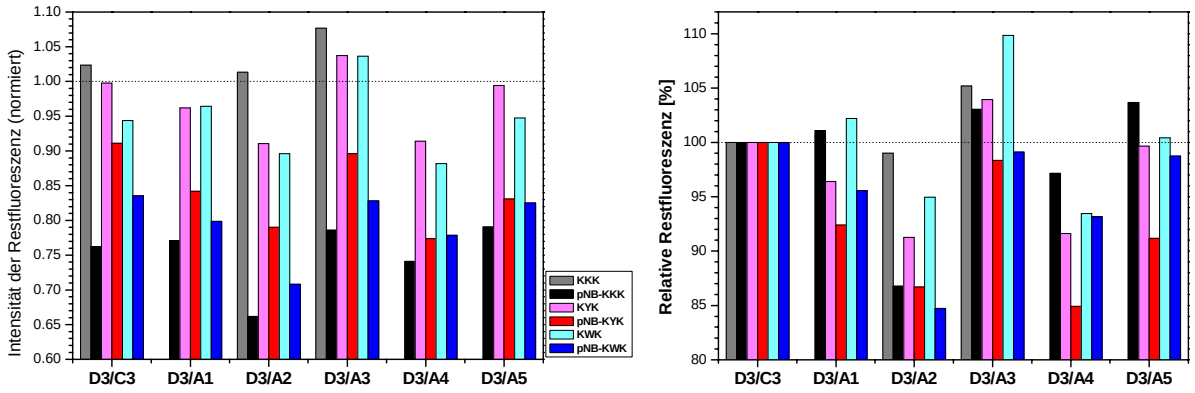


Abbildung 4-29: Auftragung der Restfluoreszenzen bei Zugabe von 5 eq Peptid.
Absolute Änderung (*links*), Relative Änderung (*rechts*)

Bei der Zugabe von 5 eq Peptid ist noch keine der Fluoreszenzkurven gesättigt, der Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten ist jedoch ausreichend, um eine zuverlässige Aussage zu erlauben. Eine Auftragung der Werte bei 1 eq erfüllt diese Voraussetzung nicht.

Im Diagramm der absoluten Fluoreszenzänderung erkennt man sehr gut, ob ein Peptid eine Fluoreszenzlöschung bewirkt oder nicht. So sieht man beispielsweise deutlich, dass bereits diese Peptidkonzentration bei **KKK** ausreicht, um eine Fluoreszenzverstärkung zu erreichen, während **KWK** und **KYK** in allen Duplexen bis auf **D3/A3** löschen bzw. die Emission unbeeinflusst lassen. Um diese Abweichung in der Fluoreszenzintensität zu relativieren und somit den Effekt der Peptide untereinander vergleichbar zu machen, werden sie auf den Wert der entsprechenden Fluoreszenz von **D3/C3** (Duplex ohne *abasic site*) normiert. Abweichungen von ≥10 % von den Werten des *match*-Duplexes sind dabei als signifikant zu werten.

Interessanterweise treten die größten Abweichungen bei den beiden Duplexen **D3/A2** und **D3/A4** auf, in denen sich die *abasic site* in 5’-Richtung vom PydU befindet. Zumindest bei geringen Konzentrationen bewirkt diese Basenfehlpaarung in 5’-Position eine Verstärkung des Ladungstransfers, was sich in einer Steigerung der Löscheffizienz zeigt. **D3/A2** löscht mit

den drei pNB-modifizierten Peptiden **pNB-KKK**, **pNB-KYK** und **pNB-KWK** deutlich effizienter als die Referenz. Auch im System **D3/A4** mit **pNB-KYK** verringert sich die Emission stärker als erwartet. In **D3/A3** nimmt die Emission mit **KWK** unverhältnismäßig zu.

Bei Peptidkonzentrationen unterhalb der Sättigung führt anscheinend der Einbau einer *abasic site* in den DNA-Duplex zu einer Verstärkung der Peptid-DNA-Interaktion. Diese wiederum kann das Löschen der PydU-Fluoreszenz mit einem Peptid entweder begünstigen (**D3/A2**, **D3/A4**) oder erschweren (**D3/A3**). Tendenziell bewirkt eine Fehlstelle in 5'-Richtung mit einem **pNB**-haltigen Peptid eine stärkere Löschung. Möglicherweise interkaliert hier der **pNB**-Rest bevorzugt in der *abasic site*. Der Indolrest des Tryptophans scheint eine Sonderstellung innerhalb der aromatischen Aminosäuren in der DNA-Peptid-Wechselwirkung einzunehmen.

Diese Ausnahmestellung der Tryptophan-haltigen Peptide spiegelt sich sehr schön in den folgenden Diagrammen zur absoluten und relativen Fluoreszenzänderung bei 200 eq Peptidzugabe wider. Bei dieser Peptidkonzentration ist in allen Duplexen schon ein weitgehender Sättigungseffekt zu beobachten. In der Auftragung der absoluten Fluoreszenzänderung wird die ungewöhnliche Fluoreszenzsteigerung von **D3/A3** mit **KWK** erneut sichtbar.

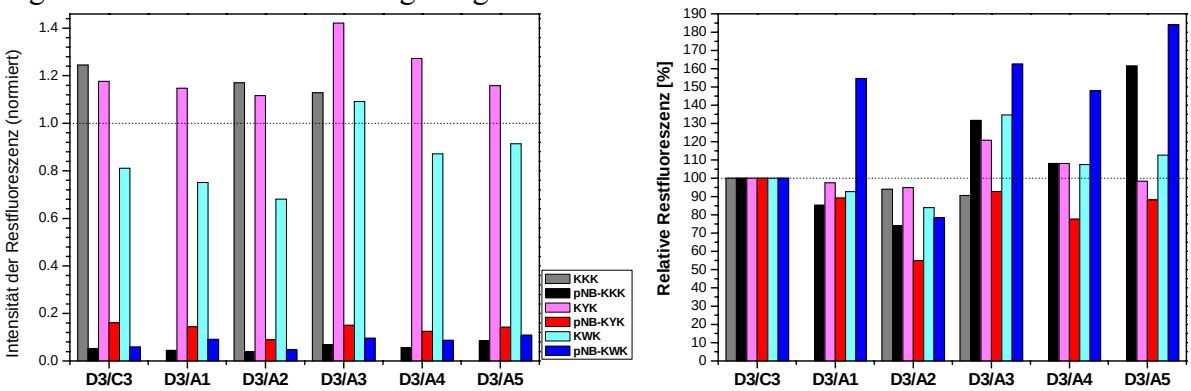


Abbildung 4-30: Auftragung der Restfluoreszenzen bei Zugabe von 200 eq Peptid. Absolute Änderung (*links*), Relative Änderung (*rechts*)

KKK und **KYK** führen in jedem der betrachteten Duplexe zu einer erhöhten Emission. Alle **pNB**-enthaltenden Peptide löschen die Fluoreszenz. Eine Betrachtung der relativen Fluoreszenzänderung veranschaulicht eine bemerkenswerte Verringerung der Löscheffizienz von **pNB-KWK** in allen Duplexen, außer **D3/A2**. **pNB-KKK** unterliegt demselben Effekt in den Duplexen mit der *abasic site* in 3'-Position vom PydU, also **D3/A3** und **D3/A5**. Insgesamt betrachtet sind in **D3/A2** bis auf **KKK** und **KYK** alle Löscheffizienzen höher und in **D3/A3** bis auf **KKK** und **pNB-KYK** niedriger als im Referenzduplex. Die bereits in vielen Fluores-

zenzexperimenten beobachtete Richtungsabhängigkeit des Ladungstransfers zeigt sich hier erneut.

Betrachtet man die Differenz-CD-Spektren als Indikator für Unterschiede im Bindungsverhalten eines Peptids an DNA, so erkennt man beispielweise im Falle des **pNB-KKK**, dass dieses in den verschiedenen Duplexen nur wenig unterschiedlich bindet.

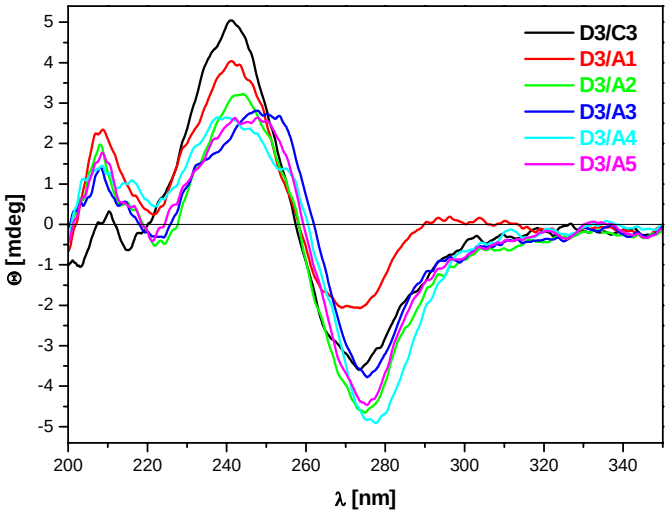


Abbildung 4-31: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM **pNB-KKK.**

Die beobachtete Richtungsabhängigkeit des Landungstransfers zeigt sich nicht durch eine signifikante Veränderung des Bindungsverhaltens. Somit ergibt sich die Direktionalität nicht aus einer unterschiedlichen Bindung des Peptids an die DNA sondern tatsächlich aus einer intrinsischen Eigenschaft des modifizierten Oligonukleotids.

4.2.4.2 Experimente mit Abasic-Site-*Duplexen des Ethidiumnukleotids*

Wie bereits bei den Fluoreszenzlöschexperimenten der *match*-Duplexe so wird auch hier das Quenchverhalten der PydU-Duplexe mit denen des Ethidiums verglichen. Eingesetzt werden hierfür die mit einer *abasic site* modifizierten Duplexe **E/A6-E/A10** aus Kapitel 3.2.3. Da sich hier der Ladungstransfer in einem Tunnelprozess[188] vollzieht, der stark vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptor abhängt, kann davon ausgegangen werden, dass sich hier die regiospezifische Einlagerung aromatischer Aminosäureseitenketten besonders deutlich auswirkt.

Abbildung 4-32 zeigt eine Übersicht der gemessenen Fluoreszenzkurven. Eine Tendenz ist prinzipiell zu erkennen: Das Löschvermögen und somit der Ladungstransfer nehmen nicht zu. Der Duplex **E/A6** zeigt einen vergleichbaren Kurvenverlauf wie **E/C5**, alle anderen Kurven verlaufen deutlich flacher als im *match*-Duplex. Das System **KWK-E/A6** weicht etwas von den übrigen ab und weist eine Verstärkung der Fluoreszenz auf.

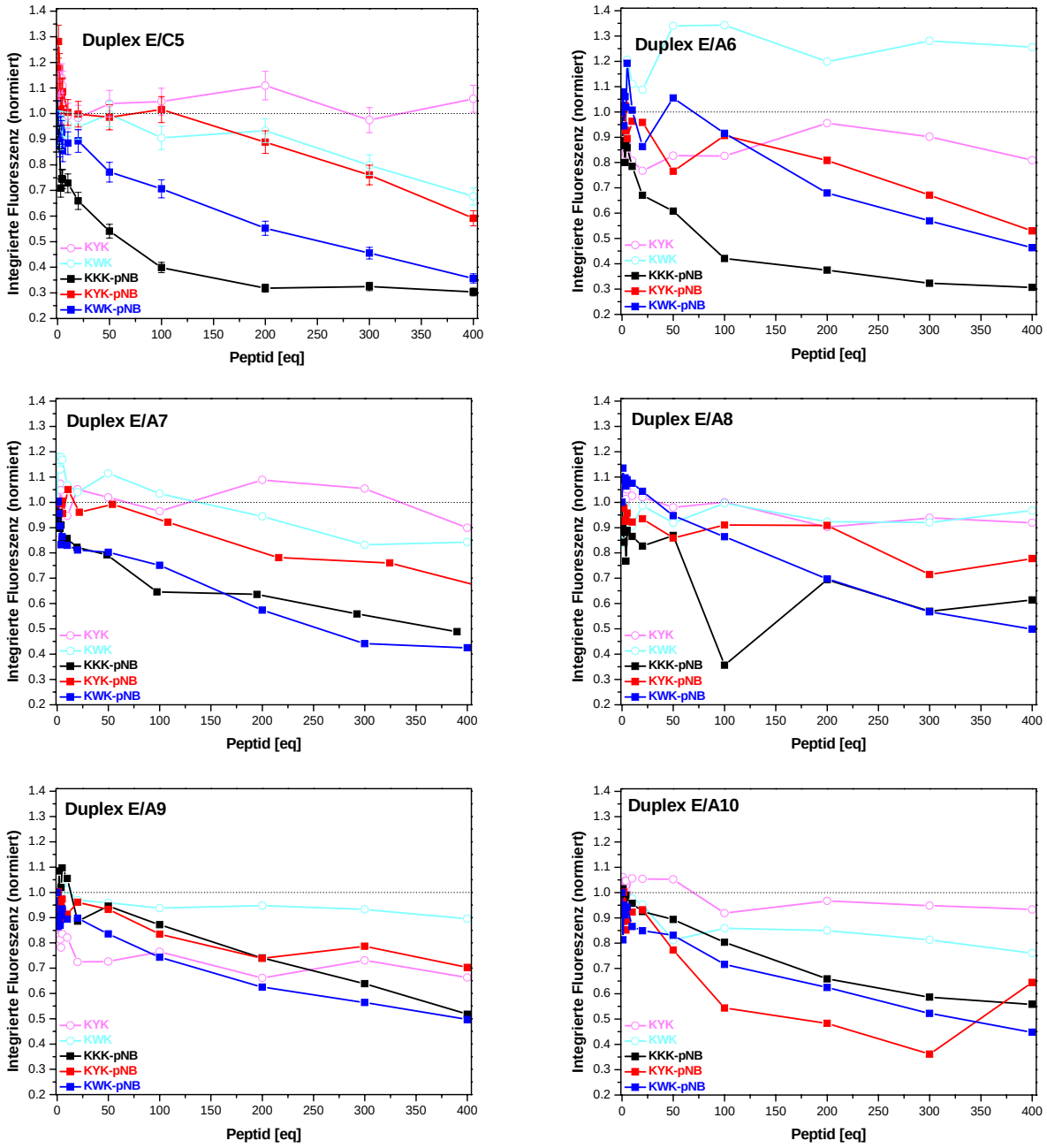


Abbildung 4-32: Fluoreszenzlöschung von 5 µM Duplexen in 10 mM NaP_i (λ_{exc}= 360 nm).

Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Erwartungen aus dem mechanistischen Modell des Superaustausches. In **E/A6** binden die Peptide bevorzugt in unmittelbarer Nähe des Ethidiumchromophors, während sie in **E/A7-E/A10** weiter entfernt binden. Dementsprechend

ist die Effizienz des Elektronentransfers und somit der Fluoreszenzlöschung in **E/A6** höher. **KWK** reagiert sehr sensibel auf die Anwesenheit einer *abasic site* und verändert seine Interaktion mit dem Ethidiumchromophor stark .

In den Differenz-CD-Spektren zeigt sich eindeutig, dass sowohl **pNB-KKK** als auch **KWK** an alle Duplexe in gleicher Weise bindet. Es sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Diese Daten belegen, dass die Strukturstörung in den Ethidium-modifizierten Duplexen so weit geht, dass der sich bei den PydU enthaltenden Doppelsträngen abzeichnende Effekt der *abasic sites* nicht auftritt. Entsprechend liefern diese Daten keine weiteren Erkenntnisse.

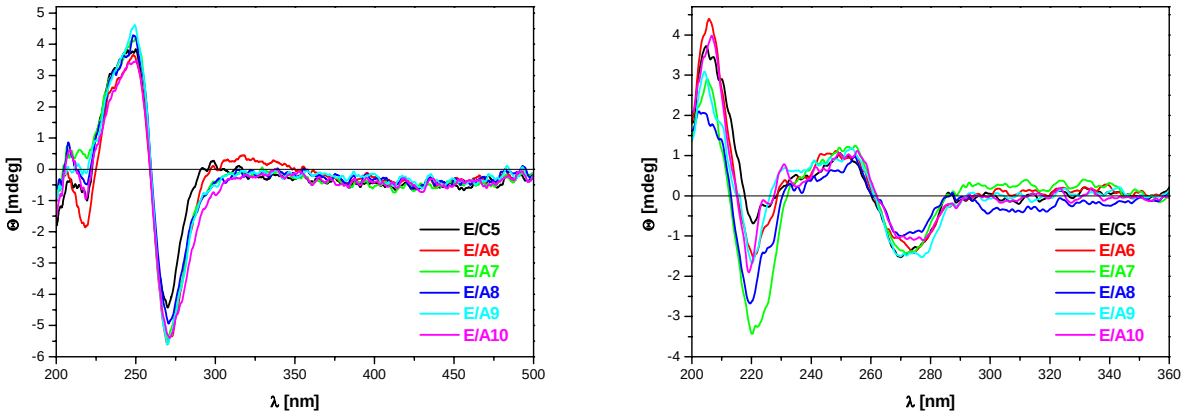


Abbildung 4-33: Differenz-CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl mit 50 µM **pNB-KKK** (*links*) und **KWK** (*rechts*).

4.2.5 Zusammenfassung der Untersuchung des Ladungstransfers in nicht kovalenten Peptid-DNA-Systemen

Für den Ladungstransfer zwischen PydU-haltiger Duplex-DNA und kurzen Peptiden mit **pNB** als Elektronenakzeptor lassen sich mehrere grundlegende Resultate benennen.

- Die Stärke der Bindung zwischen Oligonukleotid und Peptid entscheidet über die Effizienz des Ladungstransfers, wie die Untersuchung der Oligolysine zeigt.
- Die **pNB**-Gruppe interkaliert in allen verwendeten Peptiden in den Basenstapel des Duplexes.
- Die Interkalation des Ladungsakzeptors ist eine notwendige Bedingung für einen effizienten Ladungstransfer. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich dabei um den Elektronenak-

zeptor selbst oder um eine Aminosäureseitenkette mit entsprechendem Redoxpotential (Trp) handelt.

- Der Ladungstransfer kann gleichzeitig an unterschiedlichen Positionen der Peptid-DNA-Schnittstelle oxidativ und reduktiv ablaufen, wie das Beispiel des **pNB-KWK** zeigt.
- Eine Thiol- (Cys) und eine sekundäre Alkoholfunktion (Thr) greifen nicht unmittelbar in den Ladungstransferprozess zwischen dem Peptid und der DNA ein.

Der Ladungstransfer im Ethidum-**pNB**-System wird wie im PydU-pNB-System durch die Bindung zwischen Peptid und DNA bestimmt. Auch hier ist die Interkalation des Ladungsakzeptors notwendig, um einen Elektronentransfer zu ermöglichen. Anders als im Fall des PydU-Chromophors wird die Bindung des Peptids in **E/C5** durch die kationische Ladung am Chromophor beeinflusst. Diese führt zu einer Neutralisation anionischer Ladung des DNA-Rückgrates und zu einer Abstossung von Molekülteilen mit gleichnamiger Ladung. Beides bewirkt eine Verschlechterung der Bindung von Lysinseitenketten an den Duplex, v. a. im Bereich des Ladungsdonors. Durch den stark vom Donor-Akzeptor-Abstand abhängigen Elektronentransfer nach dem Superaustauschmechanismus ist in den Fluoreszenzlösch-Experimenten von **E/C5** mit den verschiedenen Peptiden insgesamt ein viel geringerer Effekt zu beobachten als beim PydU-Duplex **D3/C3**.

Der PydG-haltige Duplex **G/C6** weist eine ausgeprägte Strukturstörung im Bereich des PydG-Chromophors auf. Das wird anhand der zum PydU-Duplex unterschiedlichen Bindungstendenz der Peptide ersichtlich. Mit der **pNB-**Gruppe als Elektronenakzeptor findet ein reduktiver Elektronentransfer statt, während mit Tryptophan-Seitenketten ein Lochtransfer zu beobachten ist. Somit verhält sich das PydG-Oligonukleotid im Ladungstransferverhalten ambivalent.

Abasic sites sind in der Lage, die Interkalation bestimmter aromatischer Reste in den DNA-Basenstapel zu verbessern wie die Untersuchungen mit den Duplexen **D3/A1-D3/A5** gezeigt haben. Diese Wechselwirkung beeinflusst den Ladungstransfer zwischen Peptiden und Oligonukleotiden. In der überwiegenden Anzahl der Fälle wird er erleichtert. Die Indolseitenkette des Tryptophans nimmt dabei eine Sonderstellung ein.
Wird die Duplexstruktur eines Oligonukleotids wie im Falle der Ethidium-Sequenzen **E/A6-E/A10** nicht durch das Einbringen einer *abasic site* beeinflusst, so ändern sich auch in diesem System die Eigenschaften des Ladungstransfers zwischen Peptiden und DNA nicht.

4.3 Untersuchung der Fluoreszenzlöschung in spezfischen Peptid-DNA-Komplexen

Durch den Einsatz sequenzspezifisch bindender Peptide soll ein strukturell besser definiertes Donor-Akzeptor-System untersucht werden.

4.3.1 Spezifische Oligonukleotid- und Peptid-Sequenzen

Durch den Einbau einer *abasic site* wurde bereits zuvor versucht, eine Bindungsstelle für ein Oligopeptid zu schaffen, was bei den PydU-Duplexen auch gelang. Der nächste Schritt besteht nun darin, spezifisch an DNA bindende Oligopeptide mit einer **pNB-**Gruppe zu versehen und die Erkennungssequenz des Oligonukleotids mit PydU zu modifizieren. In den Fluoreszenztitrationsexperimenten werden folgende DNA-Sequenzen und Oligopeptide eingesetzt.

DNA-Erkennungssequenzen

D5 3'-CGC-AGC-**XTT-AA**T-CGC-GAG-5'
C7 5'-GCG-TCG-A**AA-TT**A-GCG-CTC-3'

D6 3'-CGC-AGC-T**XT-AA**T-CGC-GAG-5'
C7 5'-GCG-TCG-A**AA-TT**A-GCG-CTC-3'

Nicht spezifische Kontrollsequenz

D3 3'-TAG-TCA-CA**X**-ATA-CTG-AC-5'
C3 5'-ATC-AGT-GTA-TAT-GAC-TG-3'

Sequenzspezifische Peptide

P1 **pNB**-P-R-G-R-P-G
P2 **pNB**-P-R-G-R-P-K-K

Nicht spezifisches Kontroll-Peptid

P3 **pNB**-P-R-K-S-P-R-K

X = PydU

Als Erkennungsmotiv in den Peptiden wurde mittels NMR „*PRGRP*“ identifiziert, wobei die beiden Arginine die elektrostatische Bindung zur DNA darstellen. Das zentrale Glycin, sowie die flankierenden Proline sind essentiell für die Sequenzspezifität und dienen als strukturbestimmende Abstandsdeterminanten. Es wird angenommen, dass **P1-P3** eine dem Distamycin ähnliche gebogene Struktur besitzen.[243, 244]

Die Peptide **P1** und **P2** sollen spezifisch die Basensequenz „*AATT*“ erkennen. Entsprechend sind die DNA-Erkennungssequenzen ausgewählt. Sie enthalten direkt neben (**D5**/**C7**) bzw. am Rande (**D6**/**C7**) der vom Peptid gebundenen DNA-Sequenz PydU als Elektronendonor, um durch einen geringen Abstand zum Elektronenakzeptor einen möglichst hohen Ladungstrans-

fer zu ermöglichen. Als Kontrollen werden der Duplex **D3/C3**, der keine Erkennungssequenz enthält, sowie das Peptid **P3**, das kein *PRGRP*-Motiv enthält, eingesetzt. Sie liefern die Referenzwerte für eine unspezifische Bindung.

4.3.2 Charakterisierung der Peptide

Die Peptide enthalten durch die angeknüpfte **pNB**-Gruppe einen Chromophor, der bei 270 nm eine absorptive Bande mit hoher Extinktion besitzt.

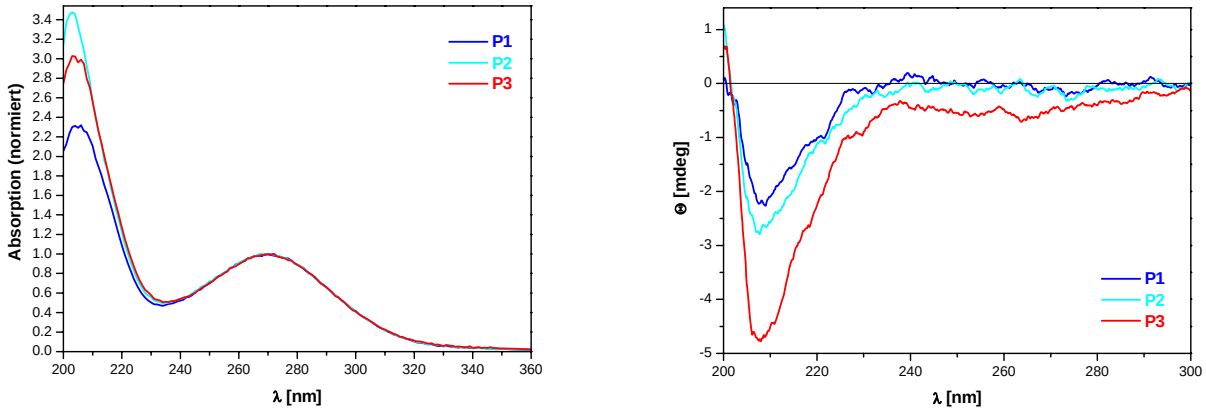


Abbildung 4-34: UV-Vis- (*links*) und CD-Spektren (*rechts*) von 50 µM Peptid in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.

Die Absorptionsbande bei 270 nm bewirkt jedoch kein CD-Signal. Lediglich die Amidbindung zeigt sowohl im UV-Vis- als auch im CD-Spektrum ein Signal.

Untersuchungen mittels 2D-NMR-Spektroskopie zeigen, dass alle drei Peptide in mehreren Konformationen vorliegen, die miteinander austauschen. **P2** und **P3** besitzen je zwei Hauptkonformationen (HK1 und HK2), **P1** weist zusätzlich noch zahlreiche Nebenkonformationen auf. Bei der Betrachtung der beiden Hauptkonformationen fällt auf, dass die Unterschiede in der chemischen Verschiebung zwischen HK1 und HK2 für die Aminosäuren am N-Terminus größer als am C-Terminus ausfallen. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Konformationsänderung in der Nähe des N-Terminus stattfindet. Die cis-/trans-Isomerisierung von Prolin ist ein bekanntes Phänomen in der Peptidanalytik. Auch in diesem Fall handelt es sich um die Konformationsänderung des N-terminalen Prolins. Aus den ROESY-Spektren und den relativen Signalintensitäten (HK1>HK2) kann gefolgert werden, dass HK1 der trans- und HK2 der cis-Konformation entspricht.

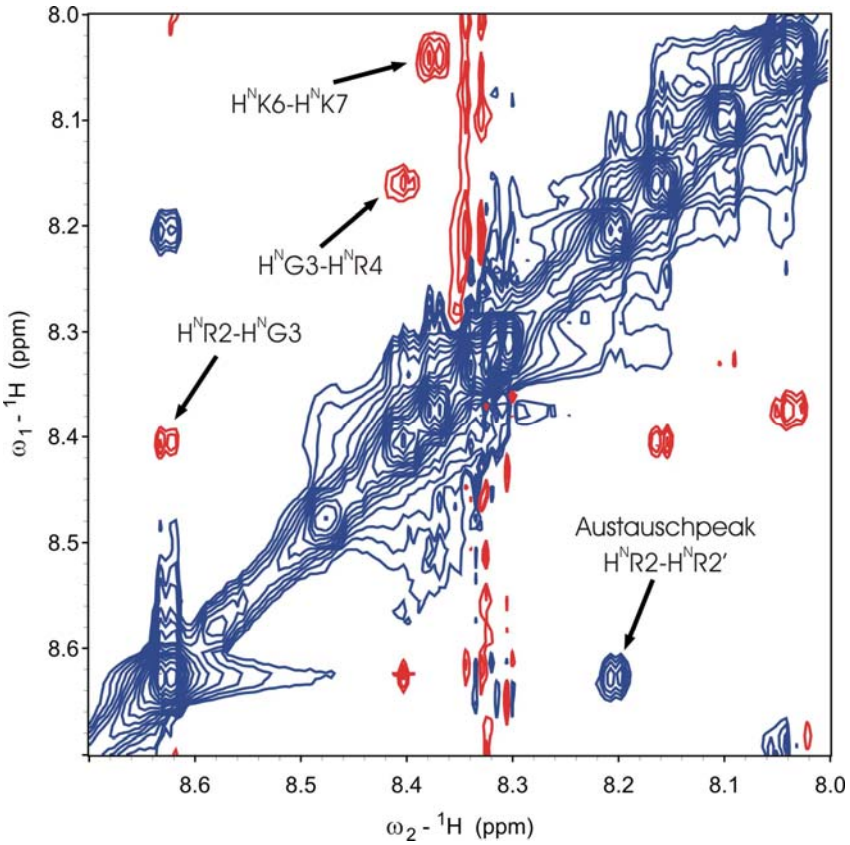


Abbildung 4-35: Auschnitt aus dem ROESY-Spektrum von **P2** in H_2O. Es sind die ROESY-Kreuzpeaks der NH-Protonen von R2-G3, G3-R4 und K6-K7 zu erkennen. Der Austauschpeak besitzt dasselbe Vorzeichen wie die Diagonale des Spekrums und bezeichnet den konformationellen Austausch der NH-Protonen von R2 in HK1 und HK2.

P1 nimmt noch weitere Nebenkonformationen ein, die möglicherweise auf eine cis-/trans-Isomerisierung des zweiten Prolins zurückzuführen sind. Es kommen allerdings noch weitere Ursachen für die Konformationsänderungen in Frage. Im Gegensatz zu den beiden anderen Peptiden besitzt **P1** einen vergleichsweise hydrophoben C-Terminus. Das kann dazu führen, dass intramolekulare Wechselwirkungen begünstigt werden, wie z. B. die Ausbildung von Wasserstoffbrücken der polaren Argininseitenketten mit der Nitrogruppe des **pNB**-Restes. Dies führt zu einer gebogenen Struktur mit in der Rotation gehemmtem **pNB**.

4.3.3 Charakterisierung der Oligonukleotid-Duplexe

Zunächst werden die spektroskopischen Eigenschaften der Duplexe **D5/C7** und **D6/C7** ohne Zugabe eines Peptides bestimmt. Die Spektren von **D3/C3** finden sich in Kapitel 3.1.

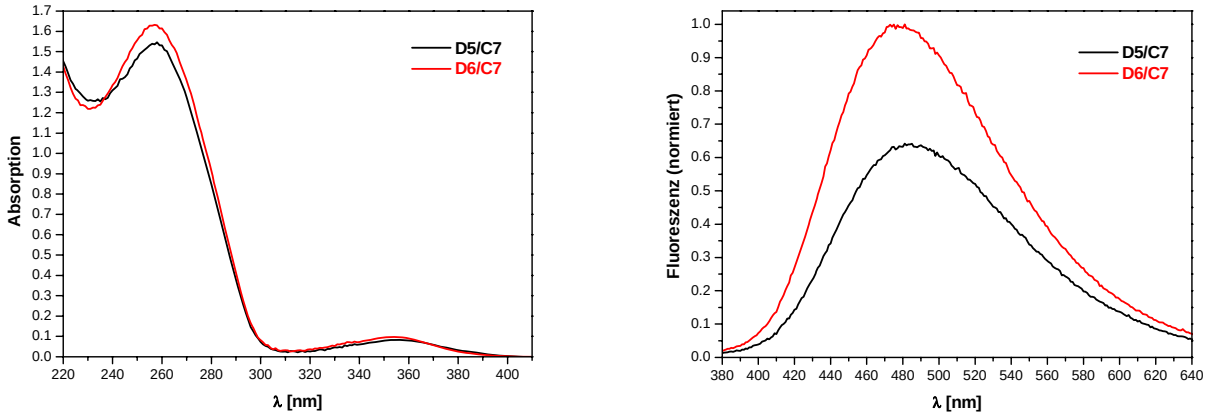


Abbildung 4-36: UV-Vis- und absorptionskorrigiertes Fluoreszenzspektrum (λ_{exc}= 360 nm) von 5 µm Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Das Absorptionsspektrum ist typisch für PydU modifizierte DNA. Das Maximum der Emission liegt in **D5/C7** bei 483 nm, in **D6/C7** bei 478 nm.

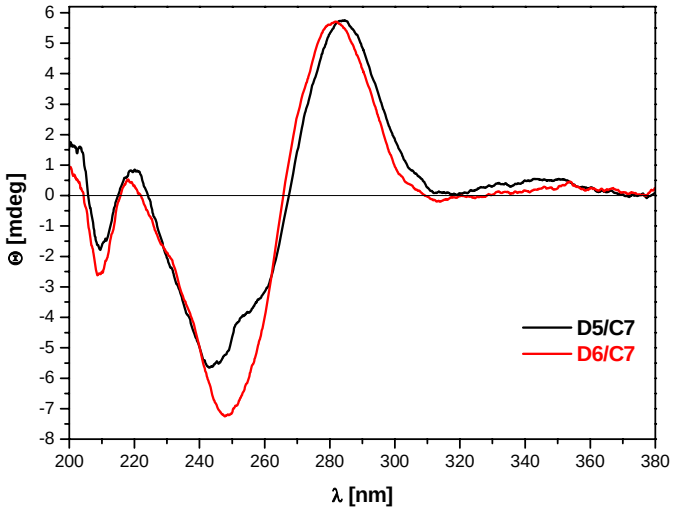


Abbildung 4-37: CD-Spektrum (λ_{exc}= 360 nm) von 5 µm Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Im CD-Spektrum erkennt man bei **D5/C7** eine Schulter im Minimum, wie sie auch beim Duplex **D1/C1** zu beobachten ist. Offensichtlich rührt diese von dC in 3'-Position von PydU aus gesehen her (vgl Kapitel 3.1).

4.3.4 Spektroskopische Untersuchung

Auffällig bei fast allen Fluoreszenztitrationen mit den Peptiden **P1-P3** ist eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 475 zu 456 nm mit den Duplexen **D5/C7** und **D6/C7**. Auch der Duplex **D3/C3** weist mit **P2** diesen signifikanten Shift auf.

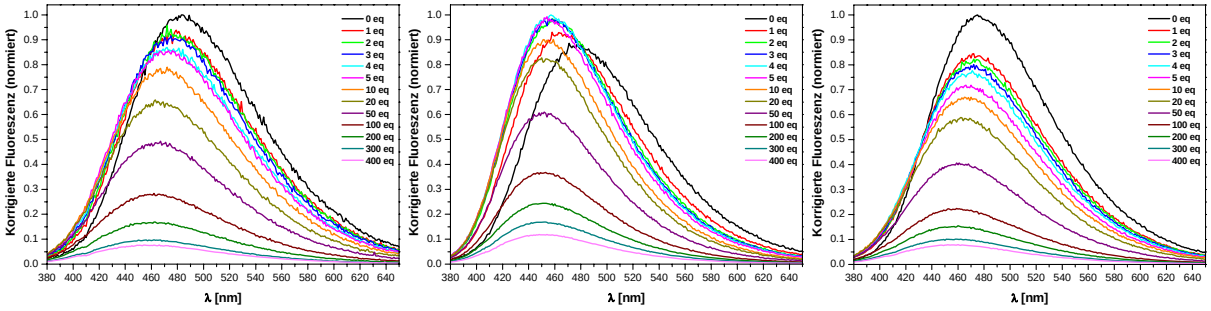


Abbildung 4-38: Auftragung der absorptionskorrigierten Fluoreszenzen (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) bei Zugabe von **P2**. (*links*: **D5/C7**, *Mitte*: **D6/C7**, *rechts*: **D3/C3**)

Diese Verschiebungen der Maxima weisen auf eine komplexe Interaktion der Doppelstränge mit den entsprechenden Peptiden hin, wie sie z. B. bei einer Interkalation des aromatischen **pNB**-Restes in den DNA-Basenstapel auftreten. Es ist wahrscheinlich, dass die Peptide, v. a. **P2** durch ihre Anlagerung die Konformation des PydU-Chromophors beeinflussen und somit einen Blaushift in der Fluoreszenz bewirken. Die hypsochrome Verschiebung legt dabei das Herausdrehen des Pyrenrestes am PydU nahe. Die Bindung zwischen DNA und Peptid vollzieht sich offensichtlich in der Nähe des modifizierten Nukleotids, also sehr wahrscheinlich an der Erkennungssequenz.

Eine Betrachtung der Fluoreszenzkurven bei Quencherzugabe der einzelnen Duplexe lässt die Spezifität der einzelnen Peptide für die jeweilige DNA erkennen.

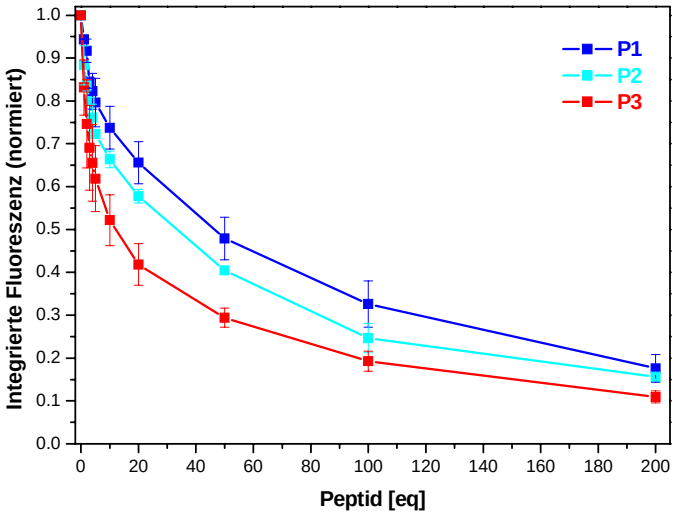


Abbildung 4-39: Fluoreszenzlöschung (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplex **D3/C3** in 10 mM NaP_i (pH 7).

Mit Duplex **D3/C3** quenchen die Peptide entsprechend ihrer Möglichkeiten zur elektrostatischen Bindung. **P3** löscht v. a. bei niedrigeren Konzentrationen sehr effektiv, was von den vier positiv geladenen Seitenketten herrührt. Zudem trägt dieses Peptid ein Serin, was zu einer

zusätzlichen Wasserstoffbrücke vom Peptid zum Phosphatrückgrat der DNA beitragen kann. **P2** führt zu einer rascheren Verminderung der Fluoreszenz als **P1**, was an der höheren Zahl an elektrostatischen Wechselwirkungen durch Arginine und Lysine liegt.

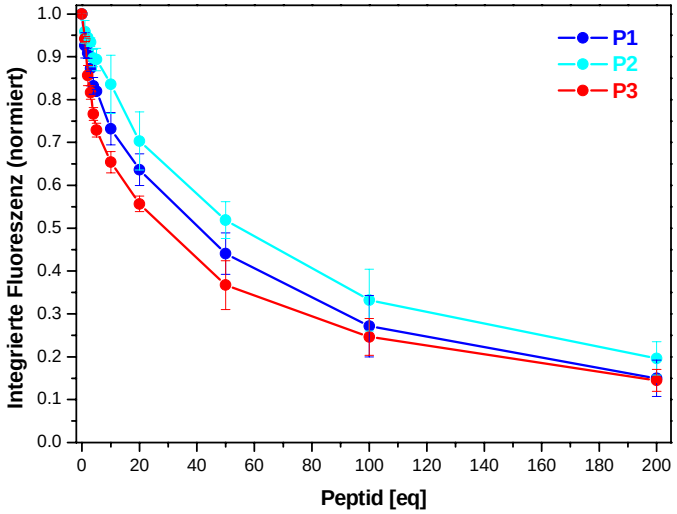


Abbildung 4-40: Fluoreszenzlöschung (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplex **D5/C7** in 10 mM NaP_i (pH 7).

In den Duplexen **D5/C7** und **D6/C7** werden die Unterschiede in der Gestaltung der Erkennungsregion deutlich. In **D5/C7**, wo PydU die Erkennungsregion lediglich flankiert, wird die Sequenzspezifität der Fluoreszenzlöschung in den einzelnen Peptiden durchaus sichtbar. Trotz der geringeren Anzahl an elektrostatischen Bindungsmöglichkeiten verläuft die Kurve von **P1** deutlich steiler als von **P2**. **P3** weist aufgrund seiner vielfältigeren Interaktionsmöglichkeiten und der unspezifischen Bindung die stärkste Löschung auf.

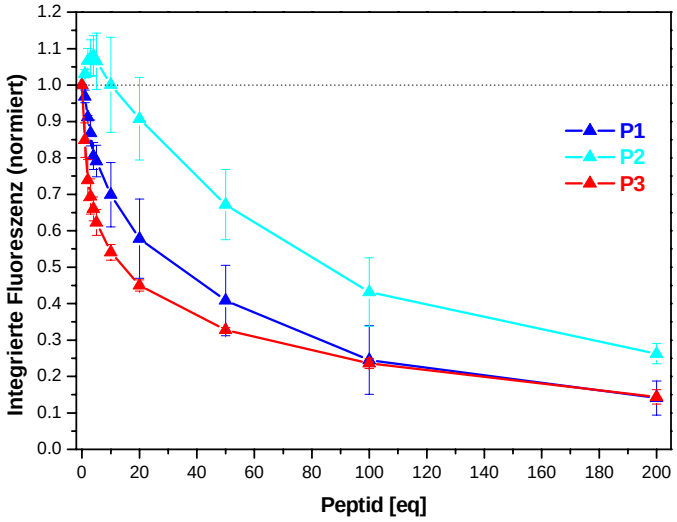


Abbildung 4-41: Fluoreszenzlöschung (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplex **D6/C7** in 10 mM NaP_i (pH 7).

Für Duplex **D6/C7** und **P1** sowie **P3** gilt dasselbe wie für **D5/C7**. Mit **P2** tritt hier ein kurzzeitiger Intensitätsanstieg in der Fluoreszenz bis zur Zugabe von 5 eq auf. Erst bei höherer Konzentration setzt eine Löschung der Emission ein. Dieses Peptid wird in **D6/C7** an der Bindung gehindert. Das spricht für die sequenzspezifische Erkennung des DNA-Motivs. Da sich aber genau an dieser Erkennungsregion eine Störstelle in Form des modifizierten PydU-Nukleotids befindet, wird die spezifische Peptid-DNA-Bindung erschwert.

Die Auftragung der Quenchkurven der unterschiedlichen Duplexe mit demselben Peptid zeigt wie stark das Peptid in seiner Wechselwirkung zwischen den Duplexen unterscheidet. Hier ist zu beachten, dass sie nicht die Spezifität der Peptid-DNA-Bindung zeigt.

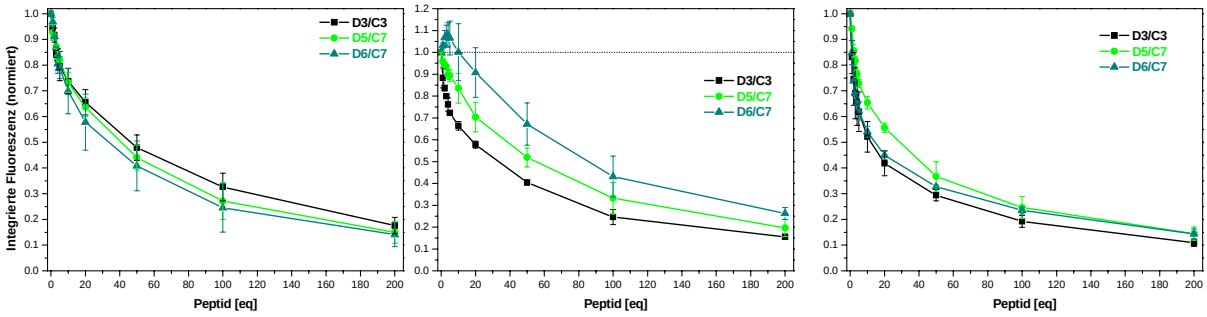


Abbildung 4-42: Fluoreszenzlöschung (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplex **D3/C3**, **D5/C7** und **D6/C7** in 10 mM NaP_i (pH 7) mit **P1** (*links*)**, P2** (*Mitte*)**, P3** (*rechts*).

Es ist dabei klar zu erkennen, dass vor allem **P2** sehr sensibel auf den jeweils gebundenen Duplex reagiert. Deutlich sieht man die gestörte Wechselwirkung zwischen **D6/C7** und dem Peptid durch die PydU-enthaltende Erkennungsregion anhand der flacher verlaufenden Kurve.

P1 und **P3** zeigen mit jedem Duplex dieselbe Quenchcharakterisitik. Das deutet darauf hin, dass in keinem der gebundenen Oligonukleotide die Peptid-DNA-Bindung durch die Anwesenheit des PydU-Nukleotids gestört wird. Es sagt aber nichts darüber aus, wie spezifisch die Bindung erfolgt, da jedes DNA-Peptid-System seine individuelle Fluoreszenzcharakteristik aufweist. Lediglich der ein wenig flachere Kurvenverlauf von **D3/C3** mit **P1** legt die Vermututng nahe, dass **P1** spezifisch auf **D5/C7** und **D6/C7** wirkt.

Die Auftragung der relativen Restfluoreszenzen erlaubt nochmals einen anderen Blickwinkel auf die Sequenzspezifität.

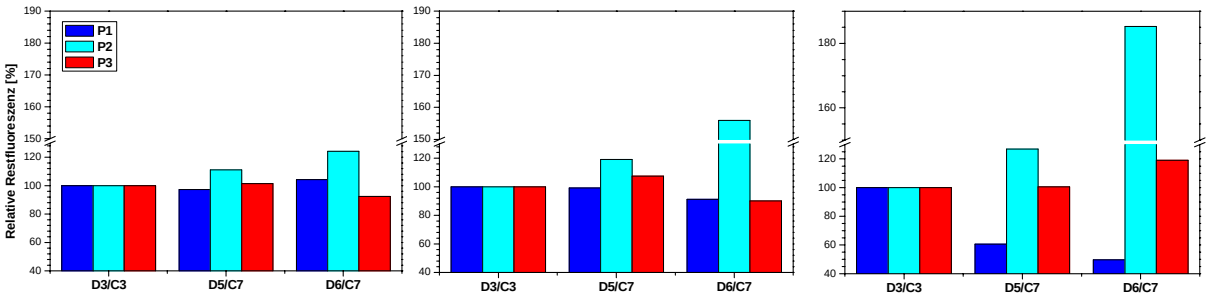


Abbildung 4-43: Auftragung der relativen Änderung der Restfluoreszenzen bei Zugabe von 1 (*links*), 5 (*Mitte*) und 100 eq (*rechts*) Peptid.

Ab dem ersten zugegebenen Äquivalent wird die Abweichung im Löschverhalten von **P2** sichtbar, ein erneuter Hinweis auf die Struktursensitivität der Peptid-DNA-Bindung. **P1** zeigt bei höherer Konzentration eine signifikante Abweichung (> 20 %) von der Norm. Der sequenzspezifische Effekt fällt bei diesem Peptid geringer aus, deshalb wird er erst bei höheren Äquivalenten in dieser Auftragung sichtbar. Er ist aber definitiv vorhanden. Der Vergleich mit dem unspezifischen Peptid belegt das: **P3** bleibt über den gesamten Messbereich in der Norm.

Ein weiteres Indiz für die Sequenzspezifität der Peptid-DNA-Bindungen von **P1** und **P2** findet sich in den Differenz-CD-Spektren. Hier zeigen sich die Unterschiede in den Bindungsverhältnissen.

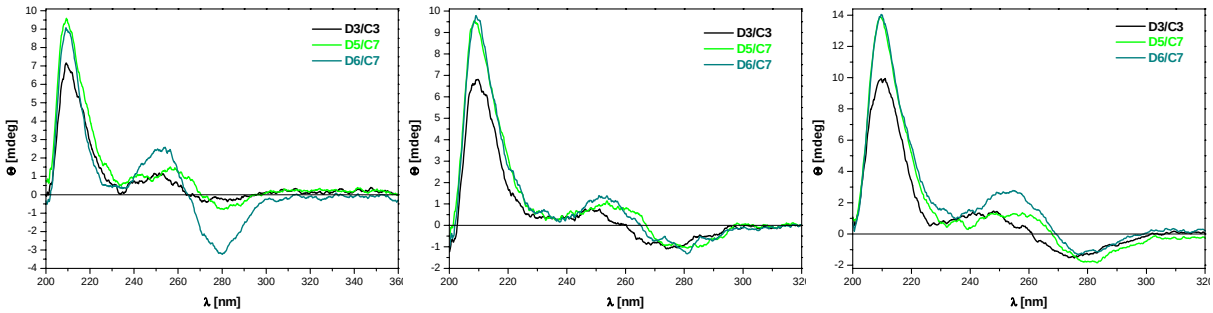


Abbildung 4-44: Differenz-CD-Spektren von 2.5 µM Duplex **D5/C7** in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl mit 12.5 µM **P1** (*links*)**, P2** (*Mitte*)**, P3** (*rechts*).

In dieser Gegenüberstellung erkennt man klar, dass sich **P1** im Bindungsmodus zwischen **D5/C7** und **D6/C7** unterscheidet. Auch dieses Peptid bindet in der Erkennungsregion des Oligonukleotids und wird durch die Anwesenheit des PydU-Chromophors beeinflusst. Dabei kann offenbar die **pNB**-Gruppe von **P1** in **D6/C7** besser interkalieren und führt somit auch zu einer stärkeren Fluoreszenzlöschung. Das PydU in der Erkennungsregion öffnet diese sozusagen für die Bindung zwischen **P1**und **D6/C7**. Die beiden anderen Peptide lassen in den Differenz-CD-Spektren nichts dergleichen erkennen.

4.3.5 Zusammenfassung der Untersuchungen des Ladungstransfers in spezifischen Peptid-DNA-Komplexen

Die Fluoreszenzlöschexperimente mit den sequenzspezifischen Peptiden belegen, dass die Peptide **P1** und **P2** tatsächlich struktursensitiv auf die Duplexe **D5/C7** und **D6/C7** reagieren. Dabei nimmt die Gestaltung der Erkennungsregion Einfluss auf die Art der Wechselwirkung mit den Peptiden. Die **pNB-**Gruppe des kürzeren und weniger geladenen **P1** kann in **D6/C7** stärker interkalieren und verstärkt somit den Effekt der Fluoreszenzlöschung. **P2** wird durch die Anwesenheit des PydU-Nukleotids in der Erkennungsregion desselben Duplexes behindert und führt zu einer geringeren Fluoreszenzlöschung.

Sequenzspezifische Peptide, die mit **pNB-**modifiziert wurden, zeigen eine geringere Fluoreszenzlöschung als unspezifische Peptide. Ein Grund dafür liegt in der geringeren Anzahl an vorhandenen Wechselwirkungen, die die Löschung der Fluoreszenz bewirken. Ein weiterer Grund könnte die stärkere Beteiligung diffusiver Prozesse am Ladungstransfergeschehen bei schwächer gebundenen unspezifischen Peptiden im Bereich des PydU-Nukleotids sein.

4.4 Strangbruchexperimente

Der Einsatz eines photochemisch anregbaren Elektronendonors in Kombination mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) als Elektronenakzeptor in einem DNA-Duplex bewirkt eine chemische Reaktion als unmittelbare Folge des reduktiven Ladungstransfers.[330-333] Die Produkte dieser Folgereaktion führen nach der Behandlung mit heißem Piperidin zu einem Strangbruch. Die entstehenden Fragmente lassen sich mittels HPLC analysieren und quantifizieren. Somit dienen Strangbruchexperimente dem chemischen Nachweis des reduktiven Ladungstransfers in DNA. Diese Methode zum Nachweis reduktiver Folgereaktionen in DNA wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und wird mittlerweile auch von anderen Forschungsgruppen angewendet.[15]

4.4.1 Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen

Der Ladungstransfer in PydU modifizierten DNA-Sequenzen unter dem Einfluss von **pNB**-modifizierten Peptiden soll mit Hilfe des Strangbruchassays untersucht werden. Dabei kommen zwei Sequenzen zum Einsatz: Sequenz **D1/C1** enthält nur den Elektronendonor (PydU) und dient als Kontrolle für eventuell durch die Piperidinbehandlung induzierten Strangbruch nach der Bestrahlung, wenn kein BrdU vorhanden ist.

D1	3'-TCA-GTC-AC**X**-TAC-TGA-CT-5'	**X** = PydU
C1	5'-AGT-CAG-TGA-ATG-ACT-GA-3'	
B	3'- TCA-GTC-AA**X**-**B**AC-TGA-CT-5'	**B** = BrdU
C8	5'-AGT-CAG-TTA-ATG-ACT-GA-3'	

Vorversuche mit unterschiedlichen Abständen zwischen PydU und BrdU haben gezeigt, dass die Effizienz des Ladungstransportes in **B/C8** ausreicht, um Strangbruchexperimente mit Peptiden durchzuführen.

4.4.2 Methode: Piperidinspaltung und Bestrahlungsexperiment

Um einen Strangbruch durch photochemisch induzierten Elektronentransfer zu erzeugen, wird ein DNA-Strang mit einem photochemisch anregbaren Elektronendonor (z. B. PydU, PtzdU) modifiziert. BrdU wird in denselben Strang als kinetischer Elektronenakzeptor eingebaut.[332, 334, 335] Dieses spaltet bei Aufnahme eines Elektrons Bromid ab und hinterlässt ein Uridinradikal, das verschiedene Folgereaktionen mit dem Solvent oder der DNA-Umgebung eingeht.

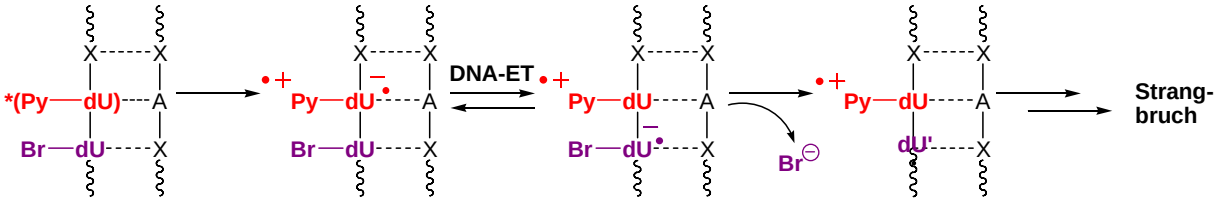


Abbildung 4-45: Photoangeregter Elektronentransfer von PydU auf BrdU führt zur Bromid-Abspaltung.

So kann dieses Radikal von der Base in 5'-Richtung (dA in **B/C8**) ein C1'-H oder ein C2'-H des Desoxyriboserestes abstrahieren, was zur Depurinierung dieser Nachbarbase führt.[336-338] Dabei entstehen DNA-Läsionen, die bei einer Behandlung mit Base bei erhöhter Temperatur zu Strangbrüchen an der Stelle des beschädigten Nukleotids führen. Typischerweise wird für die Strangbruchreaktionen Piperidin bei 90°C verwendet. Die erhaltenen Fragmente lassen sich mittels gängiger Methoden (z. B. HPLC, Gelelektrophorese) analysieren und gegebenenfalls quantifizieren.

Beim Bestrahlungsexperiment erlaubt die Piperidinbehandlung den Nachweis sämtlicher Folgereaktionen in der DNA, auch ohne genaue Kenntnis der entstehenden Produkte. Um Fehlinterpretationen durch nicht BrdU bedingte Spaltungen zu vermeiden, werden die erhaltenen Daten im Vergleich zu entsprechenden Kontrollproben bewertet. Als Kontrolle dient dazu der Duplex, der nur den Elektronendonor trägt, also kein BrdU enthält. Für zuverlässige Zerfallswerte eines Donor-Akzeptor-Systems wird über mehrere Messreihen (in der Regel drei) gemittelt.

In der Praxis wird eine Duplexlösung bekannter Konzentration mit Licht definierter Wellenlänge im Bereich der Absorption des Chromophors bestrahlt. Ein *cut-off*-Filter sorgt für den Ausschluss niedriger Wellenlängen (< 305 nm). Photochemische Prozesse durch energiereiches UV-Licht, wie die direkte Anregung des BrdU, werden so weitgehend ausgeschlos-

sen.[339] Anschließend wird alle fünf Minuten eine Probe entnommen und im Dunklen aufbewahrt, um weitere durch Licht induzierte Reaktionen zu vermeiden. Nach einer Stunde werden alle Proben mit heißem Piperidin behandelt, lyophilisiert und mittels HPLC quantifiziert. Das Verhältnis der Flächen der Peaks im HPLC von dem modifizierten Strang zu dem entsprechenden Gegenstrang stellt ein Maß für den durch Ladungstransfer verursachten Strangbruch dar. Eine Auftragung dieser Werte gegen die Bestrahlungsdauer der entsprechenden Probe ermöglicht einen Vergleich der Ladungstransfergeschwindigkeiten, die zu Strangbruchereignissen führen.
Diese Strangbruchraten werden mit denen verglichen, die unter Zugabe von verschiedenen Peptiden als Ladungsfänger ermittelt wurden. Dafür werden zu Beginn der Bestrahlung zehn Äquivalente des entsprechenden Peptids zugegeben. So erhält man Aussagen über den Einfluss kurzer, nicht kovalent bindender Peptide auf die Ladungstransfereigenschaften[199] und die Folgechemie in diesem Donor-Akzeptor-System.

4.4.3 PydU-Systeme mit und ohne BrdU

Um den Einfluss von Peptiden auf den reduktiv induzierten Strangbruch zu untersuchen, muss zuerst die Kinetik des Zerfalls des Duplexes ohne Peptidzugabe bestimmt werden.

Der Kontroll-Duplex **D1/C1** (kein BrdU) zeigt gemäß den Erwartungen keinen Strangbruch und ist auch nach einer Stunde Bestrahlung noch intakt. Duplex **B/C8** weist Strangbruch auf, was ebenfalls den Erwartungen entspricht. Durch die photochemische Anregung des PydU in **B/C8** kommt es zu einem Elektronentransfer zum BrdU, das entsprechend Bromid abspaltet und weiterreagiert.

Mittels ESI-MS lässt sich die chemische Folgereaktion des Elektronentransfers direkt verfolgen. In einem typischen HPLC-ESI-MS-Spektrum erkennt man eindeutig die Massen von Strang (**B**) und Gegenstrang (**C8**), sowie das Produkt der Bromidabspaltung aus Sequenz **B**. Diese Abspaltung des Bromidions kann in Übereinstimmung mit Experimenten von *Carell et al.* als unmittelbare Folge eines reduktiven Elektronentransfers vom Uridinradikalanion des photoangeregten PydU auf das BrdU angesehen werden.[201]

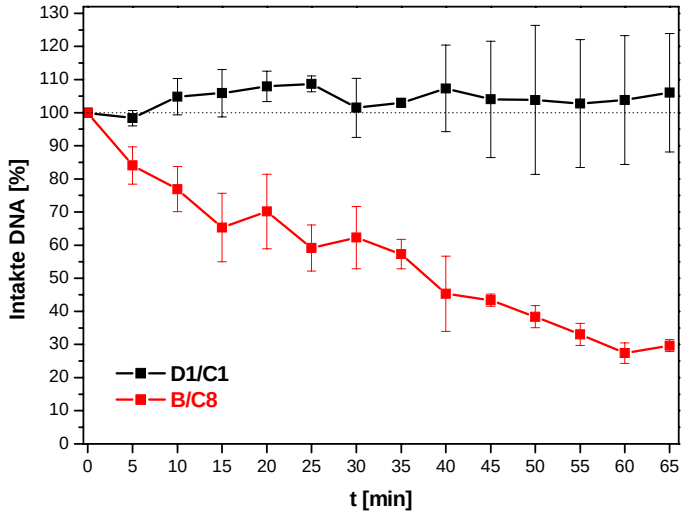


Abbildung 4-46: Zerfallskurve von 4 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei 1 h Bestrahlung ohne Zugabe von Peptid.

4.4.3.1 Einfluss von Oligolysinen

In einer ersten Versuchsreihe werden der Beitrag der elektrostatischen Wechselwirkung zum Ladungstransfer zwischen DNA und Peptid und der Einfluss von **pNB** als externem Elektronenakzeptor auf die beiden Duplexe untersucht. Dafür werden den Lösungen von **D1/C1** und **B/C8** jeweils Trilysin und mit **pNB** modifiziertes Di- und Trilysin zugegeben und bestrahlt.

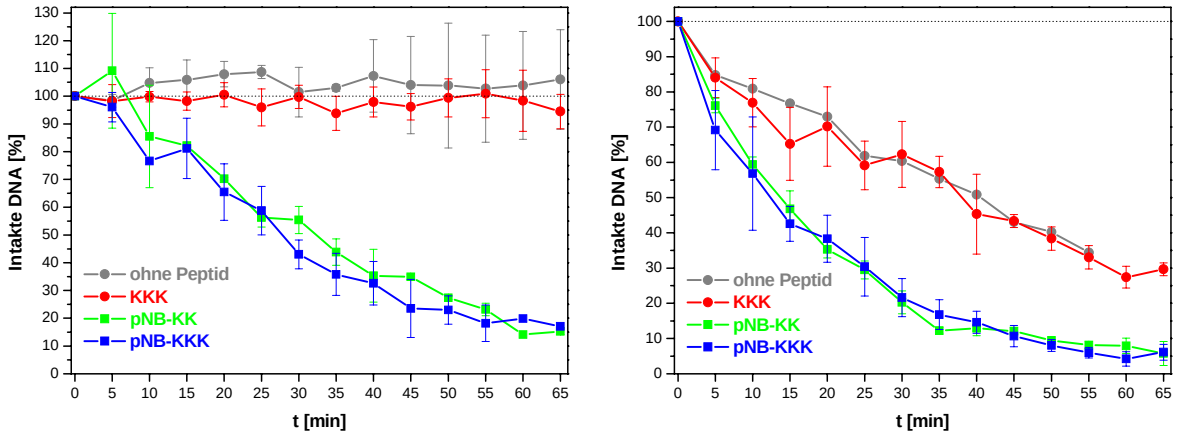


Abbildung 4-47: Zerfallskurven von 4 µM Duplex **D1/C1** (*links*) bzw. **B/C8** (*rechts*) in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei Zugabe von 40 µM Peptid.

Die Duplexe **D1/C1** und **B/C8** ergeben ähnliche Resultate: **KKK** nimmt keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Strangbruchs. Ein Effekt durch die lokale Versteifung der Duplexstruktur wie in der Fluoreszenztitration, ist nicht zu beobachten. **pNB-KK** und **pNB-KKK** erhöhen die Ausbeute der Strangbruchereignisse deutlich. Der intermolekulare Elektro-

nentransfer auf die **pNB**-Gruppe des Peptids im DNA-Peptid-Komplex tritt nicht in Konkurrenz zu dem intramolekularen Elektronentransferprozess, der zur Bromidabspaltung in **B/C8** führt. Wäre das der Fall, müsste die Strangbruchrate sinken (vgl. Abbildung 4-47). Stattdessen bewirkt der **pNB**-Rest eine neue Folgereaktion, die nach der Piperidinbehandlung zu einem Strangbruch führt. Diese Reaktion ist auch verantwortlich für den Strangbruch in **D1/C1**. Die enorme Steigerung der Reaktionsrate legt nahe, dass eine weitere Reaktion an der Bildung basenlabiler DNA-Schäden beteiligt ist. Wie *Schuster et al*. vermuten[340], sind stark wechselwirkende Polyamine in der Lage, an der Bindungsstelle die DNA von ihrem Solventkäfig abzuschirmen. Befindet sich an der DNA eine reaktive Spezies, so kann diese nur noch innerhalb des Oligonukleotids reagieren. Das gilt auch in diesem Fall sowohl für das Pyrenylradikalkation als auch das Anion des Uridins. Werden zu **B/C8** Lysin-haltige Akzeptor-modifizierte Peptide gegeben, so führen diese zu einer effizienten Abschirmung des Pyrenylradikalkations von seiner Lösungsmittelumgebung, so dass dieses nurmehr intramolekular Folgereaktionen eingehen kann. Somit lässt sich bei den Oligolysinpeptiden mit Elektronenakzeptor vermehrt Strangbruch detektieren.

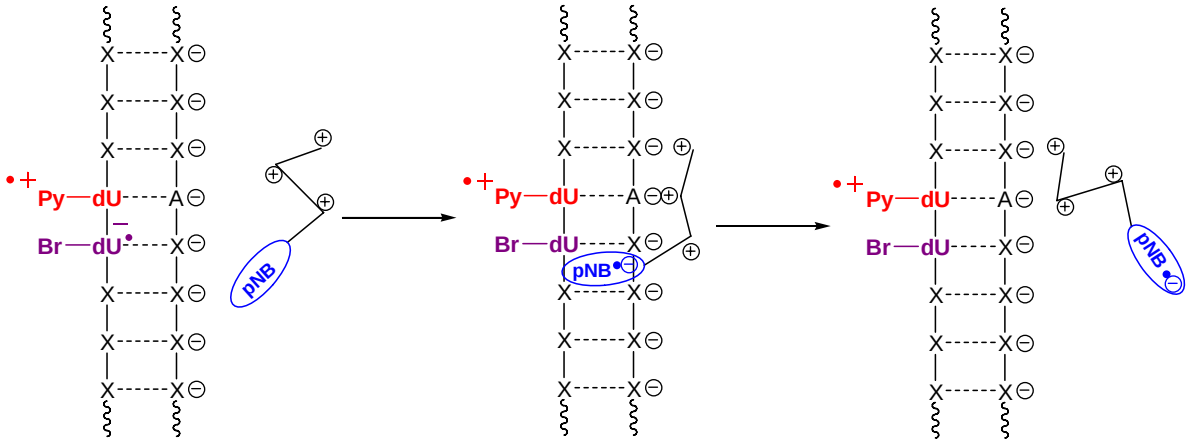


Abbildung 4-48: Modell der Wechselwirkung eines Lysin-haltigen **pNB**-Peptids mit **B/C8**. Das **pNB**-haltige Peptid tritt mit dem photoangeregten PydU-Nukleotid in der DNA in Wechselwirkung und nimmt die negative Ladung des Uridinrestes auf. Dadurch wird das **pNB** selbst zum negativ geladenen Radikalanion, das durch die positiv geladenen Lysinseitenketten stabilisiert wird. Diese Ladungsumverteilung führt zu einer Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Peptid und der DNA, und das reduzierte Peptid diffundiert vom Duplex ab. Diese Reaktion sollte die Strangbrucheffizienz vermindern. (Die geladenene Phosphatgruppen und Lysinseitenketten sind schematisch dargestellt.)

Die Anzahl der möglichen elektrostatischen Wechselwirkungen der positiv geladenen Lysinseitenketten mit dem anionischen DNA-Rückgrat spielen keine Rolle für den Elektronentransfer zwischen DNA und Peptid. Dieses Ergebnis widerspricht den Daten aus den Fluoreszenz-

titrationen, wo mit zunehmender Anzahl an Lysinen die Effizienz der Fluoreszenzlöschung zunimmt.

4.4.3.2 Einfluss aromatischer Aminosäureseitenketten

Sollte ein Teil der Strangbrüche beim Einsatz von **pNB**-modifizierten Lysinen auf Schäden durch das Pyrenylradikalkation zurück zu führen sein, so müsste der Einsatz von Tryptophan oder auch Tyrosin-haltigen Peptiden, die **pNB** tragen, die Folgechemie des Radikalkations unterbinden, da beide Aminosäureseitenketten aufgrund ihres Redoxpotentials ($E^0(W^{\bullet+}/W) \approx$ 1.0 V, $E^0(Y^{\bullet+}/Y) \approx$ 0.9 V) in der Lage sein sollten, das Radikalkation des Pyrens ($E^0(Py^{\bullet+}/Py)$ $\approx$ 1.28 V) zu reduzieren.

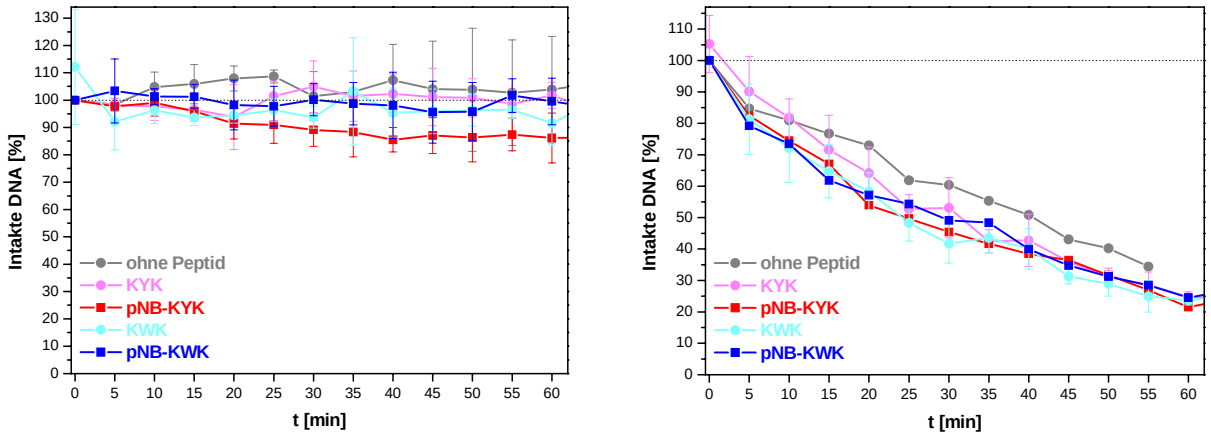


Abbildung 4-49: Zerfallskurven von 4 µM Duplex **D1/C1** (*links*) bzw. **B/C8** (*rechts*) in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei Zugabe von 40 µM Peptid.

Tatsächlich sind die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in der Lage, die durch **pNB** zusätzlich ausgelösten Strangbruchreaktionen zu unterbinden. Das Oxidationspotential dieser beiden Aminosäureseitenketten reicht hier aus, die radikalische Ladung am Pyren abzufangen. Die Ladung am Uridinrest bleibt davon unbeeinflusst, die Bromidabspaltung in **B/C8** findet weiterhin statt.

Das bedeutet für das Modell der Wechselwirkung, wie es sich aus der Untersuchung der Lysin-Peptide ergibt, dass nun **pNB** nicht mehr so schnell in der Lage ist, das Elektron des Uridinrestes aus dem photoangeregten PydU abzufangen. In diesem Fall würde die Strangbruchgeschwindigkeit geringer werden als bei der Messung des DNA-Stranges ohne Peptidzugabe.

Aus den vorangegangenen Experimenten zur Fluoreszenzlöschung geht aber eindeutig hervor, dass ein Elektronentransfer von PydU auf den **pNB**-Rest weiterhin stattfindet.

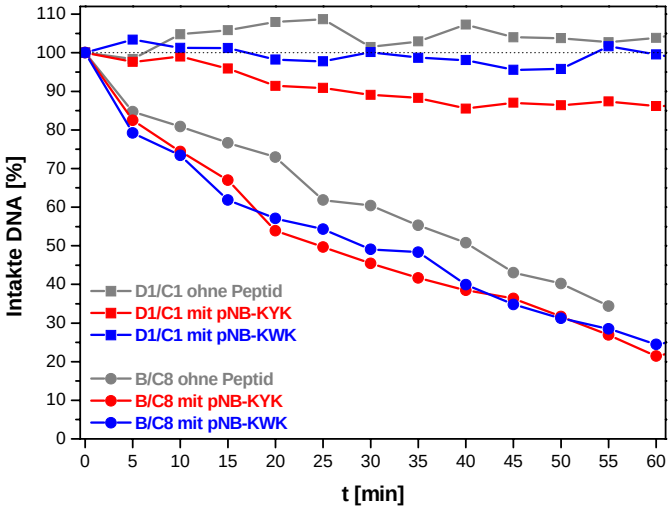


Abbildung 4-50: Zerfallskurven von 4 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei Zugabe von 40 µM Peptid.

Der nahezu identische Verlauf der Kurven von **D1/C1** und **B/C8** ohne die Zugabe von Peptid, bei der Zugabe von **pNB-KWK** und **pNB-KYK** spricht für eine bevorzugt stattfindende Interaktion der aromatischen Aminosäuren (W, Y) mit PydU.

Bleibt man bei dem oben genannten Modell, so führen die Indol- und Phenolgruppen der Aminosäuren die positive radikalische Ladung des Pyrenylradikalkations ab.

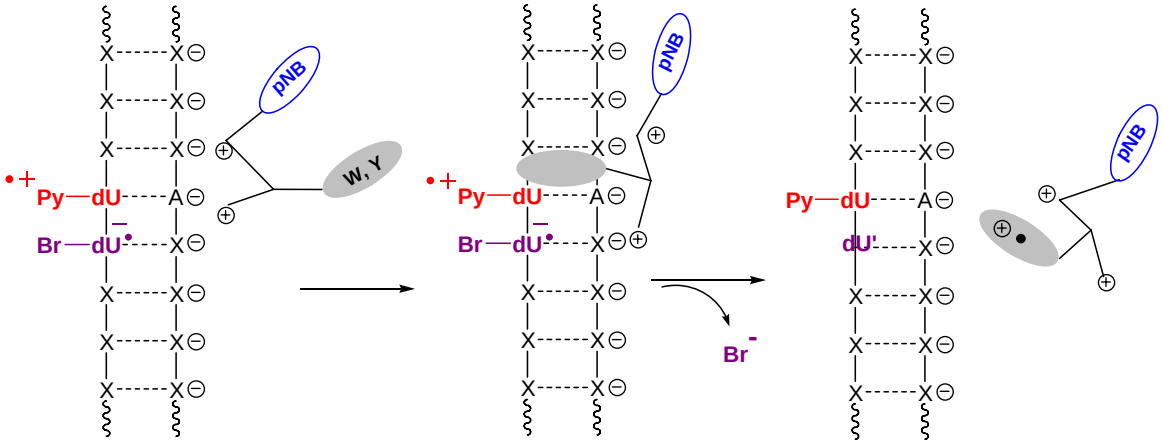


Abbildung 4-51: Modellvorstellung zum Ausbleiben zusätzlicher Strangbruchreaktionen mit **pNB-KWK** und **pNB-KYK**.

Möglicherweise kann in **pNB-KWK** und **pNB-KYK** aus sterischen Gründen die **pNB**-Gruppe nicht mehr so gut in den Basenstapel interkalieren, da auch Tryptophan und Tyrosin in Konkurrenz zum Elektronenakzeptor interkalieren. Somit vollzieht sich auch der intermo-

lekularer Elektronentransfer schlechter. Die mechanistische Vorstellung zu den Verhältnissen in **B/C8** bei der Zugabe von **pNB-KWK** und **pNB-KYK** sind in Abbildung 4-51 zusammengefasst.

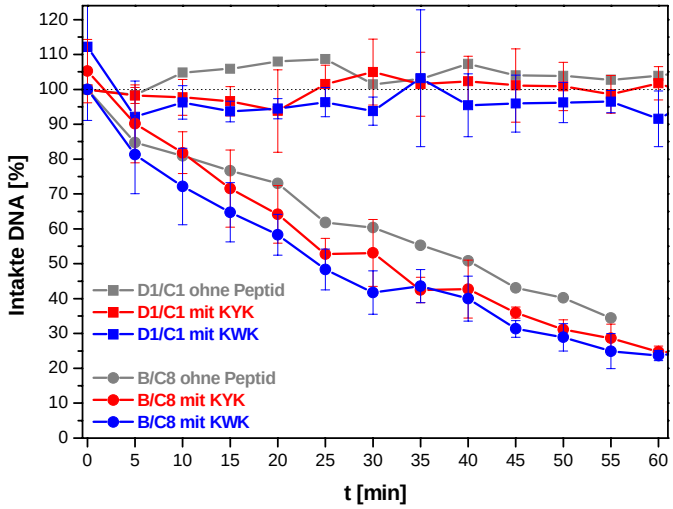


Abbildung 4-52: Zerfallskurven von 4 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei Zugabe von 40 µM Peptid.

Trifft diese Vorstellung von der Interaktion zwischen DNA und Peptid zu, so ist für die Bestrahlungsreihen von **B/C8** und **D1/C1** mit den unmodifizierten aromatischen Peptiden **KWK** und **KYK** derselbe Kurvenverlauf wie für eine Bestrahlung ohne Peptid zu erwarten. Es verhält sich tatsächlich so, eine Folgereaktion des Pyrenylradikalkations unterbleibt durch den Lochtransfer auf die aromatische Aminosäureseitenkette.

4.4.3.3 Crosslinking

Von den Aminosäuren Cystein und Threonin ist bekannt, dass sie aufgrund ihrer Nukleophilie sehr einfach *crosslinks* mit Radikalen in DNA ausbilden. Eine Möglichkeit, einen *crosslink* mit DNA zu induzieren, ist die Verwendung von BrdU als reaktive Position für einen derartigen nukleophilen Angriff eines Peptids auf die DNA.[339]

Die Bestrahlungen mit **KCK**, **KTK**, **pNB-KCK**, und **pNB-KTK** und den Duplexen **D1/C1** sowie **B/C8** ergeben das folgende Bild. **D1/C1** zeigt keinen nennenswerten Strangbruch nach einer Stunde Bestrahlung, unabhängig davon, ob die Peptide eine **pNB**-Gruppe tragen oder nicht. In einem PydU enthaltenden Duplex entsteht also während einer Bestrahlung keine von

Nukleophilen angreifbare Spezies, die nach einer Piperidinbehandlung zu einem Strangbruch führen. Ein *crosslinking* der Cystein- und Threoninseitenketten in den Peptiden mit dem Pyrenylradikalkation allerdings ist nicht ausgeschlossen, da die Folgeprodukte dieser chemischen Reaktion nicht zu einer Piperidin induzieren Spaltung führen. In den analytischen HPLC-Spektren fanden sich keine Anhaltspunkte für Peptid-Oligonukleotid-Konjugate.

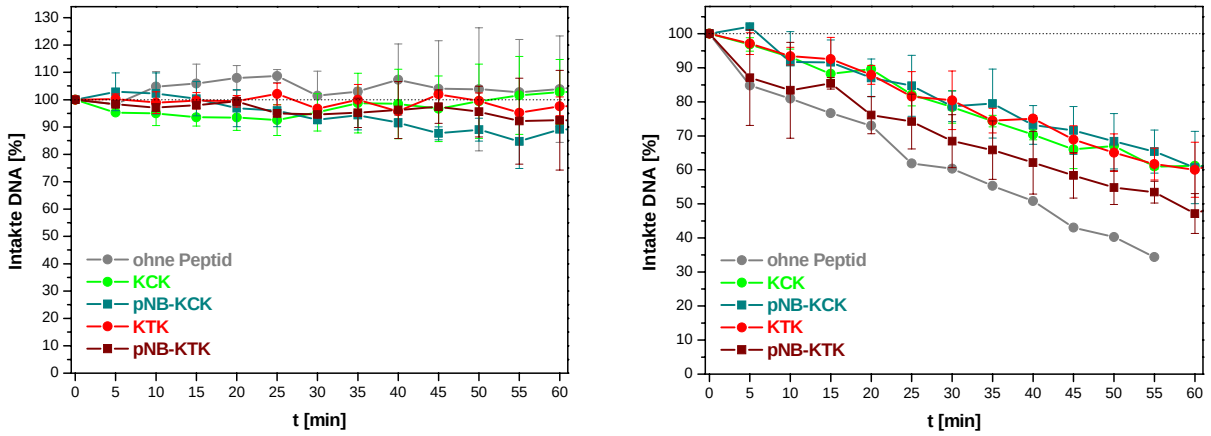


Abbildung 4-53: Zerfallskurven von 4 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei Zugabe von 40 µM Peptid.

Sobald die Peptide mit **pNB** modifiziert sind, sollte ein Strangbruch wie mit den modifizierten Lysinen zu erwarten sein, sofern der Elektronenakzeptor mit dem Uridinrest des PydU wechselwirken kann. An **D1/C1** zeigt sich, dass das nicht passiert, ein Strangbruch bleibt aus.
Der Duplex **B/C8** zeigt für alle vier Peptide eine deutlich flachere Strangbruchkurve als ohne Peptidzugabe. Lediglich **pNB-KTK** zeigt einen etwas steileren Verlauf als die anderen Peptide, erreicht aber bei Weitem nicht die Strangbruchrate des Duplexes ohne Peptidzugabe. Das legt den Schluss nahe, dass ein konkurrierender Prozess zum intramolekularen Elektronentransfer stattfindet.

Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Nitrogruppe des **pNB**-Restes und der Thiol bzw. Alkoholfunktion des Cysteins bzw. Threonins, kann in diesen Experimenten nicht als Ursache gelten. Andernfalls dürften **KCK** und **KTK** die Strangbruchrate nicht beeinflussen. Um die Ergebnisse der Fluoreszenzlöschexperimente mit denen der Strangbruchexperimente in Einklang zu bringen, muss man in beiden Fällen davon ausgehen, dass die SH- bzw. OH-Funktion der beteiligten Peptide durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke oder durch Protonierung einer reaktiven Spezies die Fluoreszenz verstärken und gleichzeitig die Strangbruchrate senken. Vermutlich handelt es sich bei dem entsprechenden Prozess um die Protonierung des Uridinradikals, dass bei der Bromid-Abspaltung des BrdU

gebildet wird. Wäre auch das dU-Radikalanion des PydU beteiligt, müssten diese Peptide eine Fluoreszenzlöschung zeigen, was aber nicht der Fall ist.

4.4.4 Strangbruchexperimente mit PtzdU als Elektronendonor

Um die Ergebnisse der PydU-Experimente besser einordnen und bewerten zu können, werden die Bestrahlungsexperimente mit PtzdU als Elektronendonor in der DNA wiederholt. Im Gegensatz zu $Py^{+\bullet}$ ist $Ptz^{+\bullet}$ nicht in der Lage, dG zu oxidieren ($E^0(Ptz^{\bullet+}/Ptz^*) \approx -2.0$ V). Somit dienen die Experimetne mit PtzdU als Elektronendonor als wichtige Kontrollexperimente, die Aufschluss über die Beteiligung von oxidativen Folgereaktionen an der Strangbruchreaktion in den vorherigen Untersuchungen mit PydU-Duplexen geben.

Z1/C9 dient als Kontrolle für den nicht durch BrdU induzierten Strangbruch. **Z2/C10** und **Z3/C11** unterscheiden sich von **B/C8** dadurch, dass PtzdU und BrdU durch ein Basenpaar getrennt sind, im Fall von **Z2/C10** durch TA, bei **Z3/C11** durch CG.

Z1	3'-TCA-GTC-AT**Z**-TAC-TGA-CT-5'	**Z** = PtzdU
C9	5'-AGT-CAG-TAA-ATG-ACT-GA-3'	
Z2	3'-TCA-GTC-AT**B**-T**Z**A-CTG-ACT-5'	**B**= BrdU
C10	5'-AGT-CAG-TAA-AAT-GAC-TGA-3'	
Z3	3'-TCA-GTC-AT**B**-C**Z**A-CTG-ACT-5'	
C11	5'-AGT-CAG-TAA-GAT-GAC-TGA-3'	

Bereits durchgeführte Bestrahlungen[15] ohne Peptide haben ergeben, dass **Z2/C10** sehr viel schneller Strangbruchreaktionen eingeht als **Z3/C11**. Der Grund dafür liegt in dem schnelleren Elektronentransfer über das TA-Paar im Gegensatz zu CG. **Z1/C9** zeigt keine Strangbruchreaktion bei Bestrahlung.

Die Ergebnisse der Bestrahlungsreihen mit Peptiden lassen sich kurz zusammenfassen. Keines der zugegebenen Peptide übt einen Einfluss auf die Strangbruchraten im PtzdU/BrdU-System aus. Offensichtlich ist weder die **pNB**-Gruppe hier in der Lage, die Ladung des Uri-

dinradikalanions des PtzdU abzufangen, noch können Tyrosin oder Tryptophan mit der positiven Ladung am Ptz-Rest wechselwirken.

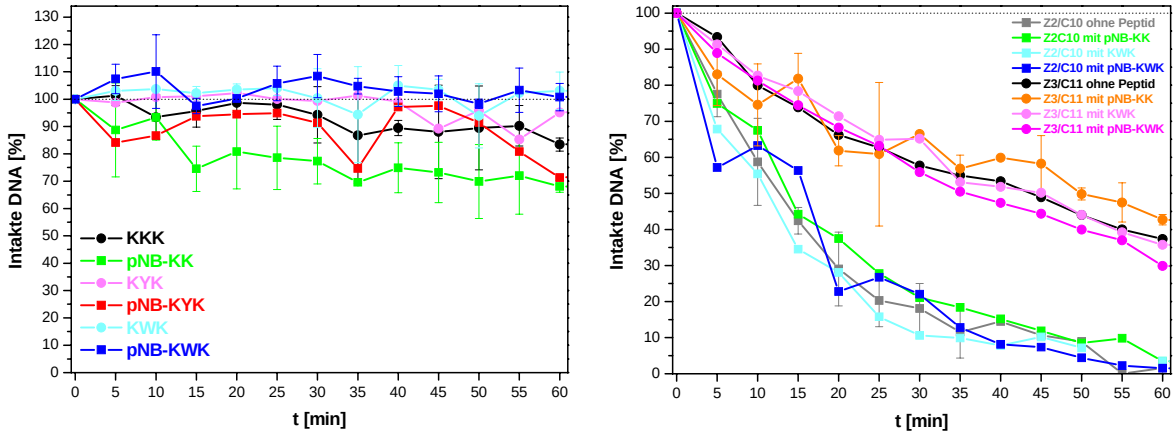


Abbildung 4-54: Zerfallskurven von 4 µM Duplex **Z1/C9** (*links*) bzw. **Z2/C10** und **Z3/C11** (*rechts*) in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei Zugabe von 40 µM Peptid.

4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente

Die Bestrahlungsexperimente von Elektronendonor-modifizierten Oligonukleotiden, die BrdU als chemische Sonde für den reduktiven Elektronentransport tragen, mit **pNB**-markierten Peptiden liefern interessante Ergebnisse über den Ladungstransport zwischen DNA und Peptiden.

Durch photochemisch induzierten Ladungstransfer lässt sich die Reduktion von BrdU erreichen, die in der Folge basenlabile Schäden in den Oligonukleotiden hervorruft. Durch die Behandlung mit heißem Piperidin können diese als Strangbrüche nachgewiesen und mittels HPLC analysiert werden. Andere, aber auf gleiche Weise detektierbare DNA-Läsionen in den Peptid-DNA-Systemen können durch Folgereaktionen des Pyrenylradikalkations und des Uridin- bzw. **pNB**-Radikalanions ausgelöst werden. Eine Reaktion, die zum Strangbruch führt, findet statt, wenn

- der **pNB**-Rest in den Basenstapel interkaliert und das Elektron eines beteiligten Uridinrestes aufnimmt. Dadurch gelangt das entstehende **pNB**-Radikalanion in unmittelbare Nähe der Desoxyriboseeinheit eines Nukleotids, mit dem es reagiert

- das bei der photochemischen Anregung entstehende Pyrenylradikalkation durch die Anlagerung von Oligolysinresten, die über eine interkalierende **pNB**-Gruppe sehr fest an die DNA gebunden sind, von einer Reaktion mit der Solvathülle abgeschirmt wird und somit einen Oxidationsprozess in der DNA induziert.

Beides ist bei den Versuchen mit **pNB**-Oligolysinen der Fall.

Es findet kein Strangbruch statt, wenn

- der **pNB**-Rest an der Interkalation in den Basenstapel gehindert wird. Das ist bei aromatischen Aminosäureresten der Fall.
- die Ladung des Pyrenylradikalkations durch redoxaktive aromatische Aminosäurereste (W, Y) abgefangen werden kann.
- die Ladung des Uridinradikals des BrdU mittels Protonierung durch eine alkoholische Aminosäureseitenkette (C, T) abgefangen wird.

Die Ladungstransferprozesse in der DNA und zwischen Peptiden und Oligonukleotiden hängen also nicht allein von den Redoxpotentialen der beteiligten Donoren und Akzeptoren ab. PtzdU und PydU verhalten sich grundsätzlich verschieden in dem gewählten System. Der Ladungstransfer im PtzdU-System lässt sich nicht durch die Zugabe von Peptiden beeinflussen. Das liegt zum einen an der veränderten elektronischen Struktur und Reaktivität des photoangeregten Zustands und zum anderen an einer unterschiedlichen Struktur der Elektronendonoren im modifizierten DNA-Duplex.

4.5 Kovalente Peptid-DNA-Konjugate (POCs)

Der Ladungstransfer zwischen Oligonukleotiden und kurzen Peptiden lässt sich durch nicht kovalente Peptid-DNA-Wechselwirkungen beeinflussen, wie Fluoreszenzlöschexperimente mit verschiedenen auch sequenzspezifischen Peptiden und *abasic site* Duplexen gezeigt haben. Nun gilt es, das Fluoreszenzverhalten eines strukturell klar definierten Donor-Akzeptor-Systems zu untersuchen. Eine kovalente Verknüpfung von DNA und Peptid verringert die unkontrollierbare Assoziation und Dissoziation des gebildeten Komplexes. In einem kovalenten Peptid-Oligonukleotid-Konjugat lässt sich zudem der Ort der Wechselwirkung durch die Art der Verknüpfung festlegen.

4.5.1 Synthetische Möglichkeiten zur kovalenten Verknüpfung von Peptiden mit Oligonukleotiden

Zur Darstellung kovalenter Peptid-Oligonukleotid-Konjugate (POCs)[341] gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: a) die schrittweise Aufbausynthese und b) die Fragmentkupplung. Im Idealfall lassen sich beide Strategien an der festen Phase durchführen. Obwohl die SPPS und die DNA-Festphasensynthese (vgl. Kapitel 2.2.1) hoch optimiert sind und im Produktionsmaßstab durchgeführt werden können, stellt die Synthese von Konjugaten beider Biopolymere ein Problem dar, da die Bedingungen der beiden Synthesemethoden nicht kompatibel sind.

Eine klassische Festphasesynthese nach der Aufbaustrategie besteht darin, auf einem CPG-Träger das Oligopeptid nach der *Fmoc*-Strategie zu kuppeln, terminal eine primäre OH-Funktion einzuführen (z. B. ω-Hydroxy-Carbonsäure an N^{α}) und daran eine Oligonukleotidsynthese nach der Phosphoramiditmethode anzuschliessen. Dann wird zuerst der Peptid-Anteil unter sauren Bedingungen entschützt, danach erfolgt die Entschützung des Oligonukleotidrestes und die Abspaltung vom CPG unter basischen Bedingungen.[342] Mögliche Probleme dieser Vorgehensweise bestehen hauptsächlich in der Entschützung der Seitenkettenschutzgruppen bei niedrigem pH, aber auch bei der Behandlung mit Base kann es im Peptid-Teil des Moleküls zur Spaltung von Amidbindungen kommen. Bei niedrigem pH-Wert kommt es zu

Depurinierungen im DNA-Anteil des Konjugates. Dieses Problem versucht man zu umgehen, indem möglichst mild abspaltbare Schutzgruppen bei den Aminosäuren eingesetzt werden. Eine Alternative bietet auch der Aufbau des Peptids nach der *Boc*-Strategie, bei der die Seitenketten basenlabil mit *Fmoc*-Gruppen versehen sind.

Der Einsatz bifunktionaler Linker stellt eine weitere Möglichkeit zur Festphasensynthese von POCs dar.[343, 344] Dabei handelt es sich um ein auf einem Träger immobilisiertes Molekül, dass an einem Ende eine *Fmoc*-geschützte Aminofunktion und am anderen einen *DMT*-geschützten Alkohol trägt. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass sich hier der Peptidrest nicht nur 3'-terminal an ein Oligonukleotid einführen lässt, sondern auch an einer internen Position im DNA-Strang.

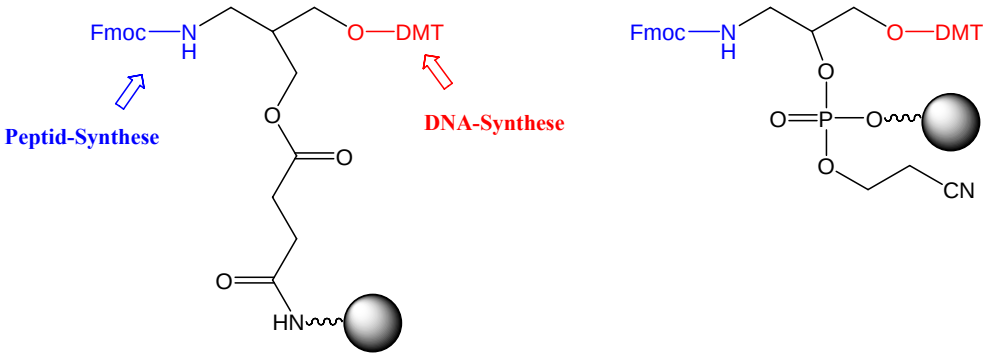


Abbildung 4-55: Beispiele für Festphasenträger mit Anknüpfungsmöglichkeiten für die SPPS und die DNA-Festphasensynthese; *links*: Peptid an 3'-Ende der DNA, *rechts*: Peptid an seitlicher Verzweigung des DNA-Stranges

Trotz der Entwicklung verschiedener modifizierter fester Phasen, die z. T. auch kommerziell erhältlich sind, bleibt die unterschiedliche Schutzgruppenstrategie in den Peptiden und den Oligonukleotid-Sequenzen ein grundsätzliches Problem. Aus diesem Grund gibt es alternativ ein sich ständig weiterentwickelndes Arsenal an Fragmentkupplungsmethoden, bei denen die Verknüpfung zwischen den beiden Molekülbestandteilen erst nach der erfolgten Synthese und Aufreinigung des jeweiligen Teiles erfolgt. Diese Art der kovalenten Anbindung ermöglicht eine große Varianz im Molekülaufbau: Das Oligopeptid kann in 3'-[345-347] oder 5'-Postion[148, 317-320] an das Oligonukleotid angebracht, aber auch intern an den Strang über ein modifiziertes Nukleotid angeknüpft werden.[348-350]

Die kovalente Verknüpfung kann über eine Vielzahl von Bindungstypen geschehen. Häufig werden dafür Schwefelbindungen[351] oder Amidbindungen[352] verwendet. Auch die Phosphatgruppe kann zur Anknüpfung dienen. Für die eigentliche Fragmentkupplung werden beide Moleküle vorher entsprechend chemisch modifiziert. Für die Knüpfung der Bindung ist es unwichtig, welche reaktive Gruppe an welchem Teil des Konjugats liegt. Reaktive Amino-

säureseitenketten wie Cysteine und Lysine können an jeder Position eines Oligopeptids eingebaut werden. Die Funktionalisierung der Oligonukleotide kann beispielsweise über die Aktivierung der 5'-terminalen OH-Funktion mit 1,1'-Carbonyldiimidazol geschehen.[353] So kann ein Amin mit Oligonukleotiden zur Reaktion gebracht werden. Dieses kann als Linker dienen, wenn es eine zweite reaktive Gruppe für eine weitere Anknüpfung enthält. Selbst eine sehr reaktive Aldehydfunktion kann am Oligonukleotid für eine Konjugation erzeugt werden. Der Schlüsselschritt ist dabei die Periodat-Spaltung eines geeigneten Vorläufermoleküls, das über konventionelle Festphasensynthese in die DNA eingebracht wird.[327]

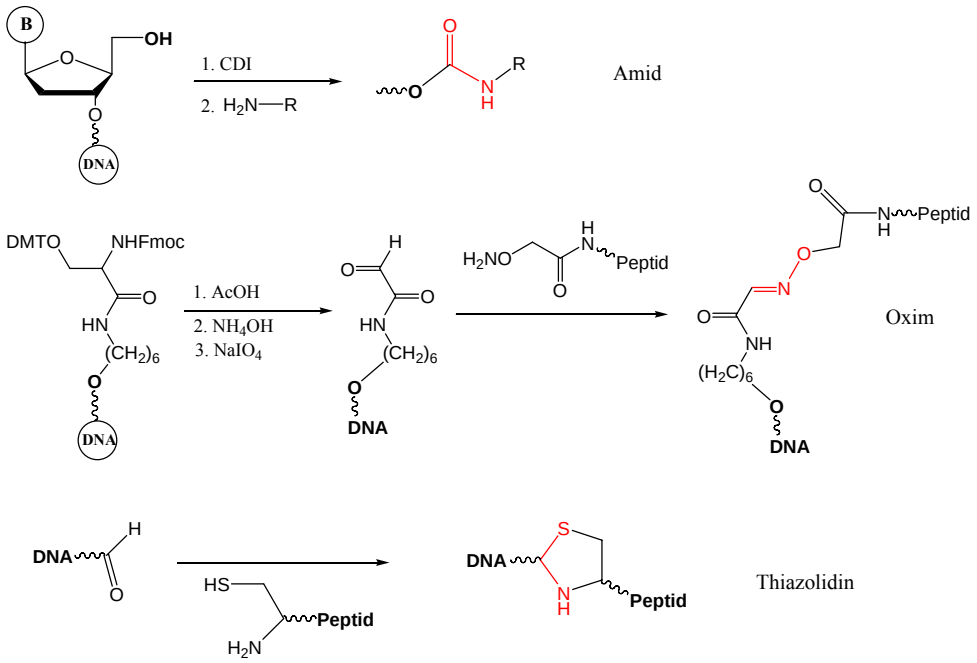


Abbildung 4-56: Schematische Darstellung einer Auswahl von Verknüpfungsarten zwischen Oligonukleotiden und Peptiden.

Da ein großes Interesse an POCs herrscht, existiert eine Reihe kommerziell erhältlicher Phosphoramidite für die terminale oder interne Anbindung über Thiol oder Amino-Gruppen, die sich in der konventionellen DNA-Festphasensynthese einsetzen lassen.[148, 317-320, 345-350]

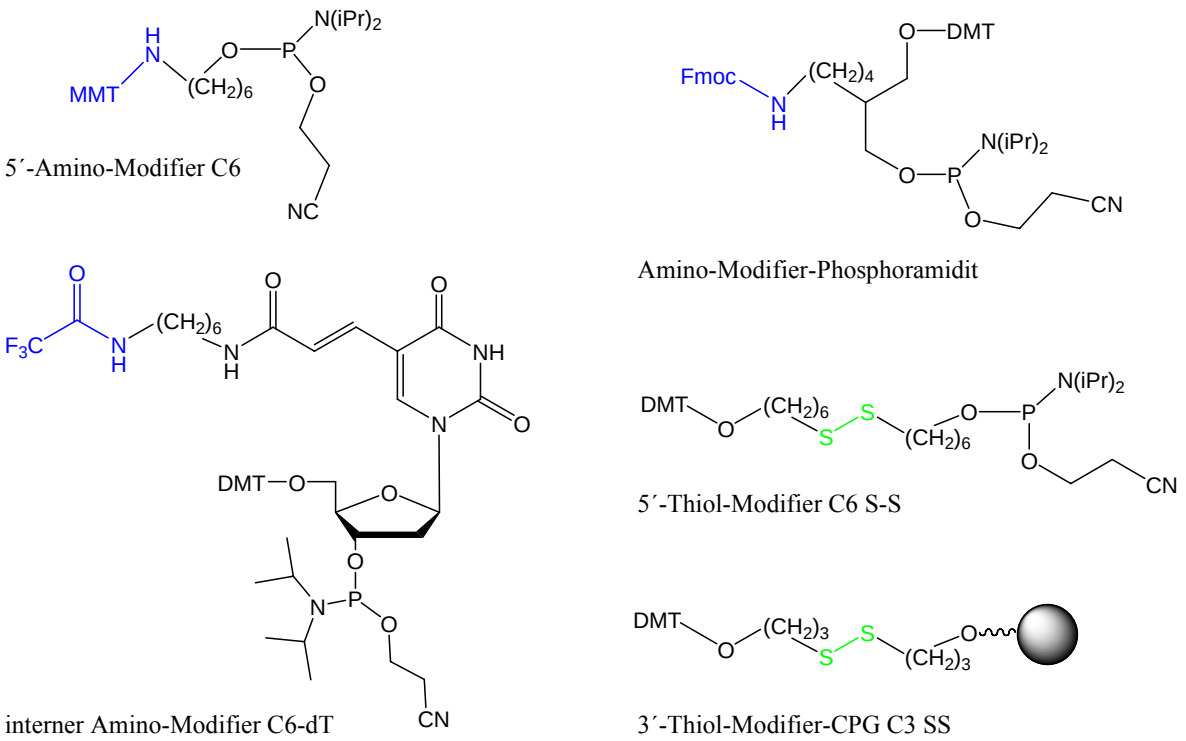


Abbildung 4-57: Verschiedene kommerziell erhältliche Verbindungen zur DNA-Modifikation. Die blauen Gruppen zeigen die Anknüpfungspunkte für den C-Terminus von Peptiden, die grünen Disulfidbrücken werden zur Verknüpfung gespalten.

Die Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten POCs bzw. der Testkonjugate erfolgte über die Einführung eines Aminolinkers an den 5'-Terminus der Oligonukleotidsequenz. Diese Synthesemethode hat sich bereits bei der Darstellung von Peptid-DNA-Konjugaten bewährt.[143, 229]

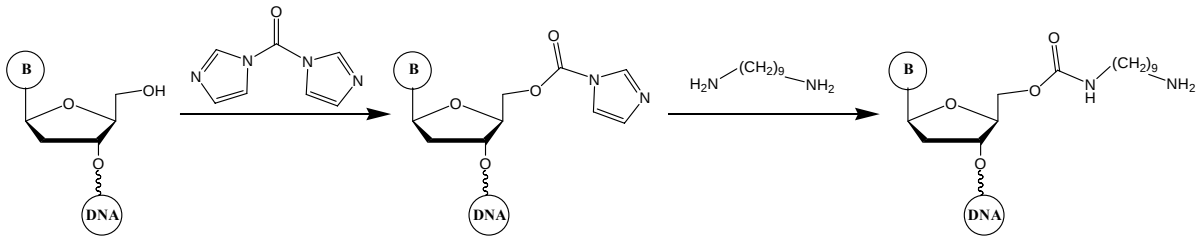


Abbildung 4-58: Schematische Darstellung der Einführung eines Aminolinkers an ein Oligonukleotid.

An die primäre Aminofunktion kann der C-Terminus eines beliebigen Seitenkettengeschützten Peptids oder eine Carbonsäure mit den Kupplungsmethoden der SPPS angebunden werden.

4.5.2 Bestimmung des Donor-Akzeptor-Abstands

Im Rahmen dieser Arbeit ist geplant, Oligonukleotide am 5'-Ende mit einem 1,9-Diaminononanlinker versehen, an den über eine Amidbindung **pNB** als Elektronenakzeptor geknüpft wird. Als Elektronendonor dient das modifizierte Nukleotid PydU. Die Modifikation der DNA erfolgt nach einem Festphasenprotokoll. Dafür werden die geschützten Oligonukleotide nach der Darstellung im Synthesizer auf dem CPG belassen.
Die mit einem Linker versehenen festphasengebundenen Oligonukleotidsequenzen sind unter Feuchtigkeitsausschluss über mehrere Wochen haltbar und können auf Vorrat hergestellt werden. Über ein modifiziertes Protokoll aus der SPPS können mit der Aktivestermethode daran sowohl eine **pNB**-Gruppe als auch Seitenketten- und N-terminal geschützte Peptide angebunden werden.

In Vorexperimenten wird der Elektronenakzeptor **pNB** aus zwei Gründen direkt an den Aminolinker gekuppelt:

- Der Unterschied in den Ladungstransfereigenschaften wird erst durch den Vergleich von Fluoreszenzeigenschaften möglich. Dafür müssen die Eigenschaften von Elektronendonor- und Peptid-substituierten Doppelsträngen mit denen von nur PydU-tragenden Duplexen verglichen werden. Da nicht sichergestellt ist, dass der Elektronentransfer von der DNA auf die **pNB**-Gruppe ausschliesslich über die Wechselwirkung der Peptid-Seitenketten mit den Nukleotiden vermittelt wird, sondern auch direkte Interaktionen des Elektronenakzeptors mit den Basenpaaren möglich sind, muss das PydU-**pNB**-Konjugat ohne Oligopeptid als Referenz im Fluoreszenzvergleich herangezogen werden.
- Ein möglichst einfaches System erleichtert die Optimierung der Synthesebedingungen, ohne dass größerer Mengen an Peptid kostenintensiv dargestellt und eingesetzt werden müssen.

4.5.2.1 Vorversuche

In einem ersten Vorversuch werden die Sequenzen **C3** und **C5** mit **pNB** modifiziert und untersucht.

D3	5'-CAG-TCA-TA**X**-ACA-CTG-AT-3'	**X** = PydU
M1	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-TA-AN-**pNB**	AN = Aminononanlinker
E	5'-CAG-CAT-GTT-**E**AT-GCT-G-3'	**E** = Ethidium
M2	3'-GTC-GTA-CAA-CTA-CGA-C-AN-**pNB**	

Die Wahl fiel auf diese beiden Sequenzen, da die Fluoreszenzeigenschaften der Duplexe **D3/C3** und **E/C5** bereits sehr intensiv untersucht wurden (s. Kapitel 3 und 4). Eine Modifikation des DNA-Stranges alleine mit **pNB** am Aminolinker soll zeigen, ob in diesem System ein reduktiver Ladungstransfer auf den **pNB**-Rest stattfindet.

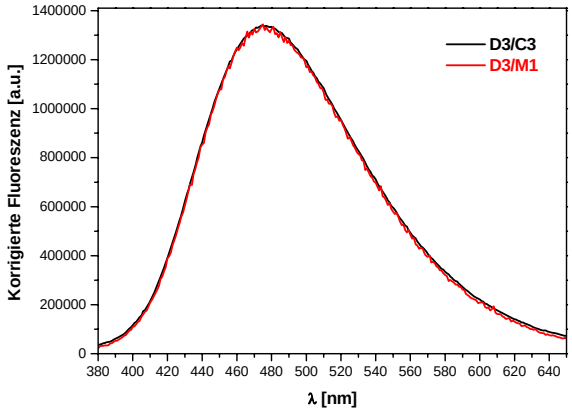


Abbildung 4-60: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

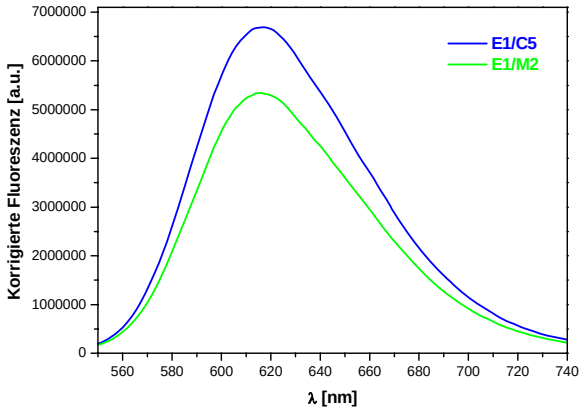


Abbildung 4-59: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz (λ_{exc} = 530 nm) von 1.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Wie die Daten zeigen, beobachtet man mit dem PydU-Duplex keine Fluoreszenzlöschung. Da die **pNB**-Gruppe allerdings in den nicht kovalenten Experimenten eine Löschung der Emission bewirkt, muss der ausbleibende Ladungstransfer in **D3/M1** mit großer Wahrscheinlichkeit auf einem zu großen Abstand zwischen PydU und **pNB** zurückgeführt werden.

Der Ansatz mit **E/M2** wird nicht weiter verfolgt und soll hier nur zeigen, dass die Experimente auch prinzipiell mit dem Ethidiumnukleosidanalogon funktionieren würden.

4.5.2.2 Synthese der pNB-Oligonukleotid-Konjugate

Um den optimalen Abstand von Donor und Akzeptor zu bestimmen, werden Oligonukleotidsequenzen synthetisiert, die PydU in unterschiedlichen Entfernung vom 3'-Ende tragen. Die entsprechenden Gegenstränge werden mit einem Aminononan-Linker versehen, an den die **pNB**-Gruppe kovalent gebunden wird (Sequenzen **D7-D9**). Um auszuschließen, dass der Einbau von Donor und Akzeptor in unterschiedliche Stränge eines Duplexes Einfluss auf die Ladungstransfereigenschaften nimmt, werden auch Oligonukleotide dargestellt, die PydU sehr nah am 5'-Ende der Sequenz tragen (Sequenzen **D10** und **D11**).

D7	5'-CAG-TCA-TAT-ACA-CTG-**X**T-3'	**C12**	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-**A**A-5'
		M3	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-**A**A-AN-**pNB**
D8	5'-CAG-TCA-TAT-ACA-CT**X**-AT-3'	**C13**	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GA**A**-TA-5'
		M4	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GA**A**-TA-AN-**pNB**
D9	5'-CAG-TCA-TAT-ACA-C**X**G-AT-3'	**C3**	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-5'
		M1	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-AN-**pNB**
D10	3'-TAG-TCA-CAT-ATA-CTG-**X**C-5'	**C14**	5'-ATC-AGT-GTA-TAT-GAC-**A**G-3'
M5	3'-TAG-TCA-CAT-ATA-CTG-**X**C-AN-**pNB**		
D11	3'-TAG-TCA-CAT-ATA-CT**X**-AC-5'	**C15**	5'-ATC-AGT-GTA-TAT-GA**A**-TG-3'
M6	3'-TAG-TCA-CAT-ATA-CT**X**-AC-AN-**pNB**		

X = PydU, AN = Aminononanlinker

Die Synthese dieser DNA-Konjugate erfolgt analog zu einem Festphasenprotokoll, das bereits für die Anknüpfung von Peptiden an Oligonukleotide genutzt wurde.[143, 229]

Die DNA-Sequenz wird zuerst im Synthesizer *trityl-off* synthetisiert. Die Aktivierung des freien 5'-OH des Oligonukleotids mit CDI erfolgt von Hand über die Zugabe der Reaktions- und Waschlösungen mittels Spritzen (vgl. Sonogashira-Protokoll Kapitel 5.6.2).
Als Linker wird 1,9-Diaminononan verwendet, das an einem Aminende mit der aktivierten Alkoholfunktion der 2'-Desoxyribose reagiert. Dieser Nonanlinker hat sich bereits bei der Einführung verschiedener Chromophore an DNA bewährt und gewährleistet durch seine Länge die Interaktion einer terminal verknüpften Gruppe mit dem 3. bis 5. Basenpaar des DNA-Duplexes. Trotz der hohen Basizität des 1,9-Diaminononans lässt sich eine Entschützung und Abspaltung der DNA durch eine kurze Reaktionszeit vermeiden.

An diesen Linker wird die *para*-Nitrobenzoesäure als Aktivester nach der HOBt/TBTU-Methode über ein modifiziertes Festphasenprotokoll der Peptidsynthese gekuppelt. Die erhaltenen modifizierten Oligonukleotide lassen sich mit den übliche Methoden über HPLC reinigen und fallen in guter Ausbeute an.

4.5.2.3 Spektroskopische Untersuchung der pNB-Oligonukleotid-Konjugate

Die UV/VIS-, Emissions- und CD-Spektren ermöglichen nicht nur eine Aussage, welcher Abstand zwischen PydU und **pNB** für die Beobachtung eines Ladungstransfers im kovalent verknüpften Peptid-DNA-System eingehalten werden muss, sondern geben darüber hinaus Hinweise über das Verhalten des Pyrenchromophors in unterschiedlicher Basenumgebung bzw. in der Nähe eines Doppelstrangendes.

Absorptionsspektren und Schmelzpunkte

Eine Betrachtung der Absorptionsspektren der Duplexe **D7/C12-M6/C15** zeigt die weitgehende Identität der sich entsprechenden Paare (**D7/C12** und **D7/M3**, etc.) in der Absorption im Pyrenbereich. Das Maximum bei ca. 350 nm ist breit und wenig strukturiert, was typisch für PydU-haltige Doppelstränge ist.

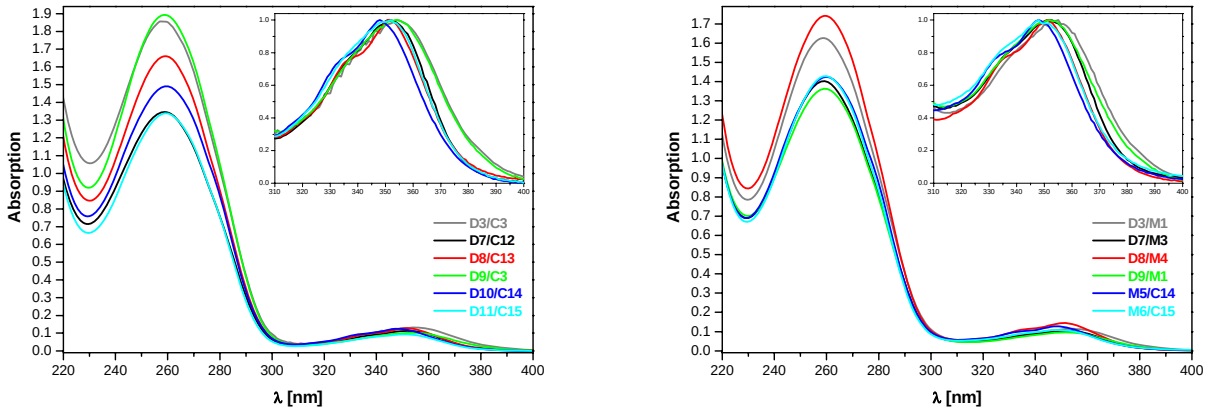


Abbildung 4-61: Absorption von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).
links: unmodifizierte, *rechts*: **pNB**-modifizierte Duplexe

Es treten keine nachweisbaren Grundzustandswechselwirkungen zwischen der **pNB**-Gruppe und dem PydU auf, die Einfluss auf den Ladungstransfer nehmen könnten.

Die Konjugate sind ähnlich stabil wie die PydU-Duplexe, ihre Schmelzpunkte unterscheiden sich kaum (vgl. Abschnitt 7.6.7). Der Linker mit der **pNB**-Gruppe bewirkt also keine Destabilisierung der Duplexarchitektur. Allerdings besitzt der Duplex **D11/C15** bzw. **M6/C15** im Vergleich zu den anderen einen niedrigeren Schmelzpunkt: Ein PydU am 5'-Ende eines Oligonukleotids wirkt offensichtlich destabilisierend.

Fluoreszenzspektren

Interessant sind die Fluoreszenzspektren der unmodifizierten Doppelstränge. Betrachtet man die nicht verlinkten Duplexe, so variiert beispielsweise die Quantenausbeute beträchtlich, ohne dass eine Tendenz für eine bestimmte Basenumgebung des PydU erkennbar ist.

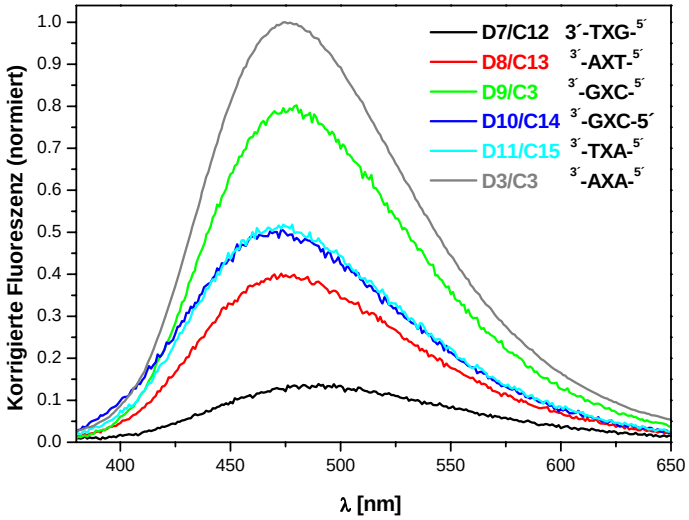


Abbildung 4-62: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM unmodifizierten Duplexen in 10 mM NaP_i (pH 7).

Auffallend ist, dass die Duplexe **D10/C14** und **D11/C15** eine leichte Blauverschiebung ihres Fluoreszenzmaximums von 476 zu 470 nm zeigen. In beiden befindet sich das PydU sehr nah am 5'-Ende des Stranges. Beide emittieren mit fast derselben Quantenausbeute, obwohl sie eine vollkommen unterschiedliche Basenumgebung für das PydU aufweisen.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass der Chromophor in diesen Sequenzen durch die Nähe zum 5'-Terminus eine andere Konformation einnehmen kann als in den übrigen Doppelsträngen. Das führt zu einer veränderten Wechselwirkung des PydU mit dem Basenstapel und somit zu einem abweichenden Verhalten im Fluoreszenzverhalten. Möglicherweise bewirkt diese Position eine zusätzliche Dynamik in der PydU-Umgebung, die Einfluss auf den Elek-

tronentransfer nimmt. In gewisser Weise bestätigen sich bei diesen Duplexen die Ergebnisse der *abasic site* Duplexe aus Kapitel 3.2.2: Der Elektronentransfer hängt davon ab, ob sich in 5'-Richtung vom PydU ein intaktes Basenpaar befindet. Man beobachtet lediglich eine geringfügige Löschung der Fluoreszenz, wenn sich dort eine *abasic site* oder der Terminus des Oligonukleotids befindet.

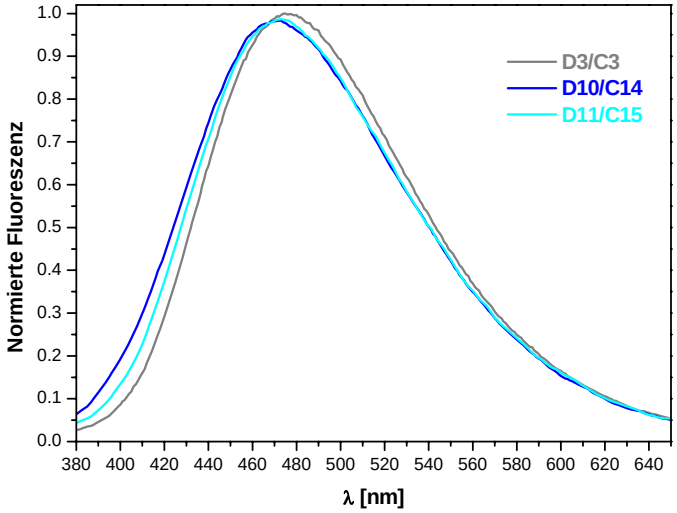


Abbildung 4-63: Normierte Fluoreszenz (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplexen in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die hypsochrome Verschiebung in **D10/C14** und **D11/C15** liefert einen Hinweis auf ein aus dem Basenstapel herausgedrehtes Pyren. Die bereits erwähnte Asymmetrie der Wechselwirkungen des PydU mit dem Basenstapel zeigt sich auch hier in den abweichenden Ergebnissen für die Duplexe mit PydU in der Nähe des 3'-Endes, die sich nicht so verhalten. (vgl. Kapitel 3.2.2)

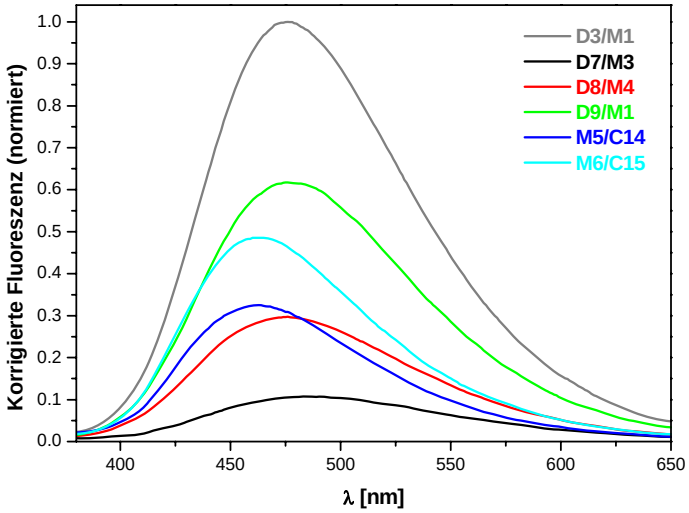


Abbildung 4-64: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM **pNB**-modifizierten Duplexen in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die Anbindung des **pNB**-Restes über den Aminononanlinker bewirkt in allen Duplexen (außer **D3/M1**) eine Fluoreszenzlöschung. Einen Sonderfall stellen auch hier die Duplexe von **M5/C14** und **M6/C15** dar, bei denen die Anknüpfung des Elektronenakzeptors zu einem zusätzlichen Blaushift in der Emission führt. Bei **M6/C15** findet nur eine sehr geringe Fluoreszenzlöschung statt (vgl. Tabelle 4-1). Auch daran lässt sich die durch den 5'-Terminus lokal stark gestörte Struktur im Bereich des modifizierten Nukleotids erkennen.

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren lassen keinen einheitlichen Trend für die Basenumgebung erkennen. Im Fall der Linker-modifizierten Duplexe ähneln sich die Spektren mehr, da hier die optischen Eigenschaften des **pNB**-Restes dominieren.

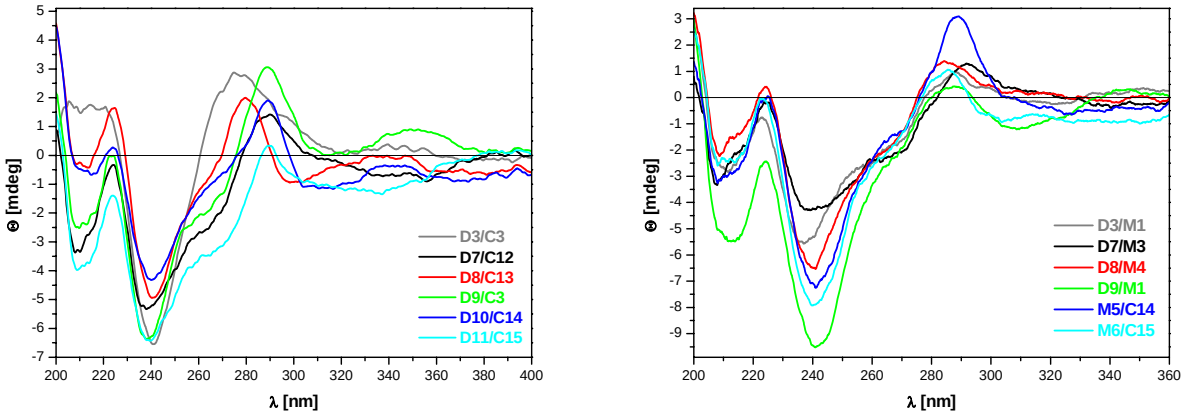


Abbildung 4-65: Absorption von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.
links: unmodifizierte, *rechts*: **pNB**-modifizierte Duplexe

Auffällig ist eine Verschiebung des Maximums bei ~ 290 nm, das in den Duplexen **D3/C3** und **D8/C13** bei 280 nm erscheint. Die Bandenform des breiten Minimums bei ca. 240 nm weist in allen Duplexen außer **D3/C3** eine Schulter bei >260 nm auf. Diese spektroskopischen Daten belegen erneut die Sensibilität der Duplexstruktur im Bereich des PydU-Nukleotids (vgl. Kapitel 3.2).

4.5.2.4 Bestimmung des Abstands

In der Auftragung der absorptionskorrigierten Fluoreszenzen werden die Unterschiede in der Ladungstransfereffizienz der einzelnen Duplexe mit und ohne **pNB**-Gruppe sichtbar.

Während zwischen **D3/C3** und **D3/M1** kaum ein Unterschied erkennbar ist, differiert die Emission in den anderen Duplexpaaren. Besonders ausgeprägt ist er im Vergleich von **D9/C3** und **D9/M1, D8/C13** und **D8/M4** sowie **D10/C14** und **M5/C14**. Der jeweilige mit dem Elektronenakzeptor versehene Duplex weist eine deutlich verminderte Emission auf.

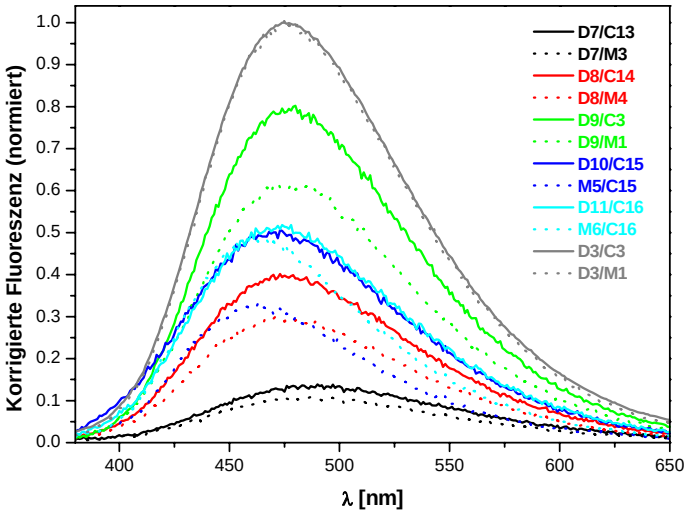


Abbildung 4-66: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz (λ_{exc} = 360 nm) von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

In Tabelle 4-1 sind die absoluten und realtiven Restfluoreszenzen zusammengefasst. Die absolute Fluoreszenz gibt dabei Auskunft, wie hoch die Emission eines Duplexes im Vergleich mit dem nicht unmodifizierten Duplex **D3/C3** ausfällt, während sich die relative Restfluoreszenz auf den Unterschied zwischen unmodifiziertem und **pNB**-modifizierten Doppelstrang bezieht.

In den DNA-Sequenzen mit kleiner relativer Restfluoreszenz ist der Donor-Akzeptor-Abstand also optimal für einen Ladungstransfer. Die Position des PydU weist darauf hin, dass die **pNB**-Gruppe, bedingt durch den Linker, in unmittelbarer Nähe zum Chromophor mit der DNA interagiert, dabei spielt es keine Rolle, ob die **pNB**-Gruppe in demselben Strang oder im Gegenstrang zum PydU sitzt.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Fluoreszenzintensitäten von unmodifizierten und **pNB**-Duplexen

Duplexe	Restfluoreszenz absolut*[%]	Restfluoreszenz relativ**[%]
D3/C3	100	-
D3/M1	100	99
D7/C12	13	-
D7/M3	11	80
D8/C13	40	-
D8/M4	30	73
D9/C3	80	-
D9/M1	62	76
D10/C14	51	-
M5/C14	33	64
D11/C15	52	-
M6/C15	49	93

* Werte bezogen auf maximale Fluoreszenzintensität von **D3/C3**

** Werte bezogen auf maximale Fluoreszenzintensität des entsprechenden unmodifizierten Duplexes

Da die Duplexe in etwa das gleiche Ausmaß an Fluoreszenzlöschung zeigen, wird für die Modifikationen mit Peptiden auf Duplexe von **D9** zurückgegriffen. Das hat mehrere Gründe:

- Diese Duplexe zeigen eine hohe Grundfluoreszenz, was für die Emissionsspektroskopie günstig ist.
- Ihre Anwendung erfordert keine Synthese Pyren-haltiger Duplexe, die modifiziert werden müssen, stattdessen können zu einem PydU-haltigen Strang verschiedene konventionelle Gegenstränge für die kovalente Anbindung verwendet werden. Da die Synthese der Peptid-Konjugate erst noch erprobt werden muss, ist diese Alternative günstiger.
- Da die Ursache des Fluoreszenzshifts in **M5/C14** nicht bekannt ist, und somit dessen Folgen für den Ladungstransfer nicht abgeschätzt werden können, ist es sinnvoller, auf andere Duplexe zurückzugreifen.

4.5.3 Kovalente Anknüpfung

4.5.3.1 Synthese

Das Ziel der synthetischen Arbeit ist die Entwicklung einer Darstellungsvorschrift für Peptid-DNA-Konjugate, die die DNA-Festphasensynthese mit der SPPS kombiniert.

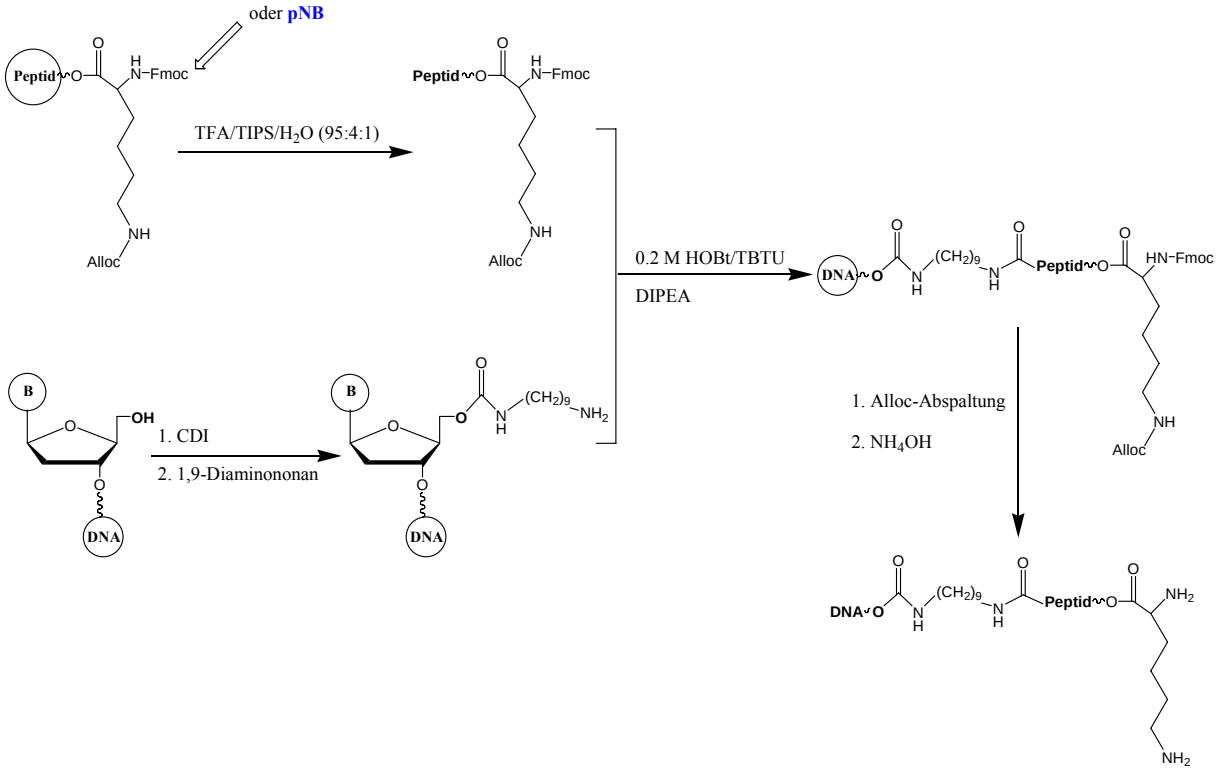


Abbildung 4-67: Schematische Darstellung der Synthese von Peptid-DNA-Konjugaten. Befindet sich eine **pNB**- statt der *Fmoc*-Gruppe am Peptid, so verbleibt diese am POC.

In der SPPS müssen dabei die Peptide mit Schutzgruppen versehen werden, die sich unter den Bedingungen der DNA-Synthese abspalten lassen. Da die Peptidsynthese nach der *Fmoc*-Strategie erfolgen soll, scheidet die Verwendung basenlabiler Seitenkettenschutzgruppen, die bei der Abspaltung des modifizierten Oligonukleotids vom CPG-Träger mit entfernt werden, aus. Diese Vorgehensweise bietet gegenüber der alternativen *Boc*-Strategie den Vorteil, dass der N-Terminus des Peptids, falls er nicht durch eine **pNB**-Gruppe blockiert wird, mit der basenlabilen *Fmoc*-Gruppe versehen bleibt. Säurelabile Schutzgruppen (z. B. *Boc*) lassen sich nicht mehr in Anwesenheit von DNA abspalten. Durch die Verwendung der orthogonalen *Alloc*-Schutzgruppe für die Seitenketten (der Lysine) lässt sich ein weiterer Syntheseschritt, d. h. eine weitere Schützung, nach der Abspaltung des Peptids vom TCP-Harz verhindern. Die-

ser ist durch die erforderlichen Reinigungsprozesse immer mit einem gewissen Substanzverlust und einem Mehraufwand an Kosten und Zeit verbunden. Gelingt die Abspaltung der *Alloc*-Gruppen auf dem CPG, ist damit eine sehr effiziente Darstellungsform für Peptid-DNA-Konjugate gefunden.

Auf der Basis der Vorversuche mit **D9/M1** sollen drei Peptid-DNA-Konjugate für erste Messungen dargestellt werden.

D9	5'-CAG-TCA-TAT-ACA-C**X**G-AT-3'	**X** = PydU
M7	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-**AN**-**KK**-**pNB**	**AN** = Aminononanlinker
M8	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-**AN**-**KWK**	
M9	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-**AN**-**KWK**-**pNB**	

Das Konjugat **M7** dient dabei als Kontrolle, wie die elektrostatische Interaktion des Dilysinrestes an der DNA das Fluoreszenzverhalten des kovalent verknüpften PydU-**pNB**-Systems beeinflusst. Die beiden Tryptophan enthaltenden Konjugate **M8** und **M9** sollen den Einfluss einer aromatischen Aminosäure aufzeigen, die in den Ladungstransfer von PydU au **pNB** eingreifen kann: **M8** zeigt dabei den Effekt des Lochakzeptors Tryptophan allein, **M9** die Wirkung der Kombination aus Loch- und Elektronenakzeptor. Im Vergleich mit den Duplexen **D9/C3** und **D9/M1** können die Ladungstransfereigenschaften des **pNB**-PydU-Systems bewertet werden.

Die Synthese der benötigten *Alloc*-geschützten Peptide mittels SPPS verläuft problemlos. Auch die Kupplung des Peptids an die mit dem Aminononanlinker modifizierte DNA-Sequenz liefert befriedigende Ergebnisse. Die Entschützung der Lysinseitenketten stellt allerdings ein Problem dar. In der Literatur existieren verschiedene Methoden zur Entschützung von *Alloc*-Gruppen.
Alloc lässt sich mittels Pd(0)-Katalyse unter Zuhilfenahme eines Allylakzeptors abspalten, der die Rückübertragung eines Allylrestes auf die entschützte Aminofunktion vermeidet. Eine Reihe von Abspaltreagenzien kann dabei auch in Anwesenheit von DNA eingesetzt werden.[354, 355] Solange die Nukleobasen die während der Festphasensynthese benötigten Schutzgruppen tragen, kann keine Nebenreaktion mit einem abgespaltenen Allyrest erfolgen.

Für die Abspaltung von *Alloc*-Gruppen als Schutzgruppen an Nukleobasen während der DNA-Festphasensynthese schlagen *Hayakawa et al.*[354, 355] den Einsatz von $Pd(PPh_3)_4$ als

Katalysator und verschiedener Allylakzeptoren in THF vor. Dieser Veröffentlichung folgend werden Dimedon und frisch dargestelltes n-Butylamin/Ameisensäure-Salz als Akzeptoren verwendet. Beide Systeme liefern bei vergleichbarer Reaktionszeit ähnliche Ergebnisse. 3-Amino-1-propanol, das bei der Entschützung eines Ethidium-Nukleosidanalogons erfolgreich angewendet wurde[356], zeigt bei den Peptid-DNA-Konjugaten keine Umsetzung.

4.5.3.2 Probleme

Das grundlegende Problem bei der Optimierung der Abspaltung liegt in den Schwierigkeiten der Analytik und Reinigung der entstehenden Konjugate. Eine konventionelle HPLC-Analytik oder gar präparative Trennung mit den erprobten HPLC-Säulen liefert unbefriedigende Ergebnisse. Auch eine Ethanol-Präzipitation des Peptid-DNA-Konjugates, wie sie zur Reinigung von Oligonukleotiden oft verwendet wird, bringt keine Verbesserung. Die Bestimmung der Masse mittels MALDI der erhaltenen DNA-Stränge sowohl aus den Rohprodukten, als auch von den aus den HPLC-Läufen erhaltenen Fraktionen ergibt extrem schwache Signale. Die Reinigung derartiger kurzer Peptid-Konjugate wird in der Literatur durchaus als schwierig beschrieben.[357] Auch die Massenspektrometrie derartiger Verbindungen stellt aufgrund der sich gegensätzlich verhaltenden Eigenschaften des Peptid- und DNA-Restes eine Herausforderung dar, wenn keiner der beiden Oligomerreste deutlich größer als der andere ist. [358] Die Ausbeute an Peptid-DNA-Konjugaten kann in zukünftigen Arbeiten bei einer entsprechenden Optimierung der Synthese deutlich verbessert werden.

4.5.3.3 Ergebnisse

Durch die Probleme in der Aufreinigung der Konjugate sind die Resultate der spektroskopischen Untersuchung nur als erste Ergebnisse aus Vorversuchen zu bewerten. Durch die geringe Konzentration und das kleine Probenvolumen der erhaltenen Sequenzen mussten die Messungen in 3 mm Küvetten durchgeführt werden, was keine Bestimmung des Schmelzpunktes erlaubte. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis in den Absorptions- und Fluoreszenzmessungen ist aufgrund der geringen Schichtdicke entsprechend schlecht.

Durch Absorptionsmessungen ließen sich in den Fraktionen der HPLC-Läufe die DNA-Peptid-Konjugate als Einzelstränge identifizieren und quantifizieren. Sie zeigen als einzige Komponenten eine DNA-typische Absorption bei 255 nm mit einer Schulter bei ~275 nm. Die UV-Vis-Spektren der Duplexe **D9/M7-D9/M9** ähneln den Duplexen **D9/C3** und **D9/M1**. Die CD-Spektren erscheinen um 10 nm verschoben, zeigen aber immer noch den typischen Verlauf. In den Emissionsspektren lässt sich eine Blau-Verschiebung des Fluoreszenzmaximums beobachten von 475 nm bei **D9/C3** und **D9/M1** zu 460 nm in den Peptid-DNA-Konjugaten.

Die Betrachtung der Fluoreszenz-Quantenausbeute ermöglicht schließlich eine Aussage über die Ladungstransfereigenschaften der kovalenten Peptid-DNA-Konjugate. Dafür werden die Restfluoreszenzen der nicht kovalenten und kovalenten Systeme miteinander verglichen. Erwartungsgemäß sollte die Restfluoreszenz des Duplexes **D3/C3** mit 1 eq nicht kovalent gebundenen Peptid höher sein als im kovalenten System, da nicht 100 % der zugegebenen Peptidmenge tatsächlich an die DNA gebunden wird.

Tabelle 4-2: Fluoreszenzen Peptid-modifizierter Duplexe im Vergleich zum nicht kovalenten Löschexperiment

Duplexe	Restfluoreszenz* [%]
D3/C3 (1 eq pNB-KK)	98
D9/M1	80
D9/M7	60
D3/C3 (1 eq KWK)	98
D9/M8	60
D3/C3 (1 eq pNB-KWK)	95
D9/M9	45

*Der Wert bezieht sich auf die Fluoreszenzintensität von **D9/C3**

Wie Tabelle 4-2 zeigt, ist das tatsächlich der Fall. **D9/M1** weist 80 % der Fluoreszenz von **D9/C3** auf und dient als Grenzwert für die Löscheffizienz der **pNB**-Gruppe ohne Beteiligung einer peptidischen Wechselwirkung. Obwohl die Werte der Peptid-DNA-Konjugate fehlerbehaftet sind, lässt sich dennoch ein wichtiger Trend aus ihnen ableiten. Die kovalente Anknüpfung von **pNB-KK** und **KWK** lässt die Fluoreszenz um rund ein Drittel auf 60 % sinken. Die Verlinkung mit **pNB-KWK** löscht die Fluoreszenz um rund die Hälfte. Damit liegen diese Werte sämtlich unter denen des Duplexes **D9/M1** und belegen, dass eine Anknüpfung an

Peptiden zu einer Erhöhung der Ladungstransfereffizienz führt, egal ob es sich wie im Fall des **D9/M7** um einen Elektronentransfer oder wie bei **D9/M8** um einen Lochtransfer handelt. Die gleichzeitige Anknüpfung eines Loch- und Elektronenakzeptors wie in **D9/M9** steigert die Ladungstransfereffizienz erheblich.

4.6 Zusammenfassung der Resultate zur Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Peptiden und Oligonukleotiden

Der Ladungstransfer zwischen Peptiden und DNA ist von der Art und Stärke der Bindung zwischen beiden Molekülen abhängig. Dabei gilt: Je stärker die Bindung zwischen Oligonukleotid und Oligopeptid, desto mehr Ladung kann transferiert werden. Dabei ist die Anwesenheit einer aromatischen Gruppe (**pNB**, W oder Y) notwendig.

Die Effizienz des Donor-Akzeptor-Systems hängt vom vorherrschenden Mechanismus für den Ladungstransfer ab. Im PydU-**pNB**-System ist Elektronentransfer dank des Hopping-Mechanimus auch über größere Distanzen zwischen Donor und Akzeptor möglich, während im Ethidium-**pNB**-System der Ladungstransfer aufgrund des Superaustauschmechanismus nur über sehr kurzen Entfernungen (ca. 2 bp) erfolgt.

Ein kovalentes System ist einem nicht kovalenten nur bedingt überlegen. Es ist nicht allein die Stärke einer Bindung entscheidend, vielmehr kommt es auch auf die Lokalisation der Kontaktstelle von Peptid und Oligonukleotid an. Befinden sich Ladungsdonor und -akzeptor zu weit voneinander entfernt, sei es durch eine nicht kovalente Interaktion in großer Entfernung voneinander oder durch eine erzwungene Position der Wechselwirkung durch ein kovalent verknüpftes System, findet kein Ladungstransfer mehr statt.

Eine lokale Störung der Struktur im Bereich des PydU-Chromophors, wie z. B. der Einbau einer *abasic site,* kann ebenso eine Behinderung des Ladungstransfers zur Folge haben.

Eine wichtige Rolle bei den Ladungstransferereignissen spielen Faktoren, die sich in der unmittelbaren Umgebung der Reaktionszentren auswirken. Dazu gehören Einflüsse wie die Ab-

schirmung einzelner Molekülteile von der Solventhülle der DNA, die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die den Elektronenakzeptor an der Interkalation in den Basenstapel hindern, die sterische Hinderung der Einlagerung des Elektronenakzeptors oder die Protonierung einer reaktiven Spezies. Gerade diese Faktoren werden durch die anwesenden Seitenketten der beteiligten Peptide beeinflusst.

Da zu Beginn dieser Arbeit nicht klar war, in wie vielfältiger Weise die Zusammensetzung eines Peptids die Ladungstransfereigenschaften innerhalb eines Oligonukleotids und zwischen DNA und Peptiden beeinflusst, bilden diese Resultate eine wichtige Grundlage für das Verständnis des Ladungstransfers in den biologisch aktiven DNA-Protein-Komplexen. Die erstaunliche Komplexität der elektronischen Wechselwirkungen zwischen Oligonukleotiden und Peptiden in diesen kleinen Modellsystemen lässt die viel höhere Komplexität in großen Protein-DNA-Komplexen erahnen.

5 Entwicklung neuer DNA-basierter Fluoreszenzsonden

5.1 Nukleinsäuren in der Nanotechnologie

In der Nanotechnologie sind Nukleinsäuren aufgrund ihrer biologischen Funktion und ihrer besonderen supramolekularen Materialeigenschaften ein ideales Medium für die Entwicklung neuartiger Werkstoffe und Werkzeuge. Besonders die Selbstkomplementarität und die Ladungstransfereigenschaften der DNA bilden dabei die Grundlage, molekulare Maschinen und Materialien in der Größenordnung von Nanometern nach dem Vorbild der Natur darzustellen. Hinzu kommen wichtige Eigenschaften wie Stabilität, Flexibilität und die vorhandenen chemischen Werkzeuge zur Modifikation, die die Nukleinsäuren für die Nanotechnologie so interessant machen.[359-368]

Dabei ist eine Vielzahl von Anwendungen vorstellbar. An dieser Stelle sollen beispielhaft ein paar aufgeführt werden:

- Künstliche Photorezeptoren, die auf dem Prinzip der Selbstkomplementarität beruhen, können in der Biosensorik und Diagnostik Anwendung finden. Eine wichtige Rolle spielen dabei fluoreszente Systeme, deren optische Eigenschaften sich genau und einfach modulieren lassen und die hoch sensibel auf Strukturänderungen der DNA reagieren. Diese Anforderungen erfüllen z. B. DNA-basierte Multi-Chromophorstrukturen.[103, 369-379]
- Neuartige Wirkstoffe, die auf der Ebene der Nukleinsäuren arbeiten, ermöglichen neue Therapieformen in der Medizin.[380-382]
- Künstliche Enzyme, die DNA-templatgesteuerte chemische Synthese betreiben, können als Nanosynthesizer z. B. in der kombinatorischen Chemie eingesetzt werden.[383-387]
- Ein Einsatz in der Nanorobotik ist denkbar, wenn die konformationelle Beweglichkeit beispielsweise über die thermische Stabilität von Duplexen oder die Anwesenheit alternativer Partner zur Ausbildung von Basenpaarungen gesteuert werden kann.[388-393]
- Ein verbesserter Ladungstransfer in Nukleinsäuren könnte in der DNA-Diagnostik für Chips mit direktem elektronischen *read-out* Verwendung finden oder in der Nanoelektronik in Form von Nanodrähten.[76, 361, 394-400]
- Konjugate von Nukleinsäuren und ihren Monomeren mit diversen funktionellen Einheiten können zu neuartigen Molekülen mit völlig neuen, Nukleinsäure fremden Eigenschaften

führen.[401-404] So lassen sich beispielsweise Bolaamphiphile von Nukleosiden mit Polyglykoleinheiten in der Phasentransferkatalyse nutzen.[405]

Auf allen genannten Gebieten sind bereits erste Erfolge zu verzeichnen. Für die praktische Anwendung der Verfahren ist allerdings zum Teil noch ein erheblicher Forschungsaufwand vonnöten.

Im Rahmen dieser Arbeit wird Grundlagenforschung für die nanotechnologische Anwendung im Bereich der Biosensorik betrieben. Mithilfe verschiedener in unserer Gruppe verwendeten photochemisch anregbaren Elektronendonoren in Oligonukleotiden sollen DNA-basierte Fluoreszenzsonden erzeugt werden, die neuartige strukturelle und elektronische Eigenschaften aufweisen. Unter diesem Aspekt werden zwei Ansätze verfolgt:

- PydU bzw. PtzdU werden in unterschiedlicher Anzahl und Anordnung in DNA eingebaut und spektroskopisch untersucht. Das Hauptaugenmerk gilt dabei den Struktureinflüssen, denen ein Oligonukleotid durch den Einbau mehrerer modifizierter Nukleotide unterworfen wird. Diese entscheiden letztlich darüber, inwieweit sich ein modifiziertes Oligonukleotid selbstkomplementär verhält und somit zur Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen geeignet ist.
- Über Sonogashira-Reaktion an festphasengebundenen Oligonukleotiden[136] wird 1-Ethinylpyren als neuer Chromophor eingeführt, spektroskopisch untersucht und auf mögliche Anwendungen hin getestet.

5.2 Zweifach-modifizierte Oligonukleotide

5.2.1 Hintergrund und Design

Die einzige Bedingung für die Anordnung mehrerer Chromophore in einem Oligonukleotid, die für eine Anwendung in der Praxis sinnvoll erscheint, ist die Möglichkeit der elektronischen Wechselwirkung zwischen den Fluorophoren. So kann die Integrität der Basenumgebung sondiert werden, indem die Emission über die strukturellen Veränderungen moduliert wird. Eine Interaktion der einzelnen Chromophore kann nur stattfinden, wenn diese sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Das bedeutet, dass sie prinzipiell sowohl in einem Strang hintereinander angeordnet sein können als auch gegenüberliegend in Strang und Gegenstrang. Die Untersuchung des folgenden zweifach fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids soll zeigen, ob eine Anordnung von zwei PydU-Nukleotiden als komplementäre Basen als Hybridisierungssonde einsetzbar ist. Eine theoretische Vorhersage für diesen Fall fällt schwer, da die Struktur PydU-haltiger Duplex-DNA bislang nicht hinreichend bekannt ist. Wie die vorangehenden Kapitel gezeigt haben, existieren Hinweise darauf, dass je nach Basenumgebung der Pyrenrest des PydU-Nukleotids nicht aus der DNA-Helix heraus in die große Furche ragt, sondern vielmehr eine leicht verzerrte Konformation aufweist, was eine teilweise Interaktion des Pyrenrestes mit dem Basenstapel ermöglicht.
Um das Verhalten des Pyrenchromophors in einem zweifach modifizierten System zu überprüfen, wird die selbstkomplementäre Oligonukleotidsequenz **H** synthetisiert, die je nach gewählten Hybridisierungbedingungen intramolekular eine Haarnadelstruktur ***hp*H** oder intermolekular den Duplex **H/C16** bilden kann.

H	3'-GTG-**X**CG-AAG-CG**X**-CAC-5'	**X** = PydU
C16	5'-CAC-AGC-TTC-GCA-GTG-3'	

H ist so entworfen, dass sich in ***hp*H** die beiden PydU-Einheiten direkt gegenüber liegen, während sie in **H/C16** durch sieben Basenpaare getrennt sind.

5.2.2 Spektroskopische Untersuchungen am zweifach-markierten Oligonukleotid

Ein Vergleich der Absorptionsspektren von Einzelstrang ***ss*H**, Duplex **H/C16** und Hairpin ***hp*H** liefert keinen Hinweis auf eine elektronische Kopplung der beiden PydU-Chromophore.

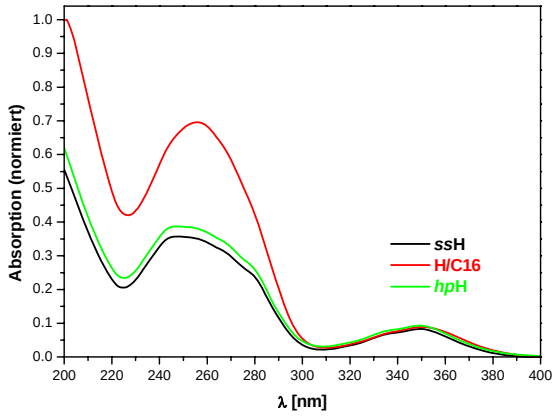


Abbildung 5-1: Absorption von 5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die Fluoreszenzspektren unterscheiden sich deutlich voneinander: Trägt man die korrigierte Emission auf, so erkennt man, dass **H/C16** am stärksten fluoresziert, der Einzelstrang erreicht noch etwa 80 %, ***hp*H** dagegen nurmehr 70 % der Intensität. Die Lage des Fluoreszenzmaximums bleibt dabei nahezu unverändert.

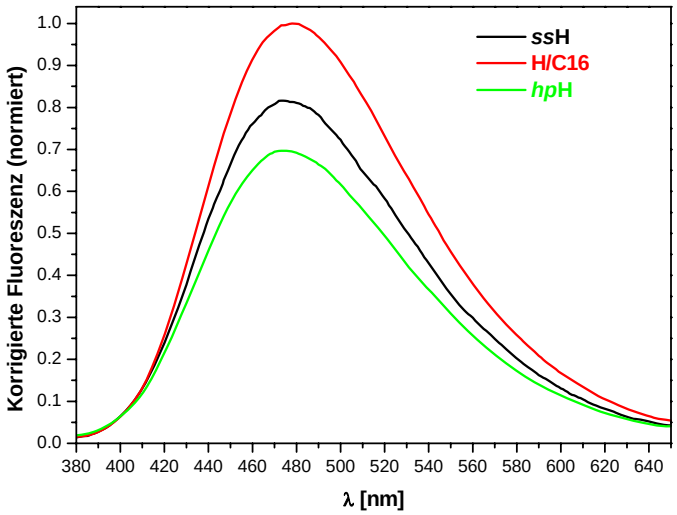


Abbildung 5-2: Absorptionskorrigierte Fluoreszenz von 5 µM Duplex-DNA und 2.5 µM Einzelstrang-DNA in 10 mM NaP_i (pH 7) bei λ_{exc}=360 nm.

Der Unterschied in der Emission zwischen ***ss*H** und **H/C16** entspricht den Erwartungen, der Rückgang der Emission in ***hp*H** im Vergleich zu ***ss*H** ist jedoch ungewöhnlich. Der Anstieg in

der Fluoreszenz vom Einzel- zum Doppelstrang lässt sich auf den Einfluss der Basenumgebung auf die Exciplexemission von PydU zurückführen. Umgekehrt gilt für die Abnahme der Emission von ***hp*H** zu ***ss*H** dass zumindest lokal eine grössere Flexibilität im Bereich der PydU-Einheiten vorliegt. Die Strukturverhältnisse im lokalen Umfeld der PydU-Gruppen sind in ***hp*H** und ***ss*H** ähnlich. Das zeigen auch die fast identischen Absorptionsspektren.

Die CD-Spektren von **H/C16** und ***hp*H** unterscheiden sich klar voneinander. Zwischen 320 und 400 nm liegt das positive Signal der Pyrenbande. In **H/C16** weist es bei 360 nm ein Maximum auf, in ***hp*H** bei 365 nm. Auch das Maximum der DNA-Bande erscheint verschoben: Es liegt im Duplex bei 290 nm, im Hairpin bei 280 nm. Ebenso zeigen sich Verschiebungen im kurzwelligen Absorptionsbereich des Pyrens für die beiden DNA-Strukturen, also zwischen 200-260 nm, die darauf hindeuten, dass ***hp*H** im Gegensatz zu **H/C16** nur teilweise helikal vorliegt.

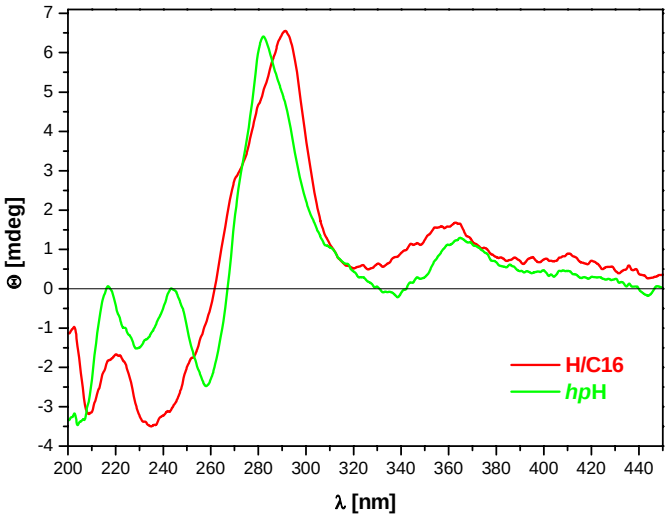


Abbildung 5-3: CD-Spektrum von 5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.

Gestützt werden die Beobachtungen aus den CD-Spektren durch die Anregungsspektren, die bei einer Emissionswellenlänge von 475 nm aufgenommen wurden. Die Anregungsprofile von **H/C16** und ***hp*H** zeigen im Vergleich ebenfalls eine hypsochrome Verschiebung der Pyrenabsorptionen. Der Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Basenumgebung des PydUs in **H/C16** und ***hp*H.**

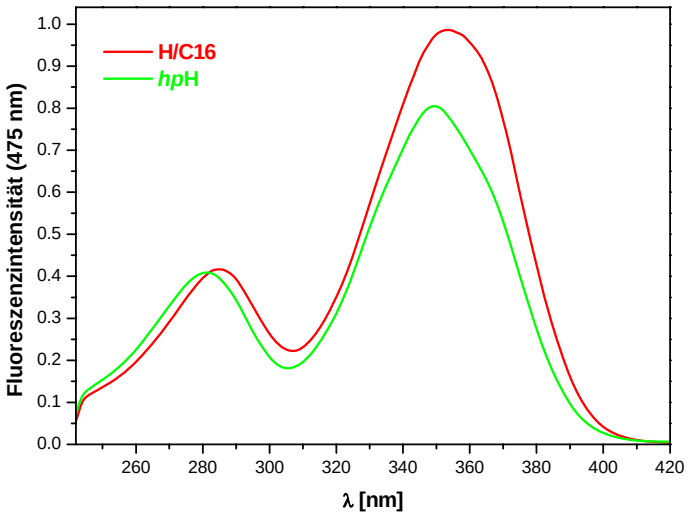


Abbildung 5-4: Anregungsspektrum bei λ_{em}=475 nm mit 5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

5.2.3 Zusammenfassung

Befinden sich zwei PydU-Chromophore im Abstand von sieben Basenpaaren in einem DNA-Duplex wie in **H/C16**, so beeinflussen sich diese aufgrund der großen Entfernung nicht gegenseitig. Liegen sich zwei PydU-Chromophore wie in der Haarnadel ***hp*H** direkt gegenüber, so kommt es zu einer Strukturstörung an dieser Stelle, die sich in einer verringerten Fluoreszenzausbeute zeigt. Die modifizierten Nukleotide nehmen in Duplex und Haarnadel unterschiedliche Konformationen ein, wobei in ***hp*H** eine verminderte Wechselwirkung des Pyrenrestes mit dem Basenstapel erfolgt, wie die große Ähnlichkeit von ***hp*H** und ***ss*H** beweist.

Für die Planung weiterer DNA-Systeme bedeutet dies zum einen, dass der Abstand zwischen den Chromophoren nicht zu groß sein darf. Zum anderen sollten die Chromophore in demselben Strang liegen. Die einfachsten Systeme, die diese Bedingungen erfüllen, sind Oligonukleotide, in denen modifizierte Nukleotide direkt benachbart liegen.

5.3 Fünffach-PydU-modifizierte Oligonukleotide

5.3.1 Hintergrund und Design

Die Synthese mehrfach gelabelter Oligonukleotide stellt den nächsten Schritt in Richtung Nanodevice dar. Fünf nebeneinander eingebaute PydU-Einheiten sollen dabei zeigen, ob sich eine geordnete Struktur ausbildet und die Pyrenreste in elektronische Wechselwirkung miteinander treten können.

N1	3'-CAG-TCA-TA**X**-ATA-CTG-AC-5'	**X** = PydU
C17	5'-GTC-AGT-ATA-TAT-GAC-TG-3'	
N2	3'-ACG-TGC-A**XX**-**XXX**-ACG-TGC-A-5'	
C18	5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'	

Die mit fünf benachbarten PydU-Nukleotiden versehene DNA **N2** und die einfach markierte Kontroll-DNA **N1** wurden zu diesem Zweck synthetisiert und untersucht. Beide Sequenzen enthalten AT-Basenpaare als direkten Nachbarn der fluorophoren Gruppen. Ein effektiver reduktiver Elektronentransfer in den Basenstapel wird somit signifikant unterdrückt.

5.3.2 Spektroskopische Untersuchung am fünffach-markierten Oligonukleotid

5.3.2.1 Messungen am Einzelstrang

Die spektroskopische Untersuchung des Einzelstranges ***ss*N1** zeigt die Eigenschaften des DNA-Pyrensystems ohne ausgebildeten helikalen Basenstapel, da die Wechselwirkungen der Nukleobasen untereinander fehlen. Somit lässt sich durch den Vergleich von Messungen an ***ss*N1** und **N1/C17** die Bedeutung der DNA-Architektur für die elektronischen Interaktionen zwischen den PydU-Chromophoren ermitteln.

Wie erwartet, absorbiert der Einzelstrang ***ss*N2** im Pyrenbereich etwa fünfmal so stark wie ***ss*N1**. Das Maximum der sehr breiten Absorptionsbande liegt dabei in beiden Einzelsträngen bei ca. 350 nm.

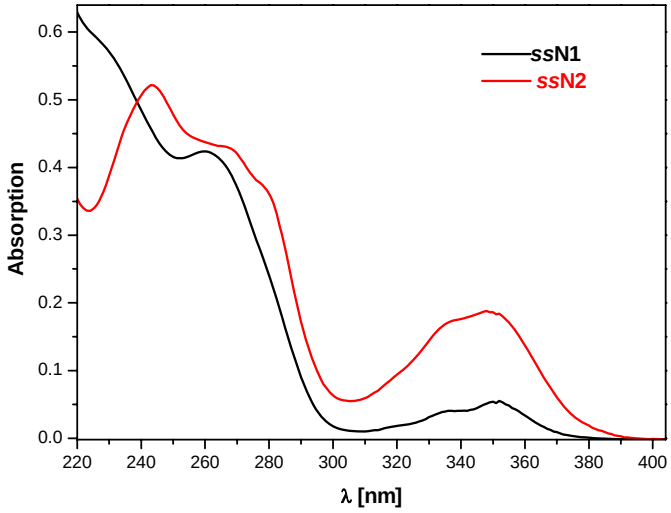


Abbildung 5-5: Absorptionsspektren von 2.5 µM Einzelstrang in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die Emission der Einzelstränge zeigt bei ***ss*N1** und ***ss*N2** ein Maximum bei 475 nm. Wie aus der korrigierten Emission ersichtlich, ist die Quantenausbeute von ***ss*N2** fast so hoch wie in ***ss*N1**, was aufgrund der ungeordneten Struktur der Einzelstränge auch zu erwarten ist.

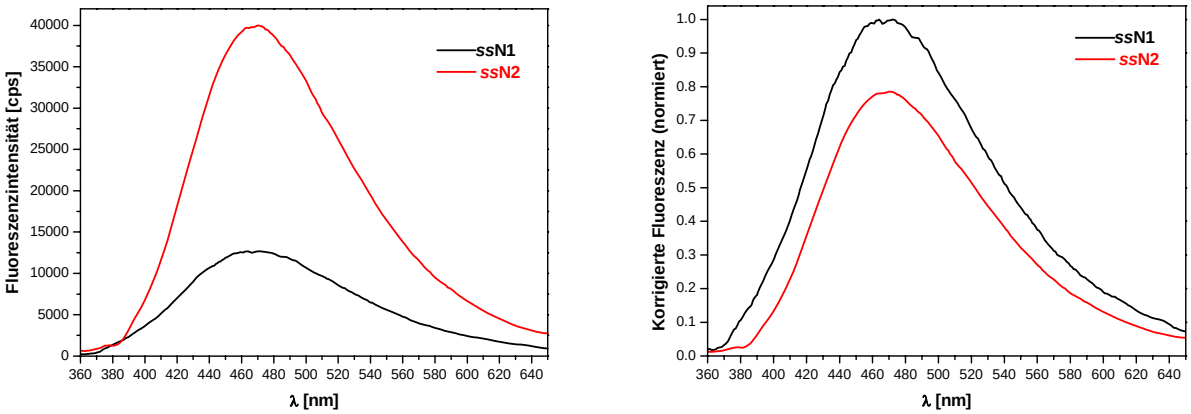


Abbildung 5-6: Absolutes (*links*) und absorptionskorrigiertes (*rechts*) Emissionsspektrum (λ_{exc}=340 nm) von 2.5 µM Einzelstrang in 10 mM NaP_i (pH 7).

In guter Näherung lässt sich sagen, dass die PydU-Chromophore in ***ss*N2** keinen Einfluss aufeinander ausüben. Sie verhalten sich annähernd wie fünf einzelne PydU-Einheiten.

5.3.2.2 Absorption und Emission im Doppelstrang

Die spektroskopische Untersuchung der Duplexe liefert ein etwas anderes Bild. Das Absorptionsspektrum der Duplexe **N1/C17** und **N2/C18** ist gegenüber den Einzelstrangmessungen nur leicht verändert und weist im Pyrenbereich ein breites, leicht strukturiertes Maximum bei nunmehr 356 nm auf.

Das Emissionsverhalten von einfach und fünffach modifiziertem Duplex dagegen zeigt nun deutliche Unterschiede. Beide Doppelstränge fluoreszieren im Duplex deutlich mehr als im Einzelstrang, was prinzipiell den Erwartungen entspricht. Eine Auftragung der korrigierten Fluoreszenzen macht den Anstieg der Emission in **N2/C18** im Vergleich zu Duplex **N1/C17** sichtbar. Durch die räumliche Abschirmung der inneren drei PydU-Einheiten der Fünfergruppe von den Nachbarbasen im DNA-Strang, werden Elektronentransferprozesse zwischen den Chromophoren und den Nachbarbasen unterbunden, die zu einer Löschung der Fluoreszenz führen. Somit ist insgesamt betrachtet die Emission in **N2/C18** um ein Vielfaches höher als im Kontrollduplex.

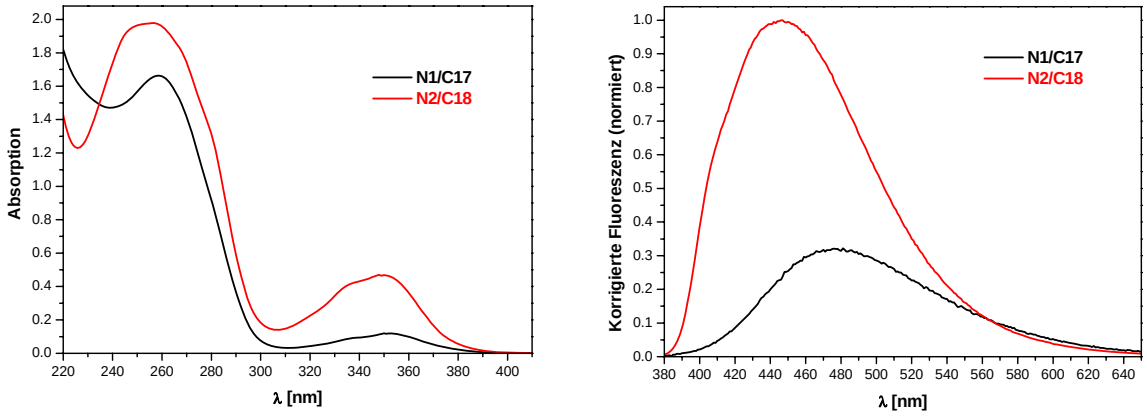


Abbildung 5-7: Absorption und absorptionskorrigierte Emission (λ_{exc}=360 nm) von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Das Maximum der Emission von **N1/C17** liegt wie im Einzelstrang bei 475 nm, während bei **N2/C18** eine deutliche Blauverschiebung zu 445 nm eintritt. Diese Verschiebung ins Blaue bei **N2/C18** basiert vermutlich auf einer teilweisen elektronischen Entkopplung der benachbarten Chromophorsysteme im angeregten Zustand.

Die Anregungsspektren bei den Emissionsmaxima von **N1/C17** und **N2/C18** liefern keine weiteren Erkenntnisse, die über die Informationen aus den Absorptionsspektren hinausgehen.

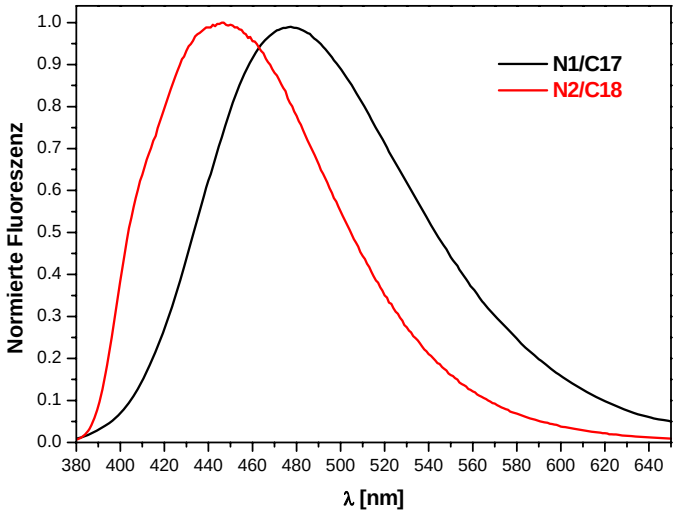


Abbildung 5-8: Normierte Emission (λ_{exc}=360 nm) von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

5.3.2.3 CD-Spektroskopie des Duplexes

Das Spektrum von **N1/C17** wird von den Signalen der Chromophore dominiert, die sich in einer chiralen Umgebung befinden. Auffällig ist der Verlauf der CD-Kurve des Duplexes **N2/C18** vom Negativen ins Positive zwischen 320 und 400 nm mit einem Nulldurchgang bei 370 nm (Absorptionsmaximum des Pyrens). Ein derartiges excitonisches Signal des Pyrenrestes fehlt bei **N1/C17**.

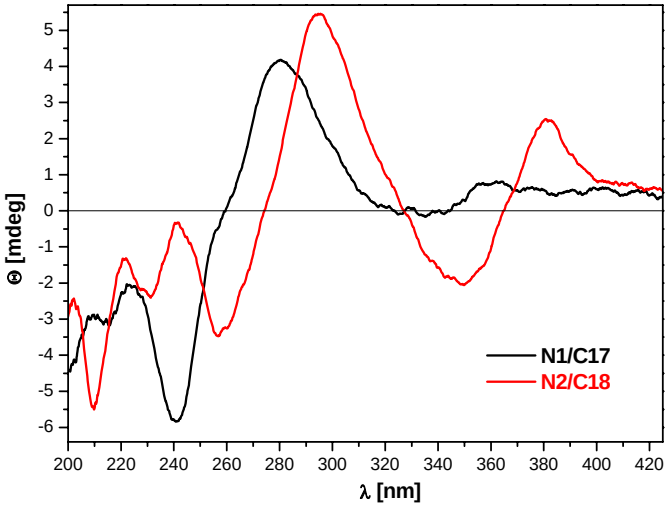


Abbildung 5-9: CD-Spektrum von 2.5 µM Duplex in 5.5 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.

Dieses ausgeprägte Signal deutet auf eine rechtshelikale Anordnung der Pyrenchromophore hin. Auch die Bande der B-DNA-Struktur mit ihrem stark positiven *Cotton*-Effekt wird durch

den Chromophorstapel in **N2/C18** beeinflusst. Ihr Signal wird im Vergleich zu **N1/C17** stärker und das Maximum verschiebt sich von 280 zu 300 nm. Im Wellenlängenbereich von 200-260 nm wird durch den Vergleich von **N1/C17** mit **N2/C18** ebenfalls die Veränderung im Bereich der Pyreneinheiten durch ihre Einbindung in eine geordnete Struktur sichtbar. Im Bereich der kurzwelligen Pyrenabsorption ($\lambda < 260$ nm) zeigen sich verschiedene Auswirkungen wie Verschiebungen der Extrema und eine Umkehr der Vorzeichen von *Cotton*-Effekten.
Somit weisen die Strukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie auf eine geordnete, helikale Anordnung der fünf PydU-Chromophore hin. Die PydU-Einheiten haben sich so orientiert, dass ihre Pyreneinheiten über Stapelung in starke elektronische Wechselwirkung treten können und sich durch die Ausbildung von Watson-Crick-Paarungen ihrer Uridin-Einheiten mit dem Komplementärstrang entlang der DNA-Helix ausrichten und diese stützen. Dies bewirkt eine ebenfalls rechtsgängig helikale Anordnung der Chromophore.

5.3.2.4 Temperaturabhängige Messungen

Die helikale Anordnung der PydU-Chromophore hängt von der Intaktheit der tragenden Duplex-Architektur ab, d. h. eine Störung der B-DNA-Helix führt zu veränderten elektronischen Interaktionen der Fluorophore und somit zu anderen optischen Eigenschaften. Dies lässt sich anhand temperaturabhängiger Messungen eindeutig zeigen.

In der Absorption von **N2/C18** ist bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt ($T > 50°C$) eine Verschiebung im Maximum der Pyrenabsorption von 360 nm zu 350 nm zu beobachten. Dies deckt sich mit den Absorptionswerten des Einzelstrangs ($\lambda_{max} \approx 350$ nm). Die Struktur der Pyrenbande liefert Anhaltspunkte dafür, dass im Duplex Grundzustandswechselwirkungen zwischen den fünf Chromophoren bestehen, die Absorptionsbanden bei über 360 nm liefern. Diese Interaktionen werden durch die Dehybridisierung des Duplexes zerstört, und die Absorption verändert sich entsprechend. Das Auftreten eines isosbestischen Punktes bei 356 nm weist dabei auf einen Übergang zwischen zwei Konformationen in der Nähe des Schmelzpunktes hin.

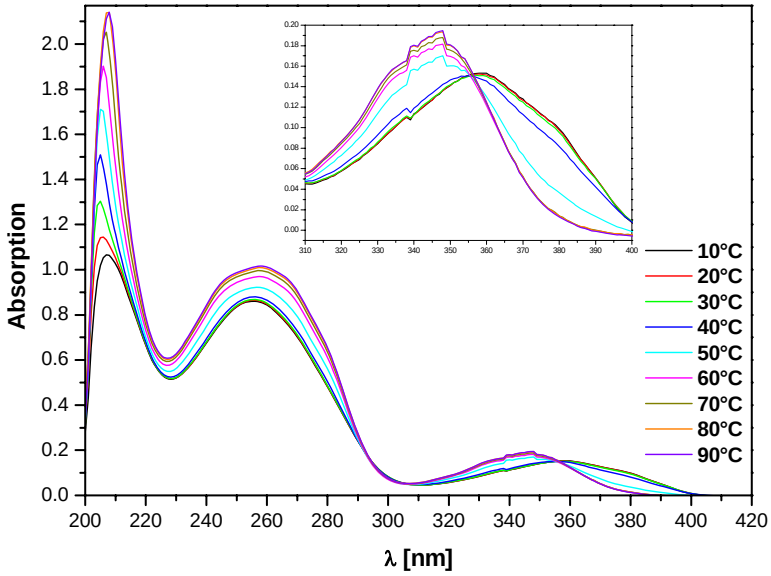


Abbildung 5-10: Temperaturabhängige Absorptionsspektren von 2.5 µM Duplex **N2/C18** in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl. Der Einschub zeigt eine Vergrößerung des Bereichs der Pyrenabsorption.

Das CD-Spektrum zeigt bei hohen Temperaturen das Verschwinden des excitonischen Signals der Pyrene zwischen 320 und 400 nm. Es ist kein Nulldurchgang mehr bei 370 nm zu beobachten, und es verbleibt nurmehr ein negatives Extremum bei 350 nm.

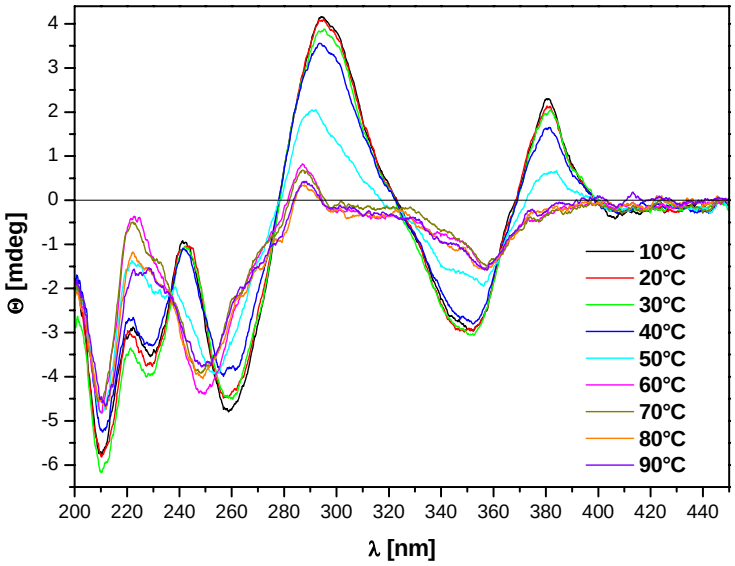


Abbildung 5-11: Temperaturabhängige CD-Spektren von 2.5 µM Duplex **N2/C18** in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl.

In den temperaturabhängigen Emissionsspektren erkennt man die Veränderung der optischen Eigenschaften von **N2/C18** bei über 50°C ebenfalls. Es sind sowohl ein starker Rückgang in der Fluoreszenz als auch eine Verschiebung des Maximums von 445 nm zu 480 nm zu beobachten. Hierbei findet keine langsame Veränderung in den elektronischen Gegebenheiten

über viele Zwischenzustände statt, es kommt in einem Schritt zu einer neuen elektronischen Struktur. Das legt auch der isosbestische Punkt im Absorptionsspektrum nahe.

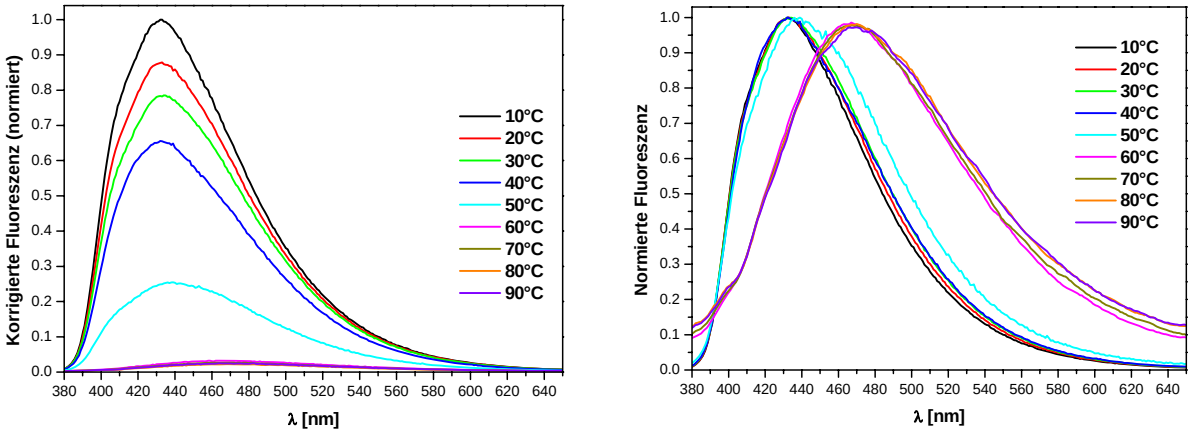


Abbildung 5-12: Temperaturabhängige Emissionsspektren (λ_{exc}=360 nm) von 2.5 µM Duplex **N2/C18** in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl (*links:*absorptionskorrigiert, *rechts:*normiert).

Mit der Dehybridisierung des DNA-Gerüstes bricht die Helixstruktur der PydU-Einheiten zusammen. Diese Kopplung der Anordnung der Chromophore mit dem Vorhandensein der intakten Duplex-Struktur erkennt man darin, dass die spektroskopischen Eigenschaften bei Temperaturen bis 40°C fast unverändert bleiben, sich bei 50°C deutlich verändern und ab 60°C erneut ungefähr gleich bleiben. Beim Zerstören der Sekundärstruktur des Chromophorstapels scheint es sich also wie bei der Dehybridisierung der DNA um einen hochgradig kooperativen Prozess zu handeln.

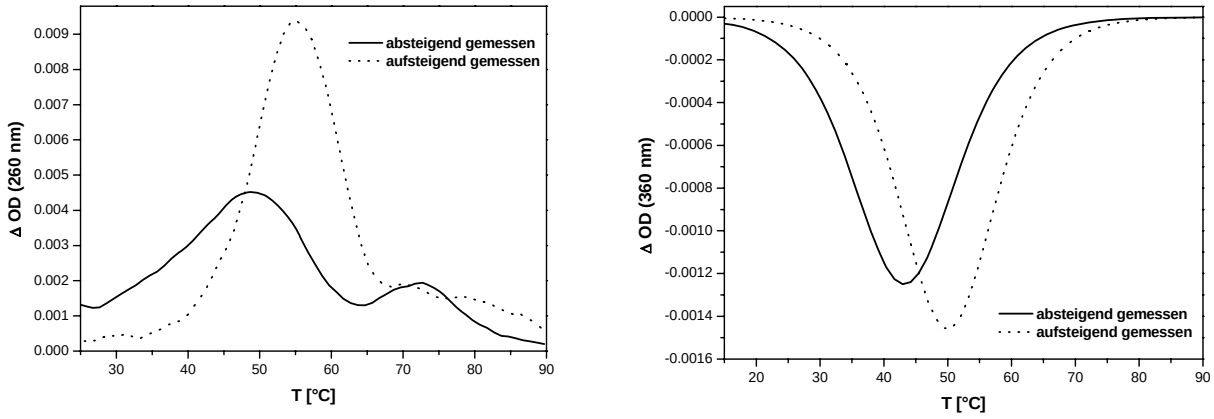


Abbildung 5-13: Schmelzpunkte von 2.5 µM Duplex **N2/C18** in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei unterschiedlicher Absorptionswellenlänge (*links*: DNA-Absorption, *rechts*: Pyrenabsorption).

Vergleiche der Schmelzkurven bei 260 nm und 360 nm bestätigen diese Interpretation. Bemerkenswert dabei ist, dass die Kurve bei der DNA-Absorptionswellenlänge den bekannten Hyperchromizitätseffekt mit einem Anstieg der Absorption in den Einzelsträngen gegenüber dem Duplex aufweist, während die Kurve bei der Pyrenabsorptionswellenlänge einen Hy-

pochromizitätseffekt mit einem Minimum in der Ableitung zeigt. Die beiden erhaltenen Schmelztemperaturen sind ähnlich (vgl. Abschnitt 7.6.4). Die Schmelztemperatur im Bereich der Chromophorabsorption liegt ca. 6°C unter der des DNA-Gerüstes, was belegt, dass der PydU-Stapel niedrigerer Temperatur dehybridisiert wird als der übrige DNA-Basenstapel.

5.4 Fünffach-PydU- und PtzdU-modifizierte Oligonukleotide

5.4.1 Hintergrund und Design

Für eine potentielle Anwendung in der Biosensorik reicht es nicht allein aus, über einen struktursensitiven und fluoreszenzverstärkten Chromophorstapel zu verfügen, vielmehr benötigt man einen modulierbaren Multichromophor, das vielfältige Einsatzmöglichkeiten als Hybridisierungssonde bietet. In dieser Arbeit wird versucht, die Eigenschaften des Pyren-Multichromophors durch den Einbau zweier verschiedener modifizierter Nukleotide zu variieren. Derartige heterogene Multichromophor-Systeme sollten ähnlich wie im Fall des fünffachen PydU-Stapels in **N2/C18** als supramolekulare Architektur im Duplex andere elektronische Eigenschaften besitzen als die einzelnen eingesetzten Chromophorbausteine.

In diesem Fall werden alternierend PydU- und PtzdU-Einheiten nebeneinander in einen DNA-Strang eingebaut, so dass hier insgesamt ebenfalls fünf Chromophoreinheiten benachbart sind. Mit einer symmetrischen Anordnung ergeben sich zwei Sequenzen, im Fall von **N3** stehen zwei PtzdU-Nukleotide mit den Nachbarbasen in Wechselwirkung, bei **N4** zwei PydU-Nukleotide.

N3	3'-ACG-TGC-A**ZX**-**ZXZ**-ACG-TGC-A-5'	**X**=PydU, **Z**=PtzdU
C18	5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'	
N4	3'-ACG-TGC-A**XZ**-**XZX**-ACG-TGC-A-5'	
C18	5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'	

Wie bei Duplex **N2/C18** sind für den fünf PtzdU-tragenden Duplex die spektroskopischen Eigenschaften aus anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe bekannt. Auch hier ordnen sich die

Phenothiazin-modifizierten Nukleotide helikal an, treten in starke elektronische Wechselwirkung und rufen eine veränderte optische Eigenschaften hervor.

5.4.2 Spektroskopische Untersuchung der fünffach-modifizierten Duplexe

5.4.2.1 Absorption, CD und Schmelzpunkte

Die Höhe der Absorption zwischen 300 und 400 nm von **N3/C18** und **N4/C18** wird bestimmt durch die Anzahl der PydU-Einheiten. Die Absorption der PtzdU-Nukleotide (270-300 nm) liegt unter der DNA-Bande. Es tritt keine Grundzustandswechselwirkung bei Wellenlängen > 360 nm wie bei **N2/C18** auf. Somit entsprechen die Absorptionsspektren der Duplexe **N3/C18** und **N4/C18** den Erwartungen und gleichen denen von **N1/C17** und **N2/C18**.

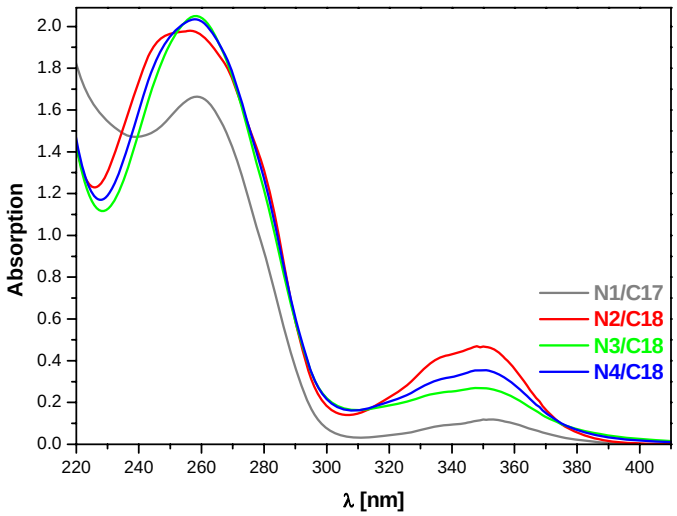


Abbildung 5-14: Absorption von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Der Vergleich der CD-Spektren von **N3/C18** und **N4/C18** mit **N2/C18** und **N1/C17** lässt die strukturellen Besonderheiten der einzelnen Duplexe sehr gut erkennen. Bei Duplex **N4/C18**, der drei Pyrenchromophore trägt, wird das im Duplex **N2/C18** sichtbare excitonische Signal zwischen 330 und 400 nm für den helikal geordneten PydU-Stapel deutlich kleiner, und es verbleibt ein schwacher negativer *Cotton*-Effekt mit einem Extremum bei 332 nm. Bei 290 nm erkennt man das positive Signal der B-DNA, allerdings ist es schwächer als in **N2/C18** und erscheint leicht verschoben.

In Duplex **N3/C18** dominieren die Eigenschaften des Ptz-Chromophors. Man erhält ein ausgeprägtes positives Maximum bei 365 nm, das darauf hinweist, dass die übergeordnete Struktur der PtzdU-Einheiten durch den Einbau von PydU sehr wenig gestört wird.

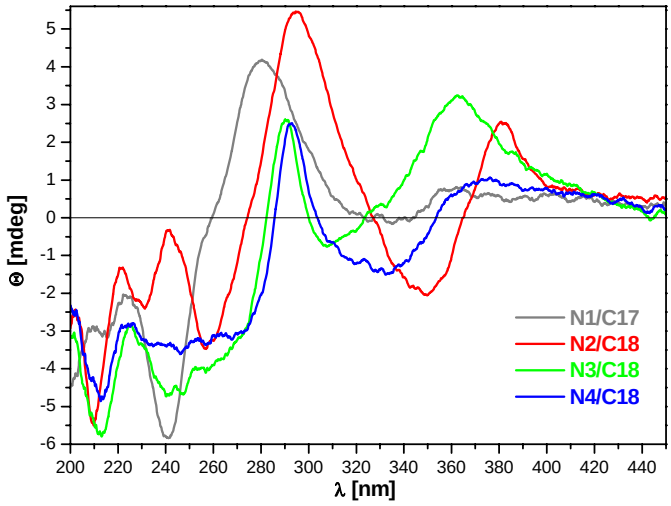


Abbildung 5-15: CD-Spektrum in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl von 2.5 µM (**N1/C17**, **N2/C18**) bzw. 5 µM (**N3/C18**, **N4/C18**) DNA .

In beiden Spektren treten im Bereich der kurzwelligen Pyrenabsorptionsbanden zwischen 200 und 260 nm im Vergleich zu **N2/C18** Veränderungen auf, die das Spektrum dem einfach PydU modifizierten Duplex **N1/C17** ähnlicher machen.

Durch die symmetrische Anordnung der beiden unterschiedlichen Chromophore erhält man Duplexe, die ebenso wie die homogen gelabelten Doppelstränge eine geordnete Struktur entlang des DNA-Rückgrates einnehmen. Diese ist jedoch von der des PydU-Stapels in **N2/C18** verschieden und orientiert sich weitaus weniger an der B-DNA-Struktur, wie das schwächere CD-Signal bei 260 nm zeigt. **N3/C18** und **N4/C18** reagieren deshalb vermutlich weniger empfindlich auf Strukturstörungen als **N2/C18**. Durch diese neue Anordnung der Chromophore in **N3/C18** und **N4/C18** sind zudem andere elektronische Wechselwirkungen der PydU-Einheiten als im Homolabel zu erwarten.

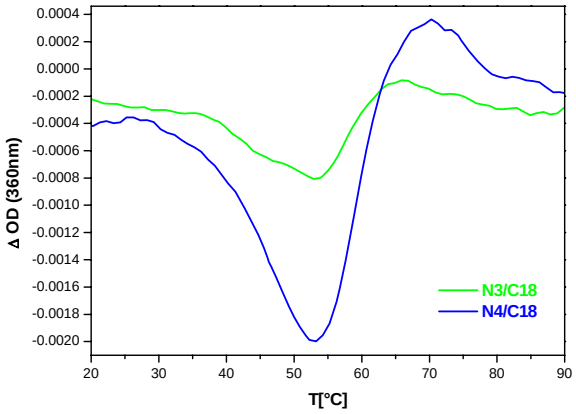


Abbildung 5-16: Schmelzpunkte von 5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl bei 360 nm.

Die erhaltenen Schmelzpunkte bei 260 nm weisen auf eine geringe Destabilisierung der Hybridisierung in **N3/C18** und **N4/C18** hin (s. Abschnitt 7.6.4).

5.4.2.2 Fluoreszenzeigenschaften

Die auffälligste Änderung in den spektroskopischen Eigenschaften der Duplexe **N3/C18** und **N4/C18** ist die fast vollständige Löschung der Fluoreszenz. **N4/C18** besitzt weniger als 2 % der Fluoreszenz von **N2/C18**, **N3/C18** weniger als 1 %. Der Quantenausbeute nimmt mit steigender Zahl an PtzdU-Einheiten ab.

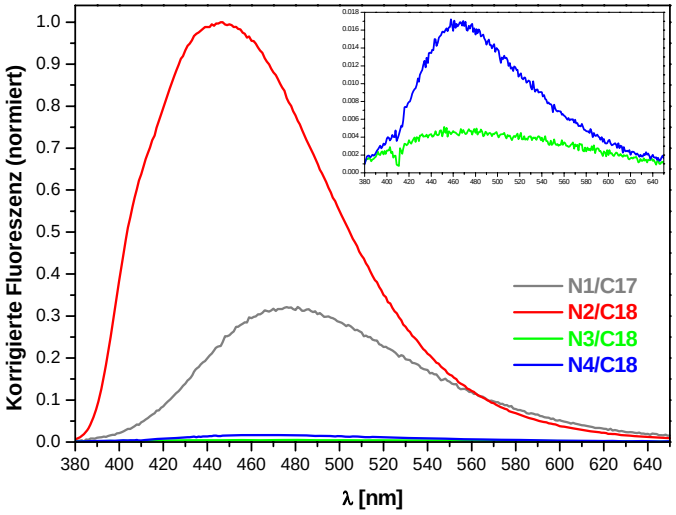


Abbildung 5-17: Absorptionskorrigierte Emissionsspektren von 5 µM DNA (λ_{exc}=360 nm) in 10 mM NaP_i (pH 7). Der Einschub zeigt eine Vergrößerung des Spektrums.

Ein Grund dafür liegt zum einen in der elektronischen Entkopplung der PydU-Nukleotide untereinander, wodurch keine Fluoreszenzverstärkung auftritt. Zum anderen löscht die Anwesenheit von PtzdU die Fluoreszenz der benachbarten PydU-Chromophore sehr effektiv, was vermutlich auf Elektronentransferprozesse zurückzuführen ist. Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass der Löscheffekt von PtzdU als Nachbarbase deutlich stärker ist als von den unmodifizierten DNA-Basen. Wäre das nämlich der Fall, müsste **N3/C18** eine höhere korrigierte Fluoreszenz zeigen als **N4/C18**. PtzdU selbst fluoresziert im Gegensatz zu PydU kaum und leistet keinen nennenswerten Beitrag zur Emission. Eine Verschiebung des Emissionsmaximums in **N4/C18** zu höheren Wellenlängen (468 nm) im Vergleich zu **N2/C18** (445 nm) belegt die energetische Veränderung der beteiligten Zustände. Bei **N3/C18** ist eine Aussage wegen der niedrigen absoluten Fluoreszenz nicht möglich.

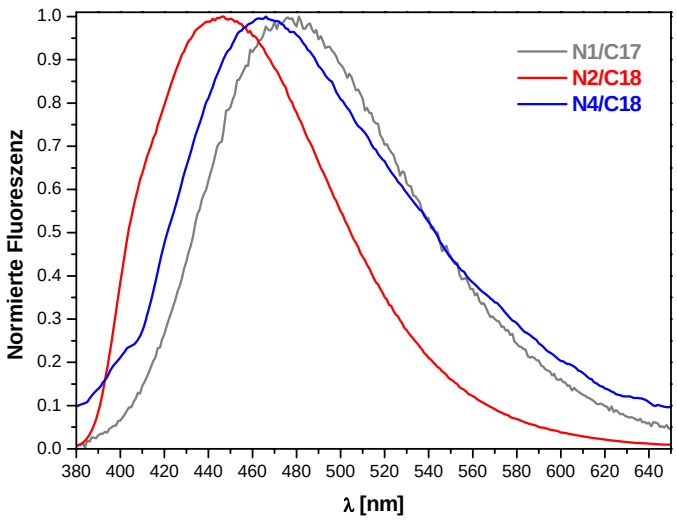


Abbildung 5-18: Normierte Emissionsspektren von 5 µM DNA (λ_{exc}=360 nm) in 10 mM NaP_i (pH 7). **N3/C18** fehlt aufgrund der äußerst geringen Fluoreszenzintensität.

Die Daten der gemessenen Anregungsspektren decken sich mit den Informationen aus den Absorptionsspektren und zeigen keine signifikanten Veränderungen im Anregungsprofil. Wie die Absorption so ist auch die Emission bestimmt durch die nicht miteinander in Wechselwirkung stehenden Pyrenchromophore.

5.5 Mismatch-*Duplexe fünffach-modifizierter Oligonukleotide*

5.5.1 Hintergrund und Design

Ein ideales, für die diagnostische Anwendung geeignetes Mehrfach-Fluoreszenzlabel reagiert auf Veränderungen der Basenumgebung mit einer Veränderung seiner Fluoreszenzeigenschaften. Wie sich durch die Integration von PtzdU in einen PydU-Multichromophor gezeigt hat, führt der Einbau von PtzdU zu einer Neuanordnung der Chromophore und bewirkt eine Rotverschiebung und Löschung der Fluoreszenz des Pyrens. Es wird erwartet, dass geringe Strukturstörungen, die typischerweise mit Basenfehlpaarungen einhergehen, einen Effekt auf die spektroskopischen Eigenschaften von **N2, N3** oder **N4** haben. Ist dies der Fall, besitzt man mit dem fünffach-PydU-Chromophor eine Fluoreszenzsonde, die zur Detektion von Fehlstellen in der DNA genutzt werden kann.

C19 3'-TGC-ACG-T**AA-GAA**-TGC-ACG-T-5'

C20 3'-TGC-ACG-T**AG-AGA**-TGC-ACG-T-5'

C21 3'-TGC-ACG-T**GG-GGG**-TGC-ACG-T-5'

Um weitere Informationen über den Einfluss der Struktur auf die Wechselwirkung der Chromophore untereinander zu bekommen, werden die fünffach-modifizierten Einzelstränge ***ss*N2**, ***ss*N3** und ***ss*N4** mit Gegensträngen (**C19-20**) hybridisiert, die im Bereich der fünf nebeneinander liegenden Chromophore zu einer, zwei und fünf Basenfehlpaarungen führen. Zu diesem Zweck wurde die entsprechende Gegenbase zu der Uridin-Einheit des modifizierten Nukleotids, also Adenin, durch das sterisch ähnliche Guanin ausgetauscht. Eine Watson-Crick-Basenpaarung ist nun zwischen PydU bzw. PtzdU und dG nicht mehr möglich. Ein Vergleich dieser fehlgepaarten Duplexe mit den Duplexen **N2/C18**, **N3/C18** und **N4/C18** liefert weitere Erkenntnisse zum Verständnis der fünffach-modifizierten Duplexe.

5.5.2 Spektroskopische Untersuchung des Ladungstransfers

Aus den Absorptions- und CD-Spektren, sowie den Fluoreszenzspektren ergibt sich folgendes Bild: Das Auftreten einer Basenfehlpaarung in den Duplexen **N2/C19**, **N4/C19** und **N3/C19** lässt die spektroskopischen Eigenschaften im Vergleich zu den *match*-Duplexen **N2/C18**, **N4/C18** und **N3/C18** praktisch unverändert. Lediglich die Fluoreszenz nimmt bei **N2/C19** um mehr als 50 % gegenüber **N2/C18** ab. Eine Diskussion der Fluoreszenzänderung zwischen den fehlgepaarten Duplexen **N4/C19** und **N3/C19** im Vergleich zu den regulären Duplexen **N4/C18** und **N3/C18** ist aufgrund der geringen Fluoreszenzintensitäten nicht möglich.

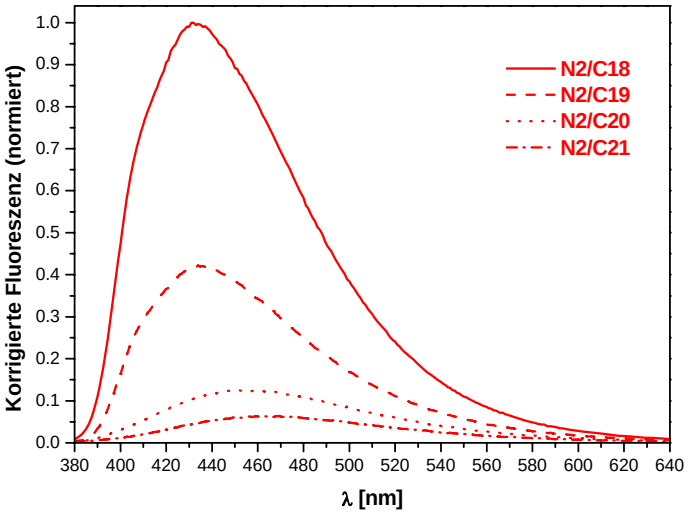


Abbildung 5-19: Absorptionskorrigierte Emissionsspektren von 2.5 µM DNA (λ_{exc}=360nm) in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl .

Eine weitere Zunahme der Basenfehlpaarungen wirkt sich bei den Duplexen **N2/C20** und **N2/C21** sehr deutlich aus. In der Absorption zeigen **N4/C20**, **N4/C21**, **N3/C20** und **N3/C21** keine Veränderung gegenüber dem jeweiligen *match*-Duplex. **N2/C20** und **N2/C21** hingegen gleichen nun sowohl in der Form der Absorptionsbande im Pyrenbereich als auch in der Lage des Maximums (350 nm statt 360 nm) den inhomogen modifizierten Duplexen von **N4** und **N3**. Der Anteil an der Absorption bei Wellenlängen > 360 nm, der einer Grundzustandswechselwirkung der PydU-Einheiten zugerechnet wurde, fehlt nun.

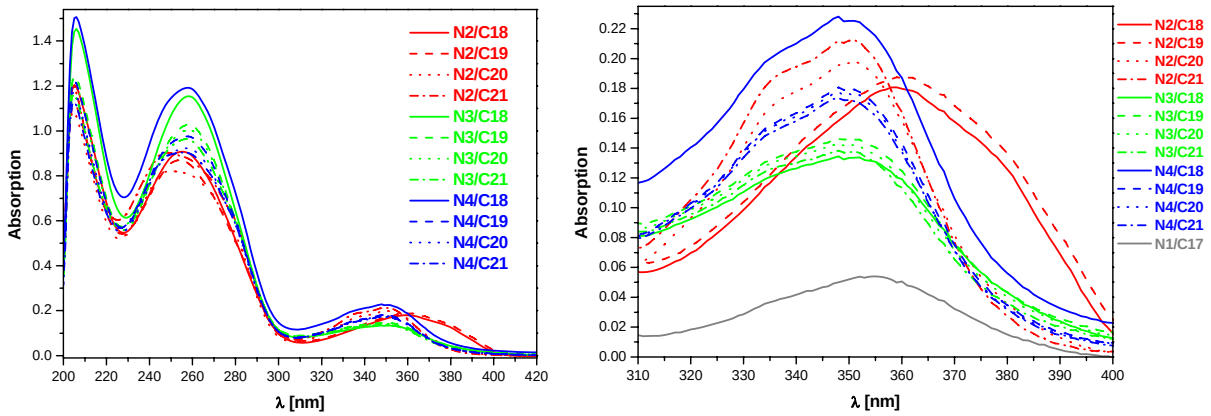


Abbildung 5-20: Absorptionsspektren von 2.5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl . *rechts*: Vergrößerung des Bereichs der Pyrenabsorption.

Die dramatische Veränderung im absorptiven Verhalten von **N2/C18** und **N2/C19** zu **N2/C20** und **N2/C21** ist ebenfalls in den CD-Spektren wieder zu finden. Das ausgeprägte excitonische Signal zwischen 275-400 nm mit einem Nulldurchgang bei 370 nm ist in **N2/C20** und **N2/C21** nicht mehr vorhanden. Gleichzeitig verliert das Signal der B-DNA-Helix etwa ein Drittel an Intensität und wandert im Maximum von 300 nm zu 290 nm. Somit ähnelt der Verlauf der CD-Kurve von **N2/C20** und **N2/C21** den Duplexen von **N4** und **N3** im Wellenlängenbereich > 260 nm bzw. von **N1/C17** im Bereich von 200-300 nm.

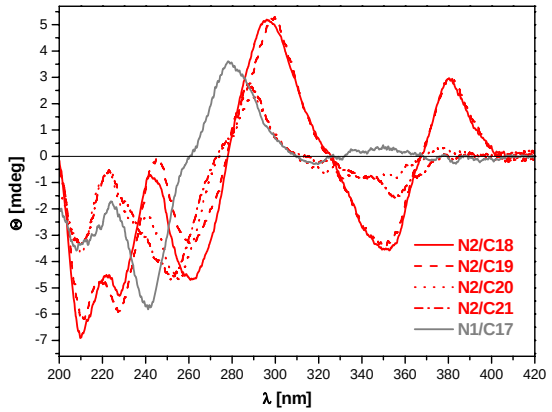
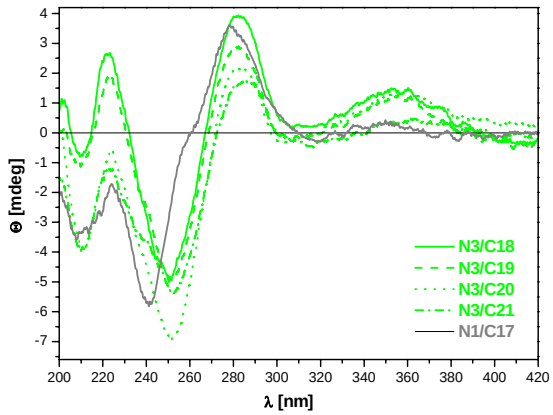
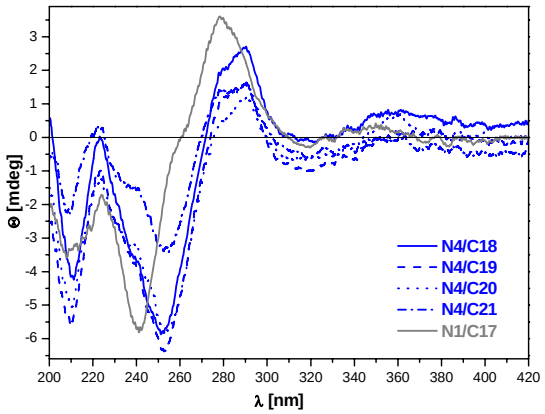


Abbildung 5-21: CD-Spektren von 2.5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7) und 250 mM NaCl .





Die Basenfehlpaarungen scheinen eine deutliche Strukturstörung im PydU-Stapel hervorzurufen. Die Duplexe von **N3** und **N4** reagieren wegen der durch die PtzdU-Einheiten ohnehin unterbrochenen elektronischen Kopplung der PydU-Nukleotide ohne große Veränderungen auf Fehlpaarungen, während die Duplexe von **N2**, in denen die PydU-Chromophore stark elektronisch gekoppelt sind, sehr sensibel darauf ansprechen. Der Duplex **N2/C19** verhält sich **N2/C18** noch relativ ähnlich, der Grund dafür liegt in der relativ kleinen Störung des PydU-Stapels, die zudem in der Mitte der Sequenz liegt.

Bei **N4** und **N3** nimmt der kooperative Effekt bei der Dehybridisierung mit zunehmender Zahl an Fehlpaarungen ab. Eine Basenfehlpaarung hat keinen großen Einfluss auf die Stabilität. Das ist ein weiterer Hinweis auf die weitaus weniger von der B-DNA-Struktur abhängige Ordnung des Chromophorstapels in den PydU- und PtzdU-Einheiten tragenden Duplexen.

5.5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Ansatz zur Entwicklung neuer DNA-basierter Fluoreszenzsonden besteht in der Darstellung mehrfach modifizierter Oligonukleotide. An einem zweifach modifizierten Oligonukleotid wurde geprüft, ob sich ein System aus zwei sich gegenüberliegenden PydU-Nukleotiden als Hybridisierungssonde eignet. Dies ist nicht der Fall, da sich die spektroskopischen Eigenschaften von ***hp*H**, ***ss*H** und **H/C16** nicht ausreichend unterscheiden.

Der Einbau von fünf PydU-Nukeotiden in **N2/C18** führt zu einer hochgradig geordneten Anordnung der Pyrenreste der modifizierten Nukleotide. Dabei lagern sich die aromatischen Gruppen entlang des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats helikal übereinander an und treten in starke elektronische Kopplung. Dies führt zu einer Blauverschiebung und Verstärkung der Fluoreszenz. Die inneren PydU-Nukleotide werden von der Basenumgebung und somit von Fluoreszenzlöschung durch Elektronentransfer in den Basenstapel abgeschirmt. Temperaturabhängige Messungen zeigen eindeutig die Abhängigkeit der Chromophoranordnung von der Integrität der helikalen Duplexarchitektur. Diese Eigenschaften machen die fünffach-PydU-modifizierten Oligonukleotide zu einer struktursensitiven Fluoreszenzsonde, die die Hybridisierung zu einem Duplex durch einen Anstieg der Fluoreszenz bei gleichzeitiger Blauver-

schiebung des Maximums der Emission anzeigt. Im Fall der fünffach markierten DNA **N2/C18** kann somit von einem Multichromophor gesprochen werden.

Die Eigenschaften des fünffach-PydU-Chromophors sollen durch den Einbau von PtzdU-Einheiten moduliert werden. Der Aufbau gemischter Chromophorstapel aus PydU- und PtzdU-Einheiten führt zu einer elektronischen Entkopplung der PydU-Chromophore. Die hochgeordnete helikale Architektur in **N2/C18** wird durch eine andere Anordnung ersetzt. Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften werden in **N4/C18** und **N3/C18** vom PydU-Nukleotid bestimmt.

Die spektroskopische Untersuchung von fehlgepaarten Duplexen der fünffach-modifizierten Oligonukleotide zeigt erneut die hohe Abhängigkeit der PydU-Struktur im Duplex **N2/C18** von der Intaktheit der Watson-Crick-Basenpaarungen zwischen den Nukleobasen. Die Einführung mehrerer Fehlpaarungen erzeugt eine gestörte Struktur. Die Chromophoranordnung in **N3** und **N4** reagiert weitaus weniger sensibel auf die Störung der Duplexstruktur, wie die geringfügigen Änderungen in den Spektren zeigen. Hier erscheint es als wahrscheinlich, dass bereits in den korrekt gepaarten Duplexen **N3/C18** und **N4/C18** die modifizierten Nukleobasen keine regulären Wasserstoffbrücken mit dem jeweiligen Gegenstrang ausbilden. Das könnte z. B. der Fall sein, wenn die Phenothiazin- und Pyrenreste zumindest teilweise in den Basenstapel hineinragen.

Das Ziel weiterer Forschung wird es sein, Multichromophorstapel modulierbar zu machen. Das Potential als struktursensitive Fluoreszenzsonde ist in jedem Fall vorhanden. Dazu müssen noch weitere Fragen, hauptsächlich hinsichtlich der Struktur geklärt werden. Ein Ansatz, der direkt an diese Experimente anschließt, besteht darin, asymmetrisch Basenfehlpaarungen im Gegenstrang einzuführen und deren Lage und Art zu variieren. Einen weiteren Ausgangspunkt stellen die Auswirkungen von *abasic sites* an unterschiedlichen Positionen im Gegenstrang in der Nähe des Chromophorstapels dar: Das Fehlen einer Gegenbase könnte zu einer Umorientierung der modifizierten Nukleotide oder der Ausbildung einer neuen Struktur zwischen den aromatischen Resten der modifizierten Nukleotide und dem DNA-Basenstapel führen. Derartige weitere Versuche werden das Verständnis dieser DNA-Strukturen erweitern und sie möglicherweise Anwendung in der Nanobiotechnologie und Diagnostik finden lassen.

5.6 Py*ind*C-modifizierte DNA-Oligonukleotide

5.6.1 Hintergrund

Die Anknüpfung eines Pyrens als Chromophor an eine Nukleobase hat sich als interessantes Mittel zur Synthese modifizierter Oligonukleotide herausgestellt. Diese DNA besitzt spektroskopische Eigenschaften, die sich u. a. in der Bioanalytik nutzen lassen. Die Detektion von Strukturänderungen der DNA spielt eine wichtige Rolle bei der Identifizierung von DNA-Schädigungen oder bei der Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen. Da diese konformativen Veränderungen sehr unterschiedlich aussehen können und unter sehr verschiedenen Bedingungen festgestellt werden müssen, ist die Entwicklung weiterer photoaktiver DNA-Hybridisierungssonden mit unterschiedlichen Eigenschaften von großer Bedeutung.

Die Einführung des über eine Alkinylbrücke kovalent gebundenen Pyrens (Py*in*) an eine Nukleobase bietet gegenüber dem einfach angeknüpften Aromaten einige Vorteile. Die Py*in*-Gruppe lässt sich wie der Py-Chromophor Palladium-katalysiert an ein halogeniertes Nukleosid kuppeln. Statt einer Suzuki-Miyaura-Kupplung wird hier eine Sonogashira-Reaktion durchgeführt, die sich sogar an der festen Phase während der DNA-Synthese durchführen lässt. Durch die kommerziell erhältlichen halogenierten Phosphoramidite aller vier nativen Nukleobasen besteht der Zugang zu den modifizierten Nukleotiden Py*ind*A, Py*ind*G, Py*ind*U und Py*ind*C ohne den Umweg über eine komplexe Synthese des Py*in*-Phosphoramidits als DNA-Synthesebaustein. So lassen sich einfach und schnell beliebige Positionen einer Oligonukleotid-Sequenz modifizieren.
Die rigidere Struktur des Py*in*-Chromophors führt im Vergleich zu der Py-Gruppe zu veränderten Eigenschaften des modifizierten Nukleotids. Über die Alkinylbrücke sind die Nukleobase und das Pyren (anders als in den pyrenmodifizierten Nukleotiden) stark elektronisch gekoppelt. Das verändert die Fluoreszenzeigenschaften dieser Nukleotide in der DNA. Die starre Dreifachbindung bewirkt eine deutliche räumliche Trennung von Pyreneinheit und Basenstapel trotz elektronischer Kopplung.

Um die spektroskopischen Eigenschaften des Py*in*-Chromophors in DNA zu untersuchen, wurden in der Arbeitsgruppe Oligonukleotide mit den Nukleotiden Py*ind*A, Py*ind*G, Py*ind*U und Py*ind*C synthetisiert und spektroskopisch untersucht.[23, 33, 34] Die Ergebnisse dieses Pro-

jekts sind in mehreren Publikationen veröffentlicht. Im Rahmen dieser Arbeit werden zum einen die Ergebnisse der eigenen spektroskopischen Untersuchungen der Py*ind*C-Duplexe **S1-S6** präsentiert und zum anderen deren potentielle Anwendungen diskutiert.

Duplex **S1**	3'-CAG-TCA-GT**A**-**Y**A**T**-GAC-TGA-C-5'	**Y** = Py*ind*C
	5'-GTC-AGT-CA**T**-**I**T**A**-CTG-ACT-G-3'	**I** = dI
Duplex **S2**	3'-CAG-TCA-GT**G**-**Y**G**T**-GAC-TGA-C-5'	
	5'-GTC-AGT-CA**C**-**I**C**A**-CTG-ACT-G-3'	
Duplex **S3**	3'-GTC-AGT-CA**C**-**Y**C**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**G**-**I**G**T**-GAC-TGA-C-3'	
Duplex **S4**	3'-GTC-AGT-CA**T**-**Y**C**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**A**-**I**G**T**-GAC-TGA-C-3'	
Duplex **S5**	3'-GTC-AGT-CA**C**-**Y**T**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**G**-**I**A**T**-GAC-TGA-C-3'	
Duplex **S6**	3'-GTC-AGT-CA**T**-**Y**T**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**A**-**I**A**T**-GAC-TGA-C-3'	

Bei den Oligonukleotidsequenzen **S1-S6** handelt es sich um statistische Basenfolgen. Das modifizierte Nukleotid befindet sich in der Mitte der Sequenz, um ihm eine vollständig ausgebildete Duplexumgebung zu bieten. Durch den Einbau unterschiedlicher Nachbarbasen kann deren Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften des Py*ind*C untersucht werden. Für Py*ind*C konnte bislang im Gegensatz zu PydU kein intramolekularer Elektronentransfer vom photoangeregten Pyren auf das Pyrimidin nachgewiesen werden.

Als Gegenbase des artifiziellen Nukleotids dient das Desoxyribonuklotid des Inosins (dI). Durch diese Substitution eines Guanosins soll eine eventuell stattfindende direkte Reduktion des Cytidinrestes (im angeregten Zustand) verhindert werden.

5.6.2 Sonogashira-Kupplung an der festen Phase

Die Sonogashira-Kupplung[266-271] ist ähnlich wie die Suzuki-Miyaura-Reaktion, eine Palladium katalysierte Kreuzkupplungsreaktion mit halogenierten Aromaten. Als aktive Spezies wird hier ein Kupferacetylid angenommen, das *in situ* aus der primären aromatischen Alkin-Verbindung und Cu(I)-Salzen unter basischen Bedingungen generiert wird. Der exakte Verlauf der Reaktion ist ungeklärt, man vermutet aber, dass sie nach dem üblichen Mechanismus Palladium katalysierter Kreuzkupplungen abläuft.

$$\text{R''-}\equiv\text{-H} \quad + \quad \text{CuX} \quad \xrightarrow[-\ R_3^* NH^+X^-]{+\ R_3^* N} \quad \text{R''-}\equiv\text{-Cu}$$

Abbildung 5-22: Bildung der aktiven Kupfer-Alkin-Spezies R´-M (typisch: X = I, R^* = Ethyl).

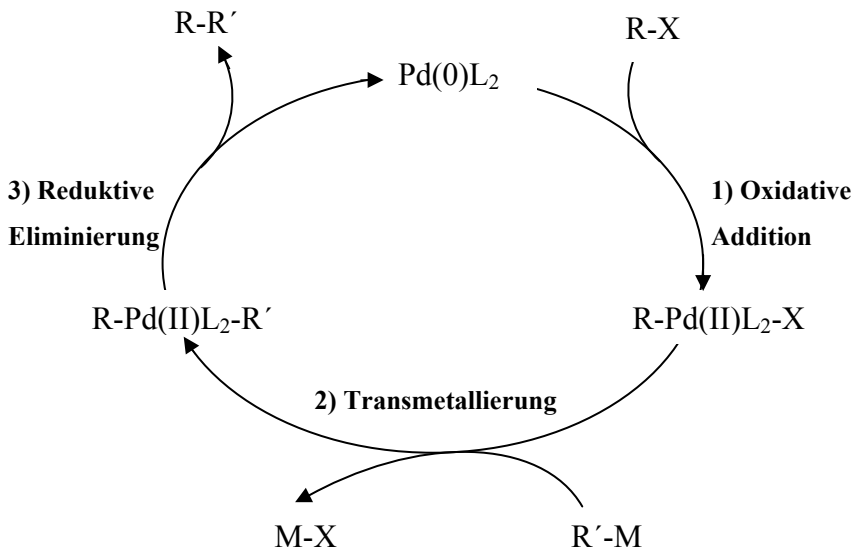


Abbildung 5-23: Typischer Katalysezyklus Palladium katalysierter Kreuzkupplungsreaktionen (X = Halogenid, L = Ligand (z. B. PPh_3))

Die Bedingungen der Sonogashira-Kupplung sind mit denen der DNA-Festphasensynthese kompatibel.[136] Die Reaktion mit bromierten und iodierten Derivaten der Phosphoramidite ist bei Raumtemperatur ausreichend schnell. Durch großzügiges Waschen des CPG können Überschüsse an Reagenzien und Salzen zuverlässig entfernt werden.

In der praktischen Durchführung wird das Oligonukleotid bis zu der Position mit dem halogenierten Baustein (hier: IdC) *trityl-on* synthetisiert. Das CPG wird aus dem Synthesizer entnommen und die Kupplung mit den unterschiedlichen Reagenzien durchgeführt. Die Reakti-

ons- und Waschlösungen werden dazu über Spritzen unter Lichtausschluss zugegeben. Nach erfolgter Kupplung wird das CPG wieder in den Synthesizer eingesetzt. Die automatische Synthese kann nun zu Ende geführt werden. Die Abspaltung und Aufarbeitung der Oligonukleotide erfolgt nach Standardprotokollen.

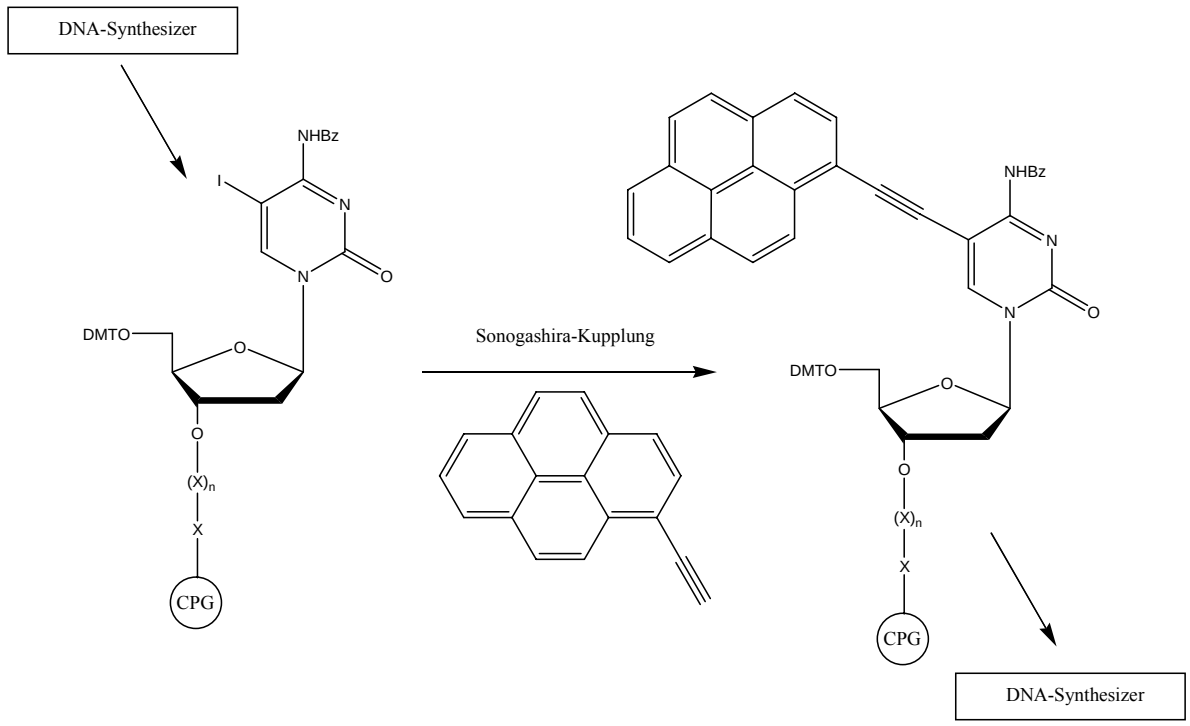


Abbildung 5-24: Schematische Darstellung der Synthese eines Py*ind*C-modifizierten Oligonukleotids (X = Nukleotid).

5.6.3 Spektroskopische Untersuchung Py*ind*C-modifizierter Oligonukleotide

5.6.3.1 Absorptions- und CD-Spektren

Die Messungen an den modifizierten Einzelsträngen erfolgen sowohl in Wasser als auch in DMSO um zu überprüfen, inwieweit bereits im Einzelstrang ungeordnete hydrophobe Wechselwirkungen vorhanden sind. DMSO ist in der Lage, die Interaktionen zwischen den Nukleobasen zu verhindern.

Der Vergleich der Absorptionsspektren der Einzelstränge in beiden Medien zeigt keinen signifikanten Unterschied. Im Bereich der Pyrenabsorption (300-400 nm) tritt ein breites strukturiertes Signal mit Maxima bei ca. 400 nm, 375 nm und 360 nm auf.

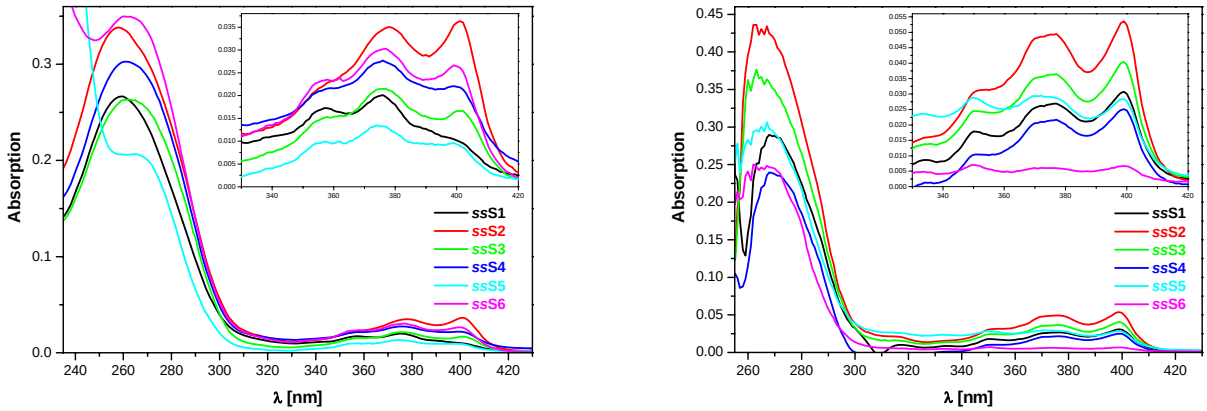


Abbildung 5-25: UV-Vis-Spektren von 1.25 µM Einzelstrang in 10 mM NaP_i (pH 7) (*links*) bzw. DMSO (*rechts*). Die Einschübe zeigen jeweils den Bereich der Pyrenabsorption vergrößert.

Die UV-Vis-Spektren der Duplexe **S1-S6** zeigen zwischen 310-410 nm eine markante Absorption. Im Vergleich mit den Duplexen der anderen Py*in*-modifizierten Nukleotide lassen sich diese Ergebnisse genauer interpretieren.

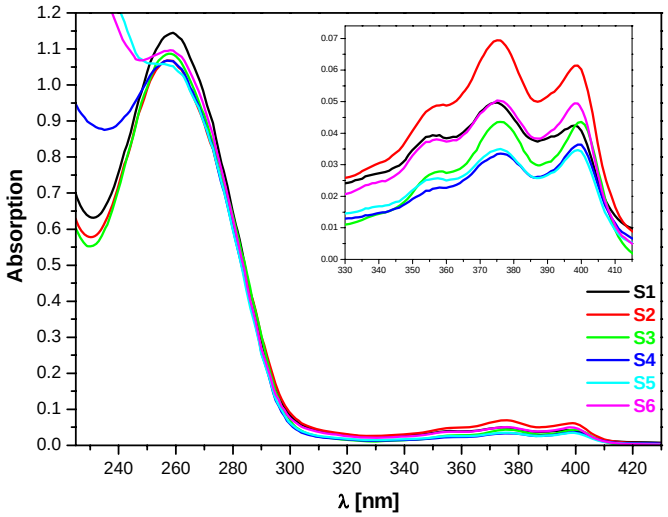


Abbildung 5-26: UV-Vis-Spektren von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7). Der Einschub zeigt den Bereich der Pyrenabsorption vergrößert.

Die Py*in*dC- und Py*in*dU-markierte Doppelstränge weisen Absorptionsmaxima bei 375 und 400 nm auf, Py*in*dG- und Py*in*dA-modifizierte Duplexe im Vergleich dazu bei 390 und 420 nm. Diese Banden bei 400 bzw. 420 nm lassen sich auf die strukturellen Unterschiede zwischen Py*in*-Pyrimidin- und Py*in*-Purin-Duplexe zurückführen. Wahrscheinlich liegen Py*in*dC und Py*in*dU in Oligonukleotiden in der *anti*-Konformation vor, während es sich bei Py*in*dG

und Py*ind*A um die *syn*-Konformation handelt. Die Absorptionsbande bei 400 bzw. 420 nm stammt von Grundzustandswechselwirkungen zwischen der Ethinylbrücke des Py*in*-Chromophors und der Nukleobase in 5'-Richtung. Somit reagiert diese Bande sehr empfindlich auf die Konformation des Nukleotids.

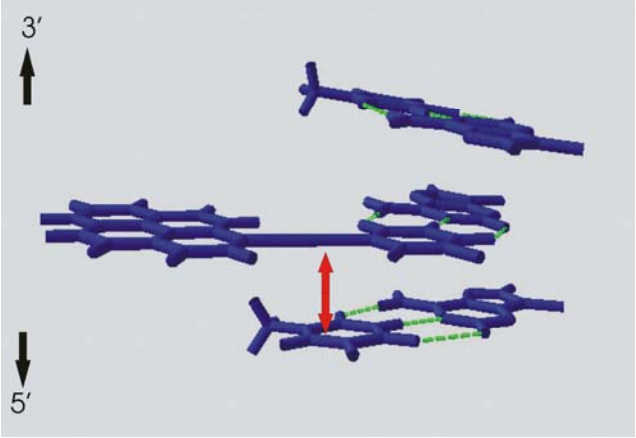


Abbildung 5-27: Schematische Darstellung der Grundzustandswechselwirkung zwischen dem Py*in*-Chromophor und der Nukleobase in 5´-Richtung in einem Py*ind*C-modifizierten Oligonukleotid.

Die CD-Spektren der Duplexe **S1-S6** verlaufen im Bereich >260 nm nahezu identisch. Im kurzwelligen Bereich unterscheiden sich die Spektren je nach Nachbarbasenumgebung.

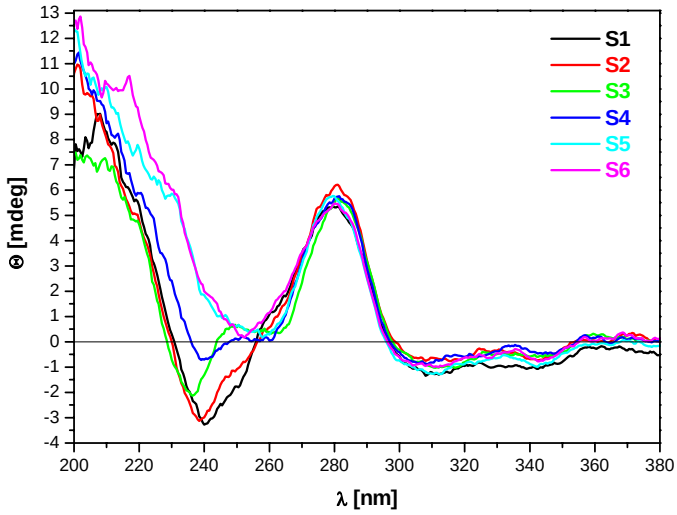


Abbildung 5-28: CD-Spektren von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Auffällig sind dabei zwei Effekte: Während die Duplexe **S1** und **S2** den typischen Verlauf für B-DNA aufweisen, besitzen die Duplexe **S5** und **S6** keinen Nulldurchgang und somit keinen negativen Signalanteil unter 260 nm Wellenlänge. Dieser Effekt wird offensichtlich durch das dT in 5'-Richtung von Py*ind*C hervorgerufen. **S3** und **S4** zeigen einen negativen Signalanteil, dieser enthält jedoch eine deutliche Schulter. Sie enthalten in 3'-Richtung ein dC. Diese Be-

obachtung deckt sich mit den CD-Spektren der PydU-Dupexen aus Abschnitt 3.1. Diese Analogie stützt die Vermutung, dass Py*ind*C, ähnlich wie PydU, eine asymmetrische Position im Basenstapel einnimmt und mit den Basen in verschiedenen Richtungen unterschiedlich stark interagiert (s. Abbildung 5-27).

Wie die Messungen des Schmelzpunktes bei 260 nm belegen (s. Abschnitt 7.6.6), sind die Oligonukletide **S1-S6** stabil und unterliegen keinen destabilisierenden Faktoren (vgl. leichte Destabilisierung mit PydU) durch den Einbau von Py*ind*C. Messungen der Schmelztemperatur bei 400 nm belegen, dass die lokale Hybridisierung der Py*ind*C-Struktur früher aufgebrochen wird (ΔT_m =15°C), da in diesem Bereich eine starke Strukturstörung vorliegt. Dies wird auch in Py*ind*U-, Py*ind*A- und Py*ind*G-modifizierten Duplexen beobachtet.

5.6.3.2 Emissionsspektren

Eine Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen (359 nm, 376 nm, 400 nm) ergibt Fluoreszenzspektren, deren Aussagen identisch sind. Deshalb werden exemplarisch die Spektren bei 376 nm Anregungswellenlänge dargestellt.

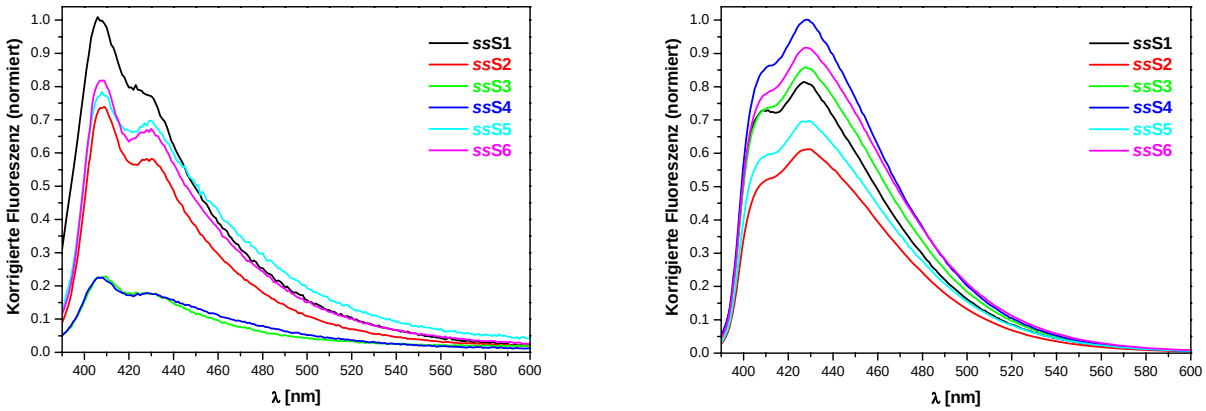


Abbildung 5-29: Absorptionskorrigierte Emissionsspektren (λ_{exc}= 376 nm) von 1.25 µM Einzelstrang in 10 mM NaP_i (pH 7) (*links*) bzw. DMSO (*rechts*).

Betrachtet man die Emissionsspektren der Einzelstränge in Puffer und DMSO, so erkennt man jeweils ein strukturiertes Spektrum mit zwei Emissionsmaxima bei rund 410 nm und 430 nm, was typisch für eine Pyrengruppe ist.

Im Vergleich werden die Unterschiede zwischen dem vollständig entkoppelten Einzelstrang in DMSO und den teilweise gekoppelten Elektronensystemen in Puffer ersichtlich. In DMSO sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Strängen kleiner als im wässrigen Medium.

Das deckt sich mit der Erwartung, dass bei vollständiger Entkopplung die Fluoreszenzintensität aller Stränge ähnlich sein sollte. Zudem ändert sich die relative Intensität von ***ss*S1-6** in DMSO im Vergleich mit der in Puffer. Auch das Verhältnis der beiden Fluoreszenzmaxima ist in DMSO umgekehrt.

Im Duplex befindet sich Py*ind*C in einer durch Wasserstoffbrücken wohl definierten Umgebung. Die erhaltenen Fluoreszenzspektren von **S1-S6** sind in ihrer Struktur den Einzelstrangspektren in Puffer ähnlich und deuten auf eine nur schwache elektronische Kopplung zwischen Pyrenrest und Nukleobase im Py*ind*C hin.

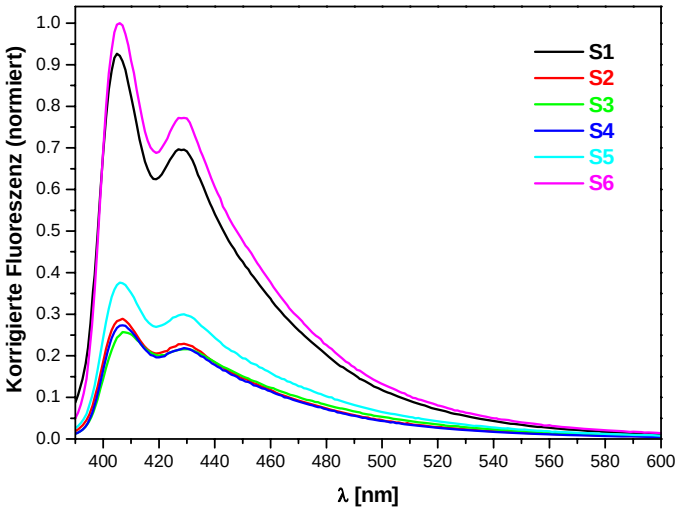


Abbildung 5-30: Absorptionskorrigierte Emissionsspektren (λ_{exc}= 376 nm) von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die höchste Fluoreszenz zeigen die Duplexe **S1** und **S6**. **S2**-**S4** fluoreszieren nur noch mit etwa 30 % der Intensität, **S5** mit ca. 40 %. In **S1** und **S6** ist Py*ind*C jeweils von zwei AT-Basenpaaren flankiert, in allen anderen Duplexen ist jeweils mindestens eines davon ein GC-Paar. Bereits die Anwesenheit eines einzigen GC-Paares in der Umgebung des Py*ind*C reicht aus, um die Fluoreszenzintensität um mehr als die Hälfte zu löschen. **S2** und **S3** weisen entsprechend die niedrigste Fluoreszenz auf. **S4** trägt das GC-Paar in 5'-Richtung vom modifizierten Nukleotid und löscht deshalb ebenfalls sehr effektiv, da die Wechselwirkung mit dem Basenpaar in 5'-Position ist stärker als in 3'-Richtung. **S5**, das in 5'-Richtung ein AT besitzt, fluoresziert stärker als **S4**, da das AT-Basenpaar keine Fluoreszenzlöschung hervorruft. Py*ind*C ist also offenbar in der Lage, dG zu oxidieren.

Die Fluoreszenzeigenschaften der Py*in*-modifizierten Oligonukleotide unterscheiden sich deutlich voneinander. Py*ind*G-markierte Oligonukleotide zeigen ein Fluoreszenzverhalten,

das ebenfalls auf eine schwache elektronische Kopplung schließen lässt. Die Maxima der Emission sind hier deutlich bathochrom verschoben (430/455 nm). Py*ind*U- und Py*ind*A-enthaltende Oligonukleotide zeigen dagegen Fluoreszenzspektren mit einer breiten unstrukturierten Emissionsbande (Maximum bei 452 bzw. 447 nm), die auf die Bildung eines intramolekularen Exciplexes mit partiell ladungsgetrenntem Charakter hinweist. Das modifizierte Nukleotid zeigt hier also eine starke elektronische Kopplung

5.6.4 Das Py*ind*X-Chromophor als neue Fluoreszenzsonde in der DNA-Analytik

Durch die Synthesemethode mittels Sonogashira-Kupplung an der festen Phase sind alle vier natürlichen Py*in*-modifizierten Nukleotide leicht zugänglich. Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Py*ind*X-Nukleotide stellt die Py*in*-Modifikation eine modulierbare, potentiell anwendbare Fuoreszenzsonde für die Bioanalytik dar.

Das Auftreten einer neuen starken Absorptionsbande bei 400 (Py*ind*U, Py*ind*UC) oder 420 nm (Py*ind*A, Py*ind*G) im Duplex lässt sich als Hybridisierungsmarker für DNA nutzen.[23] Da diese Absorptionsbande auf eine excitonische Wechselwirkung des Py*ind*G mit den benachbarten Basenpaaren zurückgeführt wird, sich diese aber nur im hybridisierten Zustand ausbilden kann, stellt die Bande einen zuverlässigen Marker für die Doppelsträngigkeit dar. Auch der signifikante Anstieg in der Doppelstrang-Fluoreszenz bis auf das 40-fache der Einzelstrangemission von Py*ind*U- und Py*ind*G-Oligonukleotiden kann dem Nachweis der Hybridisierung dienen.

Werden die Eigenschaften der Py*ind*X-Nukleotide kombiniert, so lassen sich weitere spektroskopische Werkzeuge auf DNA-Basis zu entwickeln. Eine in unserer Arbeitsgruppe bereits beschriebene potentielle Anwendung eines kombinierten Labels aus Py*ind*G und Py*ind*C als FRET-Sonde soll hier kurz vorgestellt werden.[34]
Py*ind*G zeigt durch eine signifikante Änderung seines UV-Vis-Spektrums an, ob es im Einzelstrang oder im Duplex vorliegt. Diese Absorption lässt sich in einem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-System (FRET, s. Kapitel 2.1.1.3) ausnutzen. Das Prinzip des Energietransfers nach Förster beruht auf zwei Chromophoren, von denen einer (Energiedonor) mit seiner

Fluoreszenzemission die Absorption des anderen (Energieakzeptor) anregt. Diese Übertragung an Energie ist stark vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängig und funktioniert nur über kurze Distanzen. Py*ind*C und Py*ind*G erfüllen die Anforderungen für ein FRET-Paar. Mit seiner Emission ist Py*ind*C in der Lage, die Absorption von Py*ind*G bei 420 nm anzuregen. Dieser Energieübertrag wird in der Fluoreszenz des Py*ind*G sichtbar. In der Praxis würde man in die unterschiedlichen Stränge eines Duplexes Py*ind*G und Py*ind*C so einbauen, dass sie sich gegenüber stehen. Im Falle einer erfolgreichen Hybridisierung ist die räumliche Nähe zwischen beiden Nukleotiden so groß, dass die Fluoreszenz des Py*ind*G bei einer Anregungswellenlänge auftritt, bei der dieses Nukleotid kaum absorbiert.

5.6.5 Zusammenfassung

Ein zweiter Ansatz zur Entwicklung neuer Fluoreszenzsonden besteht in der Darstellung Py*ind*X-modifizierter Oligonukleotide. Hier wird mittels Sonogashira-Kupplung an der festen Phase eine Py*in*-Gruppe an ein halogeniertes Nukleotid ein neuer Chromophor in die DNA eingebracht.

Das Py*ind*C-Nukleotid befindet sich ähnlich wie PydU innerhalb der DNA in einer asymmetrischen Umgebung. Es interagiert mit dem Nukleotid in 5'- Richtung stärker als mit dem in 3'-Richtung. Zu einer Löschung der Fluoreszenz kommt es, wenn im Duplex ein GC-Paar benachbart ist. Bereits im Einzelstrang ist eine Tendenz zur Wechselwirkung mit einem benachbarten dC zu erkennen. Der Verlust an Fluoreszenzintensität ist auf einen Ladungstransferprozess vom Py*ind*C auf das GC-Paar zurückzuführen.

Py*ind*X-Nukleotide eignen sich aufgrund ihrer charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften und der guten synthetischen Zugänglichkeit als neue Fluoreszenzsonden für die Hybridisierung von Oligonukleotiden.

6 Zusammenfassung

Seit über 40 Jahren werden Ladungstransferprozesse in DNA untersucht. Dennoch sind noch einige Fragen offen. Durch die Bedeutung dieser Prozesse in der Natur und mittlerweile auch in der Technik, stellt ihre Untersuchung auch heute noch ein wichtiges Forschungsgebiet dar. In dieser Arbeit werden zur Untersuchung des Ladungstransfers in DNA verschiedene Ladungsdonor-/-akzeptor-Systeme verwendet, um den oxidativen Lochtransfer und den reduktiven Elektronentransfer zu studieren. Der erste Schwerpunkt liegt dabei in der Untersuchung struktureller Einflüsse auf die Fluoreszenz- und Ladungtransfereigenschaften von PydU- und Ethidium-modifizierten DNA-Strängen. Zu diesem Zweck wurden PydU- und Ethidium-modifizierte Oligonukleotide synthetisiert, charakterisiert und mit Gegensträngen hybridisiert, die eine *abasic site* im Komplementärstrang tragen. Diese Studien führen zu folgenden Resultaten:

- In PydU-haltigen DNA-Sequenzen führt die *abasic site* zu einer Verbesserung der Ladungstransfereigenschaften des modifizierten Oligonukleotids im Vergleich zu einem herkömmlichen Duplex.
- Die durch das PydU-Nukleotid hervorgerufene Störung in der Duplexstruktur erstreckt sich mindestens über zwei Basenpaare in jede Richtung, wobei die Störung an der Stelle der direkten Gegenbase selbst ist. Die Auswirkungen in der Entfernung von zwei Basenpaaren sind schwächer als in direkter Nachbarschaft zum PydU. Das Fehlen eines intakten Basenpaares an diesen beiden Positionen führt zu einer Destabilisierung der Duplexe.
- Im regulären PydU-Duplex spielen Grundzustandswechselwirkungen von PydU mit benachbarten Basenpaaren in größerer Entfernung eine Rolle. Ein intaktes Basenpaar in 5'-Richtung ist Voraussetzung für einen effizienten Ladungstransfer. Befindet sich in 3'-Richtung freier Platz, so führt das zu einer Verbesserung der Elektronentransfereffizienz.
- Die schlechteren Ladungstransfereigenschaften gehen im PydU-Duplex mit einer Verschiebung des Emissionsmaximums zu kleineren Wellenlängen einher. Das deckt sich mit der Modellvorstellung, dass sich bei der Bildung des ladungsgetrennten Zustands im PydU-Nukleotid der Winkel zwischen Pyren- und Uridinrest verringert, d. h. mit der Koplanarisierung des photoangeregten PydU erhöht sich die Elektronentransfereffizienz des Systems. Diese Strukturänderung begünstigt gleichzeitig die Integration des PydU in

den Basenstapel. Findet weniger Elektronentransfer statt, ist der Winkel zwischen Pyren- und Uridinrest größer und der Pyrenrest ragt weiter in die große Furche.

- Die Verwendung von *abasic sites* als komplementäre Basen zum Nukleosidanalogon des Ethidiums zeigen, dass komplexe Grundzustandswechselwirkungen mit benachbarten Basenpaaren hier die entscheidende Rolle spielen. Die Fluoreszenzeigenschaften werden bestimmt durch ein unterschiedliches Ausmass an Interkalation in den Basenstapel. Dabei hat die Gegenbase diesbezüglich den größten Einfluss. Das Ethidiumnukleosid liegt unsymmetrisch zwischen den beiden Nachbarbasen und wechselwirkt mit den Basen in 5'-Richtung stärker.

Da Ladungstransferprozesse in der biologischen Umgebung der DNA in der Regel in Anwesenheit von Proteinen verlaufen oder sogar durch Proteine vermittelt werden, gilt der zweite Schwerpunkt in dieser Arbeit der Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Ladungsdonor-modifizierten Oligonukleotiden und Ladungsakzeptor-modifizierten kurzen Peptiden.
Der Ladungsakzeptor ist dabei entweder die Aminosäure Tryptophan oder Tyrosin (Lochakzeptor beim oxidativen Lochtransfer) oder *para*-Nitrobenzoyl (**pNB,** Elektronenakzeptor beim reduktiven Elektronentransfer). Der erfolgreiche Ladungstransfer wurde entweder spektrokopisch durch Fluoreszenzexperimente nachgewiesen oder chemisch durch die Piperidin induzierte Spaltung BrdU-substituierter Oligonukleotide. Als Modellpeptide wurden in einer Reihe von Versuchen kurze Tripeptide vom Typ **KXK** verwendet. Ist **X** eine aromatische Aminosäure, so kann deren Seitenkette in den Basenstapel interkalieren, ist **X** Threonin oder Cystein, kann der Einfluss einer nukleophilen Aminosäureseitenkette auf die während des Ladungstransfers gebildeten Intermediate untersucht werden. Als Ladungsdonoren wurden PydU, PtzdU, PydG und Ethidium eingesetzt.
In weiterführenden Experimenten mit PydU- und Ethidium-modifizierten Duplexen wurde der Einfluss einer spezifischen DNA-Peptid-Bindung untersucht. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt: Erstens wird durch den Einsatz *abasic site*-modifizierter Duplexe die Position der Interkalation einer aromatischen Seitenkette der Tripeptide gesteuert, da diese Aromaten bevorzugt in *abasic site*s interkalieren. Zweitens ermöglicht die Verwendung sequenzspezifisch an PydU-haltige Oligonukleotide bindender Peptide die Untersuchung des Ladungstransfers spezifischer Peptid-DNA-Komplexe.

Für den Ladungstransfer zwischen Peptiden und DNA gilt, dass die Ladungstransferprozesse in der DNA und zwischen Peptiden und Oligonukleotiden nicht allein von den Redoxpotentialen der beteiligten Donoren und Akzeptoren abhängen:

- Der Ladungstransfer hängt von der Art, Stärke und Häufigkeit der Bindungen zwischen beiden Molekülen ab. Dabei gilt, dass eine unspezifische Bindung den Ladungstransfer erhöht, da die Wahrscheinlichkeit für eine Bindung mit geeignetem Abstand von Donor und Akzeptor steigt. Als Ladungsdonoren eignen sich PydU, PydG und Ethidium gleichermaßen.
- Wie Messungen der CD-Spektren belegen, ist die Interkalation des Ladungsakzeptors eine notwendige Bedingung für einen effizienten Ladungstransfer. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich dabei um den Elektronenakzeptor **pNB** oder um eine Aminosäureseitenkette handelt. Der Ladungstransfer kann dabei in einem System abhängig von den redoxaktiven Gruppen gleichzeitig reduktiv und oxidativ verlaufen.
- Aus den Untersuchungen mit *abasic site*-modifizierten Duplexen konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des Donor-Akzeptor-Systems vom vorherrschenden Mechanismus für den Ladungstransfer abhängt. Im PydU-**pNB**-System ist Elektronentransfer dank des Hopping-Mechanimus auch über größere Distanzen zwischen Donor und Akzeptor möglich, während im Ethidium-**pNB**-System der Ladungstransfer aufgrund des Superaustauschmechanismus nur über sehr kurzen Entfernungen (ca. 2 bp) erfolgt.
- Bei Ethidium-modifizierten Oligonukleotiden wird die Bindung zwischen Peptid und DNA durch die kationische Ladung am Chromophor beeinflusst. Diese führt zu einer Neutralisation anionischer Ladung des DNA-Rückgrates und zu einer Abstossung von Molekülteilen mit gleichnamiger Ladung.

Darüberhinaus lieferten die Strangbruchexperimente folgende Erkenntnisse, die zeigen, in welch vielfältiger Weise Aminosäureseitenketten in den Ladungstransfer von Oligonukleotiden zu Peptiden eingreifen können:

- Das Strangbruchverhalten des PtzdU/BrdU-System lässt sich im Gegensatz zum PydU/BrdU-System durch die Zugabe von Peptiden nicht beeinflussen.
- Sowohl Folgereaktionen des Pyrenylradikalkations als auch des Uridin- bzw. **pNB**-Radikalanions können zum Strangbruch führen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Hydrathülle der DNA. So können Oligolysine, die über eine interkalierende **pNB**-Gruppe sehr fest an die DNA gebunden sind, das bei der photochemischen Anregung entstehende

Pyrenylradikalkation von der Solvathülle abschirmen und so einen Oxidationsprozess in der DNA induzieren.

- Eine Strangbruchreaktion lässt sich verhindern, indem die Ladung eines reaktiven Intermediats durch einen Ladungsakzeptor abgefangen wird. Das gilt sowohl für das Abfangen der Ladung des Pyrenylradikalkations durch redoxaktive aromatische Aminosäurereste (W, Y) als auch für die Ladung des Uridinradikals des BrdU, die mittels Protonierung durch eine alkoholische Aminosäureseitenkette (C, T) neutralisiert wird. Wird der **pNB**-Rest an der Interkalation in den Basenstapel durch die Anwesenheit aromatischen Aminosäureseitenketten gehindert, findet ebenfalls kein Strangbruch statt.

Nach den Experimenten mit den nicht kovalenten Peptid-DNA-Systemen wurde der Ladungstransfer an strukturell genau definierten kovalenten Peptid-Oligonukleotid Konjugaten (POC) weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Festphasenprotokoll für die Modifikation von Oligonukleotiden mit **pNB** und **pNB-**modifizierten Peptiden entwickelt. Dabei zeigte sich, dass ein kovalentes System einem nicht kovalenten nur bedingt überlegen ist, da nicht allein die Stärke einer Bindung entscheidet. Befinden sich Ladungsdonor und -akzeptor zu weit voneinander entfernt, findet auch im PydU/**pNB**-System kein Ladungstransfer mehr statt.

Da modifizierte Nukleinsäuren zunehmend an Bedeutung in der Nanobiotechnologie und der Bioanalytik gewinnen, stellt die Entwicklung neuer DNA-basierter Fluoreszenzsonden als bioanalytisches Werkzeug den dritten Schwerpunkt in dieser Arbeit dar. Hierfür wurden zwei Strategien verfolgt.

Die Darstellung mehrfach fluoreszenzmarkierter Nukleotide dient der Entwicklung einer sensiblen DNA-Struktursonde. Durch den Einbau mehrerer Pyren-modifizierter Uridine in unmittelbarer Nachbarschaft lassen sich Duplexe erzeugen, die im Vergleich zu einfach modifizierten Duplexen neue strukturelle und spektroskopische Eigenschaften aufweisen.

- Die PydU-Einheiten ordnen sich im intakten Duplex so an, dass die Uridinreste Wasserstoffbrücken mit den Adenosinen des Gegenstranges ausbilden, während die Pyrenreste aus dem Basenstapel in die große Furche ragen und sich helikal entlang des DNA-Rückgrates anordnen. Dies führt zu einer intensiven elektronischen Kopplung der Chromophore untereinander und somit zu einer deutlichen Verstärkung der Emission.
- Durch Dehybridisierung, nicht komplementäre Basen im Gegenstrang und den Einbau von PtzdU anstelle von PydU wird diese PydU-Helix und somit auch die elektronische Kopp-

lung der PydU-Nukleotide gestört. Es bilden sich alternative Strukturen aus, die nicht von der Intaktheit der Watson-Crick-Basenpaarungen abhängen.

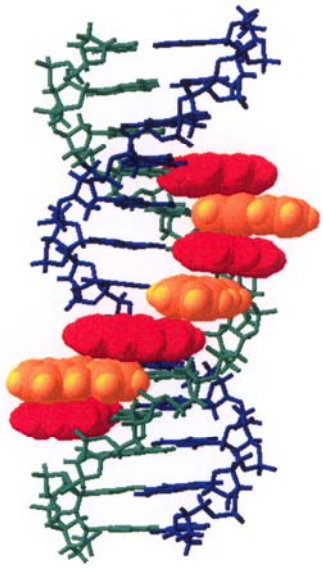


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der helikalen Anordnung der Chromophore in einem fünffach PydU-markierten Oligonukleotid.

Die Einführung einer neuen Nukleotidmodifikation stellt den zweiten Ansatz zur Entwicklung neuer Fluoreszenzsonden dar. Der Py*in*-Chromophor lässt sich über Sonogashira-Kupplung an der festen Phase an einem halogenierten Nukleotid einführen. Es gelingt die Darstellung aller vier Py*in*dX-modifizierter Oligonukleotide. Untersuchungen mit Py*in*dC-modifizierten Oligonukleotiden ergeben, dass dieses Nukleotid in der DNA mit dem Nukleotid in 5'- Richtung stärker als mit dem in 3'-Richtung wechselwirkt. Ein Ladungstransferprozess vom Py*in*dC auf dG führt zu einer Löschung der Fluoreszenz des Chromophors. Alle Py*in*dX-Nukleotide eignen sich aufgrund ihrer charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften und der guten synthetischen Zugänglichkeit als neue Fluoreszenzsonden in der Bioanalytik oder Diagnostik.

7 Materialien und Methoden

7.1 Materialien und Geräte

Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien stammen von den Firmen *Merck*, *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Lancaster*, *ICN*, *Eurogentech* und *ABCR*.

Lösungsmittel

Alle technischen Lösungsmittel werden vor Gebrauch destilliert. Als Lösungsmittel für den Betrieb der HPLC dienen hochgereinigte organische Lösungsmittel (LiChrosolv, *Merck*), sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage.

Reaktionsführung

Die Reaktionen werden gegebenenfalls unter Lichtausschluss und unter Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6, 99.996 % rein) zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Die benötigten Glasgeräte werden in diesem Fall vorher im Hochvakuum ausgeheizt.

Säulenchromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC): Es werden DC-Alufolien der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0.25 mm verwendet, die mit Kieselgel 60 F_{254} beschichtet sind. Die Auswertung der Platten erfolgt optisch über Fluoreszenzlöschung bei 254 nm bzw. Fluoreszenzanregung bei 366 nm, sowie chemisch mittels verschiedener Anfärbereagenzien: Routinemäßig wird $MeOH/H_2SO_4$-Reagenz (2 %) verwendet. Zum Erhitzen dient ein Heißluftfön. Für Amine wird 5 % Ninhydrin in Ethanol eingesetzt.
- Präparative DC (PTLC): Es werden DC-Glasplatten der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 2 mm verwendet, die mit Kieselgel 60 F_{254} beschichtet sind.

- *Flash*-Säulenchromatographie (FC): Als stationäre Phase wird Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40-63 µm verwendet. Es wird nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still* bei ca. 0.4 bar Überdruck chromatographiert. Die Auftragung der zu reinigenden Substanz erfolgt als Lösung im Laufmittel oder gegebenenfalls auf Kieselgel aufgezogen.

HPLC

Reversed-Phase HPLC wird mit einem Shimadzu HPLC System durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A). Für die Analytik wird eine Supelcosil LC-318-Säule (25 cm × 4.6 mm, *Supelco*) verwendet, für die präparative Trennung eine Supelcosil LC-318 (25 cm × 10.0 mm ID, 5 µm). Die Säule wird mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5, Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) durchgeführt. Die Elution erfolgt mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min (analytisch) bzw. 2.5 ml/min (präparativ). Die Detektion der DNA-Stränge erfolgt bei 260 und 290 nm im Fall nicht fluoreszenter Oligonukleotide und bei 260 und 340 nm für PydU-enthaltende DNA (Spaltbreite 8 nm).

Lyophilisation

Wässrige Lösungen werden an einer *Speed-Vac* RC 10.22 der Firma *Joan* nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff lyophilisiert.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese wurde an einem Expedite 8900 *Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Als Träger dienen CPGs mit 1 µmol Belegung (500 Å). Phosphoramidite und CPG-Säulen stammen von *ABI* oder *Glen Research*, Synthesizerchemikalien und Reagenzien von *ABI*.

Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren werden an einem *Finnigan LQC-ESI*-Spektrometer aufgenommen. Die Proben werden dafür in Acetonitril (*LiChrosolv*® Firma *Merck*) gelöst und durch einen

0.45 µm HPLC-Filter der Firma *Satorius* gegeben. Die Angaben erfolgen in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks. Die MALDI-TOF Massenspektren der Oligonukleotide werden an einem Bruker Biflex III Spektrometer im negativen Detektionsmodus aufgenommen.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgt an einem AC 250 bzw. DMX 500 Spektrometer der Firma *Bruker* bei 300 K. Das jeweilige deuterierte Lösungsmittel ist angegeben. Die Proben befinden sich in Probenröhrchen mit 5 mm Außendurchmesser und beinhalten ca. 10 mg Substanz in 0.5 ml Lösungsmittel. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Trimethylsilan als Nullpunkt. Die Angabe der chemischen Verschiebungen δ erfolgt in ppm, die Angabe der Kopplungskonstanten (^3J bzw. ^4J) in Hz.

Die Aufnahme, Prozessierung und sequentielle Zuordnung der 2D-Spektren der Peptide **P1-P3** erfolgt an einem DMX600 Spektrometer (*Bruker*) durch Andreas Enthart aus der Arbeitsgruppe *Prof. Kessler*.

Optische Spektroskopie

Soweit nichts anderes angegeben ist, werden 1 cm-Quarzglas-Küvetten (*Starna*) verwendet.

- Die Absorptions- und Schmelzpunktmessungen werden an einem Cary 100 Bio (*Varian*) mit Temperatureinheit vorgenommen. Die Aufnahme der UV/VIS-Spektren erfolgt mit dem Programm „Scan“ mit folgenden Einstellungen: SBW 2 nm, Average time 0.1 s, Data interval 1, Light source change over 330-350 nm (je nach Absorptionsmaximum der Probe). Bei temperaturabhängigen Messungen wird das Programm „Thermal“ mit den identischen Einstellungen verwendet. Die Spektren werden gegen die Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Schmelzpunktmessungen werden mit dem Programm „Thermal“ aufgenommen: SBW 1 nm, Average time 2 s, Light source change over 350 nm, Heiz- bzw. Kühlrate 0.7°C/min.
- Die Aufnahme der Fluoreszenz- und Anregungsspektren erfolgt an einem Fluoromax-3 Fluorimeter (*Jobin-Yvon*) mit Peltiere-Element zur Temperatursteuerung (LFI-3751). Die Aufnahme erfolgt mit folgenden Software-Einstellungen: Integration time 0.2 s, Increment 1.0 nm Die Spektren werden routinemäßig mit 2 nm Spaltbreite aufgenommen und gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert.

- Die CD-Spektren stammen von einem *Jasco* J-715 Spektropolarimeter mit *Jasco* PTC-150J Thermostat. In der Software werden folgende Einstellungen vorgenommen: Sensitivity 100 mdeg, Data pitch 0.1 nm, Scanning mode continous, Scanning speed 500 nm/m, Response 0.5 sec, band width 2 nm. Das Spektrum wird über 4-5 Messungen gemittelt. Die Spektren werden manuell basislinienkorrigiert. Differenz-CD-Spektren werden ermittelt, indem vom Spektrum des Peptid-DNA-Komplexes die Einzelspektren von Puffer, DNA und Peptid mit der jeweiligen Konzentration subtrahiert werden.
- Zeitaufgelöste Messungen werden von der Arbeitsgruppe Dr. T. Fiebig (*Boston College, USA*) durchgeführt.

7.2 Durchführung und Auswertung der Bestrahlungsexperimente

Bestrahlung

Für die Strangbruchexperimente werden 1000 µl einer frisch hybridisierten 4 µM Duplex-Lösung in 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in einer 1 cm breiten Quarzglasküvette mit Licht (75 W Xe-Lampe, *Oriel Instruments*) über 305 nm Wellenlänge (*cut-off* Filter, *Andover Corporation*) bestrahlt. Wird in Anwesenheit eines Peptids gemessen, so werden 10 eq davon (= 40 µM) vor der Bestrahlung der Duplexlösung hinzugegeben. Alle fünf Minuten werden 30 µl der Duplex-Lösung entnommen und lichtgeschützt aufbewahrt. Die erste Probe wird dabei nach 0 min Bestrahlungszeit gezogen (Probe 0). Nach 60 min wird die Bestrahlung mit Probe 12 beendet. Die in der Küvette verbliebene Duplexlösung wird als separate Probe behandelt (Probe 13).

Piperidinbehandlung

Zu den Proben 0-12 werden jeweils 3 µl Piperidin gegeben. Im Dunklen werden alle Proben 30 min auf 90°C erhitzt. Anschließend werden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gefriergetrocknet.

HPLC-Analytik

Für die HPLC-Analytik werden die Rückstände in jeweils 15 µl (50 µl für Probe 13) HPLC-Wasser aufgenommen. Das Injektionsvolumen beträgt 10 µl (RP-18), der Gradient 0-30 % B über 50 min. Die erhaltenen Peaks werden integriert und das Verhältnis aus modifizierter und unmodifizierter DNA ermittelt. Der Quotient von Probe 0 dient als Referenz für die Auswertung der Messreihe und ist definitionsgemäß eins. In der Regel wird über drei Messreihen gemittelt.

ESI-Analytik

Die Auftrennung bei den ESI-HPLC-MS-Spektren erfolgt mit einer YMC-PAK ODS-A (250 × 4.6 mm, 10 µm, C-18) und einem Gradienten von 0-30 % B über 50 min. Die Detektion erfolgt im negativen Detektionsmodus.

Es sind die typischen Massen mit den Retentionszeiten angegeben, die für alle Proben des entsprechenden Doppelstranges gelten. Die Peptidmassen erscheinen ebenfalls, sind aber nicht angegeben.

D1/C1:

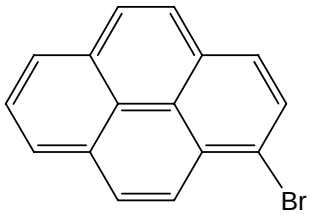
Mittels **ESI-HPLC-MS** identifiziert (m/z, Retentionszeit): 1325.4 (25.8 min) $[M_{\mathbf{D1}}\text{-}4H]^{4-}$, 1313.5 (22.0 min) $[M_{\mathbf{C1}}\text{-}4H]^{4-}$.

B/C8:

Mittels **ESI-HPLC-MS** identifiziert (m/z): 1307.8 (19.8 min) $[M_{\mathbf{C8}}\text{-}4H]^{4-}$, 1327.6 (22.0 min) $[(M_{\mathbf{B}}\text{-}Br^{-})\text{-}4H]^{5-}$, 1347.7 (23.5 min) $[M_{\mathbf{B}}\text{-}4H]^{4-}$.

7.3 Synthese des PydU-Phosphoramidits

7.3.1 Darstellung von 1-Brompyren



(3)

$C_{16}H_9Br$
281.15 g/mol

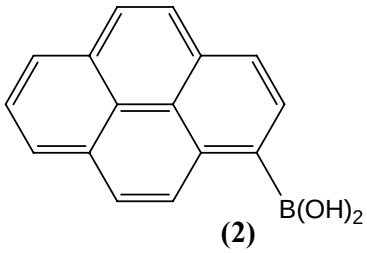
50 g (0.25 mol) Pyren werden in 750 ml Chlorbenzol unter Argonatmosphäre gelöst und unter Rückfluss erhitzt. 110.5 g (0.50 mol, 2 eq) $CuBr_2$ werden vorsichtig zugegeben. Nach 2 h wird die Reaktionslösung durch Kieselgur filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird auf eine kurze Aluminiumoxid-Säule (2 cm × 10 cm) gegeben und mit Benzol eluiert. Das erhaltene Rohprodukt wird dreimal aus Benzol/Hexan (1:1) umkristallisiert. Man erhält 45.8 g des gewünschten Produkts (75 %) als leicht gelben Feststoff.[274]

DC (100 % Benzol) $R_f = 0.86$

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.35, 8.16, 8.14, 8.08, 8.00, 7.98, 7.93, 7.91.

^{13}C-NMR (50 MHz, $CDCl_3$): δ = 131.05, 130.85, 130.48, 129.91, 129.51, 128.86, 127.59, 126.98, 126.39, 125.89, 125.73, 125.62, 125.44, 125.39, 123.9, 119.82.

7.3.2 Darstellung von 1-Pyrenylboronsäure



(2)

$C_{16}H_{11}BO_2$
246.07 g/mol

Unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss werden 2.0 g (7.11 mmol) **3** in 100 ml absolutem Diethylether gelöst. Bei 0°C werden 5.3 ml (8.53 mmol, 1.2 eq) einer 1.6 M BuLi-Lösung in Hexan vorsichtig zugegeben. Man lässt die Mischung auf Raumtemperatur kommen und 1 h rühren. 4 ml (35.6 mmol, 5 eq) $B(OCH_3)_3$ werden in 10 ml absolutem Diethylether

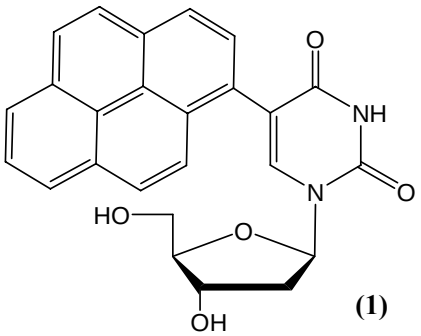
gelöst und auf –78°C gekühlt. Diese Lösung gibt man langsam dem lithiierten Pyren bei -78° C über 30 min zu. Nach drei Stunden lässt man die Lösung auf RT kommen und 40 h rühren. Zur Aufarbeitung werden 40 ml 2 M HCl zugegeben und 3 h gerührt. Es wird dreimal mit 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen anschließend dreimal mit 70 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wird über FC gereinigt (Hexan/Essigsäureethylester 20:1, Elution 100 % EtOH). Man erhält 1.32 g Produkt als gelben Feststoff (75 %).[272, 273]

DC (Hexan/Diethylether 3:1) $R_f = 0.2$

^{1}**H-NMR** (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.66 (2H, s; $B(OH)_2$), 8.35 (1H, d, 7.5 Hz; H-2), 8.14-8.30 (6H, m), 8.04 (1H, t, 7.5 Hz; H-7).

^{13}**C-NMR** (63 MHz, DMSO-d_6): δ = 134.1, 132.6, 131.9, 131.5, 130.9, 130.5, 128.6, 127.6, 126.9, 126.0, 125.0, 124.1, 123.7, 123.1.

7.3.3 Darstellung von 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin



(1)

$C_{25}H_{20}N_2O_5$
428.44 g/mol

514 mg 5-Iod-2'-desoxyuridin (1.45 mmol), 534 mg 1-Pyrenylboronsäure (**2**) (2.17 mmol, 1.5 eq), sowie 167.6 mg Tetrakis-triphenylphosphin-palladium (0.15 mmol, 0.1 eq), und 1.16 g NaOH (30 mmol, 20 eq) werden in 120 ml THF/H_2O (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 30 ml Methanol wird unter Lichtausschluss etwa eine Stunde mit Stickstoff entgast und anschließend 48 h Stunden unter Rückfluss erhitzt. Es wird mit festem NH_4Cl neutralisiert und dreimal mit 50 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Nach Trocknen im HV erhält man das Rohprodukt als braunen Feststoff. Dieser wird über FC gereinigt (DCM/Aceton 4:1, Essigsäureethylester/MeOH 10:1). Man erhält 358 mg (60 %) eines leicht braunen Feststoffs.[32]

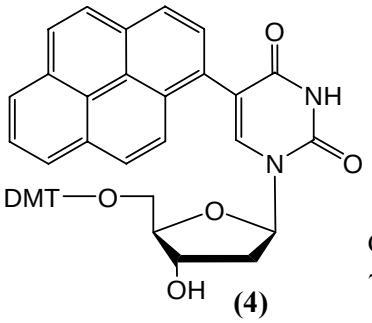
DC (Essigsäureethylester/MeOH/H_2O 10:1:0.5) R_f = 0.63

ESI-MS:m/z (%) 429.0 (30) $[M+H]^+$, 313.3 (100) $[M-C_5H_9O_3+2H]^+$

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 8.21 (1H, m; H-6 (dU)), 8.14-7.84 (9H, m; Pyren), 6.35 (1H, t, 6.6 Hz; H-1'), 4.31 (1H, m; H-4'), 3.84 (1H, m; H-3'), 3.60-3.50 (2H, m; H-5'), 3.62 (1H, m; 5´-H), 2.29 (2H, m; H-2').

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6): δ = 174.9, 174.1, 167.4, 163.9, 153.4, 153.2, 144.6, 144.1, 134.9, 134.3, 134.1, 133.9, 131.2, 131.0, 130.5, 129.5, 127.9, 126.8, 103.8, 104.4, 90.1, 87.8, 73.4, 62.7, 42.5.

7.3.4 Darstellung von 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenyl)- 2'-desoxy-uridin



(4)

$C_{46}H_{38}N_2O_7$
730.8 g/mol

246 mg **1** (0.57 mmol) werden zweimal mit absolutem Pyridin eingedampft. Unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre werden 195 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (0.57 mmol, 1.0 eq) zu einer Lösung von **1** in 10 ml absolutem Pyridin gegeben und 20 h bei RT gerührt. Anschließend lässt man 1 h mit 2 ml MeOH rühren. Die Reaktionslösung wird eingedampft. Die Reinigung erfolgt über FC (DCM/Aceton 4:1, Essigsäureethylester/MeOH 10:1). Man erhält 355 mg (85 %) eines leicht braunen Feststoffs.[31]

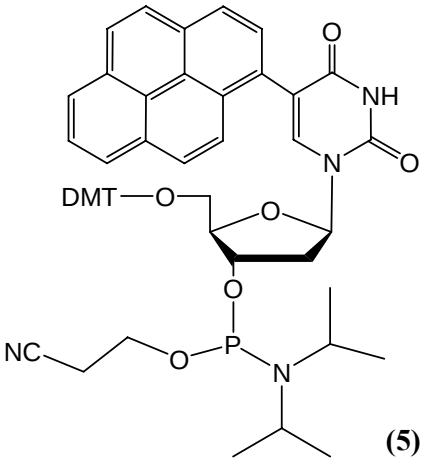
DC (Essigsäureethylester/MeOH/H_2O 10:1:0.5) R_f = 0.80

ESI-MS:m/z (%) 753.2 (20) $[M+Na]^+$, 731.2 (5) $[M+H]^+$, 303.3 (100) $[DMT]^+$.

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.70 ()1H,s; NH), 8.29-7.88 (10H, m; Pyren, H-6 (dU)), 7.40-6.81 (13H, m; DMT), 6.32 (1H, t, 6.6 Hz; H-1'), 4.04 (1H, m; H-4'), 3.69 (6H, s; CH_3(DMT)), 3.51-3.43 (1H, m; H-3'), 2.93-2.77 (2H, m; H-5'), 2.23-2.20, 1.90-1.87 (2H, m; H-2').

^{13}C-NMR (63 MHz, DMSO-d_6): δ = 181.0, 163.8, 160.0, 159.6, 151.7, 146.4, 137.1, 137.0, 132.1, 131.7, 131.3, 131.1, 130.9, 130.6, 19.4, 129.1, 128.9, 128.6, 128.3, 127.6, 126.4, 125.8, 125.2, 125.1, 115.8, 114.4, 114.0, 88.1, 87.1, 63.8, 56.4, 55.9, 39.7.

7.3.5 Darstellung von 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-di*iso*propyl)-phosphoramidit]



(5)

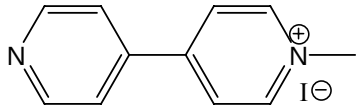
$C_{55}H_{55}N_4O_8P$
931.02 g/mol

119 mg **4** (0.16 mmol) werden unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss in 5 ml absolutem DCM gelöst und mit 80 µl über KOH getrocknetem Triethylamin (0.58 mmol, 3.6 eq) versetzt. Es werden 84 µl Cyanoethyl-*N*,*N*-di*iso*propyl-phosphoramiditchlorid (0.38 mmol, 2.4 eq) zugegeben. Nach 30 min wird die Reaktion auf Vollständigkeit kontrolliert und gegebenenfalls erneut TEA und Cyanoethyl-*N*,*N*-di*iso*propyl-phosphoramiditchlorid zugegeben. Nach 60 min wird die Reaktion durch Zugabe von 2 Tropfen absolutem Ethanol gestoppt. Die organische Phase wird mit 10 ml frischer, gesättigter, wässriger $NaHCO_3$-Lösung extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und zweimal mit 5 ml trockenem Diethylether eingedampft.[31]
Man nimmt vollständigen Umsatz an und stellt für den Einsatz in der Oligonukleotidsynthese nach 2 h Trocknen im Vakuum eine 0.1 M Lösung des 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-di*iso*propyl)-phosphoramidits] (**5**) in trockenem Acetonitril (1.6 ml) her, die sofort verbraucht wird.

DC (DCM/Aceton 6:1) R_f = 0.86 (Doppelfleck mit Hydrolyseprodukt)
ESI-MS:m/z (%) 931.9 (7) $[M+H]^+$, 303.3 (100) $[DMT]^+$.
^{31}P-NMR (101 MHz, MeCN-d_3): δ = 159.0

7.4 Synthese der Bipyridinverbindungen

7.4.1 Darstellung von N-Methyl-4,4'-bipyridinium-Iodid



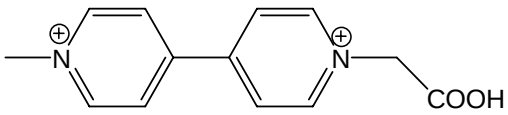
(6)

$C_{11}H_{11}N_2I$
m_{exc}(Kation): 171.092
M: 298.1 g/mol

1 g Bipyridin (6.4 mmol) wird in 10 ml DCM gelöst. Es werden 0.4 ml Methyliodid (6.4 mmol, 1 eq) zugegeben und 24 h unter Lichtschutz gerührt. Der entstandene gelbe Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält 1.46 g (76 %) des gewünschten Produkts.[321]

ESI-MS: m/z (%) 171.1 (100) $[M]^{+\bullet}$
^{1}**H-NMR** (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.11 (2H, d, 6.8 Hz; 2H-2), 8.85 (2H, dd, 4.6 bzw. 1.7 Hz; 2H-2'), 8.59 (2H, d, 6.8 Hz; 2H-3), 8.0 (2H, dd, 4.6 bzw. 1.7 Hz; 2H-3'), 4.37 (3H, s; CH_3).
^{13}**C-NMR** (63 MHz, DMSO-d_6): δ = 152.4 (C-4), 151.4 (2 C-2), 146.6 (2C-2'), 141.3 (C-4'), 125.4 (2C-3), 122.3 (2C-3'), 48.1 (CH_3).

7.4.2 Darstellung von N-Carboxymethyl-N'-methyl-4,4'-bipyridinium-Bromid



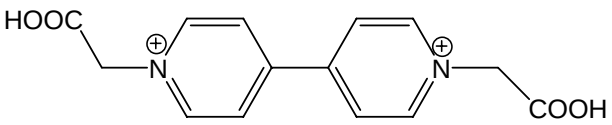
(7)

$C_{13}H_{14}N_2O_2^{2+}$
m_{exc}(Kation): 230.104

588 mg **6** (1.97 mmol) werden in 4 ml Ethanol gelöst. Es werden 385 mg 2-Bromessigsäure (2.37 mmol, 1.4 eq) zugegeben und 3 Tage lang gerührt. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 40 mg des blassgrünen Produkts (6 %).

^{1}**H-NMR** (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.35 (4H, m; 2H-2, 2H-2'), 8.85 (2H, d, 6.3 Hz; 2H-3), 8.75 (2H, d, 6.3 Hz; 2H-3'), 5.69 (2H, s; CH_2), 4.48 (3H, s; CH_3).

7.4.3 Darstellung von N,N'-Di(carboxymethyl)-4,4'-bipyridinium-Bromid



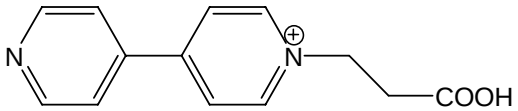
(8)

$C_{14}H_{14}N_2O_4^{2+}$
m_{exc}(Kation): 274.094

1.16 g Bipyridin (7.4 mmol) werden in 7 ml $CHCl_3$ gelöst. Es werden 5.16 g 2-Bromessigsäure (37.1 mmol, 5 eq) zugegeben und 60 h gerührt. Nach der Zugabe von 5 ml HCl/Aceton (1:6) erhält man einen grünlichen Niederschlag, der nach dem Trocknen 40 % Produkt enthält.

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.45 (4H, d, 7.6 Hz; 2H-2, 2H-2'), 8.93 (4H, d, 7.6 Hz; 2H-3, 2H-3'), 5.76 (4H, s; $2CH_2$).

7.4.4 Darstellung von N-Carboxyethyl-4,4'-bipyridinium-Bromid



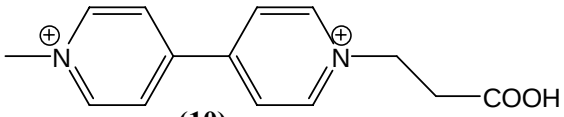
(9)

$C_{13}H_{13}N_2O_2^{+}$
m_{exc} (Kation): 229.097

922 mg Bipyridin (5.90 mmol) werden in 15 ml DCM gelöst. Es werden 993 mg 3-Brompropansäure (6.5 mmol, 1.1 eq) zugegeben und 30 h unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit viel DCM gewaschen. Man erhält 485 mg Produkt (27 %).

ESI-MS: m/z (%) 229.2 (18) $[M]^{+\bullet}$, 157.1 (100) $[Bipyridin+H]^+$
^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.28 (2H, d, 6.4 Hz; 2H-2), 8.89 (2H, d, 5.3 Hz; 2H-2'), 8.65 (2H, d, 6.4 Hz; 2H-3), 8.16 (2H, d, 5.3 Hz; 2H-3'), 4.85 (2H, t, 6.6 Hz; CH_2-3), 3.15 (2H, t, 6.6 Hz; CH_2-2).

7.4.5 Darstellung von N-Carboxyethyl-N'-methyl-4,4'-bipyridinium-Iodid



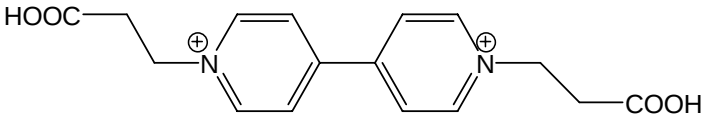
(10)

$C_{14}H_{16}N_2O_2^{2+}$
m_{exc} (Kation): 244.12

3.06 g **6** (10.3 mmol) werden in 12 ml $CHCl_3$ gelöst. Es werden 27 ml Acrylsäure (396 mmol, 40 eq) zugegeben und 48 h unter Lichtschutz gerührt. Der orange Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält 2.52 g des orangen Produktes (63 %).[322]

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.14 (2H, d, 6.6 Hz; 2H-2), 9.0 (2H, d,6.6 Hz; 2H-2'), 8.49 (4H, m; 2H-3, 2H-3'), 4.98 (2H, t, 6.2 Hz; CH_2-3), 4.43 (3H, s; CH_3), 3.20 (2H, t, 6.2 Hz; CH_2-2).

7.4.6 Darstellung von N,N'-Di(carboxyethyl)-4,4'-bipyridinium-Bromid



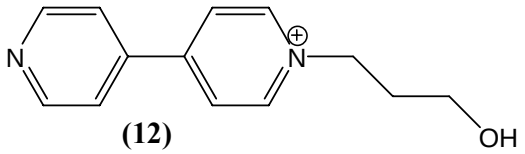
(11)

$C_{16}H_{18}N_2O_4^{2+}$
m_{exc}(Kation): 302.126

1.0 g Bipyridin (6.4 mmol) werden in 10 ml $CHCl_3$ gelöst. Es werden 15 ml Acrylsäure (220 mmol, 34 eq) zugegeben und 60 h unter Lichtschutz gerührt. Nach Zugabe von 20 ml HCl/Aceton (6:1) wird der weiße Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Man erhält 2.54 g des weißen Produktes (100 %).[322]

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 9.14 (4H, d, 5.3 Hz; 2H-2, 2H-2'), 9.50 (4H, d, 5.3 Hz; 2H-3, 2H-3'), 4.98 (4H, t, 6.2 Hz; 2CH_2-3), 3.18 (4H, t, 6.2 Hz; 2CH_2-2).

7.4.7 Darstellung von N-(1-Hydroxypropyl)-4,4'-bipyridinium-Bromid

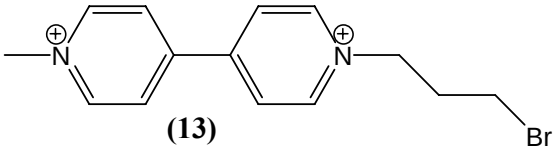


(12)

$C_{13}H_{15}N_2O^+$
m_{exc}(Kation): 215.118

2.07 g Bipyridin (13.2 mmol) werden in 20 ml MeCN gelöst. Es werden 1.15 ml 3-Brom-1-propanol (13.2 mmol, 1 eq) zugegeben und 7 Tage unter Lichtschutz gerührt. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält 1.82 g des weißen Produktes (47 %).
^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.26 (2H, d, 6.7 Hz; 2H-2), 8.90 (2H, d, 6.1 Hz; 2H-2'), 8.67 (2H, d, 6.7 Hz; 2H-3), 8.08 (2H, d, 6.1 Hz; 2H-3'), 4.73 (2H, t, 7.0 Hz; CH_2-3), 3.55 (2H, t, 5.8 Hz; CH_2-1), 2.16 (2H, m; CH_2-2).

7.4.8 Darstellung von N-(1-Brompropyl)-N'-methyl-4,4'-bipyridinium-Bromid



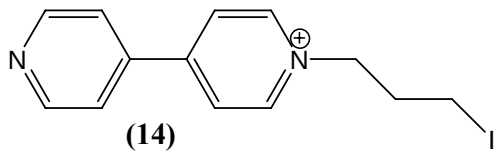
(13)

$C_{14}H_{17}BrN_2^{2+}$
m_{exc}(Kation): 292.056

825 mg **6** (2.77 mmol) werden in 20 ml MeCN gelöst. Es werden 0.5 ml 1,3-Dibrompropan (4.8 mmol, 1.7 eq) unter Lichtschutz zugegeben und 48 h unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert, aus Ethanol umkristallisiert und getrocknet. Man erhält 300 mg des roten Produktes in Form (22 %).

ESI-MS: m/z (%) 293.2 (14) $[M+H]^{+\bullet}$, 171.3 (100) $[M-C_3H_6Br]^+$, 157.3 (20) $[Bipyridin+H]^+$
^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.38 (2H, d, 6.6 Hz; 2H-2'), 9.28 (2H, d,6.6 Hz; 2H-3'), 8.79 (2H, d, 6.8 Hz; 2H-2), 8.74 (2H, d, 6.8 Hz; 2H-3), 4.82 (2H, t, 7.0 Hz; CH_2-3), 4.43 (3H, s; CH_3), 3.60 (2H, t, 6.6 Hz; CH_2-1), 3.56 (2H, m; CH_2-2).

7.4.9 Darstellung von N-(1-Iodpropyl)-4,4'-bipyridinium-Iodid



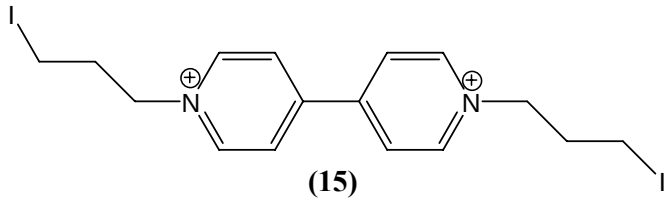
(14)

$C_{13}H_{14}IN_2^+$
m_{exc}(Kation): 325.02

850 mg Bipyridin (5.4 mmol) werden mit 7 ml 1,3-Diiodpropan (60 mmol, 12 eq) versetzt und unter Lichtschutz 60 h gerührt. Der orange Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält 2.34 g des Produktes (96 %).

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.21 (2H, d, 7.0 Hz; 2H-2), 8.88 (2H, d, 6.2 Hz; 2H-2'), 8.67 (2H, d, 7.0 Hz; 2H-3), 8.02 (2H, d, 6.2 Hz; 2H-3'), 4.68 (2H, t, 7.0 Hz; CH_2-3), 3.28 (2H, t, 7.1 Hz; CH_2-1), 2.52 (2H, m; CH_2-2).

7.4.10 Darstellung von NN'-Di(1-iodpropyl)-4,4'-bipyridinium-Iodid



(15)

$C_{16}H_{20}I_2N_2^{2+}$
m_{exc}(Kation): 493.97

1.01 g **14** (2.24 mmol) werden in 30 ml MeCN aufgeschlämmt und mit 2 ml 1,3-Diiodpropan (17 mmol, 7.6 eq) versetzt und unter Lichtschutz 18 h gerührt. Der braune Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält 991 mg des Produktes (59 %).

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 9.39 (4H, d, 6.5 Hz; 2H-2, 2H-2'), 9.80 (4H, d, 6.4 Hz; 2H-3, 2H-3'), 4.78 (4H, t, 7.0 Hz; 2CH_2-3), 3.29 (4H, t, 7.2 Hz; 2CH_2-1), 2.58 (4H, m; 2CH_2-2).

7.5 Synthese von Peptiden

7.5.1 Allgemeines

Die Peptide werden nach der *Fmoc*-Strategie auf der Grundlage eines Syntheseprotokolls der Arbeitsgruppe Kessler (TU München) dargestellt. Es werden Aminosäuren verwendet, deren Seitenketten mit im Sauren abspaltbaren Schutzgruppen versehen sind (vgl. Tabelle 2-2). Für den Einsatz zur Synthese Peptid-modifizierter Oligonukleotide werden Lysine eingesetzt, deren Seitenketten *Alloc*-geschützt sind. Die Synthese wird in Spritzen durchgeführt, die mit Fritten versehen sind.

AAV1: Belegung des TCP-Harzes

Pro 1 g TCP-Harz werden 1.2 eq Aminosäure in 10 ml absolutem DCM gelöst. Ein Drittel der DIPEA-Menge (2.5 eq) wird dieser Lösung hinzugefügt und dem in einer Spritze befindlichen trockenen TCP-Harz zugegeben. Nach 5 min Schütteln gibt man den Rest des DIPEA zu und schüttelt weitere 60 min. Es werden 5 ml Methanol zugesetzt, um letzte freie OH-Gruppen zu blockieren, und schüttelt 15 min. Danach wird jeweils fünfmal mit ca. 15 ml DCM, NMP und Methanol gewaschen, wobei man langsam mit Mischungen von NMP auf Methanol übergeht, um ein Verklumpen des TCP-Harzes zu vermeiden. Anschließend wird das TCP-Harz in einem Exsikkator über P_2O_5 mindestens acht Stunden getrocknet.

Die Belegung errechnet sich nach folgender Formel:

$$c\left[\frac{mol}{g}\right] = \frac{m_{belegt} - m_{unbelegt}}{(M - 36.461)\cdot m_{belegt}}$$

mit: $m_{unbelegt}$: Masse TCP vor Belegung

m_{belegt}: Masse TCP nach Belegung

M: Molmasse der *Fmoc*-Aminosäure

Typische Belegungsgrade hängen von der verwendeten Aminosäure ab und liegen zwischen 0.5-0.8 mmol/g.

AAV2: Kupplung der Peptide

Das getrocknete und belegte Harz wird in einer Spritze eingewogen und gegebenenfalls unter Lichtschutz gehalten. Vor dem Beginn der eigentlichen Synthese lässt man das trockene Harz etwa 1 h in dem entsprechenden Lösungsmittel quellen. Das nachfolgende Kupplungsprotokoll ist exemplarisch für eine Synthese mit 300 mg Harz nach der HOBt/TBTU-Methode dargestellt. Alternativ kann statt NMP auch DMF verwendet werden.

Tabelle 7-1: Syntheseprotokoll für eine Festphasensynthese von Peptiden nach der *Fmoc*-Strategie.

Anzahl	*Volumen*	*Lösung*	*Schritt*	*Dauer pro Schritt*
1	10 ml	NMP	Quellen	60 min
3	5 ml	20 % Piperidin in NMP	*Fmoc*-Abspaltung	10 min
5	5 ml	NMP	Waschen	
1 (oder 2)		Kupplungslösung **A** (oder **B**)	Kuppeln	60-120 min
5	5 ml	NMP	Waschen	
		entweder	*Fmoc*-Abspaltung	
		oder		
5	5 ml	DCM	Vorbereiten zum Trocknen	

Kupplungslösung **A**: 2 eq Aminosäure, 2 eq HOBt, 2 eq TBTU, 1.3 eq DIPEA pro saurer Gruppe (Normalfall 5.4 eq)

Kupplungslösung **B**: 1.5 eq Aminosäure, 1.5 HOBt, 1.5 TBTU, 1.3 eq DIPEA pro saurer Gruppe

AAV3: Abspaltung vom TCP-Harz

Die Abspaltung erfolgt nach folgendem Schema:

Tabelle 7-2: Protokoll für die Abspaltung des Peptids vom Träger.

Anzahl	*Volumen*	*Lösung*	*Schritt*	*Dauer pro Schritt*
3	10 ml	Abspaltlösung	Abspalten	60-120 min
3	7 ml	DCM	Spülen	

Anschließend wird das Flüssigkeitsvolumen im Vakuum auf 30-50 % reduzieren. Das Peptid wird aus 15 ml kaltem Diethylether (0°C) ausgefällt.

Tabelle 7-3: Abspaltlösungen.

Methode	***Lösung***	***Bemerkungen***
Standardmethode	95 % TFA in H_2O	Peptid fällt als Seitenketten entschütztes Trifluoracetat an.
Bei Tryptophan, Cytosin, Threonin	TFA/TIPS/ H_2O (95:4:1)	Peptid fällt als Seitenketten entschütztes Trifluoracetat an.
Bei Arginin	85.5 % TFA, 2.0 % H_2O, 2.5 % Ethandithiol, 5 % Phenol, 5 % Thioanisol	Peptid wird nochmals aus Diethylether ausgefällt und zur Entfernung der Thiole mit ^{t}Butanol/ H_2O lyophilisiert. Man erhält das Seitenketten entschützte Peptid.
Vollgeschütztes Peptid	20 % HFIP in DCM	Das Peptid erhält man vollgeschützt. Wird auf eine finale Piperidinbehandlung im Kupplungszyklus verzichtet, so verbleibt das Peptid *Fmoc*-geschützt.

Bestimmung der Peptidkonzentration

Von den Peptiden werden Stammlösungen hergestellt, deren Konzentration über Messungen der optischen Dichte berechnet wird. Es gelten die folgenden molaren Extinktions-koeffizienten. Bei mehreren Chromophoren in einem Peptid werden die Koeffizienten aufaddiert.

Tabelle 7-4: Übersicht über die Extinktionskoeffizienten der Chromophore in den synthetisierten Peptiden.

	Chromophor	***Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$]***
ε_{280}	Tryptophan	5600
ε_{275}	Tyrosin	1400
ε_{257}	Phenylalanin	197
ε_{270}	*para*-Nitrobenzoesäure	16000

Fehlen chromophore Gruppen, wird die Konzentration aus der Einwaage des Peptids berechnet.

7.5.2 Charakterisierung der synthetisierten Peptide

Die Peptide werden nach **AAV1-AAV3** synthetisiert und sind im Folgenden im Einbuchstaben- oder Dreibuchstabencode angegeben.

7.5.2.1 Oligolysine

Charakterisierung von KKK:

ESI-MS: m/z (%) 441.5 (12) $[M+K]^+$, 403.6 (100) $[M+H]^+$, 202.5 (10) $[M+2H]^{2+}$

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 4.25 (2H, m; 2H-α), 3.95 (1H, t, 6.5 Hz; H-α), 2.90 (6H, m; 6H-ε), 1.9-1.5 (12H, m; 6H-δ, 6H-β), 1.5-1.3 (6H, m; 6H-γ)

Charakterisierung von pNB-K:

ESI-MS: m/z (%) 296.2 (100) $[M+H]^+$, 280.3 (10) $[M-NH_2]^+$

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 8.25 (2H, d, 8.7 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.85 (2H, d, 8.7 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 4.5 (1H, dd, 5.3 bzw. 9.0 Hz; H-α (K)), 2.9 (2H, t, 7.4 Hz; 2H-ε (K)), 2.0-1.75 (2H, m; 2H-δ (K)), 1.65 (2H, m;2H-β (K)), 1.45 (2H, m; 2H-γ (K))

Charakterisierung von pNB-KK:

ESI-MS: m/z (%) 847.2 (15) $[2M+H]^+$, 424.3 (100) $[M+H]^+$, 212.7 (20) $[M+2H]^{2+}$

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 8.3 (2H, d, 8.75 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.9 (2H, d, 8.75 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 4.5-4.3 (2H, m; 2H-α (K)), 2.95 (4H, m; 4H-ε (K)), 2.0-1.3 (12H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K), 4H-γ (K))

Charakterisierung von pNB-KKK:

ESI-MS: m/z (%) 552.4 (100) $[M+H]^+$, 536.5 (20) $[M-NH_2]^+$, 276.9 (30) $[M+2H]^{2+}$

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 8.25 (2H, d, 8.75 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.85 (2H, d, 8.75 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 4.45 (1H, m; H-α (K)), 4.25 (2H, m; 2H-α (K)), 2.9 (6H, m; 6H-ε (K)), 1.9-1.55 (12H, m; 6H-δ (K), 6H-β(K)), 1.5-1.3 (6H, m; 6H-γ (K))

7.5.2.2 Tripeptide mit aromatischer Aminosäure

Charakterisierung von KFK:

ESI-MS: m/z (%) 422.6 (100) $[M+H]^+$, 211.9 (28) $[M+2H]^{2+}$

^{1}**H-NMR** (250 MHz, D_2O): δ = 7.2 (5H, m; 5 Phenyl-H (F)), 4.55 (1H, t, 7.8 Hz; H-α), 4.13 (1H, dd, 6.0 bzw. 8.0 Hz; H-α), 3.88 (1H, t, 6.6 Hz; H-α), 3.03 (2H, d, 7.8 Hz; 2H-β (F)), 2.9 (4H, m; 4H-ε (K)), 1.9-1.5 (8H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K)), 1.4-1.2 (4H, m; 4H-γ (K))

Charakterisierung von KYK:

ESI-MS: m/z (%) 438.4 (100) $[M+H]^+$, 219.9 (30) $[M+2H]^{2+}$

^{1}**H-NMR** (250 MHz, D_2O): δ = 7.10 (2H, d, 8.4 Hz; *meta*-H (Y)), 6.76 (2H, d, 8.4 Hz; *ortho*-H (Y)), 4.50 (1H, t, 7.7 Hz; H-α), 4.08 (1H, m; H-α), 3.89 (1H, t, 6.5 Hz; H-α), 3.0-2.8 (6H, m; 2H-β (Y), 4H-ε (K)), 1.83-1.50 (8H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K)), 1.59-1.10 (4H, m; 4H-γ (K))

Charakterisierung von KWK:

ESI-MS: m/z (%) 921.3 (36) $[2M+H]^+$, 461.4 (100) $[M+H]^+$, 231.4 (28) $[M+2H]^{2+}$

^{1}**H-NMR** (250 MHz, D_2O): δ = 7.59 (1H, d, 7.8 Hz; H-4 (W)), 7.4 (1H, d, 8.0 Hz; H-7 (W)), 7.18 (1H, s; H-2 (W)), 7.05 (2H, m; H-5, H-6 (W)), 4.6 (1H, m; H-α), 4.05 (1H, m; H-α), 3.88 (1H, t, 6.6 Hz; H-α), 3.2 (2H, d, 7.7 Hz; 2H-β (W)), 2.9 (2H, t, 7.6 Hz; 2H-ε (K)), 2.75 (2H, t, 7.6 Hz; 2H-ε (K)), 1.9-1.4 (8H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K)), 1.3 (2H, m; 2H-γ (K)), 1.1 (2H, m; 2H-γ (K))

Charakterisierung von pNB-KFK:

ESI-MS: m/z (%) 1141.4 (15) $[2M+H]^+$, 571.4 (100) $[M+H]^+$, 286.5 (45) $[M+2H]^{2+}$

^{1}**H-NMR** (250 MHz, D_2O): δ = 8.3 (2H, d, 8.7 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.85 (2H, d, 8.7 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 7.2 (5H, m; 5 Phenyl-H (F)), 4.55 (1H, m; H-α), 4.4 (1H, m; H-α), 4.25 (1H, m; H-α), 3.2-2.9 (2H, m; 2H-β (F)), 2.9 (4H, m; 4H-ε (K)), 1.9-1.55 (8H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K)), 1.4-1.2 (4H, m; 4H-γ (K))

Charakterisierung von pNB-KYK:

ESI-MS: m/z (%) 587.5 (100) $[M+H]^+$, 571.4 (20) $[M-NH_2]^+$, 294.4 (60) $[M+2H]^{2+}$

^{1}**H-NMR** (250 MHz, D_2O): δ = 8.28 (2H, d, 8.8 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.8 (2H, d, 8.8 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 7.05 (2H, d, 8.5 Hz; *meta*-H (Y)), 6.6 (2H, d, 8.5 Hz; *ortho*-H (Y)), 4.55

(1H, m; H-α), 4.4-4.2 (2H, m; 2H-α), 3.1-2.8 (6H, m; 2H-β (Y), 4H-ε (K)), 1.9-1.5 (8H, m; 4H-δ (K), 4H-β(K)), 1.45-1.15 (4H, m; 4H-γ (K))

Charakterisierung von pNB-KWK:

ESI-MS: m/z (%) 1219.4 (20) $[2M+H]^+$, 610.4 (100) $[M+H]^+$, 594.6 (10) $[M-NH_2]^+$, 305.9 (75) $[M+2H]^{2+}$

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 8.22 (2H, d, 8.8 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.65 (2H, d, 8.8 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 7.50 (1H, d, 8.2 Hz; H-4 (W)), 7.25 (1H, d, 7.6 Hz; H-7 (W)), 7.10 (1H, s; H-2 (W)), 7.0 (2H, m; H-5, H-6 (W)), 4.6 (1H, m; H-α), 4.3-4.1 (2H, m; 2H-α), 3.25 (2H, d, 6.6 Hz; 2H-β (W)), 2.85 (2H, t, 7.6 Hz; 2H-ε (K)), 2.75 (2H, t, 7.8 Hz; 2H-ε (K)), 1.8-1.1 (12H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K)), 4H-γ (K))

7.5.2.3 Tripeptide mit nukleophiler Aminosäure

Charakterisierung von KCK:

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 4.5 (1H, m; H-α), 4.25 (1H, m; H-α), 4.0 (1H, m; H-α), 2.95 (6H, m; 4H-ε(K), 2H-β (C)), 1.85 (4H, m; 4H-δ (K)), 1.65 (4H, m; 4H-β (K)), 1.4 (4H, m; 4H-γ(K))

Charakterisierung von KTK:

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 4.27 (2H, m; 2H-α), 4.15-4.0 (2H, m;1H-α, 1H-β(T)), 2.95 (4H, m; 4H-ε(K)), 1.85 (4H, m; 4H-δ (K)), 1.65 (4H, m; 4H-β (K)), 1.4 (4H, m; 4H-γ(K)), 1.2 (3H, d, 6.4 Hz; 3H-γ (T))

Charakterisierung von pNB-KCK:

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 8.3 (2H, d, 8.0 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.9 (2H, d, 8.0 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 4.5 (2H, m; 2H-α), 4.3 (1H, m; H-α), 2.95 (6H, m; 4H-ε(K), 2H-β (C)), 2.0-1.3 (12H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K), 4H-γ(K))

Charakterisierung von pNB-KTK:

^{1}H-NMR (250 MHz, D_2O): δ = 8.3 (2H, d, 8.5 Hz; *meta*-H (**pNB**)), 7.9 (2H, d, 8.5 Hz; *ortho*-H (**pNB**)), 4.55 (1H, m; H-α), 4.3 (2H, m; 2H-α), 4.1 (2H, m; 1H-β(T)), 2.95 (4H, m; 4H-ε(K)), 1.9-1.3 (12H, m; 4H-δ (K), 4H-β (K), 4H-γ(K)), 1.2 (3H, d, Hz; 3H-γ (T))

7.5.2.4 Längere Oligopeptide

Die NMR-Daten wurden aus **HSQC, HMBC, TOCSY** und **ROESY** ermittelt. Einzelne Signalzuordnungen können fehlen. Die Multiplizitäten und Integrale entsprachen den Erwartungen, werden aber aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Kopplungskonstanten wurden nicht explizit bestimmt, da sie für eine sequentielle Zuordnung nicht benötigt wurden. Die Aminosäuren sind beginnend beim N-Terminus durchnummeriert, diastereotope Protonen werden mit „u“ (upfield, hochfeldverschoben) und „d“ (downfield, tieffeldverschoben) bezeichnet. Aufgrund der Signalintensitäten von HK1:HK2 (HK1>HK2) und der größeren Stabilität von trans-Amidbindungen an Prolin gegenüber der cis-Konformation, wird HK1 als trans-Konformation an Pro1 und HK2 als cis-Form an Pro1 angenommen.

***Charakterisierung von* P1**: **pNB**-P-R-G-R-P-G

ESI-MS: m/z (%) 788.3 (5) $[M+H]^+$, 731.6 (10) $[(M-CH_2N_3)+H]^+$, 395.1 (30) $[M+2H]^{2+}$, 366.9 (100) $[(M-CH_2N_3)+2H]^{2+}$

Es lassen sich in Analogie zu **P2** und **P3** zwei Hauptkonformere (HK1, HK2 (7:5)) bestimmen, daneben existieren noch weitere Konformationen.

HK1: **^{1}H-NMR** (600 MHz, H_2O/D_2O 9:1):
δ = 8.32 (*ortho*-H (**pNB**)), 7.76 (*meta*-H (**pNB**)); 4.57 (H-α (P1)), 2.39 (H-βd (P1)), 1.93 (H-βu (P1)), 3.57 (H-δd (P1)), 3.52 (H-δu (P1)), 1.95 (H-γd (P1)), 1.90 (H-γu (P1)); 4.36 (H-α (R2)), 1.83 (H-βd (R2)), 1.78 (H-βu (R2)), 3.19 (H-δ (R2)), 7.17 (H-ε (R2)), 1.67 (H-γd (R2)),

1.63 (H-γu (R2)), 8.59 (HN (R2)); 3.96 (H-α (G3)), 8.42 (HN (G3)); 4.62 (H-α (R4)), 1.83 (H-βd (R4)), 1.72 (H-βu (R4)), 3.15 (H-δ (R4)), 7.14 (H-ε (R4)), 1.65 (H-γ (R4)), 8.40 (HN (R4)); 4.42 (H-α (P5)), 2.28 (H-βd (P5)), 1.95 (H-βu (P5)), 3.80 (H-δd (P5)), 3.64 (H-δu (P5)), 2.01 (H-γd (P5)), 1.97 (H-γu (P5)); 3.82 (H-α (G6)), 8.09 (HN (G6)).

HK1: **^{13}C-NMR** (150 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 170.3 (CO (**pNB**)), 128.5 (*meta*-C (**pNB**)), 124.4 (*ortho*-C (**pNB**)), 149.2 (*para*-C (**pNB**)), 141.5 (*ipso*-C (**pNB**)); 61.2 (C-α (P1)), 30.4 (C-β (P1)), 51.2 (C-δ (P1)), 25.5 (C-γ (P1)), 174.5 (CO (P1)); 53.7 (C-α (R2)), 28.6 (C-β (R2)), 41.2 (C-δ (R2)), 24.8 (C-γ (R2)), 173.9 (CO (R2)), 157.5 (C-ζ (R2)); 42.9 (C-α (G3)), 174.7 (CO (G3)); 51.8 (C-α (R4)), 28.0 (C-β (R4)), 41.2 (C-δ (R4)), 24.7 (C-γ (R4)), 172.1 (CO (R4)); 61.2 (C-α (P5)), 29.9 (C-β (P5)), 48.5 (C-δ (P5)), 25.1 (C-γ (P5)), 174.4 (CO (P5)); 43.2 (C-α (G6)), 175.7 (CO (G6)).

HK2: **^{1}H-NMR** (600 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 8.30 (*ortho*-H (**pNB**)), 7.60 (*meta*-H (**pNB**)); 4.44 (H-α (P1)), 2.37 (H-βd (P1)), 1.90 (H-βu (P1)), 3.73 (H-δu (P1)), 1.99 (H-γ (P1)); 3.84 (H-α (R2)), 1.48 (H-βd (R2)), 1.29 (H-βu (R2)), 3.00 (H-δ (R2)), 7.08 (H-ε (R2)), 1.67 (H-γd (R2)), 1.18 (H-γu (R2)), 8.17 (HN (R2)); 3.88 (H-αd (G3)), 3.84 (H-αu (G3)), 8.33 (HN (G3)); 4.55 (H-α (R4)), 1.81 (H-βd (R4)), 1.67 (H-βu (R4)), 3.17 (H-δ (R4)), 7.16 (H-ε (R4)), 1.62 (H-γ (R4)), 8.36 (HN (R4)); 4.37 (H-α (P5)), 2.25 (H-βd (P5)), 1.85 (H-βu (P5)), 3.75 (H-δd (P5)), 3.62 (H-δu (P5)), 2.01 (H-γd (P5)), 1.97 (H-γu (P5)); 3.83 (H-α (G6)), 8.07 (HN (G6)).

HK2: **^{13}C-NMR** (150 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 170.9 (CO (**pNB**)), 128.3 (*meta*-C (**pNB**)), 124.4 (*ortho*-C (**pNB**)), 148.8 (*para*-C (**pNB**)), 142.0 (*ipso*-C (**pNB**)); 62.4 (C-α (P1)), 32.3 (C-β (P1)), 48.6 (C-δ (P1)), 23.4 (C-γ (P1)), 174.2 (CO (P1)); 54.0 (C-α (R2)), 28.4 (C-β (R2)), 41.0 (C-δ (R2)), 25.2 (C-γ (R2)), 173.5 (CO (R2)), 157.5 (C-ζ (R2)); 42.8 (C-α (G3)), 174.2 (CO (G3)); 51.7 (C-α (R4)), 28.0 (C-β (R4)), 41.1 (C-δ (R4)), 24.6 (C-γ (R4)), 172.0 (CO (R4)); 61.2 (C-α (P5)), 29.9 (C-β (P5)), 48.5 (C-δ (P5)), 25.1 (C-γ (P5)), 174.4 (CO (P5)); 43.1 (C-α (G6)), 175.7 (CO (G6)).

***Charakterisierung von* P2**: **pNB**-P-R-G-R-P-K-K

ESI-MS: m/z (%) 987.5 (5) $[M+H]^+$, 494.6 (35) $[M+2H]^{2+}$, 486.6 (26) $[(M-NH_2)+2H]^{2+}$, 330.4 (100) $[M+3H]^{3+}$, 325.0 (58) $[(M-NH_2)+3H]^{3+}$

Es lassen sich zwei Hauptkonformationen (HK1 und HK2 (2:1)) bestimmen.

HK1: **^{1}H-NMR** (600 MHz, H_2O/D_2O 9:1):
δ = 8.33 (*ortho*-H (**pNB**)), 7.76 (*meta*-H (**pNB**)); 4.58 (H-α (P1)), 2.40 (H-βd (P1)), 1.96 (H-βu (P1)), 3.55 (H-δ (P1)), 1.90 (H-γ (P1)); 4.38 (H-α (R2)), 1.90 (H-βd (R2)), 1.79 (H-βu (R2)), 3.20 (H-δ (R2)), 7.16 (H-ε (R2)), 1.71 (H-γd (R2)), 1.67 (H-γu (R2)), 8.63 (HN (R2)), 6.64 (H-ζ (R2)); 3.94 (H-α (G3)), 8.40 (HN (G3)); 4.61 (H-α (R4)), 1.82 (H-βd (R4)), 1.69 (H-βu (R4)), 3.16 (H-δ (R4)), 7.16 (H-ε (R4)), 1.64 (H-γ (R4)), 8.16 (HN (R4)), 6.64 (H-ζ (R4)); 4.39 (H-α (P5)), 2.28 (H-βd (P5)), 1.87 (H-βu (P5)), 3.79 (H-δd (P5)), 3.60 (H-δu (P5)), 1.99 (H-γ (P5)); 4.25 (H-α (K6)), 1.81 (H-βd (K6)), 1.73 (H-βu (K6)), 1.66 (H-δ (K6)), 2.98 (H-ε (K6)), 1.44 (H-γ (K6)), 8.09 (HN (K6)), 7.49 (H-ζ (K6)); 4.18 (H-α (K7)), 1.80 (H-βd (K7)), 1.70 (H-βu (K7)), 1.65 (H-δ (K7)), 2.95 (H-ε (K7)), 1.38 (H-γ (K7)), 8.04 (HN (K7)), 7.49 (H-ζ (K7)).
HK1: **^{13}C-NMR** (150 MHz, H_2O/D_2O 9:1):
δ = 170.4 (CO (**pNB**)), 128.7 (*meta*-C (**pNB**)), 124.5 (*ortho*-C (**pNB**)), 149.2 (*para*-C (**pNB**)), 141.5 (*ipso*-C (**pNB**)); 61.4 (C-α (P1)), 30.3 (C-β (P1)), 51.2 (C-δ (P1)), 25.5 (C-γ (P1)), 174.7 (CO (P1)); 54.0 (C-α (R2)), 28.6 (C-β (R2)), 41.1 (C-δ (R2)), 25.0 (C-γ (R2)), 174.7 (CO (R2)), 157.4 (C-ζ (R2)); 42.8 (C-α (G3)), 171.4 (CO (G3)); 51.7 (C-α (R4)), 28.0 (C-β (R4)), 41.2 (C-δ (R4)), 24.5 (C-γ (R4)), 172.0 (CO (R4)), 157.4 (C-ζ (R4)); 60.9 (C-α (P5)), 30.0 (C-β (P5)), 48.4 (C-δ (P5)), 25.2 (C-γ (P5)), 174.5 (CO (P5)); 54.2 (C-α (K6)), 31.0 (C-β (K6)), 26.9 (C-δ (K6)), 40.0 (C-ε (K6)), 22.5 (C-γ (K6)), 173.7 (CO (K6)); 54.8 (C-α (K7)), 31.3 (C-β (K7)), 27.0 (C-δ (K7)), 22.5 (C-γ (K7)), 177.9 (CO (K7)).

HK2: **^{1}H-NMR** (600 MHz, H_2O/D_2O 9:1):
δ = 8.31 (*ortho*-H (**pNB**)), 7.61 (*meta*-H (**pNB**)); 4.46 (H-α (P1)), 2.38 (H-βd (P1)), 1.94 (H-βu (P1)), 3.75 (H-δd (P1)), 3.70 (H-δu (P1)), 1.99 (H-γ (P1)); 4.84 (H-α (R2)), 1.54 (H-βd (R2)), 1.34 (H-βu (R2)), 3.00 (H-δ (R2)), 7.08 (H-ε (R2)), 1.19 (H-γ (R2)), 8.20 (HN (R2)), 6.64 (H-ζ (R2)); 3.87 (H-α (G3)), 8.33 (HN (G3)); 4.59 (H-α (R4)), 1.81 (H-βd (R4)), 1.68 (H-βu (R4)), 3.17 (H-δ (R4)), 7.16 (H-ε (R4)), 1.63 (H-γ (R4)), 8.10 (HN (R4)), 6.64 (H-ζ

(R4)); 4.39 (H-α (P5)), 2.26 (H-βd (P5)), 1.89 (H-βu (P5)), 3.78 (H-δd (P5)), 3.59 (H-δu (P5)), 2.00 (H-γ (P5)); 4.26 (H-α (K6)), 1.81 (H-βd (K6)), 1.73 (H-βu (K6)), 1.45 (H-δ (K6)), 2.98 (H-ε (K6)), 1.44 (H-γ (K6)), 8.38 (HN (K6)), 7.49 (H-ζ (K6)); 4.19 (H-α (K7)), 1.80 (H-βd (K7)), 1.70 (H-βu (K7)), 1.65 (H-δ (K7)), 2.96 (H-ε (K7)), 1.37 (H-γ (K7)), 8.05 (HN (K7)), 7.49 (H-ζ (K7)).

HK2: **^{13}C-NMR** (150 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 170.9 (CO (**pNB**)), 128.4 (*meta*-C (**pNB**)), 124.6 (*ortho*-C (**pNB**)), 148.9 (*para*-C (**pNB**)), 142.0 (*ipso*-C (**pNB**)); 62.6 (C-α (P1)), 32.3 (C-β (P1)), 48.6 (C-δ (P1)), 23.4 (C-γ (P1)), 174.3 (CO (P1)); 54.4 (C-α (R2)), 28.5 (C-β (R2)), 41.1 (C-δ (R2)), 25.2 (C-γ (R2)), 174.3 (CO (R2)), 157.4 (C-ζ (R2)); 42.7 (C-α (G3)), 171.3 (CO (G3)); 51.6 (C-α (R4)), 28.0 (C-β (R4)), 41.2 (C-δ (R4)), 24.7 (C-γ (R4)), 172.0 (CO (R4)), 157.4 (C-ζ (R4)); 60.9 (C-α (P5)), 30.0 (C-β (P5)), 48.4 (C-δ (P5)), 25.2 (C-γ (P5)), 174.5 (CO (P5)); 54.2 (C-α (K6)), 31.0 (C-β (K6)), 26.9 (C-δ (K6)), 40.0 (C-ε (K6)), 22.5 (C-γ (K6)), 173.7 (CO (K6)); 54.8 (C-α (K7)), 31.2 (C-β (K7)), 27.0 (C-δ (K7)), 22.5 (C-γ (K7)), 177.9 (CO (K7)).

***Charakterisierung von* P3: pNB**-P-R-K-S-P-R-K

ESI-MS: m/z (%) 1017.5 (5) $[M+H]^+$, 509.6 (40) $[M+2H]^{2+}$, 501.6 (30) $[(M-NH_2)+2H]^{2+}$, 340.4 (100) $[M+3H]^{3+}$, 335.0 (70) $[(M-NH_2)+3H]^{3+}$

Es lassen sich zwei Hauptkonformationen (HK1 und HK2 (4:3)) bestimmen.

HK1: **^{1}H-NMR** (600 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 8.32 (*ortho*-H (**pNB**)), 7.74 (*meta*-H (**pNB**)); 4.56 (H-α (P1)), 2.38 (H-βd (P1)), 1.93 (H-βu (P1)), 3.56 (H-δd (P1)), 3.51 (H-δu (P1)), 1.95 (H-γd (P1)), 1.89 (H-γu (P1)); 4.36 (H-α (R2)), 1.85 (H-βd (R2)), 1.77 (H-βu (R2)), 3.18 (H-δ (R2)), 7.14 (H-ε (R2)), 1.67 (H-γd (R2)), 1.64 (H-γu (R2)), 8.57(HN (R2)); 4.32 (H-α (K3)), 1.78 (H-βd (K3)), 1.69 (H-βu (K3)), 1.38 (H-δ (K3)), 2.94 (H-ε (K3)), 1.62 (H-γ (K3)), 8.37 (HN (K3)), 7.48 (H-ζ (K3)); 4.72 (H-α (S4)), 3.83 (H-βd (S4)), 3.79 (H-βu (S4)), 8.34 (HN (S4)); 4.42 (H-α (P5)), 2.26 (H-βd (P5)), 1.90 (H-βu (P5)), 3.78 (H-δd (P5)), 3.69 (H-δu (P5)), 1.98 (H-γ (P5)); 4.26 (H-α (R6)), 1.82 (H-βd (R6)), 1.72 (H-βu (R6)), 3.17 (H-δ (R6)), 7.13 (H-ε (R6)), 1.62 (H-γ (R6)), 8.28 (HN (R6)); 4.20 (H-α (K7)), 1.81 (H-βd (K7)), 1.70 (H-βu (K7)), 1.38 (H-δ (K7)), 2.95 (H-ε (K7)), 1.64 (H-γ (K7)), 8.15 (HN (K7)), 7.48 (H-ζ (K7)).

HK1: **^{13}C-NMR** (150 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 170.4 (CO (**pNB**)), 128.6 (*meta*-C (**pNB**)), 124.5 (*ortho*-C (**pNB**)), 149.2 (*para*-C (**pNB**)), 141.5 (*ipso*-C (**pNB**)); 61.3 (C-α (P1)), 30.4 (C-β (P1)), 51.2 (C-δ (P1)), 25.5 (C-γ (P1)), 174.6 (CO (P1)); 53.8 (C-α (R2)), 28.7 (C-β (R2)), 41.1 (C-δ (R2)), 24.9 (C-γ (R2)), 174.0 (CO (R2)), 157.4 (C-ζ (R2)); 53.9 (C-α (K3)), 31.0 (C-β (K3)), 26.9 (C-δ (K3)), 39.9 (C-ε (K3)), 22.5 (C-γ (K3)), 174.2 (CO (K3)); 54.2 (C-α (S4)), 61.2 (C-β (S4)), 170.5 (CO (S4)); 61.0 (C-α (P5)), 30.0 (C-β (P5)), 48.6 (C-δ (P5)), 25.0 (C-γ (P5)), 174.6 (CO (P5)); 53.9 (C-α (R6)), 28.7 (C-β (R6)), 41.1 (C-δ (R6)), 24.8 (C-γ (R6)), 173.5 (CO (R6)), 157.5 (C-ζ (R6)); 54.5 (C-α (K7)), 31.0 (C-β (K7)), 26.9 (C-δ (K7)), 39.9 (C-ε (K7)), 22.5 (C-γ (K7)), 177.6 (CO (K7)).

HK2: **^{1}H-NMR** (600 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 8.29 (*ortho*-H (**pNB**)), 7.59 (*meta*-H (**pNB**)); 4.43 (H-α (P1)), 2.36 (H-βd (P1)), 1.91 (H-βu (P1)), 3.71 (H-δd (P1)), 3.51 (H-δu (P1)), 1.99 (H-γd (P1)), 1.89 (H-γu (P1)); 3.81 (H-α (R2)), 1.50 (H-βd (R2)), 1.29 (H-βu (R2)), 2.99 (H-δ (R2)), 7.06 (H-ε (R2)), 1.17 (H-γ (R2)), 8.15 (HN (R2)); 4.26 (H-α (K3)), 1.74 (H-β (K3)), 1.35 (H-δ (K3)), 2.95 (H-ε (K3)), 1.64 (H-γ (K3)), 8.32 (HN (K3)), 7.48 (H-ζ (K3)); 4.68 (H-α (S4)), 3.80 (H-βd (S4)), 3.76 (H-βu (S4)), 8.31 (HN (S4)); 4.40 (H-α (P5)), 2.24 (H-βd (P5)), 1.89 (H-βu (P5)), 3.76 (H-δd (P5)), 3.68 (H-δu (P5)), 1.97 (H-γ (P5)); 4.25 (H-α (R6)), 1.81 (H-βd (R6)), 1.71 (H-βu (R6)), 3.17 (H-δ (R6)), 7.13 (H-ε (R6)), 1.62 (H-γ (R6)), 8.26 (HN (R6)); 4.20 (H-α (K7)), 1.81 (H-βd (K7)), 1.70 (H-βu (K7)), 1.38 (H-δ (K7)), 2.95 (H-ε (K7)), 1.64 (H-γ (K7)), 8.15 (HN (K7)), 7.48 (H-ζ (K7)).

HK2: **^{13}C-NMR** (150 MHz, H_2O/D_2O 9:1):

δ = 170.9 (CO (**pNB**)), 128.4 (*meta*-C (**pNB**)), 124.6 (*ortho*-C (**pNB**)), 148.8 (*para*-C (**pNB**)), 142.0 (*ipso*-C (**pNB**)); 62.5 (C-α (P1)), 32.3 (C-β (P1)), 48.5 (C-δ (P1)), 23.3 (C-γ (P1)), 174.3 (CO (P1)); 54.1 (C-α (R2)), 28.4 (C-β (R2)), 41.1 (C-δ (R2)), 25.3 (C-γ (R2)), 173.7 (CO (R2)), 157.4 (C-ζ (R2)); 53.9 (C-α (K3)), 31.1 (C-β (K3)), 26.9 (C-δ (K3)), 39.9 (C-ε (K3)), 22.5 (C-γ (K3)), 174.2 (CO (K3)); 54.2 (C-α (S4)), 61.2 (C-β (S4)), 170.5 (CO (S4)); 61.0 (C-α (P5)), 30.0 (C-β (P5)), 48.6 (C-δ (P5)), 25.1 (C-γ (P5)), 174.4 (CO (P5)); 53.9 (C-α (R6)), 28.7 (C-β (R6)), 41.1 (C-δ (R6)), 24.8 (C-γ (R6)), 173.5 (CO (R6)), 157.5 (C-ζ (R6)); 54.5 (C-α (K7)), 31.0 (C-β (K7)), 26.9 (C-δ (K7)), 39.9 (C-ε (K7)), 22.5 (C-γ (K7)), 177.6 (CO (K7)).

7.5.2.5 Oligopeptide für die Synthese von Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten

***Charakterisierung von* pNB-Lys(*alloc*)-Lys(*alloc*)-OH:**

ESI-MS: m/z (%) 1221.4 (20) $[2M+K]^+$, 1183.2 (60) $[2M+H]^+$, 614.4 (20) $[M+Na]^+$, 592.3 (100) $[M+H]^+$.

***Charakterisierung von Fmoc*-Lys(*alloc*)-Trp-Lys(*alloc*)-OH:**

ESI-MS: m/z (%) 1740.5 (5) $[2M+K]^+$, 1723.4 (20) $[2M+Na]^+$, 1701.5 (65) $[2M+H]^+$, 873.6 (24) $[M+Na]^+$, 851.5 (100) $[M+H]^+$.

***Charakterisierung von* pNB-Lys(*alloc*)-Trp-Lys(*alloc*)-OH:**

ESI-MS: m/z (%) 1555.4 (60) $[2M+H]^+$, 1577.4 (20) $[2M+Na]^+$, 778.4 (100) $[M+H]^+$, 800.6 (100) $[M+Na]^+$.

7.6 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden

7.6.1 Verwendete Oligonukleotidsequenzen

Oligonukleotide mit einem PydU-Nukleotid

D1 3'-TCA-GTC-AC**X**-TAC-TGA-CT-5' **X** = PydU
C1 5'-AGT-CAG-TGA-ATG-ACT-GA-3'

D2 3'-TCA-GTC-AT**X**-CAC-TGA-CT-5'
C2 5'-AGT-CAG-TAA-GTG-ACT-GA-3'

D3 3'-TAG-TCA-CA**X**-ATA-CTG-AC-5'
C3 5'-ATC-AGT-GTA-TAT-GAC-TG-3'

D4 3'-TAG-TCA-TA**X**-ACA-CTG-AC-5'
C4 5'-ATC-AGT-ATA-TGT-GAC-TG-3'

D5 3'-CGC-AGC-**X**TT-AAT-CGC-GAG-5'
C7 5'-GCG-TCG-AAA-TTA-GCG-CTC-3'

D6 3'-CGC-AGC-T**X**T-AAT-CGC-GAG-5'
C7 5'-GCG-TCG-AAA-TTA-GCG-CTC-3'

Oligonukleotide mit mehreren PydU-Nukleotiden und Kontrollstränge

H 3'-GTG-**X**CG-AAG-CG**X**-CAC-5' **X** = PydU
C16 5'-CAC-AGC-TTC-GCA-GTG-3'

N1 3'-CAG-TCA-TA**X**-ATA-CTG-AC-5'
C17 5'-GTC-AGT-ATA-TAT-GAC-TG-3'

N2 3’-ACG-TGC-A**XX**-**XXX**-ACG-TGC-A-5’
C18 5’-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3’

N3 3’-ACG-TGC-A**ZX**-**ZXZ**-ACG-TGC-A-5’ **Z**=PtzdU
C18 5’-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3’

N4 3’-ACG-TGC-A**XZ**-**XZX**-ACG-TGC-A-5’
C18 5’-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3’

C19 3’-TGC-ACG-T**AA**-**GAA**-TGC-ACG-T-5’
C20 3’-TGC-ACG-T**AG**-**AGA**-TGC-ACG-T-5’
C21 3’-TGC-ACG-T**GG**-**GGG**-TGC-ACG-T-5’

abasic site-*modifizierte Oligonukleotide und Kontrollstränge*

D3 5’-CAG-TCA-TA**X**-ACA-CTG-AT-3’ **X** = PydU
C3 3’-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-TA-5’

A1 3’-GTC-AGT-AT**S**-TGT-GAC-TA-5’ **S** = *abasic site*
A2 3’-GTC-AGT-A**S**A-TGT-GAC-TA-5’
A3 3’-GTC-AGT-ATA-**S**GT-GAC-TA-5’
A4 3’-GTC-AGT-**S**TA-TGT-GAC-TA-5’
A5 3’-GTC-AGT-ATA-T**S**T-GAC-TA-5’

E 5’-CAG-CAT-GTT-**E**AT-GCT-G-3’ **E** = Ethidiumnukleotid
C5 3’-GTC-GTA-CAA-CTA-CGA-C-5’

A6 3’-GTC-GTA-CAA-**S**TA-CGA-C-5’
A7 3’-GTC-GTA-CA**S**-CTA-CGA-C-5’
A8 3’-GTC-GTA-CAA-C**S**A-CGA-C-5’
A9 3’-GTC-GTA-C**S**A-CTA-CGA-C-5’
A10 3’-GTC-GTA-CAA-CT**S**-CGA-C-5’

PyindC-modifizierte Oligonukleotide

Duplex **S1**	3'-CAG-TCA-GT**A**-**Y**A**T**-GAC-TGA-C-5'	**Y** = Py*in*dC
	5'-GTC-AGT-CA**T**-**I**T**A**-CTG-ACT-G-3'	**I** = 2'-Desoxyinosin
Duplex **S2**	3'-CAG-TCA-GT**G**-**Y**G**T**-GAC-TGA-C-5'	
	5'-GTC-AGT-CA**C**-**I**C**A**-CTG-ACT-G-3'	
Duplex **S3**	3'-GTC-AGT-CA**C**-**Y**C**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**G**-**I**G**T**-GAC-TGA-C-3'	
Duplex **S4**	3'-GTC-AGT-CA**T**-**Y**C**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**A**-**I**G**T**-GAC-TGA-C-3'	
Duplex **S5**	3'-GTC-AGT-CA**C**-**Y**T**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**G**-**I**A**T**-GAC-TGA-C-3'	
Duplex **S6**	3'-GTC-AGT-CA**T**-**Y**T**A**-CTG-ACT-G-5'	
	5'-CAG-TCA-GT**A**-**I**A**T**-GAC-TGA-C-3'	

pNB-*modifizierte Oligonukleotide und unmodifizierte Kontrollstränge*

D3	5'-CAG-TCA-TA**X**-ACA-CTG-AT-3'	**X** = PydU
M1	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-TA-**AN**-**pNB**	**AN** = Aminononanlinker
		pNB = *para*-Nitrobenzoyl
E	5'-CAG-CAT-GTT-**E**AT-GCT-G-3'	**E** = Ethidium
M2	3'-GTC-GTA-CAA-CTA-CGA-C-**AN**-**pNB**	
D7	5'-CAG-TCA-TAT-ACA-CTG-**X**T-3'	
C12	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-**A**A-5'	
D7	5'-CAG-TCA-TAT-ACA-CTG-**X**T-3'	
M3	3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-**A**A-**AN**-**pNB**	

D8 5’-CAG-TCA-TAT-ACA-CT**X**-AT-3’
C13 3’-GTC-AGT-ATA-TGT-GA**A**-TA-5’

D8 5’-CAG-TCA-TAT-ACA-CT**X**-AT-3’
M4 3’-GTC-AGT-ATA-TGT-GA**A**-TA-**AN**-**pNB**

D9 5’-CAG-TCA-TAT-ACA-C**X**G-AT-3’
C3 3’-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-5’

D9 5’-CAG-TCA-TAT-ACA-C**X**G-AT-3’
M1 3’-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-**AN**-**pNB**

D10 3’-TAG-TCA-CAT-ATA-CTG-**X**C-5’
C14 5’-ATC-AGT-GTA-TAT-GAC-**A**G-3’

M5 3’-TAG-TCA-CAT-ATA-CTG-**X**C-**AN**-**pNB**
C14 5’-ATC-AGT-GTA-TAT-GAC-**A**G-3’

D11 3’-TAG-TCA-CAT-ATA-CT**X**-AC-5’
C15 5’-ATC-AGT-GTA-TAT-GA**A**-TG-3’

M6 3’-TAG-TCA-CAT-ATA-CT**X**-AC-**AN**-**pNB**
C15 5’-ATC-AGT-GTA-TAT-GA**A**-TG-3’

Peptid-Oligonukleotid-Konjugate

D9 5’-CAG-TCA-TAT-ACA-C**X**G-AT-3’
M7 3’-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-**AN**-**KK**-**pNB**

D9 5’-CAG-TCA-TAT-ACA-C**X**G-AT-3’
M8 3’-GTC-AGT-ATA-TGT-G**A**C-TA-**AN**-**KWK**

X = PydU
AN = Aminononanlinker
pNB = *para*-Nitrobenzoyl

D9 5'-CAG-TCA-TAT-ACA-C**X**G-AT-3'

M9 3'-GTC-AGT-ATA-TGT-GAC-TA-**AN**-**KWK**-**pNB**

Weitere verwendete Oligonukleotidsequenzen

G 3'-AGT-CAC-TA**Y**-ATC-TGA-CG-5' **Y** = PydG

C6 5'-TCA-GTG-ATC-TAG-ACT-GC-3'

B 3'- TCA-GTC-AA**X**-**B**AC-TGA-CT-5' **X** = PydU

C8 5'-AGT-CAG-TTA-ATG-ACT-GA-3' **B** = BrdU

Z1 3'-TCA-GTC-AT**Z**-TAC-TGA-CT-5' **Z** = PtzdU

C9 5'-AGT-CAG-TAA-ATG-ACT-GA-3'

Z2 3'-TCA-GTC-AT**B**-T**Z**A-CTG-ACT-5'

C10 5'-AGT-CAG-TAA-AAT-GAC-TGA-3'

Z3 3'-TCA-GTC-AT**B**-C**Z**A-CTG-ACT-5'

C11 5'-AGT-CAG-TAA-GAT-GAC-TGA-3'

7.6.2 Allgemeines

AAV4: DNA-Festphasensynthese

Die Oligonukleotide werden im Synthesizer auf CPG-Säulen nach Standardprotokollen synthetisiert, am Ende der Synthese am 5'-OH entschützt und im Vakuum getrocknet. Die feste Phase wird dann in Reaktionsgefäße überführt und mit 700 µl NH_4OH versetzt. Soweit nicht anders angegeben wird mindestens 10 h bei 55°C erhitzt. Im Anschluss daran wird die erhaltene Lösung vom Trägermaterial abzentrifugiert. Die Proben werden lyophilisiert, resuspendiert und mittels HPLC getrennt.

Oligonukleotidstränge mit photoanregbaren Nukleotiden werden unter Lichtausschluss gehalten und bei -32°C gelagert. Soweit nicht anders angegeben wird für die Messungen 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7) verwendet.

Modifizierte Duplexe und Gegenstränge

Sofern keine anderen Angaben dazu gemacht werden, gilt für die verwendeten Gegenstränge, dass sie voll komplementär zu dem entsprechenden modifizierten Strang sind. Als Gegenbase für das PydU-, das BrdU- und das PtzdU-Nukleotid wird dA eingesetzt, beim PydG- und dem Ethidium-Nukleotid dC.

HPLC-Gradienten

Zur Analytik und präparativen Trennung der Oligonukleotide werden folgende Gradienten verwendet (A = 50 mM NH_4OAc-Puffer (pH 6.5), B = MeCN):

Tabelle 7-5: Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten zur Oligonukleotidreinigung.

Sequenzen	***Gradient***
Unmodifizierte Oligonukleotide	0-15 % B über 50 min
abasic site-modifizierte Oligonukleotide	0-15 % B über 50 min
PydU-modifizierte Oligonukleotide	0-30 % B über 50 min
Fünffach PydU-modifizierte Oligonukleotide	0-40 % B über 50 min
pNB-modifizierte Oligonukleotide	0-30 % B über 50 min
Oligonukleotid-Peptid-Konjugate	5-40 % B über 50 min
Py*in*dC-modifizierte Oligonukleotide	0-30 % B über 50 min

MALDI-TOF-MS der Oligonukleotide

Zur Ionisierung dient eine Matrix aus 50 mg/ml Picolinsäure in Acetonitril/H_2O (1:1) und 50 mg/ml Diammoniumcitratat in H_2O im Verhältnis 9:1. Für eine Probe werden ca. 1 µl Oligonukleotid-Stammlösung mit 50 µl Matrix vermischt, was in etwa einer Konzentration von 40 µM entspricht. Die Kalibrierung erfolgte bei jeder Messung neu.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Es werden Stammlösungen der Oligonukleotide in entionisiertem Wasser hergestellt, deren Konzentration über die optische Dichte bei 260 nm bestimmt wird. Der Extinktionskoefizient des modifizierten Oligonukleotids wird durch die Addition aller Koeffizienten der einzelnen Nukleobasen ermittelt und mit einem dem Faktor 0.9 für die Hypochromizität verrechnet.

Tabelle 7-6: Molare Extinktionskoeffizienten modifizierter Nukleotide in DNA.

Chromophor	***Extinktionskoeffizient*** ε_{260} ***[mM^{-1}cm^{-1}]***
PydU	14.6
abasic site	0.0
PtzdU	53.2
Py*in*dC	40.0
dI	11.7
pNB	16.0

Hybridisierung von DNA-Duplexen

Eine equimolare Lösung aus den sich entsprechenden Einzelsträngen wird in Puffer gegebenenfalls unter Salzzugabe 10 min auf 90°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Hybridisierung von DNA-Haarnadeln: Snapcooling

Eine Lösung des DNA-Stranges wird in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl 10 min auf 90°C erhitzt und anschließend sofort für ca. 10 min im Eisbad abgekühlt.

Schmelzpunktmessungen

Für die Schmelzpunktmessungen werden Duplexlösungen in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl frisch hybridisiert und in einem Cary 100 UV-Vis-Spektrometer bei 260 nm bzw. 360 nm vermessen. Die Konzentration der Duplexlösungen ist so hoch, dass sie eine Absorption von > 0.1 bei der verwendeten Wellenlänge aufweisen (meist 2.5 µM bzw. 5 µM).

7.6.3 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden mit einem PydU-Nukleotid

Der Einbau von PydU erfolgt gemäß dem Standardprotokoll des DNA-Synthesizers. Bei der Abspaltung wird auf Lichtausschluss geachtet.

Tabelle 7-7: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten.

DNA-Strang	*errechnete Masse [g/mol]*	*gemessene Masse [g/mol]*	ε_{260} *[mM^{-1}cm^{-1}]*
ssD1	5306.3	5309.2	148.9
ssD2	5306.3	5315.1	148.9
ssD3	5339.3	5346.5	162.2
ssD4	5339.4	5351.3	162.2
ssD5	5685.7	5690.1	179.3
ssD6	5685.7	5687.9	179.3

Tabelle 7-8: Schmelzpunkte von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl (260 nm).

DNA-Duplex	*errechnet [°C]*	*gemessen [°C]*
D1/C1	55	57
D2/C2	55	58
D3/C3	53	54
D4/C4	53	54
D5/C7	60	65
D6/C7	60	65

7.6.4 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden mit mehreren PydU-Nukleotiden

Der Einbau von mehr als zwei PydU-Einheiten wird mit einem Protokoll durchgeführt, dass eine längere Kupplungszeit für das modifizierte Nukleotid vorsieht. Bei der Abspaltung wird auf Lichtausschluss geachtet, sonst gelten die Standardbedingungen. Der HPLC-Gradient wird für die fünffach modifizierten Stränge optimiert (s. Tabelle 7-5).

Tabelle 7-9: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten.

DNA-Strang	*errechnete Masse [g/mol]*	*gemessene Masse [g/mol]*	*ε_{260} [$mM^{-1}cm^{-1}$]*
ssH	4964.9	4963.7	157.6
ssN1	5339.5	5349.6	176.8
ssN2	6724.1	6727.4	212.7
ssN3	6756.3	6756.8	328.5
ssN4	6745.3	6745.2	289.9

Tabelle 7-10: Schmelzpunkte von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl (260 nm).

DNA-Duplex	*errechnet [°C]*	*aufwärts gemessen [°C]*	*abwärts gemessen [°C]*
H/C16*	55	64	57
N1/C17	53	52	49
N2/C18	58	56	50
N2/C19		61	50
N2/C20		51	49
N2/C21		(71)	(68)
N3/C18	58	57	55
N3/C19		55	53
N3/C20		57	52
N3/C21		62	62
N4/C18	58	55	52
N4/C19		56	52
N4/C20		54	47
N4/C21		67	63

* 5 µM Duplex

Tabelle 7-11: Schmelzpunkte von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl (360 nm).

DNA-Duplex	*Werte bei 260 nm [auf/ab °C]*	*aufwärts gemessen [°C]*	*abwärts gemessen [°C]*
N2/C18	56/50	51	43
N3/C18	57/55	55	53
N4/C18	55/52	53	51

7.6.5 Synthese und Charakterisierung *abasic-site*-modifizierter Oligonukleotide

Der Einbau einer *abasic site* erfordert weder eine Anpassung des Syntheseprotokolls noch der Abspaltbedingungen oder der Bedingungen der HPLC-Reinigung.

Tabelle 7-12: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten.

DNA-Strang	*errechnete Masse [g/mol]*	*gemessene Masse [g/mol]*	ε_{260} *[mM^{-1}cm^{-1}]*
ssA1	5090.3	5098.4	158.2
ssA2	5099.3	5107.7	164.2
ssA3	5099.3	5120.3	164.2
ssA4	5090.3	5094.1	158.2
ssA5	5074.3	5093.2	161.6
ssA6	4740.1	4749.4	150.9
ssA7	4716.1	4731.7	143.6
ssA8	4725.1	4726.3	149.6
ssA9	4716.1	4727.8	143.6
ssA10	4716.1	4714.9	143.6

Tabelle 7-13: Schmelzpunkte von 2.5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl (260 nm).

DNA-Duplex	*errechnet [°C]*	*gemessen [°C]*
D3/A1	51	50
D3/A2	51	50
D3/A3	51	46
D3/A4	51	44
D3/A5	49	37
E/C5	55	72
E/A6	52	72
E/A7	55	73
E/A8	55	73
E/A9	55	72
E/A10	55	57*

* in 10 mM NaP_i

7.6.6 Synthese und Charakterisierung Py*ind*C-modifizierter Oligonukleotide

AAV5:Sonogashira-Kupplung an der festen Phase

Py*ind*C-modifizierte Oligonukleotide werden analog einem Syntheseprotokoll von *Khan* und *Grinstaff* dargestellt.[136] Dafür wird ein *N*-Benzyl-5-Iod-Desoxycytidin-Phosphoramidit mittels DNA-Festphasenprotokoll in die DNA integriert. Die 5'-DMT-Gruppe verbleibt auf dem Nukleotid. Das CPG wird aus dem Synthesizer entnommen und im Vakuum getrocknet. Mithilfe zweier Spritzen wird die Reaktionslösung aus 60 µmol Ethinylpyren, 30 µmol $Pd(PPh_3)_4$ und 30 µmol CuI in 0.5 ml trockenem DMF/TEA (3.5:1.5) mehrmals durch die CPG-Säule gedrückt. Die Reaktionszeit beträgt drei Stunden bei Raumtemperatur und Lichtausschluss. Während dieser Zeit wird die Reaktionslösung immer wieder durch das CPG bewegt. Danach wird die Lösung verworfen, und die Säule mit 10 ml DMF/TEA (9:1) und 40 ml trockenem Acetonitril gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wird die Oligonukleotidsynthese im Synthesizer fortgesetzt. Entschützung und Abspaltung erfolgen nach Standardmethoden, die Aufreinigung wird wie beschrieben durchgeführt.

Tabelle 7-14: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten.

DNA-Strang	*errechnete Masse [g/mol]*	*gemessene Masse [g/mol]*	ε_{260} *[mM^{-1}cm^{-1}]*
ssS1	6020.9	6026.3	231.8
ssS2	6052.9	6059.5	225.1
ssS3	5972.9	5973.3	217.2
ssS4	5987.9	5988.8	218.6
ssS5	5987.9	5993.9	218.6
ssS6	6002.9	6011.0	219.9

Tabelle 7-15: Schmelzpunkte von 1.17 µM Duplex in 9.4 mM NaP_i und 250 mM NaCl (260 nm).

DNA-Duplex	*errechnet [°C]*	*gemessen [°C]*
S1	60	69
S2	64	66
S3	64	69
S4	62	69
S5	62	69
S6	60	69

7.6.7 Synthese und Charakterisierung *pNB*-modifizierter Oligonukleotide

AAV6: Kupplung eines Aminolinkers an ein Oligonukleotid an der festen Phase[143]

Die Oligonukleotid-Sequenzen werden nach Standardmethoden *trityl-off* synthetisiert und das CPG nach mindestens 30 min Trocknen im Vakuum den folgenden Protokollen unterzogen. Dabei werden die Lösungen über Spritzen zugegeben und mehrmals hin- und her bewegt. Die Angaben beziehen sich jeweils auf ein CPG.

Tabelle 7-16: Syntheseprotokoll zur Kupplung des Aminononanlinkers an ein Oligonukleotid.

Anzahl	*Volumen*	*Lösung*	*Schritt*	*Dauer pro Schritt*
3	1 ml	absolutes Dioxan	Quellen	
2	1 ml	25 mg/ml CDI in Dioxan	Aktivierung 5'-OH	15 min
5	1 ml	absolutes Dioxan	Waschen	
1	1 ml	16 mg/ml 1,9-Diaminononan in Dioxan/H_2O (9:1)	Kupplung des Linkers	10 min
1	1 ml	16 mg/ml 1,9-Diaminononan in Dioxan/H_2O (9:1)	Kupplung des Linkers	15 min
5	1 ml	Dioxan	Waschen	
5	1 ml	Methanol	Waschen	

Die Linker-modifizierten Oligonukleotide sind nach dem Trocknen im Vakuum bei einer Lagerung unter Feuchtigkeitsausschluss über mehrere Wochen stabil.

AAV7: Kupplung der* para-*Nitrobenzoesäure an den Aminolinker des Oligonukleotids

Die mit einem Aminolinker modifizierten Oligonukleotide werden über ein modifiziertes Peptidfestphasenprotokoll mit *para*-Nitrobenzoesäure gekuppelt. Die CPG-Säulen werden im Vakuum getrocknet und mittels der konventionellen Methode abgespalten und entschützt. Die Reinigung erfolgt über HPLC wie in Tabelle 7-5 angegeben.

Tabelle 7-17: Syntheseprotokoll zur Kupplung einer Carbonsäure an Aminomodifizierte Oligonukleotide

Anzahl	*Volumen*	*Lösung*	*Schritt*	*Dauer pro Schritt*
5	1 ml	absolutes DMF	Quellen	
3	1 ml	0.2 M HOBt/TBTU/**pNB** in DMF und 87 µl DIPEA	Kupplung	30 min
5	1 ml	absolutes DMF	Waschen	
5	1 ml	Methanol	Waschen	

Charakterisierung der erhaltenen Stränge

Tabelle 7-18: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten.

DNA-Strang	*errechnete Masse [g/mol]*	*gemessene Masse [g/mol]*	ε_{260} *[mM^{-1}cm^{-1}]*
ssD7	5330.3	5330.6	170.8
ssD8	5314.3	5312.4	174.2
ssD9	5339.4	5338.5	176.8
ssD10	5330.3	5330.2	170.8
ssD11	5314.3	5314.3	174.2
ssC12	5233.5	5231.6	178.0
ssC13	5248.5	5247.4	179.4
ssC14	5233.5	5233.4	178.0
ssC15	5248.5	5247.9	179.4
ssM1	5558.7	5556.8	188.1
ssM2	5184.4	5168.9	173.5
ssM3	5567.7	5554.5	194.0
ssM4	5582.7	5565.0	195.4
ssM5	5664.5	5647.3	186.8
ssM6	5648.5	5632.7	190.2

Tabelle 7-19: Schmelzpunkte von 5 µM Duplex in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl (260 nm).

DNA-Duplex	*errechnet [°C]*	*aufwärts gemessen [°C]*	*abwärts gemessen [°C]*
D7/C12	53	62	60
D7/M3	53	62	61
D8/C13	51	58	56
D8/M4	51	59	56
D9/C3	53	56	54
D9/M1	53	57	55
D10/C14	53	61	59
M5/C14	53	60	59
D11/C15	51	54	52
M6/C15	51	53	52
D3/M1	53	57	54

7.6.8 Synthese und Charakterisierung von Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten

Die Oligonukleotid-Sequenzen werden mit 1,9-Diaminononan als Linker versehen (**AAV6**) und dem folgenden Protokoll unterzogen. Die *Alloc*-geschützten Peptide werden (*Fmoc-on*) mittels SPPS dargestellt (s. 7.5.2.5) und vollgeschützt eingesetzt.

Tabelle 7-20: Darstellung eines vollgeschützten Peptid-Oligonukleotid-Konjugats

Anzahl	*Volumen*	*Lösung*	*Schritt*	*Dauer pro Schritt*
5	1 ml	absolutes DMF	Quellen	
1	1 ml	0.2 M HOBt/TBTU/Peptid in DMF und 87 µl DIPEA	Kupplung	30 min
1	1 ml	s. o.	Kupplung	40 min
1	1 ml	s. o.	Kupplung	70 min
5	1 ml	absolutes DMF	Waschen	
5	1 ml	Methanol	Waschen	

Nach 60 min Trocknen im Vakuum erfolgt die Abspaltung der *Alloc*-Gruppen unter verschiedenen Bedingungen.

Tabelle 7-21: Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen an den Lysinen

Anzahl	***Volumen***	***Lösung***	***Schritt***	***Dauer pro Schritt***
5	1 ml	absolutes THF	Quellen	
1	1 ml	33mg/ml $Pd(PPh_3)_4$ in THF mit Allylakzeptor[a,b,c]	Entschützung	45 min
1	1 ml	s. o.	Entschützung	60 min
1	1 ml	s. o.	Entschützung	150 min
5	1 ml	THF	Waschen	
5	1 ml	DMF	Waschen	
5	1 ml	Dioxan	Waschen	
5	1 ml	Methanol	Waschen	

Als Allylakzeptor wurden Dimedon (**a**), Aminopropanol (**b**) und 1.4 M Ameisensäure/Butylamin (1:1) in THF (**c**) getestet. Die Abspaltung vom CPG-Träger des Peptid-Oligonukleotid-Konjugats wird mit NH_4OH bei 40°C 18 h unter Lichtausschluss durchgeführt. Die HPLC-Reinigung erfolgte mit dem angegebenen Gradienten.

8 Literaturverzeichnis

[1] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158.

[2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.

[3] I. H. G. Collaborators, *National Center for Biotechnology Information* **2001**.

[4] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045-3046.

[5] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.

[6] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 1859-1862.

[7] M. H. Caruthers, A. Barone, S. L. Beaucage, D. Dodds, E. Fisher, L. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Young, *Meth. Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.

[8] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463-5467.

[9] R. Higuchi, C. H. von Beroldingen, G. F. Sensabaugh, H. A. Erlich, *Nature* **1988**, *332*, 543-546.

[10] Y. Sun, C.-H. Kiang in *DNA-based Artificial Nanostructures: Fabrication, Properties, and Applications*, *Vol. 2* (Hrsg. H. S. Nalwa), American Scientific, Stevenson Ranch, CA, **2005**, S. 224-246.

[11] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411-415.

[12] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, *17*, 53-120.

[13] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, *411*, 366-374.

[14] D. Wang, D. A. Kreutzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, *400*, 99-115.

[15] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871-1876.

[16] L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2005**, 2281-2284.

[17] L. Valis, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 36-38.

[18] A. Trifonov, M. Raytchev, I. Buchvarov, M. Rist, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 19490-19495.

[19] A. Trifonov, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *409*, 277-280.

[20] E. Mayer-Enthart, P. Kaden, H.-A. Wagenknecht, *Biochem.* **2005**, *44*, 11749-11757.

[21] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 1637-1639.

[22] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 706-712.

[23] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 865-868.

[24] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.

[25] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1845-1847.

[26] H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 2454-2460.

[27] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.

[28] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878-1879.

[29] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1685-1690.

[30] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877-4883.

[31] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2978-2980.

[32] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691.

[33] M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2498-2504.

[34] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062-2063.

[35] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *35*, 161-214.

[36] R. B. Merrifield, *Angewandt. Chem.* **1985**, *97*, 801-812.

[37] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

[38] B. Valeur, *Molecular Fluorescence-Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, p.

[39] A. Sharma, R. G. Shulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, John Wiley and Sons, Inc., New York, **1999**, p.

[40] IUPAC Comission of Photochemistry, *Pure and Applied Chemistry* **1998**, *49*, 2223-2286.

[41] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14-19.

[42] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463.

[43] T. Förster, *Annalen der Pysik (Leipzig)* **1948**, *6*, 55-75.

[44] L. Stryer, *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-846.

[45] D. P. Weicherding, *Dissertation* **2000**.

[46] S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochem.* **2001**, *40*, 5556-5564.

[47] Y. A. Berlin, A. L. Burin, M. A. Ratner, *Superlattices Microstructures* **2000**, *28*, 241-252.

[48] S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17678-17682.

[49] M. E. Nunez, K. T. Noyes, D. A. Gianolio, L. W. McLaughlin, J. K. Barton, *Biochem.* **2000**, *39*, 6190-6199.

[50] Y. Kan, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10858-10864.

[51] V. Sartor, P. T. Henderson, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11027-11033.

[52] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253-260.

[53] P. J. Dandliker, M. N. Nunez, J. K. Barton, *Biochem.* **1998**, *37*, 6491-6502.

[54] I. M. Abdou, V. Sartor, H. Cao, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6696-6697.

[55] U. Santhosh, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10986-10987.

[56] A. Joy, G. B. Schuster, *Chem. Commun.* **2005**, 2778-2784.

[57] G. B. Schuster, U. Landman, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, 139-161.

[58] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025-1029.

[59] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. C. Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 389-400.

[60] D. B. Hall, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5045-5046.

[61] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2714-2730.

[62] B. A. Jackson, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12986-12987.

[63] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Bioconj. Chem.* **1997**, *8*, 31-37.

[64] E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2921-2925.

[65] D. B. Hall, S. O. Kelley, J. K. Barton, *Biochem.* **1998**, *37*, 15933-15940.

[66] T. Fiebig, C. Wan, S. O. Kelley, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1187-1192.

[67] B. A. Jackson, V. Y. Alekseyev, J. K. Barton, *Biochem.* **1999**, *38*, 4655-4662.

[68] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Nucl. Acids Res.* **1999**, *27*, 4830-4837.

[69] M. E. Núnez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85-97.

[70] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014-6019.

[71] S. R. Rajski, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutation Res.* **2000**, *447*, 49-72.

[72] D. A. Vicic, D. T. Odom, M. E. Nunez, D. A. Gianolio, L. W. McLaughlin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8603-8611.

[73] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14052-14055.

[74] P. K. Bhattacharya, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8649-8656.

[75] E. M. Boon, N. M. Jackson, M. D. Wightman, S. O. Kelley, M. G. Hill, J. K. Barton, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11805-11812.

[76] S. Delaney, J. K. Barton, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6475-6483.

[77] S. Delaney, J. K. Barton, *Biochem.* **2003**, *42*, 14159-14165.

[78] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51-53.

[79] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.

[80] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520.

[81] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, *431*, 217-221.

[82] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51-70.

[83] Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460-1467.

[84] A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128-1136.

[85] S. R. Rajski, S. Kumar, R. J. Roberts, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5615-5616.

[86] D. B. Nikolov, H. Chen, E. D. Halay, A. Hoffmann, R. G. Roeder, S. K. Burley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4862-4867.

[87] K. Nakatani, C. Dohno, A. Ogawa, I. Saito, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 361-366.

[88] P. Vigny, *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* **1971**, *272*, 3206-3209.

[89] D. Voet, W. B. Gratzer, R. A. Cox, P. Doty, *Biopolymers* **1963**, *1*, 193-208.

[90] D. N. Nikogosyan, D. Angelov, B. Soep, L. Lindqvist, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *252*, 322-324.

[91] T. Haupl, C. Windolph, T. Jochum, O. Brede, R. Hermann, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *280*, 520-524.

[92] T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, W. Domcke, *Science* **2004**, *306*, 1765-1793.

[93] L. Alaverdian, S. Alaverdian, O. Bilenko, I. Bogdanov, E. Filippova, D. Gavrilov, B. Garbovitsky, M. Gouzman, G. Gudkov, S. Domratchev, O. Kosobokova, N. Lifshitz, S. Luryi, V. Ruskuvoloshin, A. Stepoukhovich, M. Tcherevishnick, G. Tyshko, V. Gorfinkel, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2804-2817.

[94] G. Xue, E. S. Yeung, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1490-1498.

[95] C. Lee, E. Lemyre, P. M. Miron, C. C. Morton, *Curr. Op. Pediat.* **2001**, *13*, 550-555.

[96] C. Fauth, M. R. Speicher, *Cytogenetics and Cell Genetics* **2001**, *93*, 1-10.

[97] R. Amann, B. M. Fuchs, S. Behrens, *Curr. Op. Biotechnol.* **2001**, *12*, 231-236.

[98] J. Pernthaler, F. O. Glockner, W. Schonhuber, R. Amann, *Meth. Mikrobiol.* **2001**, *30*, 207-226.

[99] E. A. Mothershed, P. K. Cassiday, K. Pierson, L. W. Mayer, T. Popovic, *J. Clinical Microbiol.* **2002**, *40*, 4713-4719.

[100] N. Li, W. G. Tan, R. Y. Tsang, D. L. J. Tyrrell, N. J. Dovichi, *Anal. Bioanal.l Chem.* **2002**, *374*, 269-273.

[101] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7842-7849.

[102] M. Olivier, *Mutation Res.* **2005**, *573*, 103-110.

[103] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1623-1633.

[104] A. E. Remmers, R. R. Neubig, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4791-4797.

[105] Y. P. Jia, S. S. Patel, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30147-30153.

[106] M. R. Otto, L. B. Bloom, M. F. Goodman, J. M. Beechem, *Biochem.* **1998**, *37*, 10156-10163.

[107] J. T. Stivers, K. W. Pankiewicz, K. A. Watanabe, *Biochem.* **1999**, *38*, 952-963.

[108] B. W. Allan, J. M. Beechem, W. M. Lindstrom, N. O. Reich, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2368-2373.

[109] B. W. Allan, N. O. Reich, J. M. Beechem, *Biochem.* **1999**, *38*, 5308-5314.

[110] J. J. Sullivan, K. P. Bjornson, L. C. Sowers, P. L. deHaseth, *Biochem.* **1997**, *36*, 8005-8012.

[111] Y. P. Jia, A. Kumar, S. S. Patel, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30451-30458.

[112] K. P. Bjornson, K. J. M. Moore, T. M. Lohman, *Biochem.* **1996**, *35*, 2268-2282.

[113] D. Klostermeier, D. P. Millar, *Methods* **2001**, *23*, 240-254.

[114] P. Z. F. Qin, A. M. Pyle, *Biochem.* **1997**, *36*, 4718-4730.

[115] G. S. Bassi, N. E. Mollegaard, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Biochem.* **1999**, *38*, 3345-3354.

[116] D. G. Xu, T. M. Nordlund, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1042-1058.

[117] M. Kawai, M. J. Lee, K. O. Evans, T. M. Nordlund, *J. Fluoresc.* **2001**, *11*, 23-32.

[118] T. Fiebig, C. Z. Wan, A. H. Zewail, *Chemphyschem* **2002**, *3*, 781-788.

[119] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.

[120] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.

[121] M. W. Grinstaff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 3629-3635.

[122] A. R. Pike, L. H. Lie, R. A. Eagling, L. C. Ryder, S. N. Patole, B. A. Connolly, B. R. Horrocks, A. Houlton, *Angewandt. Chem.-Int. Ed.* **2002**, *41*, 615-+.

[123] E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 282-286.

[124] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. de Lumley-Woodyear, Y. B. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.***1999**, *121*, 10803-10812.

[125] N. M. Jackson, M. G. Hill, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 209-215.

[126] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 770-772.

[127] C. D. Mao, W. Q. Sun, Z. Y. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144-146.

[128] H. W. Fink, C. Schonenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407-410.

[129] C. M. Niemeyer, *Angewandt. Chem.-Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128-4158.

[130] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635-638.

[131] D. Loakes, D. M. Brown, *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 4039-4043.

[132] D. Loakes, F. Hill, D. M. Brown, S. A. Salisbury, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 426-435.

[133] R. X.-F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. R. IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678.

[134] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119-9128.

[135] I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, A. A. Petrov, S. V. Gontarev, Y. A. Berlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2081-2084.

[136] S. I. Khan, M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4704-4705.

[137] L. Zhang, H. Long, G. E. Boldt, K. D. Janda, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 314-322.

[138] A. Stutz, S. M. Langenegger, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3156-3163.

[139] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673-676.

[140] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281-3289.

[141] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, R. L. Letsinger, R. Sanishvili, A. Joachimiak, V. Tereshko, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9905-9906.

[142] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280-11281.

[143] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Bioconj. Chem.* **1999**, *10*, 1122-1130.

[144] H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2482-2506.

[145] G. B. Dreyer, P. B. Dervan, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 968-972.

[146] B. A. Connolly, *Nuc. Ac. Res.* **1987**, *15*, 3131-3139.

[147] B. S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner, *Nu. Ac. Res.* **1987**, *15*, 4837-4848.

[148] R. Zuckerman, D. Corey, P. Schultz, *Nuc. Ac. Res.* **1987**, *15*, 5305.

[149] P. Li, P. P. Medon, D. C. Skingle, J. A. Lanser, R. H. Symons, *Nuc. Ac. Res.* **1987**, *15*, 5275-5287.

[150] J. G. Zendegui, K. M. Vasquez, J. H. Tinsley, D. J. Kessler, M. E. Hogan, *Nuc. Ac. Res.* **1992**, *20*, 307-314.

[151] A. Kumar, S. Advani, H. Dawar, G. P. Talwar, *Nuc. Ac. Res.***1991**, *19*, 4561-4561.

[152] T. Horn, M. S. Urdea, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 4705-4708.

[153] H. Urata, M. Akagi, *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 4015-4018.

[154] J. L. Ruth, C. Morgan, A. Pasko, *DNA-a J. Mol. Cell. Biol.* **1985**, *4*, 93-93.

[155] E. Jablonski, E. W. Moomaw, R. H. Tullis, J. L. Ruth, *Nuc. Ac. Res.* **1986**, *14*, 6115-6128.

[156] J. Telser, K. A. Cruickshank, L. E. Morrison, T. L. Netzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6966-6976.

[157] J. G. Farmar, M. Castaneda, *Biotechniques* **1991**, *11*, 588-589.

[158] M. Ratner, *Nature* **1999**, *397*, 480-481.

[159] E. K. Wilson, *Chem. Eng. News* **1998**, *76*, 51-54.

[160] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angewandt. Chem.-Int. Ed.* **1997**, *36*, 2715-2730.

[161] D. B. Hall, S. O. Kelley, J. K. Barton, *Biochem.* **1998**, *37*, 15933-15940.

[162] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322.

[163] J. R. Winkler, H. B. Gray, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 369-379.

[164] M. R. Wasielewski, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 435-461.

[165] M. E. Nunez, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 199-206.

[166] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 409-428.

[167] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759-12765.

[168] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 791-800.

[169] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6406-6407.

[170] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063-7068.

[171] H.-A. Wagenknecht, *Chem. in unserer Zeit* **2002**, *36*, 318-330.

[172] M. E. Nunez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, 85-97.

[173] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253-260.

[174] H. Ikeda, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10836-10837.

[175] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318-320.

[176] K. Kawai, T. Majima in *Spectroscopic Investigation of Oxidative Hole Transfer via Adenine Hopping in DNA*, *Vol.* (Hrsg. H.-A. Wagenknecht), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 117-132.

[177] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5361-5362.

[178] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656-3660.

[179] T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 352-354.

[180] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861-9870.

[181] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 158-161.

[182] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, *283*, 375-381.

[183] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4399-4408.

[184] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10046-10055.

[185] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 89-91.

[186] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9083-9092.

[187] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8206-8215.

[188] L. Valis, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *unpublished results*.

[189] M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11713-11716.

[190] W. B. Davis, S. Hess, I. Naydenova, R. Haselsberger, A. Ogrodnik, M. D. Newton, M. E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2422-2423.

[191] F. D. Lewis, J. Q. Liu, X. Y. Liu, X. B. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Angewandt. Chem.-Int. Ed.* **2002**, *41*, 1026-1029.

[192] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Op. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320-329.

[193] B. Giese, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 612-618.

[194] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 4827-4831.

[195] A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3918-3920.

[196] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 1763-1766.

[197] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480-11481.

[198] S. E. Rokita, T. Ito in *Chemical Probing of Reductive Electron Transfer in DNA*, *Vol.* (Hrsg. H.-A. Wagenknecht), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 133-152.

[199] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1839-1842.

[200] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15552-15559.

[201] A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgilialoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 318-321.

[202] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1848-1851.

[203] S. T. Gaballah, J. D. Vaught, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 5927-5934.

[204] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865-3877.

[205] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701-4709.

[206] A. Weller, *Zeitschr. Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93-98.

[207] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5529-5541.

[208] D. G. McCafferty, D. A. Friesen, E. Danielson, C. G. Wall, M. J. Saderholm, B. W. Erickson, T. J. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8200-8204.

[209] D. J. Freed, L. R. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4790-4792.

[210] M. T. Tierney, M. Sykora, S. I. Khan, M. W. Grinstaff, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7574-7576.

[211] M. T. Tierney, M. W. Grinstaff, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3413-3416.

[212] S. A. N. Hashmi, X. Hu, C. E. Immoos, S. J. Lee, M. W. Grinstaff, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4571-4574.

[213] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6842-6843.

[214] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1125-1129.

[215] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 413-425.

[216] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237.

[217] D. B. Sanders, O. West, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5127-5134.

[218] S. Porello, S. D. Williams, H. Kuhn, M. L. Michaels, S. S. David, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10684-10692.

[219] N. V. Bulychev, C. V. Varaprasad, G. Dormán, J. H. Miller, M. Eisenberg, A. P. Grollman, F. Johnson, *Biochem.* **1996**, *35*, 13147-13156.

[220] S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1221-1261.

[221] H. Sticht, P. Rösch, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1998**, *70*, 95-136.

[222] E. Yavin, A. K. Boal, E. D. A. Stemp, E. M. Boon, A. L. Livingston, V. L. O'Shea, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3546-3551.

[223] S. L. Porello, M. J. Cannon, S. S. David, *Biochem.* **1998**, *37*, 6465-6575.

[224] P. Gaudu, B. Weiss, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10094-10098.

[225] N. Khoroshilova, H. Beinert, P. J. Kiley, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2499-2503.

[226] N. Khoroshilova, C. Popescu, E. Munk, H. Beinert, P. J. Kiley, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6087-6092.

[227] J. Schreiber, l. Enderich, M. Wegner, *Nuc. Ac. Res.* **1998**, *26*, 2337-2343.

[228] G. Tell, L. Pellizzari, D. Cimarosti, C. Pucillo, G. Damante, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, *252*, 178-183.

[229] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1-7.

[230] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochem.* **2000**, *39*, 5483-5491.

[231] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4400-4407.

[232] C. Hélène, J. C. Maurizot, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1981**, *10*, 213-258.

[233] M. R. Rajeswari, T. Montenay-Garestier, C. Helene, *Biochem.* **1987**, *26*, 6825-6831.

[234] M. R. Rajeswari, *J. Biomol. Struct. Dyn.***1996**, *14*, 25-30.

[235] C. Otto, F. F. M. DeMul, J. Greve, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1667-1689.

[236] G. C. King, J. E. Coleman, *Biochem.* **1987**, *26*, 2929-2937.

[237] J. R. Casas-Finet, N.-I. Jhon, A. H. Maki, *Biochem.* **1988**, *27*, 1172-1178.

[238] D. H. H. Tsao, J. R. Casas-Finet, A. H. Maki, J. W. Chase, *Biophys. J.* **1989**, *55*, 927-936.

[239] M. Suzuki, *Nature* **1990**, *344*, 562-565.

[240] C. Robledo-Luigi, W. D. Wilson, E. Pares, M. Vera, C. S. Martinez, D. Santiago, *Biopolymers* **1991**, *31*, 907-917.

[241] P. Ilich, F. G. Preudergast, *Biopolymers* **1992**, *32*, 667-694.

[242] K. D. Copeland, A. M. K. Lueras, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochem.* **2002**, *41*, 12785-12797.

[243] B. H. Geierstanger, B. F. Volkman, W. Kremer, D. E. Wemmer, *Biochem.* **1994**, *33*, 5347-5355.

[244] R. Reeves, M. S. Nissen, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8573-8582.

[245] T. Morii, K. Makino, *Adv. DNA Sequence Spec. Agents* **2002**, *4*, 105-137.

[246] M. E. Vázquez, A. M. Caamano, J. L. Mascarenas, *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 338-349.

[247] M. E. Vázquez, A. M. Caamano, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 4723-4725.

[248] P. Chaltin, F. Borgios, J. Rozenski, A. V. Aerschot, P. Herdewijn, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 533-547.

[249] R. V. Talanian, C. J. McKnight, P. S. Kim, *Science* **1990**, *249*, 769-771.

[250] M. E. A. Churchill, A. A. Travers, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 92-97.

[251] P. S. Braterman, J.-I. Song, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4678-4682.

[252] A. Harriman, G. R. Millward, P. Neta, M. C. Richoux, J. M. Thomas, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 1286-1290.

[253] I. Guilford Jones, V. Malba, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5776-5782.

[254] J. Reed in *Circular Dichroism as a Tool for Inverstigating Macromolecular Structure*, *Vol.* (Hrsg. H. Tschesche), Walter de Gruyter, **1990**, 366-394.

[255] M. Klessinger, J. Michl in *Optische Aktivität*, VCH, Weinheim, **1989**, 129-144.

[256] M. Stöckle, *Dissertation* TU München, **2002**.

[257] D. M. Gray, R. L. Ratliff, M. R. Vaughan, *Meth. Enzymol.* **1992**, *211*, 389-406.

[258] W. C. Johnson in *CD of Nucleic Acids*, *Vol.* (Hrsg. K. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody), VCH, Weinheim, **1994**, 523-540.

[259] F. S. Allen, D. M. Gray, G. P. Roberts, I. Tinoco, *Biopolymers* **1972**, *11*, 853-879.

[260] F. Lottspeich, H. H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.

[261] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.

[262] D. Millstein, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4992-4998.

[263] W. J. Scott, G. T. Crisp, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4630-4632.

[264] W. J. Scott, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.***1986**, *108*, 3033-3040.

[265] A. M. Echavarren, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5478-5486.

[266] E. Negishi, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 340-348.

[267] T. R. Hoye, P. R. Hanson, A. C. Kovalesky, T. D. Ocain, Z. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.***1991**, *113*, 9369-9371.

[268] K. Sonogashira, Y. Toda, N. Hagihara, *Tetrahedron Letters* **1975**, *16*, 4467-4470.

[269] H. A. Dieck, R. F. Heck, *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 259-263.

[270] S. Takahashi, Y. Kuroyama, K. Sonogashira, N. Hagihara, *Synthesis* **1980**, 627-630.

[271] P. Magnus, H. Annoura, T. Harling, *J. Org. Chem.* **1999**, *55*, 1709-1711.

[272] H. Suenaga, K. Nakashima, T. Mizuno, M. Takeuchi, I. Hamachi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1263-1267.

[273] M. Beinhoff, W. Weigel, M. Jurczok, W. Rettig, C. Modrakowski, I. Brüdgam, H. Hartl, A. D. Schlüter, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3819-3829.

[274] D. J. McCaustland, A. B. Susan, J. C. Wiley, *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **1981**, *18*, 1465-1470.

[275] L. A. Carpino, D. Sadataalaee, H. G. Chao, R. H. Deselms, *J. Am. Chem. Soc.***1990**, *112*, 9651-9652.

[276] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 1927-1930.

[277] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 2739-2742.

[278] Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460-1467.

[279] P. Li, J. C. Xu, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2951-2958.

[280] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 2279-2282.

[281] A. Wahhab, J. Leban, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 235-238.

[282] B. Castro, G. Evin, C. Selve, R. Seyer, *Synthesis* **1977**, 413.

[283] J.-A. Fehrentz, B. Castro, *Synthesis* **1983**, 676-678.

[284] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Letters* **1975**, *14*, 1219-1222.

[285] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205-208.

[286] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.

[287] J. C. Sheehan, G. L. Boshart, P. A. Cruickshank, *J. Org. Chem.***1961**, *26*, 2525-2528.

[288] J. C. Sheehan, J. Preston, P. A. Cruickshank, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2492-2493.

[289] L. J. Mathias, *Synthesis* **1979**, *1979*, 561-576.

[290] M. R. DeFilipps, C. P. Murphy, F. Broitman, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3416-3419.

[291] J. Butler, E. J. Land, W. A. Prütz, A. J. Swallow, *Biochim. Biophys. Ac.* **1982**, *705*, 150-162.

[292] S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. G. Simic, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 684-687.

[293] P. M. Mitrasinovic, *Bioconj. Chem.* **2005**, *16*, 588-597.

[294] L. L. Larcom, C. A. Rains, *Photochem. Photobiol.* **1985**, *42*, 113-120.

[295] Anwar, X.-M. Duan, S. Okada, H. Matsuda, H. Oikawa, H. Nakanishi, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* **1998**, 2451-2457.

[296] H.-H. Perkampus, *UV-Vis Atlas of Organic Compounds*, VCH, Weinheim, **1992**.

[297] H.-A. Wagenknecht in *Charge Transfer in DNA*, *Vol.* (Hrsg. C. Schmuck, H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 369-385.

[298] H.-A. Wagenknecht, *Coll. Symp. Ser.* **2005**, *7*, 47-55.

[299] H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig in *Electron Transfer and Structural Dynamics in DNA*, *Vol.* (Hrsg. H.-A. Wagenknecht), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 197-224.

[300] M. W. Kalnik, C. N. Chang, A. P. Grollman, B. J. Patel, *Biochem.* **1988**, *27*, 924-931.

[301] M. Takeshita, C. N. Chang, F. Johnson, S. Will, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.***1987**, *262*, 10171-10179.

[302] W. R. Boon, *Outlook on Agriculture* **1964**, *4*, 163-170.

[303] A. Calderbank, *Biochem. J.* **1966**, *101*, 2P-3P.

[304] T. Seitz, M. G. Hoffmann, H. Krämer, *Chemie in Unserer Zeit* **2003**, *37*, 112-126.

[305] J. Volke, *Coll. Czech. Chem.Comm.* **1968**, *33*, 3044-3048.

[306] C. M. Bullivant, *Brit. Med. J.* **1966**, *5498*, 1272-1273.

[307] D. A. Cory-Slechta, M. Thiruchelvam, B. K. Barlow, E. K. Richfield, *Environmental Health Perspectives* **2005**, *113*, 1263-1270.

[308] J. H. Russell, S. C. Wallwork, *Acta Crystallographica Section B-Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1972**, *B 28*, 1527-1530.

[309] T. Ishida, M. Murakami, G. Watanabe, H. Yoshikawa, S.-I. Nishikiori, *Internet Electr. J. Mol. Des.* **2003**, *2*, 14-23.

[310] S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3993-3997.

[311] D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochem.* **1992**, *31*, 11620-11625.

[312] E. Weitz, *Angewandt. Chem.* **1954**, *66*, 658-677.

[313] S. Hunig, W. Schenk, *Liebig. Ann. Chem.* **1979**, 727-742.

[314] A. J. Bard, A. Ledwith, H. J. Shine, *Advances in Physical Organic Chemistry* **1976**, *13*, 155-278.

[315] C. L. Bird, A. T. Kuhn, *Chem. Soc. Rev.* **1981**, *10*, 49-82.

[316] S. Hunig, W. Schenk, *Lieb. Ann. Chem.* **1979**, 1523-1533.

[317] G. B. Dreyer, P. B. Dervan, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 968-972.

[318] B. A. Connolly, P. Rider, *Nuc. Ac.Res.* **1987**, *15*, 3131-3139.

[319] B. S. Sproat, B. S. Beijer, P. Rider, P. Neuner, *Nuc. Ac. Res.***1987**, *15*, 4837-4848.

[320] P. Li, *Nuc. Ac. Res.* **1987**, *15*, 5275-5287.

[321] L. A. Kelly, M. A. J. Rodgers, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6386-6391.

[322] I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1428-1441.

[323] A. Calderbank, D. F. Charlton, R. James, Farrington, J., *J. Chem. Soc. -Perkin Trans. 1* **1972**, 138-140.

[324] S. T. Gaballah, T. L. Netzel, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2002**, *21*, 681-694.

[325] Y. Iso, F. Yoneda, H. Ikeda, K. Tanaka, K. Fuji, *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 503-506.

[326] H. Ikeda, K. Fuji, K. Tanaka, Y. Iso, F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1455-1463.

[327] P. Z. Qin, A. M. Pyle, *Methods* **1999**, *18*, 60-70.

[328] T. Behmoras, J.-J. Toulme, C. Hélène, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 926-930.

[329] T. Behmoras, J.-J. Toulme, C. Helene, *Nature* **1981**, *292*, 858-859.

[330] T. Chen, G. P. Cook, A. T. Koppisch, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3861-3866.

[331] E. Rivera, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3966-3971.

[332] S. D. Wetmore, R. J. Boyd, L. A. Eriksson, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *343*, 151-158.

[333] X. Li, M. D. Sevilla, L. Sanche, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8916-8920.

[334] X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 1596-1603.

[335] V. P. Kadysh, Y. L. Kaminskii, L. N. Rumyantseva, V. L. Efimova, J. P. Strandish, *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1992**, *10*, 1404-1408.

[336] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6720-6721.

[337] G. P. Cook, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10025-10030.

[338] H. Sugiyama, K. Fujimoto, I. Saito, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 1805-1808.

[339] T. M. Dietz, R. J. von Trebra, B. J. Swanson, T. H. Koch, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1793-1797.

[340] H. Cao, G. B. Schuster, *Bioconj. Chem.* **2005**, *16*, 820-826.

[341] C.-H. Tung, S. Stein, *Bioconj. Chem.* **2000**, *11*, 605-618.

[342] J. Haralambidis, L. Duncan, G. W. Tregear, *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 5199-5202.

[343] S. Basu, E. Wickstrom, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 4943-4946.

[344] C. D. Juby, C. D. Richardson, R. Bruoussear, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 879-882.

[345] H. Urata, M. Akagi, *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 4015-4018.

[346] A. Kumar, S. Advani, H. Dawar, G. P. Talwar, *Nuc. Ac. Res.* **1991**, *19*, 4561.

[347] T. Horn, M. Urdea, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 4705-4708.

[348] J. Telser, P. A. Cruickshank, L. E. Morrison, T. L. Netzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6966-6976.

[349] J. L. Ruth, C. Morgan, A. Pasko, *DNA* **1985**, *4*, 93.

[350] E. Jablonski, E. W. Moomaw, R. H. Tullis, J. L. Ruth, *Nuc. Ac. Res.* **1986**, *14*, 6115-6128.

[351] D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.

[352] A. V. Kachalova, D. A. Stetsenko, E. A. Romanova, V. N. Tashlitsky, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Helv. Chim. Aca* **2002**, *85*, 2409-2416.

[353] R. K. Bruick, M. Koppitz, G. F. Joyce, L. E. Orgel, *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 1309-1310.

[354] Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajino, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2400-2402.

[355] Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1691-1696.

[356] N. Amann, *Dissertation*, TU München, **2004**.

[357] J. Winkler, E. Urban, C. R. Noe, *Bioconj. Chem.* **2005**, *16*, 1038-1044.

[358] J. H. Banoub, R. P. Newton, E. Esmans, D. F. Ewing, G. Mackenzie, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1869-1915.

[359] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 4128-4158.

[360] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3779-3783.

[361] T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2221-2228.

[362] J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277-280.

[363] J. L. Sessler, J. Jayawickramarajah, *Chem. Commun.* **2005**, 1939-1949.

[364] F. J. M. Hoeben, P. Jonkheijm, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1491-1546.

[365] K. C. Hannah, B. A. Armitage, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 845-853.

[366] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2865-2869.

[367] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 3179-3183.

[368] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 603-606.

[369] J. Engels, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7166-7169.

[370] M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466-3471.

[371] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547-553.

[372] A. P. H. J. Schenning, E. W. Meijer, *Chem. Commun.* **2005**, 3245-3258.

[373] J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12748-12749.

[374] D. Ackermann, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 2790-2804.

[375] H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6522-6525.

[376] C. Brotschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1911-1923.

[377] I. Bouamaied, E. Stulz, *Chimia* **2005**, *59*, 101-104.

[378] K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2005**, 2509-2511.

[379] B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **2005**, *253*, 55-76.

[380] J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.

[381] M. Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Development* **2002**, *12*, 103-128.

[382] M. J. Gait, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 844-853.

[383] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961-6963.

[384] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10304-10306.

[385] J. T. Goodwin, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197-9198.

[386] X. Li, Z.-Y. J. Zhan, R. Knipe, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 746-747.

[387] J. Brunner, A. Mokhir, R. Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410-12411.

[388] N. C. Seeman, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1151-1159.

[389] M. Endo, N. C. Seeman, T. Majima, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6074-6077.

[390] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144-146.

[391] J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *530*, 631-632.

[392] P. Yin, H. Yan, X. G. Daniell, A. J. Turberfield, J. H. Reif, *Angewandt. Chem. -Int. Ed.* **2004**, *43*, 4906-4911.

[393] P. Alberti, J.-L. Mergny, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1569-1573.

[394] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631-636.

[395] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714-10715.

[396] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375-3376.

[397] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, *299*, 1212-1213.

[398] P. Aich, S. L. Labiuk, L. W. Tari, L. J. T. Delbaere, W. J. Roesler, K. J. Falk, R. P. Steer, J. S. Lee, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 477-485.

[399] A. Schwögler, T. Carell, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1415-1418.

[400] E. M. Boon, J. K. Barton, P. I. Pradeepkumar, J. Isaksson, C. Petit, J. Chattopadhyaya, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3402-3404.

[401] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 936-943.

[402] S. M. Langenegger, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 3414-3420.

[403] G. Mathis, J. Hunziker, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3203-3205.

[404] N. C. Seeman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 3220-3228.

[405] Z. Li, Y. Zhang, P. Fullhart, C. A. Mirkin, *Nano Letters* **2004**, *4*, 1055-1058.