

Technische Universität München
Department Chemie
Lehrstuhl II für Organische Chemie

**Darstellung und Untersuchung von Ladungsdonor und –akzeptorsystemen für den
reduktiven Elektronentransfer durch DNA.**

Clemens Wagner

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. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 25.10.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 11.12.2006 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2003 bis September 2005 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München und von Oktober 2005 bis Juni 2006 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht danke ich für die hervorragende Betreuung, die immer genug Platz für eigene Initiative ließ ohne dabei das Ziel aus den Augen zu verlieren.

Prof. Dr. Kessler gilt mein Dank für die Unterstützung unserer Arbeitsgruppe an der TU München und für die Möglichkeit, die Ressourcen seines Lehrstuhls beim Verfassen dieser Arbeit benutzen zu dürfen.

Speziell möchte ich mich bedanken bei:

- meinen Kollegen Dr. Manuela Rist, Dr. Elke Mayer-Enthart, Linda Valis, Claudia Wanninger-Weiß, Christa Prunkl, Sina Berndl, Janez Barbaric, Christoph Beyer, Alex Sommer, Peter Kaden, Peter Kaiser, Robert Huber und Stefan Mitschke für die kreative und fröhliche Laboratmosphäre und eine angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit.
- meinen Laborkollegen im „Exil“ des Lehrstuhls Kessler: Florian Opperer, Jayanta Chatterjee, Dr. Timo Weide, Synthesemann und das Phantom für Elvis-Hits zu jeder Tageszeit und vor allem viel Spaß bei der Arbeit.
- allen weiteren Mitgliedern des AK Kessler, die einem stets mit Rat und Tat zur Seite standen.
- besonders bei Rainer Haessner und Alex Frenzel, die die EDV am laufen hielten und mir ermöglichten in München zusammenzuschreiben.
- Andreas Enthart, der mir die Feinheiten des NMR zwar nicht beibringen konnte, aber jederzeit bereit war eine Messung für mich anzusetzen.
- Dr. Torsten Fiebig und seinen Mitarbeitern für die Messung der zeitaufgelösten Spektroskopie.
- Burghard Cordes für die Aufnahme der ESI-Massenspektren und die Möglichkeit, wichtige Proben auch kurzfristig zu messen.
- Silke Peters für die Messung der EI-Massenspektren.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der Regensburger NMR-Abteilung für die Messung und Interpretation auch von widerspenstigen Proben.

- meinen Praktikanten Fatima Djugonjic-Bilic, Simon Donhauser, Karin Sperling, Stefan Meding und Martin Häusl, die fleißig Phenothiazine gekocht haben und immer mit Herz- und Fingerblut bei der Sache waren.
- Ulrike Weck, Martha Fill, Evelyn Bruckmaier und Marianne Machule für ihre stete Unterstützung in organisatorischen Dingen, besonders beim Umzug nach Regensburg.
- meinen Eltern für die Möglichkeit zu studieren und ihre Unterstützung, auch aus weiter Ferne.
- Dietmar, Christine, Helene, Moritz und Johanna Neugebauer für viele sonntägliche Abendessen und das Gefühl, zur Familie zu gehören.

Ganz besonders danke ich Silke für ihre stete Unterstützung, Motivation und Zuneigung.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung und Themenstellung</i>	1
2	<i>Theoretischer Hintergrund</i>	7
2.1	Ladungstransfer in DNA	7
2.1.1	Reduktiver Elektronentransfer durch DNA	9
2.1.2	Oxidativer Lochtransfer durch DNA	23
2.2	Experimentelle Methoden	25
2.2.1	Optische Spektroskopie	25
2.2.2	Cyclovoltammetrie und Radikalspektroskopie	32
2.2.3	Berechnung des Redoxpotentials angeregter Verbindungen	33
2.3	Synthesemethoden	34
2.3.1	DNA-Synthese	34
2.3.2	DNA-Synthese mit artifiziellen Bausteinen	36
2.3.3	Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen an Nucleosiden	38
2.3.4	Synthese von 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU)	40
3	<i>Synthese eines nukleosidischen Elektronendonors</i>	41
3.1	Arbeiten zur Synthese von 5-(8-(<i>N,N</i>-Dimethyl)aminopyren-1-yl)-2'-desoxyuridin ...	41
3.2	Synthese von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (2)	45
3.2.1	Spektroskopische Untersuchungen von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin	49
3.2.2	Synthese von Ptz-dU-modifizierter DNA	56
3.2.3	Spektroskopische Untersuchungen von Ptz-dU-modifizierter DNA	58
3.2.4	Untersuchungen zum Elektronentransfer	66
3.3	Zusammenfassung	71
4	<i>Synthese eines nicht-nukleosidischen Elektronendonors</i>	73
4.1	Synthese von 10-(3-((<i>S</i>)-2,3-Dihydroxyprop-1-yl)-aminoprop-1-yl)-phenothiazin (3)	73
4.2	Spektroskopische Untersuchungen von 10-(3-((<i>S</i>)-2,3-Dihydroxypropyl)-aminopropyl)-phenothiazin (3)	78
4.3	Synthese von Phenothiazin-modifizierter DNA	81
4.4	Spektroskopische Untersuchungen von Phenothiazin-modifizierter DNA	84
4.5	Zusammenfassung	91
5	<i>Synthese eines absorptionsspektroskopisch nachweisbaren Elektronenakzeptors</i>	93

6	<i>Synthese eines Elektronenakzeptors zur Durchführung zeitaufgelöster Spektroskopie</i>	101
6.1	Synthese von <i>N</i> -(2-Ethylhexyl)- <i>N'</i> -(3- <i>O</i> -(4,4-dimethoxytrityl)-(<i>S</i>)-2,3-dihydroxypropyl)-perylene-3,4;9,10-tetracarbonsäurebisimid (31)	104
6.2	Spektroskopische Untersuchungen von <i>N</i> -(2-Ethylhexyl)- <i>N'</i> -(3- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-(<i>S</i>)-2,3-dihydroxypropyl)-perylene-3,4;9,10-tetracarbonsäurebisimid (31).....	105
6.3	Synthese von Perylenbisimid-modifizierter DNA	109
6.4	Spektroskopische Untersuchung von Perylenbisimid-modifizierter DNA	111
7	<i>Synthese eines Donor-Akzeptor-Systems zur spektroskopischen Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch DNA</i>	125
7.1	Untersuchungen durch <i>steady-state</i> -Spektroskopie	127
7.2	Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen	130
8	<i>Fünffach Ptz-dU-markierte DNA</i>	135
9	<i>Zusammenfassung</i>	141
10	<i>Summary</i>	143
11	<i>Experimenteller Teil</i>	145
11.1	Allgemeines.....	145
11.2	Arbeitsvorschriften	148
11.3	DNA- Synthese	167
11.4	Bestrahlung von Ptz-dU- und Br-dU-modifizierten DNA-Duplexen	175
12	<i>Literaturverzeichnis</i>	177

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
A	Adenin
Å	Angström
Ac	Acetyl
Ak	Akzeptor
APy	Aminopyren
AU	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
BET	Elektronenrücktransfer (<i>back electron transfer</i>)
bp	Basenpaar
Br-dU	5-Brom-2'-desoxyuridin
ⁱ Bu	<i>Isobutyryl</i>
Bz	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CED-Cl	2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> -diisopropylchlorophosphoramidit
CPG	<i>controlled pore glass</i>
cps	<i>counts per second</i>
CT	Ladungstransfer (<i>charge transfer</i>)
CV	Cyclovoltammetrie
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dG	2'-Desoxyguanin
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Do	Donor

dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
ds	doppelsträngig
d. Th.	der Theorie
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetat
em	Emission
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz(spektroskopie)
ET	Elektronentransfer
Et	Ethyl
exc	Anregung (<i>excitation</i>)
F	<i>N</i> -(2-Ethylhexyl)- <i>N'</i> -((<i>S</i>)-2,3-dihydroxypropyl)-perylene-3,4;9,10-tetracarbonsäurediimid
FC	Flash-Säulenchromatographie
G	Guanin
h	Stunde
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum
inj	Injektion
i. V.	im Vakuum
K	Kelvin
LM	Laufmittel
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	molar, mol/L
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption and ionization</i>
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
N	beliebige Nukleobase (A, C, G, T)
NaP _i	Natriumphosphatpuffer, pH 7
NBS	N-Brom-Succinimid
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NMR	Kernmagnetresonanz(spektroskopie)
O	1,2-Didesoxy-D-ribofuranose
P	5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin

PG	Schutzgruppe (<i>protective group</i>)
Ph	Phenyl(-rest)
PNA	Peptidnukleinsäure
ⁱ Pr	<i>Isopropyl</i>
Ptz	Phenothiazin
Ptz-dU	5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin
Py-dU	5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s	Sekunde
SEC	Spektro-Elektrochemie
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
ss	einzelsträngig
T	Thymin
TAMRA	Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyl-dimethyl-silyl
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
Ts	4-Toluolsulfonyl (Tosyl)
U	Uridin
UV	Ultraviolett (190-400 nm)
V	Volt
Vis	sichtbares Licht (<i>visible</i>), 400-800 nm
vs.	gegen
v.v.	<i>vice versa</i>
Y	Pyrimidinbase (C oder T)
Z	10-(3-((<i>S</i>)-2,3-Dihydroxypropyl)-aminopropyl)-phenothiazin

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 werden *kursiv* gedruckt.

¹ Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

² a) IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Joint Commission 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.

1 Einleitung und Themenstellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Ladungstransfer durch DNA und der Synthese von neuartigen modifizierten Nucleobasen. Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist für die meisten Lebewesen von essentieller Bedeutung, da in ihrer Basensequenz die genetische Information gespeichert ist. Die Veränderung der Basensequenz durch Replikationsfehler, vor allem aber durch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung, Alkylierungs- und Oxidationsmittel führt zur Schädigung des Organismus. Mögliche Folgen sind Mutationen, Apoptose oder die Entstehung von Krebserkrankungen.^[1-3]

Der oxidative Ladungstransfer durch DNA ist maßgeblich an den Prozessen beteiligt, die zur Schädigung der DNA führen.^[4] Wegen dieser Bedeutung für die Biologie wurde die Aufklärung des oxidativen Lochtransfers in den letzten 20 Jahren intensiv vorangetrieben. Inzwischen ist der Mechanismus des Lochtransfers weitestgehend aufgeklärt.^[5] Über die biologische Bedeutung des verwandten Prozesses, des reduktiven Elektronentransfers durch DNA, herrscht noch Unklarheit. Eine Beteiligung von Elektronentransferprozessen wird z.B. bei der proteinabhängigen Erkennung von DNA-Schäden vermutet. Die Erforschung der Mechanismen des Elektronentransfers wurde erst seit dem Jahr 2000 intensiviert und ist noch nicht so weit fortgeschritten. Insbesondere konnten bisher noch keine Elektronentransferraten bestimmt werden. Durch das gesteigerte Interesse an Nucleinsäuren zur Verwendung in der Nanotechnologie^[6-12] hat die Bedeutung des Elektronentransfers durch DNA stark zugenommen.

In dieser Arbeit sollen neuartige modifizierte Nucleoside und Nucleosidanaloga, die als Ladungsdonor bzw. -Akzeptor dienen, zum Einbau in die DNA synthetisiert und in Experimenten zum Elektronentransfer angewendet werden. Die Modifikation von DNA-Oligonucleotiden mit artifiziellen Nucleobasen hat sich inzwischen als eine gängige Methode der Biochemie und bioorganischen Chemie etabliert. Die zu behandelnden Fragestellungen lauten:

- auf welche Weise werden Elektronen durch die DNA transportiert und welche intermediären Ladungsträger treten auf?
- sind noch weitere Prozesse in den Mechanismus des Elektronentransfers involviert?
- mit welcher Geschwindigkeit läuft der Elektronentransfer durch DNA ab?

Bisherige Untersuchungen zum reduktiven Elektronentransfer wurden in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* mit dem Ladungsdonor 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU)^[13-17] durchgeführt. Das Reduktionspotential dieses Systems von -1.8 V im angeregten Zustand reicht gerade aus, um ein Elektron in die DNA zu injizieren. Es bildet sich ein Gleichgewicht zwischen angeregtem und ladungstrenntem Zustand aus. In dieser Arbeit soll ein Ladungsdonor synthetisiert und charakterisiert werden, dessen Reduktionspotential im angeregten Zustand deutlich über dem Potential des Thymins bzw. Uridins liegt.

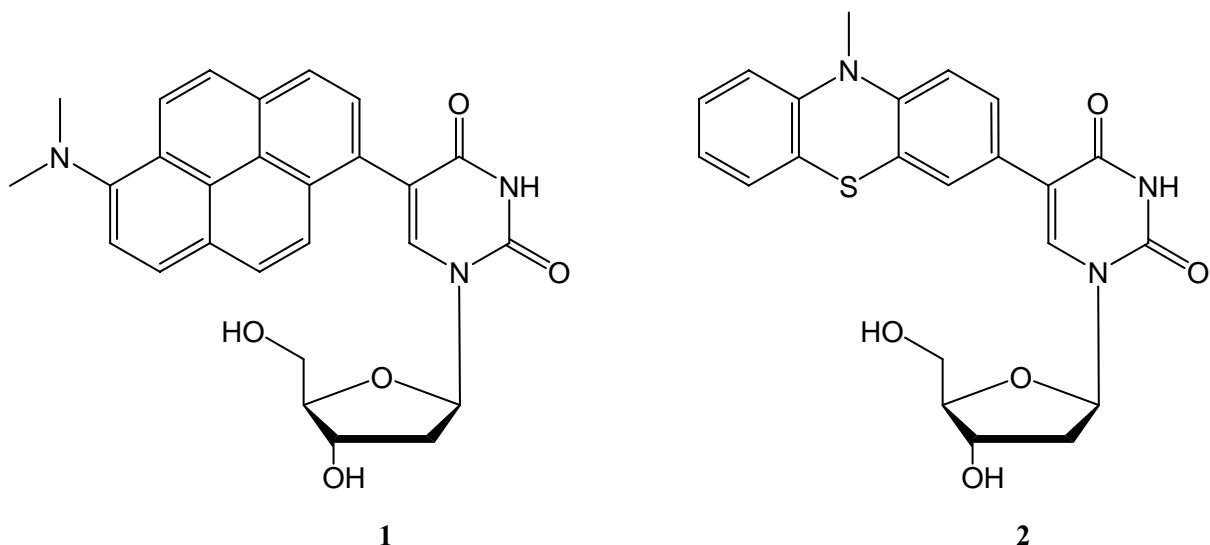


Abb.1-1: Die Strukturen der Zielmoleküle 5-(6-(*N,N*-Dimethylamino)-pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin **1** und 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **2**.

Um dieses Ziel zu erreichen sollen zwei unterschiedliche Wege erprobt werden: Zum einen die Modifikation von Py-dU mit einer elektronenreichen Gruppe. Die Einführung einer Aminogruppe am Pyren sollte das Reduktionspotential des Pyrens ausreichend erhöhen, um eine Injektion eines Überschusselektrons in die DNA zu ermöglichen. Der zu synthetisierende Ladungsdonor ist 5-(6-(*N,N*-Dimethylamino)-pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin **1**. Zum anderen ist der Austausch des Pyrenchromophors durch einen anderen Ladungsdonor durchzuführen. Als photochemisch selektiv anzuregendes System ist Phenothiazin vorgesehen, dessen Reduktionspotential im angeregten Zustand zur Übertragung eines Elektrons auf die

Pyrimidinbasen der DNA ausreichend sein sollte. Das zu synthetisierende Zielmolekül ist 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **2**. Die Ladungsdonoren sollen in DNA-Oligonukleotide inkorporiert werden. Eine Untersuchung der optischen und elektronischen Eigenschaften soll mit Hilfe der *steady-state*-Spektroskopie erfolgen. In Kombination des Ladungsdonors mit dem Ladungsakzeptor 5-Brom-2'-desoxyuridin soll der Elektronentransfer durch DNA chemisch untersucht werden.

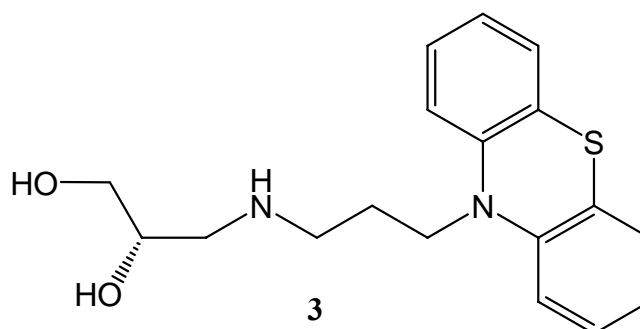


Abb.1-2: Das Zielmolekül 10-(3-((*S*)-2,3-Dihydroxypropyl)-aminopropyl)-phenothiazin **3**.

Eine weitere Möglichkeit zum Einbau eines Ladungsdonors in DNA-Oligonukleotide bietet die Inkorporation eines Chromophors als artifizielle Nukleobase. Dazu soll Phenothiazin an ein Nukleosidanalogen geknüpft werden, anstatt wie in 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **2** kovalent mit einer Nukleobase verbunden zu sein. Als Analogon zum 2'-Desoxyribosesterest von Nukleosiden ist ein 1-Aminopropan-(*S*)-2,3-diol bereits in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* angewendet worden.^[18, 19] Mit diesem Linkersystem soll Phenothiazin über eine Propylgruppierung verbunden werden. 10-(3-((*S*)-2,3-Dihydroxypropyl)-aminopropyl)-phenothiazin **3** soll hergestellt und spektroskopisch charakterisiert werden. DNA-Oligonukleotide, die mit **3** modifiziert sind, sollen synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert werden.

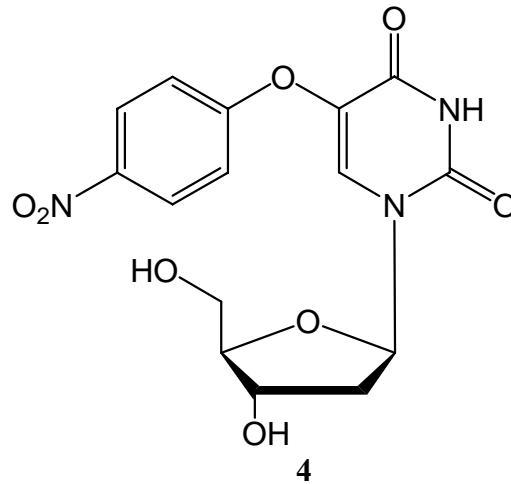


Abb.1-3: Struktur des Zielmoleküls 5-(4-Nitrophenoxy)-2'-desoxyuridin **4**.

An neuartige Ladungsakzeptoren wird die Anforderung gestellt, dass sie die Detektion des Ladungstransfers vereinfachen sollen. Ein dabei zu beachtender Aspekt ist die Verminderung des apparativen Aufwands zur Detektion des erfolgreichen Ladungstransfers. Der Nachweis des reduktiven Ladungstransfers über absorptionsspektroskopische Methoden soll durch neue modifizierte Nucleoside ermöglicht werden. Analog zur reduktiven Spaltung von 5-Brom-2'-desoxyuridin soll die Freisetzung eines Farbstoffs aus einem modifizierten Nucleosid versucht werden. Die Aufgabe ist es, den Ladungsakzeptor 5-(4-Nitrophenoxy)-2'-desoxyuridin **4** zu synthetisieren und anhand dieses Modellsystems zu überprüfen, ob es sich um einen durch optische Spektroskopie nachweisbaren Akzeptor handelt.

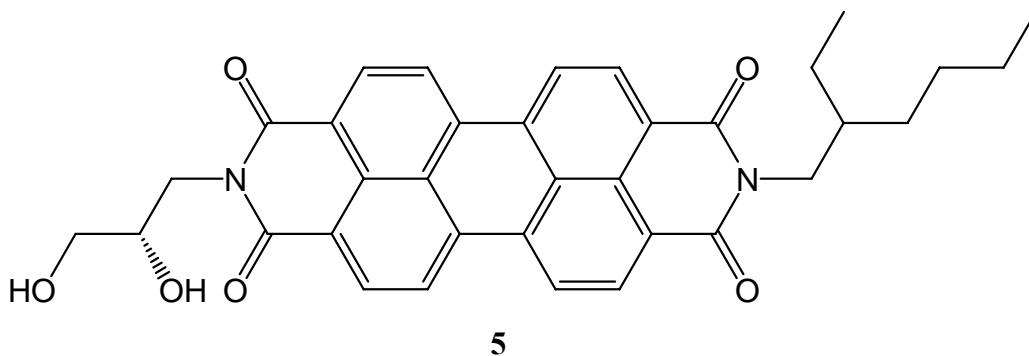


Abb.1-4: Die Struktur des Zielmoleküls *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-((*S*)-2,3-dihydroxypropyl)-perylene-3,4,9,10-tetracarbonsäurebisimid **5**.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist, einen Elektronenakzeptor zur detaillierten, zeitaufgelösten spektroskopischen Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch die DNA bereitzustellen. Dazu ist ein System notwendig, welches durch sein Absorptions- oder Fluoreszenzverhalten die Aufnahme eines Elektrons mit geringer Ansprechzeit signalisiert. Diese Aufgabe soll *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-((*S*)-2,3-dihydroxypropyl)-perylene-3,4,9,10-

tetracarbonsäurebisimid **5** erfüllen. Die Inkorporation eines solchen Perylenfarbstoffs in Oligonukleotide und die spektroskopische Untersuchung des Farbstoffs sowie der modifizierten DNA-Oligonukleotide soll im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

Die detaillierte Aufklärung der Mechanismen des reduktiven Elektronentransfers durch DNA erfordert ein Nachweissystem aus Ladungsdonor und -akzeptor, durch welches man in der Lage ist, die vermutlich mit Ratenkonstanten von $k \approx 10^8$ - 10^9 s⁻¹ verlaufenden Prozesse des Elektronentransfers zu untersuchen. Für spektroskopische Messungen an DNA-Duplexen, die Phenothiazin **3** als Ladungsdonor und Perylenbisimid **5** als Elektronenakzeptor tragen, sollen modifizierte DNA-Oligonukleotide bereitgestellt und durch *steady-state*-Spektroskopie untersucht werden. Die zeitaufgelösten Messungen mittels Transientenabsorptionsspektroskopie werden von der Arbeitsgruppe *Fielig* (Boston College, USA) durchgeführt und ausgewertet.

Die Eignung der DNA zur Verwendung in der Nanotechnologie ist ein viel diskutiertes Thema in der Literatur.^[10-12, 20-24] Unter Einsatz des im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten modifizierten Nukleosids **2** soll ein Modellsystem erstellt werden, in welchem mehrere modifizierte Nukleobasen in unmittelbarer Nachbarschaft in einen DNA-Strang inkorporiert werden. Mit spektroskopischen Methoden soll untersucht werden, in welchem Maße die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors sowie die strukturelle Stabilität der DNA von der Anordnung mehrerer Modifikationen an der DNA beeinflusst werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Ladungstransfer in DNA

DNA besitzt die Fähigkeit, elektrische Ladung durch den Basenstapel zu transportieren. Aufgrund des charakteristischen Aufbaus der DNA, insbesondere der gestapelten und miteinander wechselwirkenden π -Elektronensysteme der aromatischen Basen, ist der Transport von positiven und negativen Ladungen in Richtung der Helixachse schon bald nach Aufklärung der B-DNA-Struktur diskutiert worden.^[25] Man unterscheidet je nach Art der transportierten Ladung zwischen oxidativem Lochtransfer und reduktivem Elektronentransfer. Besonders die biologische Relevanz des Lochtransfers, dessen Beitrag zu Schädigungen des menschlichen Erbgutes und den daraus resultierenden Erkrankungen, führte zu verstärkter Erforschung der Mechanismen des oxidativen Ladungstransfers durch DNA.^[2-4, 26]

Sowohl der reduktive Elektronentransfer wie auch der oxidative Lochtransfer beschreiben eine Bewegung von Elektronen durch die DNA. Der Lochtransfer kann aber nicht als Elektronentransfer in entgegengesetzter Richtung betrachtet werden. Der grundlegende Unterschied zwischen beiden Vorgängen sind die dabei beteiligten Orbitale. Der oxidative Lochtransfer ist HOMO-kontrolliert, während der Elektronentransfer unter LUMO-Kontrolle abläuft.^[27, 28]

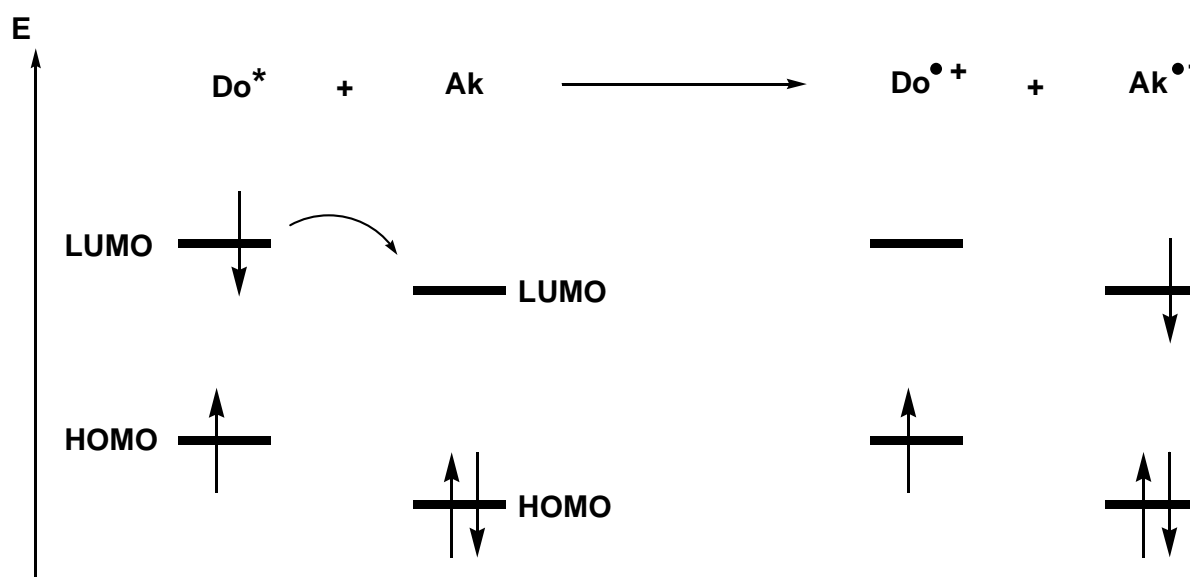


Abb.2-1: Am reduktiven Elektronentransfer beteiligte Orbitale des Ladungsdonors **Do** und Akzeptors **Ak**. Ein Elektron wird aus dem LUMO des angeregten Donors in das LUMO des Akzeptors übertragen.

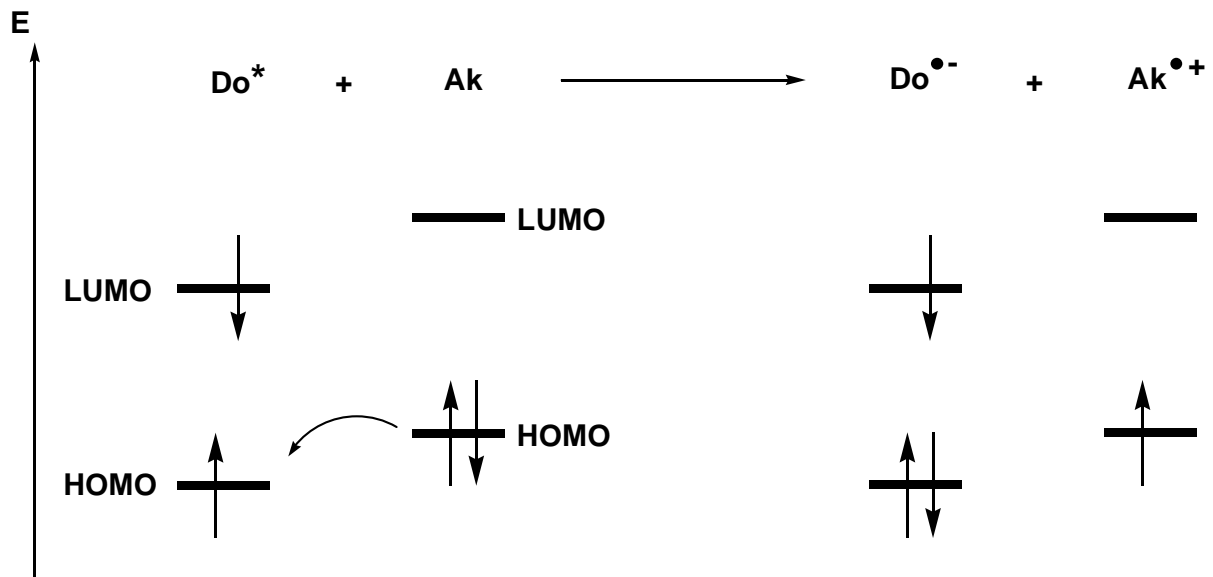


Abb.2-2: Schema des oxidativen Lochtransfers. Ein Elektron aus dem HOMO des Ladungsakzeptors **Ak** wird in das HOMO des angeregten Ladungsdonors **Do*** übertragen.

Zur Erforschung des Ladungstransfers ist eine Modifikation der DNA mit redoxaktiven Sonden sowohl zur Erzeugung als auch zum Abfangen der Ladung notwendig. Die Inkorporation dieser Sonden in den DNA-Basenstein kann nach folgenden Methoden geschehen:^[29]

- (A) Der Einbau einer redoxaktiven Sonde als artifizielle Nukleobase. Der Donor bzw. Akzeptor wird über einen Linker oder eine Desoxyriboseeinheit am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA verankert und ersetzt in der Basensequenz eine Nukleobase.
- (B) Die Modifikation eines natürlichen Nukleosids mit einer redoxaktiven Gruppe. Das resultierende modifizierte Nukleosid kann über Standardsynthesemethoden in den Basenstein inkorporiert oder an der festen Phase an einen entsprechenden Vorläufer angeknüpft werden. Die Sonde steht idealerweise in die (große oder kleine) Furche der DNA-Doppelhelix.
- (C) Die Platzierung der Sonde als Kopfgruppe einer DNA-Haarnadel. Die Modifikation ist (über Linkereinheiten) mit zwei komplementären DNA-Sequenzen versehen, die in der Lage sind einen DNA-Duplex zu bilden. Die Sonde kommt auf dem Basenstein zu liegen und bildet die Schleifenregion einer DNA-Haarnadel. Eine solche Haarnadel ist sehr stabil, nimmt meist die B-DNA-Konformation ein und dissoziiert erst bei

hoher Temperatur. Diese Variante ist außerdem synthetisch sehr einfach durchzuführen.

(D) Die Anknüpfung über einen Linker, verbunden mit der Interkalation in den Basenstapel. Die Bindungsstelle des Linkers kann der 3'- oder 5'-Terminus der DNA sein, auch eine Anknüpfung an spezielle Bausteine inmitten der DNA-Sequenz ist möglich. Der Ort der Interkalation kann durch Variation des Linkers eingegrenzt, jedoch nicht genau definiert werden, der entstehende Interkalationskomplex ist nicht einheitlich.

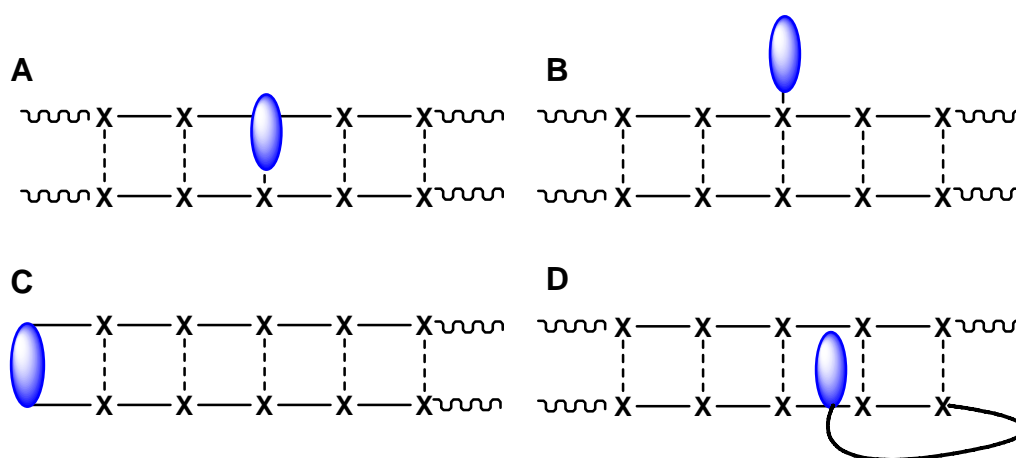


Abb.2-3: Möglichkeiten zur Modifikation von DNA mit redoxaktiven Sonden.

2.1.1 Reduktiver Elektronentransfer durch DNA

Eine biologische Bedeutung des reduktiven Elektronentransfers konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Unter natürlichen Bedingungen sind keine Schädigungen der DNA bekannt, die auf reduktiven Ladungstransfer zurückzuführen sind. Die Untersuchung des zu DNA-Schäden führenden oxidativen Ladungstransfers ist daher bevorzugt vorangetrieben worden. Anwendungen des reduktiven Transfers von Überschusselektronen finden sich in der Nanotechnologie und der DNA-Chiptechnologie.^[21, 30-37]

Basenfehlpaarungen, fehlende oder beschädigte Nukleobasen unterbrechen den Basenstapel und verhindern einen effektiven Transfer von Elektronen. Ein solcher ein/aus-Schalter des Elektronentransfers lässt sich durch einen elektrochemisch auslesbaren Chip zu einem leistungsfähigen Analysensystem erweitern.^[38-43] Das Grundprinzip dieser Sonde ist eine einzelsträngige DNA-Sequenz, die zum einen mit einem Elektronendonator versehen wird, zum anderen auf der Oberfläche einer Elektrode oder eines Chips immobilisiert ist. Gibt man die

zu untersuchende Substanz hinzu, und befindet sich in dieser Substanz ein zur DNA- Sequenz der Sonde komplementärer DNA-Abschnitt, so lassen sich die DNA- Einzelstränge hybridisieren. Durch den intakten Duplex erfolgt Elektronentransfer vom Donor zur Elektrode und löst dort ein Signal aus. Dieser Vorgang ist nur dann möglich, wenn die Basensequenz der Sonde und der Testsubstanz vollständig komplementär sind, ansonsten kann kein Signal die Elektrode erreichen. Damit ist diese Methode extrem empfindlich auf DNA-Schäden und Basenfehlpaarungen und eignet sich auch zur Detektion von Punktmutationen (SNP, *single nucleotide polymorphism*).^[44] Derartige Analyseverfahren werden z.B. in der Genetik, der Virologie, der Onkologie und der Pharmakogenetik benötigt.

2.1.1.1 Mechanismen

Der reduktive Ladungstransport durch DNA benötigt einen Ladungsdonor zur Injektion des Elektrons, sowie einen Ladungsakzeptor zum Abfangen desselben. Eine thermodynamische Grundbedingung ist dabei, dass der Ladungsdonor in der Lage sein muss, den Akzeptor zu reduzieren. Wie das Elektron durch die DNA transportiert wird, ist von den Reduktionspotentialen der Nukleobasen und des Ladungsdonors abhängig.

Das größte Reduktionspotential besitzt G vor A, die Pyrimidine T bzw. U und C sind am leichtesten zu reduzieren^[45-49]. Wie Experimente von *Lewis* und *Wasielowski* zeigen, ist in B-DNA-Duplexen das Reduktionspotential von C größer als das Potential von T. Das Potential hängt dabei von der Umgebung ab: beispielsweise senkt die Gegenbase Inosin statt Guanin das Potential von C ab. Die Sequenzmotive TCT und TTT gelten als die stärksten Elektronenakzeptoren.^[50]

Die Reihenfolge der Reduzierbarkeit der Nukleobasen ist unzweifelhaft $G > A > C \approx U \approx T$. Eine exakte Bestimmung der Reduktionspotentiale ist mehrfach versucht worden. Die Potentiale schwanken allerdings stark in Abhängigkeit des Lösungsmittels und der experimentellen Bedingungen. Damit können die Eigenschaften von Nukleobasen in der DNA signifikant von denen der isolierten Nukleobasen abweichen. Besonders die Werte für die Potentiale von T und C besitzen eine große Streuung. Anhand von Experimenten zum Ladungstransfer durch DNA kann ein Wert von ca. -1.8 V für beide Nukleoside angenommen werden. Der von *Steenken* gemessene und extrem abweichende Wert des Reduktionspotentials von $E(C/C^{\bullet-}) \approx -1.1$ V reflektiert vermutlich den Einfluss eines gekop-

pelten Protonentransfers^[46]. Korrekter wäre demnach die Darstellung $E(C/C(H)') \approx -1.1 \text{ V}$. Die Potentiale der Purinbasen können in guter Übereinstimmung mit experimentellen und theoretischen Betrachtungen zu -2.75 V für G und -2.45 V für A angenommen werden.

Der oxidative Lochtransfer durch DNA ist bevorzugt (seit ca. 1986) untersucht worden^[51]. Seit 1993 wurden erste Experimente zum reduktiven Ladungstransfer publiziert^[52], intensivere Untersuchungen fanden aber erst ab 2000 statt. Anfänglich wurde, in Ermangelung aussagekräftiger Untersuchungen zum reduktiven Ladungstransfer, der Mechanismus des oxidativen Lochtransfers auf das Prinzip des Transfers von Elektronen übertragen^[28]. Demnach sind zwei Wege möglich, um eine Elektron durch die DNA vom Ladungsdonor zum Akzeptor zu übertragen. Von entscheidender Bedeutung sind dabei die Nucleobasen, die die Brücke zwischen Donor und Akzeptor bilden.

Liegen die Energieniveaus dieser Brücke in demselben Bereich wie der Ladungsdonor, so ist eine Übertragung des Überschusselektrons auf die Basen der Brücke möglich. Das Elektron wird schrittweise von einem intermediären Ladungsträger zum nächsten übertragen und ist auf den Basen der Brücke tatsächlich lokalisiert.^[40, 53] Die Übertragung eines Elektrons auf eine Nucleobase stellt eine Reduktion der Base dar. Betrachtet man die Reduktionspotentiale der Nucleobasen (s.o.), so sind die Purinbasen dG und dA als Ladungsträger in natürlicher DNA ungeeignet, da ihre Reduktionspotentiale zu hoch liegen. Die Redoxpotentiale von dC und T sind etwa gleich groß und mit -1.8 V die niedrigsten der natürlichen Nucleobasen. Die Radikalanionen dieser Basen konnten als intermediäre Ladungsträger nachgewiesen werden. Das Elektron „springt“ von einem Ladungsträger zum nächsten, dieser Vorgang wird deswegen als *hopping*-Mechanismus bezeichnet.

Jeder *hopping*-Schritt ist ein Tunnelprozess von einem intermediären Ladungsträger zum nächsten. Damit ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Ladung auf den dazwischenliegenden Basen gleich Null. Eine Bestimmung der Reaktionsrate für einen *hopping*-Schritt ist im Falle des oxidativen Lochtransfers gelungen.^[54] Für den Transfer einer positiven Ladung von einem G zu einer GG-Sequenz wurde die Ratenkonstante zu $k_{\text{HOP}} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

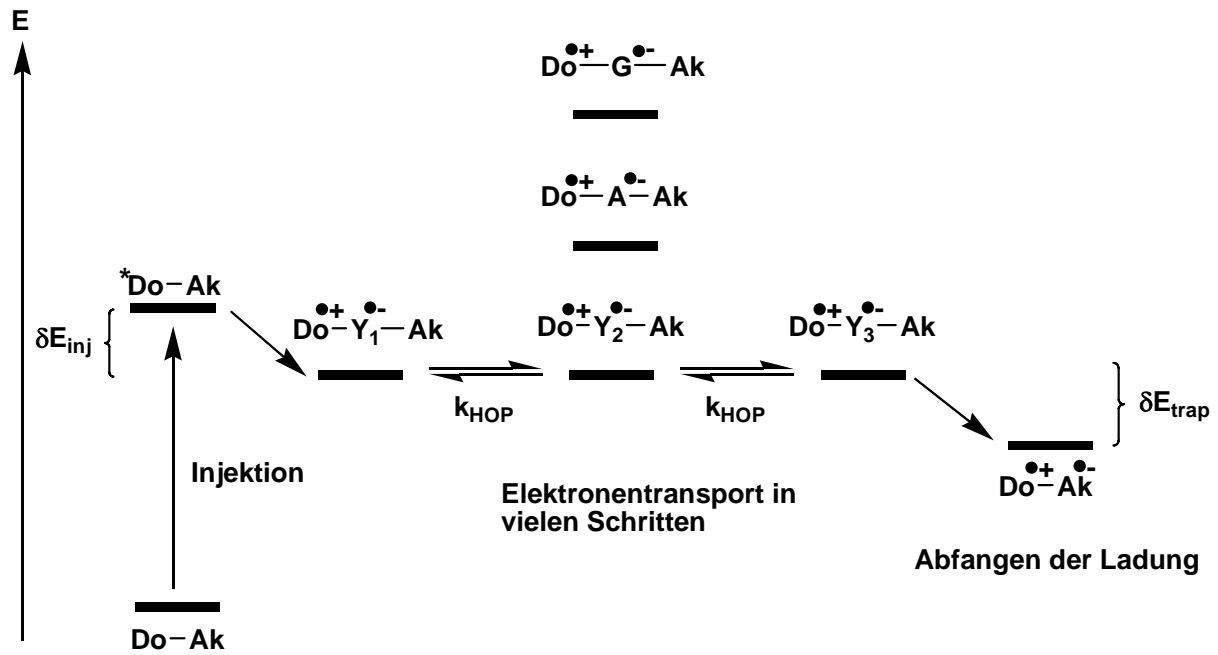


Abb.2-4: Schematische Darstellung des Ladungstransfers nach dem *hopping*-Mechanismus. Die Ladung wird vom Donor **Do** in den Basenstapel injiziert und wandert in mehreren Schritten über die Pyrimidinbasen ($\text{Y} = \text{C}$ oder T) zum Akzeptor **Ak**. Purinbasen sind am Ladungstransport nicht beteiligt.

Liegt der Ladungsdonor energetisch unter den Niveaus der Brücke, so ist eine Injektion der Ladung in die Nucleobasen der Brücke nicht zu erwarten. Statt dessen wird die Ladung in einem einzigen Schritt vom Ladungsdonor zum Akzeptor übertragen, ohne jemals auf den dazwischenliegenden Nucleobasen lokalisiert gewesen zu sein. Dieser Prozess ist der *Superaustausch*-Mechanismus.^[40, 53, 55]

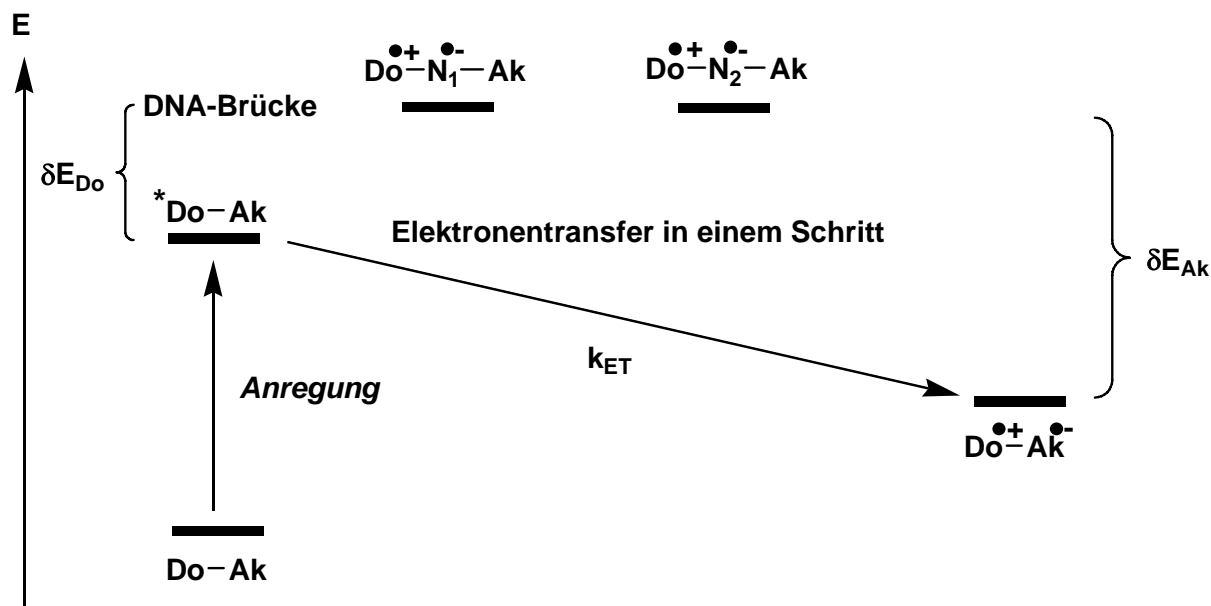


Abb.2-5: Schematische Darstellung des Superaustausch- Mechanismus. Die Ladung wird vom Donor **Do** in einem Schritt auf den Akzeptor **Ak** übertragen, ohne auf den dazwischenliegenden Nucleobasen **N** lokalisiert zu sein.

Die Rate des Elektronentransfers nach dem Superaustausch-Prinzip ist exponentiell von der Entfernung R zwischen Ladungsdonor und Akzeptor abhängig. Nach der *Marcus*-Theorie^[56] berechnet sich die Ratenkonstante zu:

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{V^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(-\frac{-(\Delta G_{ET} + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad (\text{Gleichung 2-1})$$

- k_{ET} Ratenkonstante des Ladungstransfers
- V^2 Matrixelement der elektronischen Kopplung zwischen Donor und Akzeptor
- λ Reorganisationsenergie
- k_B Boltzmannkonstante
- T absolute Temperatur
- ΔG_{ET} Triebkraft des Elektronentransfers

In exponentieller Abhängigkeit des Abstandes R zwischen Donor und Akzeptor verändert sich das Matrixelement der elektronischen Kopplung:

$$V^2 = V_0^2 \cdot e^{-\beta \cdot R} \quad (\text{Gleichung 2-2})$$

- V_0^2 Maximalwert von V^2
- β Proportionalitätsfaktor
- R Abstand zwischen Donor und Akzeptor

Die Zusammenfassung der Gleichungen 2-1 und 2-2 liefert eine exponentielle Abstandsabhängigkeit der Elektronentransferrate:

$$k_{ET} \propto e^{-(\beta \cdot R)} \quad (\text{Gleichung 2-3})$$

Der β -Faktor als Maß für die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers ist eine charakteristische Eigenschaft der jeweils untersuchten Spezies. β ist unter anderem von den verwendeten Donor- und Akzeptorsystemen, wie auch von den zu durchtunnelnden Basen abhängig.

In DNA-haltigen Gläsern wurde bei Tieftemperaturmessungen (< 77 K) ein Tunnelprozess nach dem Superaustausch-Mechanismus belegt.^[57-60] Der β -Wert dieses Vorgangs liegt zwischen 0.8 und 1.2 \AA^{-1} . Wie auch theoretische Berechnungen vorhersagen, ist die Abstandsabhängigkeit des Ladungstransfers durch DNA vergleichbar mit dem Ladungstransfer durch Proteine. Liegt die DNA dagegen in Lösung vor bzw. misst man bei höheren Temperaturen, so erfolgt der Elektronentransfer durch DNA nach dem *hopping*-Mechanismus.

Neuere Untersuchungen^[61] beziehen die Flexibilität und Dynamik der DNA in mechanistische Modelle mit ein. Man nimmt an, dass der Ladungstransfer mit der Bewegung der Nukleobasen gekoppelt ist. Ein Superaustausch von einer Potentialsenke zur nächsten (gleichbedeutend mit einem *hopping*-Schritt) ist nur möglich, wenn sich gerade eine effektive Überlappung der Orbitale der dazwischenliegenden Basen ergibt. Dieser Vorgang wird als *base gating* bezeichnet und gilt sowohl für den reduktiven als auch den oxidativen Ladungstransfer.

2.1.1.2 γ – Puls – Radiolyse – Studien

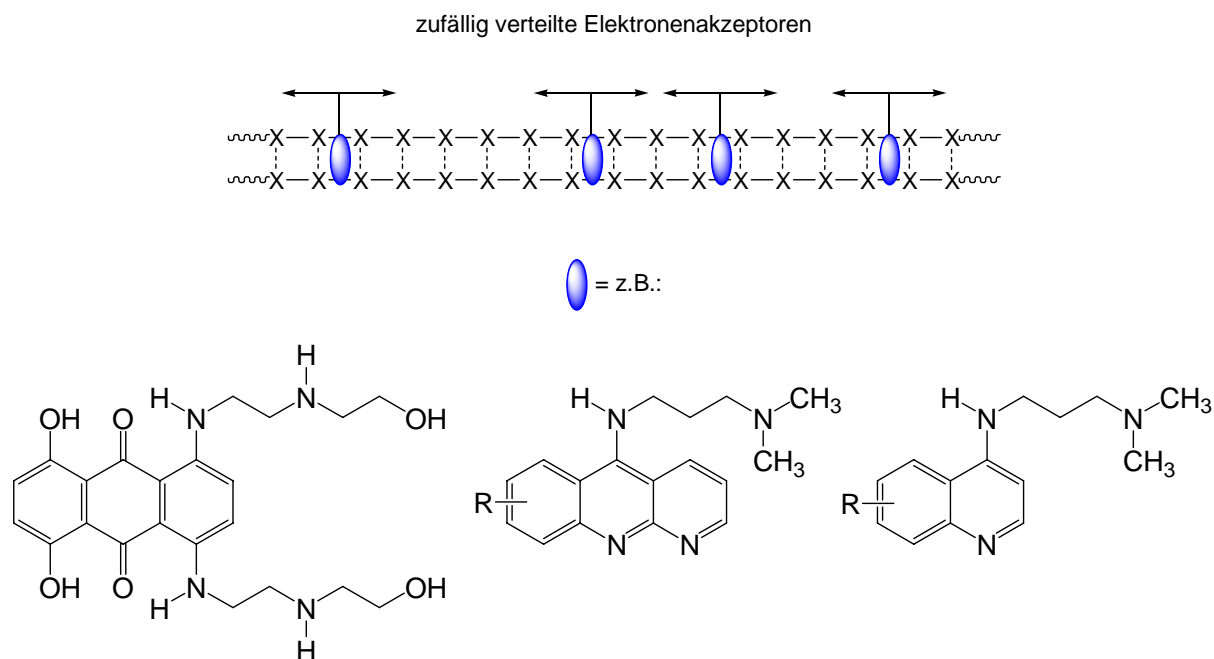


Abb.2-6: Aufbau eines typischen γ -Puls-Radiolyse-Experiments.

Erste Untersuchungen zum reduktiven Elektronentransfer durch DNA wurden mit γ -Puls-Radiolyse-Verfahren von *Sevilla* und *Anderson* durchgeführt.^[57-60, 62-65] Das zu transportierende Elektron wurde durch γ -Strahlung aus dem wässrigen Lösungsmittel freigesetzt. Als Elektronenakzeptor dienten polykondensierte Aromaten, Acridine, Chinolin oder Ethidium. Diese interkalieren an zufälligen Stellen in native DNA. Durch ESR-Spektroskopie kann beobachtet werden, wie das primär entstandene Nucleobasen-Radikalanion seine überschüssige Ladung abgibt. Das neu entstehende Radikalanion des interkalierten Elektronenakzeptors nimmt die Ladung auf. Weder der Ort des Eintritts eines Elektrons in den Basenstapel noch der Ort seines Abfangens kann beeinflusst oder detektiert werden. Aussagen über den Mechanismus des reduktiven Elektronentransfers sind daher nur sehr eingeschränkt möglich.

2.1.1.3 Photochemische Auslösung des Elektronentransfers

Ein kovalent an die Basensequenz gebundener Ladungsdonor ermöglicht es, den Ort an dem die Ladung in die DNA eintritt genau zu lokalisieren.. Die Injektion des Elektrons wird durch selektive photochemische Anregung des Donorsystems initiiert. Das Reduktionspotential des angeregten Elektronendonors muss mindestens zur Reduktion von Pyrimidinbasen ausreichen, um ein Elektron in die DNA übertragen zu können.

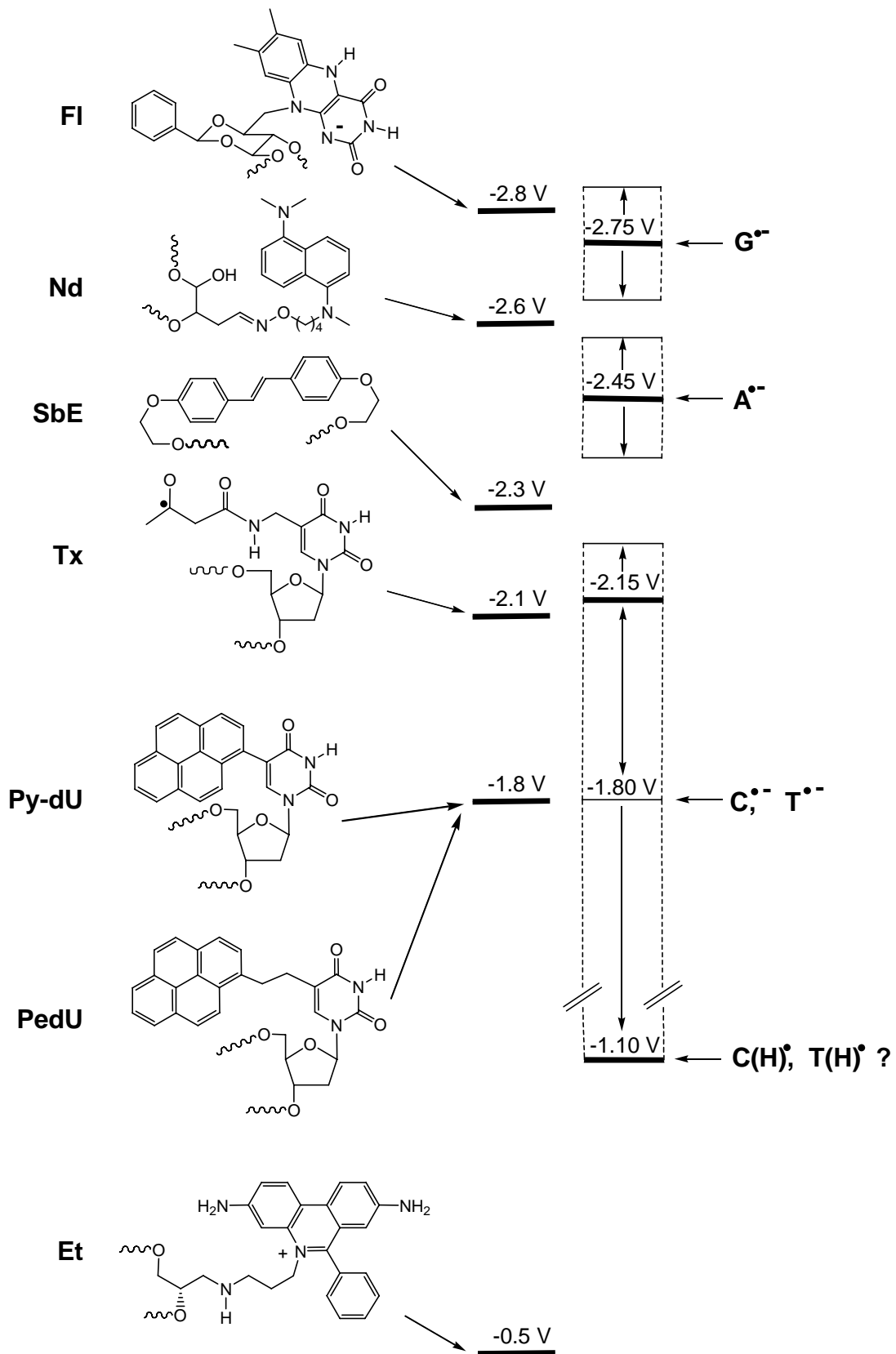


Abb.2-7: Übersicht über Ladungsinjektoren zur Auslösung des Elektronentransfers durch DNA. Für die Redoxpotentiale der Radikalanionen natürlicher DNA-Basen sind die wahrscheinlichsten Werte mit ihrer Schwankungsbreite angegeben.

Das von *Carell et al.* verwendete, reduzierte und deprotonierte Flavinderivat **Fl** besitzt im angeregten Zustand ein Reduktionspotential von -2.8 V und ist damit in der Lage, sämtliche Nucleobasen zu reduzieren.^[66, 67] Der verwendete DNA-Baustein wird durch Zugabe von Natriumdithionit oder EDTA reduziert und ist dann in der Lage, Elektronentransfer photochemisch auszulösen. Das Flavin kann sowohl als artifizielle Nucleobase wie auch als Kopfgruppe von DNA-Haarnadeln eingesetzt werden.

Die Arbeitsgruppe *Rokita* setzt Naphthalendiamid **Nd** als artifizielle Nucleobase ein.^[68-70] Dessen angeregter Zustand besitzt ein Reduktionspotential von -2.6 V und ist nicht mehr zur Reduktion von Guanin fähig, ermöglicht aber theoretisch noch die Übertragung von Elektronen auf Adenin.

Als Haarnadel-Kopfgruppe können Stilbendiether **SbE** inkorporiert werden, wie von *Lewis et al.* gezeigt. Mit einem Redoxpotential von -2.3 V ist dieser nur noch zur Reduktion von Pyrimidinbasen fähig.^[71, 72]

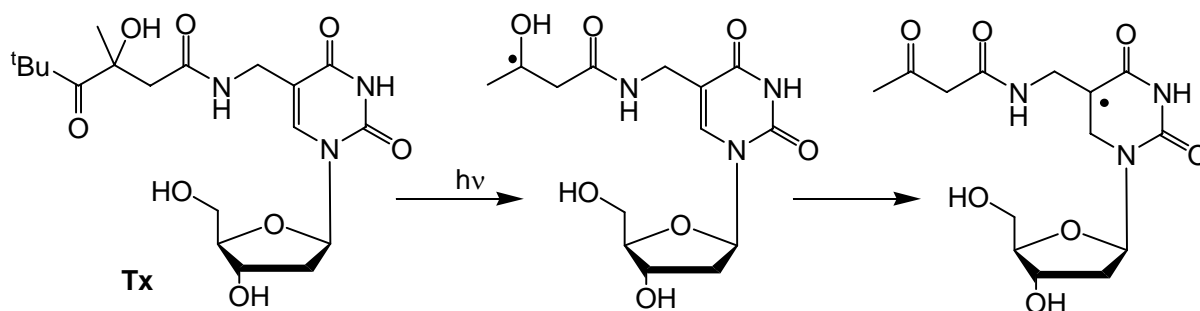


Abb.2-8: Injektion eines Elektrons in die DNA durch den Ladungsdonor **Tx**.

Das von *Giese et al.* verwendete Thyminderivat **Tx** besitzt ein Redoxpotential von -2.1 V.^[73, 74] Die photochemische Spaltung eines *tert.*-Butylketons nach *Norrish* führt zu einem Ketylradikal, welches das überschüssige Elektron auf Thymin überträgt. Dieses System ist, im Gegensatz zu Naphthalendiamiden und Flavinen, nur zur Injektion eines einzelnen Elektrons in der Lage. Eine Besonderheit dieses Donors ist die Tatsache, dass die Injektion des Elektrons in die DNA aus dem Grundzustand des Injektors erfolgt.

Netzel et al. setzen Pyren als Ladungsdonor ein und verbinden den 1-Pyrenylrest über einen Ethylspacer mit der 5-Position von 2'-Desoxyuridin. Das resultierende **PedU** wurde in die Stammregion von DNA-Haarnadeln inkorporiert.^[75] Man erkennt die Übertragung eines Überschusselektrons auf das Uracilsystem, gleichzeitig aber auch eine Ladungsinjektion in

benachbarte Pyrimidinbasen. Der Grund für dieses Phänomen liegt in der Flexibilität des Spacers, der eine räumliche Annäherung des Pyrens an die benachbarten Nukleobasen zulässt.

Die Modifikation eines Desoxyuridins mit einem Pyrenrest führt zu 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (**Py-dU**), welches in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* als Elektronendonator Verwendung findet.^[13-17, 76] Das Reduktionspotential des Pyrens von -1.8 V ist zur Reduktion von Thymin gerade ausreichend, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen dem angeregten Ladungsdonor und dem ladungstrennten Zustand ausbildet. Die Verschiebung dieses Gleichgewichts durch Elektronentransferprozesse lässt sich fluoreszenzspektroskopisch beobachten.^[77]

Das von *Wagenknecht* und *Fiebig* eingesetzte Ethidium **Et** stellt einen Sonderfall dar, da es auch im angeregten Zustand nicht in der Lage ist, ein Elektron auf eine Nukleobase zu übertragen.^[78] Ein Elektronentransfer kann nur dann von Ethidium ausgehen, wenn ein geeigneter artifizieller Elektronenakzeptor zugegen ist.

2.1.1.4 Chemische Detektion des Elektronentransfers

Der Nachweis des erfolgreichen Elektronentransfers durch DNA kann, außer durch ESR-Messungen^[57-60, 79], auch auf chemischem Wege geschehen. Dazu wird ein artifiziieller Baustein in die DNA-Sequenz inkorporiert, dessen Radikalanion eine Veränderung des DNA-Stranges auslöst. Wird das Oligonukleotid in zwei Fragmente gespalten, können die entstehenden Bruchstücke bzw. die Menge des verbleibenden intakten DNA-Stranges anschließend durch HPLC^[80], Gelelektrophorese^[68, 69] oder Kapillarelektrophorese^[81] analysiert werden.

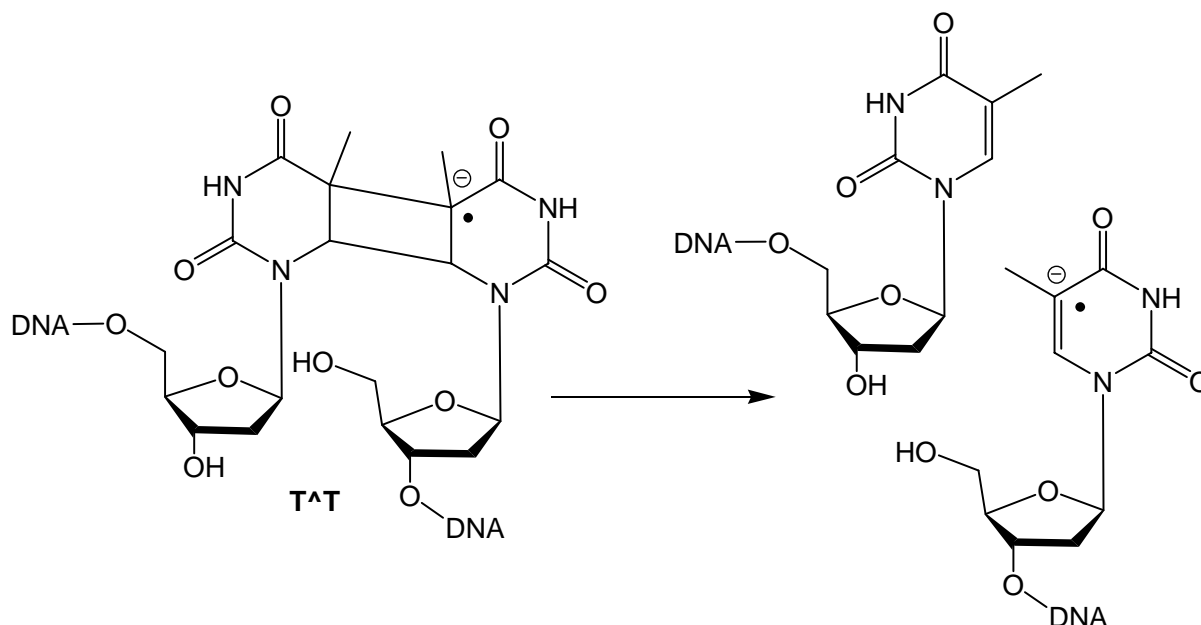


Abb.2-9: Die Cycloreversion des Thymindimers $T^A T$ generiert zwei kurze DNA-Bruchstücke. Das zur Spaltungsreaktion führende Elektron wird nicht verbraucht.

Die Arbeitsgruppe *Carell* verwendet als Ladungsdonor ein Flavinderivat, der Ladungstransfer erfolgt durch den DNA-Strang auf ein Thymindimer ($T^A T$).^[66, 67, 73] Der Ladungsakzeptor gleicht dem in der menschlichen Zelle als Photoschaden gebildeten Thymindimer, die Phosphatgruppe zur Verbindung beider Nucleoside fehlt jedoch. Die Cycloreversion des Vierrings nach Aufnahme eines Elektrons führt damit zur Entstehung zweier kurzer DNA-Bruchstücke. Im Vergleich zum Elektronentransfer ($k \approx 10^8\text{-}10^9 \text{ s}^{-1}$) verläuft die Spaltung des Thymindimers langsamer ($k \approx 10^6 \text{ s}^{-1}$).^[82, 83]

Giese und *Carell* konnten zeigen, dass die Spaltungsreaktion unter Katalyse eines Elektrons stattfindet.^[73] Das Überschusselektron verbleibt in einem der beiden entstehenden DNA-

Stränge und ist in der Lage, mehr als ein Thymindimer im gleichen DNA-Strang zu spalten. Als Elektronendonator wurde statt des Flavins ein Thyminderivat **Tx** eingesetzt.

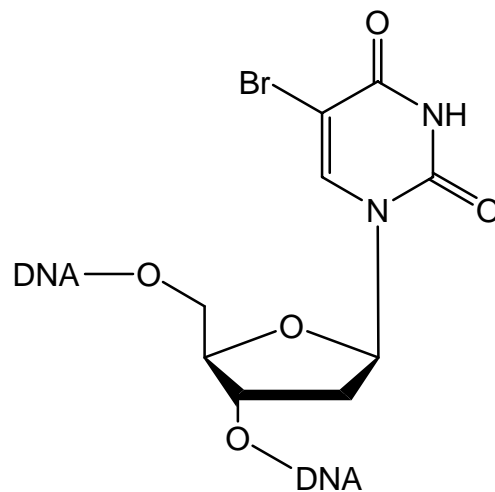


Abb.2-10: Strukturformel des Ladungsakzeptores Br-dU. Zum Verlauf der Nachweisreaktion siehe Kap. 3.2.4.

Von der Arbeitsgruppe *Rokita* ist erstmals ein 5-Brom-2'-desoxyuridin (Br-dU) als Ladungsfalle eingesetzt worden.^[68, 69] Nach Aufnahme eines Elektrons spaltet sich ein Bromidion ab. Das zurückbleibende neutrale Uridinradikal geht Folgereaktionen ein, deren Produkte bei Basenbehandlung einen Strangbruch erzeugen. Gleichzeitig wird mit dem Austritt des Bromidanions das überschüssige Elektron aus der DNA entfernt. Im Gegensatz zum Thymindimer kann keine weitere Spaltungsreaktion auftreten. Die Reaktionszeit von Br-dU ($k \approx 10^{10} \text{ s}^{-1}$) ist wesentlich schneller als der Ladungstransfer.^[84] Das Reduktionspotential von Br-dU ist vergleichbar mit dem Potential unmodifizierter Pyrimidinbasen. Br-dU stellt damit eine kinetische, keine thermodynamische Elektronen Falle dar.

Der Mechanismus der zum Strangbruch führenden Reaktion ist von *Sugiyama et al.* untersucht worden.^[85] Unter anaeroben Bedingungen abstrahiert das entstandene neutrale Uridinradikal in B-DNA ein Wasserstoffatom von der C2'-Position des in 5'-Richtung anschließenden Nukleotids. Es entsteht eine basenlabile Schädigung der DNA, das Endprodukt dieser Reaktionen ist ein Ribonolacton. Durch theoretische Berechnungen konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität des intermediären Uracilradikals durch die Basenpaarung im DNA- Duplex nicht verändert wird.^[86]

Weitere Ladungsakzeptoren sind von *Carell et al.* untersucht worden.^[81] Elektronentransfer von einem Flavinderivat durch DNA-Haarnadeln auf bromierte Purinbasen zeigte die

prinzipielle Eignung von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (Br-dG) und 8-Brom-2'-desoxyadenosin (Br-dA) als Elektronenakzeptoren.

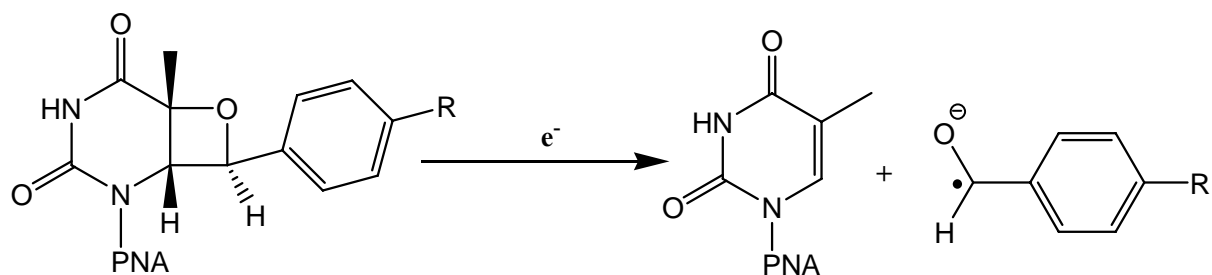


Abb.2-11: Spaltung von Thymin-Oxetan in DNA-PNA-Hybriden liefert ein spektroskopierbares Benzaldehyd-Radikalanion. R=H, CH₃, OCH₃.

Ein neuartiger Ladungsakzeptor, der die zeitaufgelöste Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers ermöglichen kann, wurde von *Diederichsen et al.* vorgestellt.^[87] Das Prinzip dieses Akzeptors orientiert sich ebenfalls an einem in der Natur auftretenden DNA-Schaden. Durch Cycloaddition eines Benzaldehyds an Thymin wird ein Analogon zum 6-4-Photoschaden der DNA erstellt. Die Cycloreversion nach Reduktion des Oxetans führt zur Freisetzung eines Benzaldehyd-Radikalanions, welches prinzipiell spektroskopisch nachweisbar ist. Entsprechende Ergebnisse sind aber bisher noch nicht veröffentlicht worden. Statt dessen wurde durch HPLC-Analyse die Menge des generierten unmodifizierten PNA-Stranges bestimmt. Die Cycloreversion des Oxetanrings verläuft schneller als die Spaltung des Cyclobutans im T⁺T-Dimer, mit Ratenkonstanten $k > 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Versuche zum Ladungstransfer mit diesem Akzeptorsystem sind bisher nur in DNA-PNA-Hybriden durchgeführt worden.

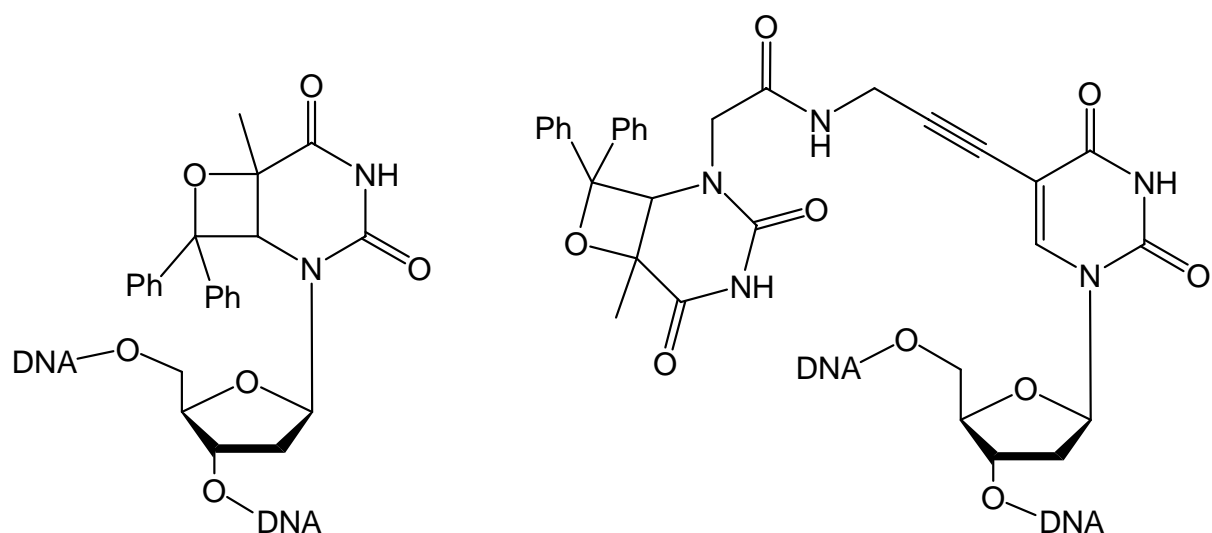


Abb.2-12: Thymin-Oxetane zum Nachweis des reduktiven Ladungstransfers in DNA-Haarnadeln.

Die Anwendung eines Thymin-Oxetans als Akzeptor zur Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers durch DNA wird von *Carell et al.* berichtet.^[88] Statt substituierter Benzaldehyde wird Benzophenon zur Synthese des Oxetans verwendet. Zum einen wurde das Oxetan aus der Nucleobase selbst gebildet, zum anderen wurde ein Thymin-Oxetan über einen Linker mit einem Thymin-Nucleosid verknüpft. Letzteres stellt den effektiveren Ladungsakzeptor dar. Vermutlich stört ein direkt am Nucleosid gebundenes Benzophenon die DNA-Struktur zu stark, als dass ein effizienter Elektronentransfer zum Akzeptor stattfinden kann. Die modifizierten Nucleobasen wurden in den Stamm von DNA-Haarnadeln inkorporiert, deren Schleifenregion aus dem Flavin-Ladungsdonor **FI** (s. 2.1.2.3) bestehen. Die Spaltung des Thymin-Oxetans führt nicht zur Fragmentierung des DNA-Stranges, das Reaktionsprodukt wird über HPLC detektiert. Der Einbau des Akzeptors in Oligonucleotide ist nach Standardverfahren möglich. Im Gegensatz dazu ist das von *Diederichsen et al.* verwendete Thymin-Oxetan^[87] säureempfindlich und damit labil gegen die Bedingungen der DNA-Synthese.

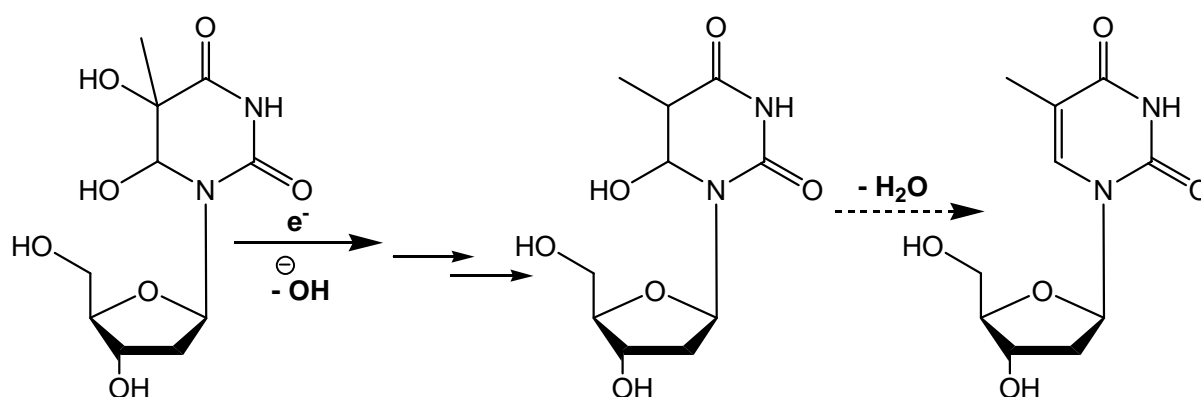


Abb.2-13: Reduktion von Thymin-Glykol führt zu einer Mischung aus 6-Hydroxy-5,6-dihydrothymidin und Thymidin.

Ein weiteres System zum Nachweis des Elektronentransfers durch DNA wurde von *Ito et al.* vorgestellt.^[89] Durch eine photoinduzierte Ein-Elektronen-Reduktion von Thymin-Glykol wird sowohl die natürliche Base Thymidin als auch ein 6-Hydroxy-5,6-dihydrothymidin erhalten. Beide Reaktionsprodukte sind chromatographisch nachweisbar. In den Versuchen, die mit den Elektronendonoren **FI** und Phenothiazin durchgeführt wurden, zeigte sich eine geringe Reaktionsrate für die Abspaltung eines Hydroxylanions (10^4 s^{-1}). Das Thyminglykol behindert kaum den weiteren Transport der Ladung über den Akzeptor hinaus und ist damit eine ineffiziente Elektronenfalle. Die erfolgte Umwandlung des Thyminglykols in seine Reaktionsprodukte wird durch HPLC-Analyse der modifizierten Oligonucleotide nachgewiesen.

2.1.2 Oxidativer Lochtransfer durch DNA

Aufgrund seiner biologischen Relevanz ist der oxidative Lochtransfer intensiv untersucht worden (beginnend mit *Fromherz et al.*, 1986)^[90], bevor man sich dem reduktiven Elektronentransfer zuwandte. Von besonderer Bedeutung sind oxidative Schäden in der DNA, die durch ionisierende Strahlung (Röntgen-, UV-, γ -Strahlung), Alkylierungsreagenzien oder Radikale hervorgerufen werden können. Wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen den Schaden nicht oder nur fehlerhaft beheben, können Mutationen des Erbguts entstehen. Mögliche Folgen sind Krebserkrankungen oder die Entstehung von vererbbaaren Gendefekten.^[2-4, 26]

Die Oxidationspotentiale der DNA-Nukleobasen betragen etwa 1.29 V für G, 1.42 V für A, 1.6 V für C und 1.7 V für T^[91]. Guanin ist somit am leichtesten zu oxidieren. Aus dem Oxidationsprodukt entstehen unter Sauerstoff- und Wassereinfluss eine Reihe von Folgeprodukten, die unter der Bezeichnung G^{ox} zusammengefasst werden.^[26, 92-96] Als Beispiel für ein Folgeprodukt sei 8-Oxoguanosin^[3] genannt, dessen Entstehung zu einer Mutation eines G-C zu einem T-A-Paar führen kann.^[97]

Betrachtungen des Mechanismus führten zu den zwei Modellen des *Superaustausch*- und des *Hopping*-Mechanismus. Der Superaustausch hat eine Reichweite von $< 10 \text{ \AA}$, ist damit auf eine Entfernung von ca. 3 Basenpaaren begrenzt. *Hopping* erfolgt über Guanosin-Radikalkationen G^{*+} als intermediäre Ladungsträger. Steht innerhalb von vier Basenpaaren kein Guanosin zur Verfügung, ist ein Tunnelprozess (Superaustausch) aufgrund der großen Entfernungen nicht möglich. In diesem Fall kann auch A^{*+} als Ladungsträger auftreten.^[28, 98, 99]

Einen Überblick über verwendete Ladungsdonoren und -akzeptoren, ermittelte β -Werte und Ratenkonstanten k_{CT} liefert Tabelle 1. Die vorliegende Arbeit widmet sich der Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers. Auf den oxidativen Lochtransfer durch DNA soll daher nicht näher eingegangen werden.

Ladungsdonor	Akzeptor	$\beta/\text{\AA}^{-1}$	k_{CT}/s^{-1}	Forschungsgruppe	Jahr
5'-Ru ²⁺	5'-Rh ³⁺	0.2	10 ⁹	Barton ^[52, 100]	1993
Nuk-Ru ²⁺	Nuk-Rh ³⁺	1.0-1.5	10 ⁶	Meade ^[101]	1995
SbA	G/Z	0.64	10 ⁸ -10 ¹²	Lewis/Wasielewski ^[42, 54, 71, 72, 102-115]	1997
5'-Et	5'-Rh ³⁺	-	10 ¹⁰	Barton ^[39, 100, 116-119]	1997
Acr	G	1.4	10 ⁵ -10 ¹⁰	Tanaka ^[120]	1998
5'-Et	Z	-	10 ¹²	Barton/Zewail ^[39, 61, 100, 116-118, 121-123]	1999
2-Ap	G	0.1-1.0	10 ⁹ -10 ¹¹	Barton/Zewail ^[38, 39, 100, 116-118, 124-126]	1999
2-Ap	G	0.75	10 ⁶ -10 ⁷	Shafirovich/Geacintov ^[127-133]	2000
Acr	G/Z	2.0/0.8	10 ⁷ -10 ¹²	Michel-Beyerle ^[41, 50, 134, 135]	2001
Py/Pz ⁺	G	0.2-0.3	10 ⁴	Majima/Kawai ^[99, 136-140]	2001
5'-Ru ²⁺	Trp/Ind	-	$\geq 10^7$	Barton ^[39, 100, 116-118, 141-143]	2002
SbA	SbE	0.4	10 ⁸	Lewis/Wasielewski ^[72, 144, 145]	2004
Nuk-Et	Z	0.4	10 ¹⁰ -10 ¹¹	Fiebig/Wagenknecht ^[146]	2005

Tabelle 2-1: Übersicht über wichtige Untersuchungen zum oxidativen Lochtransfer durch DNA. **5'-Ru²⁺**: Rutheniumkomplex, an 5'-Terminus der DNA gebunden; **5'-Rh³⁺**: Rhodiumkomplex, 5'-terminal; **Nuk-Ru²⁺**: Rutheniumkomplex, an Nukleosid gebunden; **Nuk-Rh³⁺**: Rhodiumkomplex, an Nukleosid gebunden; **SbA**: Stilbendicarboxamid; **G**: Guanin; **Z**: 7-Deazaguanin; **5'-Et**: Ethidium, 5'-terminal gebunden; **Acr**: Acridin; **2-Ap**: 2-Aminopurin; **Py**: Pyren; **Pz⁺**: Phenothiazin-Radikalkation; **Trp**: Tryptophan; **Ind**: 4-Methylindol; **SbE**: Stilbendiether, **Nuk-Et**: Ethidiumnukleosid.

2.2 Experimentelle Methoden

2.2.1 Optische Spektroskopie

2.2.1.1 Absorptionsspektroskopie

Absorbiert ein Molekül ein Lichtquant der richtigen Frequenz, so gelangt es in einen energetisch höher gelegenen, angeregten elektronischen Zustand. Absorptionsvorgänge sind extrem schnell und benötigen ca. 10^{-15} s. Die Molekülgeometrie kann sich in dieser kurzen Zeitspanne nicht ändern, nach dem *Franck-Condon*-Prinzip beschreibt man die Absorption als vertikalen Übergang.^[147, 148]

Der Absorptionsbereich von DNA erstreckt sich bis $\lambda < 300$ nm, das Absorptionsmaximum befindet sich bei $\lambda = 260$ nm. Um eine selektive Anregung eines kovalent an die DNA gebundenen Chromophors zu erreichen, muss sich dessen Absorptionsbereich weiter als $\lambda = 300$ nm erstrecken und die Anregung muss in diesem Wellenlängenbereich erfolgen.

2.2.1.2 Schmelzpunktanalyse

Die Temperatur, an der die Dissoziation des DNA-Duplex eintritt, ist charakteristisch für die jeweilige Sequenz. Anhand dieser, Schmelztemperatur oder Schmelzpunkt genannten Temperatur, kann eine Aussage über die relative Stabilität einer DNA-Doppelhelix getroffen werden. Ein Schmelzvorgang im physikalischen Sinne findet bei diesem Prozess nicht statt, die Bezeichnung hat sich aber durchgesetzt. Eine theoretische Abschätzung des Schmelzpunktes kann anhand folgender Formel vorgenommen werden:

$$T_m = 81.5 + 0.41 \cdot P_{GC} + 16.6 \log_{10} [Na^+] - 600 / N \quad (\text{Gleichung 2-4})$$

T_m	Schmelztemperatur in °C
P_{GC}	Prozentualer Anteil an G-C-Paaren
$[Na^+]$	Konzentration von Natrium-Kationen (in mol/L)
N	Länge des DNA-Stranges in bp

Diese Formel ist eine Schätzung und gilt nur für Sequenzen von 18-70 Basenpaaren Länge. Für kürzere Sequenzen schätzt man einen Beitrag zur Schmelztemperatur von 2 °C pro A-T-Paar und 4 °C pro G-C-Paar.

Die Schmelztemperatur von DNA-Duplexen wird standardmäßig bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von DNA, $\lambda = 260 \text{ nm}$, bestimmt. Der Nachweis der Dissoziation eines DNA-Duplex beruht auf dem hyperchromen Effekt. Die Absorption von parallel angeordneten, miteinander wechselwirkenden DNA-Basen ist geringer als die Summe der Absorptionen der einzelnen, isolierten Basen. Der Übergang vom regelmäßigen DNA-Duplex zum ungeordneten Einzelstrang führt zu einem Anstieg der Absorption.^[149]

Die Modifikation von Nukleobasen oder der Ersatz einer natürlichen Nukleobase durch einen Chromophor beeinflusst die hydrophoben und π - π -Wechselwirkungen sowie das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen. Die dadurch hervorgerufene Störung der DNA-Struktur bewirkt eine Änderung der Schmelztemperatur.

2.2.1.3 Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie

Die *pump-probe*-Spektroskopie ermöglicht selbst die Absorption von kurzlebigen Zuständen abzufragen. Durch die Zeitauflösung können Absorptions- und Relaxationsprozesse verfolgt werden. Zur Zeit liegt die Untergrenze der Zeitauflösung bei etwa 10 fs. Diese Methode ist aber wesentlich unempfindlicher als die *steady-state*-Fluoreszenzspektroskopie.

Durch einen kurzen Laserpuls der entsprechenden Wellenlänge wird der zu untersuchende Chromophor angeregt (*pump*). Die anschließende Abfrage (*probe*) erfolgt durch weitere Laserpulse, die in definierten Zeitabständen die Probe durchstrahlen. Durch den *pump*-Puls entstandene intermediäre Zustände können durch die Absorption des *probe*-Pulses detektiert werden. Prinzipiell kann, je nach Wellenlänge des *probe*-Pulses, die Besetzungswahrscheinlichkeit jedes beliebigen Zustandes abgefragt werden.

Durch die Abfrage der Absorption des Grundzustandes kann die Repopulationsrate dieses Zustandes bestimmt werden. Man erhält Aussagen über die Rate des Rückladungstransfers und der Lebenszeit des angeregten Zustands. Eine Abfrage der Fluoreszenzbande führt zu stimulierter Emission des angeregten Zustands. Die Depopulationsrate dieses Zustands lässt

sich ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Abfrage mit einem Weißlichtkontinuum durchgeführt. Dadurch können gleichzeitig sämtliche Wellenlängen detektiert werden.

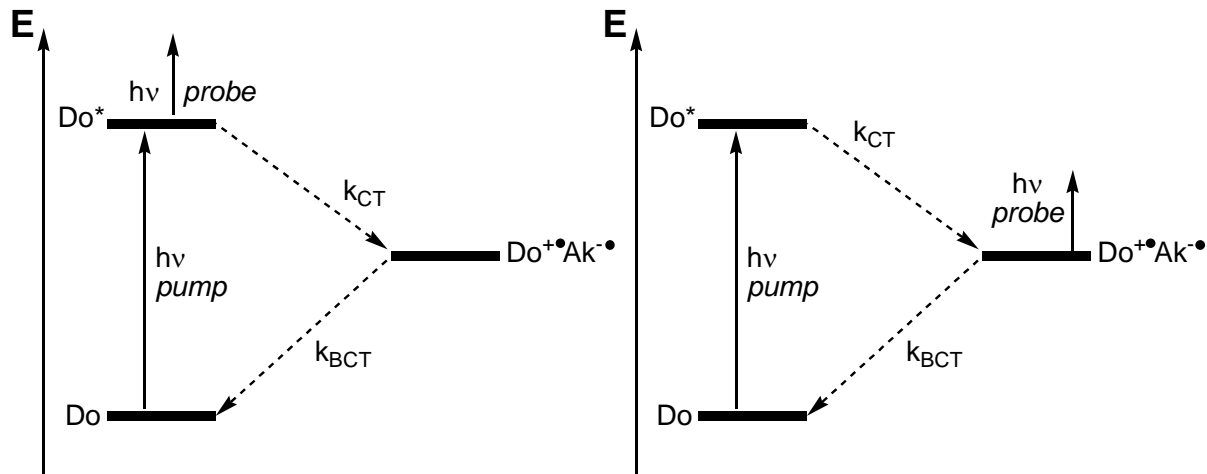


Abb.2-14: Anregung (*pump*) des Ladungsdonors **Do** und Abfrage (*probe*) beliebiger Zustände durch zeit-aufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie. CT=Ladungstransfer, BCT=Rückladungstransfer.

2.2.1.4 Fluoreszenzspektroskopie

Die durch Absorption aufgenommene Energie kann ein Molekül durch Aussenden von Licht wieder abgeben. Dieser Vorgang wird allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Man unterscheidet zwischen zwei Arten der Lumineszenz: Fluoreszenz erfolgt aus einem angeregten Zustand in den Grundzustand der gleichen Spinmultiplizität. Typischerweise erfolgt Fluoreszenz während einer Zeitspanne von 10^{-12} s. Deutlich mehr Zeit, zwischen 10^{-4} und 10^{-9} s, erfordert der Prozess der Phosphoreszenz (zum Vergleich: Absorption erfolgt während 10^{-15} s). Hierbei relaxiert ein angeregter Zustand über einen spin-verbotenen Übergang in einen Grundzustand anderer Multiplizität. Üblicherweise erfolgt Phosphoreszenz vom Triplett- in den Singulettzustand.

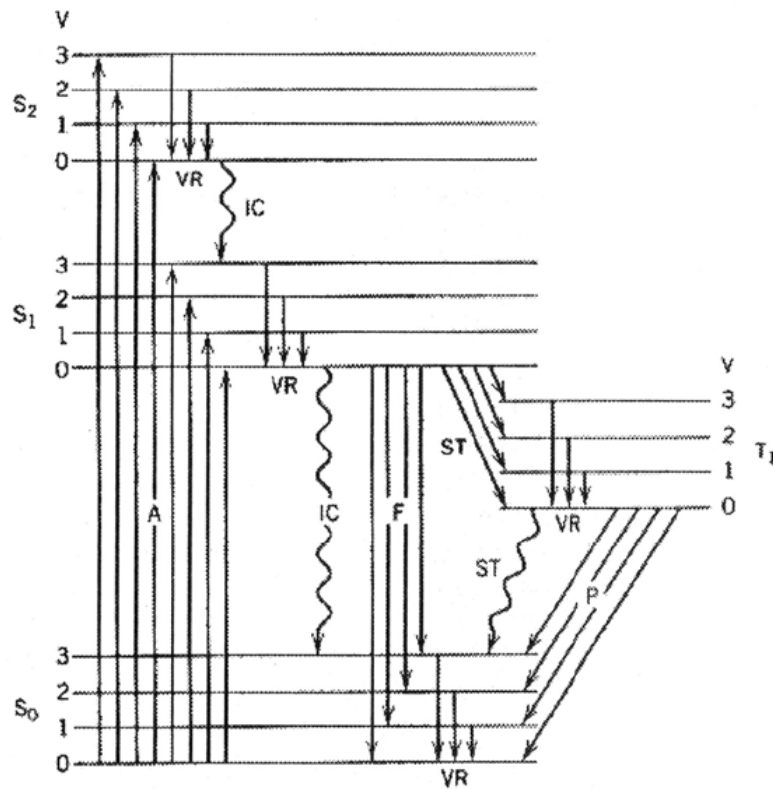


Abb.2-15: Überblick über Absorptions- und Relaxationsprozesse am Beispiel eines Jablonski- Diagramms (aus^[147]). **A:** Absorption; **VR:** vibronische (thermische) Relaxation; **IC:** Internal conversion; **F:** Fluoreszenz; **ST:** Inter-system-crossing, **P:** Phosphoreszenz.

Die Regel von *Kasha*^[150] besagt, dass die Emission von Licht stets aus dem niedrigsten Schwingungszustand des niedrigsten angeregten Zustands erfolgt. Die Emissionswellenlänge ist damit unabhängig von der Anregungswellenlänge. Die Anregung kann dagegen von jedem populierten Schwingungszustand ausgehen, das Absorptionsspektrum ist also temperaturabhängig. Die Lumineszenz gibt Energie in Form eines einzelnen Lichtquants ab, dessen Frequenz $\nu = E/h$ beträgt. Daraus folgt die Regel von *Stokes*^[151]: die Energie des emittierten Photons ist geringer als die Energie des anregenden Photons. Das Fluoreszenzspektrum erscheint gegen das Anregungsspektrum zu längeren Wellenlängen verschoben.

Die strahlende Relaxation durch Lumineszenz ist langsamer (zwischen 10^{-12} und mehreren Sekunden) als strahlungslose Prozesse, die 10^{-14} bis 10^{-12} s benötigen. Zu den nicht-strahlenden Übergängen zählt die thermische Relaxation durch Vibration, die *internal conversion* unter Erhalt der Spinmultiplizität und das *inter-system-crossing* zwischen Singulett- und Triplettzuständen.

Neben den bereits genannten Möglichkeiten, die Anregungsenergie abzugeben, stehen zwei weitere wichtige strahlungslose Prozesse zur Verfügung: Energie- und Elektronentransfer. Dabei wird die Anregungsenergie beziehungsweise ein Elektron auf ein weiteres Molekül oder einen Molekülteil übertragen. Beide Prozesse können inter- und intramolekular ablaufen.

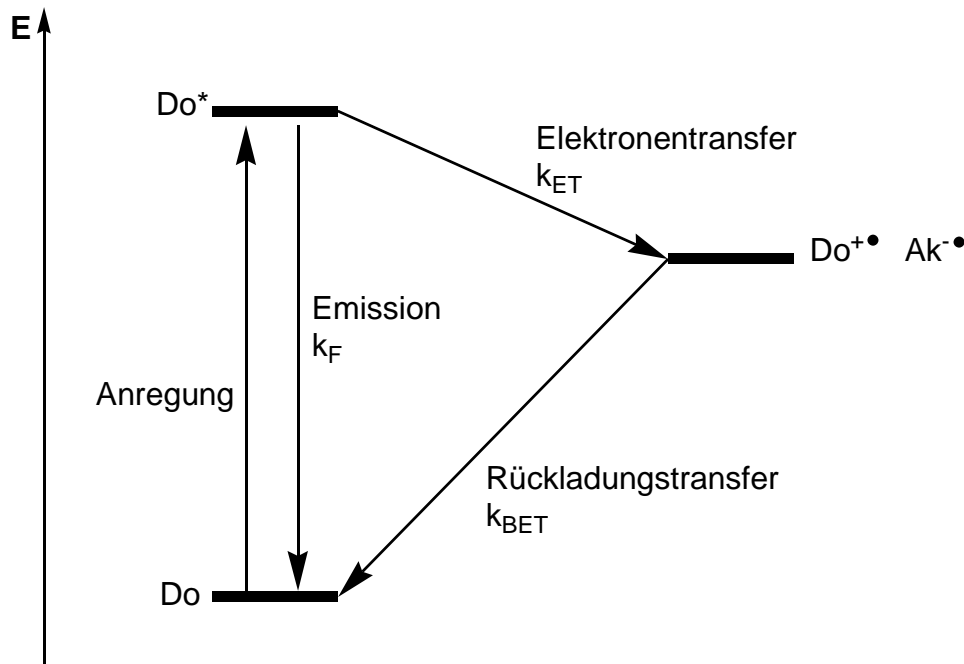


Abb.2-16: Elektronentransfer öffnet einen Weg zur strahlungslosen Abgabe der Anregungsenergie.

Der Anteil der Fluoreszenzintensität an allen strahlenden und strahlungslosen Relaxationsprozessen wird definiert als Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F . Die experimentelle Bestimmung erfolgt durch Messung der eingestrahnten zur emittierten Lichtmenge, üblicherweise durch Integration des Fluoreszenzspektrums in Relation zu einer Referenzsubstanz. Die Berechnung^[152] der Quantenausbeute erfolgt nach der Formel:

$$\Phi_F(P) = \Phi_F(R) \cdot \frac{A(R) \cdot n_D^2(P) \cdot F(P)}{A(P) \cdot n_D^2(R) \cdot F(R)} \quad (\text{Gleichung 2-5})$$

es bedeuten: Φ_F Fluoreszenzquantenausbeute
 A Absorption
 n_D Brechungsindex des Lösungsmittels
 F integrierte Fluoreszenzintensität
 P Probensubstanz
 R Referenzsubstanz

Wie in Abb. 2-16 dargestellt führt ein Ladungstransfer aus dem angeregten Zustand Do^* zu einem ladungstrennten Zustand $Do^{\bullet+} Ak^{\bullet-}$. Ladungstransfer verringert die Populationsrate des zur Fluoreszenz fähigen Zustands Do^* und führt zu einem Absinken der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F .

Die Fluoreszenzlebensdauer τ gibt die mittlere Lebensdauer des angeregten Zustandes an und ist definiert als der Kehrwert der Ratenkonstante k_F des strahlenden Zerfalls. Ladungstransferreaktionen verändern die Fluoreszenzlebensdauer. Eine Quantifizierung ist über zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen möglich.

Detailliertere Informationen über die elektronischen Zustände eines Moleküls liefert ein Anregungsspektrum. Man misst die Fluoreszenzintensität bei einer festgelegten Emissionswellenlänge in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge. Das resultierende Anregungsspektrum ist nicht notwendigerweise deckungsgleich mit dem Absorptionsspektrum. Das Anregungsspektrum dient zur Unterdrückung der Absorption in nicht-fluoreszierende Zustände bzw. zur Eliminierung der Absorption von weiteren Chromophoren, die nicht oder bei anderer Wellenlänge emittieren.

Die Intensität der Fluoreszenz steigt nicht linear zur Konzentration des Chromophors. Nur in verdünnten Lösungen ($< 10^4$ mol/L) gilt eine lineare Relation von Fluoreszenzintensität und Konzentration. Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren in konzentrierter Lösung führen zu Aggregationseffekten. Tritt ein Molekül im angeregten Zustand mit einem anderen Molekül im Grundzustand in Wechselwirkung, so entsteht ein Exciplex. Dieser besteht aus Donor- und Akzeptormolekül, welche sich die Anregungsenergie und Ladung teilen. Die elektronischen und damit auch spektroskopischen Eigenschaften dieser Intermediate weichen stark von den Eigenschaften der isolierten Bestandteile ab. Ein Exciplex kann als Zwischenschritt des Elektronentransfers von einem Donor zum Akzeptor betrachtet werden. Im Py-dU-System entsteht ein Exciplex aus dem angeregten Pyrenrest und der kovalent gebundenen Nukleobase Uridin.^[16] Dieser Exciplex absorbiert bei deutlich größeren Wellenlängen als Py-dU. Er ist zur Fluoreszenzemission fähig, zeigt aber gleichzeitig Merkmale des ladungstrennten Zustands.

Handelt es sich bei beiden miteinander wechselwirkenden Molekülen um die gleiche Art von Chromophor, so erhält man ein Excimer (von **excited state dimer**, Dimer im angeregten

Zustand). Ein Excimer kann als einfacher charge-transfer-Komplex angesehen werden, die großen attraktiven Orbital- und Coulombwechselwirkungen stabilisieren diesen Komplex. Befinden sich beide zur Excimerbildung benötigten Moleküle sehr nahe beieinander, so ist nur eine geringe Bewegung und Rotation zur Einnahme der bevorzugten Konformation notwendig. In diesem Fall geschieht die Bildung des Excimers äußerst schnell, aus diesem Grund spricht man von „excimer-artigen“ Komplexen bzw. von „vorgeformten Excimeren“.

2.2.1.5 CD- Spektroskopie

Unter Zirkulardichroismus (CD) versteht man das Vorhandensein von unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten ε für rechts und links zirkular polarisiertes Licht. Zur Bestimmung des CD-Effektes wird eine Probe abwechselnd von rechts und links zirkular polarisiertem, monochromatischem Licht durchstrahlt. Angegeben wird die Differenz der Absorptionen $\Delta A = A_L - A_R$, bzw. die Differenz der Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$, bei einer bestimmten Wellenlänge. Auch die Auftragung der molaren Elliptizität Θ_λ ist als Angabe üblich ($\Delta A = \Theta/3298$).^[153]

Zur Erstellung eines CD-Spektrums wird ein ORD-Spektrum (optische Rotationsdispersion) aufgenommen und durch die *Kronig-Kramers*-Transformation in das CD-Spektrum umgewandelt. Die dispersiven ORD-Signale werden in schmalere, weniger überlagernde und daher leichter interpretierbare absorptive CD-Banden transformiert. Signale im CD-Spektrum verhalten sich additiv. Ist die Differenz $\varepsilon_L - \varepsilon_R > 0$, so definiert man das entstehende Signal als positiven *Cotton*-Effekt und trägt die Bande im Spektrum nach oben auf. Ist andererseits $\varepsilon_R > \varepsilon_L$ ergibt sich ein negativer *Cotton*-Effekt, im Spektrum erscheint ein Minimum.

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können die DNA-Konformationen A-, B- und Z-DNA aufgrund ihrer Spektrenform einfach nachgewiesen werden. Die B-DNA zeigt zu kürzeren Wellenlängen einen Übergang vom positiven zum negativen *Cotton*-Effekt mit einem Nulldurchgang bei 260 nm und einem Minimum bei ca. 240 nm. Im CD-Spektrum von A-DNA ist der Nulldurchgang zu kürzeren Wellenlängen (ca. 250 nm) verschoben und das Minimum tritt bei ca. 210 nm auf. Untersucht man Z-DNA, erhält man einen Übergang vom negativen zum positiven *Cotton*-Effekt bei ca. 280 nm und ein Maximum bei 260 nm.^[149, 154]

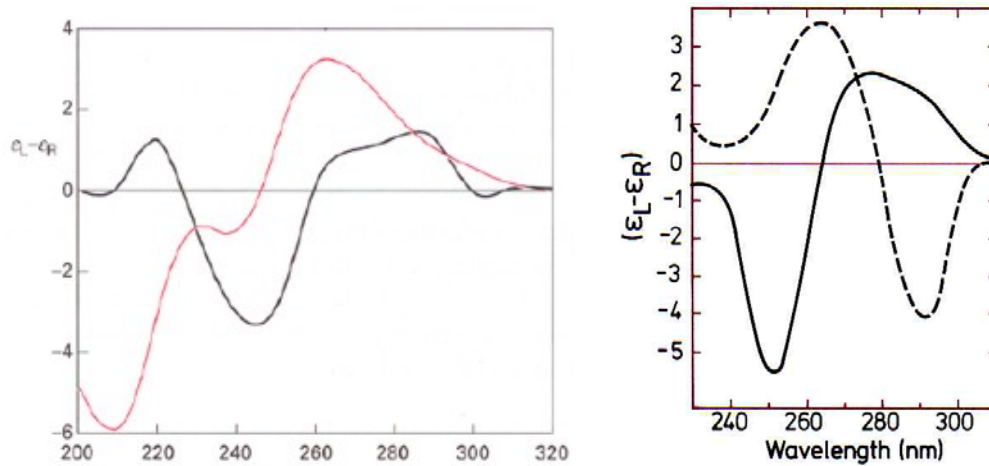


Abb.2-17: Beispiele für CD-Spektren von DNA-Helices in der A-, B- und Z-Konformation. Links: Übergang von der B-DNA (schwarz) zur A-DNA. Rechts: B-DNA (—) und Z-DNA (---).^[149]

Modifikationen der DNA mit Chromophoren lassen sich ebenfalls im CD-Spektrum nachweisen. Durch Wechselwirkung eines achiralen Chromophors mit der chiralen Umgebung der DNA entsteht ein CD-Signal bei der Absorptionswellenlänge des Chromophors. Die Intensität dieser CD-Bande ist auch von der Orientierung des Chromophors abhängig. Eine Absorption des Chromophors ist zur Entstehung eines CD-Signals bei einer bestimmten Wellenlänge notwendig, aber nicht hinreichend.

2.2.2 Cyclovoltammetrie und Radikalspektroskopie

Durch die Cyclovoltammetrie lassen sich die Redoxpotentiale einer Verbindung bestimmen. Die Messung erfolgt mit einer Drei-Elektroden-Anordnung aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode in nicht gerührter Lösung. Die Vorgänge an der Arbeitselektrode werden mit Hilfe der *Nernst*-Gleichung und den *Fickschen* Gesetzen der Diffusion beschrieben. Cyclovoltammetrische Messungen liefern anodische und kathodische Peakpotentiale E_{Pa} und E_{Pk} . Das Standardpotential eines elektrochemischen Übergangs ist der Mittelwert beider Peakpotentiale und wird auch als Halbstufenpotential $E_{1/2}$ bezeichnet.^[155]

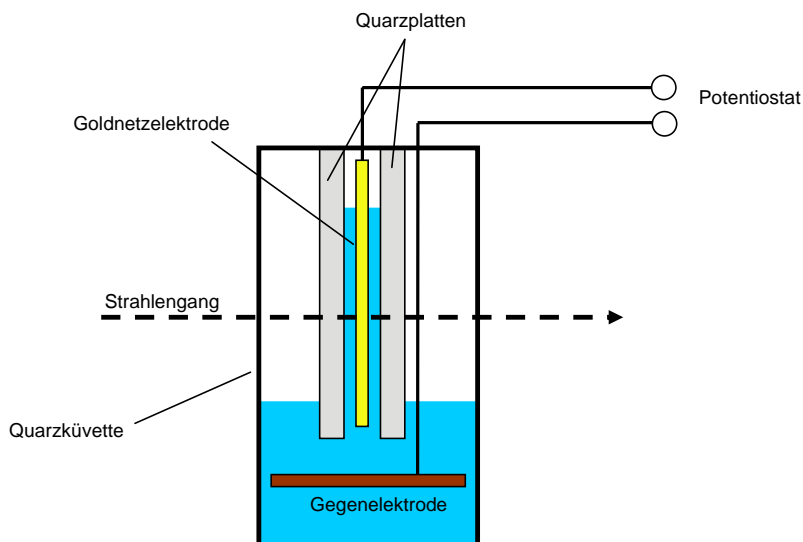


Abb.2-18: Skizze einer Messzelle für die Spektroelektrochemie.^[156]

Das Absorptionsspektrum eines Radikations zu vermessen ist aufgrund der Reaktivität des Radikals nur möglich, wenn es gelingt das Radikalion im Spektrometer zu isolieren. Wird an einer speziellen Messzelle ein elektrisches Potential angelegt, so kann ein Radikalion ausreichend lang stabilisiert werden, um ein Absorptionsspektrum aufzunehmen. Der Zeitaufwand für spektroelektrochemische Messungen ist größer als für die Cyclovoltammetrie. Sehr reaktive, instabile Radikale können in der Spektroelektrochemie nicht charakterisiert werden, auch wenn eine cyclovoltammetrische Untersuchung möglich ist.

2.2.3 Berechnung des Redoxpotentials angeregter Verbindungen

Die direkte Messung des Redoxpotentials einer photochemisch angeregten Verbindung ist mit den hier vorgestellten Methoden nicht möglich. Eine Abschätzung der elektrochemischen Triebkraft einer Ladungstransferreaktion ist über die *Rehm-Weller-Gleichung*^[157, 158] möglich. Man nähert die freie Enthalpie aus dem Redoxpotential der Neutralverbindung und dem Betrag der Anregungsenergie:

$$\Delta G = e[E_{Ox}(D) - E_{Red}(A)] - E_{00} + C \quad (\text{Gleichung 2-6})$$

ΔG	freie Enthalpie
e	Elementarladung
$E_{Ox}(D)$	Oxidationspotential des Ladungsdonors
$E_{Red}(A)$	Reduktionspotential des Akzeptors
E_{00}	Singulett-Singulett-Energie (HOMO-LUMO-Übergang) des Donors
C	Änderung der Coulomb-Energie

Die *Rehm-Weller*-Gleichung verwendet die Redoxpotentiale der Grundzustände der beteiligten Ladungsträger. Diese sind auf einfache Weise mit elektrochemischen Methoden zu bestimmen. Die Singulett-Singulett-Energie ist aus Absorptions- und Fluoreszenzspektren zu entnehmen. Die Änderung der Coulomb-Energie ist meist von vernachlässigbarer Größe und wird daher $C=0$ gesetzt.

2.3 *Synthesemethoden*

2.3.1 DNA- Synthese

Durch Übertragung des von *Merrifield* entwickelten Prinzips der Peptid-Festphasensynthese auf die Herstellung von Oligonukleotiden durch *Letsinger*^[159-162] steht heute eine Methode zur Verfügung, mit der Oligonukleotide schneller, effizienter und zuverlässiger synthetisiert werden können als mit den früher in Lösung durchgeführten Verfahren.

In der DNA-Festphasensynthese fungiert ein *Controlled Pore Glass* (CPG) als Trägermaterial. Ein Spacer liefert den notwendigen Abstand zur Oberfläche und stellt die primären Aminogruppen bereit, an die über einen Linker - üblicherweise Succinat - das erste Nukleosid über seine 3'-OH-Gruppe verankert ist. Mit dieser Starteinheit belegtes CPG ist kommerziell erhältlich. Die 5'-OH-Gruppe des Nukleosids ist mit der 4,4'-Dimethoxytrityl-(DMT) Gruppe geschützt, außerdem sind die Aminofunktionen der Nukleobasen A, C und G mit Schutzgruppen versehen. Das gebrauchsfertige CPG wird in Kunststoffssäulen verpackt und kann in dieser Form sofort in den Syntheseautomaten eingesetzt werden.

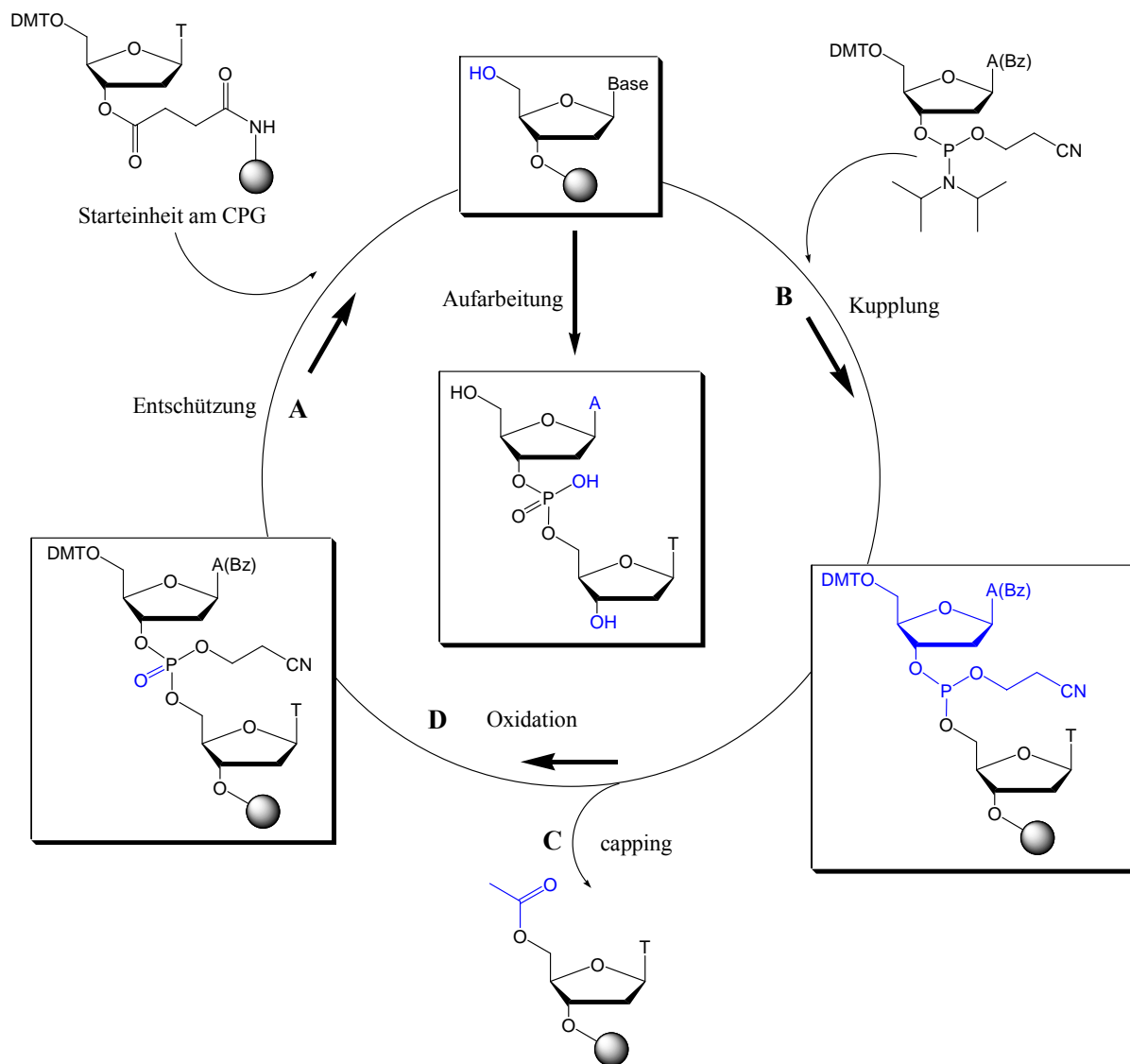


Abb.2-19: Schema der automatisierten DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode am Beispiel der Sequenz 3'-TA-5'. Verwendete Reagenzien: (A) 2% Dichloressigsäure in DCM; (B) 0,45 M Tetrazol in Acetonitril; (C) Acetanhydrid, N-Methylimidazol, Lutidin in THF; (D) Iod, Lutidin in Wasser.

Die orange Färbung des abgespaltenen 4,4'-Dimethoxytritylkations dient zur Überprüfung der Kupplungseffizienz. Während der Abspaltung der DMT-Gruppe misst eine im DNA-Synthesizer eingebaute Photozelle die Absorption ($\lambda = 470 \text{ nm}$) der Lösung nach Verlassen des CPG. Trägt man die über die Zeit integrierte Absorption für jeden Kupplungsschritt nacheinander auf, so erhält man den Tritylmonitor, anhand dessen man die Effizienz jedes einzelnen Kupplungsschrittes überprüfen kann.

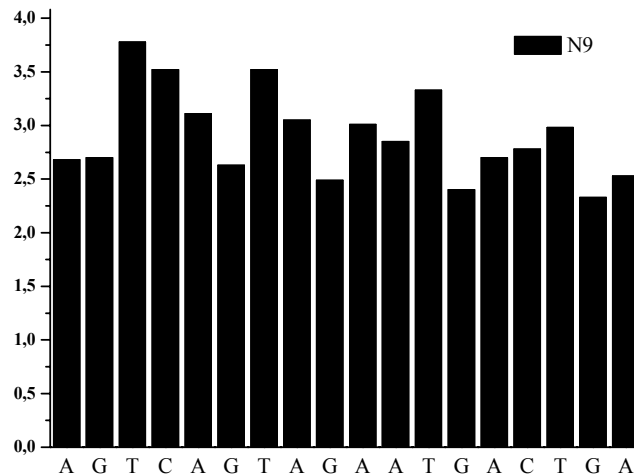


Abb.2-20: Beispiel eines Tritylmonitors. Die Synthese verläuft von links (3'-Terminus) nach rechts. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten der Nucleoside und der nichtlinearen Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration dienen die angezeigten Werte nur als Richtlinie.

Ist die Synthese mit der Detritylierung am 5'-terminalen Nucleosid abgeschlossen, werden die Oligonucleotidstränge vom CPG abgespalten. Im Standardverfahren geschieht dies mit wässriger konzentrierter Ammoniaklösung bei 60 °C innerhalb von 10 h. Gleichzeitig mit der Spaltung des Bernsteinsäureesters am 3'-Terminus entfernt man die acylischen Schutzgruppen an den exocyclischen Aminofunktionen der Nucleobasen. Durch β -Eliminierung werden die Cyanoethoxy-Schutzgruppen von den Phosphatgruppen abgespalten. Die Aufreinigung der Oligonucleotide erfolgt üblicherweise durch *reversed-phase* HPLC, alternativ kann auch gelelektrophoretisch gereinigt werden.

2.3.2 DNA-Synthese mit artifiziellen Bausteinen

Die Integration von redoxaktiven Sonden in die DNA-Basensequenz wird in dieser Arbeit nach zwei unterschiedlichen Methoden ausgeführt. Die erste Synthesestrategie geht von einem Nucleosidderivat aus, welches mit einem Chromophor versehen und als modifizierter Baustein in die DNA-Synthese eingeführt wird. Als Ausgangsmaterial wird kommerziell erhältlich 5-Iod-2'-desoxyuridin eingesetzt, welches eine reaktive Stelle zur Modifikation mit einem Chromophor bietet. Das modifizierte Nucleosid wird nach Standardverfahren zum DNA-Baustein umgesetzt und in die automatisierte Phosphoramiditsynthese eingebracht. Diese Strategie wurde auch zur Synthese von 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin **Py-dU** angewendet.^[13-17]

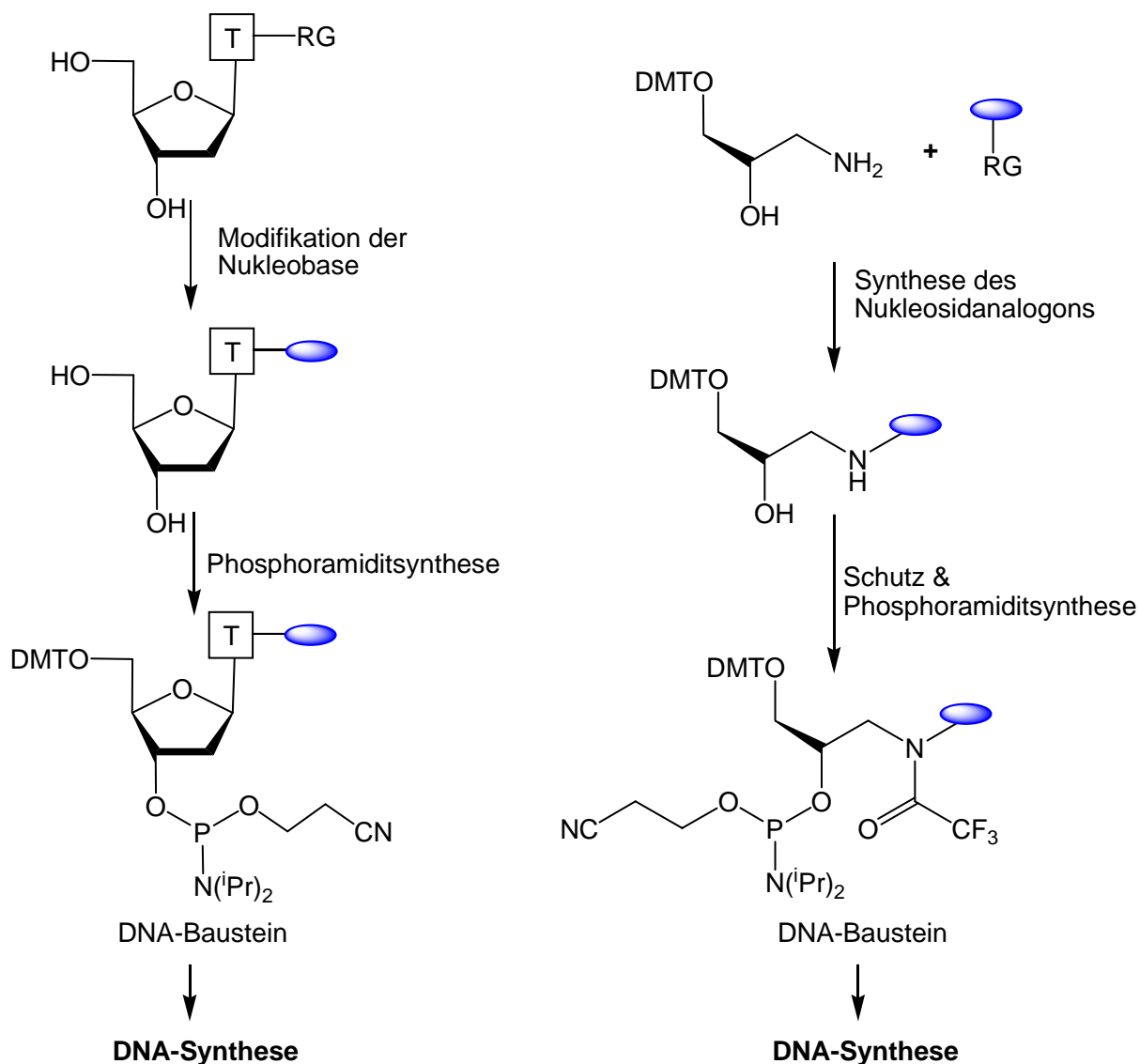


Abb.2-21: In dieser Arbeit angewendete Synthesestrategien zur Modifikation von DNA mit redoxaktiven Gruppen. RG= reaktive Gruppe.

Die Inkorporation einer redoxaktiven Sonde an Stelle einer Nucleobase kann über die Verknüpfung des Chromophors mit einer Desoxyriboseeinheit erfolgen. In dieser Arbeit wird die Desoxyribose durch ein Aminopropan-(S)-2,3-diol als Riboseanalogon ersetzt.^[18, 19, 163] Dieser Linker trägt bereits die zur DNA-Synthese notwendige DMT-Schutzgruppe. Das Nucleosidanalogon wird mit den notwendigen Schutzgruppen versehen, zum Phosphoramidit umgesetzt und in die DNA-Synthese eingeführt. Die Eignung des Aminopropandiols als Ribosesurrogat ist mit der erfolgreichen Synthese eines Ethidiumnucleosids erstmals demonstriert worden.^[18, 19, 164]

Im Labor hergestellte artifizielle DNA-Bausteine benötigen meist abweichende Kupplungsbedingungen, z. B. aufgrund des großen sterischen Anspruchs einer modifizierten

Nukleobase, durch die veränderte Struktur des acyclischen Nucleosidanalogs oder wegen zu geringer Löslichkeit im Standardreagenz Acetonitril. Die für die hier eingesetzten modifizierten DNA-Bausteine speziellen Bedingungen zur Synthese und Aufarbeitung werden bei der Synthese der entsprechenden DNA-Oligonucleotide diskutiert. Die Aufreinigung der modifizierten Oligonucleotide erfolgt ebenfalls über semipräparative *reversed-phase* HPLC.

2.3.3 Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen an Nucleosiden

Zur Knüpfung der C-C-Bindung zwischen der Nucleobase und dem Elektronendonator stehen mehrere Palladium-katalysierte Kreuzkupplungsmethoden zur Verfügung.^[165] An Nucleosiden sind hauptsächlich die Heck-^[166], Stille-^[167, 168], Sonogashira-^[169] und Suzuki-Miyaura-Kupplung^[170, 171] angewendet worden.

Das allgemeine Prinzip der Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen folgt einem dreistufigen Syntheszyklus aus oxidativer Addition (A), Transmetallierung (B) und reduktiver Eliminierung (C).

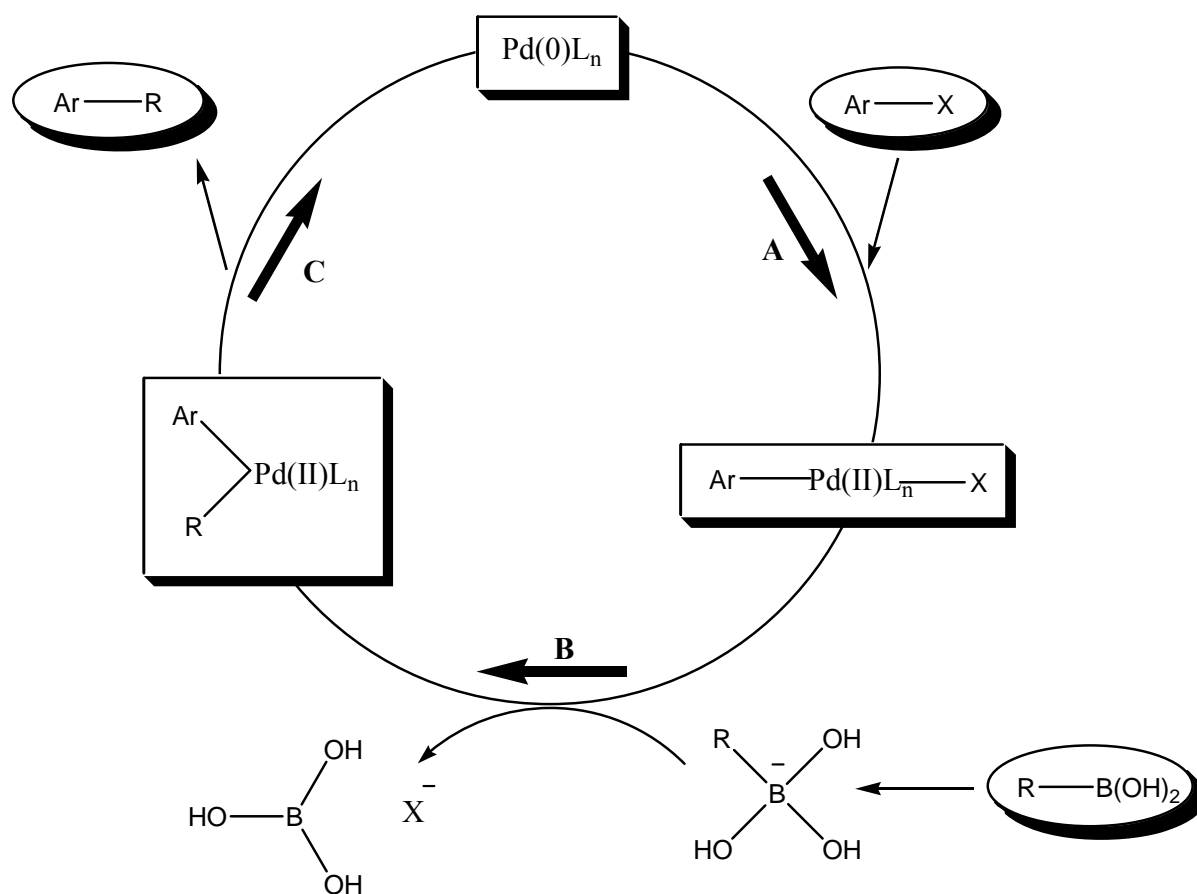


Abb.2-22: Schema des Katalysezyklus der Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen am Beispiel der Suzuki-Kupplung. L= Ligand, X= Halogen oder Pseudohalogen, Ar= Aromatischer Rest.

In dieser Arbeit sollen die Suzuki-Miyaura-,^[172] Masuda-^[173] und Buchwald-Kupplung^[174, 175] angewendet werden. Zur Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen geht die Suzuki-Kupplung von Boronsäuren aus und ist damit eine Alternative zur Stille-Kupplung.^[176-179] Das Produkt der Masuda-Kupplung sind Boronsäuren, die wiederum in einer Suzuki-Kupplung eingesetzt werden sollen. Die Buchwald-Kupplung^[174, 175] bietet einen Zugang zu Diarylaminen und Diarylethern, ist aber bezüglich der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungsbildung bisher noch nicht umfassend untersucht und nur an wenigen Beispielen angewendet worden.^[180]

Die Palladium-katalysierte Synthese von 5-substituierten Uridinen wurde bisher hauptsächlich über die Stille-Kupplung durchgeführt.^[165] Die dazu eingesetzten Organostannane sind aber den in der Suzuki-Kupplung verwendeten Boronsäuren im Hinblick auf Stabilität gegen Luft, Wasser und Hitze unterlegen. Zur Synthese modifizierter Purin- und einiger Pyrimidinbasen ist die Suzuki-Kupplung bereits verwendet worden.^[165] Über eine Anwendung der Masuda- und Buchwald-Kupplungen zur Bildung von C-B- und C-O-Bindungen an Nucleosiden wurde noch nicht berichtet.

2.3.4 Synthese von 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin Py-dU

Der nukleosidische Ladungsdonor Py-dU wurde von *Netzel et al.*^[181] entwickelt und in unserer Arbeitsgruppe zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch DNA eingesetzt.^[13-17] Die Synthese dieses modifizierten Nukleosids dient als Leitfaden zur Synthese anderer auf Nucleosiden basierender Donorsysteme und soll deswegen hier kurz vorgestellt werden.

Pyren wird selektiv an 1-Position durch Kupfer(II)bromid in Chlorbenzol bromiert.^[182] Das resultierende 1-Brompyren wird durch Halogen-Lithium-Austausch aktiviert und mit einem Borsäureester zur Reaktion gebracht. Hydrolyse unter sauren Bedingungen liefert 1-Pyrenylboronsäure.^[183, 184]

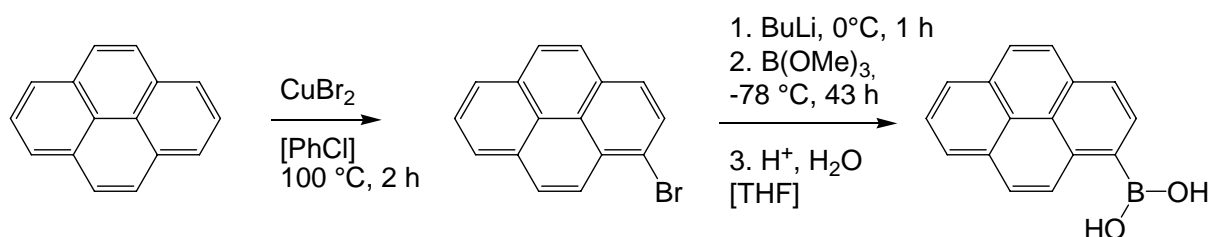


Abb.2-23: Synthese von 1-Pyrenylboronsäure.

Der Schlüsselschritt der Synthese ist eine Suzuki-Miyaura-Kupplung zwischen der Pyrenboronsäure und kommerziell erhältlichem 5-Iod-2'-desoxyuridin.^[13, 14] Die Kupplung erfolgt in wässrigem Tetrahydrofuran unter Zusatz von Methanol und Natriumhydroxid. Als Katalysator wird Tetrakis(triphenylphosphino)-palladium(0) zugesetzt.

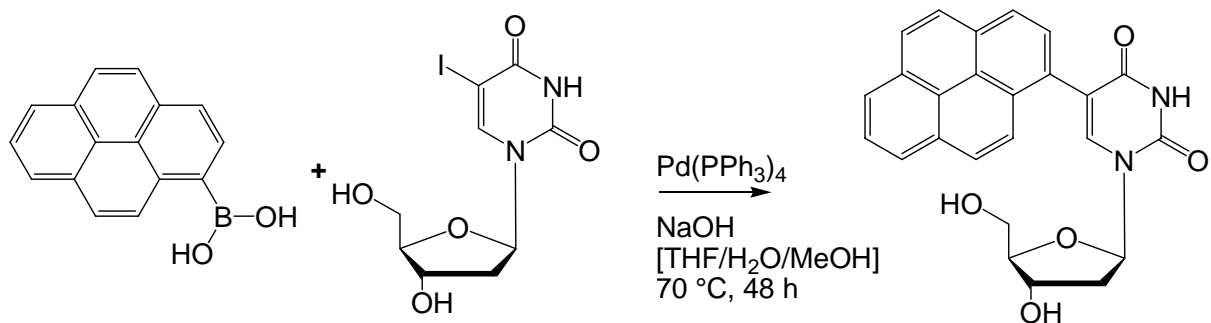


Abb.2-24: Synthese von Py-dU.

3 Synthese eines nukleosidischen Elektronendonors

Zur Injektion eines Elektrons in den DNA-Basenstapel ist ein Donorsystem notwendig, welches selektiv angeregt werden kann und unter reproduzierbaren Bedingungen die Injektion des Elektrons ausführen kann. Die notwendige Selektivität lässt sich erreichen, indem man den Elektronentransfer photochemisch auslöst. Ist das Absorptionsspektrum des Donors von dem der Nukleobasen ausreichend verschieden, kann der Chromophor angeregt werden ohne dabei die Nukleobasen zu beeinflussen. Die Verknüpfung eines Elektronendonorsystems mit einer Nukleobase bietet den Vorteil, dass der Donor an einer definierten Stelle der Basensequenz lokalisiert ist. Die Stelle, an der die Ladung in den DNA-Duplex eintritt, ist damit eindeutig festgelegt. Nach Möglichkeit sollte die Fähigkeit der Base zum Ausbilden eines Watson-Crick-Basenpaares erhalten bleiben. Die Injektion eines Elektrons kann über die elektronische Kopplung des Chromophors mit dem π -Elektronensystem der Nukleobase erfolgen. Als Base bietet sich in diesem Fall das Uracil an, dessen Reduktionspotential von ca. -1.8 V das niedrigste der natürlichen Basen ist.^[45] Damit ist hier am ehesten eine Übertragung eines Elektrons vom Elektronendonator auf die Nukleobase und damit die Injektion in den DNA-Basenstapel zu erwarten. Zudem benötigt Uracil in der DNA-Synthese keine Schutzgruppe und ist in der Form des 5-Iod-2'-desoxyuridin kommerziell erhältlich.

3.1 Arbeiten zur Synthese von 5-(8-(N,N-Dimethyl)aminopyren-1-yl)-2'-desoxyuridin

Die bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* zum Ladungstransfer durch DNA verwendeten als nukleosidische Ladungsdonoren mit dem Pyrenchromophor modifizierte Nukleoside.^[13-17] Abhängig von der verwendeten Base ist das Pyren in der Lage, entweder eine positive oder eine negative Ladung in den DNA-Basenstapel zu injizieren.^[13, 185] Als Elektronendonorsystem wurde mit Pyren modifiziertes 2'-Desoxyuridin (Pyren-dU, Py-dU) eingesetzt. Das Reduktionspotential des angeregten Pyrens lässt sich über die Rehm-Weller-Gleichung aus dem Reduktionspotential und der Singulett-Singulett-Energie zu ca. -1.8 V abschätzen. Damit sollte Pyren in der Lage sein, ein Elektron auf Uridin zu übertragen. Die Experimente mit Py-dU zeigten, dass das zwischen -1.2 und -1.8 V angegebene Oxidationspotential des Uridins^[45-49] nahe bei dem Redoxpotential des angeregten Pyrens von

- 1.8 V liegen muss, da sich ein Gleichgewicht zwischen dem angeregten Zustand des (Py-dU)* und dem ladungstrennten Zustand $\text{Py}^{+\bullet}\text{-dU}^{-\bullet}$ einstellt.^[14]

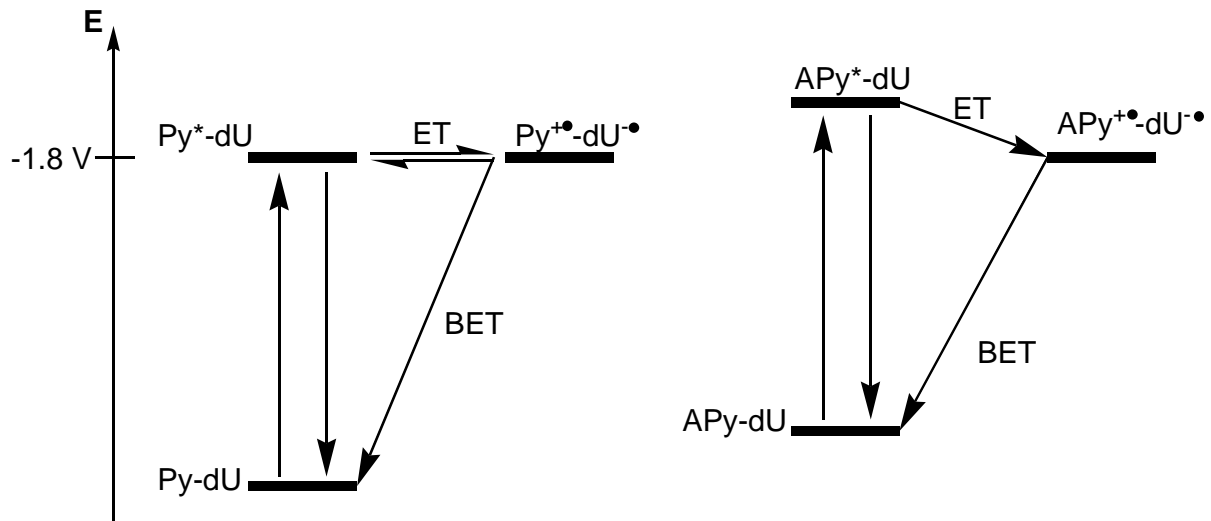


Abb.3-1: Zwischen angeregtem und ladungstrenntem Zustand von Py-dU bildet sich ein Gleichgewicht aus. Angeregtes Aminopyren sollte in der Lage sein, Uridin quantitativ zu reduzieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Elektronendonorsystem bereitzustellen, das im angeregten Zustand ein stärkeres Reduktionsvermögen als Py-dU besitzt und damit das Gleichgewicht zwischen angeregtem und ladungstrenntem Zustand deutlich auf die Seite der Ladungstrennung zu verschieben vermag. Um die bereits etablierten Synthesvorschriften des Py-dU^[13, 14] möglichst übernehmen zu können wurde dazu eine Modifikation des Pyrenylrestes mit einer elektronenreichen Gruppe in Betracht gezogen. Als einfach erhältliche Ausgangsverbindung wurde 1-Aminopyren verwendet. Das Reduktionspotential von Aminopyren liegt 0.77 V über dem des Pyrens.^[186] Die Triebkraft für eine Ladungstrennung sollte demnach bei ca. 0.77 V liegen. Die dreistufige Synthese von Py-dU aus Bromierung, Boronsäuresynthese und Suzuki-Kupplung musste in diesem Fall erweitert werden durch die Blockade der Aminofunktion mittels Methylierung sowie die Trennung der unterschiedlich substituierten Brom-Aminopyrene.

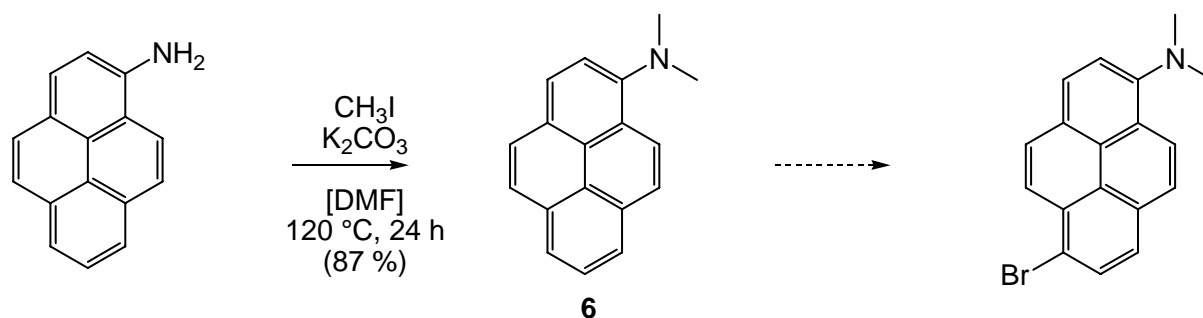


Abb.3-2: Strategie zur Synthese von 6-Brom-1-(*N,N*-dimethylamino)pyren über 1-(*N,N*-Dimethyl)aminopyren **1**.

Die Methylierung von 1-Aminopyren^[187, 188] gelingt in sehr guten Ausbeuten in Dimethylformamid durch Umsetzung mit Methyljodid im Überschuss in Gegenwart von Kaliumcarbonat als Base. Die folgende Bromierung von **6** wurde sowohl mittels NBS in Tetrachlormethan^[189] als auch mit Kupfer(II)bromid in Chlorbenzol^[182, 188] durchgeführt. Die Hauptprodukte sind stets einfach bromiert, beide Reaktionen lieferten nur Isomerenmischungen in geringer Ausbeute. Während die 3-Position des Pyrens praktisch nicht an der Reaktion teilnimmt, entstehen 6-Brom-1-dimethylaminopyren und 8-Brom-1-dimethylaminopyren gleichermaßen. Eine Trennung der Brom-dimethylaminopyrene konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Allgemein^[190] wird in der Literatur die Trennung von unterschiedlich substituierten Pyrenen als äußerst anspruchsvoll beschrieben, so dass eine neue Synthesestrategie primär darauf ausgerichtet sein sollte, die Trennung der 1,6- und 1,8-disubstituierten Pyrene zu ermöglichen und ausgehend vom reinen 1,6-Isomer (**8**) die Darstellung von 6-Brom-1-aminopyren durchzuführen.

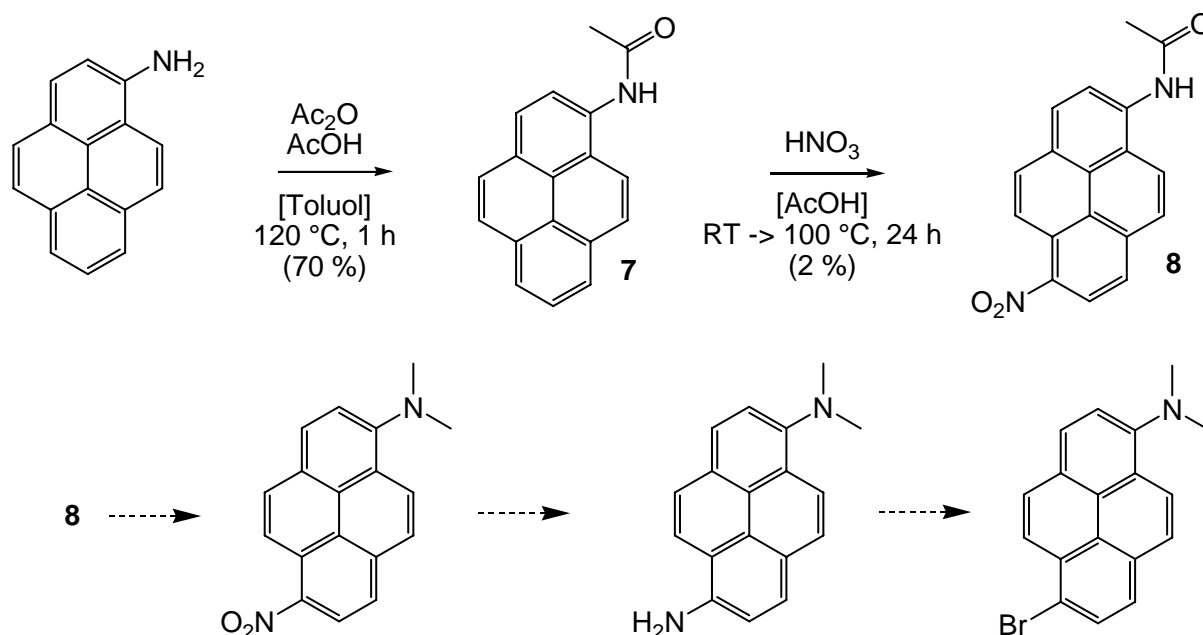


Abb.3-3: Synthesestrategie zur Gewinnung von 6-Brom-1-dimethylaminopyren.

Über die Separation von 1,6- und 1,8-substituierten (*N*-Acetylamino)-nitropyrenen per Flash-Säulenchromatographie wurde in der Literatur^[191] berichtet, die Herstellung dieser Verbindung (8) ist in wenigen Schritten möglich. Zuerst wurde Aminopyren mit Acetanhydrid und Essigsäure acetyliert um die Aminofunktion zu schützen. Darauf folgend wurde mit konzentrierter Salpetersäure in Eisessig nitriert, es entstehen die isomeren 1,6- und 1,8-Acetylaminonitropyrene. Diese beiden Isomeren sind zwar durch Flash-Chromatographie zu isolieren, die Reinigung ist aber sehr aufwendig und ergibt nur geringe Mengen der Reinprodukte.

Ausgehend vom isomerenreinen 1-Acetylaminopyren könnte das gewünschte 1-Dimethylamino-6-bromopyren über eine Reduktion der Nitrogruppe^[192] mit anschließender Sandmeyer-Reaktion^[193], zusätzlich zur Entfernung der Acetyl-Schutzgruppe^[191] und Methylierung der Aminofunktion, erhalten werden. Da die Herstellung von 8 aber nicht genügend reines Ausgangsmaterial zur Verfügung stellen konnte, wurde diese Synthesestrategie nicht weiter verfolgt. Statt dessen wurde Phenothiazin als alternativer und synthetisch besser zugänglicher Elektronendonator herangezogen.

3.2 Synthese von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (2)

Zahlreiche Derivate von Phenothiazin sind bereits zur Modifikation von DNA eingesetzt worden, um den Ladungstransfer durch DNA zu untersuchen. In den meisten Experimenten wurde Phenothiazin über einen Alkyl-Linker (A, B) am 5'-Terminus der DNA angefügt^[139, 194-198] oder mit einem 5'-Aminonukleotid über eine Amidbindung (C) verknüpft.^[199] Es diente als Lochakzeptor zur Untersuchung des oxidativen Ladungstrfers. Zu diesem Zweck eignet sich Phenothiazin besonders aufgrund seines Reduktionspotentials^[200-202] von 0.76 V (vs. NHE) und des spektroskopierbaren Radikalkations, welches eine deutliche Absorption^[139, 201-203] bei $\lambda = 510$ nm zeigt. Die Entstehung des Phenothiazin-Radikalkations kann somit nach der Auslösung des Ladungstrfers durch einen Lochdonor verfolgt werden.

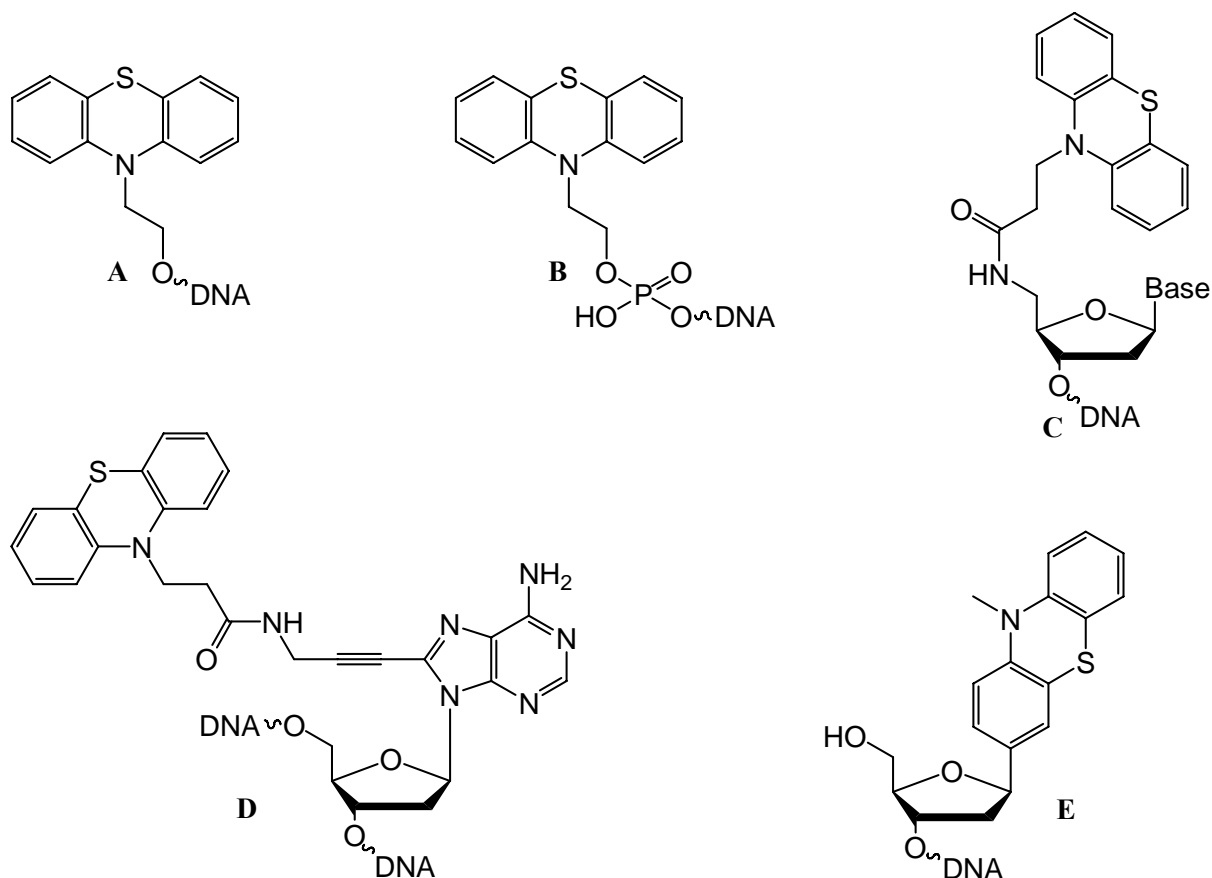


Abb.3-4: Bisher in DNA inkorporierte Phenothiazinderivate.

Weitere Möglichkeiten zur Verknüpfung von Phenothiazin mit DNA-Oligonukleotiden bietet eine Verbrückung zwischen Phenothiazin und der 8-Position des Adenins (D) über einen Alkynyllinker^[204] sowie der Einbau eines C-Nukleosids^[200] (E). Dabei handelt es sich um die bisher einzige Anbindung des Phenothiazins an DNA, die nicht über den Stickstoff des Phenothiazins erfolgt. Statt dessen wurde die Nucleobase durch einen 10-Methylphenothiazin-3-yl-Rest ersetzt und das so erhaltene C-Nukleosid am 5'-Terminus in die

DNA inkorporiert. Lediglich das Phenothiazin-modifizierte Adenin (D) wurde inmitten der Nukleotidsequenz inkorporiert, sämtliche anderen Modifikationen wurden am 5'-Terminus platziert. Untersuchungen des reduktiven Elektronentransfers durch DNA wurden mit Phenothiazin erst kürzlich durchgeführt.^[89]

Die Auslösung des reduktiven Elektronentransfers erfolgt photochemisch: das Reduktionspotential des angeregten Phenothiazins liegt bei ca. -2.0 V und erfüllt damit die Voraussetzung, deutlich über dem Potential des Uridins (ca. -1.8 V) zu liegen. Es ist zu erwarten, dass Phenothiazin nach photochemischer Anregung ein Elektron auf das Uridin übertragen kann. Der im Pyren-dU-System auftretende Rückladungstransfer vom Uridin auf den Chromophor^[14] sollte aufgrund des großen Potentialunterschiedes nicht zu beobachten sein.

Die Absorptionsmaxima von 10-Methylphenothiazin befinden sich bei $\lambda = 254$ und 315 nm.^[199] Das längerwellige Absorptionsmaximum ermöglicht die selektive Anregung des Phenothiazinsystems ohne gleichzeitige Anregung der DNA-Basen. Phenothiazin erfüllt damit die Anforderungen an ein Elektronendonorsystem für DNA. Außerdem sollte die Synthese des modifizierten Nukleosids (**2**) analog zur Synthese von Pyren-dU möglich sein, zumal da die Darstellung des Boronsäure-Pinakolesters (**11**) bereits in der Literatur^[205, 206] beschrieben wurde.

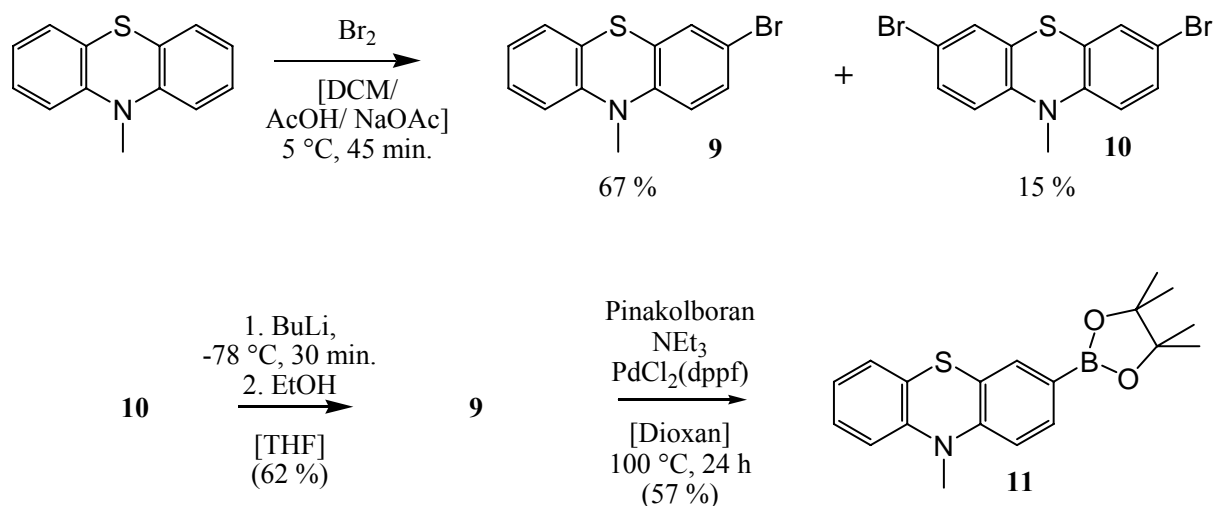


Abb.3-5: Synthesestrategie zur Gewinnung von 10-Methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenothiazin **11**.

Zur Bromierung von 10-Methylphenothiazin zu 3-Brom-10-methylphenothiazin (**9**) gibt es in der Literatur mehrere, teils widersprüchliche, Angaben. Als Bromierungsreagenzien wurden

Pyridinium Hydrobromid Perbromid^[207] (PHP), N-Brom-Succinimid^[207] (NBS) und elementares Brom in Essigsäure^[208, 209] vorgeschlagen. Stets steht die Reaktion in Konkurrenz zur Zweifachbromierung zu 3,7-Dibrom-10-methylphenothiazin (**10**). Bei Verwendung von NBS als Bromierungsreagenz wurde auch über das Auftreten von 10-Methylphenothiazin-5-oxid berichtet.^[210] Als effektivste Bromierungsmethode ist die Verwendung von elementarem Brom empfohlen.^[210] Die maximal erreichbare Ausbeute des einfach bromierten Produkts sollte nach der Theorie bei 66% liegen, vollständiger Umsatz und vergleichbare Reaktivitäten der beteiligten Verbindungen vorausgesetzt. Dazu ist eine Zugabe von mehr als der stöchiometrischen Menge an Brom notwendig. Die Reaktion wurde daher bei ca. 5 °C durchgeführt und abgebrochen, sobald sich eine günstige Produktverteilung eingestellt hatte, das heißt wenn die Zunahme an Nebenprodukt die Bildung des Produkts übersteigt. Die Produktverteilung wurde dabei über Dünnschichtchromatographie verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Reduktion des Broms mit wässriger Dithionitlösung. Nach chromatographischer Reinigung konnten Ausbeuten von 67 % erzielt werden.

Das entstandene Nebenprodukt 3,7-Dibrom-10-methylphenothiazin (**10**) kann durch Halogen-Lithium-Austausch mit stöchiometrischer Menge an n-Butyllithium in THF und anschließender Hydrolyse mit Ethanol wieder zum 3-Brom-10-methylphenothiazin (**9**) umgesetzt werden.^[211] In dieser Reaktion entsteht ebenso eine Mischung aus 10-Methylphenothiazin und den mono- und dibromierten Produkten **9** und **10**. Eine vollständige Umsetzung von 10-Methylphenothiazin zu **10** und anschließende Umwandlung in **9** bietet keinen Vorteil für die Herstellung von 3-Brom-10-methylphenothiazin (**9**).

Ein alternativer Syntheseweg zu 3-Brom-10-methylphenothiazin **9** geht von 2-Mercaptoanilin und 2,5-Dibromnitrobenzol aus.^[212, 213] In Gegenwart von Kaliumhydroxid reagieren die beiden Edukte in Isopropanol zu einem Diarylsulfid. Dieses wurde in Aceton gelöst und mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert. Erhitzt man in basischer Lösung erfolgt eine *Smiles*-Umlagerung^[214-216] des Arylrestes vom Schwefel zum Stickstoff, gefolgt vom erneuten Angriff des Sulfids unter Ringschluss sowie Deacetylierung zum 3-Bromphenothiazin. Eine anschließende Kalium-*tert.*-butylat-vermittelte Methylierung mit Iodmethan in THF ergibt 3-Brom-10-methylphenothiazin (**9**).

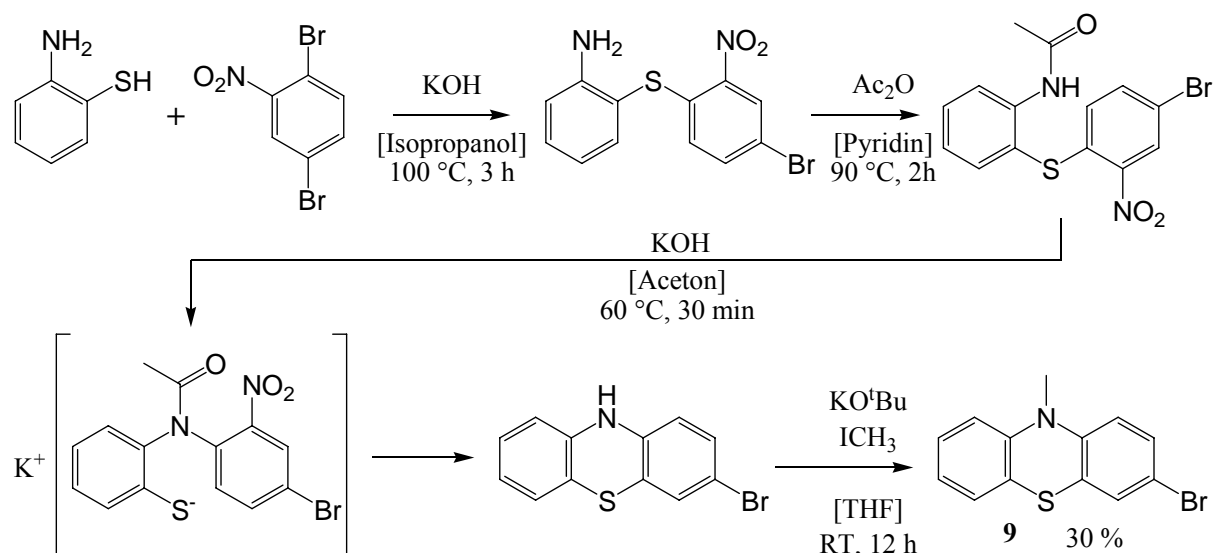


Abb.3-6: Alternativer Syntheseweg zur Herstellung von 3-Brom-10-methylphenothiazin **9**.

Diese Alternative erlaubt die Herstellung von 3-Brom-10-methylphenothiazin (**9**) in großen Mengen, geht aber zu Lasten der Reinheit, da schwer abzutrennende Nebenprodukte entstehen. Der Vorteil der kostengünstigeren Edukte wird durch die schlechte Gesamtausbeute (ca. 30 %) wieder relativiert. In der Summe ist dieser Weg weder effizienter noch ökonomischer als die Bromierung von 10-Methylphenothiazin.

Die zur Synthese von Py-dU analoge Herstellung von 10-Methylphenothiazin-3-ylboronsäure durch Halogen-Lithium-Austausch, gefolgt von Umsetzung mit Borsäuretrialkylester und anschließender Hydrolyse^[205] gelingt nicht, da sich die Boronsäure als labil gegenüber den sauren Bedingungen der Esterhydrolyse erweist. Die nachfolgende Suzuki-Kupplung ist allerdings nicht auf die freie Boronsäure angewiesen, sondern toleriert auch Boronsäureester als Edukte. Meist werden dabei die Pinakolester der Boronsäuren eingesetzt.^[217] Eine Methode zur Palladium-katalysierten Darstellung des Boronsäure-Pinakolesters aus einem Arylhalogenid und Pinakolboran ist von *Masuda*^[173] erarbeitet worden und wurde von *Müller et al.*^[205] bereits am Phenothiazin angewendet.

Unter sorgfältigem Ausschluss von Wasser wurde 3-Brom-10-methylphenothiazin **9** in Gegenwart von Triethylamin und Palladium(dppf)chlorid mit Pinakolboran 24 h in siedendem Dioxan umgesetzt. Anwesenheit von Wasser führt zur Dehalogenierung des Edukts und liefert 10-Methylphenothiazin als Nebenprodukt. Das gereinigte Produkt **11** wurde aus Dioxan lyophilisiert und lag als weißes Pulver in Ausbeuten von 57 % vor.

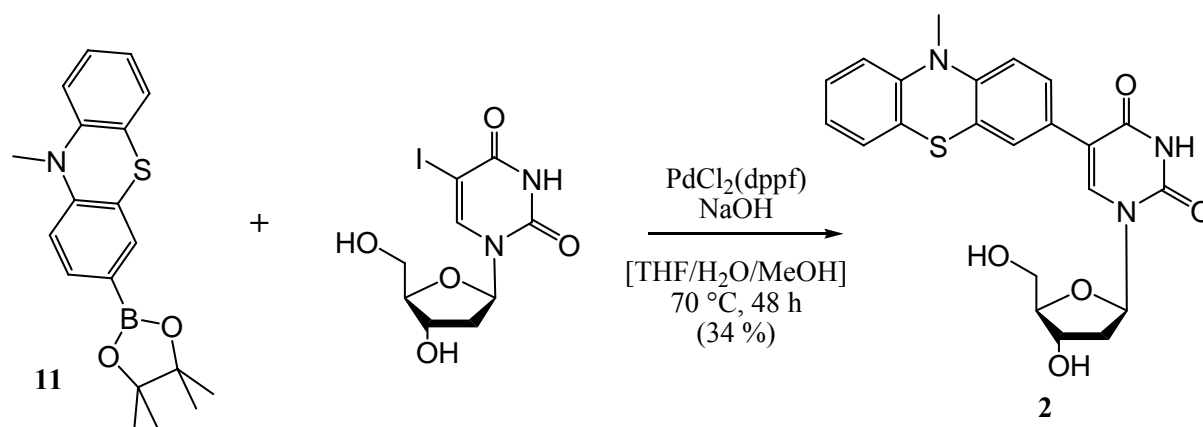


Abb.3-7: Synthese von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **2**.

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 5-Iod-2'-desoxyuridin wurde der Elektronendonator über eine Suzuki-Miyaura-Kupplung^[172] mit der Nukleobase verknüpft. Die Verwendung des auch in der Synthese von Py-dU eingesetzten Katalysators Tetrakis(triphenylphosphino)-palladium(0) führt zum Auftreten schwer abzutrennender Verunreinigungen. Der alternative Katalysator 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen-palladium(II)chlorid liefert vergleichbare Ausbeuten und weniger Nebenprodukte. Die Reaktion verläuft über 48 h bei 70 °C in einer Mischung aus THF, Wasser und Methanol. Ein großer Überschuss an Natriumhydroxid wurde zugegeben, um die benötigten basischen Reaktionsbedingungen sicherzustellen. Man erhält das Reinprodukt **2** als gelbes Pulver in Ausbeuten von ca. 30%.

3.2.1 Spektroskopische Untersuchungen von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (Ptz-dU, **2**)

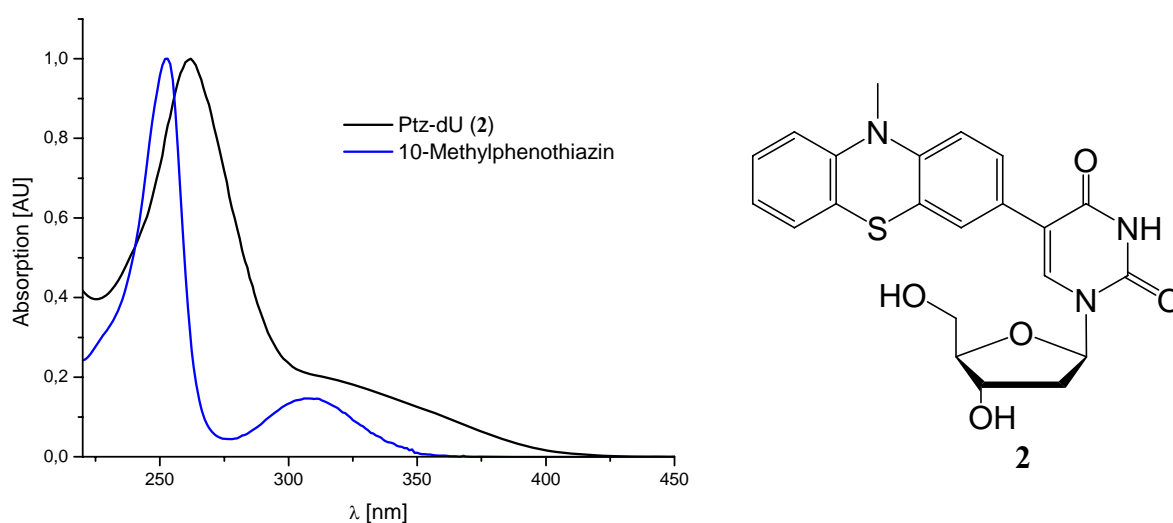


Abb.3-8: Normierte Absorptionsspektren von 10-Methylphenothiazin (blau) und Ptz-dU (schwarz). 0.1 mM 10-Methylphenothiazin in Methanol; 36 μ M Ptz-dU (**2**) in Methanol/Wasser 1:1.

Das Absorptionsspektrum von Ptz-dU zeigt eine intensive Absorption bei $\lambda = 260$ nm, die auf eine Kombination der Absorptionseigenschaften von Uracil und 10-Methylphenothiazin zurückzuführen ist. Die Absorptionsmaxima von Uracil und 10-Methylphenothiazin liegen bei $\lambda = 270$ bzw. 253 nm. Zwischen $300 \text{ nm} < \lambda < 410 \text{ nm}$ zeigt Ptz-dU eine breite unstrukturierte Absorptionsbande, die erheblich intensiver als die entsprechende Bande des Phenothiazins ist und sich weiter zu großen Wellenlängen erstreckt.

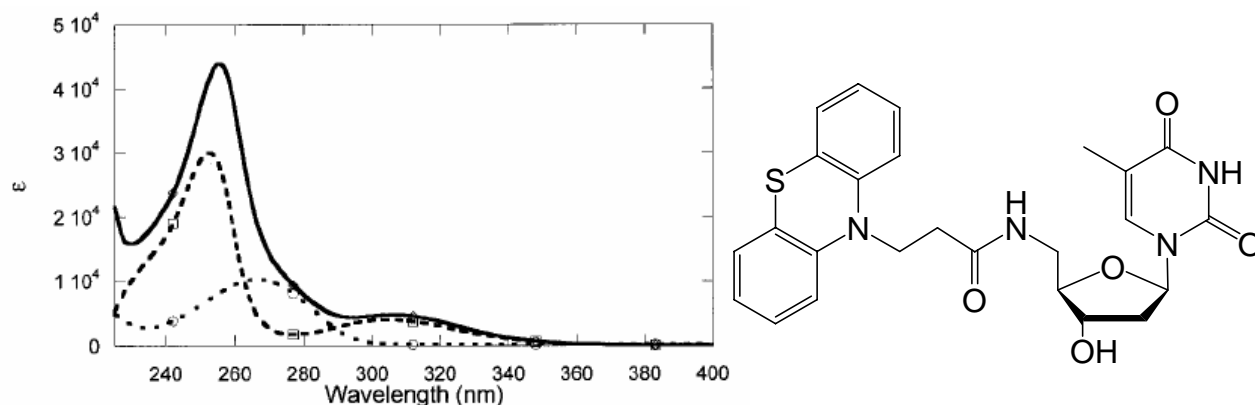


Abb.3-9: Absorptionsspektrum von Thymin (• • •), Phenothiazin (---) und Phenothiazinyl-Thymin (—), Strukturformel von Phenothiazinyl-Thymin.^[199]

Von *Grinstaff et. al.*^[199] wurde Phenothiazin über einen Propionsäurelinker mit einem 5'-Amino-5'-desoxythymin verknüpft. Vergleicht man dessen Absorptionsspektrum mit dem des Ptz-dU, so ist Phenothiazinyl-Thymin als voneinander unabhängige Kombination von Thymin (dessen Absorptionsspektrum identisch zu dem des Uridins ist) und Phenothiazin anzusehen, wohingegen die Absorptionseigenschaften von Ptz-dU (**2**) besonders zu großen Wellenlängen hin (bis ca. 410 nm) deutlich verändert sind. Dieser Effekt ist vermutlich eine Auswirkung der starken elektronischen Kopplung zwischen dem Phenothiazin- und dem Uracil-Chromophor.

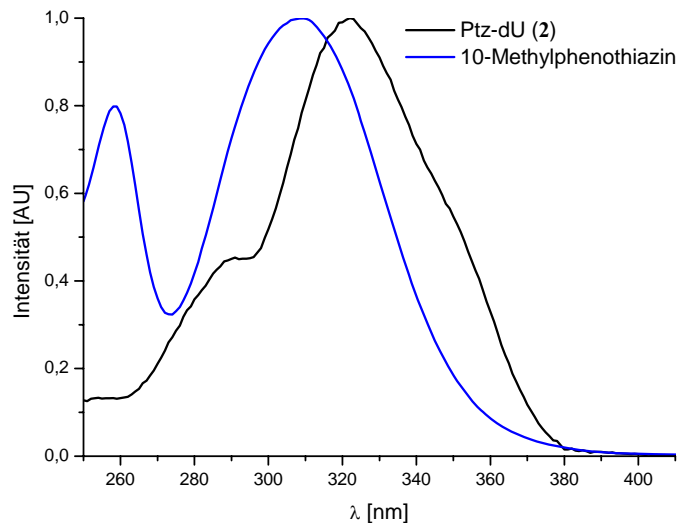


Abb.3-10: Vergleich der normierten Anregungsspektren von Ptz-dU (schwarz) und 10-Methylphenothiazin (blau). $\lambda_{em} = 430$ nm (Ptz-dU) bzw. 446 nm (10-Methylphenothiazin), $10 \mu\text{M}$ Ptz-dU bzw. 0.1 mM 10-Methylphenothiazin in Methanol.

Das Anregungsspektrum von Ptz-dU (2) verdeutlicht die Verschiebung des Absorptionsbereichs. Die Absorption bei $\lambda = 260$ nm trägt noch weniger als im 10-Methylphenothiazin zur Fluoreszenzemission bei. Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei $\lambda = 322$ nm und ist damit um 13 nm verschoben. Das Spektrum erstreckt sich bis $\lambda = 380$ nm und damit deutlich langwelliger als das Anregungsspektrum von 10-Methylphenothiazin.

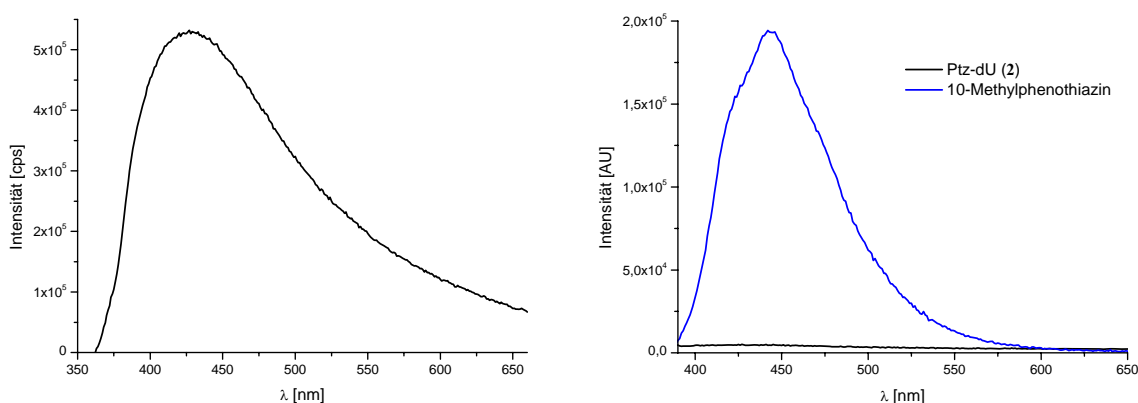


Abb.3-11: Links: Fluoreszenz von Ptz-dU, $\lambda_{exc} = 340$ nm, $10 \mu\text{M}$ in Methanol. Rechts: Vergleich der Fluoreszenzen von 10-Methylphenothiazin (blau) und Ptz-dU (schwarz), $\lambda_{exc} = 340$ nm, 0.1 mM 10-Methylphenothiazin bzw. $10 \mu\text{M}$ Ptz-dU in Methanol.

10-Methylphenothiazin fluoresziert bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 315 \text{ nm}$ und emittiert mit einem Emissionsmaximum von $\lambda = 446 \text{ nm}$. Diese Fluoreszenz ist im Ptz-dU (**2**) fast vollständig gelöscht. Das Emissionsmaximum der Restfluoreszenz befindet sich bei $\lambda = 430 \text{ nm}$. Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt bei Anregung mit $\lambda = 340 \text{ nm}$ lediglich $\Phi_{\text{F}} = 0,2\%$.

Die geringe Fluoreszenz kann durch einen nach der Anregung des Phenothiazins erfolgenden Ladungstransfer erklärt werden. Die Oxidationspotentiale von Phenothiazin^[200-202] und Uridin^[45] stützen diese These: ein Elektron wird vom Phenothiazin auf Uridin unter Ausbildung eines Phenothiazin-Radikalkations und eines Uridin-Radikalanions übertragen. Dadurch wird der angeregte Zustand des Phenothiazin-Chromophors schneller als durch Fluoreszenz depopuliert. Demnach sollte ein Ladungstransfer vom Phenothiazin auf Uridin erfolgen, der Rückladungstransfer in den angeregten Zustand sollte thermodynamisch unmöglich sein. Aus dem ladungstrennten Zustand kehrt das Molekül in den Grundzustand zurück, ohne Strahlung zu emittieren.

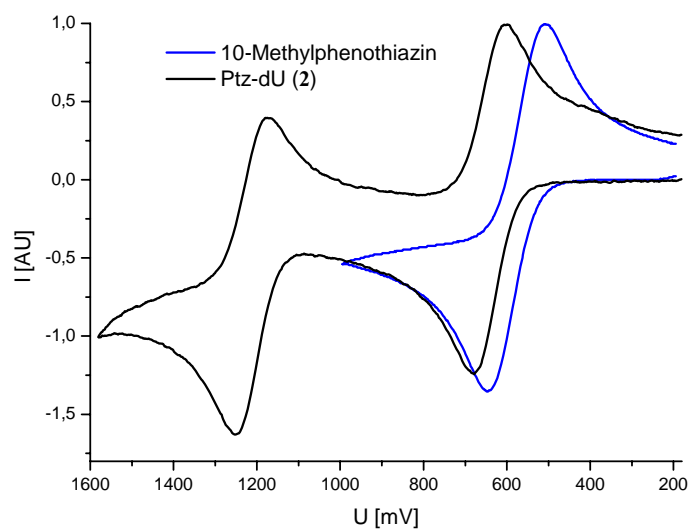


Abb.3-12: Cyclovoltammogramm von Ptz-dU (**2**) und 10-Methylphenothiazin, 0.5 mM in Acetonitril.

Das Cyclovoltammogramm zeigt zwei deutlich voneinander separierte Halbstufenpotentiale bei 640 mV und 1211 mV (jeweils gegen NHE). Der Abstand zwischen anodischem und kathodischem Peakpotential beträgt 84 mV bzw. 78 mV, so dass beide Reaktionen noch als reversibel angesehen werden können. Das Reduktionspotential des Übergangs zum Radikalkation wird für Phenothiazin in der Literatur^[200-202] mit 0.76 V gegen NHE angegeben, gemessen wurde ein Potential von 0.58 V. Aus den gemessenen Werten für Ptz-dU und einer Singulett-Singulett-Energie von $E_{00} = -2.9 \text{ eV}$ ($\lambda = 446 \text{ nm}$) ergibt sich nach der

Rehm-Weller-Gleichung ein Reduktionspotential des angeregten Ptz-dU* von ~ 2.14 V. Die maximale Triebkraft der Ladungstrennung von Ptz-dU* in Ptz⁺-dU⁻ beträgt ca. -0.34 V. Damit sollte Phenothiazin in der Lage sein, ein Elektron auf Uridin zu übertragen.

Das Absorptionsspektrum des Phenothiazin-Radikalkations zeigt eine deutliche Absorption bei $\lambda = 512$ nm. Vergleicht man die Spektren der Radikalkationen von 10-Methylphenothiazin und Ptz-dU (**2**), so fällt die Abwesenheit dieses deutlichen Absorptionsmaximums beim Ptz-dU auf. Statt dessen entstehen bei steigendem Potential drei neue Maxima bei $\lambda = 298$ nm, 620 nm und 474 nm, während die Intensität der Absorption bei $\lambda = 261$ nm abnimmt. Der Übergang zwischen der Neutralverbindung und dem Ptz-dU-Radikalkation ist reversibel.

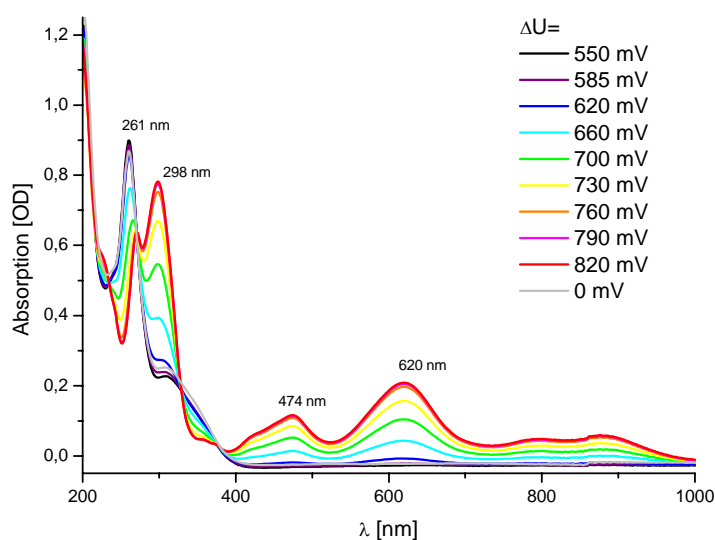
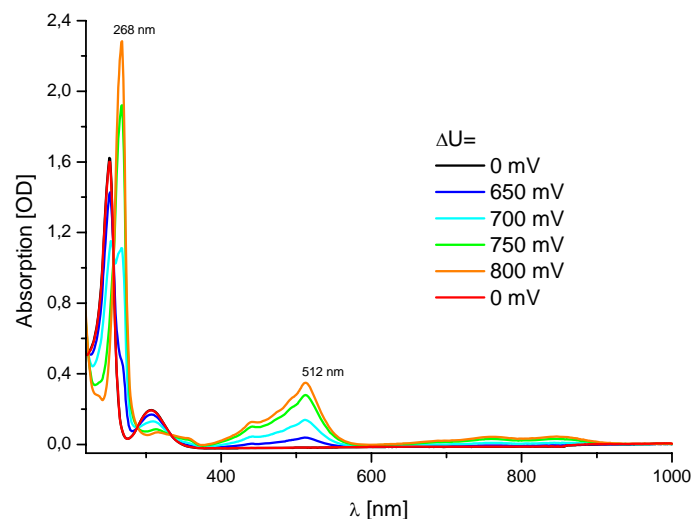


Abb.3-13: Absorptionsspektren der Radikalkationen von 10-Methylphenothiazin (oben) und Ptz-dU (unten). Die Potentiale sind gegen einen willkürlich gewählten Bezugspunkt angegeben. 0.5 mM in Acetonitril.

Das Spektrum des Radikalkations von Ptz-dU (**2**) ist nicht deckungsgleich mit dem Spektrum des Phenothiazin-Radikalkations. Die Hypothese, dass angeregtes Ptz-dU in einen ladungstrennten Zustand übergeht, der als voneinander unabhängige Kombination von Phenothiazin-Radikalkation und Uridin-Radikalanion anzusehen ist, kann so nicht aufrechterhalten werden. Die elektronische Kopplung mit dem Uridinsystem beeinflusst den Phenothiazinchromophor so stark, dass man nicht mehr von zwei getrennten Systemen, sondern von einem gemeinsamen Chromophor ausgehen muss.

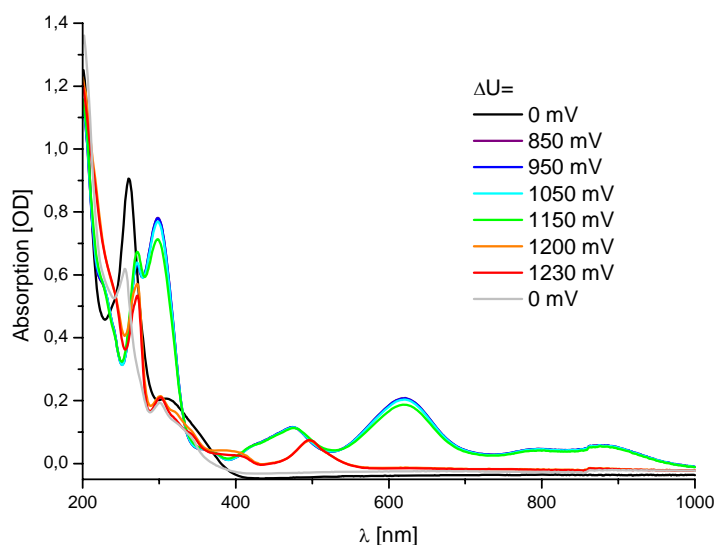


Abb.3-14: Absorptionsspektrum der irreversiblen Umwandlung des Radikalkations von Ptz-dU in eine andere Verbindung. Die Potentiale sind gegen einen willkürlich gewählten Bezugspunkt angegeben. 0.5 mM Ptz-dU in Acetonitril.

Steigert man das angelegte Potential über den Wert des Radikalkations, so bildet sich rasch eine neue Verbindung, deren Absorptionsmaxima bei $\lambda = 496$ und 272 nm liegen. Diese Umwandlung ist nicht reversibel. Nach Verringerung des angelegten Potentials ist das Spektrum nicht mehr mit der Ausgangsverbindung identisch, was auf eine irreversible chemische Umwandlung des Moleküls hindeutet. In der Cyclovoltammetrie war diese Umwandlung noch als reversibel erschienen. Während einer spektroelektrochemischen Messung verbleibt das zu vermessende Molekül aber wesentlich länger im dem angelegten Potential entsprechenden radikalischen Zustand: anstatt nur wenige Sekunden bleibt das Potential über mehrere Minuten (ca. 7-10 min pro Messreihe) angelegt. Offensichtlich ist die hier erhaltene Verbindung nur über kurze Zeit stabil und zersetzt sich während der spektroelektrochemischen Messung.

Wird eine Lösung von Ptz-dU (**2**) in Methanol/ Wasser (1:1) mit Licht $\lambda > 305$ nm bestrahlt, so findet eine Umwandlung in ein anderes Produkt statt. Die Wellenlänge des einfallenden Lichtes ist so gewählt, dass nur der Phenothiazin-Chromophor, nicht aber die Nucleobase angeregt wird. Über den Verlauf von 3 h kann mittels HPLC-MS beobachtet werden, wie Ptz-dU abgebaut wird und gleichzeitig ein neues Produkt entsteht, dessen Molekülmasse um 16 Masseneinheiten größer als die des Ptz-dU ist. Das Absorptionsspektrum der neu entstandenen Verbindung zeigt einen deutlichen Unterschied zu den Spektren des Ptz-dU und des 10-Methylphenothiazins. Dieses Produkt ist das einzige zu beobachtende Produkt (HPLC-Analyse, Detektion über UV-Absorption und ESI-MS).

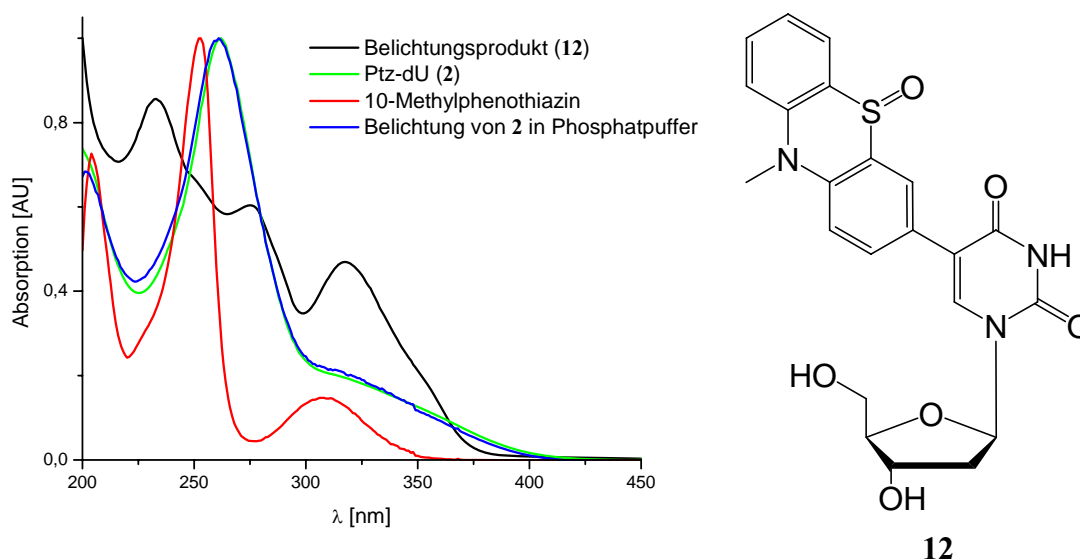


Abb.3-15: Normierte Absorptionsspektren von 10-Methylphenothiazin und Derivaten. 36 μ M Ptz-dU in Methanol/Wasser 1:1, 33 μ M Ptz-dU in Methanol/Wasser 1:1 + 10 mM NaP_i -Puffer, 36 μ M Belichtungsprodukt in Methanol/Wasser 1:1, 0.1 mM 10-Methylphenothiazin in Methanol.

Rechts: Struktur des Belichtungsprodukts **12**.

Ein NMR-Spektrum zeigt als einzige Veränderung eine geringe Verschiebung einiger dem Phenothiazin zuzuordnenden Signale. Der Vergleich mit einem auf chemischem Weg^[218] hergestellten 5-(10-Methyl-5-oxo-phenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**12**) zeigt die Identität beider Verbindungen.

Interessanterweise kann die Bildung des Oxidationsproduktes (**12**) verhindert werden, indem man bei neutralem pH-Wert anstatt unter den leicht sauren Bedingungen (pH~6.5) des deionisierten Wassers arbeitet. Gibt man Natriumphosphatpuffer (pH 7) zum Lösungsmittel und wiederholt das Belichtungsexperiment, so wird keine Veränderung des Ptz-dU

beobachtet. Unter Lichtausschluss ist Ptz-dU im Sauren stabil. Somit ist die Einwirkung beider Faktoren Licht und pH-Wert notwendig, um eine Oxidation hervorzurufen.

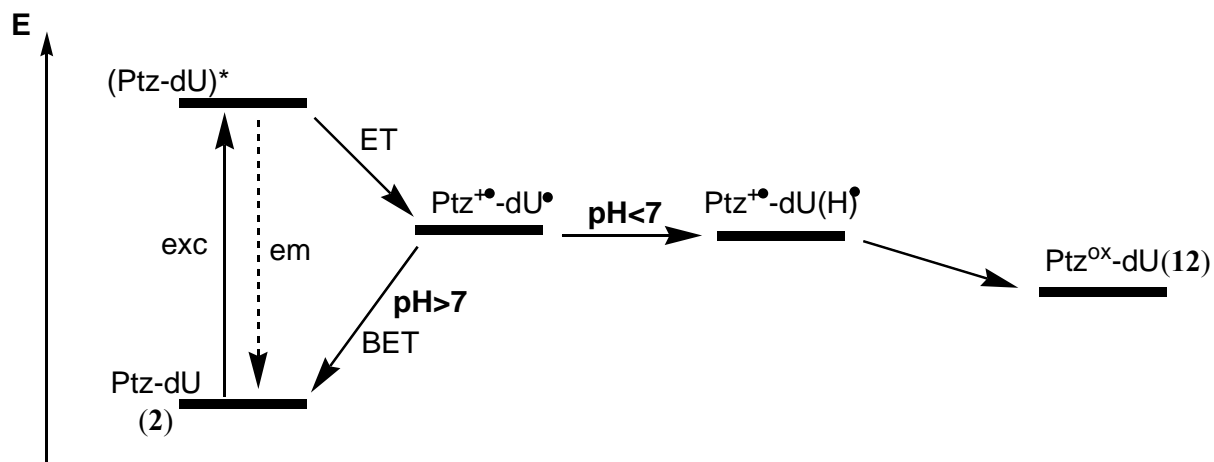


Abb.3-16: Vorschlag eines photochemischen Reaktionswegs für Ptz-dU (**2**).

Ein möglicher Reaktionsweg ist in Abb. 3-16 skizziert. Wird Ptz-dU (**2**) in saurer Lösung $\text{pH} < 7$ angeregt, stabilisiert eine Protonierung das Thymin-Radikalanion. Der pK_s -Wert des protonierten, neutralen Thyminradikals ist von *Steenken* mit 6.9 angegeben.^[219] Das Py-dU-Nukleosid wird ab $\text{pH} < 5$ protoniert, wie von *Fiebig* und *Wagenknecht* gezeigt wurde.^[15, 77] Vermutlich wird das Phenothiazin-Radikalkation durch Solvensmoleküle angegriffen und schließlich zum Oxidationsprodukt Ptz^{ox}-dU (**12**) umgesetzt.

Das Belichtungsprodukt (**12**) konnte in DNA-Oligonukleotiden nicht beobachtet werden, da diese stets in Natriumphosphatpuffer bei $\text{pH} = 7$ vorlagen und somit unter Bedingungen, bei denen Ptz-dU gegenüber der Oxidationsreaktion stabil ist. In zeitaufgelösten Absorptionsmessungen (DNA-Duplex in 10 mM NaPi, $\text{pH} 7$; siehe Abb.3-24) konnte ebenfalls eine chemische Umwandlung des Phenothiazins festgestellt werden, das entstehende Produkt zeigt jedoch andere Absorptionseigenschaften als 5-(10-Methyl-5-oxo-phenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**12**) und ist somit nicht mit diesem identisch.

3.2.2 Synthese von Ptz-dU-modifizierter DNA

Zur automatisierten DNA-Festphasensynthese wird am 5'-Terminus die säurelabile Dimethoxytritylschutzgruppe benötigt. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten der primären 5'-und der sekundären 3'-Hydroxylfunktion kann die reaktivere 5'-Position selektiv geschützt werden. Man erhält in Ausbeuten von ca. 60 % 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridin (**13**). Das Produkt ist gegen Luft und Wasser stabil und kann als Feststoff problemlos gelagert werden. Die Phosphoramiditgruppierung dagegen

ist so reaktiv, dass ihre Einführung erst unmittelbar vor der DNA-Synthese durchgeführt wird. Zu diesem Zweck wird β -Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit eingesetzt, welches in Dichlormethan in Gegenwart von Base mit der 3'-OH-Gruppe des Nucleosids ein Phosphorigsäureamid **14** bildet.

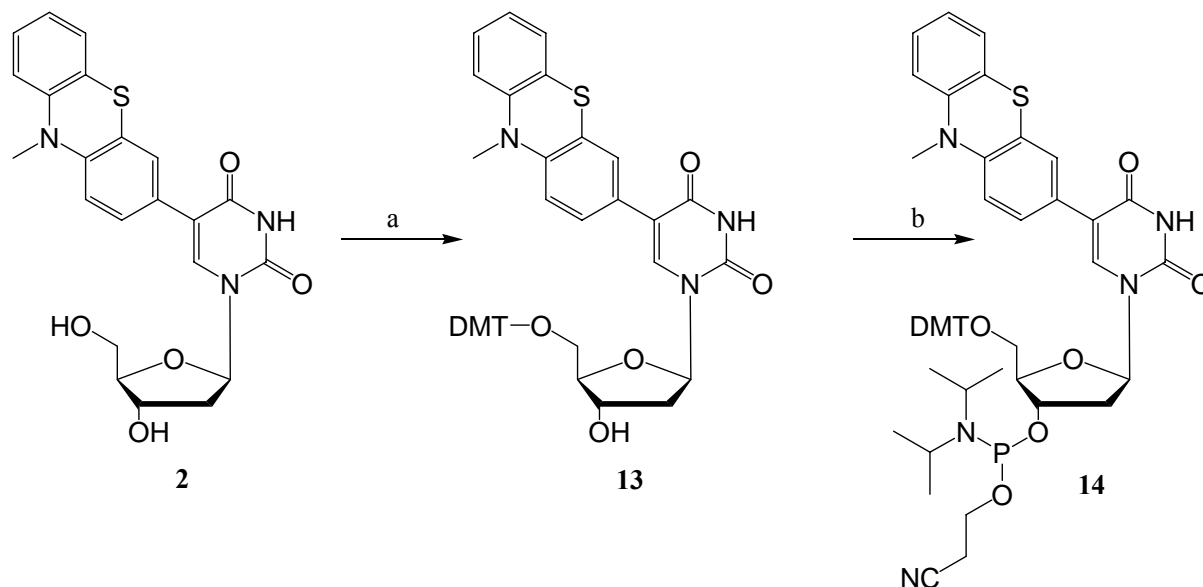


Abb.3-17: Syntheschema zur Modifikation von Ptz-dU **2** zum Einbau in DNA-Oligonukleotide. Reaktionsbedingungen: a) DMT-Cl, [Pyridin], RT, 23 h, 52 %; b) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Triethylamin, [DCM], RT, 45 min, 95 %.

Der DNA-Baustein **14** wird in Acetonitril gelöst und in den DNA-Syntheseautomaten eingesetzt. Die Kupplungsbedingungen wurden nicht verändert (für Kupplungsprotokolle siehe Kap. 11.3). Man erkennt am Tritylmonitor, dass unter Standardbedingungen eine sehr gute Kupplungseffizienz erreicht wird.

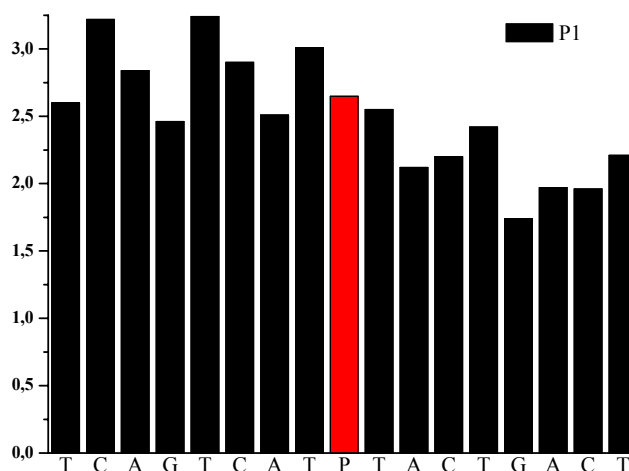
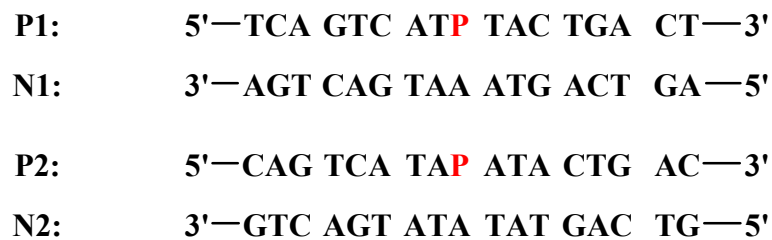


Abb.3-18: Tritylmonitor der Synthese von Ptz-dU-modifizierter DNA P1.

Nach erfolgreicher Synthese wird nach Standardprotokoll aufgearbeitet. Die Aufreinigung der DNA-Oligonukleotide wurde mittels RP-HPLC durchgeführt, zur Detektion von Ptz-dU-modifizierten Oligonukleotiden wurden die Wellenlängen $\lambda = 260$ nm aufgrund des größten Extinktionskoeffizienten und $\lambda = 315$ nm zum selektiven Erfassen des Ptz-dU gewählt.



Mit den Sequenzen P1/N1 und P2/N2 wurde der Einbau von Ptz-dU (**P**) in Oligonukleotide ausgearbeitet. Es wird davon ausgegangen, dass Ptz-dU nach photochemischer Anregung ein Elektron in die DNA injiziert, dadurch wird der angeregte Zustand depopuliert und die Fluoreszenzintensität des Phenothiazins sinkt ab. Befindet sich wie in der Sequenz P1 ein guter Elektronenakzeptor (z.B. T) unmittelbar neben dem Elektronendonator, so sollte die Fluoreszenz effektiver gelöscht werden als in der Sequenz P2, in der das nächste Thymin durch ein Adenin vom Ptz-dU separiert ist.

3.2.3 Spektroskopische Untersuchungen von Ptz-dU-modifizierter DNA

Das Absorptionsspektrum von Ptz-dU-markierter einzelsträngiger DNA zeigt jenseits von $\lambda > 300$ nm keine Veränderungen, die Absorptionseigenschaften von Ptz-dU gleichen in diesem Wellenlängenbereich denen der modifizierten Nukleobase. Die Absorption der übrigen Nukleobasen überlagert die Absorption des Ptz-dU bei $\lambda = 260$ nm.

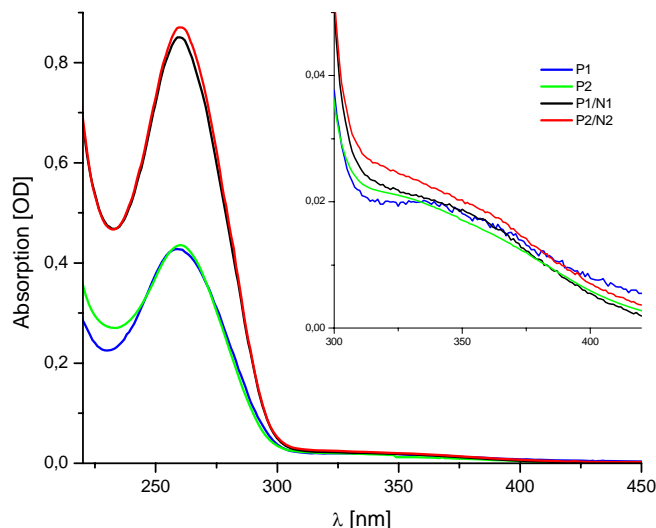


Abb.3-19: Vergleich der Absorptionsspektren von Ptz-dU-modifizierten DNA-Einzelsträngen und Duplexen. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer.

Die Formation des DNA-Duplexes hat keine Auswirkung auf das Absorptionsverhalten. Die Phenothiazinbanden $\lambda > 300$ nm von einzel- und doppelsträngiger DNA sind praktisch deckungsgleich. Das Absorptionsspektrum des Ptz-dU-modifizierten Duplex ist als Addition der Spektren der Einzelstränge anzusehen.

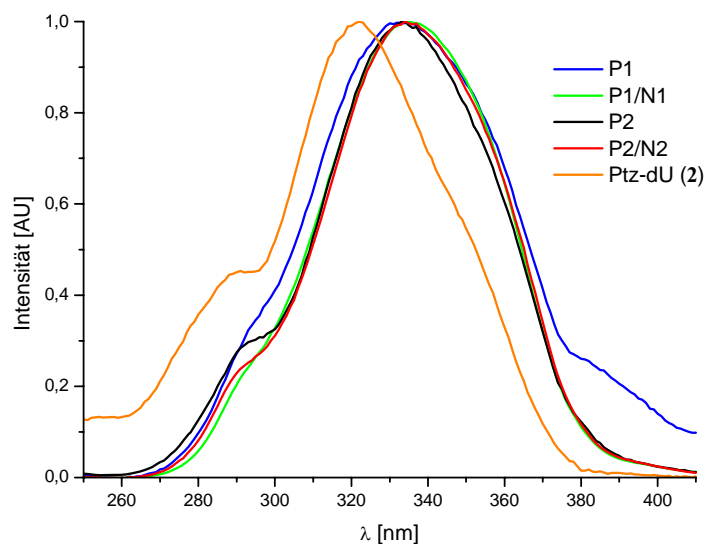


Abb.3-20: Normierte Anregungsspektren von Ptz-dU (2), Ptz-dU-modifizierter DNA P1 und P2 sowie Duplex P1/N1 und P2/N2. 10 μM Ptz-dU in Methanol; 12.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{em}} = 430$ nm.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensität eines Oligonukleotids in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge so stellt man fest, dass die Absorption bei $\lambda = 260$ nm nicht zur Fluoreszenzemission beiträgt. Die Anregung in einen fluoreszierenden Zustand findet ausschließlich bei längeren Wellenlängen $\lambda > 270$ nm statt. Das Anregungsspektrum zeigt ein Maximum bei $\lambda = 335$ nm und erstreckt sich bis $\lambda = 380$ nm. Diese Beobachtung gilt für Einzelstrang und Duplex gleichermaßen.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten von Phenothiazin-modifizierter DNA sind extrem gering. Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm hat einzelsträngige DNA P1 eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_{\text{F}} = 0.1$ %. Dieser Wert liegt im gleichen Bereich wie die Quantenausbeute des Monomers Ptz-dU (2). Bildet man den DNA-Duplex P1/N1, so erhöht sich die Quantenausbeute geringfügig auf $\Phi_{\text{F}} = 0.3$ %.

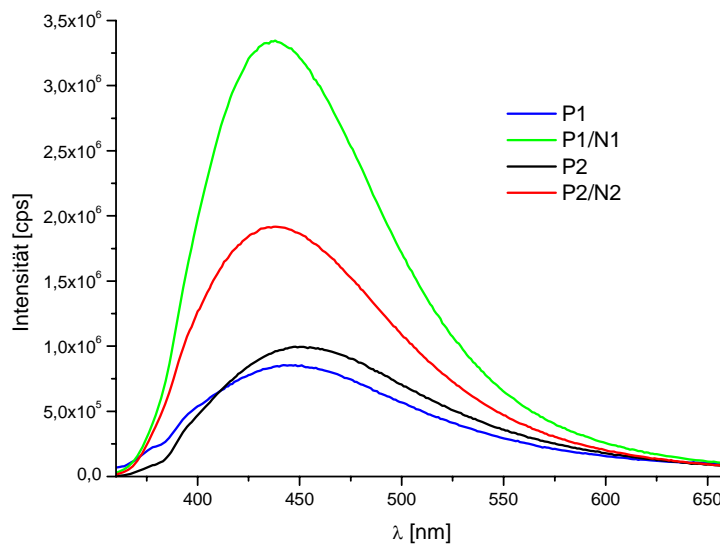


Abb.3-21: Fluoreszenz von Ptz-dU-markierten DNA-Einzelsträngen und Duplexen (12,5μM in 10 mM NaP_i-Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm)

Das Emissionsmaximum von Duplex-DNA liegt bei $\lambda = 438$ nm, dies bedeutet eine geringfügige Verschiebung gegenüber dem Einzelstrang bzw. 10-Methylphenothiazin ($\lambda = 446$ nm). Die Fluoreszenzintensität von Ptz-dU-markierten Duplexen liegt etwa um das zwei- bis fünffache über den Intensitäten der entsprechenden Einzelstränge. Prinzipiell sollte beim Übergang vom Einzelstrang zum Duplex die Effizienz des Elektronentransfers verbessert werden. Damit wäre eine stärkere Depopulation des angeregten Zustandes und damit ein Absinken der Fluoreszenzintensität verbunden. Die Quantenausbeuten des Ptz-dU (2) sind

aber so gering, dass eine quantitative Aussage über Fluoreszenzintensitäten nicht getroffen werden kann.

Der grundlegende Unterschied zwischen fluoreszierendem Py-dU^[77] und dem nur Restfluoreszenz zeigenden Ptz-dU (**2**) ist das Gleichgewicht zwischen angeregtem und ladungstrenntem Zustand (vgl. Abb.3-1). Im Falle des Ptz-dU liegt dieses beinahe vollständig auf der Seite des ladungstrennten, nicht fluoreszierenden Zustandes. Der Ladungstransfer von Phenothiazin auf die Nukleobase ist im DNA-Einzelstrang bereits so effektiv, dass eine Ableitung des Überschusselektrons auf eine benachbarte Nukleobase das Gleichgewicht nicht weiter zu verschieben vermag. Die geringfügige Verstärkung der Fluoreszenz mit der Bildung des DNA-Duplexes ist eine Folge der effektiveren Wechselwirkung von Ptz-dU mit dem Basenstapel.

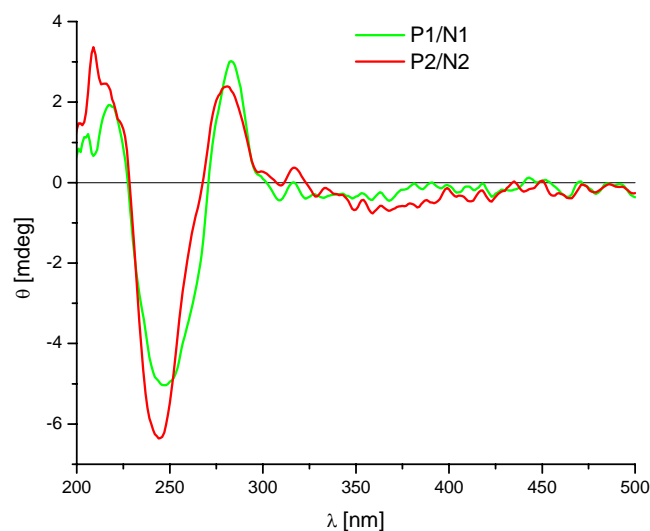


Abb.3-22: CD- Spektrum von Ptz-dU-markierten DNA-Duplexen. 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl.

Das CD-Spektrum der Ptz-dU-markierten Duplexe zeigt einen positiven *Cotton*-Effekt zwischen $300 \text{ nm} > \lambda > 270 \text{ nm}$ und eine negative Bande zwischen $270 \text{ nm} > \lambda > 230 \text{ nm}$. Eine solche Struktur deutet auf eine B-DNA-Konformation^[149] hin, wenn auch der Punkt des Nulldurchgangs bei $\lambda = 270 \text{ nm}$ etwas ins Langwellige verschoben ist. Im Wellenlängenbereich, der der Absorption von Phenothiazin zuzuordnen ist, wird nur ein geringer *Cotton*-Effekt festgestellt. Die Inkorporation von Ptz-dU in DNA-Oligonukleotide führt zu DNA-Duplexen, die hauptsächlich die native B-DNA-Konformation einnehmen.

Weitere Sequenzen wurden synthetisiert, um Aussagen über den Einfluß der strukturellen Störung von Ptz-dU (2) auf den Duplex zu treffen. Aufgrund der in der Nukleosidfunktion enthaltenen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren ist Ptz-dU, im Gegensatz zu nicht-nukleosidischen Elektronendonoren, prinzipiell in der Lage eine Watson-Crick-Basenpaarung einzugehen. Allerdings konnte im Falle des analogen Pyren-dU beobachtet werden, dass diese Basenpaarung nicht unbedingt ausgebildet wird. Obwohl das Py-dU-Nukleosid, wie eine natürliche Base, in der anti-Konformation vorliegt^[17], gibt es Hinweise dass in Oligonukleotiden die syn-Konformation bevorzugt sein könnte.

Die Schmelztemperatur von Ptz-dU-markierten Oligonukleotiden gibt Aufschluss über die bevorzugte Gegenbase von Ptz-dU. Nur wenn Ptz-dU im DNA-Duplex in der anti-Konformation vorliegt, kann eine Basenpaarung zwischen Ptz-dU und Adenosin ausgebildet werden. Die Schmelztemperatur dieses Duplexes sollte damit höher liegen als die Schmelztemperaturen von Duplexen, in denen Ptz-dU mit der gegenüberliegenden Base keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann.

P1:	5'—TCA GTC AT^P TAC TGA CT—3'
N3:	5'—TCA GTC ATC TAC TGA CT—3'
N4:	5'—TCA GTC ATT TAC TGA CT—3'
N1	3'—AGT CAG TAA ATG ACT GA—5'
N5:	3'—AGT CAG TAC ATG ACT GA—5'
N6:	3'—AGT CAG TAG ATG ACT GA—5'
N7:	3'—AGT CAG TAT ATG ACT GA—5'
O1:	3'—AGT CAG TA^O ATG ACT GA—5'

Die DNA-Sequenzen P1, N1, N3-N7 und O1 dienen zur Untersuchung der Schmelztemperaturen von Ptz-dU-markierten DNA-Duplexen. Die Ptz-dU flankierenden Basen bleiben ebenso wie deren Gegenbasen unverändert. Als Gegenbase zu Ptz-dU werden alle vier natürlichen DNA-Basen sowie die abasische Stelle (O) eingesetzt. Zusätzlich ist in den Sequenzen N3 und N4 an Stelle von Ptz-dU ein C bzw. T eingesetzt, um einen unmodifizierten Duplex als Vergleich gebrauchen zu können, welcher zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet.

Die Duplexe P1/N1, P1/N5, P1/N6, P1/N7, P1/O1, N3/N6 und N4/N1 werden hybridisiert und die Absorption bei $\lambda = 260$ nm wird in Abhängigkeit von der Temperatur aufgenommen. Trägt man die Absorption gegen die Temperatur auf, ist ein sigmoidaler Verlauf der resultierenden Kurve typisch für die Dissoziation des DNA-Duplex. Den Wert an der Stelle der größten Steigung dieser Kurve bestimmt man als Schmelztemperatur des DNA-Duplexes. Zur einfacheren Ermittlung der Schmelztemperaturen wird die Ableitung der Schmelzkurve aufgetragen, das Maximum der resultierenden Funktion entspricht dann der Schmelztemperatur.

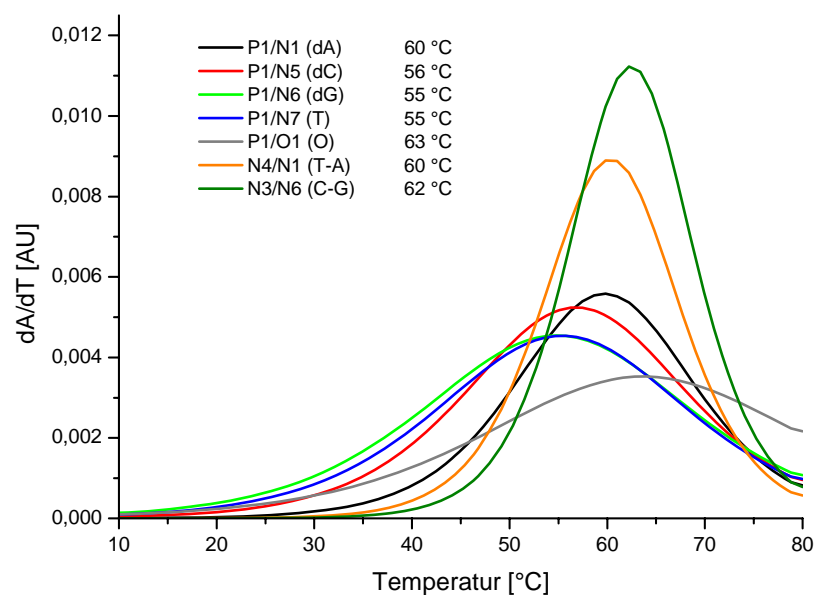


Abb.3-23: Ableitung der temperaturabhängigen Absorptionskurven für Ptz-dU-modifizierte Duplexe und Vergleichsduplexe. 2.6 μ M DNA in 10 mM NaP_i-Puffer, 250 mM NaCl, $\lambda = 260$ nm, 10→80 °C.

Die unmodifizierten Duplexe N3/N6 und N4/N1 zeigen die höchsten Schmelztemperaturen. Die schmale Form der Ableitungsfunktion und der hohe Absolutwert des Maximums zeigen, dass die Dissoziation des Duplexes in einem schmalen Temperaturbereich stattfindet. Erwartungsgemäß dissoziiert der unmodifizierte Duplex N3/N6 mit G-C-Paar bei höherer Temperatur als der A-T-haltige Duplex N4/N1. Im Vergleich zu den unmodifizierten Duplexen sind die Ableitungen der übrigen Schmelzkurven breiter und die Maxima liegen niedriger, der Schmelzbereich ist damit diffuser.

Die Gegenbase dA zu Ptz-dU ergibt eine höhere Schmelztemperatur als die übrigen natürlichen Nukleobasen. Der Duplex P1/N1 dissoziiert bei der gleichen Temperatur wie ein

unmodifizierter Duplex N4/N1. Gleichzeitig liegen die Schmelztemperaturen der Ptz-dU-modifizierten Duplexe P1/N5, P1/N6 und P1/N7 deutlich niedriger, so dass dA als Gegenbase am stärksten zur Stabilisierung des Duplexes beiträgt. Eine schwache Wechselwirkung zwischen Ptz-dU und dC kann vermutet werden, da die Schmelztemperatur von P1/N5 etwas höher liegt als die Schmelztemperaturen von P1/N6 und P1/N7.

Einen Sonderfall stellt P1/O1 dar: der Einbau einer abasischen Stelle als Gegenbase resultiert in einem sehr breiten Schmelzbereich und die Schmelztemperatur liegt mit 63 °C ungewöhnlich hoch. Der Raumanspruch der abasischen Stelle ist geringer als der einer Nukleobase. Eine zumindest partielle Interkalation des Phenothiazins in den Basenstapel dieses Duplexes scheint sehr wahrscheinlich.

Im DNA-Duplex bildet Ptz-dU wie ein natürliches Nukleosid bevorzugt mit der Gegenbase dA eine Basenpaarung aus. Die Schmelztemperatur von Ptz-dU-modifizierter DNA mit dA als Gegenbase unterscheidet sich nicht von der vergleichbarer unmodifizierter DNA. Andere Gegenbasen zum Ptz-dU bewirken eine Destabilisierung, die Schmelztemperaturen der Duplexe sind um 4-5 °C geringer.

Die Spektren der zeitaufgelösten transienten Absorption der Duplexe P1/N1 und P2/N2 zeigen, dass innerhalb weniger hundert Femtosekunden nach Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm eine breite Absorptionsbande anwächst. Diese erstreckt sich von $\lambda = 350$ nm bis über $\lambda > 750$ nm. Ein Maximum dieser Absorption ist bei $\lambda = 450$ nm erkennbar. Die Lebenszeit dieses Zustandes ist ungewöhnlich lang: nach 1,5 ns ist die Absorption nicht wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen. Vermutlich entstehen langlebige Tripletzustände und/ oder eine photochemische Zerstörung des Chromophors tritt ein. Das durch Belichtung im Sauren entstehende 5-(10-Methyl-5-oxo-phenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**12**) zeigt abweichende Absorptionseigenschaften, somit ist eine Oxidation am Schwefel als Folgereaktion wahrscheinlich auszuschließen. Auch das in der Radikalspektroskopie von Ptz-dU (**2**) zu beobachtende Reaktionsprodukt zeigt deutlich abweichende Absorptionseigenschaften und ist mit dem Befund der zeitaufgelösten Messungen nicht in Einklang zu bringen.

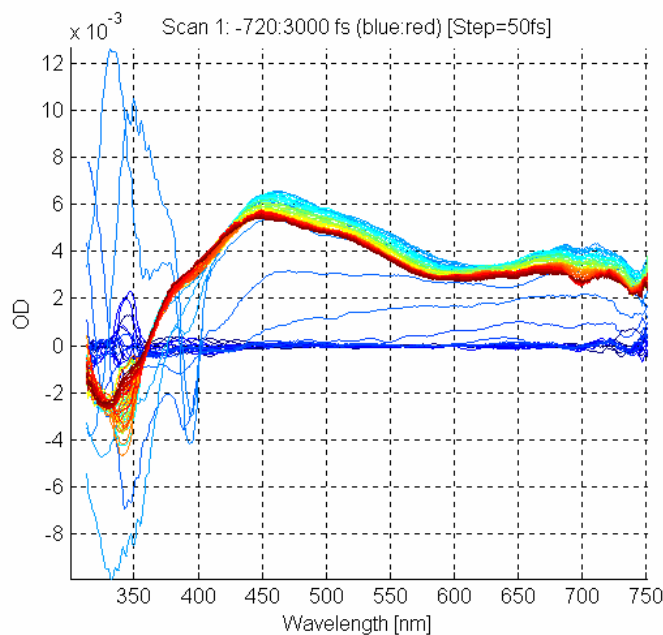


Abb.3-24: Zeitaufgelöste Absorptionsmessung von Duplex P2/N2. Das Zeitfenster verläuft in Schritten von 50 fs von -720 fs (blau) bis 3 000 fs (rot), $\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm.

Die Bildung des DNA-Duplexes verstärkt die Fluoreszenzintensität der Sequenz P1 deutlich mehr als die der Sequenz P2. Um ein vollständiges Bild der Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Basensequenz zu erhalten, wurden die DNA-Oligonukleotide P10, P11, P15, P16 und die komplementären Gegenstränge N10, N11, N15, N16 untersucht. In diesen Sequenzen wird die Umgebung des Ladungsdonors variiert, P10-P16 enthalten 5-Brom-2'-desoxyuridin (Q) als Ladungsakzeptor (vgl. Kap 3.2.4).

P1: 5'—TCA GTC **ATP** TAC TGA CT—3'

P2: 5'—CAG TCA **TAP** ATA CTG AC—3'

P10: 5'—TCA GTC **APT** TQT ACT GAC—3'

P11: 5'—TCA GTC **APC** CQT ACT GAC—3'

P15: 5'—TCA GTC ATQ **TTP** ACT GAC—3'

P16: 5'—TCA GTC ATQ **CCP** ACT GAC—3'

Von diesen Oligonukleotiden wurden die Fluoreszenzspektren der einzel- und doppelsträngigen DNA aufgenommen. Als Anregungswellenlänge diente das Maximum der Anregungsspektren bei $\lambda = 340$ nm.

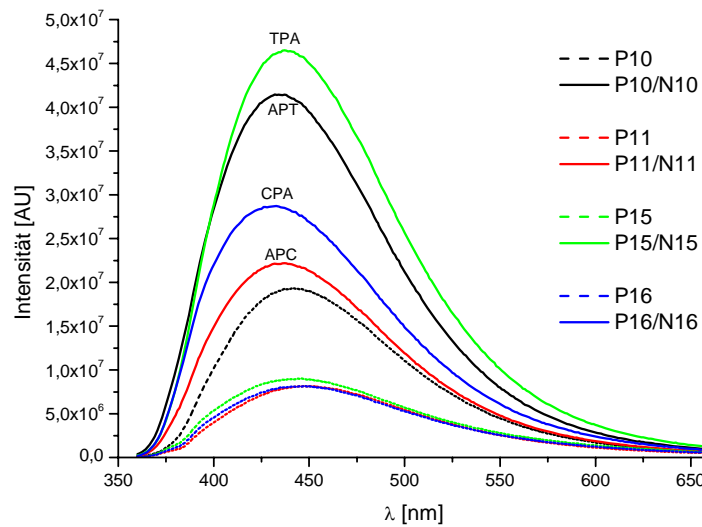


Abb.3-25: Absorptionskorrigierte Fluoreszenzspektren von Ptz-dU-modifizierten DNA-Einzel- und Doppelsträngen. 12.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm.

In allen DNA-Duplexen wird die Fluoreszenz gegenüber dem Einzelstrang verstärkt. Die Fluoreszenzintensität bleibt sehr gering, in alle Duplexe wird mit hoher Effizienz eine Ladung injiziert. Eine Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und der Effizienz des Ladungstransfers kann nicht festgestellt werden.

3.2.4 Untersuchungen zum Elektronentransfer

Experimente von *Rokita et al.* mit einem Naphtalendiimid (**Nd**) als Ladungsdonor und 5-Brom-2'-desoxyuridin (Br-dU) als Ladungsakzeptor zeigten eine Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers durch DNA.^[68, 69] Die Ladung wird über A-T-Paare schneller transportiert als über G-C-Paare. Dem widersprachen von *Carell et al.* durchgeführte Untersuchungen, nach denen die Effizienz des Elektronentransfers von einem Flavinderivat (**Fl**) auf ein Thyminidimer (**T[^]T**) sequenzunabhängig ist.^[80, 220]

In dem hier vorgestellten Experiment soll die Abhängigkeit des Elektronentransfers von der Distanz, der Basensequenz und der Richtung untersucht werden. Die Distanz zwischen Ladungsdonor und -akzeptor wurde von einem bis zu drei dazwischenliegenden Basenpaaren variiert. Diese Basenpaare bestehen entweder aus T-A- oder C-G-Paaren, um eine Abhängigkeit von der Basensequenz aufzuzeigen. Der Ladungsdonor wird sowohl in Richtung des 5'-Terminus als auch des 3'-Terminus vom Akzeptor platziert, um einen Richtungseinfluss zu untersuchen.

In die Sequenzen P8/N8-P14/N14 wurde 5-Brom-2'-desoxyuridin^[221-224] (**Q**) als Elektronenakzeptor zusammen mit dem Elektronendonator Ptz-dU (**P**) eingebaut. Ladungsdonor und -akzeptor sind durch 1-3 T-A-Paare bzw. 1-3 C-G-Paare getrennt. Der Ladungsdonor ist näher zum 5'-Terminus des Oligonukleotids, der Elektronenakzeptor näher zum 3'-Terminus lokalisiert. Die Sequenz des Oligonukleotids P14 ist spiegelsymmetrisch zu P12, das heisst die in 5'-3'-Richtung verlaufende Basensequenz von P12 verläuft in P14 in 3'-5'-Richtung.

P8:	5'—TCA GTC APT QTA CTG ACT—3'
N8:	3'—AGT CAG TAA AAT GAC TGA—5'
P9:	5'—TCA GTC APC QTA CTG ACT—3'
N9:	3'—AGT CAG TAG AAT GAC TGA—5'
P10:	5'—TCA GTC APT TQT ACT GAC—3'
N10:	3'—AGT CAG TAA AAA TGA CTG—5'
P11:	5'—TCA GTC APC CQT ACT GAC—3'
N11:	3'—AGT CAG TAG GAA TGA CTG—5'
P12:	5'—CAG TCA PTT TQT ACT GAC—3'
N12:	3'—GTC AGT AAA AAA TGA CTG—5'
P13:	5'—CAG TCA PCC CQT ACT GAC—3'
N13:	3'—GTC AGT AGG GAA TGA CTG—5'
P14:	5'—CAG TCA TQT TTP ACT GAC—3'
N14:	3'—GTC AGT AAA AAA TGA CTG—5'

Wird das Phosphoramidit von 5-Brom-2'-desoxyuridin eingebaut, so kann dies unter den Standardbedingungen der Synthese erfolgen. Aufgrund der Empfindlichkeit des Nukleosids gegen die Standardbedingungen der Abspaltung und Entschützung wurden die Oligonukleotide bei Raumtemperatur in wässriger 25%iger Ammoniaklösung über 36 h aufgearbeitet.

Das kommerziell als vollständig geschützter DNA-Baustein erhältliche 5-Brom-2'-desoxyuridin ist bereits mehrfach zur Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers in DNA eingesetzt worden.^[68, 69] Nach der Aufnahme eines Elektrons verlässt ein Bromidion das Molekül und ein Neutralradikal bleibt zurück, welches unter Baseneinfluss einen Bruch des DNA-Stranges induziert. Der unmarkierte Gegenstrang bleibt erhalten.

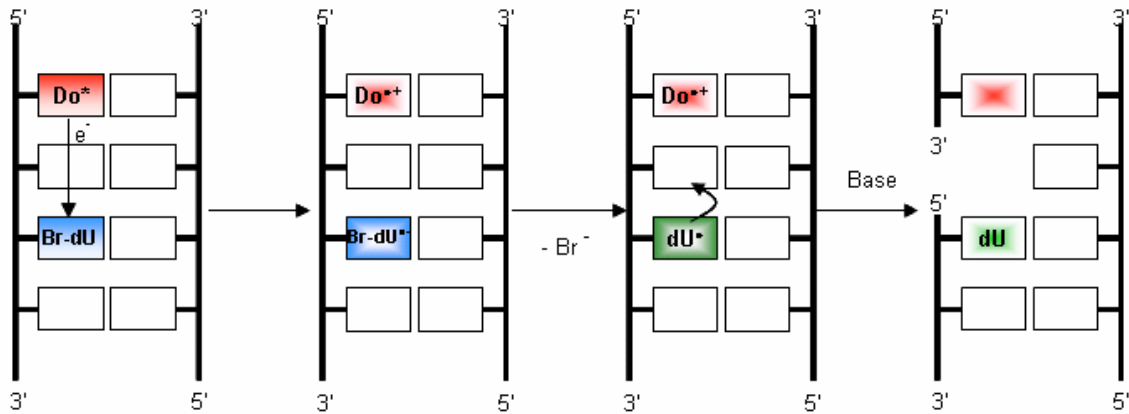


Abb.3-26: Schema der zu einem Strangbruch führenden Vorgänge in einem modifizierten DNA-Duplex. Do = Elektronendonator.

Lösungen der DNA-Duplexe P8/N8-P14/N14 wurden mit dem Licht einer Xenonlampe 1 h lang bestrahlt. Wellenlängen $\lambda < 305$ nm wurden herausgefiltert, um selektiv das Phenothiazinsystem anzuregen und die photochemische Zerstörung von Br-dU durch kurzwellige Strahlung $\lambda < 290$ nm zu verhindern.^[221, 222, 225] Während der Bestrahlung wurden in regelmäßigen Abständen geringe Mengen der DNA-Lösung entnommen, mit Piperidin bei 90 °C behandelt und mittels HPLC analysiert. Die Signalstärke des unmarkierten Gegenstranges wurde als interne Referenz für die Menge des noch vorhandenen markierten Stranges herangezogen.^[16]

Das Kontrollexperiment der Bestrahlung des DNA-Duplexes P1/N1 unter identischen Bedingungen zeigte, dass ein Phenothiazin-modifizierter DNA-Duplex ausreichend lange gegen die Versuchsbedingungen stabil ist. Phenothiazinderivate induzieren bei Bestrahlung auch in Abwesenheit von Br-dU DNA-Strangbrüche.^[226-228] In diesem Experiment ist während 18 h keine Veränderung des DNA-Duplexes festzustellen, nach 5 d ist jedoch kein intakter Duplex mehr vorhanden. Da die Bestrahlung Br-dU-haltiger Duplexe nur 1 h andauert kann innerhalb dieser Zeit eine DNA-Schädigung durch Phenothiazin allein vernachlässigt werden.

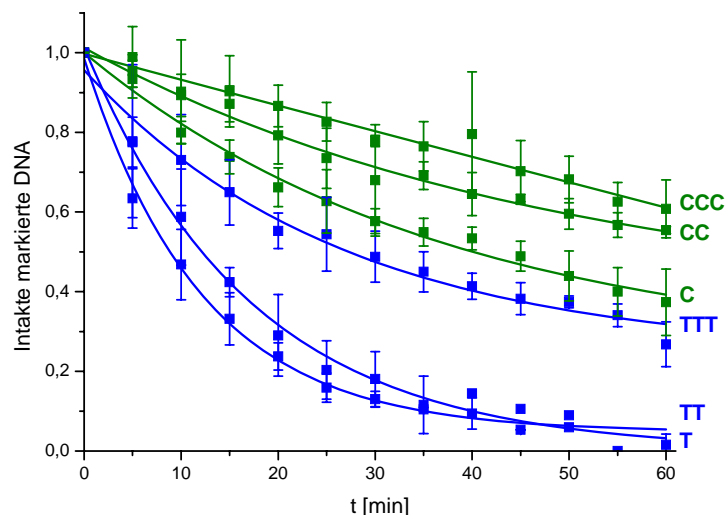


Abb.3-27: Bestrahlungsreihe der Duplexe P8/N8 – P13/N13, Mittelwert aus drei Messreihen. Aufgetragen ist das Verhältnis von intakter markierter DNA zu unmarkiertem Gegenstrang gegen die Belichtungszeit, neben dem Graphen die Sequenz der Donor und Akzeptor separierenden Nukleobasen.

Man erkennt, dass die Menge der markierten DNA in allen Duplexen kontinuierlich abnimmt. Die Geschwindigkeit dieser Abnahme ist abhängig von der Anzahl und Art der Basenpaare zwischen dem Elektronendonator Ptz-dU und dem Akzeptor Br-dU.

Während kein nennenswerter Unterschied zwischen einem und zwei separierenden T-A-Paaren festzustellen ist, wird der Ladungstransfer deutlich ineffizienter, wenn ein drittes T-A-Paar zu überbrücken ist. Sind Ladungsdonor und -akzeptor durch C-G-Paare getrennt, wird der Einfluss der Anzahl der Basenpaare noch deutlicher.

Der reduktive Ladungstransfer ist also distanzabhängig, aufgrund des Versuchsaufbaus können aber keine Geschwindigkeiten oder Raten angegeben werden. Im Vergleich mit ähnlichen Versuchen, die ein $T^{\wedge}T$ -Dimer^[80, 220] als Ladungsakzeptor einsetzten, erkennt man die Distanzabhängigkeit nur bei Verwendung von Brom-dU.^[68, 69] Diese Beobachtung lässt sich anhand der Reaktionsgeschwindigkeiten der Elektronenakzeptoren erklären. Während die Abspaltung des Bromidions aus Brom-dU mit einer Ratenkonstante von $\sim 10^{10} \text{ s}^{-1}$ erfolgt^[84], benötigt die Cycloreversion des $T^{\wedge}T$ -Dimers erheblich länger ($k \approx 10^6 \text{ s}^{-1}$)^[82, 83] und vermag Unterschiede im schneller verlaufenden Prozess des Elektronentransfers nicht aufzulösen. Die Ratenkonstante des Elektronen-Hoppings wird im Bereich zwischen 10^8 und 10^9 s^{-1} geschätzt.

Vergleicht man die Art der Basen, welche die Sequenz zwischen Donor und Akzeptor aufbauen, so stellt man gravierende Unterschiede fest. Der Elektronentransfer über T-A-Paare ist wesentlich effizienter als über C-G-Paare, so dass die Transfereffizienz über ein C-G-Paar ähnlich mit der über drei T-A-Paare ist. Die Reduktionspotentiale beider Nukleobasen sind so wenig unterschiedlich, dass die deutliche Abweichung in der Elektronentransfereffizienz damit nicht begründet werden kann. Eine alternative Erklärung liefert eine gekoppelte Protonenwanderung: Der intermediär auftretende Ladungsträger $C^{\bullet-}$ wird - wahrscheinlich durch das gegenüberliegende Guanin - protoniert. Eine vergleichbare Protonierung des Thymin-Radikalanions findet nicht statt. Für das protonierte $T(H)^{\bullet-}$ wurde ein pK_S -Wert von 6.9 gemessen.^[219] In wässriger Lösung von Py-dU findet erst ab $pH < 5$ eine Protonierung des Thymin-Radikalanions statt.^[77] In DNA wird ein Thymin-Radikalanion damit nicht protoniert. Angeregtes Ptz-dU (**2**) zeigt ebenfalls unterschiedliche Reaktionswege in Abhängigkeit des pH-Wertes (vgl. Kap. 3.2.1). Untersuchungen an 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxycytidin (Py-dC) postulieren einen pK_S -Wert > 12 für $Py^{*+}\text{-dC(H)}^{\bullet-}$.^[15] Die Protonierung eines Cytidin-Radikalanions durch Guanin ist damit sehr wahrscheinlich. Die resultierende Trennung von Drehimpuls und Ladung in einem $C(H)^{\bullet-}\text{-G(-H)}^-$ -Basenpaar senkt die Effizienz des Ladungstransfers gegenüber dem $T^{\bullet-}\text{-A}$ -Basenpaar

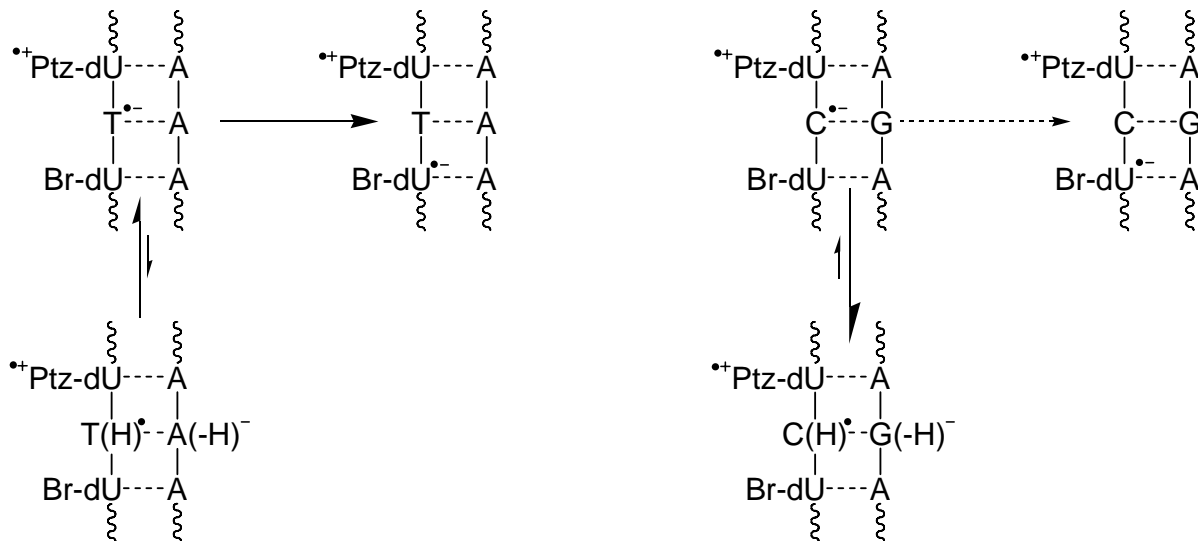


Abb.3-28: Elektronentransfer über A-T-Paare (links) ist effektiver. Über G-C-Paare (rechts) behindert die Protonierung des intermediären Ladungsträgers den Elektronentransfer zum Akzeptor Br-dU.

Am Beispiel der Oligonukleotide P12/N12 und P14/N14 wurde die Richtungsabhängigkeit des Elektronentransfers untersucht. Bisherige Untersuchungen zeigten keine Richtungsabhängigkeit des Ladungstransfers von Flavin (**Fl**) zum Thymindimer ($T^{\bullet-}T$).^[220] Experimente mit Br-dU als Ladungsakzeptor (Donor **Nd**) zeigten dagegen einen Unterschied des Ladungstransfers zwischen $3' \rightarrow 5'$ - und $5' \rightarrow 3'$ -Richtung.^[68, 69] In dem hier vorgestellten

Experiment verläuft der Abbau des markierten Stranges schneller, wenn Ptz-dU näher am 3'-Terminus und Br-dU näher am 5'-Terminus platziert ist. Der Elektronentransport in 3'→5'-Richtung ist damit bevorzugt. Der oxidative Lochtransfer durch DNA zeigt ebenfalls eine Richtungsabhängigkeit, in diesem Fall verläuft der Transport in 5'→3'-Richtung schneller.

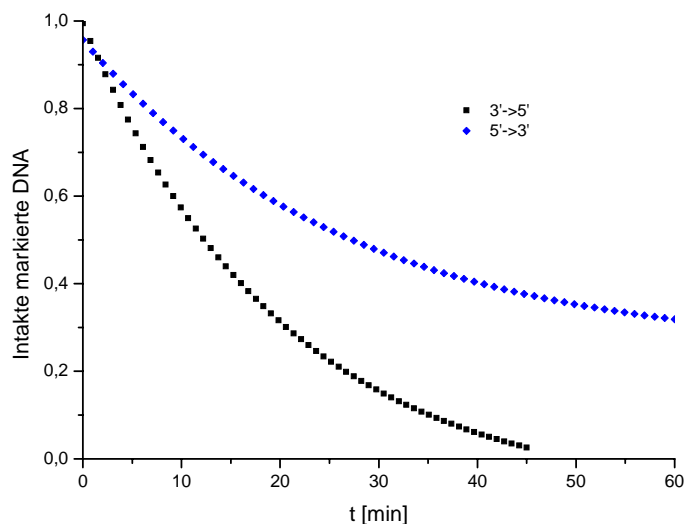


Abb.3-29: Richtungsabhängigkeit des Elektronentransfers: Abbau der DNA- Duplexe P12/N12 (blau) und P14/N14 (schwarz). Der Elektronentransfer in 3'-5'-Richtung (P14/N14) ist effektiver und führt zu schnellerem Abbau des markierten DNA-Stranges P18.

In diesen Experimenten wurde nur der (langsamer verlaufende) Elektronentransfer in 5'→3'-Richtung genauer untersucht, da die Unterschiede zwischen den untersuchten DNA-Sequenzen über das Zeitfenster von 60 Minuten besser darzustellen waren.

Basierend auf diesen Untersuchungen sind die Elektronenakzeptoren Br-dU, 8-Brom-2'-desoxyguanin (Br-dG), 8-Brom-2'-desoxyadenin (Br-dA) und das Thyminidimer (T[^]T) von *Carell et al.* untersucht worden.^[81] Dabei konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Br-dU in der Lage ist, die Sequenz- und Richtungsabhängigkeit des Elektronentransfers durch die DNA darzustellen. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der übrigen drei Akzeptoren sind so gering, dass die Geschwindigkeit der Reaktionssequenz Ladungsinjektion – Ladungstransport – Abfangen der Ladung nur von der Spaltungsgeschwindigkeit des Akzeptors abhängig ist.

3.3 Zusammenfassung

Ein neuartiger Elektronendonator wurde durch Anknüpfung des Phenothiazinsystems an die 5-Position der Nukleobase Uridin synthetisiert und über automatisierte Phosphoramiditmethode

in Oligonukleotide eingebaut. Das modifizierte Nukleosid stört die B-DNA-Konformation nicht und paart wie unmodifiziertes dU bevorzugt mit dA.

Die spektroskopischen Untersuchungen ergeben, dass Ptz-dU nicht als Kombination zweier voneinander unabhängiger Chromophore anzusehen ist. Sowohl die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften sind von denen des 10-Methylphenothiazins verschieden, wie auch das elektrochemische Verhalten von der Erwartung abweicht. Die Absorptionseigenschaften des Radikalkations unterscheiden sich deutlich vom Phenothiazin-Radikalkation.

Das System kann photochemisch selektiv angeregt werden und ist in der Lage ein Elektron in die DNA zu injizieren. In Kombination mit 5-Brom-dU bildet Ptz-dU ein chemisches Nachweissystem für den reduktiven Elektronentransfer durch DNA.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Elektronentransfer bestätigen die von *Rokita et al.* berichteten Beobachtungen. Demnach ist der Elektronentransfer durch DNA sowohl von der Richtung wie auch von der Basensequenz abhängig. Überschusselektronen werden von Pyrimidinbasen transportiert, der Transport über Thymin ist effektiver als über Cytidin. Die unterschiedliche Basizität ihrer Radikalanionen beeinflusst die Eignung der Pyrimidinbasen als Ladungsträger. Bevorzugt ist ein Elektronentransfer in 3'→5'-Richtung.

Zur Durchführung von zeitaufgelöster transientser Absorptionsspektroskopie ist Ptz-dU sowohl als Nukleosid wie auch in DNA nicht geeignet. Auf Grund von photochemischen Nebenreaktionen können keine Reaktionsraten bestimmt werden.

4 Synthese eines nicht-nukleosidischen Elektronendonors

Die Anknüpfung des Elektronendonors an die Nukleobase hat den Nachteil, dass durch die starke elektronische Kopplung über die C-C-Bindung die photochemischen Eigenschaften der Nukleobase als auch des Chromophors verändert werden. Im Falle des Ptz-dU (**2**) kann man wie gezeigt nicht mehr davon ausgehen, dass ein Phenothiazin-Radikalkation und ein Uracil-Radikalanion klar voneinander abgegrenzt vorliegen. Durch die Wechselwirkung des Donors mit der Nukleobase verändern sich die spektroskopischen Eigenschaften, besonders die charakteristische Absorption des Phenothiazin-Radikalkations bei 512 nm^[139, 201-203] wird nicht mehr beobachtet. So wurde eine Möglichkeit gesucht, den Elektronendonor in der DNA zu platzieren, ohne dabei das Donorsystem mehr als notwendig zu verändern. In zahlreichen Experimenten wurde das über eine Amid- oder Phosphorsäureesterbindung an ein DNA-Oligonukleotid gebundene 10-Propionyl-Phenothiazin zur Untersuchung des oxidativen Lochtransfers verwendet.^[139, 196-199, 229] In dieser Arbeit soll der Einbau in das Oligonukleotid aber nicht nur auf die 5'-terminale Position beschränkt bleiben. Aus diesem Grund wird ein als Nukleosidanalogen fungierender, auf (S)-Aminopropan-2,3-diol basierender Linker^[18, 19, 163] eingesetzt. Dieser Linker ist bereits mit der zur DNA-Synthese notwendigen Dimethoxytrityl-Schutzgruppe versehen und kann durch Alkylierung der Aminogruppe mit einem Elektronendonor verknüpft werden. Es ist davon auszugehen, dass der Elektronendonor keine Watson-Crick-Basenpaarung ausbildet, sondern nur über hydrophobe Wechselwirkungen zur Stabilisierung des DNA-Duplexes beitragen kann.

4.1 Synthese von *10-(3-((S)-2,3-Dihydroxyprop-1-yl)-aminoprop-1-yl)-phenothiazin (3)*

Die Verknüpfung des Phenothiazinsystems mit dem Nukleosidanalogen sollte analog zur Vorgehensweise beim Ethidium^[18, 19] über eine Propylgruppe erfolgen. Das Standardprotokoll für die Alkylierung von Phenothiazin mit Alkylhalogeniden verwendet Kalium-*tert.*-butylat als Base in Tetrahydrofuran. Beim Einsatz von Dihalogenalkanen^[230, 231] tritt als Nebenreaktion die Eliminierung von Halogenwasserstoff zum Allylhalogenid auf, so dass neben dem gewünschten Produkt **15** große Mengen des Nebenproduktes 10-(2-Propen-1-yl)-phenothiazin **16** entstehen. Durch Veränderung der Reaktionsbedingungen konnte die Bildung des Nebenproduktes zurückgedrängt, aber nicht vollständig verhindert werden.

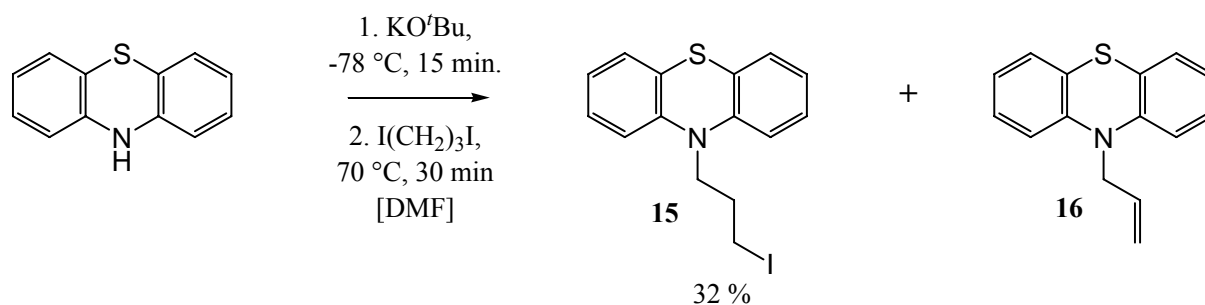


Abb.4-1: Alkylierung von Phenothiazin mit Diiodpropan.

Die größte Ausbeute des erwünschten Produktes (**15**) wurde mit Kalium-*tert.*-butylat in Dimethylformamid erreicht. Phenothiazin wurde in DMF mit einer stöchiometrischen Menge Kalium-*tert.*-butylat deprotoniert und mit einem großen Überschuss 1,3-Dibrompropan versetzt. Aufgrund des großen Überschusses (3 eq.) des Alkylierungsmittels wurde eine Mehrfachalkylierung von Diiodpropan zu 1,3-Di-(Phenothiazin-10-yl)-propan nicht beobachtet. Die quantitative Abtrennung von 10-(2-Propen-1-yl)-phenothiazin **16** durch chromatographische Verfahren ist sehr aufwändig, aufgrund der Inertheit des Nebenproduktes im nächsten Reaktionsschritt aber nicht notwendig.

Eine Alternative zur Alkylierung mit Dihalogenalkanen ist die Verwendung eines Nukleophils, welches die Konkurrenzreaktion der Eliminierung nicht eingehen kann, aber dennoch zur Alkylierung am Aminopropandiollinker befähigt ist. Dazu bietet sich die Einführung einer Propanolyl-Gruppierung an, deren Hydroxyfunktion in ein Halogenid oder Pseudohalogenid umgewandelt werden kann. Die direkte Alkylierung von Phenothiazin mit 3-Brompropanol steht unter stark alkalischen Reaktionsbedingungen in Konkurrenz zur Polymerisation des halogenierten Alkohols zu Polypropylglycolen. Die Hydroxygruppe sollte deswegen mit einer basenstabilen, einfach handhabbaren Schutzgruppe blockiert werden. TBDMS^[232] ist ausreichend stabil gegen Base und kann wie alle gebräuchlichen Silylschutzgruppen mit Fluorid einfach entfernt werden. In Gegenwart von Triethylamin wird mit käuflichem TBDMS-Chlorid die DMAP-vermittelte Silylierung von 3-Brompropanol in Ether durchgeführt, nach 18 h Reaktionszeit erhält man das Produkt **17** als farblose ölige Flüssigkeit in sehr guten Ausbeuten.^[233]

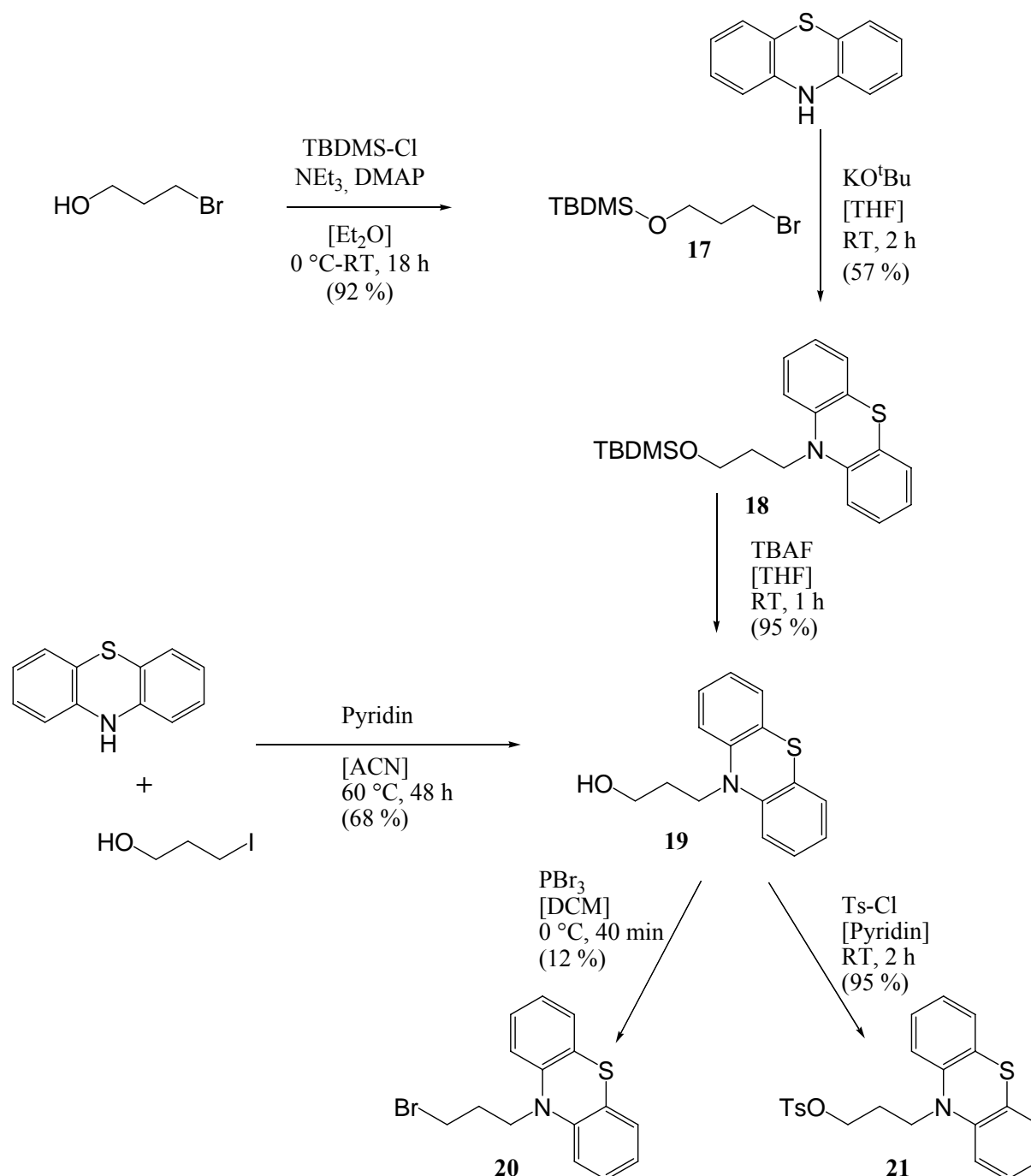


Abb.4-2: Synthesestrategien zur Herstellung der Phenothiazinderivate **20** und **21**.

Die Alkylierung von Phenothiazin mit dem silylierten Brompropanol **17** verläuft in THF, als Base wird Kalium-*tert.*-butylat eingesetzt. Eine Eliminierung von HBr aus dem geschützten Brompropanol **17** ist zwar immer noch möglich, der entstehende (*tert.*-Butyldimethylsilyl)-allylether kann aber im Gegensatz zum Allyliodid nicht mehr am Phenothiazin alkylieren. Das Alkylierungsmittel **17** wird im Überschuss zugegeben um Verluste durch Eliminierung auszugleichen. Die Reaktion ist innerhalb 2 h abgeschlossen, man erhält in guter Ausbeute das Produkt **18** als farblose Flüssigkeit. Die Silylschutzgruppe wird mit einem Überschuss an

Tetrabutylammoniumfluorid entfernt. Die Reaktion zu **19** verläuft in THF und ist innerhalb von 30 Minuten bei RT vollständig. Die Umwandlung des Alkohols **19** in ein Alkylbromid **20** verläuft in Dichlormethan durch Zugabe von Phosphortribromid.^[234] Nach 40 Minuten Reaktionszeit ist das Edukt vollständig umgesetzt. Das Produkt **20** verbleibt in mäßiger Ausbeute als weißes Pulver.

Die Gesamtausbeute dieses Syntheseweges ist nicht zufriedenstellend, als alternative Syntheseroute wurde deswegen die direkte Alkylierung von Phenothiazin mit Iodpropanol zu **19** versucht. Stark basische Reaktionsbedingungen begünstigen die Polymerisation von Brompropanol. Zur Neutralisation des entstehenden Iodwasserstoffs wird Pyridin als milde Base kontinuierlich zugesetzt. Das Produkt **19** verbleibt in guten Ausbeuten.

Die Bromierung von 10-(3-Hydroxypropyl)-phenothiazin **19** zu **20** führt zu unbefriedigenden Ergebnissen. Eine Alternative bietet die Umwandlung der Hydroxygruppe in ein Pseudohalogenid. Als gängige Aktivierungsmethode ist die Bildung eines Sulfonsäureesters wie Tosylat (p-Toluolsulfonsäureester), Triflat (Trifluormethylsulfonsäureester) oder Mesylat (Methylsulfonsäureester) gebräuchlich. Die Tosylierung verläuft mit dem entsprechenden Sulfonsäurechlorid in Pyridin bei RT innerhalb 2 Stunden quantitativ zu **21**.

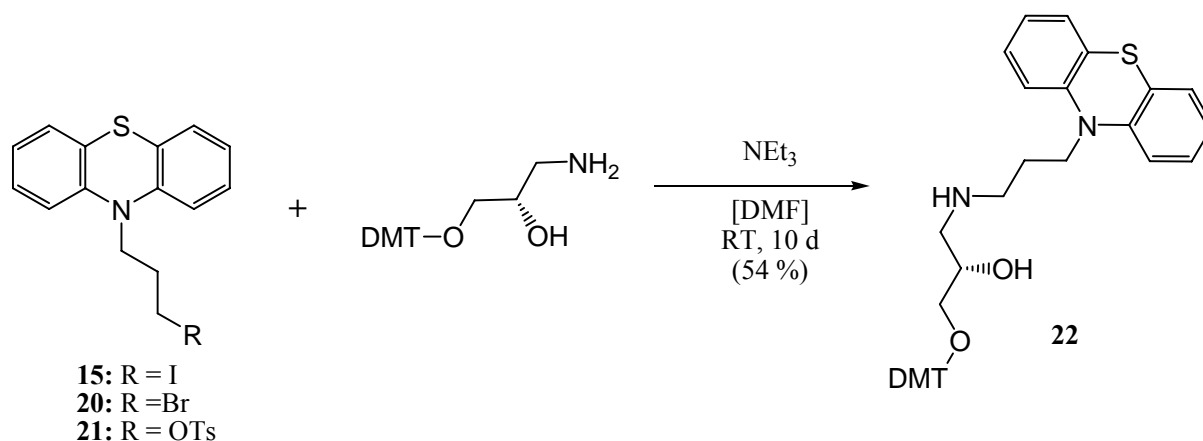


Abb.4-3: Anknüpfung des Aminopropandiollinkers an Phenothiazinderivate **15**, **20** bzw. **21**.

Die nun vorliegenden Alkylhalogenide **15**, **20** bzw. das Pseudohalogenid **21** wurden in analoger Reaktion mit dem Aminopropandiollinker zum Nukleosidanalogon **22** umgesetzt. Diese Reaktion verläuft in Dimethylformamid unter Zusatz von DIPEA zum Abfangen der entstehenden Säure. Sowohl das Iodid **15** wie auch das Bromid **20** sind als Edukte gut geeignet, beim Einsatz von Tosylat **21** muss die Reaktionszeit von 10 auf 14 Tage verlängert werden. Der Aminopropandiollinker wird analog zur Literatur^[18, 19, 163] in einer dreistufigen

Synthese mit der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe versehen. Unter den milden Reaktionsbedingungen wird keine Alkylierung der sekundären Hydroxygruppe beobachtet. Das Produkt **22** wird in guten Ausbeuten als gelbes Pulver erhalten.

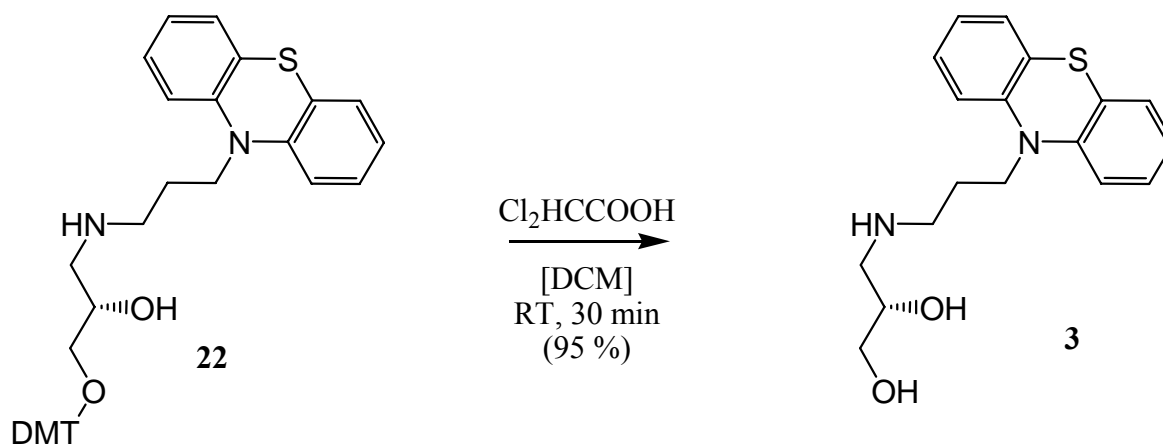


Abb.4-4: Entfernung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe aus **22**.

Zur Charakterisierung des Phenothiazinbausteins **3** ist die Synthese dieser Verbindung im kleinen Maßstab notwendig. Zur Alkylierung von 1-Aminopropan-2,3-diol mit 10-(3-Halogenpropyl-)phenothiazin (**15**, **16**) ist eine Blockade der primären Hydroxyfunktion zum Vermeiden der O-Alkylierung zwingend notwendig. Am einfachsten ist die Synthese des Bausteins **3** aus dem tritylierten DNA-Baustein **22**. Dazu wird, analog zur automatisierten DNA-Synthese, die DMT-Schutzgruppe mit Dichloressigsäure in DCM abgespalten. Nach 30 Minuten Reaktionszeit erhält man **3** in guter Ausbeute als weißes Pulver.

4.2 Spektroskopische Untersuchungen von 10-(3-((S)-2,3-Dihydroxypropyl)-aminopropyl)-phenothiazin (**3**)

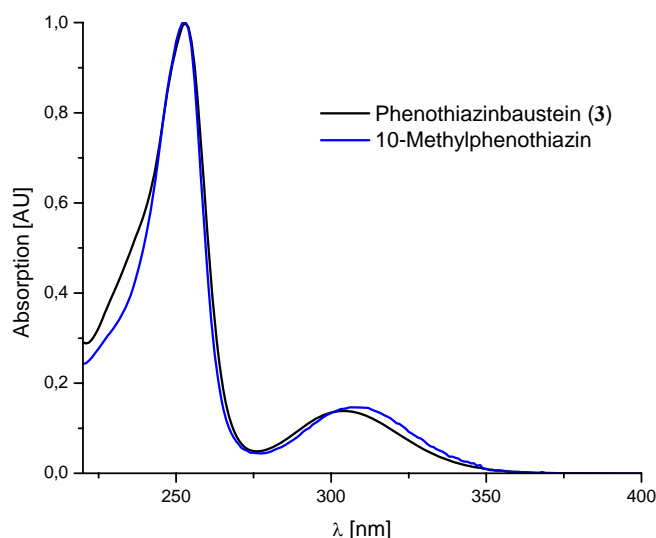


Abb.4-5: Normiertes Absorptionsspektrum des Phenothiazinbausteins **3** im Vergleich zu 10-Methylphenothiazin, jeweils 0.1 mM in Methanol.

Die spektroskopischen Eigenschaften der Phenothiazinmodifikation sind praktisch identisch zu denen von 10-Methylphenothiazin, da der Aminopropandiollinker keine UV/Vis-Absorption zeigt und auch der Einfluss des Linkers auf das Phenothiazinsystem gering ist. Die intensivste Absorption befindet sich mit einem Maximum bei $\lambda = 253$ nm, eine weniger intensive Bande besitzt ein Maximum bei $\lambda = 304$ nm. Der Extinktionskoeffizient des Phenothiazins ist mit $\epsilon_{260} = 7200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ relativ gering. (Zum Vergleich: ϵ_{260} der Nucleobasen liegt zwischen $7300 - 15400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Bei einer für das Phenothiazin charakteristischen und für spektroskopische Untersuchungen geeigneten Absorptionswellenlänge von $\lambda = 315$ nm beträgt der Extinktionskoeffizient nur noch $\sim 1850 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

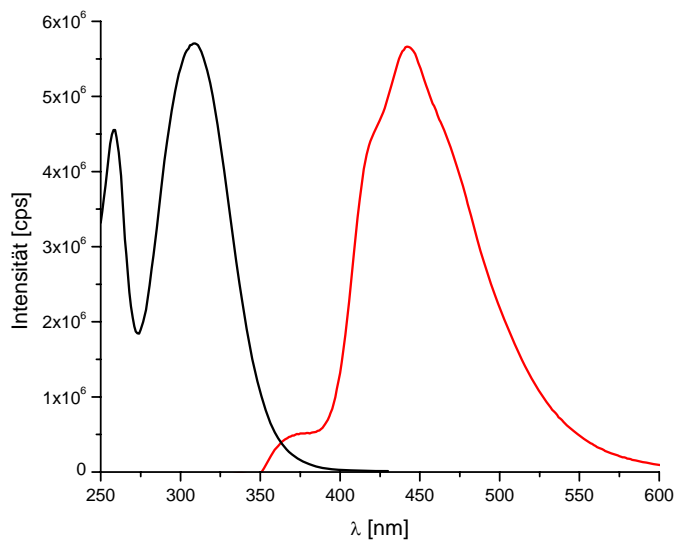


Abb.4-6: Anregungs- (schwarz) und Emissionsspektrum (rot) des Phenothiazinbausteins **3**. 0.1 mM in Methanol, $\lambda_{\text{exc}}=315\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=446\text{ nm}$.

Die Fluoreszenzemission des Phenothiazin-Bausteins (**3**) ist erwartungsgemäß identisch zum Fluoreszenzspektrum von 10-Methylphenothiazin. Der Emissionsbereich erstreckt sich von $350\text{ nm} < \lambda < 600\text{ nm}$ mit einem Maximum bei $\lambda=446\text{ nm}$. Die Fluoreszenzintensität von Phenothiazin ist gering, die Fluoreszenzquantenausbeute liegt bei $\Phi_{\text{F}}=1,3\%$.

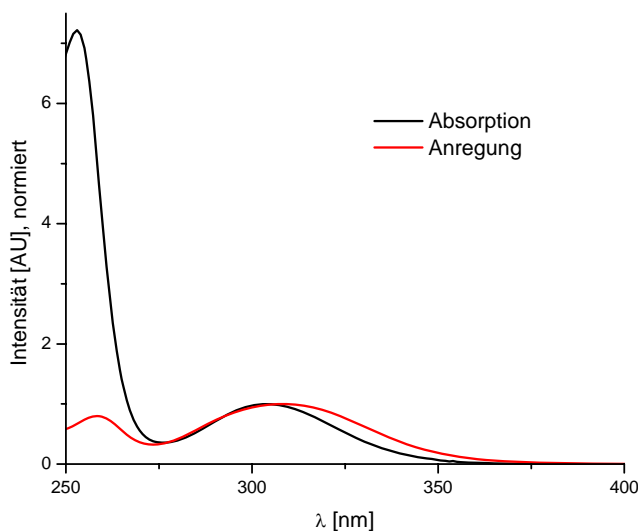


Abb.4-7: Vergleich des Absorptions- und Anregungsspektrums ($\lambda_{\text{em}}=446\text{ nm}$) des Phenothiazinbausteins **3**. 0.1 mM in Methanol. Die Kurven sind auf die Intensität bei $\lambda=304\text{ nm}$ bzw. 309 nm normiert.

Aus dem Anregungsspektrum lässt sich herauslesen, dass die intensive Absorption bei $\lambda=253\text{ nm}$ nur wenig zur Emission beiträgt. Das Anregungsspektrum zeigt die höchste Intensität bei

$\lambda = 309$ nm. Verglichen mit dem Absorptionsspektrum bedeutet dies eine bathochrome Verschiebung des Maximums um 5 nm.

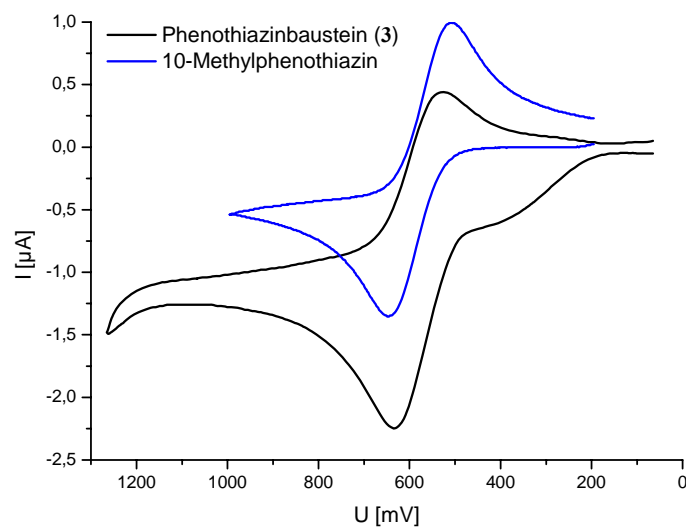


Abb.4-8: Cyclovoltammogramm von **3**. 90 μ M in DCM, Potentiale sind gegen NHE angegeben.

Das Cyclovoltammetrie-Spektrum von **3** gleicht dem Spektrum von 10-Methylphenothiazin. Der Substituent an der 10-Position des Phenothiazins übt keinen Einfluss auf das Reduktionspotential des Phenothiazins aus. Im Grundzustand beträgt das Potential $E(\text{Ptz}/\text{Ptz}^+) \approx 0.58$ V gegen NHE, nach *Rehm-Weller*^[157, 158] ergibt sich ein Reduktionspotential im angeregten Zustand ($\lambda = 446$ nm, $E_{00} = -2.9$ V) von $E(\text{Ptz}^*/\text{Ptz}^+) \approx -2.3$ V. Dieser Betrag reicht aus, um ein Elektron auf Pyrimidinbasen übertragen zu können.

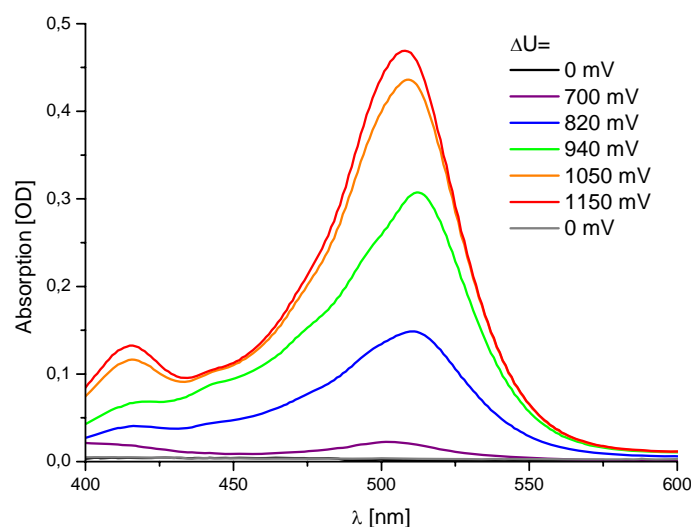


Abb.4-9: Absorptionsspektrum des Radikalkations von **3**. 90 μ M in DCM, die Potentialdifferenz ist gegen einen willkürlich gewählten Nullpunkt angegeben.

Anders als Ptz-dU (**2**) wird das Spektrum des Radikalkations von **3** nicht von weiteren, mit dem Phenothiazin elektronisch koppelnden Chromophoren beeinflusst. Es bildet sich damit das für Phenothiazin charakteristische Absorptionsspektrum des Radikalkations mit dem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 512$ nm heraus. Anhand dieser Absorption kann **3** in der zeitaufgelösten Transientenabsorptionsspektroskopie detektiert werden. Zum Vergleich mit dem Absorptionsspektrum des Radikalkations von 10-Methylphenothiazin siehe Abb.3-13.

4.3 Synthese von Phenothiazin-modifizierter DNA

Synthese von 10-(3-(3-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-(S)-2,3-dihydroxyprop-1-yl)-N-trifluoracetylaminoprop-1-yl)-phenothiazin (**23**)

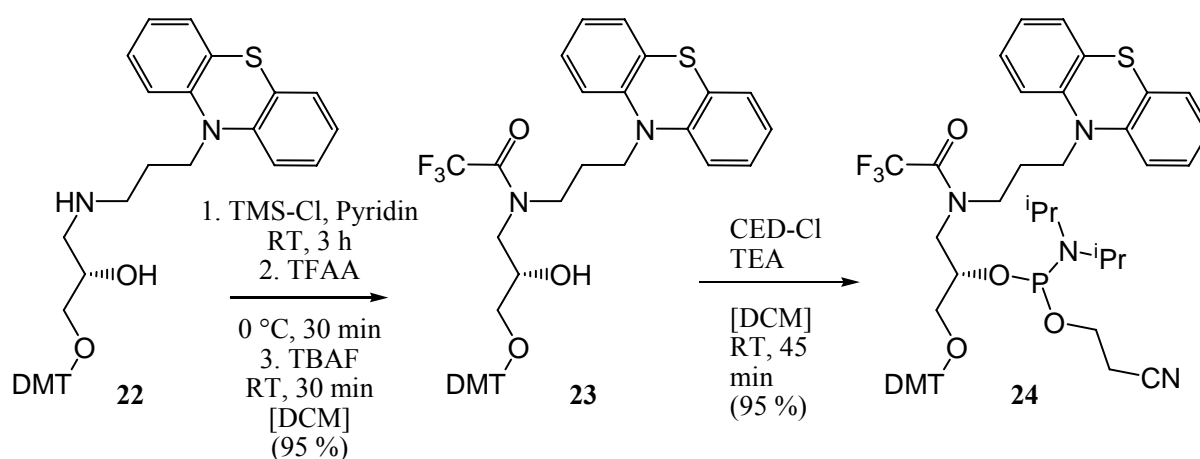


Abb.4-10: Schutz der Aminofunktion von **22** als Trifluoracetylamid (**23**) mit temporärer Silylierung der Hydroxygruppe und Synthese des Phosphoramidits **24**.

Die Umsetzung des Phenothiazinbausteins **22** zum Phosphoramidit und die Inkorporation dessen in DNA-Oligonukleotide führte zu DNA-Strängen, deren Molekülmassen durchgehend zu hohe Werte aufwiesen (MALDI-TOF-MS). Durch ESI-Massenspektrometrie konnte eindeutig eine Acetylierung nachgewiesen werden. Während des *Capping*-Schrittes der DNA-Synthese findet die Acetylierung an der ungeschützten sekundären Aminofunktion statt. Da die Acetylgruppe gegen die Bedingungen der Aufarbeitung stabil ist, muss die Aminofunktion mit einer Schutzgruppe blockiert werden. Während der Phosphoramiditsynthese muss die Schutzgruppe stark basische wasserfreie Bedingungen tolerieren, im DNA-Synthesesyklus gegen stark saure Bedingungen wie auch in Gegenwart von Wasser gegen die schwache Base Pyridin stabil sein. Idealerweise sollte die

Schutzgruppe keine sauren Bedingungen zur Einführung benötigen und in stark basischem wässrigem Milieu abzuspalten sein. Diese Bedingungen werden sämtlich durch die Trifluoracetylgruppe erfüllt. Um selektiv die Aminogruppe des Bausteins **22** zu blockieren, ohne zusätzlich einen Trifluoressigsäureester zu bilden, wurde der Umweg über eine temporäre Silylierung der Hydroxygruppe von **22** gewählt. Die Trimethylsilylgruppe schützt selektiv die Hydroxygruppe und ermöglicht die zur Synthese des Ethidiumbausteins angewendete schwierige partielle Hydrolyse des Trifluoressigsäureesters in Gegenwart von Trifluoressigsäureamiden mit wässriger Hydrogencarbonatlösung^[18, 235] zu umgehen. Zur Einführung der TMS-Gruppe wird das in Dichlormethan gelöste Edukt (**22**) mit Pyridin versetzt und 1 Equivalent Trimethylchlorsilan wird zugesetzt. Man lässt drei Stunden rühren, kühlt auf 0 °C und acyliert mit Trifluoressigsäureanhydrid. Innerhalb 30 Minuten lässt man auf RT kommen und wäscht die Reaktionsmischung zur Entfernung von Trifluoracetaten kurz mit Hydrogencarbonatlösung. Die Abspaltung der Silylgruppe erfolgt im schwach basischen mit Tetrabutylammoniumfluorid. Es verbleibt **23** als gelbe zähe Flüssigkeit in sehr guter Ausbeute, aus welcher der DNA-Baustein hergestellt werden kann.

Die Modifikation von **23** mit der Phosphoramiditgruppe wird aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Produkts **24** unmittelbar vor der DNA-Synthese durchgeführt. Die Herstellung des Phosphoramidits (**24**) verläuft nach Standardverfahren. In einer Lösung in Acetonitril wird das Produkt (**24**) in den DNA-Synthesizer eingesetzt. Die Synthese von Phenothiazin-modifizierter DNA erfolgt am automatischen DNA-Synthesizer nach der Phosphoramiditmethode. Das Kupplungsprotokoll (s. Kap. 11.3) zum Einbau der Phenothiazinmodifikation (**Z**) ist im Vergleich zum Standardverfahren verändert worden, so dass eine Kupplungszeit von 15 Minuten erreicht wird. Trotzdem ist die Ausbeute noch merklich unter der Effizienz eines nukleosidischen Bausteins. Dieser Effekt tritt bei sämtlichen auf dem Aminopropandiol-Linker basierenden Nukleosidanaloga auf.^[164, 235]

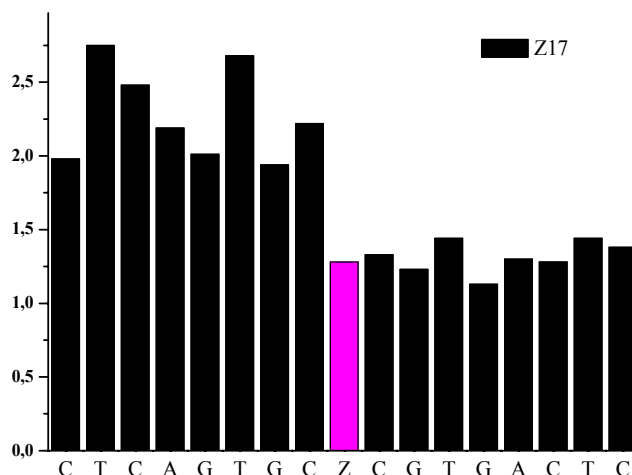
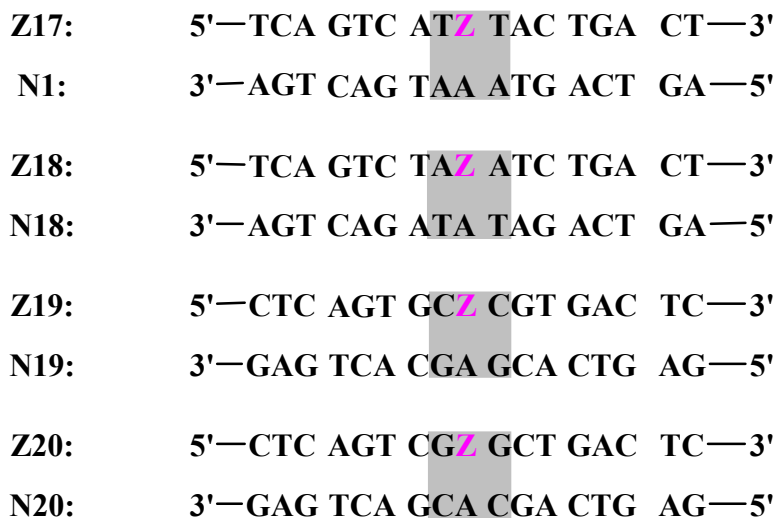


Abb.4-11: Tritylmonitor der Synthese von Phenothiazin-modifizierter DNA Z17.

Die Aufarbeitung der synthetisierten Oligonukleotide erfolgt nach Standardverfahren. Die Reinigung mittels HPLC nutzt die dem Phenothiazin eigene Absorption $\lambda > 300$ nm zur Identifikation der modifizierten Oligonukleotide.

Es wurde eine Serie von modifizierten Oligonukleotiden synthetisiert, mit denen der Einfluss der auf der 3'- und 5'-Seite benachbarten Base auf die spektroskopischen Eigenschaften der Phenothiazin-Modifikation untersucht werden soll. In den Sequenzen Z17-Z20 sind die zum Phenothiazin direkt benachbarten Basen variiert. Die komplementären Gegenstränge werden mit N1, N18-N20 bezeichnet.



4.4 Spektroskopische Untersuchungen von Phenothiazin-modifizierter DNA

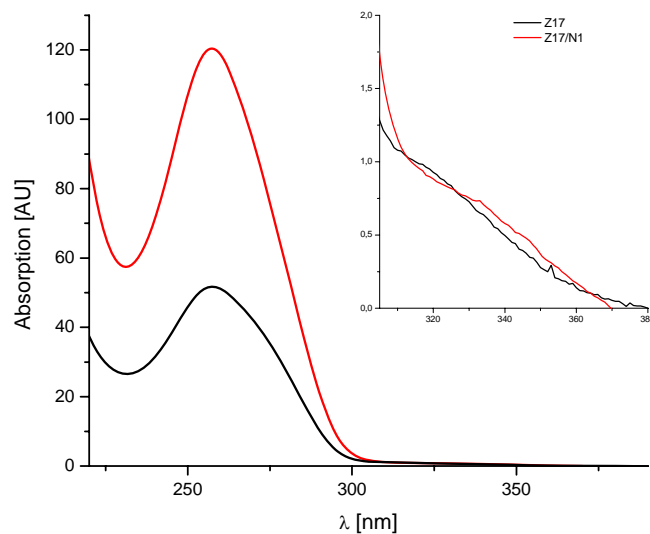


Abb.4-12: Absorptionsspektrum von Phenothiazin-modifiziertem Einzelstrang Z17 und Duplex Z17/N1. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, normiert auf Absorptionswert bei $\lambda = 315$ nm.

Die Absorptionsspektren von einzel- und doppelsträngiger Phenothiazin-modifizierter DNA werden von der Absorption der DNA-Basen bei $\lambda = 260$ nm dominiert. Diese Absorption erstreckt sich bis ca. $\lambda = 300$ nm. Zwischen $300 \text{ nm} < \lambda < 350 \text{ nm}$ ist eine schwache Schulter zu erkennen, die dem Phenothiazin zuzurechnen ist. Im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum des DNA-Bausteins **3** ist das Absorptionsmaximum bei $\lambda = 310$ nm nicht mehr als Maximum zu beobachten. Der Extinktionskoeffizient von Phenothiazin bei $\lambda = 315$ nm ist, verglichen mit dem DNA-Oligonukleotid, sehr klein. Sämtliche Absorptionen des Phenothiazins bei $\lambda < 300$ nm werden von den Nukleobasen überlagert.

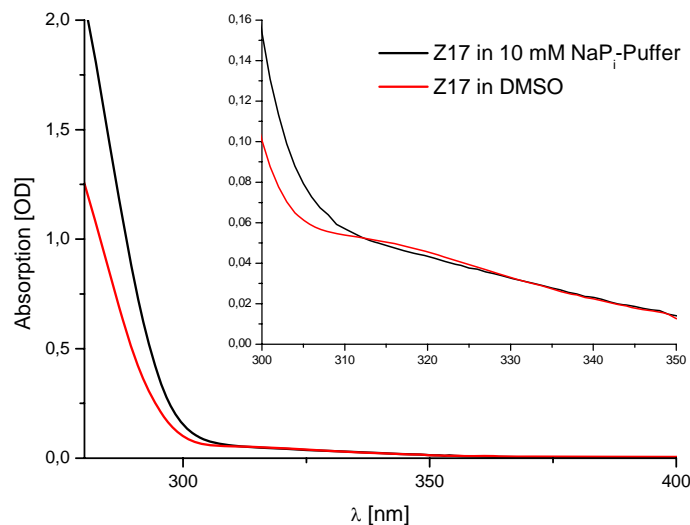


Abb.4-13: Vergleich der Absorptionsspektren von DNA Z17 in Phosphatpuffer und DMSO. 2.5 μ M DNA.

Liegt ein Phenothiazin-modifizierter DNA-Einzelstrang in DMSO gelöst vor, so werden die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Basen aufgehoben.^[236] Man beobachtet im Absorptionsbereich des Phenothiazins keine Veränderung zum Absorptionsspektrum in wässriger Lösung. Das Absorptionsverhalten des Phenothiazins wird durch Wechselwirkung mit benachbarten Basen nicht beeinflusst.

Gegenüber dem DNA-Baustein sinkt die Fluoreszenzquantenausbeute in Phenothiazin-modifizierter DNA noch weiter ab. Der Einzelstrang Z20 ergibt bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm eine Quantenausbeute von $\Phi_{\text{F}} = 0.1$ %. Ein DNA-Duplex Z17/N1 fluoresziert ebenfalls nur sehr schwach, auch hier beträgt $\Phi_{\text{F}} = 0.1$ %. Die geringe Fluoreszenzquantenausbeute behindert die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von Phenothiazin-modifizierter DNA. Da nur noch geringe Restfluoreszenzen vorhanden sind, wirken sich äußere Einflüsse (Streulicht, Rauschen) in extremer Weise aus. Es können nur sehr generelle Aussagen über das Fluoreszenzverhalten getroffen werden, eine Quantifizierung ist nicht möglich.

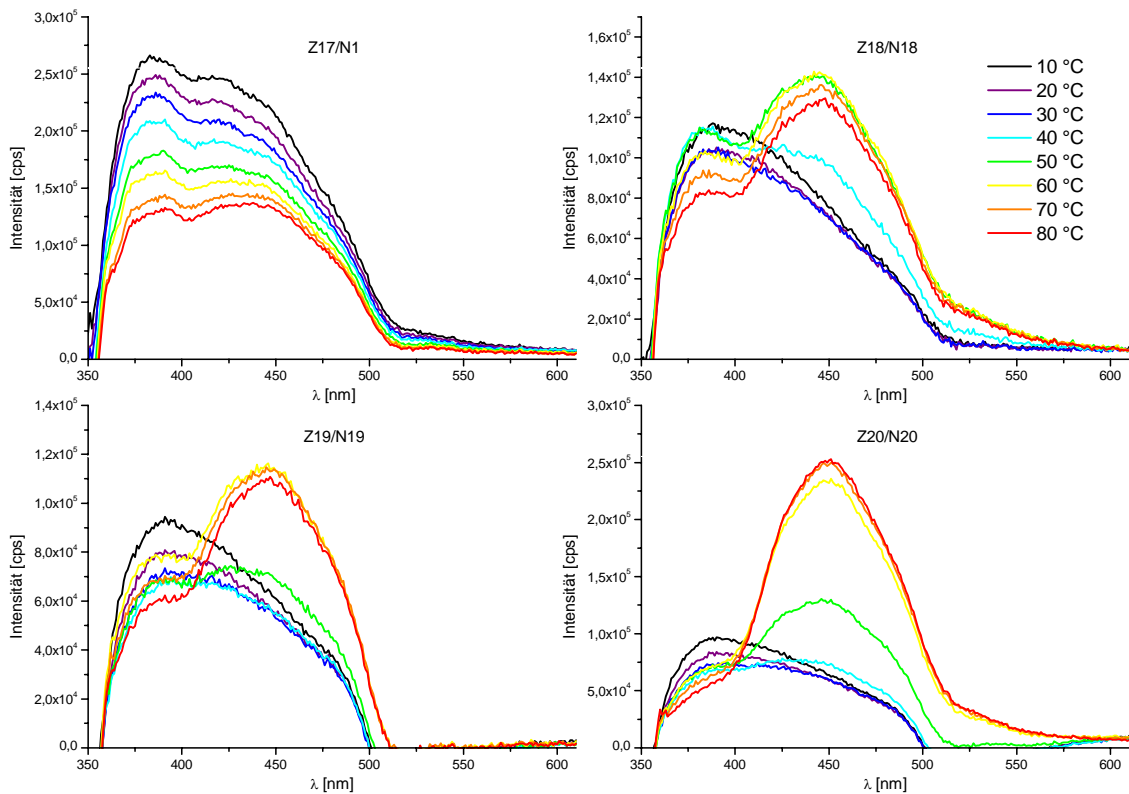


Abb.4-14: Temperaturabhängige Fluoreszenzemission von Phenothiazin-modifizierten DNA-Duplexen. 12.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm.

Die Fluoreszenzemission von Phenothiazin-modifizierten Duplexen zeigt keine Ähnlichkeit mit der Fluoreszenz des Phenothiazin-Bausteins **3**. Das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 446$ nm ist nicht mehr wahrzunehmen. Statt dessen tritt ein Maximum bei $\lambda = 390$ nm auf, welches im Fluoreszenzspektrum des Bausteins **3** als Schulter erschienen ist. Erhöht man die Temperatur, so sinkt die Fluoreszenz zunächst erwartungsgemäß leicht. In den Sequenzen Z18/N18, Z19/N19 und Z20/N20 ist ab 40 bzw. 50 °C eine deutliche Änderung der Fluoreszenzeigenschaften wahrzunehmen. Das Emissionsspektrum nimmt die Form des Spektrums von Phenothiazin an. Ein Maximum bei $\lambda = 446$ nm tritt auf. In der Sequenz Z17/N1 ist dieser Effekt nicht sichtbar, man erkennt lediglich einen etwas stärkeren Rückgang der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 390$ nm als bei $\lambda = 446$ nm.

Die Veränderung der Fluoreszenzspektren mit steigender Temperatur resultiert aus der Dissoziation des DNA-Duplex in Einzelstränge und einer verminderten Stapelung der Nucleobasen. Oberhalb der Schmelztemperatur zeigt sich das Fluoreszenzspektrum des DNA-Einzelstrangs, unterhalb das Spektrum des Duplexes. In Duplex-DNA wird die Fluoreszenz

des Phenothiazins aufgrund von Ladungstransfervorgängen gelöscht. Dem angeregten Phenothiazin bieten sich in den benachbarten Basenpaaren Pyrimidinbasen als Ladungsakzeptoren an. Diese können im modifizierten Oligonukleotid wie auch im Gegenstrang positioniert sein. Die Übertragung eines Elektrons auf eine Pyrimidinbase führt zur Depopulation des angeregten Zustands des Phenothiazins und damit zu einer quantitativen Fluoreszenzlöschung.

In einzelsträngiger DNA sind die oben beschriebenen Ladungstransferprozesse weniger effektiv. Besonders in der Sequenz Z20/N20 ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität beim Übergang vom Duplex zum Einzelstrang zu beobachten. Hier befindet sich als Nachbarbase zur Phenothiazinmodifikation Guanin, welches von angeregtem Phenothiazin nicht reduziert werden kann. Eine Ableitung der Anregungsenergie auf die Nachbarbase ist nicht möglich und führt zu verstärkter Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu ist T die am leichtesten zu reduzierende Base, in der Sequenz Z17/N1 ist die Fluoreszenzverstärkung beim Übergang zum Einzelstrang am geringsten.

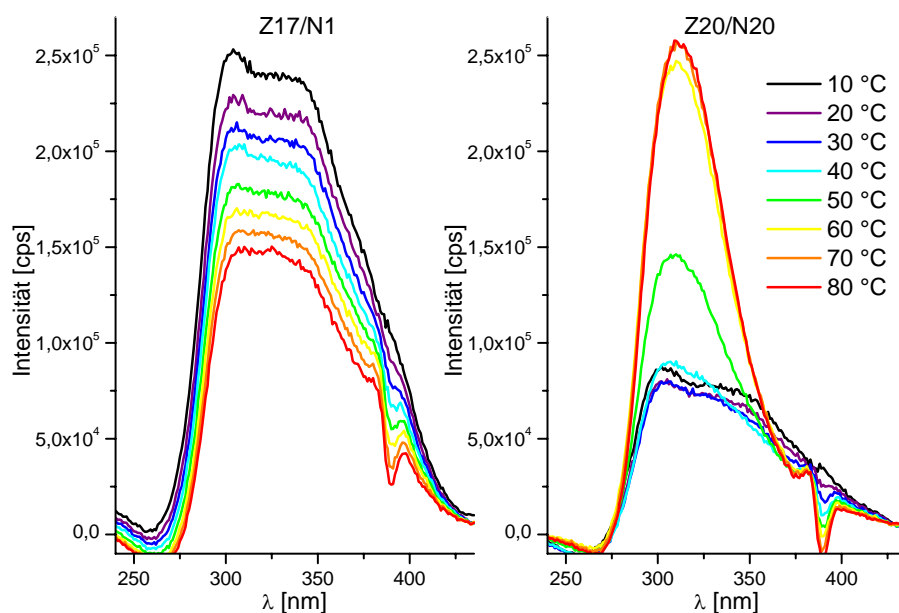


Abb.4-15: Temperaturabhängige Anregungsspektren der Phenothiazin-modifizierten Duplexe Z17/N1 (links) und Z20/N20 (rechts). 12.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{em}} = 446$ nm.

Die Fluoreszenz des Phenothiazins bei $\lambda = 446$ nm ist im DNA-Duplex bis auf eine geringe Restfluoreszenz gelöscht. Das Anregungsspektrum dieser Emission zeigt ein breites Signal zwischen $300 \text{ nm} < \lambda < 360 \text{ nm}$ ohne deutliches Maximum. Betrachtet man das von der Nukleobase T umgebene Phenothiazin im Duplex Z17/N1, so sinkt dessen

Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 446$ nm mit steigender Temperatur. Dem entsprechend sinkt auch die Intensität des Anregungsspektrums. Wie auch bei der Emission ist im Anregungsspektrum mit steigender Temperatur keine deutliche Veränderung der Linienform festzustellen. Im Gegensatz dazu ändert sich die Form des Anregungsspektrums von Z20/N20 beim Überschreiten von 50 °C. Es tritt ein deutliches Maximum bei $\lambda = 310$ nm hervor. Vergleicht man dieses Spektrum mit dem Anregungsspektrum von Phenothiazin (s. Abb. 3-10), so stellt man fest dass kurzwelliges Licht mit $\lambda = 260$ nm in Phenothiazin-modifizierter DNA keine Fluoreszenz bei $\lambda = 446$ nm hervorruft. Die dominierende Absorptionsbande des Phenothiazins trägt in modifizierter DNA überhaupt nicht mehr zur Emission bei. Die Anregung des fluoreszierenden Zustandes findet ausschließlich bei $\lambda = 310$ nm statt. Wie auch in den Emissionsspektren zu beobachten ist, verändert sich das Fluoreszenzverhalten des Phenothiazins beim Übergang von einzel- zu doppelsträngiger DNA. Im DNA-Duplex wird die Fluoreszenz aufgrund von Ladungstransfervorgängen gelöscht. Der Ladungstransfer ist im Einzelstrang weniger effektiv. Sofern sich kein T in Nachbarschaft zur Phenothiazinmodifikation befindet, lässt sich die Fluoreszenz des Phenothiazinchromophors detektieren. Der Ladungstransfer auf ein benachbartes T ist auch im Einzelstrang bereits so effektiv, dass eine vollständige Fluoreszenzlöschung eintritt.

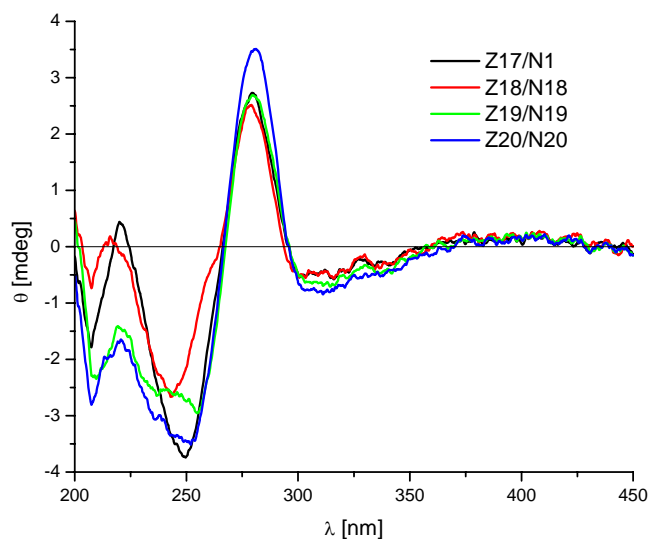


Abb.4-16: CD-Spektren von Phenothiazin-modifizierten DNA-Duplexen Z17/N1, Z18/N18, Z19/N19 und Z20/N20. $2.5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, 100 mM NaCl .

Auf den ersten Blick zeigen sämtliche CD-Spektren von Phenothiazin-modifizierten DNA-Duplexen das gleiche Bild: zwischen $500 > \lambda > 350$ nm ist kein *Cotton*-Effekt zu verzeichnen, ein positiver und ein negativer *Cotton*-Effekt führen zu einem Nulldurchgang bei $\lambda = 270$ nm

und nach einem Minimum bei $\lambda = 250$ nm nähert sich der Graph wieder der Nulllinie. Dies ist das typische Spektrum einer B-DNA-Struktur. Der Kurvenverlauf $\lambda < 250$ nm unterscheidet sich stark in Abhängigkeit der benachbarten Basen. Nur bei von T umgebenem Phenothiazin entsteht ein ungestörtes Spektrum. Trotz dieser Störung ist davon auszugehen, dass Phenothiazin-modifizierte DNA in einer, möglicherweise leicht verzerrten, B-Konformation vorliegt. Zwischen $300 \text{ nm} < \lambda < 350 \text{ nm}$ ist ein deutliches Signal zu erkennen. Nukleobasen absorbieren in diesem Wellenlängenbereich nicht, dieses Signal muss von der Phenothiazin-modifikation stammen. Dies weist auf eine mögliche Interkalation des Chromophors in den Basenstapel der DNA hin.

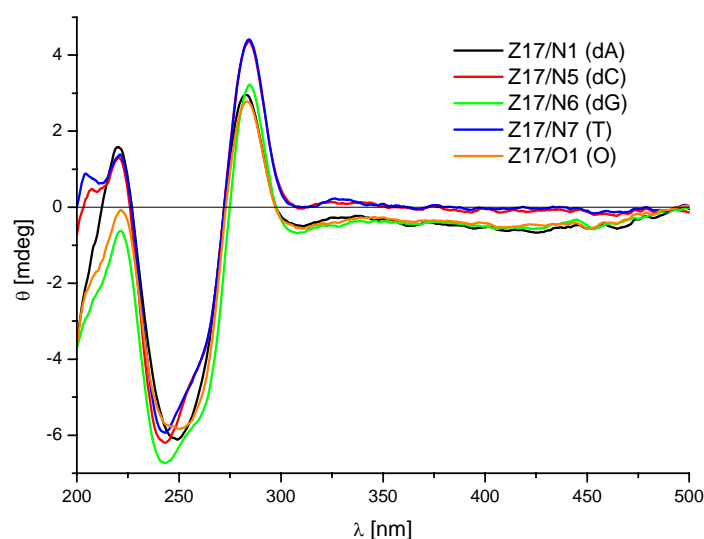


Abb.4-17: CD-Spektren der DNA-Duplexe Z17/N1, Z17/N5, Z17/N6, Z17/N7, Z17/O1. 2.6 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, 250 μM NaCl

Aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrückendonoren oder -akzeptoren im Phenothiazin kann keine Watson-Crick-Basenpaarung ausgebildet werden. Eine Änderung der Gegenbase sollte sich nur gering auf die Stabilität und Struktur des Duplexes auswirken. Analog zum gleichen Experiment mit dem Ptz-dU-modifizierten DNA-Strang P1 wurden Duplexe der Phenothiazin-modifizierten DNA Z17 hergestellt. Als Gegenbase zum Phenothiazin wurden die natürlichen Nukleobasen sowie eine abasische Stelle eingesetzt. Duplexe aus der Phenothiazin-modifizierten DNA Z17 und den Gegensträngen N1,N5-N7 bzw. O1 ergeben identische CD-Spektren. Unabhängig von der Gegenbase zu Phenothiazin nimmt modifizierte DNA die gleiche Konformation ein.

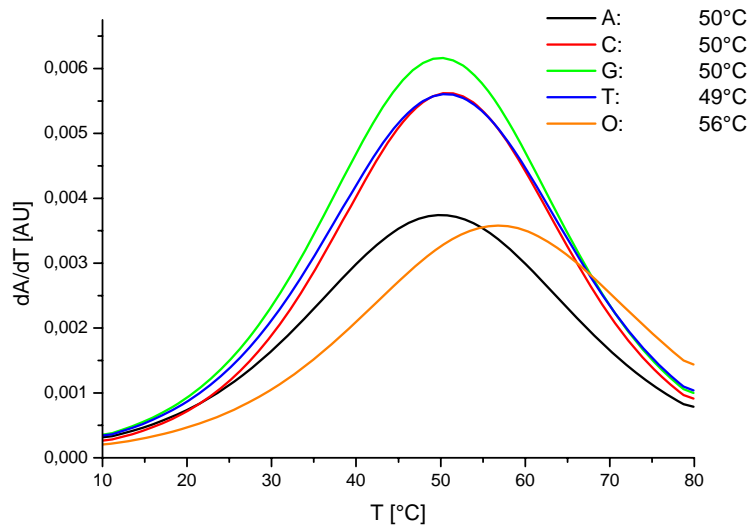


Abb.4-18: Darstellung der temperaturabhängigen Absorptionsänderung von DNA-Duplexen Z17/N1, Z17/N5, Z17/N6, Z17/N7, Z17/O1. 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i-Puffer, 80 \rightarrow 10°C, λ = 260 nm.

Der Vergleich der Schmelztemperaturen ergab praktisch identische Schmelztemperaturen für alle vier natürlichen Gegenbasen. Verwendet man eine abasische Stelle, so liegt die Schmelztemperatur geringfügig höher. Anhand der CD-Spektren und dem Schmelzverhalten ist zu vermuten dass, ähnlich wie in Ethidium-modifizierter DNA, die Gegenbase aus dem Basenstapel herausgedreht wird. Der Vorteil der abasischen Stelle wäre damit, dass der sich außerhalb des Basenstapels befindliche Teil des Oligonukleotids möglichst klein ist und damit die Störung in der Struktur der Doppelhelix möglichst gering gehalten wird. Eine Stabilisierung der Position des Elektronendonors im Basenstapel erfolgt über hydrophobe und π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Ringsystemen der Basen und des Chromophors.

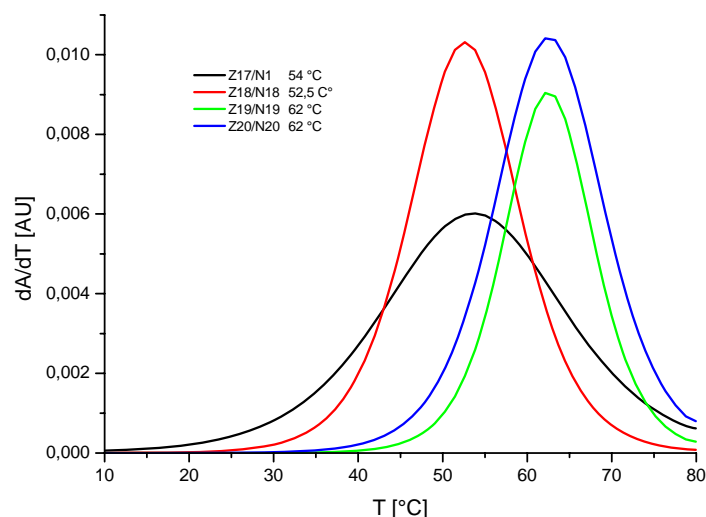


Abb.4-19: Ableitungen der temperaturabhängigen Absorption von DNA-Duplexen Z17/N1, Z18/N18, Z19/N19, Z20/N20. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, 100 mM NaCl, 80 \rightarrow 10 $^\circ\text{C}$, $\lambda = 260$ nm.

Die Umgebung der Phenothiazinmodifikation nimmt keinen Einfluss auf die Stabilität von modifizierten DNA-Duplexen. Die Schmelztemperatur der Duplexe Z19/N19 und Z20/N20 liegt ca. 9 $^\circ\text{C}$ über der Schmelztemperatur von Z17/N1 und Z18/N18. Erstgenannte Duplexe weisen einen höheren Anteil an G-C-Basenpaaren auf, eine stärkere Stabilisierung des Duplex ist damit zu erwarten.

4.5 Zusammenfassung

Ein nicht-nukleosidischer Elektronendonator zum Einbau in DNA-Oligonukleotide wurde synthetisiert. Im Gegensatz zum nukleosidischen Elektronendonator Ptz-dU verändern die zur Verankerung des Chromophors im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA notwendigen Modifikationen die spektroskopischen Eigenschaften des Donors nicht. Die Absorptions-, Fluoreszenz- und elektrochemischen Eigenschaften des DNA-Bausteins **3** entsprechen denen von 10-Methylphenothiazin.

Die Phenothiazinmodifikation konnte erfolgreich in DNA-Oligonukleotide eingebaut werden. Die erhaltenen DNA-Stränge wurden mit Methoden der *steady-state*-Spektrometrie charakterisiert. Phenothiazin-modifizierte DNA-Duplexe liegen in einer B-DNA-Konformation vor. Die Variation sowohl der benachbarten wie auch der gegenüberliegenden Nukleobase hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Struktur des Duplex. Der Chromophor ist wahrscheinlich in den Basenstapel interkaliert.

Die Fluoreszenz des Phenothiazins ist in modifizierten DNA-Duplexen nahezu vollständig gelöscht. Aus den verbleibenden Restfluoreszenzen kann nicht auf die Einflüsse der benachbarten Nukleobasen geschlossen werden. Der angeregte Chromophor injiziert offensichtlich mit hoher Effizienz ein Elektron in den DNA-Basestapel. Phenothiazin eignet sich zur selektiven photochemischen Auslösung des reduktiven Elektronentransfers durch DNA. Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie von Phenothiazin wird in Kapitel 7 diskutiert.

5 Synthese eines absorptionspektroskopisch nachweisbaren Elektronenakzeptors

Zur Untersuchung von Ladungstransfervorgängen ist zusätzlich zum Elektronendonator ein Akzeptorsystem notwendig, das die in die DNA injizierte Ladung abfängt und durch die Aufnahme des Elektrons ein Signal generiert das den erfolgreichen Ladungstransfer anzeigt. Als Akzeptorsystem wurde in ersten Experimenten (s. Kap. 3.2.4) 5-Brom-2'-desoxyuridin eingesetzt, welches als Phosphoramiditbaustein zur DNA-Synthese kommerziell erhältlich ist. 5-Brom-2'-desoxyuridin reagiert nach Elektronenaufnahme unter Verlust eines Bromidanions zum Neutralradikal.^[68, 69, 85] Bei Behandlung mit Piperidin induzieren dessen Folgeprodukte einen Bruch des DNA-Doppelstranges, der chemisch über HPLC-Analytik auszuwerten ist.

Um ein einfacheres Auslesen des Signals zu erreichen soll ein neuartiges Akzeptorsystem synthetisiert werden. Das nach Reduktion von Brom-dU abgespaltene Bromidion kann nicht direkt detektiert werden. *Ito et al.*^[89] untersuchten die photoinduzierte Reparatur von Thymin-glycolen und stellten dabei fest, dass auch Hydroxylgruppen an der 5-Position des reduzierten Dihydrothymins das Molekül verlassen. Weitere Abgangsgruppen wie z.B. Farbstoffe sollten nach dem selben Mechanismus wie Bromid aus Br-dU von einem reduziertem Uridinderivat abzuspalten sein.

Zum Nachweis des oxidativen Lochtransfers durch DNA ist von *Saito et al.*^[237] ein modifiziertes Nukleosid entwickelt worden. Dieses auf Desoxyguanosin basierende Nachweissystem setzt im oxidierten Zustand den Farbstoff TAMRA frei. Der grundlegende Nachteil dieses Systems ist die notwendige Aufarbeitung der Probe, da TAMRA sowohl in Lösung wie auch am Nukleosid gebunden fluoresziert. Der erfolgreiche Lochtransfer kann erst nach Entfernung der DNA aus der Probenlösung durch die Fluoreszenz des zurückbleibenden Farbstoffs detektiert werden.

Ein einfacher Farbstoff, der seine Absorptionseigenschaften beim Bruch einer Bindung ändert und dabei zusätzlich als gute Abgangsgruppe wirkt, ist 4-Nitrophenol. Der aus para-Nitrophenol und Uracil gebildete Diarylether absorbiert nur sehr schwach im sichtbaren Bereich. Das freizusetzende Nitrophenolation dagegen absorbiert stark, eine Abspaltung von

Nitrophenolat aus einem reduzierten Uridinderivat ließe sich durch Absorptionsspektrometrie verfolgen.

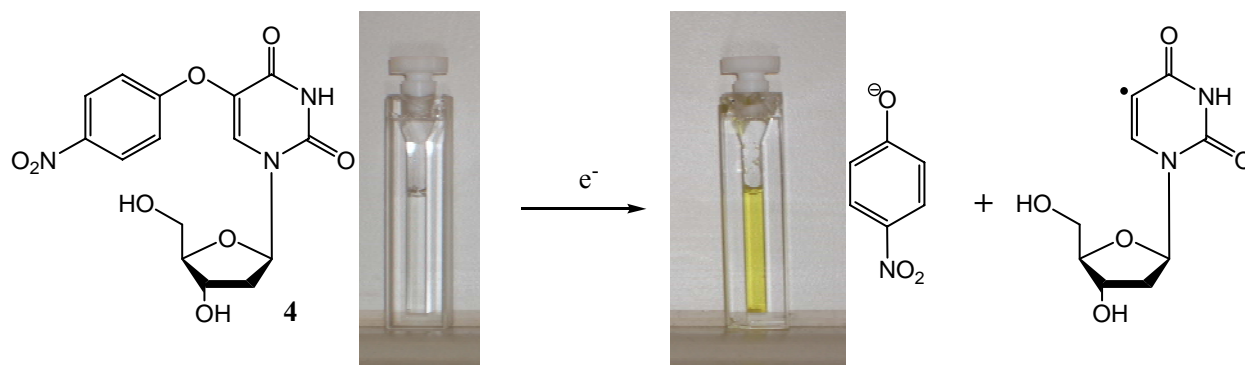


Abb.5-1: Vorgeschlagene Ein-Elektronen-Reduktion und Spaltung von 5-(p-Nitrophenoxy)-2'-desoxyuridin **4**.
Bild links: p-Nitrophenol in 0.1 M HCl, rechts: p-Nitrophenol in 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7).

Die erfolgversprechendste und einfachste Synthesestrategie zur Herstellung des modifizierten Nukleosids besteht in der Reversion der Nachweisreaktion. Zur dazu notwendigen Knüpfung einer Diarylether-Bindung sollte eine Buchwald-Kupplung zum Einsatz kommen. Diese Palladium-katalysierte Kupplungsreaktion führt ausgehend von Arylhalogeniden und Phenolen bzw. Anilinen zu Diarylethern bzw. -aminen.^[180, 238] Prinzipiell sind zwei verschiedene Wege zur Knüpfung der Etherbindung denkbar, entweder (**A**) unter Einsatz des kommerziell erhältlichen 5-Iod-2'-desoxyuridins (welches mit geeigneten Schutzgruppen modifiziert werden muss) und des p-Nitrophenolats, oder (**B**) die Verwendung eines p-Nitrohalogenbenzols und 5-Hydroxy-2'-desoxyuridin, welches ebenfalls mit Schutzgruppen zu versehen ist. Die Schutzgruppen des eingesetzten Uridinderivats werden zur Blockade der Hydroxyfunktionen benötigt. Hier bietet sich die Verwendung von *iso*-Butyrylgruppen an.

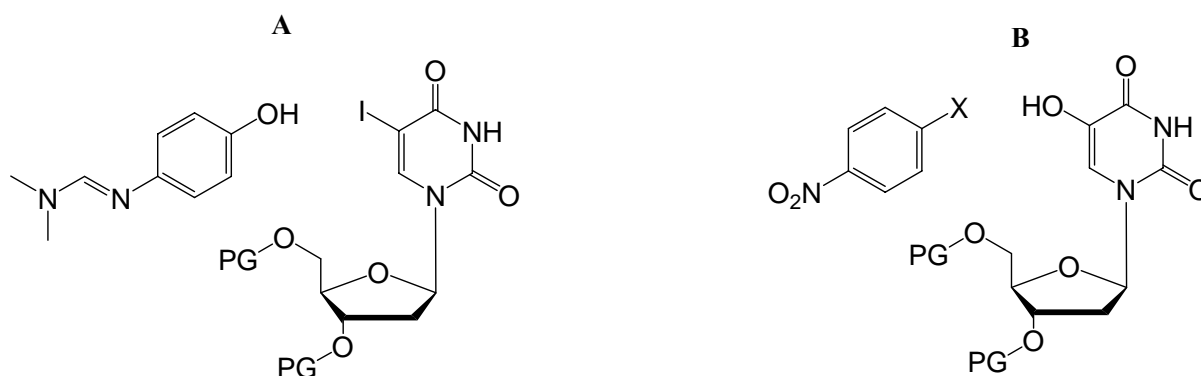


Abb.5-2: Mögliche Edukte zur Ausführung der Buchwald-Kupplung: p-Aminophenol und I-dU (Variante **A**) bzw. p-Nitrohalogenbenzol und 5-Hydroxy-2'-desoxyuridin (Variante **B**), X=Halogen.

Die bisher in der Literatur beschriebenen erfolgreichen Buchwald-Kupplungen verliefen zwischen einem elektronenreichen Phenolat und einem elektronenarmen Arylhalogenid.^[238]

Damit ist die Variante (**A**) unter Verwendung von 5-Iod-2'-desoxyuridin aussichtsreicher, da es sich bei Uridin um ein elektronenarmes System handelt. Die Bedingung des Elektronenreichtums des Phenolats ist für Nitrophenolate nicht zu erfüllen. Statt dessen wurde ein p-Aminophenolat eingesetzt, dessen Aminogruppe als Dimethylformamido-Imid geschützt wurde. Nach erfolgreicher Umsetzung ist die Aminogruppe zur Nitrogruppierung zu oxidieren.^[239]

Die Buchwald-Kupplung ist auf voluminöse Liganden am Palladium-Katalysator und auf milde Basen wie Kaliumphosphat angewiesen.^[180] Während die Base einfach erhältlich ist, sind nur wenige sterisch gehinderte Phosphinliganden im Handel zu beziehen. In diesem Fall wurde 2-Biphenyl-di-*tert.*-butylphosphin eingesetzt.^[238] Dieser Ansatz führte nicht zum Erfolg, als Reaktionsprodukt entstand überwiegend das dehalogenierte 2'-Desoxyuridin. Als nächste Variante (**B**) wurde die Hydroxylierung des Uridins versucht.

5-Hydroxy-2'-desoxyuridin ist nach der Literatur^[240, 241] aus 2'-Desoxyuridin über eine dreistufige Reaktionssequenz zugänglich. Brom sollte an die Doppelbindung addieren, durch Hydroxygruppen unter Bildung von 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydro-2'-desoxyuridin substituiert werden und eine anschließende Eliminierung von Wasser sollte zu 5-Hydroxy-2'-desoxyuridin führen. Diese Reaktion ergab stets eine Mischung aus Edukt, Zwischenprodukten und geringen Mengen des gewünschten Produktes.

Da auch dieser Syntheseweg erfolglos blieb, wurde eine Abkehr von der Buchwald-Kupplung beschlossen. Durch eine alternative Kupfer(II)-Katalyse konnten zahlreiche Diarylether aus Phenolen und Arylboronsäuren bei milden Bedingungen gewonnen werden.^[242-244] Wiederum bieten sich zwei mögliche Synthesewege an, zum einen die Hydroxylierung von 2'-Desoxyuridin und Umsetzung mit p-Nitrophenylboronsäure, die aufgrund der schwierigen Synthese von 5-Hydroxy-2'-desoxyuridin nicht geeignet erschien. Zum anderen die Umsetzung von p-Nitrophenol mit 2'-Desoxyuridin-5-yl-boronsäure.^[245] Zur Herstellung der Boronsäure war der Schutz der 3'- und 5'-Hydroxygruppen notwendig, wiederum wurde ein *Isobuttersäure*ester als Schutzgruppe eingesetzt. Der Versuch einer Synthese analog der *Masuda*-Kupplung^[173] zur Phenothiazin-Boronsäure führte ausschließlich zur Dehalogenierung des eingesetzten geschützten 5-Iod-2'-desoxyuridins. Auch die Silylierung der schwach aziden Aminofunktion des Uridins^[246] brachte keine Verbesserung.

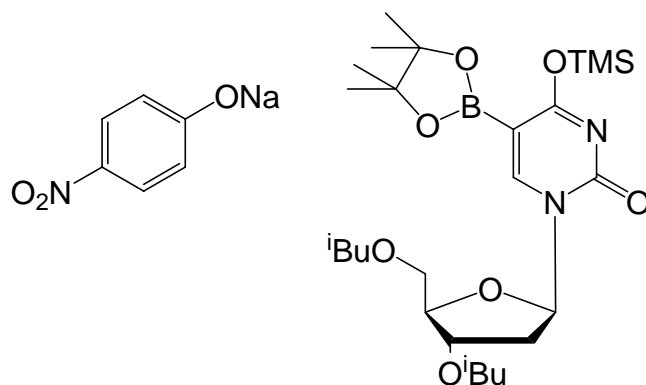


Abb.5-3: Geplante Umsetzung von p-Nitrophenolat mit einer Uridinyl-Boronsäure.

Die Herstellung von 5-(para-Nitrophenoxy)-2'-desoxyuridin konnte nicht durchgeführt werden. Als Alternative wurde die Synthese von 5-(para-Nitrophenoxy)-uracil unter Aufbau des Pyrimidin-Ringsystems versucht. Die Synthese von 5-substituierten Uracilen aus Harnstoff und einem Acrylsäurederivat ist in der Literatur^[247-249] bereits beschrieben worden. Anhand der Modellverbindung 5-(para-Nitrophenoxy)-uracil kann überprüft werden, ob das Radikalanion dieser Verbindung tatsächlich den Farbstoff Nitrophenol freisetzt. Darauf aufbauend kann die Synthese des Nucleosids **4** unternommen werden. Ebenfalls ist es denkbar, diese Synthesestrategie für die Verwendung alternativer Farbstoffe^[250-252] zu modifizieren, das über die Synthese eines veränderten Acrylsäurederivats einfach möglich ist. Die Synthese des Acrylsäurederivats (**26** bzw. **29**) als Träger der Farbstoffmodifikation benötigt nur wenige Schritte, die alle in guter oder sehr guter Ausbeute verlaufen.

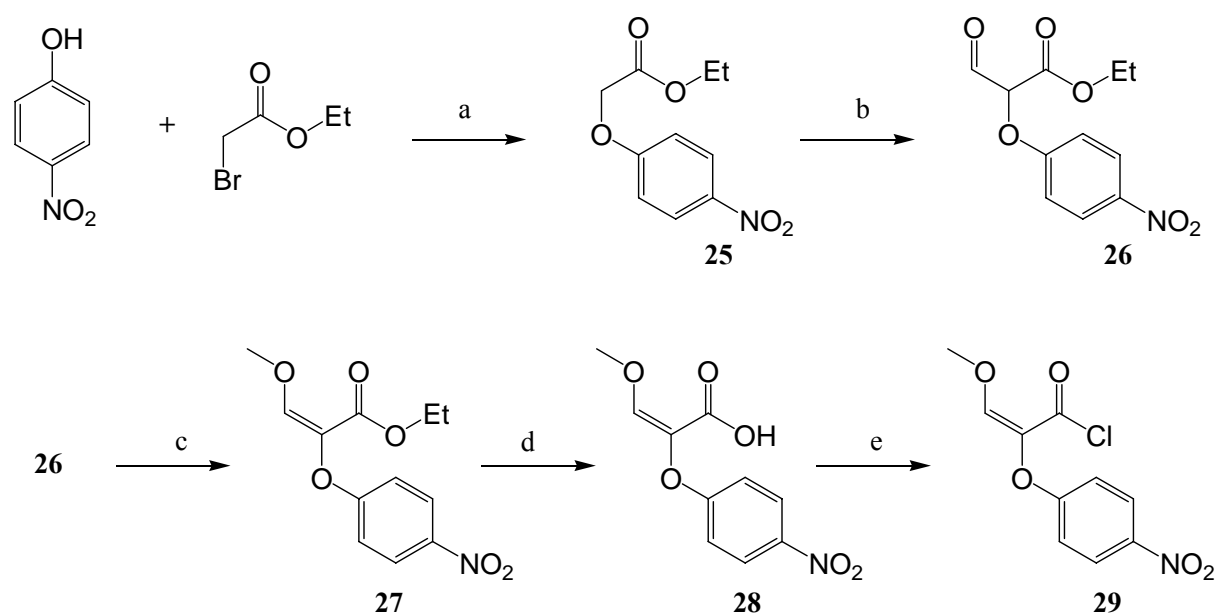


Abb.5-4: Syntheschema zur Herstellung von 2-(para-Nitrophenoxy)-3-methoxyacrylsäurechlorid.

Reaktionsbedingungen: (a) K_2CO_3 , Aceton, 60 °C, 3 h, 93 %; (b) $HCOOEt$, $NaOEt$, Et_2O , RT, 3 h, 90 %; (c) K_2CO_3 , Me_2SO_4 , Aceton, 60 °C, 12 h, 60 %; (d) KOH , H_2O , 60 °C, 3 h, 90 %; (e) $SOCl_2$, DCM, 40 °C, 3 h, 95 %.

Ausgangsmaterialien sind para-Nitrophenol und Bromessigsäureethylester. In einer nukleophilen Substitution wird Bromid durch para-Nitrophenolat ausgetauscht. Die Reaktion zu **25** verläuft innerhalb drei Stunden bei erhöhter Temperatur in Gegenwart von Kaliumcarbonat als Base. Man erhält para-Nitrophenoxyessigsäureethylester (**25**) als farblosen Feststoff in sehr guter Ausbeute.

Die Einführung der Formylgruppe gelingt durch eine Claisen-Kondensation. Ethylformiat wird in Diethylether vorgelegt und mit Natriumethanolat versetzt. Mit der Zugabe von para-Nitrophenoxyessigsäureethylester (**25**) beginnt die Reaktion, die nach drei Stunden vervollständigt ist. Das im basischen als Natriumsalz vorliegende Produkt **26** fällt aus Diethylether aus. Man erhält eine gelbe Flüssigkeit in sehr guter Ausbeute.

Die Enolform des Formylessigsäureesters **26** wird durch Methylierung isoliert. Das entstehende Produkt **27** ist nach Berichten aus der Literatur^[248, 253, 254] als Edukt einer später folgenden Cyclisierung besser geeignet. Methyliert man **26** unter milden Bedingungen mit einem harten Elektrophil, so ist ausschließlich eine Substitution am Sauerstoff zu erwarten. Die konkurrierende Methylierung am Kohlenstoff konnte nicht detektiert werden. Die Ausgangsverbindung **26** wird mit Kaliumcarbonat in Aceton deprotoniert, nach Zugabe eines Überschusses an Dimethylsulfat rührt man bei Raumtemperatur über Nacht. Man erhält das Produkt **27** in guter Ausbeute als gelbe zähe Flüssigkeit. Die Bildung des Uracilrings sollte durch Kondensation von **27** mit Harnstoff in basischer Lösung, gefolgt von der Cyclisierung in saurem Milieu erfolgen. Es konnte keine Umsetzung detektiert werden, so dass ein reaktiveres Carbonsäurederivat als der Ester **27** zum Einsatz kommen sollte. Die Verseifung des Esters **27** mit Kaliumhydroxid in wässriger Lösung führt zur freien Carbonsäure **28**. Aus dieser kann das Säurechlorid **29** gebildet werden. Auch die Umsetzung des Säurechlorids mit Harnstoff ergibt nicht das erwünschte 5-(p-Nitrophenoxy)-uracil.

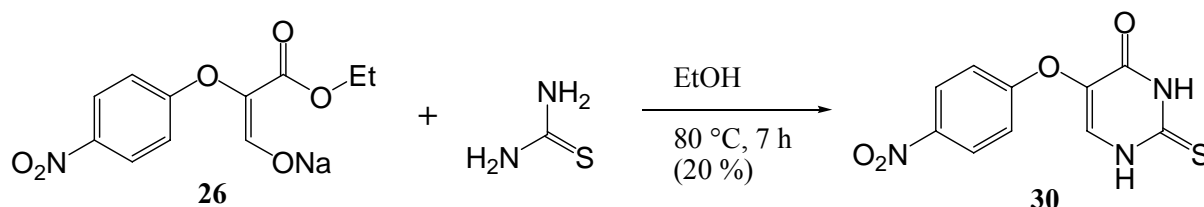


Abb.5-5: Darstellung von 5-(4-Nitrophenoxy)-2-thiouracil **30**.

Die Kondensation von Acrylsäurederivaten mit Thioharnstoff und die anschließende Cyclisierung zum 2-Thiouracilderivat verläuft in mäßiger Ausbeute, wenn das Natriumsalz

des 2-(4-Nitrophenoxy)-formylessigsäureesters (**26**) als Edukt eingesetzt wird.^[253] Die analoge Reaktion unter Einsatz von Harnstoff statt Thioharnstoff führt jedoch nicht zu substituierten Uracilen.^[255] Die Verwendung von modifiziertem Thiouracil **30** kann als tolerierbare Veränderung des Zielmoleküls betrachtet werden, um die Abspaltung eines Farbstoffs durch Reduktion des Thiouracils zu demonstrieren.

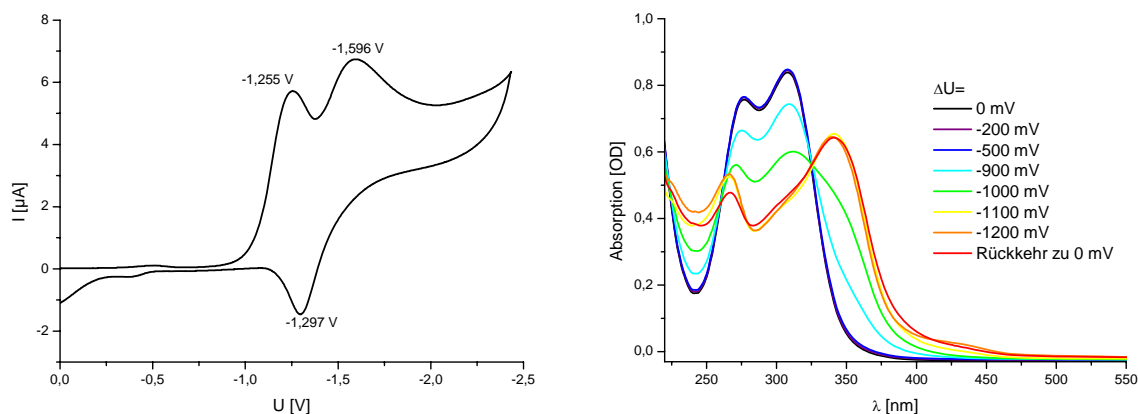


Abb.5-6: Cyclovoltammetrische (links) und spektroelektrochemische (rechts) Messung von 5-(4-Nitrophenoxy)-2-thiouracil **30**. 5 mM **30** in Acetonitril, Potentiale der CV sind gegen NHE angegeben, Potentiale der SEC gegen einen willkürlich gewählten Nullpunkt.

Das cyclovoltammetrische Spektrum von **30** zeigt eine irreversible Reduktion an. Bei einem Potential von -1.255 V gegen NHE wird eine Reaktion detektiert, zu der keine elektrochemische Rückreaktion abläuft. Die Spektroelektrochemie bestätigt dieses Ergebnis: Mit steigendem Potential bildet sich eine neue Spezies mit abweichenden Absorptionseigenschaften. Nach der Reduktion des Potentials auf den Ausgangswert bleibt die Absorption des neu entstandenen Produkts erhalten.

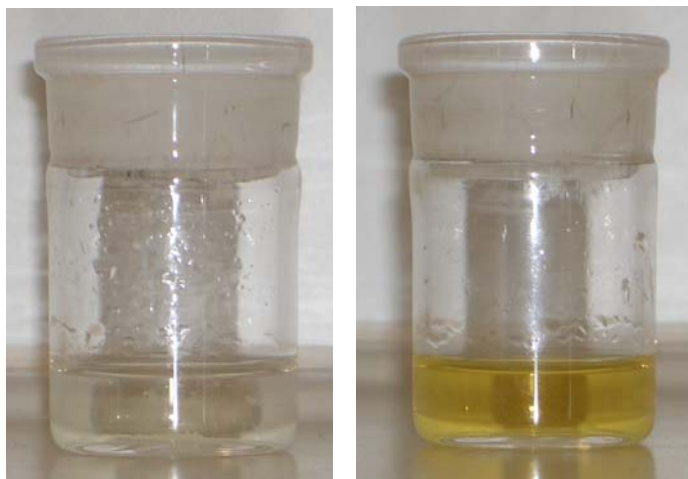


Abb.5-7: Die Messzelle der Spektroelektrochemie mit einer Lösung von 5-(4-Nitrophenoxy)-2-thiouracil (**30**). Links: vor der Messung, rechts: nach der Messung. 1 mM **30** in Acetonitril.

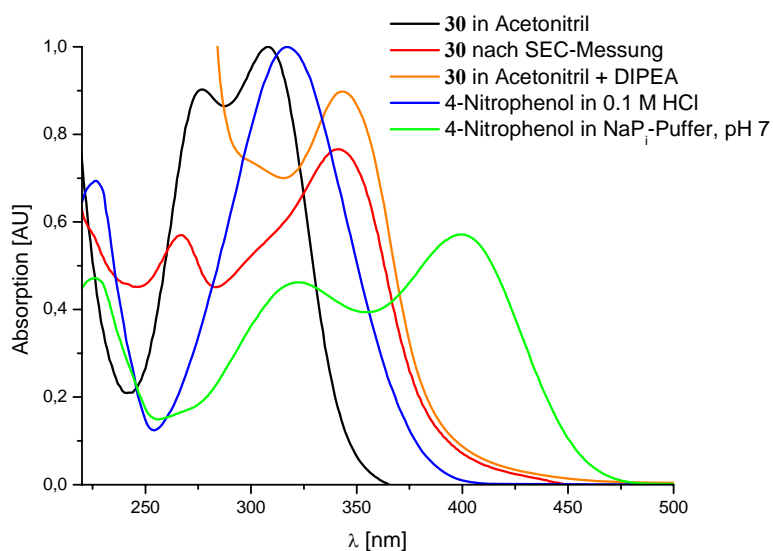


Abb.5-8: Vergleich der normierten Absorptionsspektren von **30**, dessen Produkt der elektrochemischen Reduktion und nach Basenbehandlung. Im Vergleich dazu die normierten Absorptionsspektren von 4-Nitrophenol in der protonierten und anionischen Form.

Ebenso führt die Zugabe einer starken Base (DIPEA) zu einer Lösung von **30** in Acetonitril zu einer Farbumschlag von farblos zu gelb. Die Absorptionsspektren der Verbindungen, die durch Reduktion und Basenzugabe entstanden sind, gleichen sich (s. Abb. 5-9, die starke Absorption $\lambda < 300$ nm wird von DIPEA verursacht). Das Absorptionsspektrum von 4-Nitrophenol in der protonierten Form gleicht dem Spektrum von **30** mit Ausnahme der Absorption des 2-Thiouracil bei $\lambda \approx 270$ nm. Das Absorptionsverhalten von deprotoniertem 4-Nitrophenol unterscheidet sich jedoch vom Produkt der elektrochemischen Reduktion von **30**.

Durch Massenspektrometrie kann keine Bildung von Nitrophenol durch Reduktion von **30** detektiert werden. Es ist damit nicht sicher, ob der Mechanismus, nach dem aus 5-Brom-2'-desoxyuridin durch Reduktion ein Bromidion abgespalten wird, auf andere Uridinderivate übertragbar ist.

6 Synthese eines Elektronenakzeptors zur Durchführung zeitaufgelöster Spektroskopie

Die Reaktionszeit des Elektronenakzeptors Brom-dU ist sehr schnell, so dass im Bereich von Nanosekunden verlaufende Vorgänge, wie der Elektronentransfer durch DNA, zeitlich aufgelöst werden können.^[68-70, 256] Der Nachweis des erfolgten Elektronentransfers erfolgt durch HPLC-Analytik. Eine zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchung ist nicht möglich, da keine durch transiente Absorption spektroskopierbaren Intermediate oder Produkte entstehen.

Ein spektroskopierbarer Elektronenakzeptor hat den Vorteil, dass die Vorgänge des reduktiven Ladungstransfers durch zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie aufgeklärt werden können. Die Reaktionszeiten des Akzeptors müssen dazu weit schneller als Elektronentransfervorgänge sein. Die Absorption eines Photons benötigt 10^{-15} s während der Elektronentransfer mit einer Ratenkonstante von $10^9 - 10^8 \text{ s}^{-1}$ abläuft. Ein durch zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie auslesbarer Akzeptor wäre sämtlichen bisherigen Nachweissystemen weit überlegen. Dazu ist es notwendig, dass die Absorptionsspektren des neutralen Elektronenakzeptors und seines Radikalanions ausreichend verschieden sind. Die Bildung des reduzierten Akzeptors ließe sich dann zeitaufgelöst verfolgen.

Wie in mehreren Beispielen^[257] gezeigt sind *N,N*-disubstituierte Perylen-3,4;9,10-tetracarbonsäurediimide (Perylenfarbstoffe) stark fluoreszierend, lichtbeständig und chemisch äußerst stabil. Ein großer Extinktionskoeffizient sowie ein Absorptionsbereich zwischen 450 und 600 nm, zusammen mit einem niedrigem Oxidationspotential, lassen diese Farbstoffe als geeignete Elektronenakzeptoren erscheinen. Die Inkorporation in DNA-Oligonukleotide soll mit Hilfe des bereits vorgestellten, als Nukleosidanalogen fungierenden Aminopropandiollinkers^[18, 19, 163] ermöglicht werden.

Die Synthese von symmetrisch substituierten Perylenbisimiden aus dem kommerziell erhältlichen Perylentetracarbonsäurebis-anhydrid ist mehrfach beschrieben worden.^[258-260] Dazu aktiviert man die Anhydridgruppierungen mit Zink(II)acetat und kondensiert das aktivierte Bis-anhydrid mit einem Amin zum Bisimid. Meist finden diese Reaktionen in Chinolin oder geschmolzenem Imidazol statt und benötigen Temperaturen von $\sim 200 \text{ }^\circ\text{C}$.

Der Einbau eines Perylenfarbstoffs in DNA-Oligonukleotide bedingt eine asymmetrische Substitution des Perylenbisimids. Ein Imidstickstoff muss eine Funktion mit zwei unterschiedlich reaktiven Hydroxygruppen tragen, um selektiv die DMT-Schutzgruppe und die Phosphoramiditmodifikation in das Molekül einführen zu können. Die andere Imidgruppe sollte mit einem sterisch möglichst wenig anspruchsvollen, chemisch weitgehend inerten Rest blockiert werden um Nebenreaktionen zu vermeiden. Der Bedingung des geringen sterischen Anspruchs widerspricht die Beobachtung, dass eine langkettige Alkylfunktion oder ein raumausfüllender Arylsubstituent die Löslichkeit des Perylenfarbstoffs verbessert.^[261-264] Zum Einbau in DNA-Oligonukleotide kommen arylsubstituierte Perylenfarbstoffe nicht in Frage, die Ausbildung eines DNA-Basenstapels würde durch sterisch anspruchsvolle Substituenten wie 2,6-Dialkylphenylreste unverhältnismäßig erschwert werden. Damit bleibt die Option eines Alkylrestes, die Größe dieses Restes ergibt sich aus der synthetischen Zugänglichkeit und den Lösungseigenschaften des resultierenden Perylenfarbstoffs.

Zur Synthese eines unsymmetrisch substituierten Perylenfarbstoffes lassen sich zwei mögliche Wege beschreiten:

- (A) Die Herstellung des Perylentetracarbonsäureanhydrid-imids aus dem Monokaliumsalz und einem Amin, gefolgt von der Umsetzung mit dem zweiten Amin zum Perylenbisimid.^[265, 266]
- (B) Die gleichzeitige Kondensation des Dianhydrids mit einer Mischung zweier Amine.

tetrakaliumsalzes wird durch Zugabe von Phosphorsäure das unlösliche Monokaliumsalz gefällt.^[266] Die Kondensation mit einem Amin zum Perylentetracarbonsäureanhydrid-imid ist nur für kurzkettige, wasserlösliche Amine beschrieben worden^[265] und gelang hier nicht.

6.1 Synthese von N-(2-Ethylhexyl)-N'-(3-O-(4,4-dimethoxytrityl)-(S)-2,3-dihydroxypropyl)-perylene-3,4;9,10-tetracarbonsäurebisimid (31)

Setzt man zwei Amine gleichzeitig mit Perylentetracarbonsäurebisimid um, so erhält man nur dann nennenswerte Mengen des unsymmetrisch substituierten Produktes, wenn beide Amine die annähernd gleiche Reaktivität aufweisen.^[265] Aktiviert man Perylentetracarbonsäurebisimid in siedendem Pyridin 1 h mit Zinkacetat und lässt dann in Gegenwart von 2-Ethylhexylamin und dem tritylierten Aminopropandiollinker 23 h in der Siedehitze reagieren, so erhält man bis zu 48 % des gewünschten unsymmetrisch substituierten Produktes (**31**). Die analogen Umsetzungen von Perylentetracarbonsäurebisimid mit trityliertem Aminopropandiol und Methylamin, Propylamin bzw. *tert.*-Octylamin lieferten dagegen überwiegend symmetrisch substituierte Perylenfarbstoffe und nur geringe Mengen des unsymmetrisch substituierten Farbstoffs.

Perylenbisimide sind äußerst hydrolysestabil,^[257] dagegen kann das Edukt mit starker Kalilauge in das lösliche Tetrakaliumsalz überführt und wässrig extrahiert werden. Der reine Perylenfarbstoff (**31**) wird als dunkelroter Feststoff erhalten. Bei diesem Produkt handelt es sich um eine Mischung aus Diastereomeren, da racemisches 2-Ethylhexylamin eingesetzt wurde. Eine Trennung der Diastereomeren war nicht möglich.

Die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe ist für die Handhabung des Perylenfarbstoffs von besonderer Bedeutung. Während das geschützte Produkt (**31**) in Dichlormethan gut löslich ist, fällt bei Säurezugabe das entsprechende ungeschützte Perylenbisimid **5** aus. Dieser dunkelrote Feststoff erwies sich in allen gängigen Lösungsmitteln als nicht oder nur in Spuren löslich.

Die NMR-Spektroskopie des tritylierten Perylenbisimids zeigt drei deutlich abgegrenzte Signalgruppen, die Signale der Tritylgruppe und des Perylens überlagern teilweise. Über 2D-Experimente können die Signale der Alkylketten und der Tritylgruppe zugeordnet werden. Die Substituenten des Bisimids sind zwar nicht symmetrisch, der Einfluss auf die Signale des aromatischen Perylensystems ist aber so gering, dass keine eindeutige Zuordnung der Signale

möglich ist. Es ist aber erkennbar, dass die beiden Naphtalineinheiten des Perylens nicht equivalent sind.

6.2 Spektroskopische Untersuchungen von N-(2-Ethylhexyl)-N'-(3-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-(S)-2,3-dihydroxypropyl)-perylene-3,4;9,10-tetracarbonsäurebisimid (31)

Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten DNA-Bausteinen konnte das Perylenbisimid nicht in der ungeschützten Diolform (Verbindung **5**) charakterisiert werden, da die Tritylgruppe unbedingt notwendig ist um die Verbindung in Lösung zu bringen. Spektroskopische Untersuchungen wurden daher am tritylierten DNA-Baustein **31** vorgenommen.

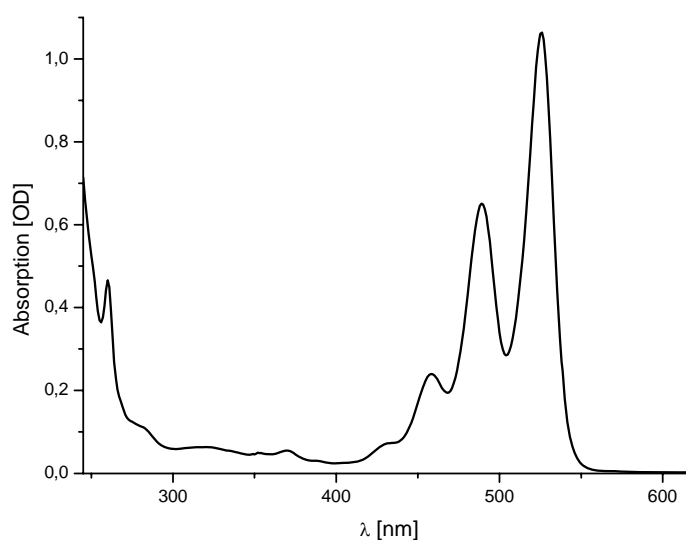


Abb.6-2: Absorption des Perylenbisimidbausteins **31** (18 μM in Dichlormethan).

Das Absorptionsspektrum zeigt bei $\lambda = 260$ nm ein Maximum. Die DMT-Schutzgruppe absorbiert in diesem Wellenlängenbereich und würde eine eventuelle Absorption des Perylenbisimids überlagern. Die intensivste Absorption des Perylenbisimidsystems ist zwischen $\lambda = 440$ und 550 nm zu beobachten, das Maximum liegt bei $\lambda = 525$ nm. Das Spektrum zeigt die für Perylenfarbstoffe typische und auch in dieser Form erwartete Struktur mit weiteren lokalen Maxima bei $\lambda = 489$ und 460 nm, die durch die Streckschwingungen des Perylenbisimidsystems verursacht werden. Perylenfarbstoffe zeichnen sich durch ihre großen Extinktionskoeffizienten ϵ aus, in diesem Fall wurde für eine Lösung in DMSO ϵ zu $60\,200\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bestimmt ($\lambda = 528$ nm).

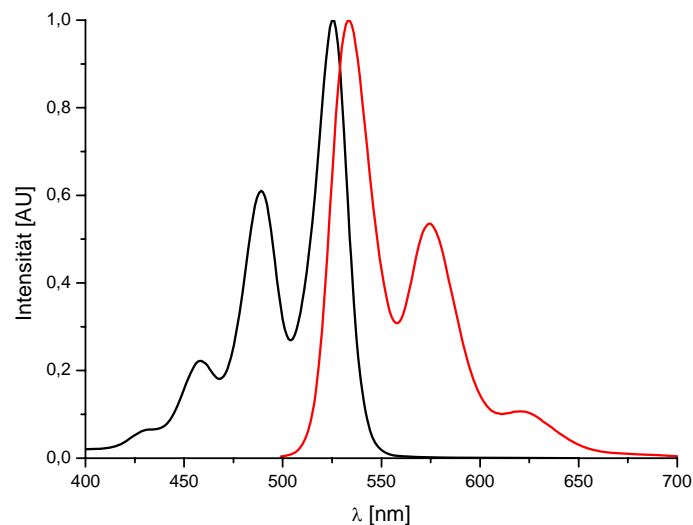


Abb.6-3: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Perylenbisimidbausteins **31**. 18 μM in Dichlormethan, $\lambda_{\text{ex}}=489\text{ nm}$.

Das Fluoreszenzspektrum von **31** ist annähernd spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum. Die Stokes-Verschiebung ist nur sehr gering mit einem Betrag von 8 nm. Dies führt zur intensivsten Emission bei $\lambda=533\text{ nm}$, weitere Emissionsmaxima (gleichbedeutend mit der Fluoreszenz in vibronisch angeregte Zustände des Grundzustands) treten bei $\lambda=574\text{ nm}$ und 620 nm auf.

Für verschiedene Perylenbisimide sind sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeuten bestimmt worden, diese betragen bis zu 100 %.^[258, 267] Für den Perylenfarbstoff **31** beträgt die Quantenausbeute in Dichlormethan $\Phi_{\text{F}}=72.7\%$.

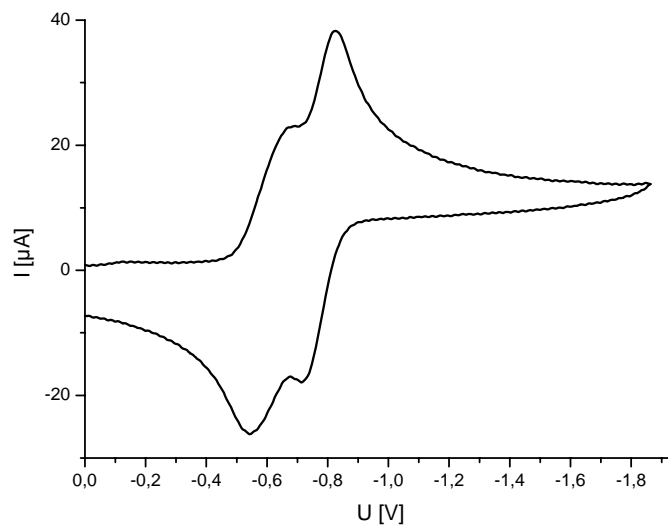


Abb.6-4: Cyclovoltammogramm des Perylenbausteins **31**, 0.8 mM in DCM.

Der Perylenbisimidbaustein zeigt in der Cyclovoltammetrie zwei nahe zusammen liegende Halbstufenpotentiale, die nur um ca. 160 mV separiert sind. Beide Potentiale sind negativ, erwartungsgemäß nimmt das Perylenbisimid Elektronen auf und wird reduziert. Das erste Potential bei -600 mV gegen NHE ist gleichbedeutend mit dem Übergang der Neutralverbindung zum Radikalanion. Das zweite Potential bei -760 mV gegen NHE bedeutet den Übergang vom Radikalanion zum Dianion. Die anodischen und kathodischen Peakpotentiale sind jeweils ca. 120 mV separiert und deuten auf eine irreversible Reaktion hin. Ferrocen als interner Standard zeigte in diesem Experiment dieselbe Differenz der Peakpotentiale, statt des für eine reversible Reaktion zu erwartenden Wertes von 58 mV.^[155] Der große Abstand der Peakpotentiale ist vermutlich auf die Messbedingungen zurückzuführen, es handelt sich demnach wahrscheinlich um reversible Übergänge. Der geringe Abstand zwischen dem ersten und zweiten Potential wird auch in der Radikalspektroskopie deutlich. Es gelingt nicht, ein reines Spektrum des Radikalanions aufzunehmen, ohne dass Signale der Neutralverbindung oder des Dianions überlagern.

Durch photochemische Anregung des Perylenbisimids kann dieses als Lochdonor dienen. Das Oxidationspotential des angeregten Perylenfarbstoffs lässt sich nach der *Rehm-Weller-Gleichung*^[157, 158] abschätzen ($E_{00} = 2.3 \text{ eV}$, $\lambda = 529 \text{ nm}$). Man erhält einen Wert von $\approx 1.7 \text{ V}$. Damit sollte eine Oxidation aller DNA-Basen, eventuell mit Ausnahme des Thymins^[91] ($E(T/T^{+\bullet}) \approx 1.7 \text{ V}$), möglich sein.

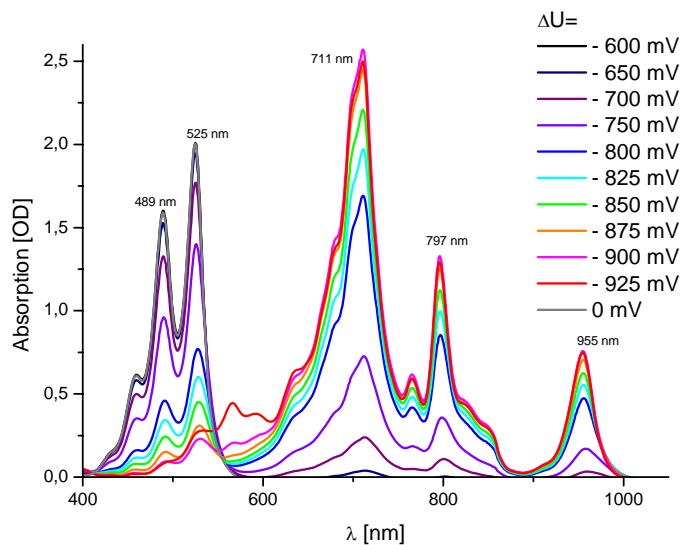


Abb.6-5: Spektroelektrochemie des Perylenbisimid-Bausteins **31**. 0.8 mM in DCM. Die Potentiale sind gegen einen willkürlich gewählten Nullpunkt angegeben.

Beim Anlegen eines steigenden negativen Potentials wird das Absorptionsspektrum des Perylenbisimids schwächer, während neue Absorptionsmaxima bei $\lambda = 711$, 797 und 955 nm hervortreten. Bemerkenswert ist der hohe Extinktionskoeffizient des Radikalanions. Das Maximum bei $\lambda = 711$ nm ist intensiver als das Maximum der Neutralverbindung. Das Radikalanion absorbiert also noch stärker als das bereits stark absorbierende Perylenbisimid. Ein isobestischer Punkt ist bei $\lambda = 553$ nm zu beobachten und zeigt eine direkte Konversion der Neutralverbindung zum Radikal an. Die Umwandlung ist reversibel, man erhält nach Reduktion des Potentials wieder das Spektrum der Ausgangsverbindung. Bei weiterer Steigerung des Potentials erscheint bei $\lambda = 560$ nm ein neues Maximum, während die Intensität der vom Radikalanion stammenden Signale wieder abnimmt. Es bildet sich in einem reversiblen Prozess das Dianion.

Der DNA-Baustein **31** zeigt spektroskopische Eigenschaften, die größtenteils mit denen anderer Perylenbisimide übereinstimmen.^[268] Die Art der Alkylreste am Perylenbisimid haben generell nur geringen Einfluss auf die Eigenschaften des Chromophors.^[263, 269] Deutliche Abweichungen konnten im elektrochemischen Verhalten festgestellt werden, die beiden Reduktionspotentiale liegen ungewöhnlich eng zusammen.

6.3 Synthese von Perylenbisimid-modifizierter DNA

Bisherige Versuche, Perylenbisimide in DNA einzubauen, beschränkten sich auf die Funktion des Perylenbisimids als endständiger Abschluss von DNA-Haarnadeln^[270-273] oder als Verbindungselement zwischen zwei DNA-Oligonukleotiden.^[264, 274-276] Im ersten Fall kann das Perylenbisimid über sein ausgedehntes π -Elektronensystem mit den π -Elektronensystemen der DNA wechselwirken, das Perylenbisimid sitzt wie ein Deckel auf einem Ende des DNA-Duplexes und kann durch die hydrophoben und π - π -Wechselwirkungen zur Stabilisierung von DNA-Tripelsträngen^[271, 272] beitragen. Im zweiten Falle kommt es zur Aggregation von zwei oder mehreren Perylenbisimideinheiten, so dass mehr oder weniger ausgedehnte, aus Perylenbisimid bestehende, Regionen von einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden umgeben sind, ohne dass das Perylenbisimid in den DNA-Basenstapel integriert oder ein DNA-Duplex ausgebildet wird.

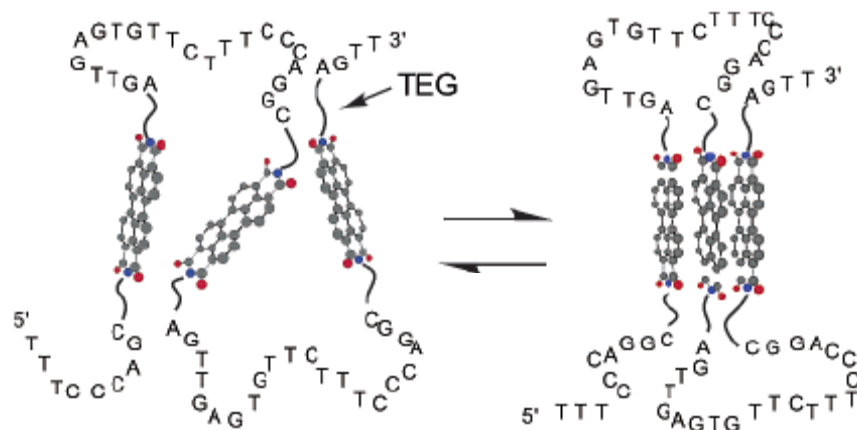


Abb.6-6: Aggregation von Perylenbisimideinheiten in DNA-Strängen ohne Duplexbildung. TEG = Tetraethylglycol^[275]

Die Synthese des Bausteines (32) für die DNA-Synthese nach der Phosphoramiditmethode verläuft unter den üblichen Bedingungen. Zum Einsatz im DNA-Syntheseautomaten wird das Produkt in Dichlormethan aufgenommen.



Mit den Sequenzen N21/F21 und N22/F22 wird erstmals ein Perylenbisimid (**F**) an den 5'-Terminus eines DNA-Einzelstranges angefügt bzw. das Oligonukleotid noch über die Position des Perylenbisimids hinaus erweitert und damit den Einbau inmitten der Basensequenz eines DNA-Einzelstranges durchgeführt. Als Gegenbase zum intern eingebauten Perylenbisimid (F22) wird einerseits ein Thymin (N22), andererseits eine abasische Stelle (O22) gewählt, um den Einfluss der Gegenbase prinzipiell abschätzen zu können. Das terminale Perylenbisimid (F21) erhält keine Gegenbase. Zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ist der Perylenbisimidbaustein nicht in der Lage, und es ist zu erwarten, dass das Perylenbisimidsystem aufgrund der großen zur π - π -Wechselwirkung fähigen Fläche auf dem Basenstapel aufliegt.

Der Perylenbisimidbaustein (**32**) ist aufgrund seiner Unlöslichkeit in Acetonitril auf Dichlormethan als Lösungsmittel angewiesen. In einer 1:1 Mischung aus Dichlormethan und Acetonitril bleibt der Baustein ausreichend löslich, so dass **32** in Dichlormethan gelöst simultan mit der Aktivatorlösung (Tetrazol in Acetonitril) zugeführt wird. Die Kupplungszeit wird auf 20 Minuten verlängert und nach erfolgter Kupplung werden nicht abreagierte Rückstände des Phosphoramidits mit Dichlormethan entfernt.

Das Kupplungsprotokoll sieht im Vergleich zum Standardverfahren einen höheren Verbrauch an Phosphoramidit vor. Wie bei allen auf Aminopropandiol basierenden DNA-Bausteinen ist die Kupplungseffizienz geringer als die nukleosidischer Bausteine.^[164, 235] Trotzdem kann der Perylenbisimidbaustein mit zufriedenstellender Ausbeute in Oligonukleotide eingebaut werden.

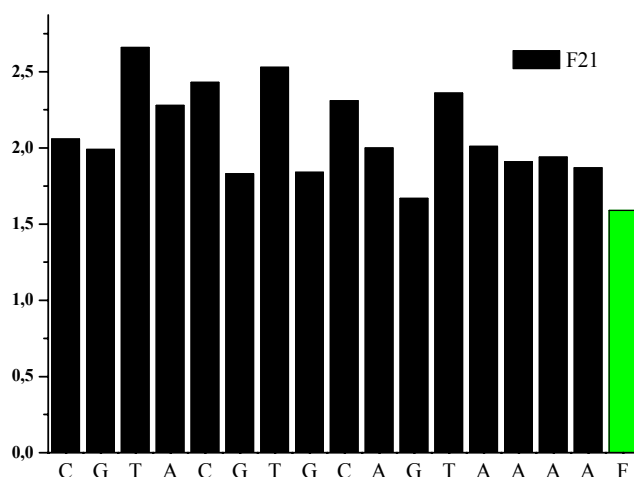


Abb.6-7: Tritylmonitor der DNA-Synthese von Perylenbisimid-modifiziertem F21.

Der Perylenbisimidbaustein ist chemisch sehr stabil, die Aufarbeitung der modifizierten DNA kann somit unter Standardbedingungen durchgeführt werden. Mit Perylenbisimid modifizierte DNA zeigt eine intensive rote Färbung, die Aufreinigung mittels HPLC nutzt die Absorption bei $\lambda = 548$ nm zur Detektion. Die Konfiguration des Stereozentrums in der 2-Ethyl-hexyl-Seitenkette hat keinen Einfluss auf die Retentionszeiten der modifizierten DNA-Stränge, es kann in der HPLC nur eine Verbindung detektiert werden.

6.4 Spektroskopische Untersuchung von Perylenbisimid-modifizierter DNA

Das Absorptionsspektrum von Perylenbisimid-modifizierten Einzelsträngen in Wasser zeigt die Absorption der DNA-Basen bei 260 nm sowie eine Absorption des Perylenbisimid-Chromophors zwischen 450 und 600 nm. Hier tritt eine deutliche Verschiebung der Absorptionsbanden gegenüber dem Perylenbisimidbaustein auf: Die Absorptionsmaxima von Perylenbisimid-modifizierter DNA befinden sich bei $\lambda = 507$ und 546 nm, verglichen mit den Absorptionsmaxima des Monomers **31** (in DCM) bei $\lambda = 525$ und 489 nm.

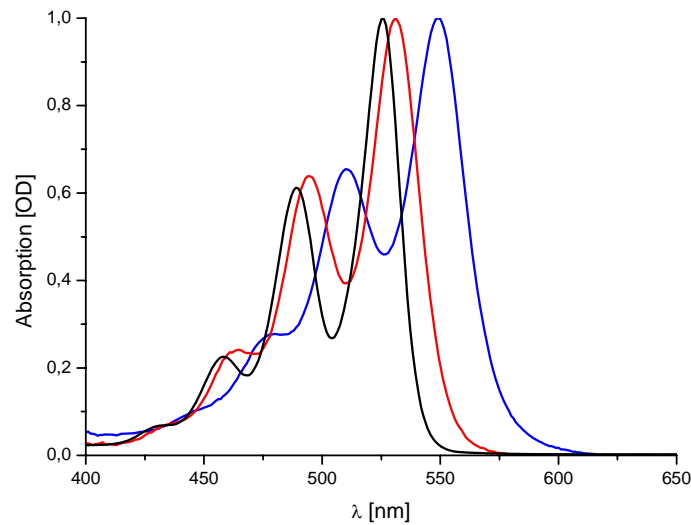


Abb.6-8: Vergleich der normierten Absorptionsspektren von Perylenbisimid-modifizierter DNA F22 in Wasser (blau) und DMSO (rot) gegen Perylenbisimid-Baustein (**31**) in DCM (schwarz). 2.5 μ M DNA, 18 μ M **31**.

Diese starke bathochrome Verschiebung ist auf die Wechselwirkung des Perylenbisimid-chromophors mit den benachbarten Basen zurückzuführen. Nimmt man das Absorptionsspektrum in DMSO auf, welches Stapelungswechselwirkungen zwischen Nucleobasen verhindert,^[236] so gleicht dieses Spektrum wieder beinahe dem des Monomers **31**. Die Wechselwirkung mit den benachbarten Basen ist bereits im Einzelstrang so stark, dass die Bildung des DNA-Duplexes keinen weiteren Effekt auf die Lage der Absorptionsmaxima ausübt.

Die Absorptionsspektren des Einzelstranges F22 und der Duplexe F22/N22 und F22/O22 zeigen die Absorption der Nucleobasen bei $\lambda = 260$ nm und die Absorption des Perylenbisimidchromophors zwischen $450 \text{ nm} < \lambda < 600 \text{ nm}$. Erhöht man die Temperatur, verschiebt sich das Maximum der Perylenbisimidabsorption im Einzelstrang von $\lambda = 549$ nm zu $\lambda = 545$ nm. Im Duplex beobachtet man das gleiche Phänomen, das vermutlich auf eine Schwächung der Wechselwirkung zwischen Perylenbisimid und benachbarten Nucleobasen zurückzuführen ist. Mit steigender Temperatur verringert sich der Grad der Basenstapelung, dementsprechend nimmt die Grundzustands-Wechselwirkung zwischen dem Perylenbisimid und den Nucleobasen ab.

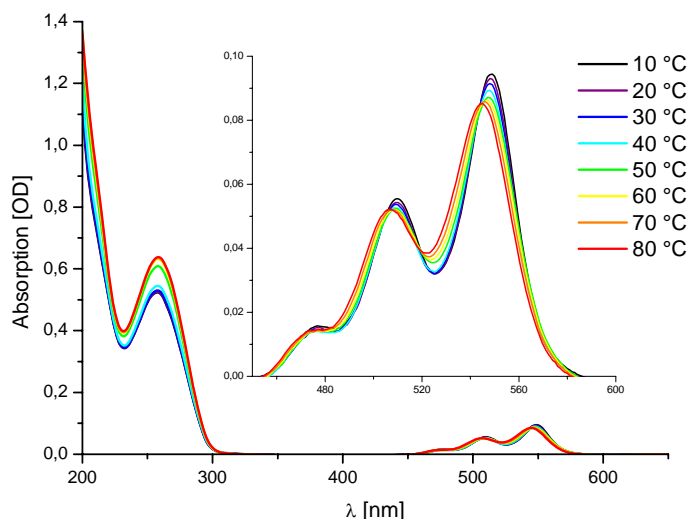


Abb.6-9: Temperaturabhängige Absorption des Duplexes F22/O22, 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer. Die Absorption des Perylenbisimids ist mit bloßem Auge sichtbar.

Der gesamte Absorptionsbereich des Perylenbisimids wird gleichmäßig verschoben. Damit ändert sich die Lage des weniger intensiven Maximums von $\lambda = 507$ nm nach $\lambda = 503$ nm. Der DNA-Duplex zeigt zwischen 50 und 60 $^{\circ}\text{C}$ eine sprunghafte Zunahme der Absorption bei $\lambda = 260$ nm, die das Aufschmelzen des Duplexes anzeigt. Im Bereich der Perylenbisimidabsorption ist dagegen keine sprunghafte Veränderung festzustellen. Die Änderung der Absorptionseigenschaften des Perylenbisimids korreliert damit nicht mit dem kooperativen Prozess der Dissoziation des DNA-Duplexes.

Dem Perylenbisimidbaustein sowie den Perylenbisimid-modifizierten DNA-Strängen ist ein sehr geringer Stokes-Shift gemein. Nimmt man die Spektren eines DNA-Einzelstranges in DMSO auf, so liegen zwischen dem Absorptions- und Emissionsmaximum nur 8 nm. Aus gerätetechnischen Gründen wird aber ein Abstand von 10 nm zwischen Anregungs- und niedrigster Emissionswellenlänge benötigt. Um den gesamten Emissionsbereich aufnehmen zu können erfolgt die Anregung des Perylenbisimidchromophors nicht bei der Wellenlänge des absoluten Absorptionsmaximums, sondern in das nächstintensivere lokale Maximum, das sich in wässriger Lösung bei $\lambda = 505$ nm ($\lambda = 495$ nm in DMSO) befindet.

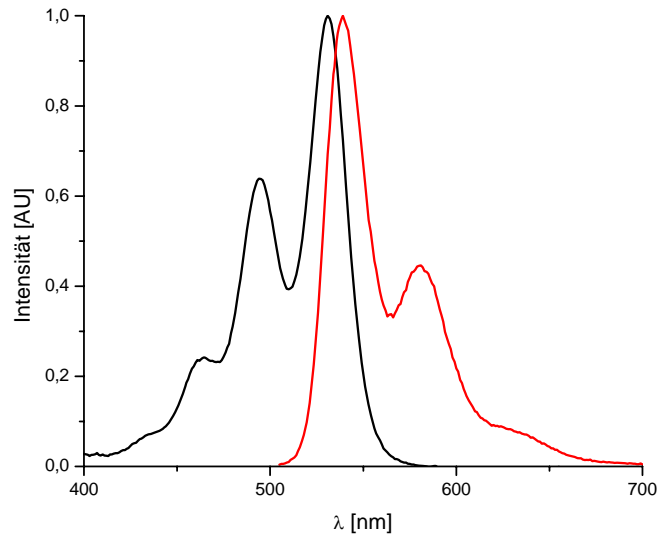


Abb.6-10: Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Perylenbisimid-modifizierter DNA F22 in DMSO. 2.5 μ M DNA, λ_{ex} = 495 nm.

Beide Perylenbisimid-modifizierten DNA-Einzelstränge F21 und F22 zeigen eine deutlich verminderte Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Perylenbisimidbaustein selbst. Der Betrag der Fluoreszenzquantenausbeute sinkt von ~ 73 % für den Baustein **31** auf $\sim 0,01$ % für Perylenbisimid-modifizierte DNA F22 in wässriger Lösung. Betrachtet man das Oxidationspotential des Perylenfarbstoffs, so ist ein Ladungstransfer auf benachbarte Nucleobasen ein möglicher und wahrscheinlicher Grund für die Fluoreszenzlöschung.

Erhöht man die Temperatur, so steigt die Fluoreszenzintensität. Dies kann mit der verminderten Stapelungswechselwirkung der Nucleobasen mit dem Perylenbisimid bei höherer Temperatur begründet werden, durch welche die Grundzustandswechselwirkung des Perylenbisimids mit den benachbarten Nucleobasen verringert wird. Liegen die DNA-Oligonucleotide in DMSO gelöst vor, so dass die Wechselwirkung mit anderen Nucleobasen vollständig unterbrochen sind^[236], lassen sich die Fluoreszenzeigenschaften des Perylenbisimids reproduzieren.

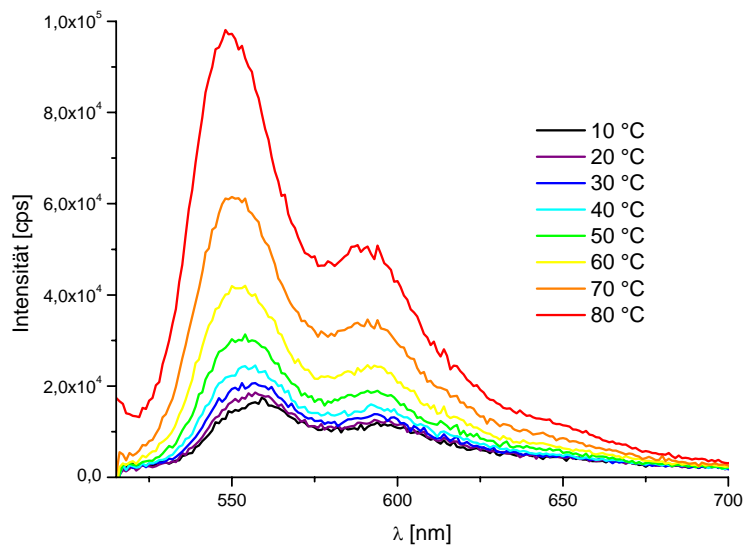


Abb.6-11: Fluoreszenzspektren von F22 in Abhängigkeit der Temperatur. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 505\text{nm}$.

Die Bildung des DNA-Duplexes hat auch auf die Fluoreszenzeigenschaften nur geringen Einfluss. Die Intensität der Fluoreszenz bleibt nahezu gleich: wie im Einzelstrang kann auch im Duplex ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bei steigender Temperatur beobachtet werden.

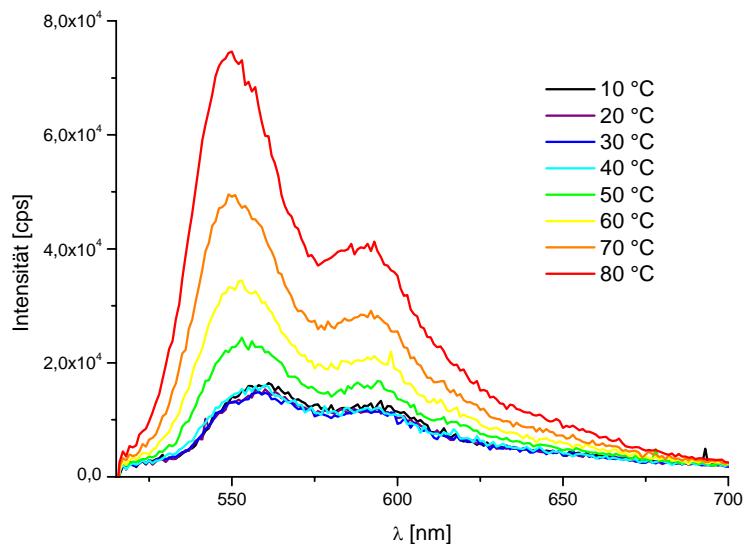
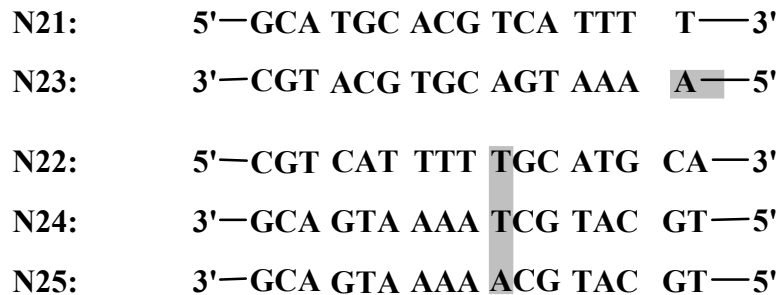


Abb.6-12: Fluoreszenz von Duplex F22/O22 in Abhängigkeit der Temperatur, 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 505\text{nm}$.

Zum Vergleich der Schmelzpunkte von Perylenbisimid-modifizierten Duplexen mit unmodifizierter DNA wurden DNA-Duplexe dargestellt, in denen die Perylenbisimid-modifikation entfernt (N23) bzw. durch natürliche Nucleobasen ersetzt (N24/25) wurde:



Zwischen den Schmelztemperaturen von Perylenbisimid-modifizierten DNA-Duplexen F21/N21 und unmodifizierte Duplexen N23/N21 zeigt sich ein Unterschied von 2 °C. Dies weist auf einen geringfügig stabilisierender Effekt des terminalen Perylenbisimids (DNA-Duplex F21/N21) hin.

Intern in die DNA integriertes Perylenbisimid hat einen großen Raumanspruch. Es ist auch nicht in der Lage, eine Basenpaarung einzugehen. Einerseits sollte damit ein destabilisierender Einfluss verbunden sein, andererseits übt das ausgedehnte π -System Wechselwirkungen mit den Nucleobasen aus, die zur Stabilität des Duplex beitragen. Ersetzt man die Perylenbisimidmodifikation in F22/N22 durch ein A-T-Basenpaar (N25/N22), so steigt der Schmelzpunkt geringfügig (um 2 °C). Perylenbisimid hat damit gegenüber einem Watson-Crick-Basenpaar einen destabilisierenden Einfluß auf einen DNA-Duplex. Verwendet man als Referenz aber ein nicht zur Watson-Crick-Paarung befähigtes Basenpaar T-T (N24/N22), so erhöht das Perylenbisimid den Schmelzpunkt um 6 °C. Im Vergleich zu einer abasischen Stelle (A-O, N25/O22, bzw. T-O, N24/O22) fällt der Unterschied noch drastischer aus: hier liegt der Schmelzpunkt von Perylenbisimid-modifizierter DNA N22/F22 um 10 °C (A-O, N25/O22) bzw. 14 °C (N24/O22, T-O) über dem Schmelzpunkt der unmodifizierten Duplexe. Die Perylenbisimidmodifikation ist damit in der Lage einen DNA-Duplex zu stabilisieren, wenn auch nicht in gleichem Maße wie eine Watson-Crick-Basenpaarung.

Im Vergleich der Perylenbisimid-modifizierten DNA-Duplexe dissoziiert der terminal modifizierte Duplex F21/N21 bei höherer Temperatur als die intern modifizierten Duplexe. In diesen hat das Perylenbisimid einen größeren stabilisierenden Effekt, da beide Flächen des

Chromophorsystems mit den benachbarten Basen wechselwirken können. Dies wird aber durch den großen Raumbedarf der Modifikation überkompensiert. Die Gegenbase übt nur einen sehr geringen Einfluss auf die Stabilität des Duplexes aus, wahrscheinlich befindet sich die Gegenbase in einer extrahelikalen Position und zeigt in die Furche der DNA-Helix (vgl. Abb. 6-21).

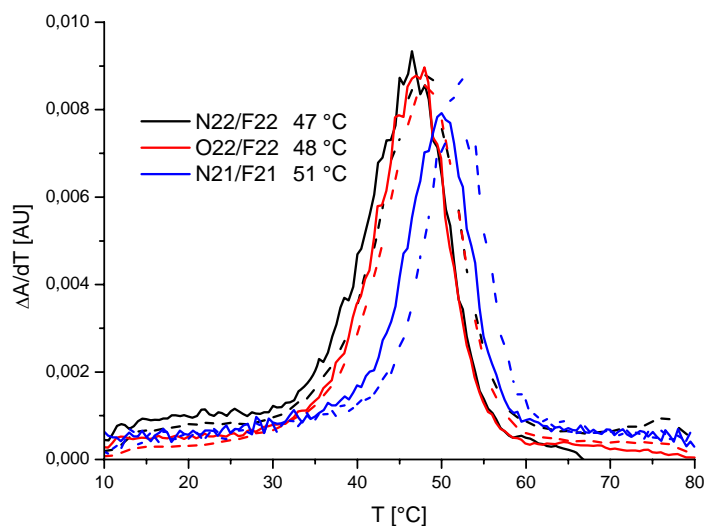


Abb.6-13: Ableitung der Schmelzpunktkurven von Perylenbisimid-modifizierten Duplexen. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, 10→80 °C (gepunktete Linie) bzw. 80→10 °C (durchgezogene Linie).

Das Perylenbisimid-modifizierte DNA-Oligonukleotid F21 trägt die Perylenbisimid-modifikation am 5'-Terminus der DNA und stellt deswegen eine Besonderheit dar. Der Perylenbisimidchromophor kann einerseits mit der benachbarten Nukleobase wechselwirken, gleichzeitig aber ist die gegenüberliegende Seite seines π -Elektronensystems von außen gut zugänglich.

Das Absorptionsspektrum des Einzelstranges F21 zeigt keine gravierenden Unterschiede zum Spektrum von F22. Im Vergleich der Duplexe erkennt man bei F21/N21, dass die Absorption bei $\lambda = 548$ nm mit zunehmender Temperatur ansteigt, während die Intensität dieser Bande in F22/N22 mit Temperaturerhöhung abfällt.

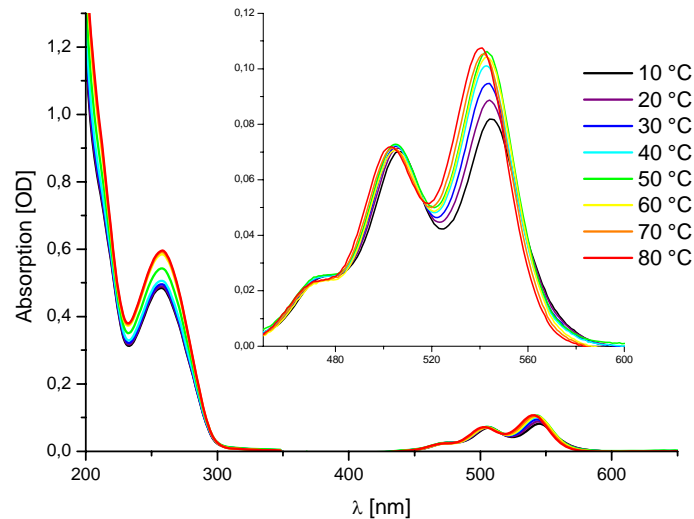


Abb.6-14: Absorption des Duplexes F21/N21 in Abhängigkeit der Temperatur. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer.

Verfolgt man die Absorption bei $\lambda = 548$ nm bei steigender Temperatur, so zeigen Perylenbisimid-modifizierte Einzelstränge und der Duplex F22/O22 ein Absinken der Absorption, die Signalintensität im Duplex F21/N21 nimmt dagegen bis $T = 59$ °C zu, mit einem deutlichen Knick bei $T = 50$ °C. Bei höheren Temperaturen sinkt die Absorption wieder. Nach der Dissoziation des Duplex erhält man ein Verhalten wie im Einzelstrang. Die Doppelsträngige DNA F21/N21 weicht in ihren Eigenschaften deutlich von Einzelsträngen und intern modifizierten perylenbisimidhaltigen Duplexen ab.

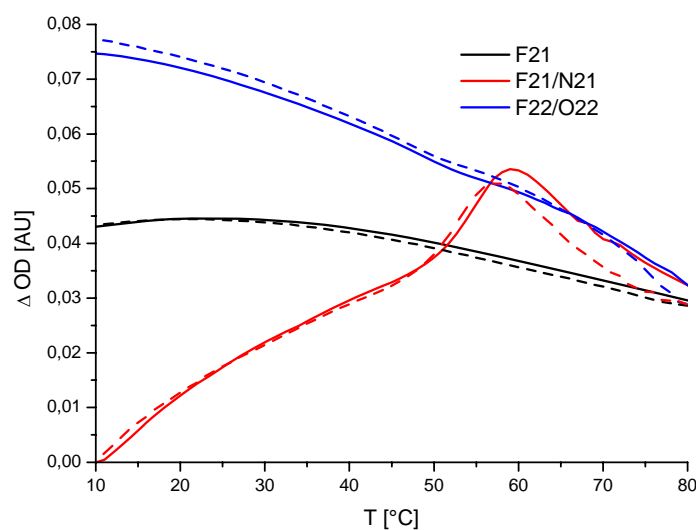


Abb.6-15: Absorptionsänderung bei $\lambda = 548$ nm von F21 und Duplexen F21/N21 und F22/O22 gegen die Temperatur. 2.5 μM ssDNA bzw. 10 μM dsDNA in 10 mM NaP_i -Puffer. 80 \rightarrow 10 °C (---) und 10 \rightarrow 80 °C (—).

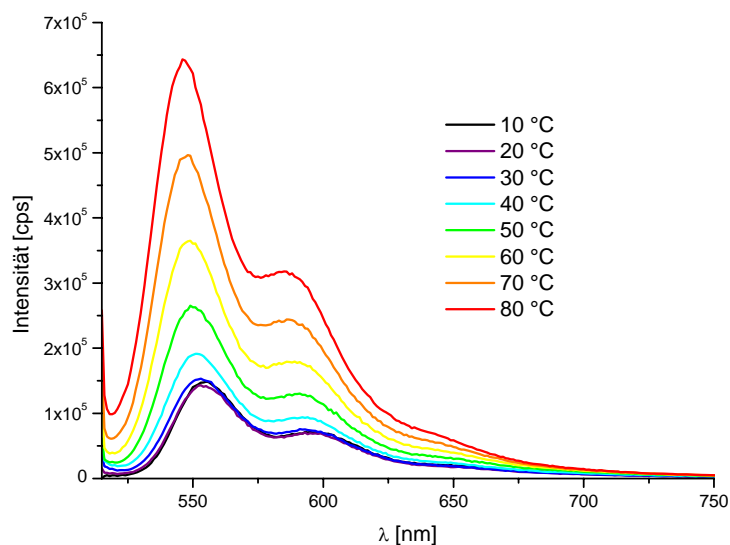


Abb.6-16: Fluoreszenz des Einzelstranges F21 in Abhängigkeit von der Temperatur, 2,5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 505$ nm.

Das Fluoreszenzspektrum des Einzelstrangs F21 mit terminalem Perylenbisimid unterscheidet sich nur wenig von den Spektren des einzelsträngigen F22 und dessen Duplexen. Die Bildung des Duplex F21/N21 verändert das Fluoreszenzspektrum stark, es tritt eine breite Bande um $\lambda = 660$ nm auf. Bei Erwärmung nimmt die Fluoreszenzintensität dieser Bande beinahe linear ab, bis ab 50 °C die langwellige Emissionsbande nicht mehr wahrzunehmen ist.

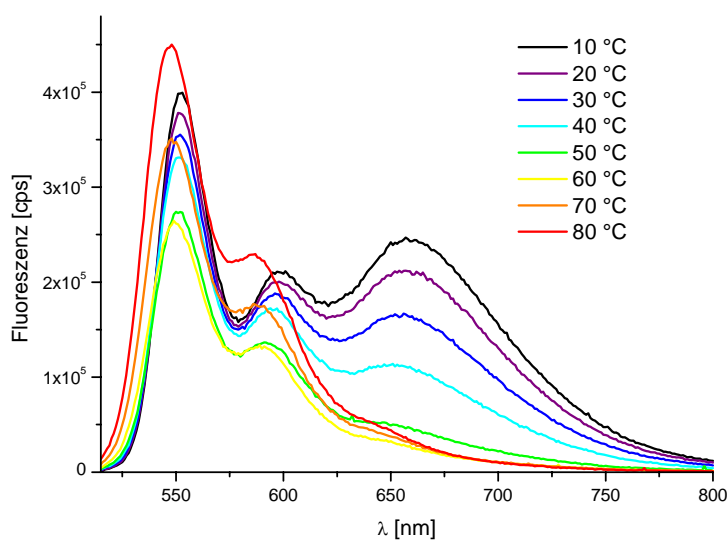


Abb.6-17: Fluoreszenz von Duplex F21/N21 in Abhängigkeit der Temperatur, 2,5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 505$ nm.

Das Auftreten dieser zusätzlichen Bande lässt sich am besten durch Aggregationseffekte erklären. Zwischen zwei terminal mit Perylenbisimid modifizierten DNA-Duplexen bildet sich durch Wechselwirkung der nach außen zeigenden Seiten der π -Systeme des angeregten Perylenbisimids ein Excimer.

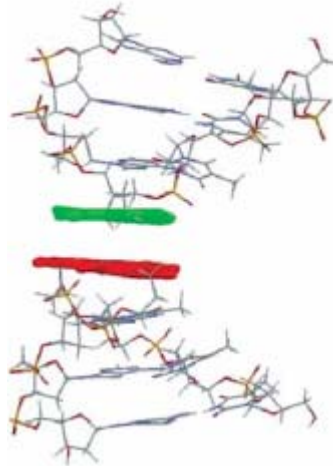


Abb.6-18: Postulierte Struktur eines Dimers aus Perylenbisimid-modifizierter DNA. (aus ^[273])

Die Bildung von Oligomeren zwischen Perylenbisimiden ist von *Li et al.* an Polyethylenglycol-verbrückten Chromophoren untersucht worden.^[274-276] Auch in diesem Fall zeigt sich eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge bei zunehmendem Aggregationsgrad. Die Fluoreszenz erfolgt nicht mehr in den Grundzustand, sondern in höhere vibrationsangeregte Zustände. Gleichzeitig verändern sich die Intensitäten der Absorption: mit sinkendem Aggregationsgrad steigt die Intensität des $0 \rightarrow 0$ – Überganges ($\lambda = 548$ nm in Perylenbisimid-modifizierter DNA) in Relation zum $0 \rightarrow 1$ – Übergang ($\lambda = 505$ nm). Übertragen auf den DNA-Duplex F21/N21 erklärt dies die Zunahme der Absorptionsintensität bei $\lambda = 548$ nm bei steigender Temperatur. Der Duplex F22/O22 ist zu solch einer Aggregation der Perylenbisimidchromophore nicht imstande, hier ist eine Abnahme der Intensität des $0 \rightarrow 0$ – Überganges zu beobachten.

Je höher die Konzentration des DNA-Duplex, desto intensiver wird die Excimer-Bande im Verhältnis zur Emission des Perylenbisimids. Bei 80 °C liegt kein Duplex mehr vor, die Fluoreszenzspektren von einzelsträngiger DNA verändern sich in ihrer Form nicht durch eine Änderung der Konzentration. Lediglich die Intensität der absorptionskorrigierten Fluoreszenz verringert sich auf etwa die Hälfte. Auch die korrigierte Fluoreszenzintensität des DNA-Duplexes sinkt mit steigender Konzentration. Allgemein ist die Fluoreszenzintensität nicht linear von der Absorption (und damit von der Konzentration) abhängig, bei steigenden

Konzentrationen verringert sich die absorptionskorrigierte Intensität der Emission aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit der strahlungslosen Desaktivierung durch intermolekulare Wechselwirkungen.

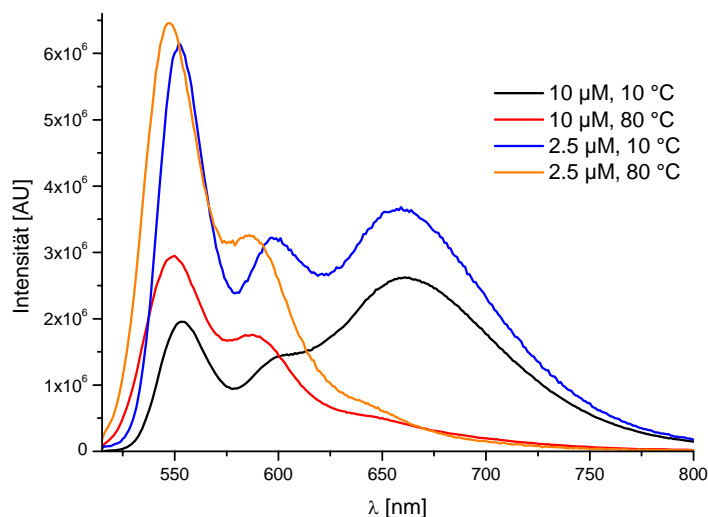


Abb.6-19: Absorptionskorrigierte Fluoreszenzen von Duplex F21/N21 in Abhängigkeit von Konzentration und Temperatur, $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$ in 10 mM NaP_i-Puffer.

Die Intaktheit der DNA-Duplex-Struktur ist für die Stabilität des Excimers zwingend notwendig: unabhängig von der Temperatur tritt die Excimerbande im Einzelstrang nicht auf. Der Schmelzpunkt des Duplexes liegt bei ca. 51 °C, und oberhalb dieser Temperatur ist selbst in Anwesenheit des Gegenstranges keine Fluoreszenz des Excimers zu beobachten. Im Gegensatz zu dem hier betrachteten System zeigen die von *Li et al.* untersuchten, durch DNA-Einzelstränge verbundenen Perylenbisimid-Chromophore ein gerade entgegengesetztes Aggregationsverhalten.^[275] Erhöht man die Temperatur, so aggregieren die Perylenbisimide zu oligomeren Stapeln (vgl. Abb 6-6). Dieser Effekt wird durch die endotherme Enthalpie für die Aggregation von Perylenbisimiden begründet. Der endotherme Beitrag stammt aus der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den großflächigen aromatischen Systemen und übertrifft in diesem Beispiel die exothermen Enthalpien der π - π -Wechselwirkungen und der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen.

Das CD-Spektrum des intern mit Perylenbisimid modifizierten Duplex F22/O22 besitzt die Form einer B-DNA. Dies zeigt, dass die Struktur der DNA trotz der Störung durch den Perylenbisimidbaustein weiterhin intakt ist und die natürliche Konformation annimmt.

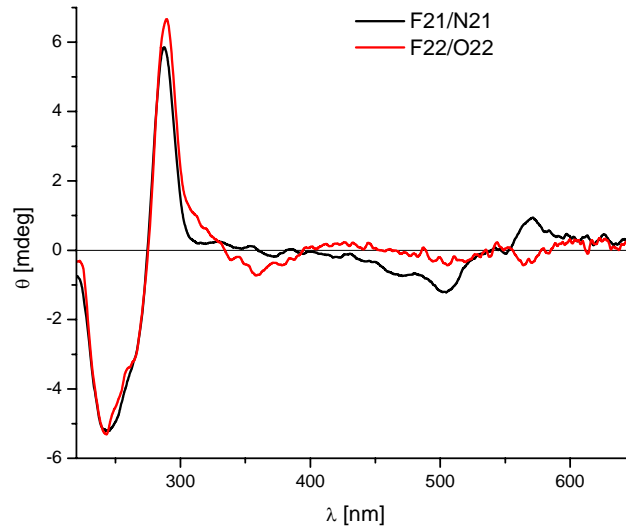


Abb.6-20: CD-Spektren von F21/N21 (schwarz) und F22/O22 (rot), 10 μ M DNA in 10 mM NaP_i-Puffer.

Der mit Perylenbisimid am 5'-Terminus modifizierte Duplex F21/N21 zeigt zusätzlich zu dem Spektrum einer B-DNA einen deutlichen *Cotton*-Effekt zwischen 450 nm < λ < 600 nm, im Bereich der Absorption des Perylenbisimids. Dieses Signal verstärkt sich bei steigender Konzentration. Dies ist eine weitere Bestätigung für die Anwesenheit eines Perylenbisimid-Excimers. Ein vergleichsweise schwacher *Cotton*-Effekt zwischen 450 nm < λ < 600 nm ist auch im Spektrum von F22/O22 zu beobachten.

Die Intensität des *Cotton*-Effekts ist für zwei identische parallele Chromophore unter anderem vom Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten abhängig. Beträgt der Winkel 0 ° oder ein Vielfaches von 90 °, so sinkt die Intensität auf 0. Die geringe Intensität der CD-Bande kann ein Hinweis auf eine beinahe deckungsgleiche Anordnung beider Chromophore sein, eine Anordnung die von di- und oligomeren Aggregaten des Perylenbisimids üblicherweise eingenommen wird.^[273, 277]

6.5 Zusammenfassung

Ein Perylenbisimid-Farbstoff konnte erfolgreich in DNA-Oligonukleotide inkorporiert werden. Die Stapelungswechselwirkung des Perylenbisimidchromophors mit den benachbarten DNA-Basen ist bereits im Einzelstrang sehr stark und führt zu deutlichen Veränderungen der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften. Photoangeregtes Perylenbisimid ist in der Lage der DNA ein Elektron zu entziehen, was zu einem deutlichen

Abfall der Fluoreszenzintensität führt. Der Perylenbisimidchromophor verhindert weder am 5'-Terminus noch in der Position mitten im Basenstapel die Formation einer B-DNA-Konformation von DNA-Duplexen.

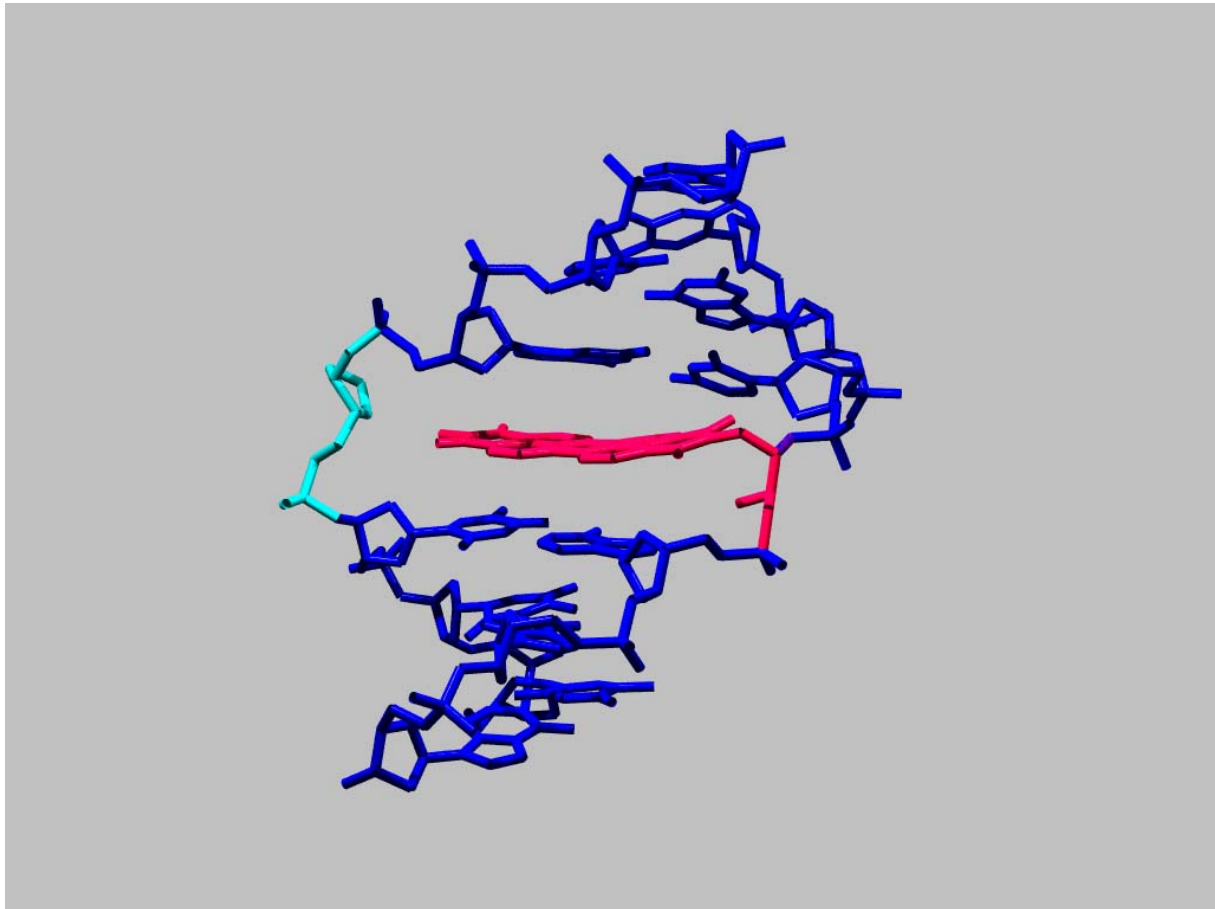


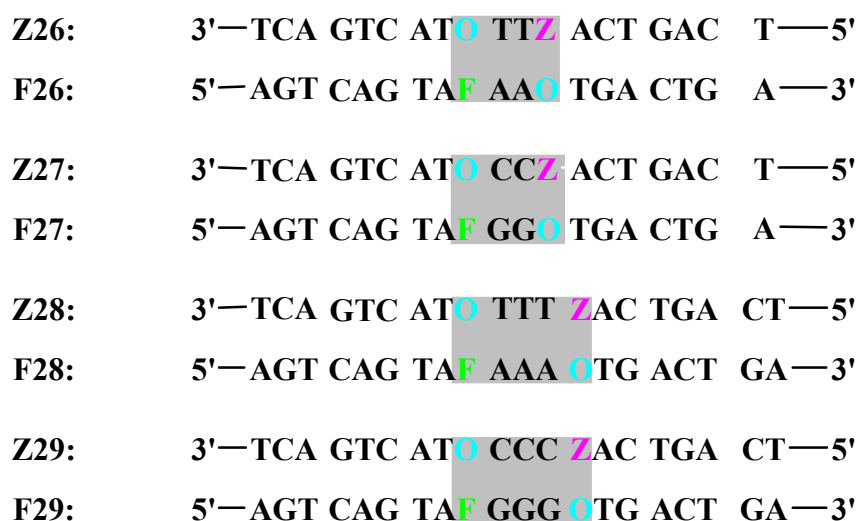
Abb.6-21: Modell einer mit Perylenbisimid modifizierten DNA. Als Gegenbase wurde eine abasische Stelle eingesetzt, die 2-Ethylhexylgruppe des Perylenbisimids wurde durch Methyl ersetzt.

Am 5'-Terminus mit Perylenbisimid modifizierte DNA-Duplexe bilden ein Excimer, das durch Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie nachgewiesen werden kann. Die Formation des Excimers ist auf die Intaktheit der DNA-Duplexe angewiesen.

7 Synthese eines Donor-Akzeptor-Systems zur spektroskopischen Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch DNA

Eine Aufklärung des reduktiven Ladungstransportes durch DNA ist allein mit chemischen Methoden und *steady-state*-Spektrometrie nicht möglich. Da die Ladungstransfervorgänge im Bereich von $k \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$ ablaufen ist eine Untersuchung durch zeitaufgelöste Spektroskopie notwendig. Dazu stehen in der Arbeitsgruppe *Fiebig* (Boston College) Versuchsapparaturen mit Auflösungen im Femtosekundenbereich zur Verfügung.

Hiermit soll der Ladungstransfer durch einen DNA-Duplex untersucht werden. Als spektroskopierbarer Ladungsdonor wird Phenothiazin verwendet, dessen Radikalkation bei $\lambda = 511 \text{ nm}$ zu detektieren ist und dessen Anregungswellenlänge zu $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$ gesetzt wird. Dabei wird selektiv der Phenothiazinchromophor angeregt ohne gleichzeitig die DNA-Nukleobasen zu beeinflussen. Der Ladungsakzeptor sollte mit einer geringen Ansprechzeit ein spektroskopisch auslesbares Signal produzieren. Aufgrund der eindeutigen Absorption seines Radikalanions bei $\lambda = 711 \text{ nm}$ wird Perylenbisimid eingesetzt. In den Duplexen F26/Z26-F29/Z29 werden der Ladungsdonor und -akzeptor durch zwei bzw. drei A-T- bzw. G-C-Paare separiert, um einen Einfluss der Art und Anzahl der Basen auf den reduktiven Elektronentransfer zu untersuchen.



Die DNA-Stränge wurden nach den bereits beschriebenen Verfahren synthetisiert und isoliert. Der Einbau von nichtnukleosidischen Bausteinen wirkt sich deutlich auf die Kupplungseffizienz aus, man erhält bevorzugt Abbruchprodukte, die keine Modifikation tragen und im HPLC- Spektrum deutlich zu erkennen sind.

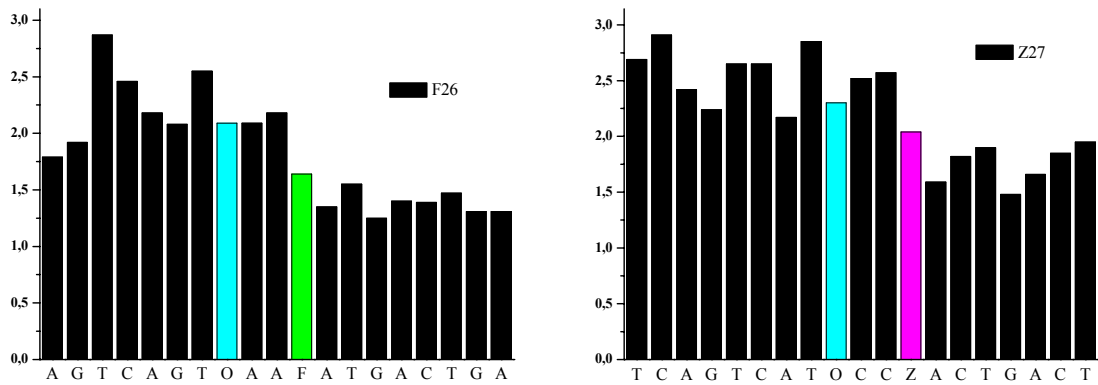


Abb.7-1: Tritylmonitore der DNA-Synthesen von F26 (links) und Z27 (rechts).

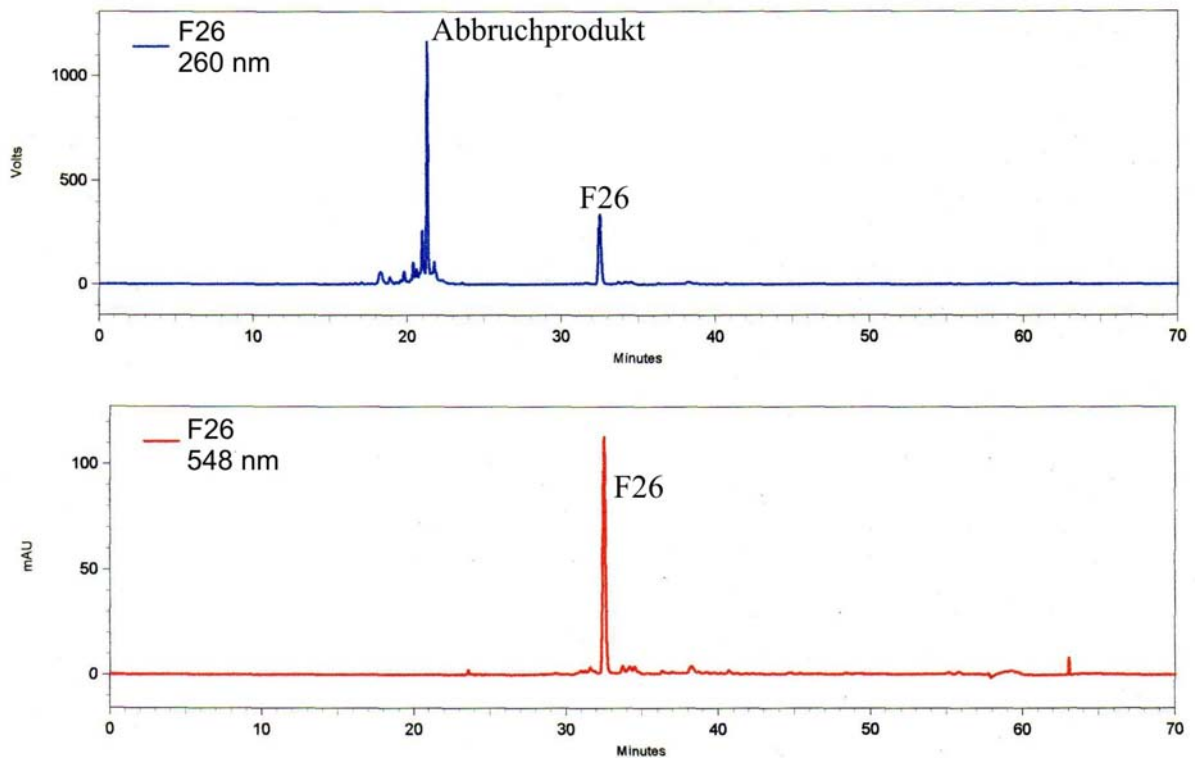


Abb.7-2: Spektrum der HPLC-Reinigung am Beispiel von Strang F26. Blau: Absorption bei 260 nm, rot: Absorption bei 548 nm.

7.1 Untersuchungen durch steady-state-Spektroskopie

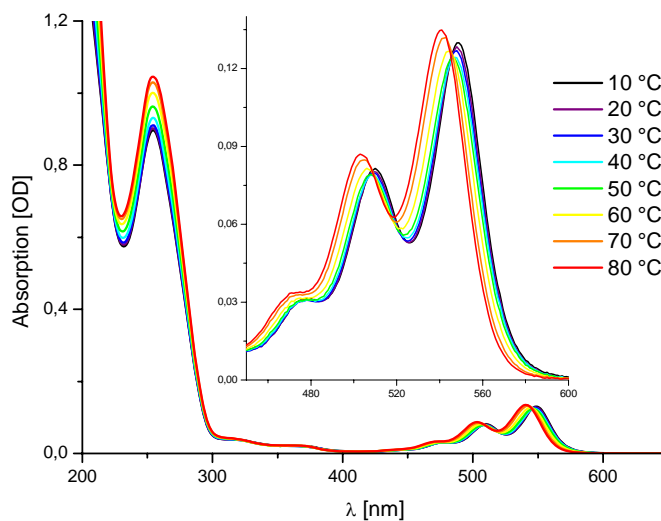


Abb.7-3: Temperaturabhängige Absorption des Duplex F26/Z26. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer.

Die Absorptionsspektren der Einzelstränge F26-F29 zeigen das bereits bekannte Bild der Perylenbisimid-modifizierten DNA. Die Absorptionsmaxima des Perylenbisimidsystems verschieben sich bei Temperaturerhöhung geringfügig zu kürzeren Wellenlängen. Dieser Effekt bleibt im Duplex erhalten, außerdem erkennt man deutlich das Aufschmelzen des Duplexes bei ca. 50 °C durch die sprunghafte Zunahme der Absorption bei $\lambda = 260$ nm.

Die Anwesenheit des Phenothiazin-Chromophors wird durch die Absorptionsbande bei $\lambda > 300$ nm aufgezeigt, der geringe Extinktionskoeffizient des Phenothiazins im Vergleich mit dem Perylenbisimid zeigt sich in diesem Fall besonders deutlich. Eine Verschiebung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von $\lambda = 260$ nm zu $\lambda = 254$ nm lässt sich ebenfalls als Effekt des Phenothiazins deuten, dessen Absorptionsmaximum sich bei $\lambda = 253$ nm befindet.

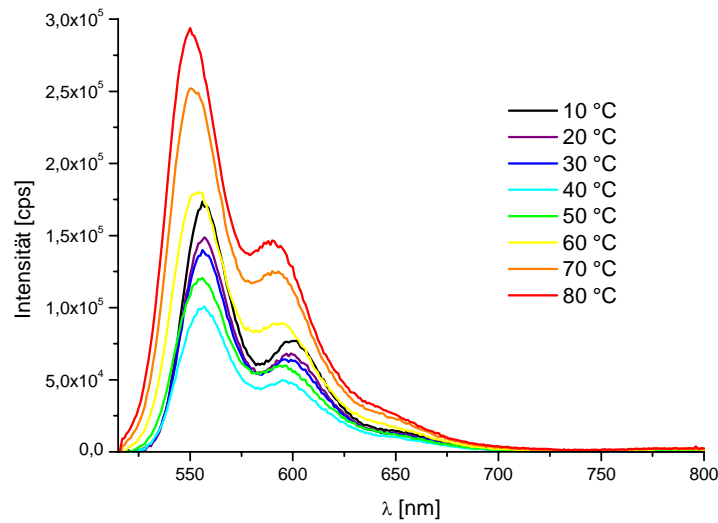


Abb.7-4: Fluoreszenz des Duplexes F26/Z26 in Abhängigkeit der Temperatur. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{ex}}=505$ nm.

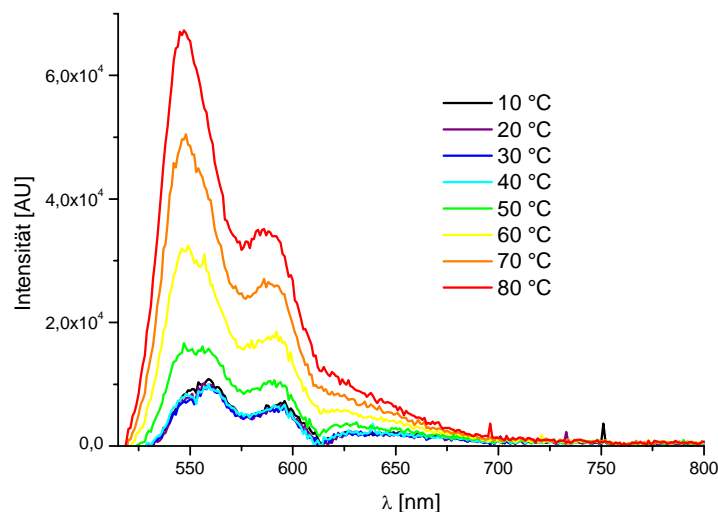


Abb.7-5: Fluoreszenz des Duplexes F29/Z29 in Abhängigkeit der Temperatur. 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{ex}}=505$ nm.

Beide Chromophore im DNA-Duplex lassen sich selektiv anregen. Die Anregungswellenlänge der Phenothiazin-Modifikation liegt bei $\lambda=315$ nm, das Perylenbisimid wird bei $\lambda=505$ nm angeregt. Wie auch in den DNA-Sequenzen Z17-Z20, die nur mit Phenothiazin modifiziert sind, zeigt sich sowohl in den Einzelsträngen Z26-Z29 und den zugehörigen Duplexen Z26/F26–Z29/F29 nur eine sehr schwache Fluoreszenz bei einer Anregung mit $\lambda=315$ nm. Regt man im Absorptionsbereich des Perylens bei $\lambda=505$ nm an, fluoresziert der Chromophor mit Intensitätsmaxima bei $\lambda=550$ nm und 590 nm. Eine Erhöhung der Temperatur führt in den Sequenzen F27 und F29 zu einer stetigen Erhöhung der

Fluoreszenzintensität, während die Intensität der Fluoreszenz von F26 und F28 bis zu einer Temperatur von 40 °C absinkt um erst dann anzusteigen. Die 5'-benachbarte Base ist in allen Sequenzen identisch. Beide Duplexe, die ungewöhnliches Verhalten zeigen, haben 3'-seitig ein benachbartes A. Die Sequenz F22, obwohl sich dort ebenfalls ein A 3'-benachbart vom Perylen befindet, zeigt aber ein stetiges Ansteigen der Fluoreszenzintensität bei Erwärmung.

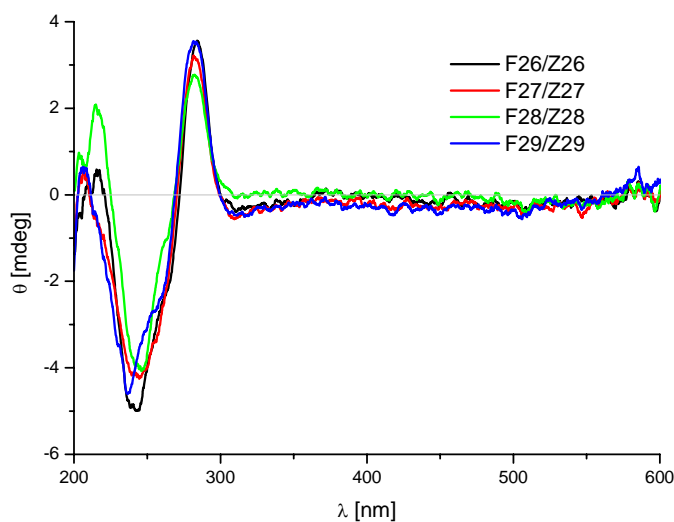


Abb.7-6: CD-Spektren der Perylenbisimid- und Phenothiazin-modifizierten Duplexe. 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i-Puffer.

Wie auch die korrespondierenden einfach modifizierten DNA-Duplexe Z17/N1-Z20/N20 und F22/O22 bilden die zweifach modifizierten Duplexe F26/Z26-F29/Z29 eine B-DNA-Struktur aus. Im Absorptionsbereich des Perylenbisimids ($450 \text{ nm} < \lambda < 600 \text{ nm}$) und des Phenothiazins ($300 \text{ nm} < \lambda < 350 \text{ nm}$) ist ein schwacher *Cotton*-Effekt zu beobachten.

Die Schmelztemperaturen der DNA-Duplexe liegen im Bereich um 50 °C, wie sich auch im Absorptionsspektrum bereits ablesen ließ. Das Fehlen zweier Watson-Crick-Basenpaare macht sich im vergleichsweise niedrigen Wert der Schmelztemperaturen bemerkbar, auch wenn die bereits diskutierten stabilisierenden Effekte diesem entgegenwirken.

7.2 Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen

Die Duplexe Z26/F26-Z29/F29 wurden mittels zeitaufgelöster Transientenabsorptionsspektroskopie untersucht. Dabei wurden zwei Experimente durchgeführt:

- 1.) Anregung des Perylenbisimids mit $\lambda = 550$ nm.
- 2.) Anregung des Phenothiazins bei $\lambda = 315$ nm.

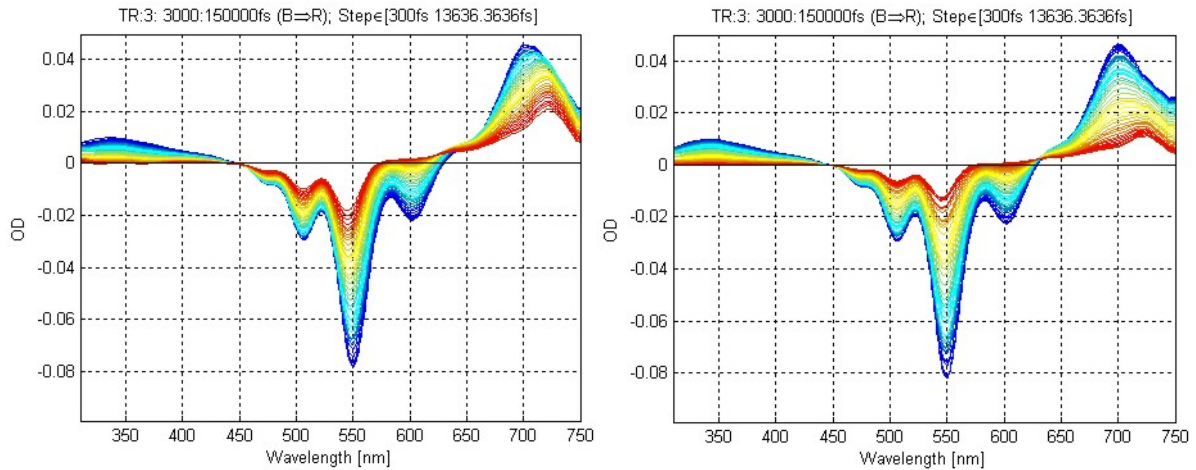


Abb.7-7: Zeitaufgelöste Transientenabsorption der DNA-Duplexe F26/Z26 (links) und F28/Z28 (rechts). Dargestellt ist der Zeitabschnitt von 3 ps (blau) bis 150 ps (rot). $\lambda_{\text{exc}} = 550$ nm. 0.5 mM DNA in 10 mM NaP_i-Puffer.

Die Anregung von Perylenbisimid führt zu vier Prozessen, die in der zeitaufgelösten Spektroskopie zu beobachten sind. Der Grundzustand des Perylenbisimids wird durch die Anregung depopuliert, die Absorption des Grundzustands nimmt ab (sog. *bleaching*, Ausbleichen des Grundzustandes). Zu beobachten ist eine negative Absorptionsänderung im Bereich $450 \text{ nm} < \lambda < 600 \text{ nm}$. Eine weitere negative Absorptionsänderung tritt zwischen $550 \text{ nm} < \lambda < 650 \text{ nm}$ auf. Hierbei handelt es sich um die stimulierte Emission des angeregten Perylenbisimids. Betrachtet man den Wellenlängenbereich $650 \text{ nm} < \lambda < 750 \text{ nm}$, so beobachtet man eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda \approx 700 \text{ nm}$ zu $\lambda \approx 720 \text{ nm}$. Das zuerst entstehende Signal ist dem angeregten Zustand des Perylenbisimids zuzuordnen, welcher mit fortschreitender Zeit in den ladungstrennten Zustand übergeht. Die Absorption des Perylenbisimid-Radikalanions wird bei $\lambda \approx 720 \text{ nm}$ detektiert.

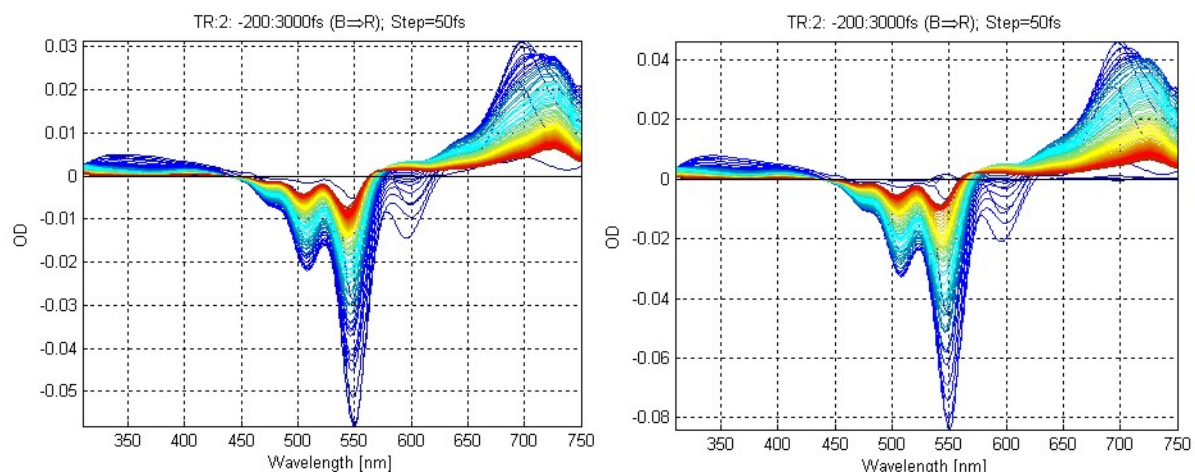


Abb.7-8: Zeitaufgelöste Transientenabsorption der DNA-Duplexe F27/Z27 (links) und F29/Z29 (rechts). Dargestellt ist der Zeitabschnitt von -200 fs (blau) bis 3 ps (rot). $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$. 0.5 mM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer.

Die Entstehung des Perylenbisimid-Radikalanions ist ein Beleg für die erfolgte Injektion einer positiven Ladung in die DNA. Wie anhand des Oxidationspotentials von Perylenbisimid bereits angenommen wurde (vgl. Kap.6.2), nimmt das Perylenbisimid ein Elektron von der benachbarten Nukleobase auf. Die Ladungsinjektion in die DNA sollte schneller verlaufen, wenn eine leichter zu oxidierende Nukleobase dem Perylenbisimid benachbart ist. Die zeitaufgelösten Transientenabsorptionsspektren der DNA-Duplexe F27/Z27 und F29/Z29 belegen, dass die gleichen Prozesse wie in den Duplexen F26/Z26 und F28/Z28 auftreten. Die Bildung des Radikalanions geschieht jedoch deutlich schneller. Während die Bildung des Perylenbisimid-Radikalanions in Nachbarschaft zu Adenin im Zeitbereich zwischen 3 ps und 150 ps geschieht, ist der Prozess der Ladungstrennung neben einem Guanin bereits nach 3 ps abgelaufen.

Ein erfolgreicher Transport der injizierten positiven Ladung durch die DNA führt zur Bildung des Radikalkations des Elektronenakzeptors. Die DNA-Duplexe F26/Z26-F29/Z29 sind mit Phenothiazin modifiziert, dessen Radikalkation bei $\lambda = 512 \text{ nm}$ absorbiert (s. Kap. 4.2). Diese Absorption überlagert mit der Grundzustandsabsorption des Perylenbisimids. Die Untersuchung von oxidativen Ladungstransferprozessen ist nur mit Hilfe weiterer Berechnungen möglich. Diese werden von der Arbeitsgruppe *Fiebig* durchgeführt, sind aber noch nicht abgeschlossen und nicht Gegenstand dieser Arbeit.

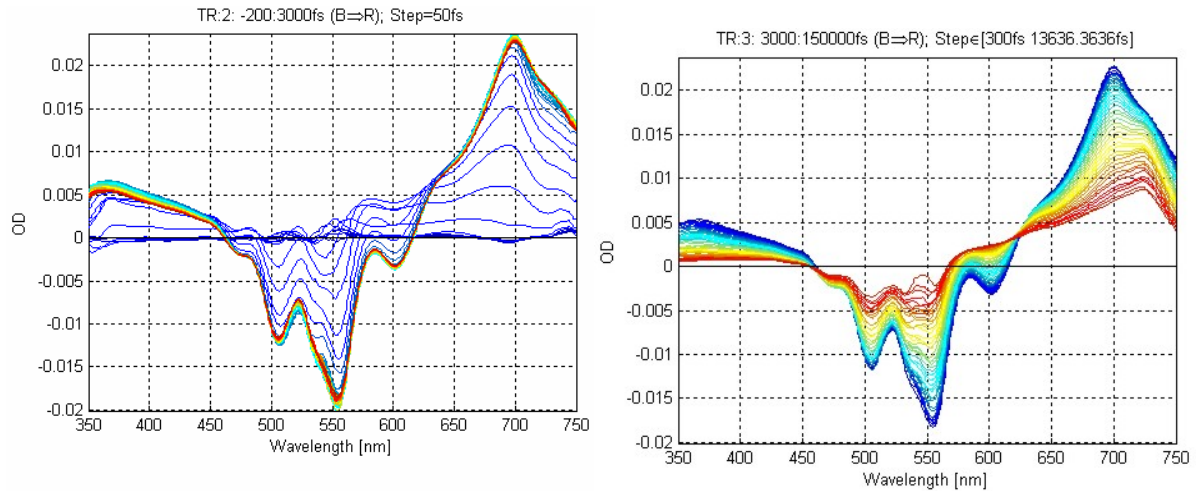


Abb.7-9: Zeitaufgelöste Transientenabsorption des DNA-Duplexes Z26/F26. Dargestellt ist der Zeitabschnitt von -200 fs bis 3 ps (links) und von 3 ps bis 150 ps (rechts), jeweils von blau zu rot. $\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm, 0.5 mM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer.

Die Anregung des Phenothiazinchromophors bei $\lambda = 315$ nm führt zu einem schnellen (ca. 0.5 ps) Ausbleichen der Grundzustandsabsorption des Perylenbisimids. Mit ähnlich großer Geschwindigkeit bildet sich der angeregte Zustand des Perylenbisimids, zu beobachten bei $\lambda \approx 700$ nm. Die Bildung des Radikalanions verläuft, wie auch bei der Anregung des Perylenbisimids, in Nachbarschaft zu G schneller als neben A.

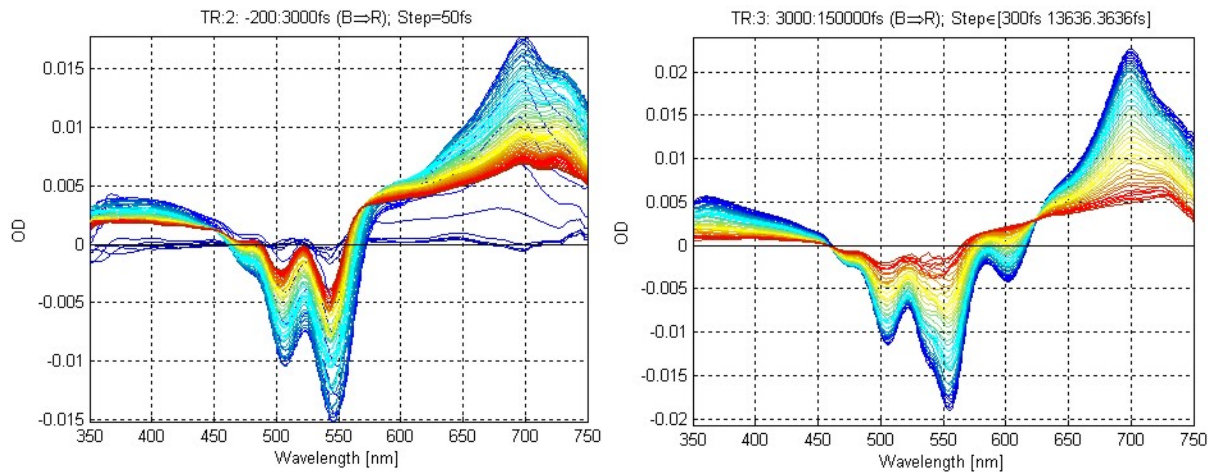


Abb.7-10: Zeitaufgelöste Transientenabsorption der DNA-Duplexe Z27/F27 (links) und Z28/F28 (rechts). Dargestellt ist der Zeitabschnitt von -200 fs bis 3 ps (links) bzw. von 3 ps bis 150 ps (rechts), jeweils von blau zu rot. $\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm, 0.5 mM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer.

Wäre ein reduktiver Elektronentransfer vom angeregten Phenothiazin durch die DNA zum Perylenbisimid der einzige stattfindende Prozess, so würde man ein Ausbleichen des Perylenbisimid-Grundzustandes und die Entstehung des Radikalanions ($\lambda \approx 720$ nm) erwarten. Der angeregte Zustand des Perylenbisimids kann aber nicht durch Elektronentransfer gebildet

werden. In einem vergleichbaren Experiment von *Carell et al.* wurden DNA-Haarnadeln untersucht, die mit Perylenbisimid sowie einem Flavinderivat modifiziert waren. Auch in diesem Experiment konnten keine Raten des Elektronentransfers bestimmt werden, was mit einem Energietransfer vom angeregten Flavin zum Perylenbisimid erklärt wurde.

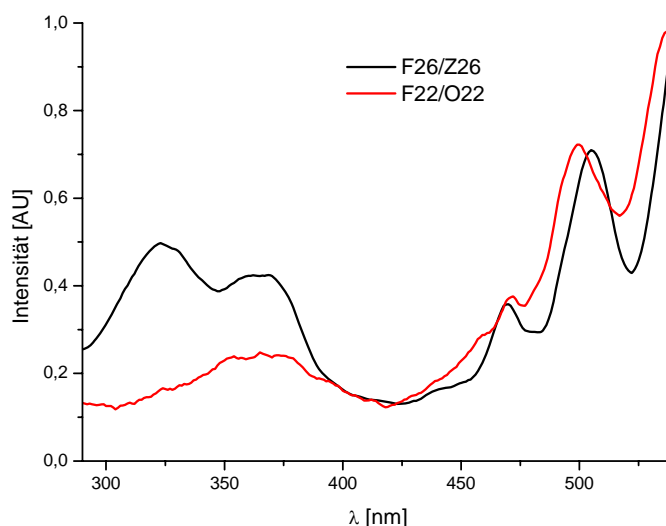


Abb.7-11: Anregungsprofile von Perylenbisimid-modifizierter DNA F22/O22 und Perylenbisimid- und Phenothiazin-modifizierter DNA F26/Z26. 2.5 μM F26/Z26, 10 μM F22/O22, jeweils in 10 mM NaPi, $\lambda_{\text{em}} = 555$ nm.

Das Anregungsspektrum von Perylenbisimid- und Phenothiazin-modifizierter DNA bestätigt einen Energietransfer vom angeregten Phenothiazin zum Perylenbisimid. Während die Fluoreszenz mit $\lambda_{\text{em}} = 555$ nm in Perylenbisimid-modifizierter DNA F22/O22 hauptsächlich durch die Absorption $\lambda > 450$ nm angeregt wird, führt die Anregung von doppelt modifizierter DNA F26/Z26 im Absorptionsbereich des Phenothiazins $300 \text{ nm} < \lambda < 400$ nm ebenfalls zur Fluoreszenzemission des Perylenbisimids. Aus den Ergebnissen der zeitaufgelösten Messungen erkennt man, dass dieser Energietransfer äußerst schnell abläuft (ca. 1 ps). Die indirekte Anregung des Perylenbisimids mit $\lambda = 315$ nm macht eine Bestimmung von Elektronentransferraten äußerst schwierig. Die hierzu notwendigen Berechnungen werden von der Arbeitsgruppe *Fiebig* durchgeführt und sind noch nicht abgeschlossen.

8 Fünffach Ptz-dU-markierte DNA

Nukleinsäuren sind ein interessanter Baustein für die Aufgaben der Nanotechnologie. Die Watson-Crick-Basenpaarung legt zu jeder Nukleobase eindeutig eine Gegenbase fest. Durch die so gegebene Möglichkeit zur Codierung lassen sich neue Strukturen^[278, 279] erstellen, mit Reaktanden versehene Oligonukleotide können gezielt zum gewünschten Reaktionspartner dirigiert^[280] und modifizierte Nukleosidbausteine mit maßgeschneiderten Eigenschaften in die DNA inkorporiert werden.^[281-290]

Die Modifikation von DNA-Oligonukleotiden mit einem oder zwei Chromophoren zählt bereits zu den Standardverfahren in der Analytik und wird dort häufig angewandt.^[291, 292] Über den Einbau von mehreren Chromophoren, die zudem unmittelbar benachbart sind, wurde ebenfalls mehrfach berichtet.^[281-286] Die Kombination von Nukleosiden, die fluoreszente Chromophore tragen, in einem DNA-Strang führt zu vielfältigen neuen spektroskopischen Eigenschaften.^[288-290] Auch das zum Ptz-dU (**2**) analoge System des 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin Py-dU zeigt bemerkenswerte Effekte, wenn sich fünf modifizierte Nukleotide in direkter Nachbarschaft in einem DNA-Strang befinden.^[293]

Bildet man den DNA-Duplex aus dem modifizierten Oligonukleotid und einem komplementären Gegenstrang, so verstärkt sich die Fluoreszenz um ein Mehrfaches gegenüber dem Einzelstrang bzw. einem mit nur einer Py-dU-Modifikation versehenen Duplex. Gleichzeitig verschiebt sich das Emissionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen. Der neu entstandene Chromophor ist nicht als Summe fünf unabhängiger Pyreneinheiten zu betrachten. Aus CD-spektroskopischen Messungen erkennt man, dass sich die Pyrenchromophore in der helikalen Struktur anordnen, die durch den DNA-Duplex vorgegeben wird.

Vergleichbare Experimente werden mit einem Oligonukleotid P30 durchgeführt, welches fünf direkt benachbarte Ptz-dU-Einheiten enthält. Durch Untersuchungen mit Ptz-dU (**2**) konnte demonstriert werden, dass die Gegenbase dA bevorzugt wird (vgl. Kap. 3.2.3). Der komplementäre Gegenstrang N30 enthält dA als Gegenbase zu Ptz-dU. Die unmodifizierte Sequenz N31 gleicht der Sequenz P30, statt des modifizierten Nukleosids Ptz-dU wird T als natürliches Nukleosid verwendet.

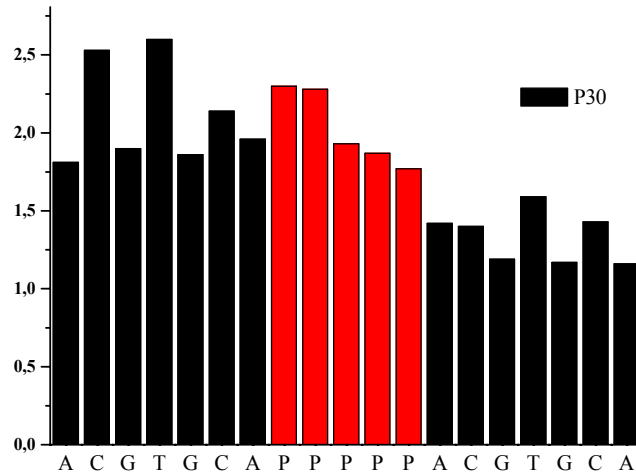


Abb.8-1: Tritylmonitor der Synthese von fünffach Ptz-dU-modifizierter DNA P30.

Die DNA-Synthese von P30 wurde mit einem, gegenüber dem einfachen Einbau von Ptz-dU veränderten, Kupplungsprotokoll mit einer Reaktionszeit von 15 Minuten durchgeführt. Am Tritylmonitor erkennt man den deutlichen Rückgang der Kupplungsausbeute, besonders nach dem zweiten Kupplungsschritt. Dennoch kann fünffach modifizierte DNA in ausreichender Menge hergestellt werden. Der aufgrund des hohen Anteils an Chromophoren ausgeprägt hydrophobe Charakter zeigt sich in den Bedingungen der HPLC-Reinigung, der Laufmittel-Gradient wird bis auf 50% Acetonitril gesteigert.

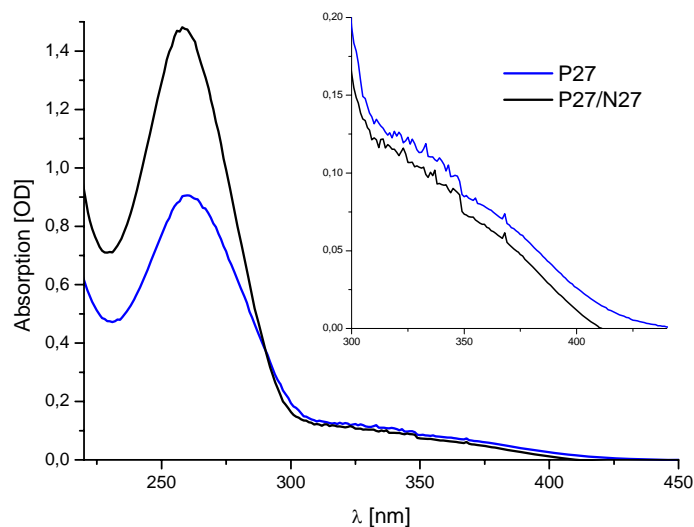


Abb.8-2: Absorptionsspektren von P30 (blau) und Duplex P30N30 (schwarz). 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i -Puffer.

Das Absorptionsspektrum von P30 zeigt keine unerwarteten Besonderheiten, die Absorption der Phenothiazinbande $\lambda > 300$ nm ist in Relation zum Absorptionsspektrum von einfach Ptz-dU modifiziertem P1 um das fünffache intensiver, so wie es der höheren Anzahl von Chromophoren im Oligonukleotid entspricht. Die Ausbildung des DNA-Duplexes führt im Absorptionsbereich des Phenothiazins nicht zu Veränderungen, lediglich bei $\lambda = 260$ nm erhöht sich erwartungsgemäß die Absorption aufgrund der Anwesenheit des Gegenstranges.

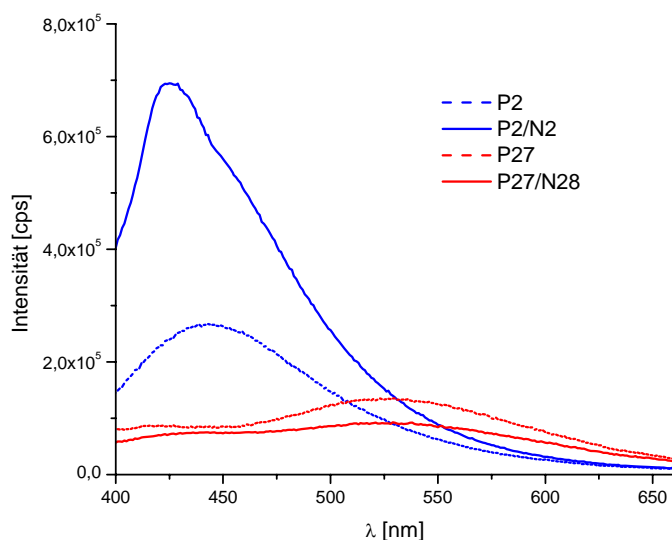


Abb.8-3: Fluoreszenzspektren von einfach modifizierter DNA P2, fünffach modifizierter DNA P30 und den entsprechenden DNA-Duplexen. 5 μ M DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm (P2) bzw. 350 nm (P30).

Die Fluoreszenzeigenschaften mehrfach Ptz-dU-modifizierter DNA ändern sich drastisch gegenüber der einfach modifizierten. Die Fluoreszenzintensität des fünffach modifizierten Einzelstrangs P30 ist geringer als die der einfach modifizierten Sequenz P2 und sinkt mit der Bildung des Duplex noch weiter ab. Das Fluoreszenzmaximum des Einzelstranges verschiebt sich um 90 nm auf $\lambda = 530$ nm. Duplexbildung führt zu einer Verschiebung um weitere 20 nm, so dass das Fluoreszenzmaximum des Duplexes P30/N30 bei $\lambda = 550$ nm liegt.

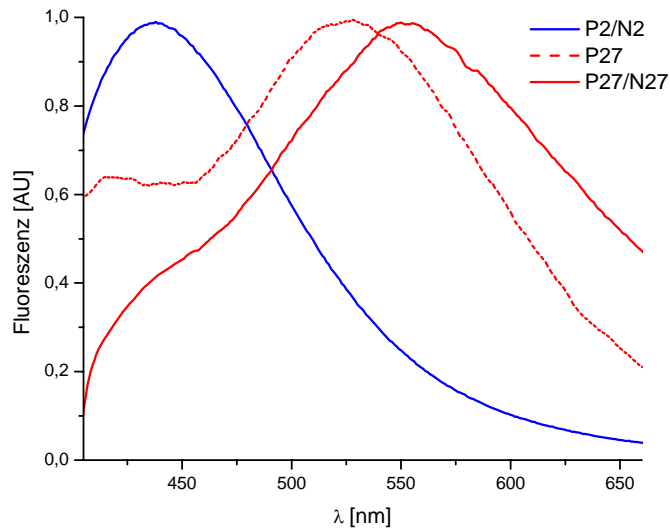


Abb.8-4: Normierte Fluoreszenzspektren von P2/N2 (schwarz), P30 (rot) und P30/N30 (blau). 12,5 μ M DNA in 10 mM NaP_i-Puffer, $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm (P2/N2), 350 nm (P30, P30/N30).

Mit der Kombination mehrerer Pyren- oder Phenothiazineinheiten in einem DNA-Duplex entsteht ein völlig neuer Chromophor. Vergleicht man die fünffach Py-dU und Ptz-dU-modifizierten Duplexe mit den zugehörigen Einzelsträngen und den einfach markierten Duplexen, bewirkt die regelmäßige Anordnung der Chromophore abhängig von deren Art stark unterschiedliche Effekte. Während die Duplexbildung des fünffach modifizierten Oligonukleotids die Fluoreszenz im Falle des Py-dU verstärkt, sinkt die Fluoreszenzintensität des mehrfach Ptz-dU-modifizierten Duplex. Das Fluoreszenzmaximum verschiebt sich im Py-dU-modifizierten Duplex zu kürzeren Wellenlängen, während P30/N30 eine deutlich langwelligere Emission zeigt.

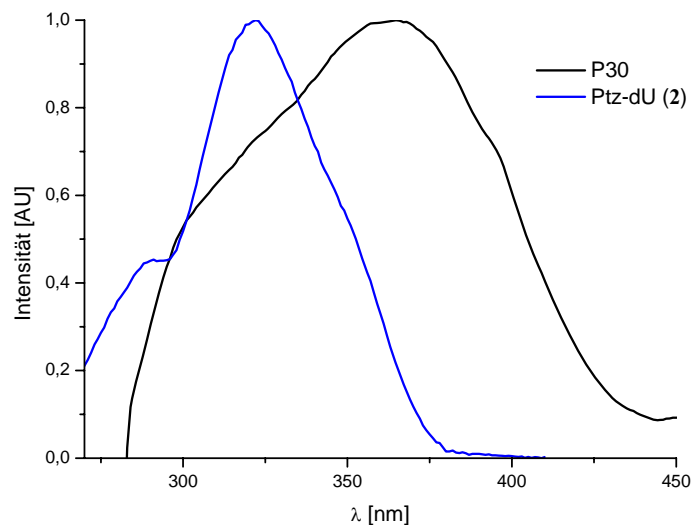


Abb.8-5: Anregungsspektrum von P30 im Vergleich mit Ptz-dU. 12.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, $\lambda_{\text{em}}=550$ nm. 36 μM Ptz-dU in Methanol, $\lambda_{\text{em}}=430$ nm.

Das Anregungsspektrum zeigt deutliche Abweichungen zum Absorptionsspektrum. Wie im Ptz-dU (2) wird die Fluoreszenz bei $\lambda=550$ nm nicht durch Absorption im Bereich der Nucleobasen bei $\lambda=260$ nm angeregt. Das Maximum der Absorption von 10-Methylphenothiazin bei $\lambda=315$ nm findet sich weder im Anregungsspektrum des Ptz-dU-Monomers noch im Anregungsspektrum von P30 wieder. Statt dessen wird die maximale Fluoreszenz des Ptz-dU-Monomers bei Anregung mit $\lambda=340$ nm erreicht. Im Oligonukleotid P27 verschiebt sich dieses Maximum bis $\lambda=360$ nm.

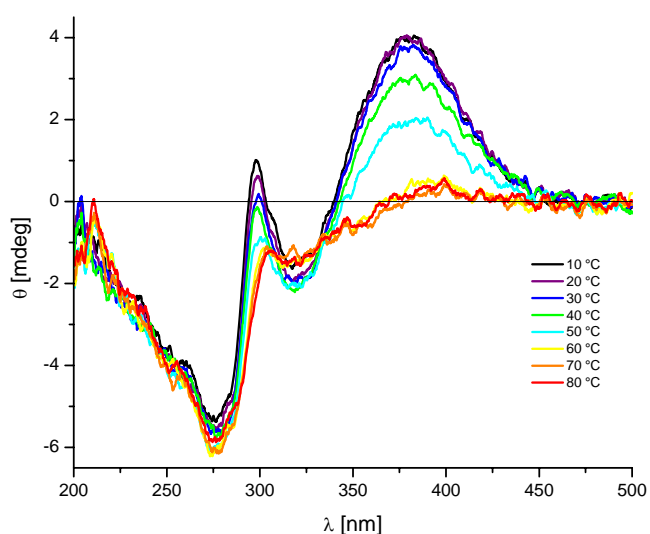


Abb.8-6: CD- Spektrum von P30/N30 in Abhängigkeit von der Temperatur, 12.5 μM DNA in 10 mM NaP_i -Puffer, 250 mM NaCl.

Die CD- Spektren von P30/N30 zeigen einen deutlichen positiven *Cotton*-Effekt zwischen $\lambda=350$ und 450 nm. Dieses Signal stammt von einer excitonischen Kopplung der Phenothiazin-Chromophore und legt ihre Anordnung in einer rechtsgängigen Helix nahe. Dieses Signal wird bei Erhöhung der Temperatur deutlich abgeschwächt und verschwindet zwischen 50 und 60 °C vollständig. Bei $\lambda=300$ und 320 nm ist bei steigender Temperatur eine schrittweise Veränderung des CD-Signals zu beobachten. Oberhalb von 60 °C verändert sich das Signal nicht mehr. Beim Aufbrechen der Basenpaarung wird die regelmäßige Anordnung der Chromophore aufgehoben. Die Phenothiazinsysteme befinden sich nicht mehr in helikaler Anordnung und generieren damit kein CD-Signal mehr.

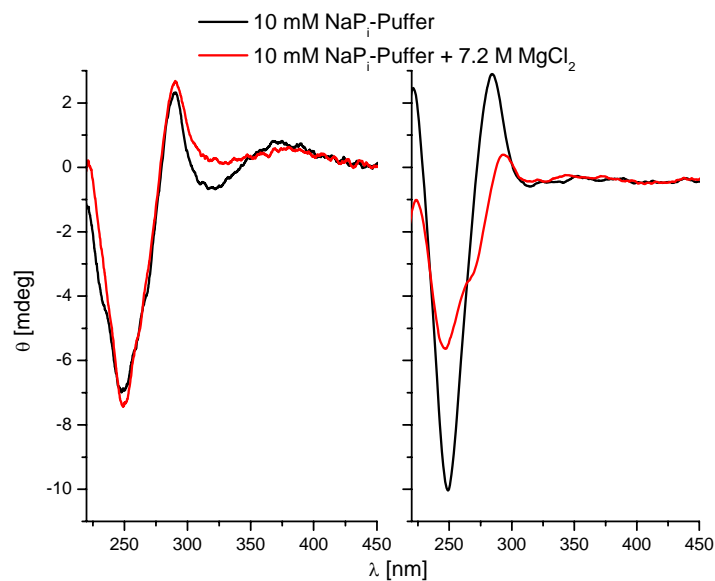


Abb.8-7: CD-Spektren der DNA-Duplexe P30/N30 (links) und N31/N30 (rechts) bei verschiedenen Salzkonzentrationen. $12.5 \mu\text{M}$ DNA.

Die Wechselwirkung der Phenothiazin-Chromophore untereinander stabilisiert die DNA in der B-Konformation. Auch hohe Salzkonzentrationen beeinflussen die geordnete helikale Anordnung der Chromophore nicht (s. Abb. 8-7). Einzel- und doppelsträngige DNA zeigen sehr ähnliche Fluoreszenzspektren. Die Anordnung der Chromophore im Einzelstrang scheint geringfügig unregelmäßiger zu sein, solange die Messung bei Raumtemperatur durchgeführt wird. Eine Temperaturerhöhung führt dagegen zu einer Abnahme des excitonischen Signals der Phenothiazin-Chromophore, wie aus den CD-Spektren ersichtlich ist. Die zugeführte thermische Energie ist ausreichend, um die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren zu überwinden.

9 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden neue Ladungsdonoren und –Akzeptoren zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch DNA vorgestellt. Der nukleosidische Ladungsdonor 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (Ptz-dU) wurde synthetisiert und charakterisiert. Das modifizierte Nukleosid ist nicht als unabhängige Kombination zweier Chromophore zu betrachten und zeigt damit vom 10-Methylphenothiazin und Uridin abweichende spektroskopische und elektrochemische Eigenschaften. Oligonukleotide wurden mit Ptz-dU modifiziert und charakterisiert. In modifizierter DNA paart Ptz-dU bevorzugt mit der Gegenbase dA, doppelsträngige modifizierte DNA liegt in der B-Konformation vor. Das photochemisch angeregte Ptz-dU injiziert mit großer Effizienz ein Elektron in den DNA-Basenstapel. In Kombination mit dem Ladungsakzeptor 5-Brom-2'-desoxyuridin wurden Untersuchungen zum Elektronentransfer durch DNA durchgeführt. Dabei konnte bestätigt werden, dass der reduktive Ladungstransfer durch DNA über A-T-Basenpaare effizienter als über G-C-Basenpaare verläuft. Eine mit dem Ladungstransfer gekoppelte Protonenwanderung senkt die Effizienz des Ladungstransfers über C-G-Paare. Die Effizienz des Ladungstransfers nimmt mit steigender Distanz zwischen Donor und Akzeptor ab.

Als nicht-nukleosidischer Ladungsdonor wurde Phenothiazin mit einem acyclischen Nukleosidanalogen kombiniert. Dieser Ladungsdonor wurde charakterisiert und die Modifikation von Oligonukleotiden mit dem Donorsystem wurde durchgeführt. Die Charakterisierung der modifizierten Oligonukleotide zeigt keinen nennenswerten Einfluß der gegenüberliegenden Nukleobase auf das Donorsystem. Phenothiazin-modifizierte Oligonukleotide nehmen im Duplex die B-Konformation ein, der Chromophor ist in den Basenstapel interkaliert. Die Fluoreszenz des Phenothiazins ist in einzel- und doppelsträngiger DNA fast vollständig gelöscht. Es findet ein sehr effizienter Elektronentransfer vom angeregten Phenothiazin auf Pyrimidinbasen der DNA statt.

Die Detektion des reduktiven Elektronentransfers durch DNA sollte vereinfacht werden durch die Bereitstellung eines Ladungsakzeptors, der nach erfolgtem Ladungstransfer ein absorptionsspektroskopisch nachweisbares Signal generiert. Mit dem Modellsystem 5-(4-Nitrophenoxy)-2-thiouracil konnte demonstriert werden, dass die elektrochemische Reduktion dieser Verbindung zu einer Änderung des Absorptionsspektrums führt. Der gebundene Farbstoff 4-Nitrophenol wird durch diese Reaktion aber nicht freigesetzt. Es ist damit nicht

sicher, ob der Mechanismus, nach dem aus 5-Brom-2'-desoxyuridin durch Reduktion ein Bromidion abgespalten wird, auf andere Uridinderivate übertragbar ist.

Ein Perylentetracarbonsäurebisimid wurde zum Einbau in DNA-Oligonukleotide modifiziert und charakterisiert. Der Einbau des Perylenfarbstoffs am 5'-Terminus sowie inmitten des Oligonukleotids führt zu DNA-Strängen die im Duplex eine B-DNA-Struktur einnehmen. Die Absorptionseigenschaften des Perylenbisimids verändern sich durch die Wechselwirkungen des Chromophors mit den benachbarten Nucleobasen. Angeregtes Perylenbisimid fluoresziert nur noch mit geringer Intensität. Der angeregte Chromophor ist aufgrund seines Oxidationspotentials in der Lage, der DNA ein Elektron zu entziehen. Ein Oligonukleotid, das am 5'-Terminus mit einem Perylenbisimid modifiziert ist, zeigt im Duplex eine zusätzliche Fluoreszenzbande. Aus angeregten Perylenbisimid-modifizierten DNA-Duplexen bildet sich ein Excimer, für dessen Stabilität der intakte DNA-Duplex zwingend notwendig ist.

Zur zeitaufgelösten Untersuchung von Ladungstransfervorgängen durch DNA wurden Oligonukleotide mit dem Ladungsdonor Phenothiazin und dem Ladungsakzeptor Perylenbisimid modifiziert. Die Injektion einer positiven Ladung in die DNA nach Anregung des Perylenbisimids kann in zeitaufgelösten Transientenabsorptionsspektren beobachtet werden. Reaktionsraten des oxidativen Lochtransfers können nicht angegeben werden, die dazu durchzuführenden Berechnungen sind noch nicht abgeschlossen. Die Auswertung der Messdaten zum reduktiven Elektronentransfer durch zeitaufgelöste Spektroskopie erweist sich aufgrund eines schnellen Energietransfers vom angeregten Phenothiazin auf das Perylenbisimid als ebenfalls sehr anspruchsvoll und ist noch nicht abgeschlossen.

Ein DNA-Oligonukleotid wurde mit fünf direkt benachbarten artifiziellen Nucleobasen Ptz-dU modifiziert und charakterisiert. Es bildet sich ein DNA-Duplex aus, in dem die Phenothiazin-Chromophore in helikale Anordnung dirigiert werden. Mit der Dissoziation des Duplex geht die geordnete Konformation der Chromophore verloren. Durch die Kombination von fünf direkt benachbarten Phenothiazineinheiten entsteht ein ausgedehnter delocalisierter Chromophor mit neuartigen Fluoreszenzeigenschaften, die stark von den Eigenschaften des Monomers abweichen.

10 Summary

In this work, new charge donor and acceptor systems for the investigation of reductive charge transfer through DNA are presented. The modified nucleoside 5-(10-methylphenothiazin-3-yl)-2'-deoxyuridine (Ptz-dU) has been synthesized and characterized. This charge donor cannot be regarded as an spectroscopically independent combination of two chromophores. Thus, it shows spectroscopic and electrochemical properties that differ from those of 10-methylphenothiazine and uridine. Oligonucleotides have been modified with Ptz-dU and characterized. In modified DNA, Ptz-dU prefers dA as its counterbase, double stranded DNA adopts a B-DNA conformation. Photochemically excited Ptz-dU injects an electron into the DNA base stack with high efficiency. Investigations of charge transfer through DNA were carried out with a combination of Ptz-dU as charge donor and the charge acceptor 5-bromo-2'-deoxyuridine. It can be confirmed that reductive electron transfer over A-T base pairs is more efficient than over G-C base pairs. A charge transfer coupled proton transfer lowers the efficiency of electron transfer over G-C pairs. The charge transfer efficiency is diminished with increasing distance between donor and acceptor.

Phenothiazine as a non-nucleosidic charge donor has been combined with an acyclic nucleoside analog. The charge donor has been characterized and used for the modification of oligonucleotides with this donor system. The characterization of modified oligonucleotides shows no appreciable influence of the opposing base on the donor system. Phenothiazine-modified oligonucleotides adopt a B-conformation of the double strand, the chromophore is intercalated into the base stack. The fluorescence of phenothiazine is almost completely quenched in single and double-stranded DNA. A very efficient electron transfer occurs from excited phenothiazine to pyrimidine bases of the DNA.

Detection of reductive electron transfer through DNA could be simplified by providing a charge acceptor that generates a signal as a result of the charge transfer process, which can be detected by absorption spectroscopy. An electrochemical reduction of the model system 5-(4-nitrophenoxy)-2-thiouracil led to a change of the absorption spectrum, although the covalently bound dye 4-nitrophenole has not been liberated during this reaction. Therefore, it cannot be confirmed if the mechanism which leads to the release of a bromide ion after the reduction of 5-bromo-2'-deoxyuridine can also be transferred to other uridine derivatives.

A perylene tetracarboxylic acid bisimide has been synthesized, characterized and applied for the incorporation into DNA-oligonucleotides. The incorporation of the perylene dye at the 5'-terminus as well as at internal positions of an oligonucleotide yields DNA duplexes that adopt a B-DNA conformation in the double strand. The absorption properties of the perylene bisimide change due to the interactions of the chromophore with neighbouring nucleobases. Photoexcited perylene bisimide is only weakly fluorescent in DNA. Due to its oxidation potential, the excited chromophore is able to abstract an electron from the DNA. The oligonucleotide modified with perylene bisimide on the 5'-position shows an additional fluorescence emission of the duplex. An excimer is formed from excited perylene bisimide-modified duplexes. The intact double strand structure of the modified DNA is crucial to build this excimer.

To conduct time-resolved measurements of charge transfer processes through DNA, oligonucleotides have been modified with the charge donor phenothiazine and perylene bisimide as a charge acceptor. Injection of a positive charge into the DNA after excitation of the perylene bisimide dye can be observed by time-resolved transient absorption spectroscopy. Reaction rates of the oxidative hole transfer cannot be presented, the necessary calculations are not completed yet. Interpretation of the results regarding reductive electron transfer obtained by time-resolved spectroscopy proves to be difficult due to a fast energy transfer from excited phenothiazine to the perylene bisimide and is therefore not yet completed.

A DNA-oligonucleotide bearing five adjacent artificial nucleobases Ptz-dU has been synthesized and characterized. Upon hybridization with a counterstrand a DNA-duplex is formed and the phenothiazine chromophores are directed into a helical arrangement. The regular conformation of the chromophores is degraded with the dissociation of the duplex. A new delocalized chromophore is formed by combination of five directly adjacent phenothiazine units. This chromophore shows new fluorescence properties that differ significantly from those of the phenothiazine monomer.

11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeines

Reagenzien und Lösungsmittel

Reagenzien werden von den Firmen *Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Lancaster*, *Merck* und *Sigma* bezogen. Die verwendete Qualität ist mindestens „zur Synthese“. Technische Lösungsmittel werden vor Gebrauch destilliert, trockene Lösungsmittel werden von *Fluka* bezogen und unter Argon aufbewahrt. Frisch destilliertes Triethylamin wird über grob zermörsertem Kaliumhydroxid über Nacht getrocknet. Es wird filtriert, mit Molekularsieb 4Å versetzt und unter Argon aufbewahrt.

Schutzgas

Alle Reaktionen werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,996% Reinheit) bzw. unter Stickstoffatmosphäre (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) durchgeführt. Reaktionen, an denen Chromophorsysteme beteiligt sind, werden unter Lichtausschluss durchgeführt.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie:

Es werden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* verwendet, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ belegt sind (Schichtdicke 0.25 mm). Detektion erfolgt über Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm, chemische Detektion erfolgt durch Eintauchen in 3% Schwefelsäure in Methanol und anschließendes Erhitzen mit einem Heißluftfön.

Flash-Säulenchromatographie:

Als stationäre Phase wird Kieselgel 60 (*Fluka*, *Merck*) der Korngröße 0.040- 0.063 mm verwendet. Es wird nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[294] mit ca. 0.4 bar Überdruck chromatographiert. Die Auftragung der zu reinigenden Substanz erfolgt an Kieselgel adsorbiert oder als Lösung in der mobilen Phase.

Gefriertrocknung

Gefriertrocknung erfolgt aus einer Lösung in 1,4-Dioxan nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff an einer *Christ Alpha 2-4* Lyophilisieranlage.

NMR

Kernresonanzspektren werden in deuterierten Lösungsmitteln an einem AC250 bzw. DMX500 Spektrometer (*Bruker*) aufgenommen sowie durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, NMR-Spektroskopie der Universität Regensburg an Spektrometern *Bruker Avance 300* und *Avance 600* gemessen. Die Proben befinden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalten ca. 10 mg Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel. 2D-Spektren enthalten 0.1 mmol Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz dient das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels (CHCl_3 : 7.24 ppm, DMSO-d_5 : 2.49 ppm) bzw. das Lösungsmittelsignal ($^{13}\text{CDCl}_3$: 77.0 ppm, DMSO : 39.4 ppm). Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben.

Massenspektrometrie

ESI-Massenspektren werden an einem *Finnigan LCQ* ESI-Spektrometer aufgenommen. Die Proben werden in Methanol oder Acetonitril (*LiChrosolv, Merck*) aufgenommen und durch einen HPLC-Filter 0.45 μM (*Sartorius*) filtriert.

EI-Massenspektren werden an einem *ThermoElectron Trace DSQ* mit Direkteinlass aufgenommen.

ESI- und CI-Spektren werden von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg an *Finnigan TSQ 7000* und *Finnigan MAT SSQ 710 A* aufgenommen.

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

Spektroskopie

Alle spektroskopischen Messungen werden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messungen werden mit Quarzglasküvetten von 1 cm Länge (*Starna*) durchgeführt. Die Spektroelektrochemie erfolgt in einer Quarzglaszelle (s.u.).

Absorption

UV/VIS- Spektren werden an einem *Varian Cary 100 Bio* mit temperierbarem Küvettenhalter 6x6 aufgenommen und sind gegen das Lösungsmittelsignal korrigiert. Einstellungen: SBW 1.0 nm, Average time 2 s, Light source changeover 350 nm. Für temperaturabhängige Absorptionsmessungen wird die Temperatur vor der Absorptionsmessung mindestens 5 min konstant gehalten.

Fluoreszenz

Fluoreszenzspektren werden an einem *Fluoromax-3 (Jobin-Yvon Horiba)* in Fluoreszenzküvetten mit 1 cm Länge durchgeführt. Das Spektrum des reinen Lösungsmittels wird subtrahiert, um Ramanemissionen und Hintergrundsignale zu entfernen.

Temperaturabhängige Fluoreszenz:

Fluoreszenzspektren werden von 10 °C bis 80 °C im Abstand von 10 °C aufgenommen. Die Zieltemperatur wird über ein Peltier-Element LFI-3751 (*Wavelength Electronics*) angesteuert. Vor der Messung wird die Temperatur mit einer Toleranz von 0.1 °C 5 min konstant gehalten.

CD

CD- Spektren werden an einem *J-715* Spektropolarimeter mit Thermostat PTC- 150J (beide *JASCO*) aufgenommen und sind manuell basislinienkorrigiert. Die Aufnahme erfolgt mit den Einstellungen: Sensitivity 100 mdeg, data pitch 0.1 nm, scanning mode continuous, scanning speed 500 nm/min, response 0.5 s, band width 2 nm. Aus fünf aufeinanderfolgenden Messungen wird der Mittelwert gebildet.

CV

Cyclovoltammetrische Messungen werden mit einer drei-Elektroden-Anordnung aus Gegenelektrode, Pseudo-Referenzelektrode und Arbeitselektrode (alle Platin) durchgeführt. Das Potential wird durch einen Potentiostaten *EG&G Model 283* angelegt, der mit der Software *Echem (EG&G)* gesteuert wird. Die Messzelle und das Lösungsmittel werden vor der Messung mit Argon durchspült.

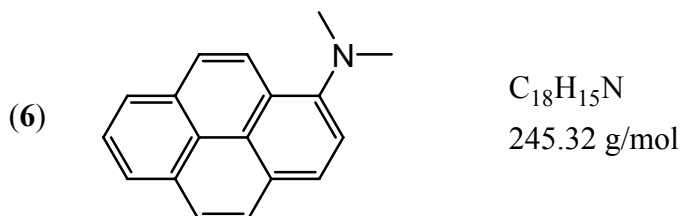
SEC

Die Zelle für spektroelektrochemische Messungen besteht aus Quarzglas, als Arbeitselektrode wird ein vergoldetes Nickelnetz (600 Linien/cm) verwendet. Die Gegenelektrode besteht aus

V2A-Stahl, der erst vernickelt und dann vergoldet wird. Als Pseudo-Referenzelektrode dient ein versilberter Platindraht. Das Goldnetz befindet sich zwischen Quarzglasplatten, der Kapillarspalt zwischen beiden Platten wird mit Kunststoffplatten auf ca. 100 μm Breite eingestellt. Die Zelle wird mit ca. 4 mL der Probenlösung gefüllt und mit Argon durchspült. Zum Aufbau der Messzelle vgl. Lit.^[156] Das Potential wird durch einen Potentiostaten *AMEL* Modell 2053 eingestellt, die spektroskopische Messung erfolgt an einem *Perkin-Elmer* Lambda 9 Spektrometer mit dem Programm *Perkin-Elmer Pcess*.

11.2 Arbeitsvorschriften

Synthese von 1-(Dimethylamino)-pyren **6**



1.056 g (4.86 mmol) 1-Aminopyren und 1.477 g (10.7 mmol, 2.2 eq) Kaliumcarbonat werden in 10 mL DMF gelöst, mit 0.75 mL (12 mmol, 2.47 eq) Iodmethan versetzt und auf 120 °C erhitzt. Nach 2 h lässt man abkühlen, entfernt die Lösungsmittel im Vakuum und nimmt den Rückstand in Diethylether auf. Es wird mit 1 N Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, die Wasserphase wird mit Ether extrahiert und die vereinigten Etherphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Nach Trocknung am HV verbleiben 1.138 g dunkelgrüner Flüssigkeit.

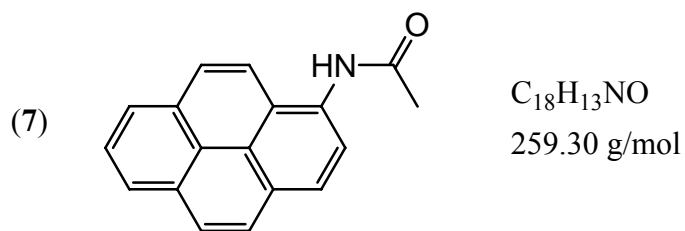
FC: LM Toluol

Ausbeute: gelbe Flüssigkeit, 1.037 g (4.22 mol, 87% d.Th.)

R_f -Wert: ~ 0.48 (Toluol)

ESI-MS: 246 (80) $[\text{M}+\text{H}^+]$, 231 (90) $[\text{M}-\text{CH}_3+\text{H}^+]$, 217 (100) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5+\text{H}^+]$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.06$ (s, 6H, Methyl), 7.76 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, Pyren), 7.99-7.90 (m, 3H, Pyren), 8.14-8.06 (m, 4H, Pyren), 8.50 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, Pyren).

Synthese von 1-(*N*-Acetylamino)-pyren **7**

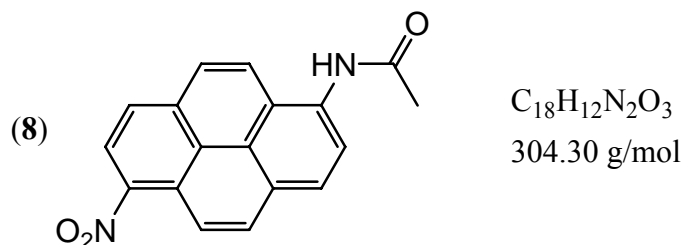
350 mg (1.6 mmol) 1-Aminopyren werden in 10 mL Toluol gelöst und mit 12.5 mL Essigsäure und 0.46 mL Acetanhydrid versetzt. Ein weißer Niederschlag bildet sich und löst sich beim Erwärmen auf. Es wird 1 h unter Rückfluss erhitzt, man lässt abkühlen und filtriert den ausfallenden weißen Feststoff ab.

Das Produkt wird in Dichlormethan aufgenommen, filtriert, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt.

Ausbeute: 289 mg weißer Feststoff (1.11 mmol, 70 % d. Th.)

ESI-MS: 260 (100) $[M+H^+]$

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.90 (s, 3H, Acetyl), 7.77 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Pyren), 7.98-7.88 (m, 3H, Pyren), 8.16-8.06 (m, 4H, Pyren), 8.51 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Pyren).

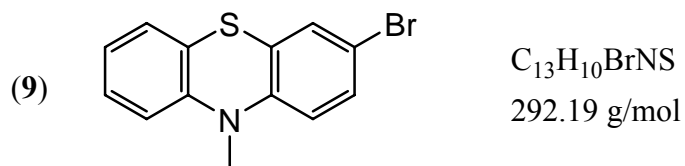
Synthese von 1-(*N*-Acetylamino)-6-nitropyren **8**

245 mg (0.94 mmol) 1-(*N*-Acetylamino)-pyren **7** werden in 35 mL Eisessig suspendiert und auf 5 °C gekühlt. Man gibt eine Lösung von (1 mmol) konz. Salpetersäure in 2.5 mL Eisessig langsam zu und rührt 1 h bei RT. Es wird auf 100 °C erhitzt und weitere 23 h gerührt. Man lässt die tiefrote klare Lösung abkühlen, neutralisiert mit 1 N Natronlauge und extrahiert 2x mit je 20 mL Dichlormethan und 2x mit je 20 mL Essigester. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt.

FC: LM Toluol bis zur Elution einer ersten farbigen Bande,
dann Toluol/Essigester 9:1

Ausbeute: gelber Feststoff, 6 mg, 0.02 mmol (2 % d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.55 (Toluol)

Synthese von 3-Brom-10-methylphenothiazin **9**

a) aus 10-Methylphenothiazin.

In 37 mL Essigsäure werden 610 mg (15.3 mmol) Natriumhydroxid gelöst. 1.070 g (5 mmol) 10-Methylphenothiazin werden in 10 mL Dichlormethan gelöst und zugegeben, unter Lichtschutz wird auf 5 °C gekühlt. Eine Lösung von 0.35 mL (7 mmol, 1.4 eq) Brom in 5 mL Essigsäure wird über 15 Minuten langsam zugetropft, nach 45 Minuten wird eine Lösung von 700 mg Natriumdithionit in 10 mL Wasser zugegeben. Die trübe schwach gelbliche Lösung wird zur Trockne eingedunstet, in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1% Natriumhydrogencarbonatlösung bis zur Beendigung der Gasentwicklung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedunstet.

Das Rohprodukt wird in Dichlormethan aufgenommen, an Kieselgel adsorbiert und über Flash-Chromatographie gereinigt.

LM Hexan/ Essigester 20 : 1

Säule 250 · 35 mm

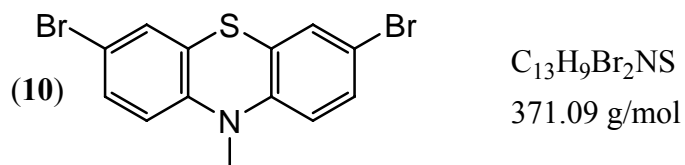
Ausbeute: weißer Feststoff, 979 mg, 3.35 mmol (67 % d. Th.)

R_f-Wert: ~0.5 (Hexan/Essigester 6:1)

ESI-MS: 291 (98), 293 (100) [M⁺]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ= 3.33 (s, 3H, Methyl), 6.62 (d, *J*= 9Hz, 1H), 6.79 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 7.11 (m, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.23 (m, 2H).

Nebenprodukt 3,7-Dibrom-10-methylphenothiazin **10**:



R_f-Wert: ~ 0.36 (Hexan/Essigester 6:1)

ESI-MS: 371 (100), 369 (50), 373 (50) [M⁺]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ= 3.34 (s, 3H, Methyl), 6.72 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.41 (m, 2H).

b) aus 3,7-Dibrom-10-Methylphenothiazin **10**

1.127 g (3.04 mmol) 3,7-Dibrom-10-methylphenothiazin **10** (aus Syntheseweg a) werden in 14 mL Tetrahydrofuran gelöst und auf -78 °C gekühlt. Es werden 3.6 mL (5.76 mmol, 1.9 eq) einer 1.6 M Lösung von n-Butyllithium in Hexan über 15 min zugetropft. Nach 15 min lässt man auf RT kommen und gibt 5 mL Ethanol, danach 20 mL Wasser zu. Es wird zweimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und am Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit.

FC: LM Hexan/Essigester 20:1

Säule 250 · 35 mm

Ausbeute: 551 mg weißer Feststoff (1.9 mmol, 62% d.Th.)

R_f-Wert: ~ 0.5 (Hexan/Essigester 6:1)

ESI-MS: 291 (99), 293 (100) [M⁺]

c) über *Smiles*-Umlagerung

2.63 g (9.4 mmol) 2,5-Dibromnitrobenzol werden in 30 mL Isopropanol gelöst. Man gibt 1 mL (9.4 mmol, 1 eq) 2-Mercaptoanilin und eine Lösung von 0.62 g (9.4 mmol, 1 eq) Kaliumhydroxid in Ethanol zu. Es wird 90 min bei 90 °C gerührt. Nach Abkühlen werden Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Aceton aufgenommen, filtriert und im Vakuum eingeengt.

Das verbleibende braune Pulver wird in 15 mL Acetanhydrid und 0.15 mL Pyridin gelöst und 2 h auf 90 °C erhitzt. Es wird eingeengt, der schwarze sirupöse Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Es wird in 180 mL Aceton gelöst. Eine Lösung von 1.23 g (18.8 mmol, 2 eq) Kaliumhydroxid in 20 mL Ethanol wird zugegeben und bei 850 mbar und 70 °C wird sofort destilliert. Der schwarze Rückstand wird in Dichlormethan gelöst und mit Wasser gewaschen. Die Wasserphase wird mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt.

Zu einer Lösung von 1.96 g des Rohprodukts in 10 mL Tetrahydrofuran werden bei -90 °C 770 mg (7.0 mmol, 1eq) Kalium-*tert.*-Butylat zugegeben. Es wird 20 min. gerührt, dann werden 0.6 mL (10 mmol, 1.4 eq) Iodmethan zugesetzt und über Nacht auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 20 mL 5% Natriumsulfatlösung zugesetzt, es wird mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und am Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit.

FC: LM Hexan/Essigester 20:1

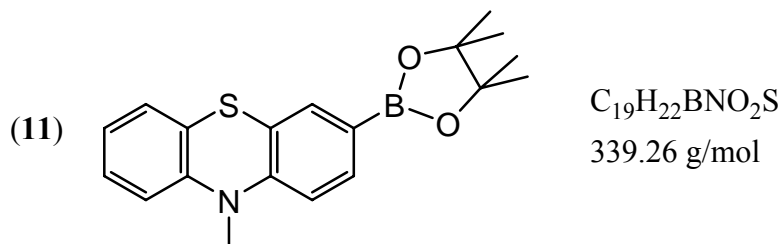
Säule 250 · 35 mm

Ausbeute: 1.069 g gelber Feststoff (3.6 mmol, 39% d.Th.)

R_f-Wert: ~ 0.5 (Hexan/Essigester 6:1)

ESI-MS: 291 (98), 293 (100) [M⁺]

Synthese von 10-Methylphenothiazin-3-yl-4,4,5,5-tetramethyldioxa[1.3.2]borolan **11**



In 16 mL wasserfreiem Dioxan werden 2.0 g (6.8 mmol) 3-Brom-10-methylphenothiazin **9** gelöst. Es werden 150 mg (0.2 mmol, 0.03 eq) [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]-palladium(II)chlorid (1:1 Komplex mit Dichlormethan), 2 mL (14 mmol, 2eq) Pinakolboran und 2.8 mL (20.6 mmol, 3 eq) trockenes Triethylamin zugegeben. Es wird 48 h unter Rückfluss erhitzt, man lässt abkühlen, versetzt mit 40 mL gesättigter Natriumchloridlösung und extrahiert 3x mit je 100 mL Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt.

FC: LM Hexan/ Diethylether 10:1

Säule 250 · 35 mm

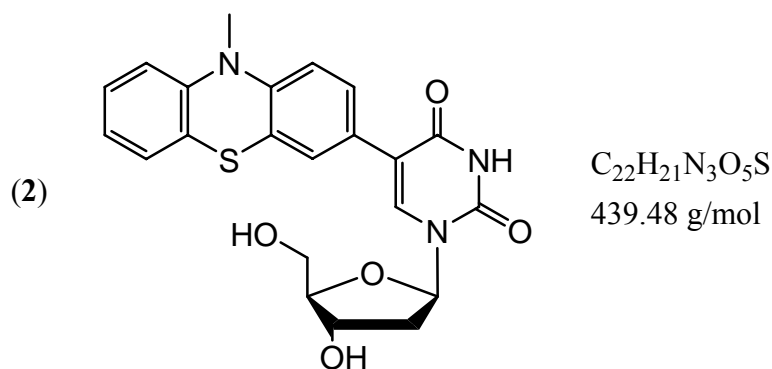
Gefriertrocknung aus Dioxan

Ausbeute: weißes Pulver, 1.32 g, 3.88 mmol (57 % d. Th.)

R_f-Wert: ~ 0.19 (Hexan/Ether 8:1)

ESI-MS: 339 (100) [M⁺], 340 (75) [M+H⁺]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ= 1.31 (s, 12H, Methyl), 3.70 (s, 3H, N-CH₃), 6.85-6.80 (m, 2H), 6.93 (1H), 7.11 (1H), 7.17 (1H), 7.49 (1H), 7.56 (1H).

Synthese von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **2**

Eine Mischung aus 60 mL Wasser und 60 mL Tetrahydrofuran wird 30 min mit Stickstoff durchspült. 514 mg (1.45 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin und 604 mg (1.78 mmol, 1.2 eq) 10-Methylphenothiazin-3-yl-4,4,5,5-tetramethyldioxa[1.3.2]borolan **11** werden zugesetzt. Man gibt 119 mg (0.16 mmol, 0.11 eq) 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen-Palladium(II)chlorid (1:1 Komplex mit Dichlormethan) zu. Es wird mit 50 mL Methanol und 1130 mg (28.3 mmol, 19.5 eq) Natriumhydroxid versetzt. Bei 65 °C wird 24 h gerührt. Die abgekühlte Mischung wird mit 1 N HCl neutralisiert, durch Kieselgur filtriert und i. V. eingengt. Die verbleibende wässrige Lösung wird dreimal mit je 40 mL Essigester extrahiert, die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das Lösungsmittel wird im HV entfernt.

FC: LM Dichlormethan/Aceton 4:1 (500 mL), dann

Essigester/Methanol 10:1

Säule 250 · 35 mm

Ausbeute: 173 mg gelber Feststoff (0.39 mmol, 27% d.Th.)

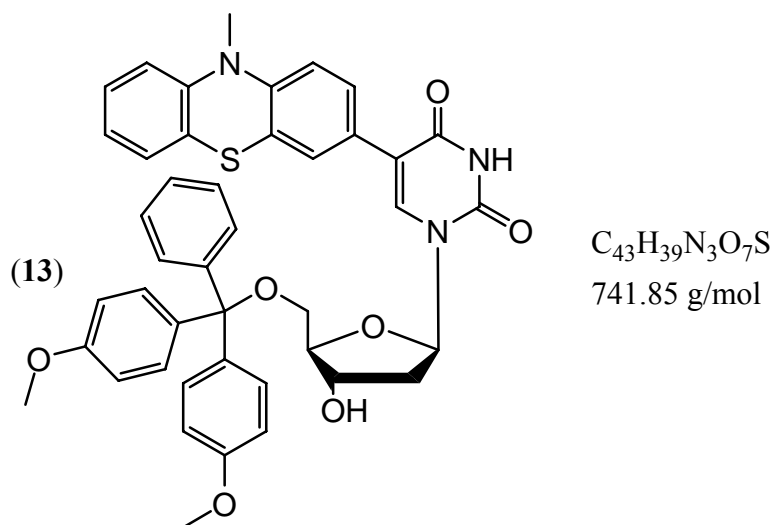
R_f -Wert: ~ 0.69 (Essigester/Methanol/Wasser 12:2:1)

ESI-MS: 439 (100) $[M^+]$, 323 (75) $[M+H^+-C_5H_9O_3]$

HRMS (MALDI): berechnet für $C_{22}H_{21}N_3O_5S$ 439.1126, gefunden 439.1196 $[M+H^+]$

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.18 (m, 2H, 2'-H), 3.31 (s, 3H, N- \underline{CH}_3), 3.59 (m, 2H, 5'-H), 3.79 (m, 1H, 4'-H), 4.27 (m, 1H, 3'-H), 5.10 (br, 1H, 5'- \underline{OH}), 5.24 (br, 1H, 3'- \underline{OH}), 6.20 (t, 1H, 1'-H), 6.94 (m, 3H, Ptz-H), 7.14 (m, 1H, Ptz-H), 7.20 (m, 1H, Ptz-H), 7.36 (m, 2H, Ptz-H), 8.12 (s, 1H, 5-H).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ = 34.9 ($\underline{C}H_3$), 39.9 (2'-C), 61.45 (5'-C), 70.65 (3'-C), 84.95 (1'-C), 87.99 (4'-C), 112.83 (5-C), 114.69, 115.07, 122.15, 122.31, 123.00, 126.46, 127.29, 127.63, 127.93, 128.29, 137.62 (6-C), 144.82, 145.58, 150.31 (2-C), 162.59 (4-C).

Synthese von 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-(10-methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **13**

288 mg (0.66 mmol) Ptz-dU **2** werden zweimal mit je 10 mL trockenem Pyridin koevaporiert. Es werden 10 mL Pyridin und 407 mg (1.2 mmol, 1.8 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zugesetzt und 23 h bei RT gerührt. 1 mL Methanol wird zugegeben und weitere 1 h gerührt. Es wird i. V. eingeeengt.

FC: LM Dichlormethan/Aceton/Pyridin 400:100:1 (700 mL),

dann Essigester/Methanol/Pyridin 1000:100:1

Ausbeute: 216 mg gelbes Pulver (0.34 mmol, 53 % d.Th.)

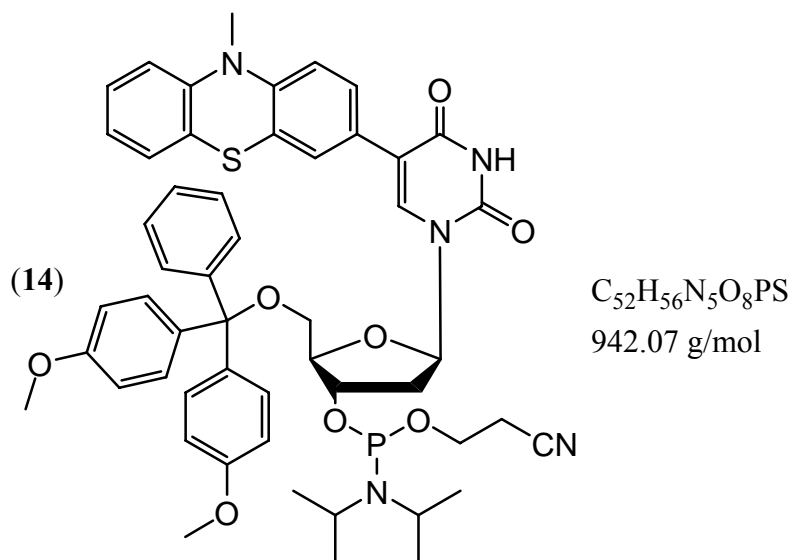
R_f -Wert: ~ 0.85 (Essigester/Methanol/Wasser 12:2:1)

ESI-MS: 741 (100) [M^+], 303 (70) [DMT^+]

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 2.22 (m, 1H, 2'-H), 2.36 (m, 1H, 2'-H), 3.12 (m, 1H, 5'-H), 3.18 (m, 1H, 5'-H), 3.25 (s, 3H, N- \underline{CH}_3), 3.63 (s, 3H, O- \underline{CH}_3), 3.65 (s, 3H, O- \underline{CH}_3), 3.94 (m, 1H, 4'-H), 4.28 (m, 1H, 3'-H), 5.33 (br, 1H, 3'-OH), 6.22 (dd, J = 6.7 Hz, 1'-H), 6.60 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ptz), 6.73 (m, 4H, DMT), 6.95 (m, 2H, Ptz), 7.06-7.11 (m, 3H, Ptz), 7.14-7.22 (m, 8H, Ptz, DMT), 7.31 (m, 2H, DMT), 7.63 (s, 1H, 5-H), 11.56 (s, 1H, N-H).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 34.90 (N- \underline{CH}_3), 39.65 (2'-C), 54.88 (O- \underline{CH}_3), 54.90 (O- \underline{CH}_3), 63.84 (5'-C), 70.52 (3'-C), 84.79 (1'-C), 85.64 (4'-C), 85.78, 113.04, 113.07, 113.80, 114.51, 121.62, 121.91, 122.48, 126.28, 126.56, 126.74, 127.04, 127.43, 127.52, 127.74, 129.61, 135.21, 135.43, 136.40 (6-C), 144.39, 144.68, 145.08, 149.82 (2-C), 157.97, 157.98, 162.10 (4-C).

Synthese von 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-(10-methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl]-phosphoramidit] **14**



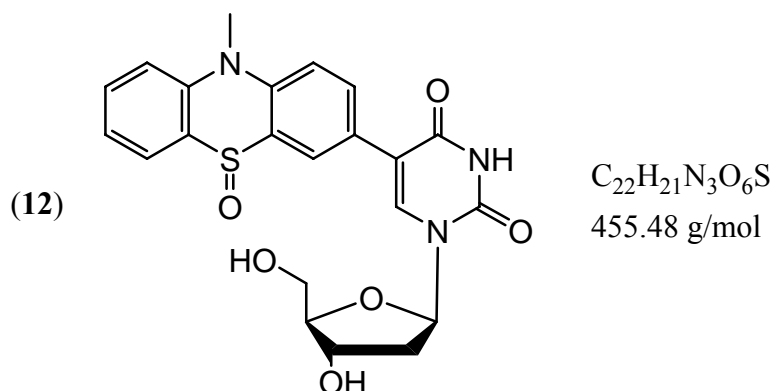
102 mg (0.137 mmol) 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-(10-methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **13** werden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 56 μ L (0.4 mmol, 2.9 eq) Triethylamin und 80 μ L (0.35 mmol, 2.6 eq) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt. Nach 40 min werden 4 Tropfen abs. Ethanol zugegeben, es wird rasch mit frischer, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, eingengt und am HV getrocknet.

Ausbeute: 122 mg, 0.130 mmol (95% d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.74 (Essigester/Methanol/Wasser 12:2:1)

ESI-MS: 941 (100) [M^+], 303 (86) [DMT^+]

Das Produkt **9** wird in 1.4 mL Acetonitril aufgenommen und in den DNA-Syntheseautomaten eingesetzt.

Synthese von 5-(10-Methyl-5-oxo-phenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin **12**

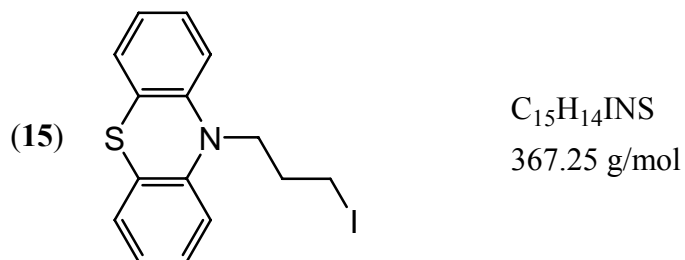
58 mg (0.13 mmol) Ptz-dU **2** werden in 6 mL Ethanol gelöst und mit 1.1 mL 30 % Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt. Nach 1 h wird i.V. eingengt.

Ausbeute: 55 mg gelber Feststoff (0.12 mmol, 92 % d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.64 (Essigester/Methanol/Wasser 12:2:1)

ESI-MS: 456 (100) $[M+H^+]$

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.18 (m, 2H, 2'-H), 3.31 (s, 3H, N-CH $_3$), 3.59 (m, 2H, 5'-H), 3.79 (m, 1H, 4'-H), 4.27 (m, 1H, 3'-H), 5.10 (br, 1H, 5'-OH), 5.24 (br, 1H, 3'-OH), 6.20 (t, 1H, 1'-H), 6.94 (m, 3H, Ptz-H), 7.17 (m, 1H, Ptz-H), 7.20 (m, 1H, Ptz-H), 7.34 (m, 1H, Ptz-H), 7.39 (m, 1H, Ptz-H), 8.12 (s, 1H, 5-H).

Synthese von 10-(3-Iodpropyl)-phenothiazin **15**.

In 10 mL Dimethylformamid werden 505 mg (2.53 mmol) Phenothiazin gelöst und 292 mg (2.6 mmol, 1eq) Kalium-*tert*-butylat zugesetzt. Man rührt 30 min bei RT und gibt 0.86 mL (7.47 mmol, 2.95 eq) Diiodpropan zu. Nach 24 h wird im HV eingengt, der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und mit 20 mL Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wird nochmals mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt.

FC: LM Hexan/Essigester 20:1

Säule 250 · 35 mm

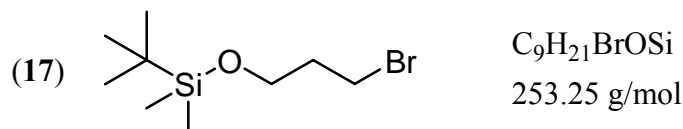
Ausbeute: farblose Flüssigkeit, 297 mg, 0.81 mmol (32 % d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.60 (Hexan/Essigester 6:1)

ESI-MS: 368 (100) [M+H⁺]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 2.21 (m, 2H, CH₂), 3.23 (m, 2H, N-CH₂), 4.00 (m, 2H, CH₂I), 6.85-6.92 (m, 4H, 1,3,7,9-H), 7.10-7.16 (m, 4H, 2,4,6,8-H).

Synthese von 3-Brompropyl-(*tert.*butyldimethylsilyl)-ether **17**.



In 1.5 mL Diethylether werden 34 mg (0.28 mmol, 0.05 eq) *N,N*-Dimethylaminopyridin vorgelegt, mit 0.5 mL (5.53 mmol) 3-Brompropanol und 1 g (6.64 mmol, 1.2 eq) *tert.*-Butyldimethylchlorsilan versetzt und auf 0 °C gekühlt. Über 1 h werden 0.92 mL (6.64 mmol, 1.2 eq) Triethylamin langsam zugetropft, bei RT wird 18 h gerührt.

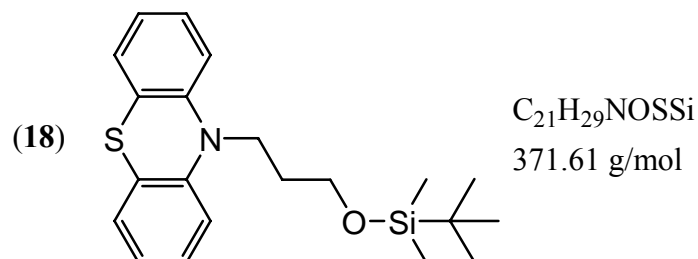
Es wird mit Ether extrahiert, die organische Phase wird zuerst mit 2 N Salzsäure, dann mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt.

Es wird mit 3 mL Hexan versetzt, durch eine ca. 5 mm starke Kieselgurschicht filtriert und eingeeengt.

Ausbeute: farblose Flüssigkeit, 1.29 g (5.1 mmol, 92 % d. Th.)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ= 0.10 (s, 6h, Si-CH₃), 0.93 (s, 9H, CH₃), 2.08 (tt, *J*= 5.9 Hz, *J*= 6.2 Hz, 2H, CH₂), 3.53 (t, *J*= 6.4 Hz, 2H, CH₂Br), 3.77 (t, *J*= 5.7 Hz, 2H, CH₂O).

Synthese von 10-[(3-*O-tert.*-Butyldimethylsilyl)-propyl]-phenothiazin **18**.



500 mg (2.5 mmol) Phenothiazin werden in 8 mL Tetrahydrofuran gelöst und auf – 90 °C gekühlt. 280 mg (2.5 mmol, 1 eq) Kalium-*tert.*-butylat werden zugesetzt und es wird 1 h gerührt, bei RT werden 1.3 g (5 mmol, 2 eq) 3- Brompropyl-(*tert.*-Butyldimethylsilyl)ether **17** zugegeben. Nach 2h wird mit 20 mL 2% Natriumsulfitlösung versetzt, mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, fitriert und eingeeengt. Es verbleiben 1.069 g violetten Feststoffs.

FC: (LM Hexan/ Essigester 20:1)

Säule 250 · 35 mm

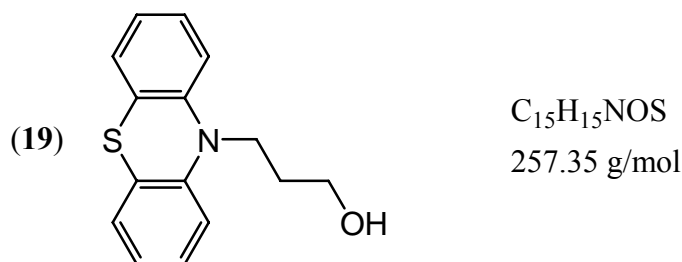
Ausbeute: farblose Flüssigkeit, 530 mg (1.42 mmol, 57 % d. Th.)

R_F-Wert: ~ 0.67 (Hexan/ Essigester 6:1)

ESI-MS: 371 (100) [M⁺]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ= 0.10 (s, 6H, Si-CH₃), 0.93 (s, 9H, CH₃), 2.10 (m, 2H, CH₂), 3.25 (t, *J*= 5.9 Hz, 2H, N-CH₂), 3.76 (t, *J*= 6.3 Hz, 2H, O-CH₂), 6.84-6.93 (m, 4H, Ptz), 7.10-7.17 (m, 4H, Ptz).

Synthese von 10-(3-Hydroxypropyl)-phenothiazin **19**



a) aus 10-[(3-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl)-propyl]-phenothiazin **18**

530 mg (1.42 mmol) 10-[(3-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl)-propyl]-phenothiazin **18** werden in 4 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 3.6 mL einer 1M Lösung von Tetrabutylammonium-fluorid (3.6 mmol, 2.5 eq) versetzt. Nach 30 min bei RT werden 20 mL Wasser zugegeben und es wird dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt.

Ausbeute: farblose Flüssigkeit, 347 mg, 1.35 mmol (95 % d. Th.)

R_F-Wert: ~ 0.47 (Hexan/Essigester 1:1)

CI-MS: 258 (100) [M+H⁺]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ= 2.12 (m, 2H, CH₂), 3.24 (t, *J*= 5.9 Hz, N-CH₂), 3.79 (t, *J*= 6.3 Hz, O-CH₂), 6.85-6.93 (m, 4H, Ptz), 7.09- 7.17 (m, 4H, Ptz).

b) aus Phenothiazin

In 10 mL Acetonitril werden 1 g (5 mmol) Phenothiazin mit 1.4 mL (15 mmol, 3eq) 3-Iod-1-propanol versetzt und auf 60 °C erhitzt. Im Verlauf von 12 h werden portionsweise 0.4 mL (20 mmol, 4 eq) Pyridin zugegeben. Nach weiteren 36 h lässt man abkühlen, zieht die Lösungsmittel i. V. ab und nimmt in Dichlormethan auf. Es wird mit 5 % Essigsäure gewaschen, die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt.

FC: (LM Hexan/ Essigester 2:1)

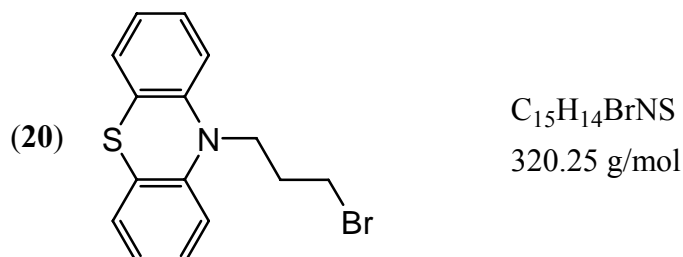
Säule 35 · 260 mm

Ausbeute farblose Flüssigkeit, 875 mg, 3.4 mmol (68 % d. Th.)

R_F-Wert: ~ 0.47 (Hexan/ Essigester 1:1)

CI-MS: 258 (100) [M+H⁺]

Synthese von 10-(3-Brompropyl)-phenothiazin **20**



515 mg (2 mmol) 10-(3-Hydroxypropyl)-phenothiazin **19** werden in 4 mL Dichlormethan gelöst und mit 0.2 mL (2 mmol, 1eq) Phosphortribromid versetzt. Nach 40 min werden 20 mL 5 % Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und es wird mit 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt.

FC: Hexan/ Essigester 20:1

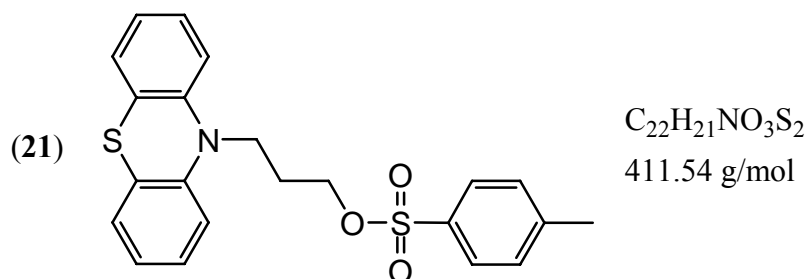
Ausbeute: gelbliche Flüssigkeit, 77mg, 0.24 mmol (12 % d. Th.)

R_F-Wert: ~ 0.89 (Hexan/ Essigester 1:1)

ESI-MS: 319 (98), 321 (100) [M⁺]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ= 2.34 (tt, *J*= 6.25 Hz, *J*= 6.5 Hz, 2H, CH₂), 3.56 (t, *J*= 6.25 Hz, 2H, N-CH₂); 4.12 (t, *J*= 6.5 Hz, 2H, CH₂Br), 6.90-7.01 (m, 4H, Ptz), 7.15-7.24 (m, 4H, Ptz).

Synthese von 10-(3-(4'-Toluolsulfonyl)propyl)-phenothiazin **21**



In 5 mL Pyridin werden 885 mg (3.44 mmol) 10-(3-Hydroxypropyl)-phenothiazin **19** vorgelegt und mit einer Lösung von 670 mg (3.5 mmol, 1eq) p-Toluolsulfonsäurechlorid in 5 mL Pyridin versetzt. Nach 2 h wird mit 5 mL Wasser versetzt und 2x mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt.

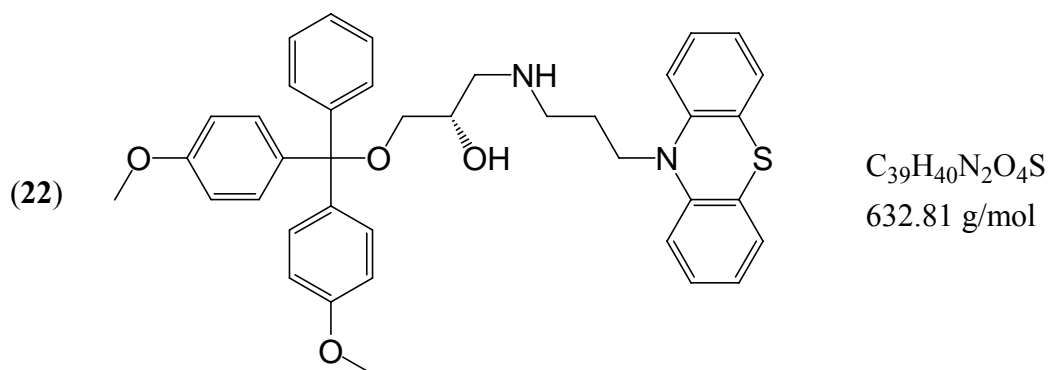
Ausbeute: farblose Flüssigkeit, 1.345 g, 3.27 mmol (95 % d. Th.)

R_F-Wert: ~ 0.80 (Hexan/Essigester 1:1)

CI-MS: 412 (100) [M+H⁺]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 2.15 (tt, *J*= 6.0 Hz, *J*= 6.4 Hz, 2H, CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 3.42 (t, *J*= 6.4 Hz, 2H, N-CH₂), 4.06 (t, *J*= 6.0 Hz, 2H, O-CH₂), 6.95-7.07 (m, 4H, Ptz), 7.18-7.27 (m, 4H, Ptz), 7.35 (d, *J*= 7.8 Hz, 2H, Tol), 7.79 (d, *J*= 7.4 Hz, 2H, Tol).

Synthese von 10-[3-(3-*O*-4,4'-Dimethoxytrityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-aminopropyl]-phenothiazin **22**.



In 8 mL Dimethylformamid werden 150 mg (0.47 mmol) 10-(3-Brompropyl)-phenothiazin **20** und 370 mg (0.94 mmol, 2 eq) 3-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-aminopropan-(*S*)-2,3-diol vorgelegt und mit 0.32 mL (1.88 mmol, 4eq) Diisopropylethylamin versetzt. Bei RT wird 10 Tage gerührt, die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird über FC gereinigt.

FC: Elution mit Essigester/ 1% Pyridin (500 mL), dann Dichlormethan/ Methanol 10:3 (+1 % Pyridin)

Ausbeute: gelber Feststoff, 161 mg, 0.25 mmol (54 % d. Th.)

R_F-Wert: ~ 0.86 (Dichlormethan/ Methanol 10:3)

ESI-MS: 633 (20) [M⁺], 303 (100) [DMT⁺]

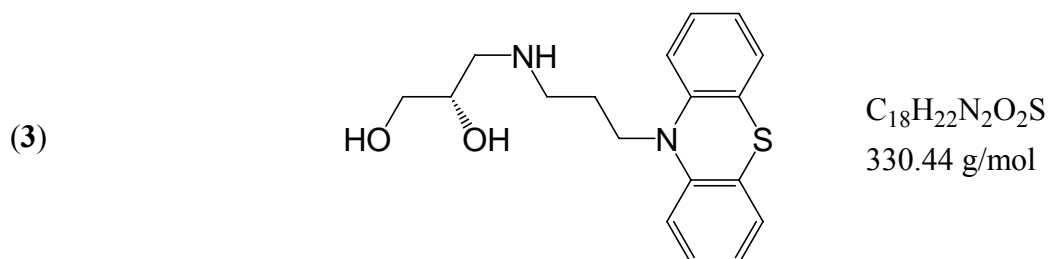
HRMS: berechnet für C₃₉H₄₁N₂O₄S [M+H⁺] 633.27815, gefunden 633.27814

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 1.76 (m, 2H, CH₂), 2.52 (m, 2H, PtzN-CH₂), 2.88 (m, 2H, OCH₂-CHOH), 3.55 (m, 2H, NCH₂), 3.67 (m, 1H, CHOH), 3.70 (s, 3H, O-Me), 3.72 (s, 3H, O-Me), 3.86 (m, 2H, N-CH₂-CHOH), 4.66 (br, 1H, OH), 6.70-6.79 (m, 4H, Ph-OMe-3,5), 6.80 (m, 2H, Ptz), 6.86 (m, 2H, Ptz), 6.99 (m, 1H, Ph-4), 7.02 (m, 2H, Ptz), 7.07 (m, 2H, Ptz), 7.12 (m, 4H, Ph-OMe-2,6), 7.18 (m, 2H, Ph-3,5), 7.27 (m, 2H, Ph-2,6).

¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 27.46 (CH₂), 45.61 (N-CH₂-CHOH), 53.52 (PtzN-CH₂), 55.86 (O-Me), 67.06 (OCH₂-CHOH), 67.24 (NCH₂), 69.77 (CHOH), 86.26 (DMT),

113.62 (Ph-OMe-3,5), 115.82, 116.16, 116.30, 123.02, 127.22 (Ptz), 127.75 (Ph-4), 128.27 (Ptz), 128.30 (Ph-3,5), 128.34 (Ph-2,6), 130.58 (Ph-OMe-2,6), 136.11 (Ph-OMe-1), 141.89 (Ptz), 145.47 (Ph-1), 159.64 (Ph-OMe-4).

Synthese von 10-[3-(2,3-(*S*)-dihydroxypropyl)-propyl]-phenothiazin **3**.



30 mg (0.05 mmol) 10-[3-(3-*O*-4,4'-Dimethoxytrityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-aminopropyl]-phenothiazin **22** werden in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit 1 mL Dichloressigsäure versetzt. Nach 30 min wird mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, mit Dichlormethan extrahiert und eingengt.

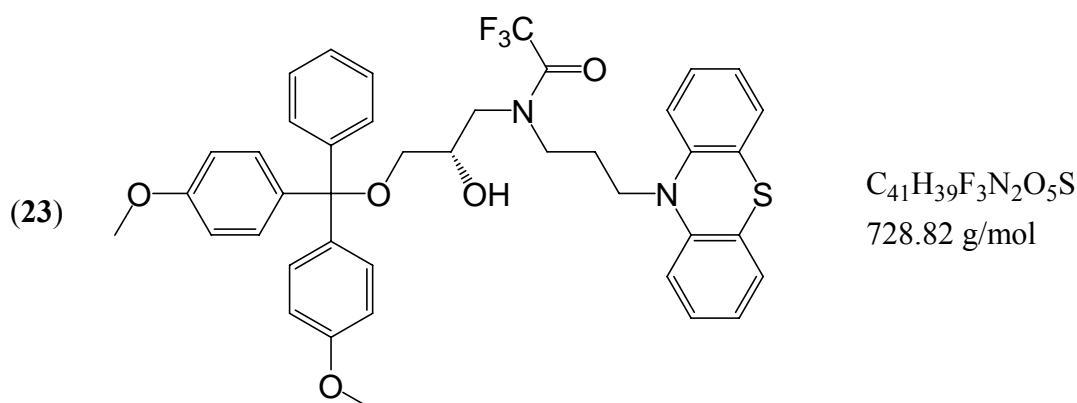
FC: Essigester/ Methanol 10:1 (150 mL), dann Methanol

Ausbeute: weißer Feststoff, 15 mg, 0.05 mmol (95 % d. Th.)

ESI-MS: 330 (100) [M^+]

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.73 (m, 2H, CH_2), 2.55 (m, 2H, PtzN- CH_2), 2.80 (m, 2H, OCH_2 -CHOH), 3.30 (m, 2H, NCH_2), 3.75 (m, 1H, $CHOH$), 3.81 (m, 2H, N- CH_2 -CHOH), 6.81-6.87 (m, 4H, Ptz), 7.09-7.17 (m, 4H, Ptz).

Synthese von 10-[3-(3-*O*-4,4'-Dimethoxytrityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-*N*-(2,2,2-trifluoracetyl)-aminopropyl]-phenothiazin **23**



298 mg (0.47 mmol) 10-[3-(3-*O*-4,4'-Dimethoxytrityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-aminopropyl]-phenothiazin **22** werden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 0.23 mL (2.8 mmol, 6eq) Pyridin und 59.6 μ L (0.47 mmol, 1eq) Trimethylchlorsilan versetzt. Nach 3 h wird auf 0 °C gekühlt und es werden 130.9 μ L (0.94 mmol, 2eq) Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben.

Unter Eiskühlung wird 20 min gerührt, dann 10 min bei RT. Es wird ein Mal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. 1 mL einer 1M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid (1 mmol, 2eq) in THF wird zugegeben und es wird 30 min bei RT gerührt. Es wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i.V. eingengt.

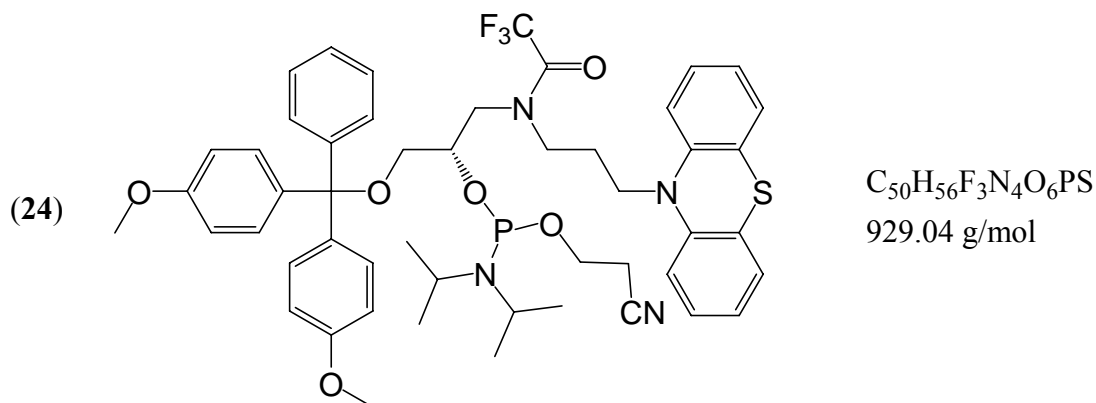
Ausbeute: gelbe Flüssigkeit, 325 mg, 0.45 mmol (95 % d. Th.)

R_f-Wert: ~ 0.79 (DCM/Methanol 20:3)

ESI-MS: 729 (20) [M+H⁺], 303 (100) [DMT⁺]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 1.74 (m, 2H, CH₂), 2.59 (m, 2H, PtzN-CH₂), 2.86 (m, 2H, OCH₂-CHOH), 3.50 (m, 2H, NCH₂), 3.71 (m, 1H, CHOH), 3.73 (s, 3H, O-Me), 3.74 (s, 3H, O-Me), 3.81 (m, 2H, N-CH₂-CHOH), 4.74 (br, 1H, OH), 6.70-6.80 (m, 6H, Ph-OMe-3,5, Ptz), 6.89 (m, 2H, Ptz), 6.99-7.12 (m, 9H), 7.20 (m, 2H, Ph-3,5), 7.29 (m, 2H, Ph-2,6).

Synthese von 10-(3-(3-*O*-Trityl-2-(*S*)-[(2-cyanoethoxy)-*N,N*-(diisopropylamino)-phosphanyloxy]-propyl)-*N*-(2,2,2-trifluoracetyl)-aminopropyl)-phenothiazin **24**

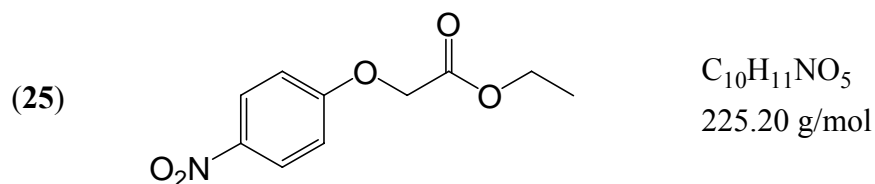


In 10 mL Dichlormethan werden 168 mg (0.23 mmol) 10-[3-(3-*O*-4,4'-Dimethoxytrityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-*N*-(2,2,2-trifluoracetyl)-aminopropyl]-phenothiazin **23** gelöst und mit 177 µL (1.04 mmol, 4.5 eq) Ethyldiisopropylamin und 91.6 µL (0.41 mmol, 1.8 eq) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt. Man rührt 45 min und versetzt mit 0.1 mL abs. Ethanol. Es wird rasch mit frischer gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt.

Ausbeute: gelbe Flüssigkeit, 203 mg, 0.22 mmol (95 % d. Th.)

R_f-Wert: ~ 0.68 (DCM/Methanol 20:3)

ESI-MS: 928 (100) [M⁺], 303 (70) [DMT⁺]

Synthese von 2-(p-Nitrophenoxy)-essigsäureethylester **25**

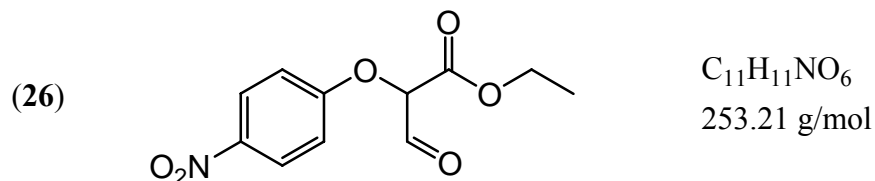
In 60 mL Aceton werden 5.99g (43.3 mmol) p-Nitrophenol gelöst und mit 12 g Kaliumcarbonat versetzt. Zur kräftig gelben Suspension werden 5 mL (45.1 mmol, 1.04 eq) Bromessigsäureethylester zugegeben und es wird 4 h unter Rückfluss gerührt. Man lässt abkühlen, zieht das Lösungsmittel ab und nimmt in Dichlormethan auf. Es wird mit 40 mL Wasser gewaschen, die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt.

Ausbeute: weißer Feststoff, 9.07 g, 40.3 mmol (93 % d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.80 (Hexan/Essigester 1:1)

EI-MS (70 eV): 225 (100) [M^+]

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3), 4.32 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2 - CH_3), 4.75 (s, 2H, CH_2), 7.00 (d, J = 9.4 Hz, 2H, Ph-2,6), 8.25 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ph-3,5).

Synthese von 2-(p-Nitrophenoxy)-formylessigsäureethylester **26**

In 25 mL Diethylether werden 12 mL (150 mmol, 30 eq) Ethylformiat und 340 mg (5 mmol, 1 eq) Natriumethanolat vorgelegt. Man versetzt mit 1130 mg (5 mmol) 2-(p-Nitrophenoxy)-essigsäureethylester **25** und rührt 3 h bei RT. Ein zitronengelber voluminöser Niederschlag entsteht. Die Lösungsmittel werden i. V. abgezogen, man nimmt in 30 mL 1 N HCl auf und extrahiert mit 50 mL Ether. Die Etherphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt.

FC: LM Hexan/ Essigester 1 : 1 + 5 % Triethylamin (700 mL),

dann Hexan/Essigester 1:1 + 5% Essigsäure

Säule 250 · 35 mm

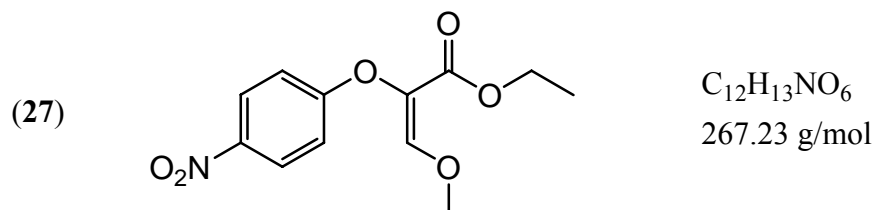
Ausbeute: gelbe Flüssigkeit, 1139 mg, 4.5 mmol (90 % d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.49 (Hexan/Essigester 2:1 + 5 % Essigsäure)

EI-MS (70 eV): 253 (100) [M^+]

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3), 4.32 (q, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.26 (s, 1H, CH), 7.00 (d, J = 9.4 Hz, 2H, Ph-2,6), 8.25 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ph-3,5), 9.97 (s, 1H, CHO).

Synthese von 2-(p-Nitrophenoxy)-3-methoxy-acrylsäureethylester **27**



1139 mg (4.5 mmol) 2-(p-Nitrophenoxy)-formylessigsäureethylester **26** werden in 25 mL Aceton gelöst und mit 3 g (21 mmol, 5 eq) Kaliumcarbonat und 2 mL (21 mmol, 5 eq) Dimethylsulfat 12 h bei 60 °C gerührt. Die Lösung wird filtriert und i.V. eingengt.

FC: LM Hexan/Essigester 1:1 + 5 % Triethylamin

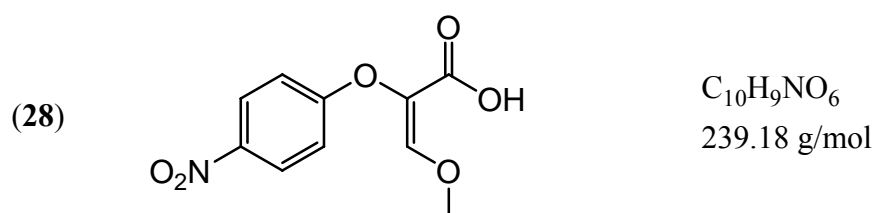
Ausbeute: gelbe Flüssigkeit, 722 mg, 2.7 mmol (60 % d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.39 (Hexan/Essigester 2:1 + 5 % Triethylamin)

CI-MS: 268 (100) [M^+]

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.33 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3), 4.32 (q, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.88 (s, 3H, OCH_3), 7.04 (d, J = 9.4 Hz, 2H, Ph-2,6), 7.64 (s, 1H, CHOME), 8.21 (d, J = 9.1 Hz, 2H, Ph-3,5).

Synthese von 2-(p-Nitrophenoxy)-3-methoxyacrylsäure **28**



1200 mg (4.5 mmol) 2-(p-Nitrophenoxy)-3-methoxy-acrylsäureethylester **27** werden in 25 mL Aceton und 5 mL Wasser gelöst. Es werden 2.5 g (44.6 mmol, 9.9 eq) Kaliumhydroxid zugegeben und auf 60 °C erhitzt. Nach 3 h zieht man das Lösungsmittel i. V. ab und nimmt in konz. Salzsäure auf. Unter Eiskühlung fällt oranger Niederschlag aus. Es wird abgesaugt und der Niederschlag wird i.V. getrocknet.

FC: LM Hexan/Essigester 1:1 + 5 % Triethylamin (400 mL),

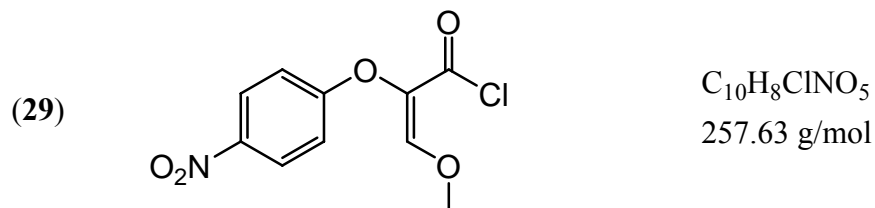
dann Hexan/Essigester 1:1 + 5 % Essigsäure.

Ausbeute: orangefarbener Feststoff 969 mg, 4.05 mmol (90 % d. Th.)

EI-MS (70 eV): 239 (100) [M^+]

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.88 (s, 3H, OCH_3), 7.04 (d, J = 9.4 Hz, 2H, Ph-2,6), 7.64 (s, 1H, CHOMe), 8.21 (d, J = 9.1 Hz, 2H, Ph-3,5).

Synthese von 2-(p-Nitrophenoxy)-3-methoxyacrylsäurechlorid **29**

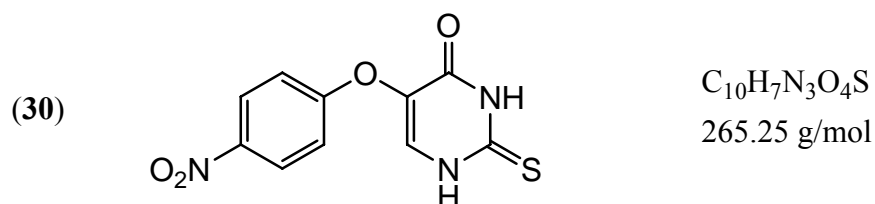


500 mg (2.1 mmol) 2-(p-Nitrophenoxy)-3-methoxyacrylsäure **28** werden in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit 1 mL (13.8 mmol, 6.6 eq) Thionylchlorid versetzt. Es wird 2 h gerührt und die Lösungsmittel werden i. V. abgezogen.

Ausbeute gelbe Flüssigkeit, 514 mg, 2 mmol (95 % d. Th.)

Charakterisierung: Das Produkt **29** wird in Ethanol gegeben. EI-MS: 268 (100) [Ethylester]

Synthese von 5-(4'-Nitrophenoxy)-2-thiouracil **30**



In 20 mL Diethylether werden 340 mg (5 mmol, 1eq) Natriumethanolat und 12 mL (150 mmol, 30 eq) Ethylformiat vorgelegt. Es werden 1126 mg (5 mmol) 2-(4'-Nitrophenoxy)-essigsäureethylester **25** zugegeben und bei RT 3 h gerührt. Es entsteht ein zitronengelber Niederschlag. Die Lösungsmittel werden i. V. abgezogen und der Rückstand wird in 10 mL absolutem Ethanol gelöst. Es werden 380 mg (5 mmol, 1eq) Thioharnstoff zugegeben und es wird 7 h bei 90 °C gerührt. Man lässt abkühlen, zieht das Lösungsmittel ab und nimmt den Rückstand in Wasser auf. Essigsäure wird zugesetzt bis pH \approx 4 erreicht ist, ein hellbrauner Niederschlag fällt aus. Es wird filtriert, der Niederschlag wird mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

FC: Säule 180 · 35 mm

LM Hexan/Ether 1:1 (600 mL), dann

Essigester (700 mL)

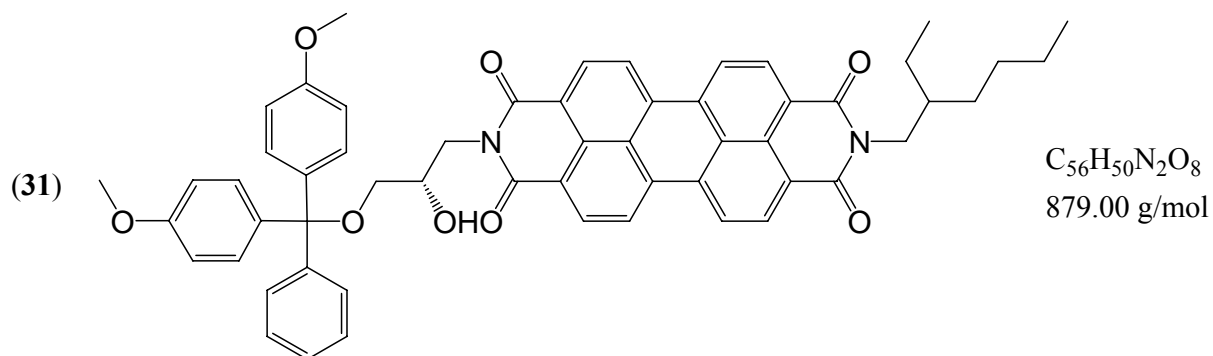
Ausbeute: hellbrauner Feststoff, 270 mg. 1 mmol (20 % d. Th.)

R_f -Wert: \sim 0.73 (Hexan/Essigester 1:1 + 5% Essigsäure)

ESI-MS: 264 (100) [M-H⁺]

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.19 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ph-2,6), 7.83 (s, 1H, H-6), 7.27 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ph-3,5).

Synthese von *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-perylene-3,4;9,10-tetracarbonsäurebisimid **31**



In 25 mL Pyridin werden 507 mg (1.29 mmol) Perylen-3,4;9,10-tetracarbonsäureanhydrid und 550 mg (2.5 mmol, 1.94 eq) Zink(II)acetat-dihydrat suspendiert und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Es werden 320 mg (2.48 mmol, 1.92 eq) 2-Ethylhexylamin und 500 mg (1.27 mmol, 0.98 eq) (*S*)-3-*O*-Dimethoxytrityl-1-aminopropan-2,3-diol in 6 mL Pyridin zugegeben und weitere 23 h unter Rückfluss gerührt. Man lässt abkühlen, zieht das Lösungsmittel ab und nimmt in Dichlormethan auf. Mit wässriger Kalilauge wird gewaschen bis die wässrige Phase keine hellgrüne Färbung mehr aufweist. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt.

FC: Dichlormethan/Aceton 20:1 bis zum Beginn der Elution der Produktfraktion, dann Dichlormethan/Aceton 10:1

Ausbeute: dunkelroter Feststoff, 544 mg, 0.62 mmol (48 % d. Th.)

R_f -Wert: ~ 0.26 (DCM/Aceton 10:1)

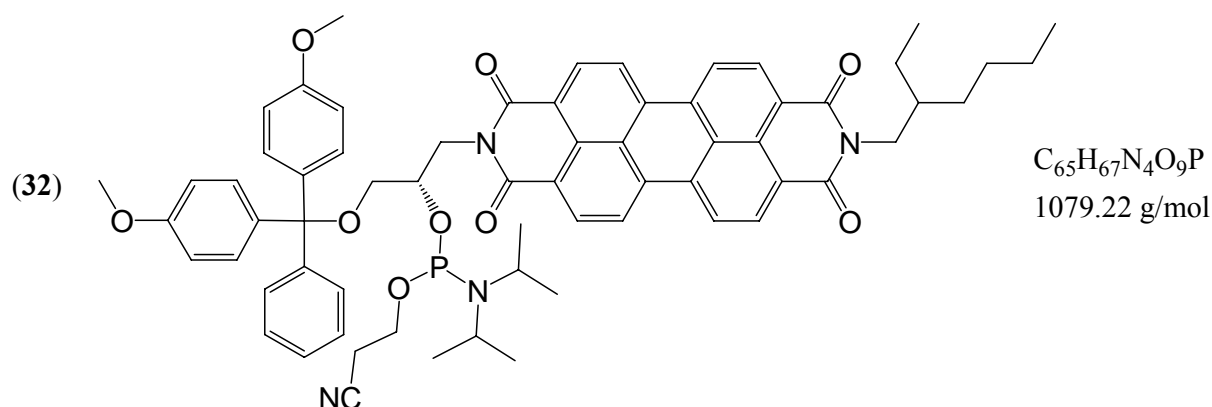
EI-MS: 878 (100) [M^-]

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_2Cl_2): δ = 0.89 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 0.94 (m, 3H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.42 – 1.27 (m, 8H, Alkylkette), 1.86 (m, 1H, CH), 3.26 (m, 2H, $\text{CHOH-CH}_2\text{-O}$), 3.37 (m, 1H, CHOH), 3.78 (s, 6H, O-CH_3), 3.99 - 3.89 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}$), 4.05 (m, 1H, N-HCH-CHOH), 4.28 (m, 1H, CHOH), 4.46 (m, 1H, N-HCH-CHOH), 6.86 (d, 4H, J = 9.0 Hz, Ph-OMe – 3,5), 7.22 (t, 1H, J = 7.3 Hz, Ph-4), 7.32 (dd, 2H, J = 7.8 Hz, J = 7.6 Hz, Ph- 3,5), 7.42 (m, 8H, Perylen – 1,6,7,12 & Ph-OMe -2,6), 7.54 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ph – 2,6), 7.87 (m, 4H, Perylen – 2,5,8,11).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_2Cl_2): δ = 163.31 (C=O), 163.07 (C=O), 158.99 (Ph-OMe – 4), 145.56 (Ph- 1), 136.47 (Ph-OMe – 1), 133.17, 133.14, 132.85, 132.82 (Perylen), 130.50 (Ph-

OMe – 2,6), 130.49, 130.34 (Perylen – 2,5,8,11), 128.55 (Ph- 2,6), 128.36 (Perylen), 128.21 (Ph – 3,5), 127.09 (Ph – 4), 124.80, 124.77, 122.84, 122.81, 122.54, 122.31 (Perylen), 113.47 (Ph-OMe – 3,5), 86.37 (DMT), 69.34, 69.29 (CHOH), 66.29 (CHOH-CH₂-O), 55.55 (OCH₃), 44.52 (N-CH₂-CH), 44.19 (N-CH₂-CHOH), 38.29, 38.21 (N-CH₂-CH), 31.00, 31.07 (CH-CH₂-CH₂), 29.01, 28.88 (CH₂-CH₂-CH₂), 24.36, 24.28 (CH-CH₂-CH₃), 23.52, 23.45 (CH₂-CH₂-CH₃), 14.31 (CH₂-CH₂-CH₃), 10.75, 10.62 (CH-CH₂-CH₃).

Synthese von *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-[(2-cyanoethoxy)-*N,N*-(diisopropylamino)-phosphanyloxy]-propyl)-perylene-3,4,9,10-tetracarbonsäurebisimid **32**



In 10 mL Dichlormethan werden 226 mg (0.257 mmol) *N*-(2-Ethylhexyl)-*N'*-(3-*O*-trityl-2-(*S*)-hydroxypropyl)-perylene-3,4,9,10-tetracarbonsäurebisimid **31** gelöst und mit 170 μ L (1.217 mmol, 4.7 eq) Triethylamin und 137.6 μ L (0.617 mmol, 2.4 eq) β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt. Nach 45 min wird mit 0.1 mL abs. Ethanol versetzt und rasch mit frisch hergestellter, gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt.

Ausbeute: dunkelrote Flüssigkeit, 263 mg, 0.244 mmol (95 % d. Th.)

R_f-Wert: ~ 0.70 (DCM/Aceton 10:1)

ESI-MS: 1079 (100) [M]

³¹P-NMR (121 MHz, CD₂Cl₂): δ = 149.6, 147.6

11.3 DNA- Synthese

Die Synthese von DNA-Oligonukleotiden erfolgt an einem PerSeptive Expedite 8909 Syntheseautomaten von *Applied Biosystems (ABI)*. Reagenzien zum Betrieb des Automaten werden von *ABI* bezogen und das Gerät wird mit Argon als Schutzgas betrieben.

Phosphoramidite werden von *ABI* (A(Bz), C(Bz), G(^tBu), T) und *Glen Research* (G(^tBu), Br-dU) bezogen.

Als Trägermaterial dienen CPG-Säulen mit 500 Å Porengröße und 1 µmol Belegung (*ABI*).

Die 5'-terminale DMT-Schutzgruppe wird an sämtlichen DNA-Strängen durch den Syntheseautomaten abgespalten (*trityl-off*-Synthese).

Artifizielle DNA-Bausteine werden in Acetonitril (amidite diluent) aufgenommen und als 0.1 M Lösung in den Syntheseautomaten eingesetzt. Der Perylenbisimid-Baustein wird in Dichlormethan aufgenommen und als 0.07 M Lösung in den Syntheseautomaten eingesetzt.

Kupplungsprotokolle

Der Syntheseautomat fördert Flüssigkeiten aus seinen Reservoirs in Pulsen zu je 16 µL durch die Reaktionsgefäße. Ein Kupplungsprotokoll besteht aus Einzelschritten, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer (in Sekunden) des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet ein schnellstmögliches Durchlaufen des Einzelschrittes.

Zur Synthese von unmarkierten DNA-Strängen wird das Standardprotokoll verwendet. Dieses Standardverfahren wird nur im Bereich „\$ Coupling“ verändert.

Dblk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan

Wsh: Acetonitril

Act: 0.45 M Tetrazol in Acetonitril

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

Ox: Iod in Wasser/ THF/ Pyridin

Standardprotokoll zur Kupplung von Adenosin:

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

Zur Synthese von einfach mit Ptz-dU oder Phenothiazin markierten DNA-Oligonukleotiden P1, P2, P8-P16, Z17-Z20, Z23-Z26 wird folgendes Protokoll verwendet (Sonderbaustein an Position 8):

\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
25	8 + Act	PULSE	5	0
25	8 + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0

Zur Synthese von mehrfach mit Ptz-dU markiertem Oligonukleotid P27 werden Kupplungszeit und Reagenzienmenge erhöht (Sonderbaustein an Pos. 8):

\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	6	0
25	8 + Act	PULSE	7	0
25	8 + Act	PULSE	2	75
2	Act	PULSE	4	300
1	Wsh	PULSE	7	525
1	Wsh	PULSE	8	0

Zur Synthese von Perylen-modifizierten Oligonukleotiden F21-F26 wird ein verändertes Kupplungsprotokoll mit zusätzlichem Reinigungsschritt verwendet. Der Perylenbaustein befindet sich in Position 6, in Position 9 wird Dichlormethan eingesetzt.

\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	6	0
23	6 + Act	PULSE	5	0
23	6 + Act	PULSE	8	350
23	6 + Act	PULSE	8	350
2	Act	PULSE	4	300
1	Wsh	PULSE	6	450
1	Wsh	PULSE	8	0
7	9	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	40	0

Aufarbeitung

Die CPG-Säulen werden im Hochvakuum getrocknet. Die Kunststoffgefäße werden geöffnet, das CPG-Granulat wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µL konzentrierter Ammoniaklösung (>25%, *trace select*, Fluka) versetzt. Die Deckel werden mit Kunststoffkappen gesichert und es wird mindestens 10 h auf 55 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das CPG mittels Zentrifugenfilter abgetrennt und mit 300 µL Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (30 min, Heizung 25 min, 35 °C, 100 mbar) vom Ammoniak befreit, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Die gefriergetrockneten Proben werden in 300 µL Wasser aufgenommen und über HPLC gereinigt.

HPLC

Reversed-phase HPLC wird mit einem *Shimadzu* HPLC System durchgeführt (Entgaser, Pumpeneinheit LC-10AT, Autosampler SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP). Für die analytische Chromatographie wird eine *Supelcosil* LC-318- Säule (250 x 4.6 mm) verwendet, präparative Trennungen erfolgen über eine *Supelcosil* LC- 318-Säule (250 x 10 mm Innen-ø, 5µm).

Zur Herstellung der Laufmittel wird Acetonitril (*LiChrosolv*, *Merck*) und entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet. Die Elution erfolgt mit einem Gradienten von 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B). Die Fließgeschwindigkeit beträgt 1 mL/min für analytische Methoden und 2.5 mL/min für präparative Methoden.

Die Detektion erfolgt über die Absorption bei $\lambda = 260$ nm sowie bei einer zweiten, von der Art des Oligonukleotids abhängigen Wellenlänge.

Modifikation	(keine)	Phenothiazin	Perylenbisimid
Wellenlänge	290 nm	315 nm	548 nm

Die Produkte der Chromatographie werden in sterilen Kunststoffröhrchen (Falcon-Tubes, 15 mL) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die verbleibende DNA wird in Wasser aufgenommen, diese Stammlösung wird zur Herstellung von weiteren DNA-Lösungen benutzt.

MS (MALDI, ESI)

Massenspektren von Oligonukleotiden werden am Institut für organische Chemie der TU München mittels MALDI-TOF an einem *Bruker* Biflex III Spektrometer im negativen Modus aufgenommen. Als Matrix dient eine Mischung von 3-Hydroxypicolinsäure und Diammoniumcitrat im Verhältnis 9:1, 50 mg/ 1 mL Lösungsmittel (Acetonitril/ Wasser 1:1).

ESI-Massenspektren von Oligonukleotiden werden von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg an einem *Finnigan* TSQ7000 im negativen Modus aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-Stammlösung wird über die Absorption bei $\lambda = 260$ nm bzw. 528 nm für perylenhaltige DNA bestimmt. 2 μ L Stammlösung wird mit 998 μ L Wasser bzw. Dimethylsulfoxid (für Perylen-modifizierte DNA F21-26) verdünnt und es wird die Absorption bei der geeigneten Wellenlänge bestimmt.

Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten DNA-Oligonukleotids (in Wasser) errechnet sich nach

$$\epsilon = (A \cdot \epsilon_A + C \cdot \epsilon_C + G \cdot \epsilon_G + T \cdot \epsilon_T) \cdot 0.9$$

A,C,G,T : Anzahl der entsprechenden Nukleobasen A,C,G,T

$\epsilon_A = 15\,400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_C = 7\,300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_G = 11\,700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_T = 8\,800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Extinktionskoeffizienten der Nukleobasen bei $\lambda = 528$ nm betragen 0.

Für artifizielle Nukleobasen wurden die Extinktionskoeffizienten bestimmt zu:

Ptz- dU (**2**) $\epsilon_{260} = 53\,200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (in Wasser/ Methanol 1:1)

Phenothiazin (**3**) $\epsilon_{260} = 7\,200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (in Methanol)

Perylen (**31**) $\epsilon_{528} = 62\,500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (in Dimethylsulfoxid)

Charakterisierung der DNA-Sequenzen

Sequenz	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mol L ⁻¹ cm ⁻¹]
N1	184 000
N2	172 000
N3	156 900
N4	158 200
N5	176 700
N6	180 600
N7	178 000
N8	197 800
N9	194 500
N10	197 800
N11	191 200
N12	197 800
N13	187 800
N14	197 800

Sequenz	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mol L ⁻¹ cm ⁻¹]
N15	197 800
N16	191 200
N18	184 000
N19	174 600
N20	174 600
N21	147 000
N22	154 900
N23	168 800
N24	176 700
N25	182 600
N30	197 100
N31	179 300
O1	170 100
O22	147 000

Sequenz	ber. Masse	gef. Masse	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mol L ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ_{528} [mol ⁻¹ L ⁻¹ cm ⁻¹]
P1	5330	5324	203 500	-
P2	5348	5344	215 400	-
P8	5698	5711	210 500	-
P9	5683	5704	209 100	-
P10	5698	5702	210 500	-
P11	5668	5675	207 800	-
P12	5698	5705	210 500	-
P13	5653	5663	206 400	-
P14	5698	5703	210 500	-
P15	5698	5710	210 500	-
P16	5668	5675	207 800	-
P30	6776	6776	405 700	-
Z17	5221	1304.9	157 500	-

Sequenz	ber. Masse	gef. Masse	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mol L ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ_{528} [mol ⁻¹ L ⁻¹ cm ⁻¹]
Z18	5221	5269	157 500	-
Z19	5223	5274	148 100	-
Z20	5223	5293	148 100	-
Z26	5705	1426.1 [M/4] ⁴⁻	165 400	-
Z27	5675	1418.6 [M/4] ⁴⁻	162 700	-
Z28	6009	1502.1 [M/4] ⁴⁻	173 300	-
Z29	5964	1490.9 [M/4] ⁴⁻	169 300	-
F21	5550	1387.5 [M/3] ³⁻ , 1850 [M/4] ⁴⁻	-	62 500
F22	5550	1387.3 [M/3] ³⁻ , 1850 [M/4] ⁴⁻	-	62 500
F26	6058	1514.5 [M/4] ⁴⁻	-	62 500
F27	6090	1522.4 [M/4] ⁴⁻	-	62 500
F28	6371	1592.7 [M/4] ⁴⁻	-	62 500
F29	6419	1604.7 [M/4] ⁴⁻	-	62 500

Schmelzpunkte der DNA-Duplexe

Schmelzpunkte werden bei $\lambda = 260$ nm in einem *Varian Cary 100 Bio* Spektrometer bestimmt.

Die Temperatur wird um 0.5 °C/min verändert. Das Spektrometergehäuse wird während der Messung mit Stickstoff gespült.

Sequenz		Schmelzpunkt [°C]	Konzentration NaCl [mmol]
P1	N1	60	250
P1	N5	56	250
P1	N6	55	250
P1	N7	55	250
P1	O1	63	250
P2	N2	53	250
N3	N6	62	250
N4	N1	60	250
P8	N8	60	250
P9	N9	61	250
P10	N10	58	250
P11	N11	60	250

Sequenz		Schmelzpunkt [°C]	Konzentration NaCl [mmol]
P12	N12	58	250
P13	N13	62	250
Z17	N1	50	0
Z17	N5	50	0
Z17	N6	50	0
Z17	N7	49	0
Z17	O1	56	0
Z18	N18	52.5	100
Z19	N19	62	100
Z20	N20	62	100
F21	N21	51	0
F22	N22	47	0
F22	O22	48	0
N23	N21	49	0
N24	N22	41	0
N24	O22	33	0
N25	N22	49	0
N25	O22	37	0
Z26	F26	53	0
Z27	F27	49	0
Z28	F28	49	0
Z29	F29	47	0
P30	N30	55	250

11.4 Bestrahlung von Ptz-dU- und Br-dU-modifizierten DNA-Duplexen P8/N8-P14/N14

Bestrahlung

1 mL einer Lösung von 4 μ M DNA-Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer und 250 mM NaCl wird frisch hybridisiert. In einer 1 cm langen Quarzküvette wird die Probe mit dem Licht einer Xenonlampe (75 W *Oriel Instruments*) durch einen cutoff-Filter ($\lambda > 305$ nm, *Andover Corporation*) bestrahlt. Beim Start der Belichtung und alle 5 Minuten werden 30 μ L der

Probe entnommen, mit 3 μL Piperidin versetzt und auf 90 °C erhitzt. Nach 30 min werden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet.

HPLC-Analytik

Die gefriergetrockneten Proben werden mit 15 μL HPLC-Wasser aufgenommen. Jeweils 10 μL einer Probe werden über HPLC (*Supelcosil* RP-18) analysiert. Der Gradient verläuft von 0→30% Acetonitril in 50 mM Ammoniumacetatpuffer über 45 Minuten. Es wird der Quotient aus den Peakhöhen des noch vorhandenen modifizierten Strangs und des unmodifizierten Gegenstrangs ermittelt. Der Quotient der ersten, zu Bestrahlungsbeginn entnommenen Probe wird auf den Wert 1 gesetzt und dient als Referenz für die weiteren Proben einer Messreihe.

12 Literaturverzeichnis

- [1] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374.
- [2] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, 17, 53-120.
- [3] D. Wang, D. A. Kreuzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.
- [4] S. Kawanashi, Y. Hiraku, S. Oikawa, *Mutation Res.* **2001**, 488, 65-76.
- [5] H.-A. Wagenknecht, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, DOI: 10.1039/b504754b.
- [6] M. Tasaka, K. Tanaka, M. Shiro, M. Shionoya, *Supramol. Chem.* **2001**, 13, 671-675.
- [7] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12494-12498.
- [8] K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, M. Shionoya, *Supramol. Chem.* **2002**, 14, 255-261.
- [9] K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8802-8803.
- [10] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 603-606.
- [11] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1398-1399.
- [12] T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2221-2228.
- [13] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691.
- [14] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2978-2980.
- [15] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 706-712.
- [16] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 1637-1639.
- [17] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, (21), 4877-4883.
- [18] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, (3), 744-751.
- [19] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1845-1847.
- [20] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2865-2869.
- [21] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 4128-4158.
- [22] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 3779-3783.
- [23] J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 277-280.
- [24] F. J. M. Hoeben, P. Jonkheijm, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1491-1546.

- [25] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 411-415.
- [26] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [27] H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 2454-2460.
- [28] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 51-70.
- [29] H.-A. Wagenknecht, *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 251-266.
- [30] A. R. Pike, L. H. Lie, R. A. Eagling, L. C. Ryder, S. N. Patole, B. A. Connolly, B. R. Horrocks, A. Houlton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 615-617.
- [31] E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2002**, 20, 282-286.
- [32] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. d. Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10803-10812.
- [33] N. M. Jackson, M. G. Hill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 209-215.
- [34] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 770-772.
- [35] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144-146.
- [36] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, 398, 407-410.
- [37] D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, 403, 635-638.
- [38] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14052-14055.
- [39] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 320-329.
- [40] M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11713-11716.
- [41] W. B. Davis, S. Hess, I. Naydenova, R. Haselsberger, A. Ogorodnik, M. D. Newton, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2422-2423.
- [42] F. D. Lewis, J. Liu, X. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1026-1028.
- [43] B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 612-618.
- [44] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2003**, 21, 1192-1199.
- [45] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5541-5553.
- [46] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4701-4709.
- [47] S. S. Wesolowski, M. L. Leininger, P. N. Pentchev, H. F. S. III, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4023-4028.
- [48] N. A. Richardson, S. S. Wesolowski, I. Henry F. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10163-10170.
- [49] X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, 1596-1603.

- [50] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 342, 231-238.
- [51] J. K. Barton, C. V. Kumar, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6391-6393.
- [52] 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.
- [53] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12759-12765.
- [54] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, 406, 51-53.
- [55] T. Renger, R. A. Marcus, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 8404-8419.
- [56] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265-322.
- [57] 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.
- [58] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 10406-10411.
- [59] Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 6942-6949.
- [60] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 2755-2762.
- [61] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6014-6019.
- [62] X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 10115-10123.
- [63] Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 1460-1467.
- [64] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, 4827-4831.
- [65] M. G. Debije, M. T. Milano, W. A. Bernhard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2752-2756.
- [66] C. Behrens, M. K. Cichon, F. Grolle, U. Hennecke, T. Carell, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 187-204.
- [67] T. Carell, M. v. Meltzer, Excess Electron Transfer in DNA Probed with Flavin- and Thymine-Dimer-modified Oligonucleotides. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Wagenknecht, H.-A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 77-92.
- [68] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (38), 11480-11481.
- [69] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1839-1842.

- [70] S. E. Rokita, T. Ito, Chemical Probing of Reductive Electron Transfer in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Wagenknecht, H.-A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 133-152.
- [71] F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 45-65.
- [72] F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, Dynamics of Photoinitiated Hole and Electron Injection in Duplex DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Wagenknecht, H.-A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 93-116.
- [73] 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.
- [74] O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 270-274.
- [75] S. T. Gaballah, J. D. Vaught, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, (12), 5927-5934.
- [76] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.
- [77] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, (15), 1878-1879.
- [78] H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, Electron Transfer and Structural Dynamics in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Wagenknecht, H.-A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 197-224.
- [79] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 6031-6041.
- [80] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1763-1766.
- [81] A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 318-321.
- [82] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8557-8558.
- [83] M. P. Scannell, D. J. Fenick, S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1971-1977.
- [84] E. Rivera, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 3966-3971.
- [85] Y. Xu, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 1354-1362.
- [86] X. Li, M. D. Sevilla, L. Sanche, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13668-13669.
- [87] T. Stafforst, U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **2006**, 118, (32), 5502-5506.
- [88] S. Breeger, M. v. Meltzer, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, (25), 6469-6477.
- [89] T. Ito, A. Kondo, S. Terada, S. Nishimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, (33), 10934-10942.

- [90] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5361-5362.
- [91] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617-618.
- [92] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503-520.
- [93] I. Saito, T. Nakamura, K. Nakatani, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12686-12687.
- [94] K. Kino, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7373-7374.
- [95] H. Ikeda, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10836-10837.
- [96] T. Douki, J.-L. Ravanat, D. Angelov, J. R. Wagner, J. Cadet, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 1-25.
- [97] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, 431, 217-221.
- [98] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, 412, 318-320.
- [99] K. Kawai, T. Majima, Spectroscopic Investigation of Oxidative Hole Transfer via Adenine Hopping in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Wagenknecht, H.-A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 117-132.
- [100] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 67-115.
- [101] T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 352-354.
- [102] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8206-8215.
- [103] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10002-10003.
- [104] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Liu, X. Zuo, D. M. Tiede, H. Long, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14445-14453.
- [105] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 159-170.
- [106] F. D. Lewis, Y. Wu, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12165-12173.
- [107] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12729-12731.
- [108] F. D. Lewis, Y. Wu, *J. Photochem. Photobiol. C* **2001**, 2, 1-16.
- [109] F. D. Lewis, R. S. Kalgutkar, Y. Wu, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12346-12351.
- [110] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14020-14026.
- [111] F. D. Lewis, J. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4850-4861.
- [112] F. D. Lewis, J. Liu, W. Weigel, W. Rettig, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12536-12541.

- [113] F. Lewis, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12037-12038.
- [114] F. D. Lewis, T. Wu, X. Liu, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2889-2902.
- [115] K. Senthilkumar, F. C. Grozema, C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, F. D. Lewis, Y. A. Berlin, M. A. Ratner, L. D. A. Siebbeles, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14894-14903.
- [116] M. A. O'Neill, J. K. Barton, Sequence-dependent DNA Dynamics: The Regulator of DNA-mediated Charge Transport. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Wagenknecht, H.-A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 27-76.
- [117] S. Delaney, J. K. Barton, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6475-6483.
- [118] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, 281, 409-428.
- [119] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9861-9870.
- [120] K. Fukui, K. Tanaka, M. Fujitsuka, A. Watanabe, O. Ito, *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, 50, 18-27.
- [121] T. Fiebig, C. Wan, S. O. Kelley, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1187-1192.
- [122] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 413-425.
- [123] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, (26), 16543-16550.
- [124] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, 283, 375-381.
- [125] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 5896-5900.
- [126] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, 3, 781-788.
- [127] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10924-10933.
- [128] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 4399-4408.
- [129] V. Shafirovich, N. E. Geacintov, Spectroscopic Investigation of Charge Transfer in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Wagenknecht, H.-A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 175-196.
- [130] V. Shafirovich, N. E. Geacintov, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 237, 129-157.
- [131] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 8431-8435.

- [132] V. Y. Shafirovich, S. H. Courtney, N. Ya, N. E. Geacintov, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4920-4929.
- [133] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 137-139.
- [134] S. Hess, W. B. Davis, A. A. Voityuk, N. Rösch, M. E. Michel-Beyerle, N. P. Ernsting, S. A. Kovalenko, J. L. P. Lustres, *ChemPhysChem* **2002**, 3, 452-455.
- [135] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10046-10055.
- [136] K. Kawai, K. Miyamoto, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 912-915.
- [137] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, N. Ichinose, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12688-12689.
- [138] K. Kawai, H. Yoshida, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13232-13237.
- [139] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (23), 6842-6843.
- [140] K. Kawai, T. Majima, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 117-137.
- [141] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajsiki, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4400-4407.
- [142] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9083-9092.
- [143] J. Yoo, S. Delaney, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6640-6641.
- [144] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11280-11281.
- [145] 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.
- [146] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, (27), 10192-10195.
- [147] A. Sharma, R. G. Shulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1999.
- [148] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- [149] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer: New York, 1984.
- [150] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, 9, 14-19.

- [151] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, 142, 463.
- [152] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, (8), 991-1024.
- [153] J. Reed, In *Circular Dichroism as a Tool for Investigating Macromolecular Structure*, Tschesche, H., Ed. Walter de Gruyter: 1990; pp 366-394.
- [154] W. C. Johnson, CD of Nucleic Acids. In *Circular Dichroism - Principles and Applications*, Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R. W., Eds. VCH: Weinheim, 1994; pp 523-540.
- [155] B. Speiser, *Chem. unserer Zeit* **1981**, 15, (2), 62-67.
- [156] J. Salbeck, *Anal. Chem.* **1993**, 65, (15), 2169-2173.
- [157] A. Weller, *Z. Physik. Chem.* **1982**, 133, 93-98.
- [158] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, (28), 5529-5541.
- [159] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3045-3046.
- [160] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [161] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.
- [162] M. H. Caruthers, A. Barone, S. L. Beaucage, D. Dodds, E. Fisher, L. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Young, *Methods Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [163] A. V. Azhayevev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4977-4986.
- [164] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1685-1690.
- [165] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1875-1916.
- [166] D. E. Bergstrom, *Nucleosides Nucleotides* **1982**, 1, (1), 1-34.
- [167] V. Farina, S. I. Hauck, *Synlett* **1991**, (3), 157-159.
- [168] P. Herdewijn, L. Kerremans, P. Wigerinck, F. Vandendreissche, A. V. Aerschot, *Tet. Lett.* **1991**, 32, (34), 4397-4400.
- [169] G. T. Crisp, B. L. Flynn, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, (24), 6614-6619.
- [170] M. Havelkova, M. Hocek, M. Cesnek, D. Dvorak, *Synlett* **1999**, (7), 1145-1147.
- [171] M. Hocek, A. Holy, I. Votruba, H. Dvorakova, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, (9), 1817-1825.
- [172] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- [173] M. Murata, T. Oyama, S. Watanabe, Y. Masuda, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, (1), 164-168.
- [174] A. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7901-7902.

- [175] A. Guram, R. A. Rennels, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1348-1350.
- [176] D. Millstein, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4992-4998.
- [177] W. J. Scott, G. T. Crisp, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4630-4632.
- [178] W. J. Scott, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3033-3040.
- [179] A. M. Echavarren, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5478-5486.
- [180] S. Höger, *Chem. in unserer Zeit* **2001**, 35, (2), 102-109.
- [181] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9119-9128.
- [182] D. J. McCaustland, A. B. Susan, J. C. Wiley, *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **1981**, 18, 1465-1470.
- [183] H. Suenaga, K. Nakashima, T. Mizuno, M. Takeuchi, I. Hamachi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 1263-1267.
- [184] M. Beinhoff, W. Weigel, M. Jurczok, W. Rettig, C. Modrakowski, I. Brüdgam, H. Hartl, A. D. Schlüter, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3819-3829.
- [185] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 3865-3877.
- [186] M. Oyama, J. Matsui, *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 570, (1), 77-82.
- [187] H. Lund, A. Berg, *Chem. Abstr.* **1946**, 40, 6072.
- [188] Y. E. Gerasimenko, V. A. Shigalevskii, V. P. Poteleshchenko, *Zh. Org. Khim.* **1970**, 6, (11), 2320-2326.
- [189] F. Dewhurst, D. A. Kitchen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1972**, 710-712.
- [190] V. Purohit, A. K. Basu, *Org. Lett.* **2000**, 2, (13), 1871-1874.
- [191] E. K. Fifer, R. H. Heflich, Z. Djuric, P. C. Howard, F. A. Beland, *Carcinogenesis* **1986**, 7, (1), 65-70.
- [192] A. Kamal, G. Ramesh, O. Srinivas, P. Ramulu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, (2), 471-474.
- [193] H. H. Hodgson, *Chem. Rev.* **1947**, 40, 251-277.
- [194] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *Tet. Lett.* **2002**, 43, 89-91.
- [195] T. Takada, K. Kawai, S. Tojo, T. Majima, *Tet. Lett.* **2003**, 44, 3851-3854.
- [196] M. T. Tierney, M. Sykora, S. I. Khan, M. W. Grinstaff, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, (32), 7574-7576.
- [197] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (4), 1125-1129.
- [198] M. T. Tierney, M. W. Grinstaff, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, (17), 5355-5359.

- [199] X. Hu, M. T. Tierney, M. W. Grinstaff, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, (1), 83-89.
- [200] S. A. N. Hashmi, X. Hu, C. E. Immoos, S. J. Lee, M. W. Grinstaff, *Org. Lett.* **2002**, 4, (26), 4571-4574.
- [201] S. L. Mecklenburg, B. M. Peek, J. R. Schoonover, D. G. McCafferty, C. G. Wall, B. W. Erickson, T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, (13), 5479-5495.
- [202] 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.
- [203] S. A. Alkaitis, G. Beck, M. Gratzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 5723-5729.
- [204] M. T. Tierney, M. W. Grinstaff, *Org. Lett.* **2000**, 2, (22), 3413-3416.
- [205] C. S. Krämer, T. J. Zimmermann, M. Sailer, T. J. J. Müller, *Synthesis* **2002**, 1163-1170.
- [206] C. S. Krämer, K. Zeitler, T. J. J. Müller, *Tet. Lett.* **2001**, 42, 8619-8624.
- [207] E. R. Biehl, T. Daniel, P. C. Reeves, S. Lapis, *J. Heterocyclic Chem.* **1974**, 11, (2), 247-249.
- [208] H. S. Chiou, P. C. Reeves, E. R. Biehl, *J. Heterocyclic Chem.* **1976**, 13, (1), 77-82.
- [209] M. J. Jovanovic, E. R. Biehl, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, (11), 1905-1908.
- [210] S. Ebdrup, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1147-1150.
- [211] M. Sailer, R. A. Gropeanu, T. J. J. Müller, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, (19), 7509-7512.
- [212] R. Baltzly, M. Harfenist, F. J. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68, 2673-2674.
- [213] J. Cymerman-Craig, W. P. Rogers, G. P. Warwick, *Aust. J. Chem.* **1955**, 8, 252-257.
- [214] W. J. Evans, S. Smiles, *J. Chem. Soc.* **1935**, 1263-1265.
- [215] E. A. Nodiff, M. Hausman, *J. Org. Chem.* **1964**, 29, (8), 2453-2455.
- [216] H. L. Yale, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 2270-2272.
- [217] L. Zhu, J. Duquette, M. Zhang, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, (9), 3729-3732.
- [218] C. D. M. t. Berge, C. H. P. Bruins, *Pharm. Weekblad* **1969**, 104, 1433-1443.
- [219] S. Steenken, *Free Rad. Res. Comms.* **1992**, 16, 349-379.
- [220] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1842-1844.
- [221] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6720-6721.
- [222] G. P. Cook, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, (42), 10025-10030.
- [223] T. Chen, G. P. Cook, A. T. Koppisch, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (16), 3861-3866.
- [224] Z. A. Doddridge, J. L. Warner, P. M. Cullis, G. D. D. Jones, *Chem. Commun.* **1998**, 1997-1998.

- [225] B. J. Swanson, J. C. Kutzer, T. H. Koch, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, (5), 1274-1276.
- [226] H. Ihmels, K. Faulhaber, K. Wissel, G. Viola, D. Vedaldi, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2999-3001.
- [227] H. Fujita, I. Matsuro, *Chem.-Biol. Interactions* **1988**, 66, 27-36.
- [228] J. Decuyper, J. Piette, M. Lopez, M.-P. Merville, A. v. d. Vorst, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, (24), 4025-4031.
- [229] K. Kawai, Y. Wata, M. Hara, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3586-3590.
- [230] G. Mehta, T. Sambaiah, B. G. Maiya, M. Sirish, A. Dattagupta, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, (4), 295-297.
- [231] M. Sakaguchi, M. Hu, L. Kevan, *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, (2), 870-874.
- [232] E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, (17), 6190-6191.
- [233] D. E. Rudisill, J. K. Stille, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, (25), 5856-5866.
- [234] K. G. Thomas, V. Biju, P. V. Kamat, M. V. George, D. M. Guldi, *ChemPhysChem* **2003**, 4, 1299-1307.
- [235] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 13, 2051-2054.
- [236] P. Koenig, S. A. Reines, C. R. Cantor, *Biopolymers* **1977**, 16, 2231-2242.
- [237] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 416-417.
- [238] A. R. Muci, S. L. Buchwald, *Top. Curr. Chem.* **2002**, 219, 131-209.
- [239] F. D. Bellamy, K. Ou, *Tet. Lett.* **1984**, 25, (8), 839-842.
- [240] E. G. Podrebarac, C. C. Cheng, 2'-Deoxy-5-hydroxyuridine. Hydroxylation via addition of aqueous bromine. In *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, Zorbach, W. W.; Tipson, R. S., Eds. Interscience Publishers: New York, 1968; Vol. 1, pp 412-413.
- [241] J. Fujimoto, L. Tran, L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, (11), 1254-1258.
- [242] P. Y. S. Lam, C. G. Clark, S. Saubern, J. Adams, M. P. Winters, D. M. T. Chan, A. Combs, *Tet. Lett.* **1998**, 39, 2941-2944.
- [243] D. A. Evans, J. L. Katz, T. R. West, *Tet. Lett.* **1998**, 39, 2937-2940.
- [244] D. M. T. Chan, K. L. Monaco, R.-P. Wang, M. P. Winters, *Tet. Lett.* **1998**, 39, 2933-2936.
- [245] R. F. Schinazi, W. H. Prusoff, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, (6), 841-847.
- [246] L. A. Al-Razzak, D. Schwepler, C. J. Decedue, J. Balzarini, E. D. Clercq, M. P. Mertes, *J. Med. Chem.* **1987**, 30, (2), 409-419.

- [247] M. Gütschow, T. Hecker, A. Thiele, S. Hauschildt, K. Eger, *Bioorg. Med. Chem* **2001**, 9, 1059-1065.
- [248] Y. Zhao, T. Yang, M. Lee, D. Lee, M. G. Newton, C. K. Chu, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, (16), 5236-5242.
- [249] I. Winckelmann, E. H. Larsen, *Synthesis* **1986**, 12, 1041-1044.
- [250] T. O. Zaikova, A. V. Rukavishnikov, G. B. Birrell, O. H. Griffith, J. F. W. Keana, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, (2), 307-313.
- [251] A. Sood, S. Kumar, S. Nampalli, J. R. Nelson, J. Macklin, C. W. Fuller, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (8), 2394-2395.
- [252] Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda, T. Ueno, K. Hirose, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (13), 4888-4894.
- [253] T. H. Brown, R. C. Blakemore, G. J. Durant, J. C. Emmett, C. R. Ganellin, M. E. Parsons, D. A. Rawlings, T. F. Walker, *Eur. J. Med. Chem.* **1988**, 23, (1), 53-62.
- [254] R. Csuk, G. Thiede, *Z. Naturforsch* **2002**, 57 b, 1287-1294.
- [255] M. S. Novikov, A. A. Ozerov, O. G. Sim, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2005**, 41, (8), 1036-1040.
- [256] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15552-15559.
- [257] H. Langhals, *Heterocycles* **1995**, 40, (1), 477-500.
- [258] S. Demming, H. Langhals, *Chem. Ber.* **1988**, 121, 225-230.
- [259] A. Rademacher, S. Märkle, H. Langhals, *Chem. Ber.* **1982**, 115, (8), 2927-2934.
- [260] H. Langhals, *Chem. Ber.* **1985**, 118, (11), 4641-4645.
- [261] H. Langhals, *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, (6), 1309-1343.
- [262] H. Langhals, S. Demming, T. Potrawa, *J. Prakt. Chem.* **1991**, 333, (5), 733-748.
- [263] F. Würthner, *Chem. Commun.* **2004**, 1564-1579.
- [264] M. A. Abdalla, J. Bayer, J. O. Rädler, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 3967-3970.
- [265] H. Kaiser, J. Lindner, H. Langhals, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 529-535.
- [266] H. Tröster, *Dyes Pigm.* **1983**, 4, 171-177.
- [267] H. Langhals, S. Saulich, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, (24), 5630-5643.
- [268] D. Gosztola, M. P. Niemczyk, W. Svec, A. S. Lukas, M. R. Wasielewski, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, (28), 6545-6551.
- [269] H. Langhals, S. Demming, H. Huber, *Spectrochim. Acta* **1988**, 44A, 1189-1193.
- [270] N. Rahe, C. Rinn, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 2120-2121.

- [271] S. Bevers, T. P. O'Dea, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, (42), 11004-11005.
- [272] S. Bevers, S. Schutte, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5905-5915.
- [273] Y. Zheng, H. Long, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Chem. Commun.* **2005**, 4795-4797.
- [274] A. D. Q. Li, W. Wang, L. Q. Wang, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4594-4601.
- [275] W. Wang, W. Wan, H.-H. Zhou, S. Niu, A. D. Q. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (18), 5248-5249.
- [276] W. Wang, L.-S. Li, G. Helms, H.-H. Zhou, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (5), 1120-1121.
- [277] H. Langhals, O. Krotz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4444-4447.
- [278] M. Endo, N. C. Seeman, T. Majima, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 6074-6077.
- [279] B. Ding, R. Sha, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (33), 10230-10231.
- [280] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 4848-4870.
- [281] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3375-3376.
- [282] C. Brotschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1911-1923.
- [283] M. D. Sorensen, M. Petersen, J. Wengel, *Chem. Commun.* **2003**, 2130-2131.
- [284] K. Yamana, R. Iwase, S. Furutani, H. Tsuchida, H. Zako, T. Yamaoka, A. Murakami, *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 2387-2392.
- [285] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (8), 2217-2223.
- [286] S. M. Langenegger, R. Häner, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 9273-9276.
- [287] S. J. Kim, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6164-6171.
- [288] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (39), 11590-11591.
- [289] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, (11), 936-943.
- [290] J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (40), 12748-12749.
- [291] M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3466-3471.
- [292] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 547-553.
- [293] E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3372-3375.
- [294] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, (14), 2923-2925.