

Technische Universität München
Department Chemie
Lehrstuhl II für Organische Chemie

**Ladungstransfer in synthetischer DNA mit Ethidium als Basensurrogat oder
pyrenmodifizierten Guanin**

Linda Valis

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. J. A. Lercher

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H.-A. Wagenknecht,
Universität Regensburg
2. Univ.-Prof. Dr. F. E. Kühn
3. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Die Dissertation wurde am 15.02.07 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17.04.07 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2003 bis September 2003 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 möchte ich besonders danken für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Darüber hinaus möchte ich ihm für die wissenschaftlich sehr interessante Themenstellung danken.

Prof. Dr. Kessler gilt mein herzlicher Dank für die Unterstützung unserer Arbeitsgruppe an der TU München und für die Möglichkeit, die Ressourcen seines Lehrstuhls mitbenutzen zu dürfen

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- meinen Laborkollegen Elke Mayer-Enthart, Clemens Wagner, Janez Barbaric, Manuela Rist, Claudia Wanninger-Weiß (Muchas Gracias!), Peter Kaiser, Peter Kaden, Nicole Amann, Robert Huber, Christoph Beyer, Veronika Rödl, Christa Prunkl, Sina Berndl, für die sehr gute Zusammenarbeit und eine fantastische Arbeitsatmosphäre.
- Sina, die mich während des Zusammenschreibens mit schwäbischen Weisheiten aufmunterte.
- Elke, Clemens, Janez, Peter Kaden, für die Zeit als Studienkollegen und Laborkollegen in München, v. a. Elke, für ihre stets aufmunternden Worte und ihre Gastfreundschaft.
- den Mitgliedern des Arbeitskreises Kessler für ihre Unterstützung.
- Dr. Torsten Fiebig und seinen Mitarbeitern für die Messung der zeitaufgelösten Spektren.
- Burghard Cordes für die Aufnahme der ESI-Massenspektren in München und für die Flexibilität dringende Proben auch kurzfristig zu messen.
- all meinen Praktikanten für ihren Arbeitseinsatz und ihr Engagement.
- Nicolas Böge an der Universität Hamburg (Arbeitsgruppe Prof. C. Meier) für das zur Verfügung stellen von Phosphoramiditen für diese Arbeit.
- Gilbert Nöll für die sehr ausführliche Einweisung in die Spektroelektrochemie und Cyclovoltammetrie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung	1
2	Hintergrund	5
2.1	<i>Ladungstransfer in DNA</i>	5
2.1.1	Oxidativer Lochtransfer.....	9
2.1.1.1	<i>Biologische Relevanz</i>	9
2.1.1.2	<i>Mechanistische Modelle für den oxidativen Ladungstransport</i>	11
2.1.1.3	<i>Biochemische Studien zum oxidativen Lochtransfer</i>	16
2.1.1.4	<i>Spektroskopische Studien zum oxidativen Lochtransfer</i>	18
2.1.2	Reduktiver Elektronentransfer.....	19
2.1.2.1	<i>Mechanismen</i>	19
2.1.2.2	<i>γ-Puls-Radiolyse-Studien</i>	20
2.1.2.3	<i>Photochemische Auslösung des Elektronentransfers</i>	21
2.1.3	Bisherige Untersuchungen des Ladungstransfers mit Ethidiumderivaten als Ladungsdonor.....	22
2.1.3.1	<i>Untersuchung des oxidativen Ladungstransfers</i>	22
2.1.3.2	<i>Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers</i>	25
2.2	<i>Spektroskopische Methoden</i>	27
2.2.1	UV/VIS - und Fluoreszenzspektroskopie	27
2.2.1.1	<i>Grundlagen</i>	27
2.2.1.2	<i>Zeitaufgelöste Transientenabsorptionspektroskopie</i>	31
2.2.2	Cyclovoltammetrie und Spektroelektrochemie.....	33
2.2.3	CD-Spektroskopie	34
2.3	<i>Synthesemethoden</i>	36
2.3.1	DNA-Festphasensynthese.....	36
2.3.2	Pd-katalysierte Kreuzkupplungen an Nukleosiden.....	38
2.4	<i>SNP-Detektion</i>	40
2.4.1	Enzymatische Assays.....	41

2.4.1.1	<i>Single-Nucleotide Primer Extension</i>	41
2.4.1.2	<i>Invader Assay</i>	42
2.4.1.3	<i>TaqMan Assay</i>	43
2.4.2	Nichtenzymatische Assays	44
2.4.2.1	<i>Allelspezifische Hybridisierung</i>	44
2.4.2.2	<i>Strang-Austausch-Methode</i>	45
2.4.2.3	<i>Fluoreszenzmarkierte DNA-Basen und Fluoreszenzsonden als artifizielle Basen</i>	46
3	Ethidiummodifizierte Oligonukleotide	49
3.1	<i>Synthese und Charakterisierung der ethidiummodifizierten Nukleoside und Oligonukleotide</i>	49
3.2	<i>Ethidium als Loch- und Elektronendonor</i>	54
3.2.1	Untersuchungen zur Abstandsabhängigkeit des Ladungstransfers im System Ethidium-Deazaguanin und Ethidium-Nitroindol	55
3.2.2	Bestimmung der Reaktionsrate in den Systemen E-Z und E-N.....	61
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
3.3	<i>Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer im System Ethidium- Deazaguanin</i>	68
3.3.1	Einfluß von Basenfehlpaarungen auf den Lochtransfer	68
3.3.2	Zusammenfassung	84
3.4	<i>Einfluß der Linkerlänge des Ethidium-Nukleosids auf die spektroskopischen Eigenschaften</i>	85
3.4.1	Synthese von Ethidiummodifizierten Oligonukleotiden.....	86
3.4.2	Spektroskopische Untersuchungen der ethidiummodifizierten DNA. 91	
3.4.3	Zusammenfassung	93
4	PydG-modifizierte Oligonukleotide	94
4.1	<i>Synthese von PydG (2)</i>	97
4.2	<i>Spektroskopische Untersuchung von PydG (2)</i>	98
4.3	<i>Synthese und Charakterisierung der PydG-modifizierten Oligonukleotide</i>	101
4.3.1	PydG als Hybridisierungssonde.....	102

4.3.2	Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer im System PydG-Deazaguanin	112
4.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	115
4.4	<i>Vergleich PydG-modifizierter Oligonukleotide mit C8-Arylamin-dG modifizierten Oligonukleotiden</i>	116
4.4.1	Einbau von C8-Arylamin-dG in DNA	116
4.4.2	Spektroskopische Charakterisierung der Oligonukleotide.....	119
4.4.3	Zusammenfassung	122
4.5	<i>Synthese und optische Charakterisierung von BpdG(3)</i>	123
4.5.1	Hintergrund.....	123
4.5.2	Synthese von 8-Benz[a]pyren-6-yl-2'-desoxyguanosin	124
4.5.3	Spektroskopische Untersuchungen von BpdG (3)	126
4.5.4	Zusammenfassung	129
5	Zusammenfassung	130
6	Materialien und Methoden	132
6.1	<i>Materialien und Geräte</i>	132
6.2	<i>Synthese von Ethidiumnukleosiden</i>	137
6.3	<i>Synthese des PydG-Phosphoramidits(2)</i>	150
6.4	<i>Synthese des 8-(6-benzo[a]pyrenyl)-2'-desoxyguanosins(3)</i>	156
6.5	<i>Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden</i>	159
6.5.1	Allgemeines	159
6.5.2	Verwendete Oligonukleotidsequenzen	163
6.5.3	Synthese und Charakterisierung von Ethidiummodifizierten Oligonukleotiden.....	169
6.5.4	Synthese und Charakterisierung von PydG-modifizierten Oligonukleotiden.....	172
7	Literaturverzeichnis	174

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
A	Adenin
Å	Angström
<i>Alloc</i>	Allyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BET	Elektronenrücktransfer (<i>Back Electron Transfer</i>)
BpdG	8-(6-benzo[a]pyrenyl)-2'-desoxyguanosin
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	Zirculardichroismus
CPG	<i>Controlled Pore Glas</i>
CT	Ladungstransfer (<i>Charge Transfer</i>)
CV	Cyclovoltammetrie
D	Donor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dG	2'-Desoxyguanosin
DIPEA	<i>Di</i> isopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
E	Ethidium
E^0	Redoxpotential
eq	Äquivalent
ESI	Elektronensprayionisation
ET	Elektronentransfer
eV	Elektronenvolt
Fc	Ferrocen

FC	<i>Flash-Säulenchromatographie</i>
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
fs	Femtosekunde
G	Guanin
h	Stunde
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MeOH	Methanol
M	Molar
MALDI	<i>Matrix assisted Laser Desorption and Ionization</i>
MS	Massenspektrometrie
N	5-Nitroindol
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NBS	N-Brom-Succinimid
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NMR	Kernresonanzspektroskopie
ns	Nanosekunde
Ph	Phenyl
PydG	8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin
ps	Pikosekunde
R _f	Retentionsfaktor
RP	<i>Reverse Phase</i>
RT	Raumtemperatur
S	<i>dSpacer</i>
SEC	Spektroelektrochemie
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ss	Einzelstrang
T	Thymin
THF	Tetrahydrofuran
UV-VIS	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190-800 nm)
V	Volt

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den Chemical Abstracts¹ und an den von der IUPAC-IUB-Kommission² 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

Bereits kurz nach der Aufklärung der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick*^[1] wurde aufgrund der ausgeprägten π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Nukleobasen über die Möglichkeit eines Ladungstransports entlang der Helixachse diskutiert.^[2] Das Interesse der Forscher an Ladungstransferprozessen nahm zu, als sich ein Zusammenhang zwischen oxidativen Ladungstransferprozessen durch die DNA und vielen beobachteten Schädigungen des Erbguts, wie Mutationen, sowie Entstehung von Krebs herausstellte.^[3-6] Eine Reihe dieser beobachteten Schäden sind die Folge des Auftretens von radikalischer Ladung in DNA. Der Ort der Radikalbildung, die z. B. durch ionisierende Strahlung, Alkylierungs- und Oxidationsmittel ausgelöst werden kann, und die Stellen der eigentlichen Schädigung können durch Ladungstransferreaktionen räumlich separiert sein.^[7] Für das Verständnis des Ladungstransfers in DNA und die Entstehung von DNA-Schäden *in vivo* ist eine grundlegende Erforschung dieser Prozesse von besonderer Bedeutung. Diese Erkenntnisse können dann zur Entwicklung neuartiger Therapeutika für Krankheiten, die mit DNA-Schäden in Verbindung stehen, genutzt werden.

Über die biologische Bedeutung des verwandten Prozesses, des reduktiven Elektronentransfers durch die DNA, besteht noch Unklarheit. Man vermutet z. B. eine Beteiligung von Elektronentransferprozessen bei der proteinabhängigen Erkennung von DNA-Schäden. Nur bei der Reperatur der Thymin-Thymin-Dimere durch die DNA-Photolyase ist die Beteiligung des reduktiven Elektronentransfers gut untersucht, der allerdings nur zwischen DNA und Protein stattfindet und nicht DNA-vermittelt läuft.^[8-10] Anfang des Jahres 2000 wurde die Erforschung des reduktiven Elektronentransfers intensiv vorangetrieben. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse lassen sich heute bereits in der Analytik einsetzen. Dabei wird der reduktive Elektronentransfer bei der Entwicklung von empfindlichen DNA-Sensoren und -Chips^[11-14] genutzt. Damit können Punktmutationen und DNA-Schäden unabhangig von deren benachbarten Basensequenzen nachgewiesen werden. Die Detektion von Punktmutationen, *sog. SNP* (single nucleotide polymorphism)^[15] ist von besonderer Bedeutung, da die Substitution, Deletion oder Insertion eines einzigen Nukleotids gravierende gesundheitliche Folgen wie z.B. Erbkrankheiten haben kann. Daher besteht großes Interesse für die Onkologie,

Genetik, Virologie und Pharmakogenetik einzelne Punktmutationen innerhalb einer Gensequenz nachweisen zu können.^[16, 17]

Diese Arbeit gliedert sich in zwei große Bereiche:

- I. Synthese von ethidiummodifizierten Oligonukleotiden zur Untersuchung des Ladungstransfers in DNA
- II. Synthese von C-8-dG-Addukten des Pyrens, von Arylaminen sowie des Benz[a]pyrens und entsprechend modifizierter Oligonukleotide zur optisch-spektroskopischen Charakterisierung

I. Durch Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Wagenknecht ist es möglich, das Ethidiumbasensurrogat (**1**) kovalent in Oligonukleotide einzubauen.^[18, 19]

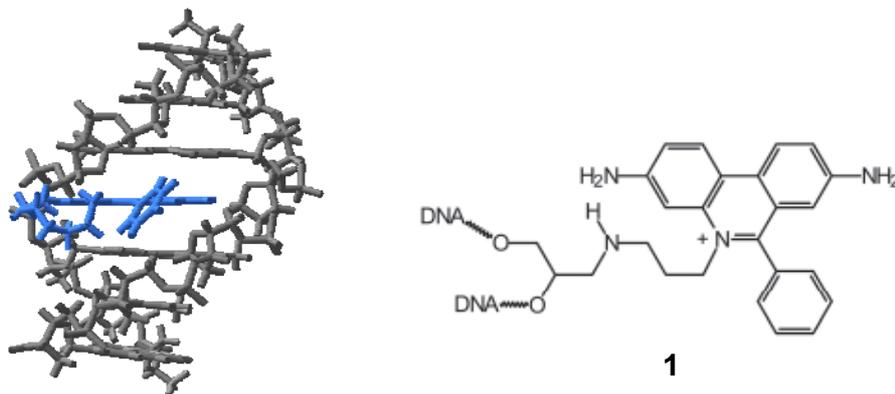


Abb.1-1: Ethidiummodifizierte DNA.

Das ist die strukturelle Voraussetzung, um eine genauere Untersuchung von Ladungstransferprozessen in DNA zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass Ethidium als Fluoreszenzsonde geeignet ist, um Ladungstransferprozesse in DNA zu untersuchen.^[20-29] Da aufgrund der relativen Lage der Redoxpotentiale kein Ladungstransfer zwischen photoangeregtem Ethidium und den natürlichen Basen stattfinden kann, müssen geeignete Ladungsakzeptoren zur Verfügung gestellt werden.^[26-28, 30-32] In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass 7-Deazaguanin (Z) ein geeigneter Lochakzeptor ist, um den oxidativen Ladungstransfer zu untersuchen und dass der Ladungstransfer empfindlich auf Basenfehlpaarungen reagiert.^[33]

Photoangeregtes Ethidium kann auch als Reduktionsmittel dienen, wenn ein geeigneter Elektronenakzeptor, wie 5-Nitroindol^[34], bereitgestellt wird. In dieser Arbeit soll die Distanzabhängigkeit des oxidativen wie reduktiven Ladungstransfers im System Ethidium-Deazaguanin und Ethidium-Nitroindol untersucht werden. Durch diese strukturell sehr ähnlichen Systeme soll die direkte Vergleichbarkeit des oxidativen und reduktiven Ladungstransfers erstmals ermöglicht werden. Außerdem soll der Ladungstransfer zwischen Ethidium und Deazaguanin in Bezug auf seine Empfindlichkeit gegenüber Basenfehlpaarungen näher untersucht werden und geprüft werden, ob eine Detektion von Punktmutationen, sog. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)^[15] mit dem System Ethidium-Deazaguanin möglich ist.

II. Bisherige Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Wagenknecht haben gezeigt, dass PydG (**2**) als Lochdonor in der DNA geeignet sein sollte.^[35] Darauf basierend sollen PydG-modifizierte Oligonukleotide synthetisiert werden, um den oxidativen Ladungstransfer in DNA weiter untersuchen zu können. Ferner soll der Einfluss der PydG-Einheit auf die Stabilität und Konformation des DNA-Duplexes untersucht werden und mit anderen repräsentativ ausgesuchten Duplexen verglichen werden.

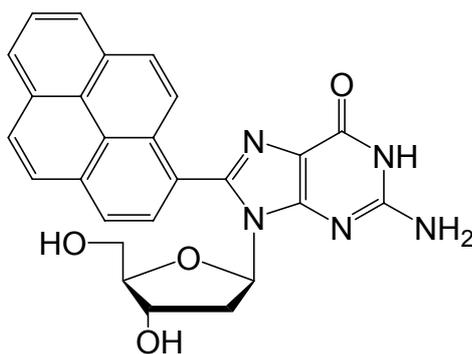


Abb. 1-2: PydG (**2**).

Benz[a]pyren zählt zu den potentesten Kanzerogenen innerhalb der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH).^[36] Ein wichtiges gebildetes Bp-Addukt im Körper stellt 8-Benz[a]pyren-6-yl-2'-desoxyguanosin (BpdG, **3**) dar.^[37] Die hohe Depurinierungstendenz der Benzpyren-Addukte spielt bei der Entste-

2 Hintergrund

2.1 Ladungstransfer in DNA

Bereits kurz nach der Aufklärung der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick*^[1] wurde aufgrund der ausgeprägten π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Nucleobasen über den Transport von Ladungen entlang der Helixachse diskutiert.^[2] Für den Ladungstransfer in DNA gibt es zwei Varianten: den oxidativen Lochtransfer und den reduktiven Elektronentransfer. Das Hauptinteresse der Forscher lag in den letzten Jahrzehnten auf dem oxidativen Lochtransfer aufgrund der biologischen Relevanz. Viele beobachtete Schädigungen des Erbguts, die Mutationen und Krebsentstehung auslösen können, sind die Folge von oxidativen Ladungstransferprozessen durch die DNA.^[3-6]

Beim Lochtransfer wird die DNA oxidiert. Ein Elektron wird vom photoangeregten Donor aus der DNA aufgenommen und ein Radikalkation, d. h. ein Elektronenloch, verbleibt im Basenstapel (s. Abb. 2-1). Dieses positive Radikal kann während des Transfers durch den Basenstapel mit seiner Umgebung reagieren, was oxidative Schäden, die Mutationen oder Krebs auslösen können, zur Folge hat.

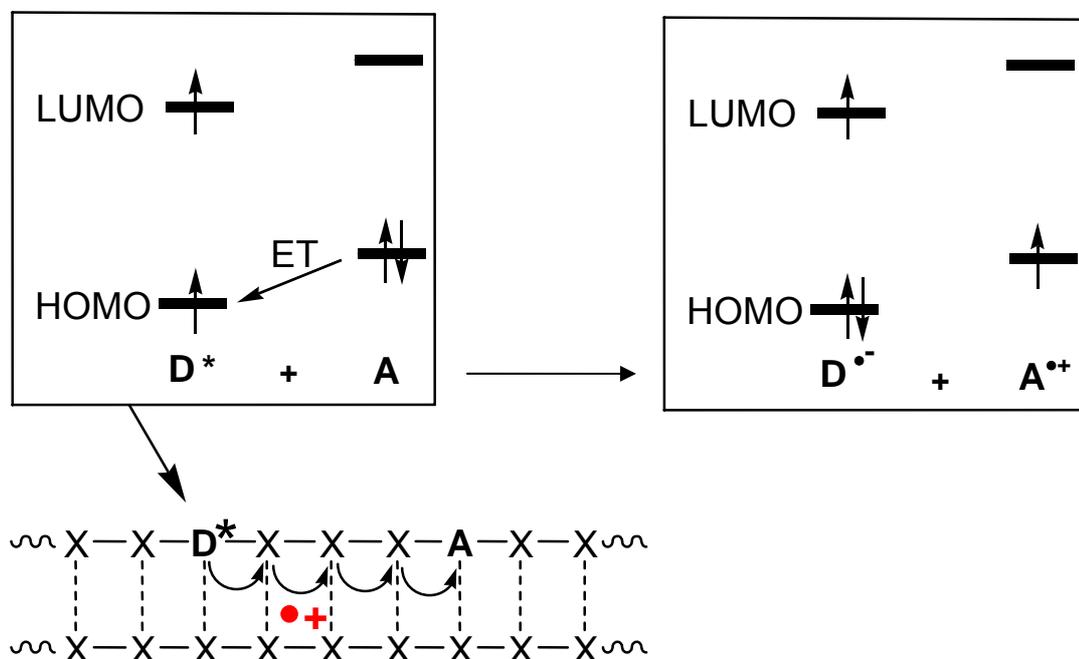


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des oxidativen Lochtransfers. Ein Elektron wird aus dem HOMO des Ladungsakzeptors A in das HOMO des photoangeregten Donors D^* übertragen.

Beim reduktiven Ladungstransfer wird die DNA reduziert. Ein Elektron wird vom photoangeregten Donor in die DNA injiziert und es entsteht ein negativ geladenes Radikalanion (s. Abb. 2-2). Diese negative Ladung kann sich durch den Basenstapel bewegen, wobei hier anders als beim oxidativen Ladungstransfer bisher keine Schädigung der DNA nachgewiesen wurde. Die Mechanismen des reduktiven Elektronentransfers wurden erst seit dem Jahr 2000 intensiv erforscht und die Erkenntnisse sind bisher noch nicht so weit fortgeschritten.

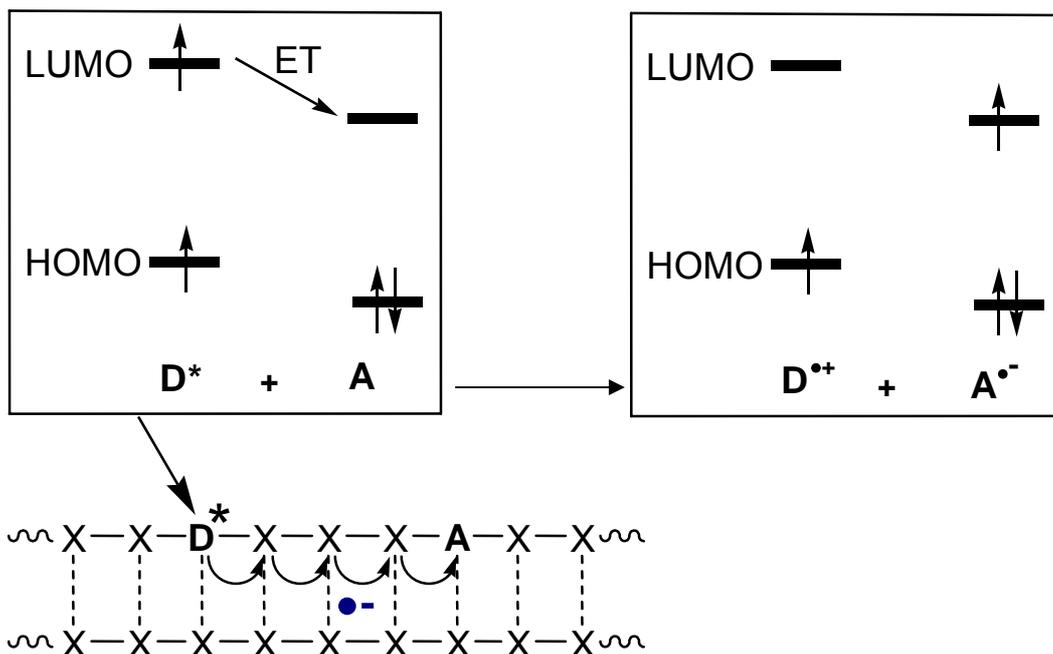


Abb. 2-2: Schematische Darstellung des reduktiven Elektronentransfers. Ein Elektron wird aus dem LUMO des photoangeregten Ladungsdonors D^* in das LUMO des Akzeptors A übertragen.

Zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen ist es erforderlich, die DNA mit redoxaktiven Sonden zu markieren. Die Einführung dieser Sonden in den DNA-Basenstapel kann auf folgenden Wegen erfolgen:

- (1) Der Einbau der redoxaktiven Sonde als artifizielles Nukleosid: Darunter versteht man vollsynthetische Nukleotidanaloga, die über Linkereinheiten^[42-45] mit dem Desoxyribosephosphatrückgrat der DNA kovalent verknüpft sind. Das Chromophor ist in den Basenstapel interkaliert und gibt

seine Anregungsenergie daher direkt an die benachbarten Nucleobasen ab.

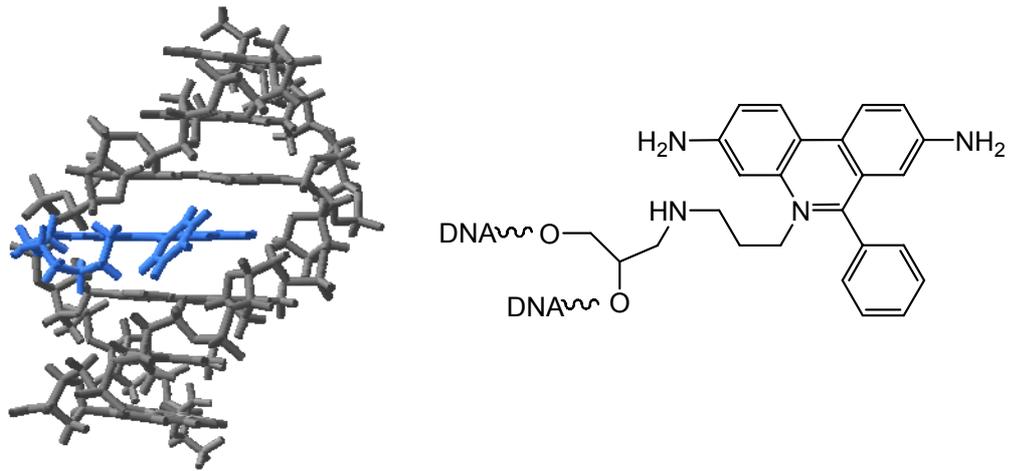


Abb. 2-3: Das Nucleotidanalogon des Ethidiums in DNA.^[18, 19, 46]

(2) Die Modifikation eines natürlichen Nucleosids durch kovalente Verknüpfung mit einer redoxaktiven Sonde. Der Einbau des modifizierten Nucleosids (z. B. PydU^[47-51], PydG^[47]) kann über DNA-Festphasensynthese erfolgen oder ist durch nachträgliche Modifikation eines inkorporierten Vorläufers möglich. Im Idealfall ragt das Chromophor in die große Furche und kann außerhalb des Basenstapels angeregt werden.

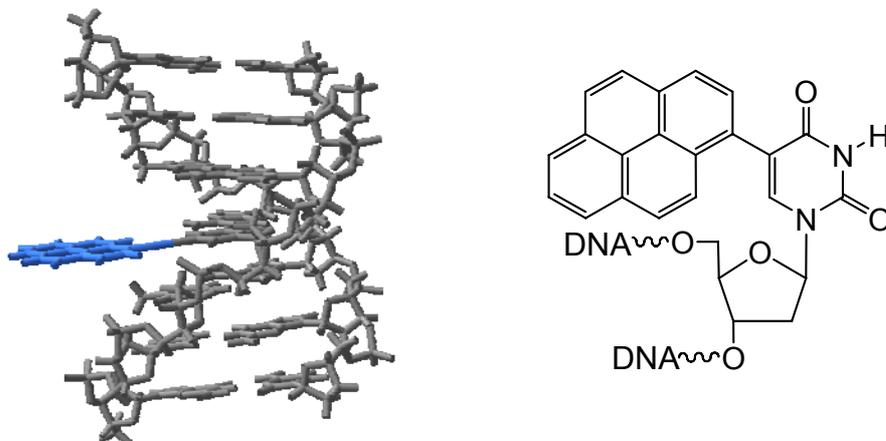


Abb. 2-4: 5-(1-Pyrenyl)-2'-Desoxyuridin (PydU) in DNA.

- (3) Die redoxaktive Sonde kann als Kopfgruppe in Haarnadelstrukturen eingebaut werden. Die Modifikation ist über Linkereinheiten kovalent mit zwei komplementären Oligonukleotiden verknüpft. Bildet sich ein Duplex aus, kommt die photoreaktive Gruppe auf dem Basenstapel zu liegen. Diese Art der Modifikation ist synthetisch am leichtesten zu realisieren.^[52-57]
- (4) Für die Anknüpfung eines Interkalators ist es ausreichend einen Einzelstrang des DNA-Duplexes kovalent mit einer Linkereinheit, die den Interkalator trägt, zu verknüpfen.^[58, 59] Die Anknüpfung des Linkers kann am 3'-, am 5'-Terminus der DNA oder auch intern erfolgen. Über die Länge des Linkers kann die Interkalationsstelle des Chromophors lokal eingegrenzt werden.

Eine Abschätzung der Triebkraft für eine Ladungstransferreaktion kann mit Hilfe der *Rehm-Weller-Gleichung* getroffen werden.

$$\Delta G = e[E_{\text{Ox}}(\mathbf{D}) - E_{\text{Red}}(\mathbf{A})] - E_{00} + C \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

ΔG	freie Enthalpie
e	Elementarladung
$E_{\text{Ox}}(\mathbf{D})$	Oxidationspotential des Ladungsdonors
$E_{\text{Red}}(\mathbf{A})$	Reduktionspotential des Ladungsakzeptors
E_{00}	Energie des HOMO-LUMO-Übergangs des Donors
C	Coulomb-Energie, hier: näherungsweise ~ 0

2.1.1 Oxidativer Lochtransfer

2.1.1.1 Biologische Relevanz

Bestrahlung (Röntgen, UV), Sauerstoff- oder organische Radikale und Alkylierungsreagentien können in der DNA zur Bildung von Radikalen führen.^[60] Dabei ist die Stelle der Radikalbildung und die Stelle der eigentlichen Schädigung aufgrund von Ladungstransferprozessen deutlich voneinander getrennt.^[61] Versagen die Kontroll- und Reperaturmechanismen des Körpers kann es zu permanenten Mutationen oder zur Entstehung von Krebs kommen. Ein wichtiges Intermediat bei diesen Prozessen ist das Guaninradikalkation $G^{\bullet+}$,^[62] das über Reaktionen mit seiner Umgebung (z. B. H_2O , O_2) zu Bildung von Oxidationsprodukten führt.^[6, 63] Das prominenteste Beispiel ist 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-Desoxyguanosin (8-oxo-dG)^[4] (s. Abb. 2-5). Wird 8-oxo-dG vor der Replikation als fehlerhafte Base erkannt und von Reperaturenzymen beseitigt, ergeben sich keinerlei Folgen für den Organismus. Liegt 8-oxo-dG allerdings in der *syn*-Form vor, kommt es aufgrund der Hoogsten-Basenpaarung mit A bei der Replikation durch die DNA-Polymerase zum Einbau von A gegenüber 8-oxo-dG. Wird beim anschließenden *Proofreading* 8-oxo-dG als fehlerhafte Basenpaarung erkannt, wird es durch Nukleotidexzision entfernt und stattdessen ein T als komplementäre Base zu A eingebaut. Eine Mutation hat stattgefunden. Es wurde ein GC-Paar durch ein AT-Paar ausgetauscht. Genauere Untersuchungen zu der Entstehung dieses Replikationsfehlers der DNA-Polymerase konnten *Carell et al.*^[64] aufklären.

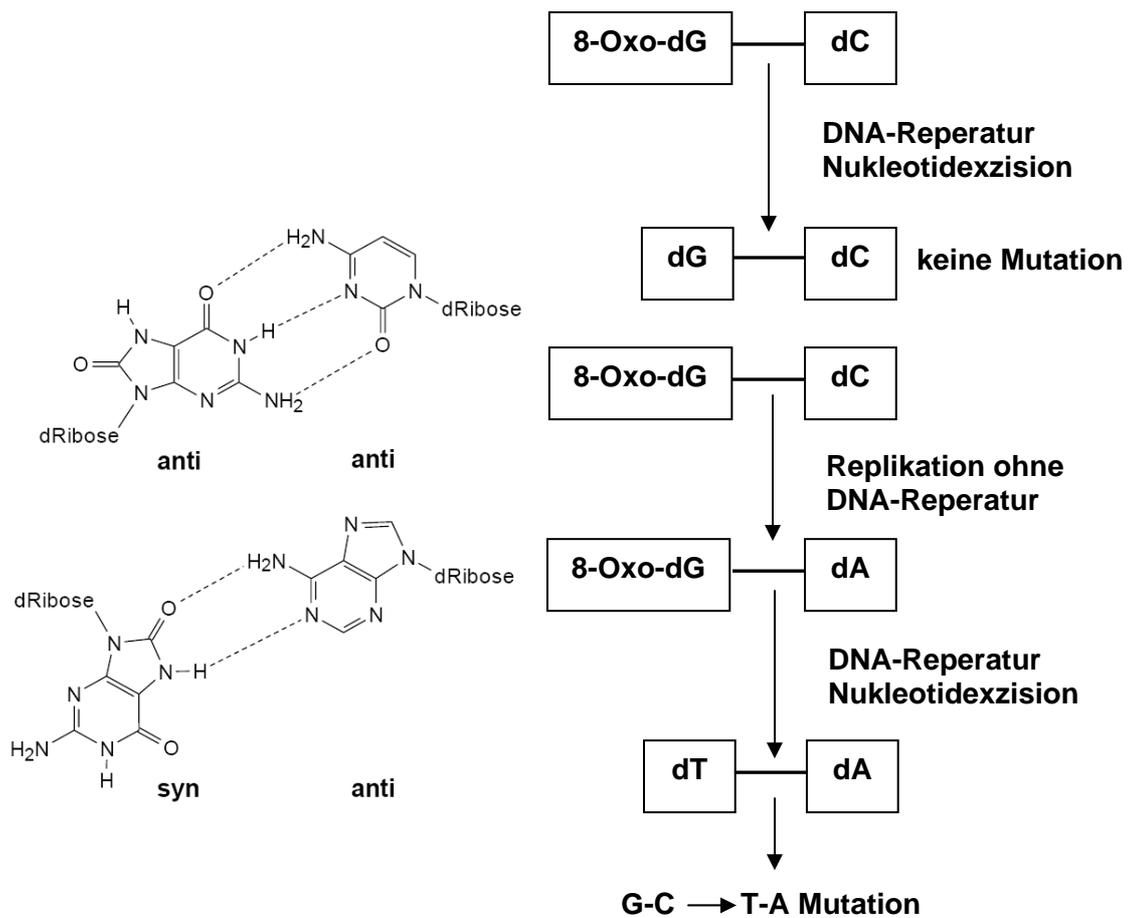


Abb. 2-5: Schematische Darstellung einer durch 8-oxo-dG ausgelösten Mutation von dG-dC nach dA-dT.

2.1.1.2 Mechanistische Modelle für den oxidativen Ladungstransport

Aufgrund der biologischen Relevanz des oxidativen Ladungstransfers wurden in den letzten 20 Jahren intensive Studien dazu durchgeführt. Aufgrund der dabei gewonnenen Erkenntnisse sind zwei mechanistische Modelle vorgeschlagen worden: der *Superaustausch*- und der *Hopping*-Mechanismus.

Der Superaustausch kann mit der klassischen Elektronentransfertheorie von Marcus^[65] beschrieben werden. Die Ladung wandert hierbei in einem Schritt vom Ladungsdonor (**D**) zum Akzeptor (**A**) ohne dabei jemals auf der DNA-Brücke lokalisiert zu sein (s. Abb. 2-6).

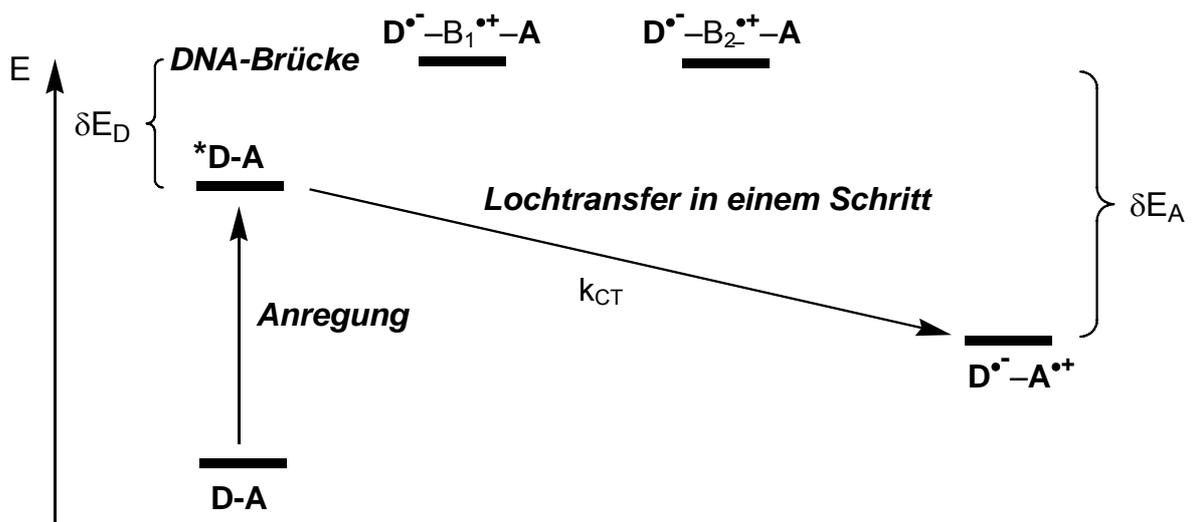


Abb. 2-6: Schematische Darstellung des Superaustausch-Mechanismus. Die Ladung wird in einem Schritt in einem Tunnelprozess vom Donor **D** auf den Akzeptor **A** übertragen.

Die Ladungstransferrate k_{CT} ist zum einen vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor und zum anderen vom Parameter β abhängig. Diesen Zusammenhang beschreibt die *Marcus*-Theorie^[65] mit:

$$k_{ET} = \frac{4\pi^2 |V_{el}|^2}{h} \sqrt{\frac{1}{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(-\frac{\{\Delta G_{ET} + \lambda\}^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

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 Ladungstransfers

Nach starker Vereinfachung ergibt sich:

$$k_{ET} \propto e^{-\beta \cdot \Delta r} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Der Parameter β ist abhängig von den Eigenschaften der Brücke, die die Kopplung zwischen Donor und Akzeptor beeinflusst. Er ist eine charakteristische Größe des untersuchten Systems. Für Proteine liegt er typischerweise zwischen 1.0-1.4 \AA^{-1} , für den Lochtransfer durch DNA bei $\beta < 0.1 \text{\AA}^{-1}$ ^[66, 67], bis $\beta = 1.5 \text{\AA}^{-1}$.^[68, 69]

In neueren zeitaufgelösten Experimenten, in denen kovalent angeknüpfte Interkalatoren als redoxaktive Sonden verwendet wurden, konnte die Abstandsabhängigkeit des Ladungstransfers genauer untersucht werden. Hierbei stellte man fest, dass der Ladungstransfer mit $k_{CT} = 10^9$ - 10^{12}s^{-1} sehr schnell ablaufen kann. Für den effizienten Ladungstransfer ist die Interkalation des Donors und Akzeptors entscheidend. Typische Werte für β sind hier 0.6\AA^{-1} - 0.8\AA^{-1} . Allerdings ist der effiziente Ladungstransfer hier auf drei bis vier Basenpaare beschränkt.

Da in einigen Experimenten zum langreichweitigen Ladungstransfer ($>200 \text{\AA}$) eine deutlich geringere Distanzabhängigkeit beobachtet wurde, wurde als alternativer Mechanismus das *Hopping* vorgeschlagen.^[70] Im Gegensatz zum Superaustausch wird hier die Ladung in mehreren Schritten vom Donor zum Akzeptor

transportiert, wobei sie kurzzeitig auf intermediären Ladungsträgern lokalisiert ist. Aufgrund der Oxidationspotenziale der Nukleobasen $dG < dA < dC \approx dT$ ^[31, 71, 72], treten hier Guanosinradikalkationen $G^{\bullet+}$ als Ladungsträger auf, da Guanin von den DNA-Basen am leichtesten zu oxidieren ist (s. Abb. 2-7). *Lewis et al.* konnten die Rate für einen einzelnen Hoppingschritt k_{HOP} von G zu einem GG-Dublett mit $k_{HOP} = 10^6 - 10^8 \text{ s}^{-1}$ bestimmen (s. Abb. 2-7).^[62]

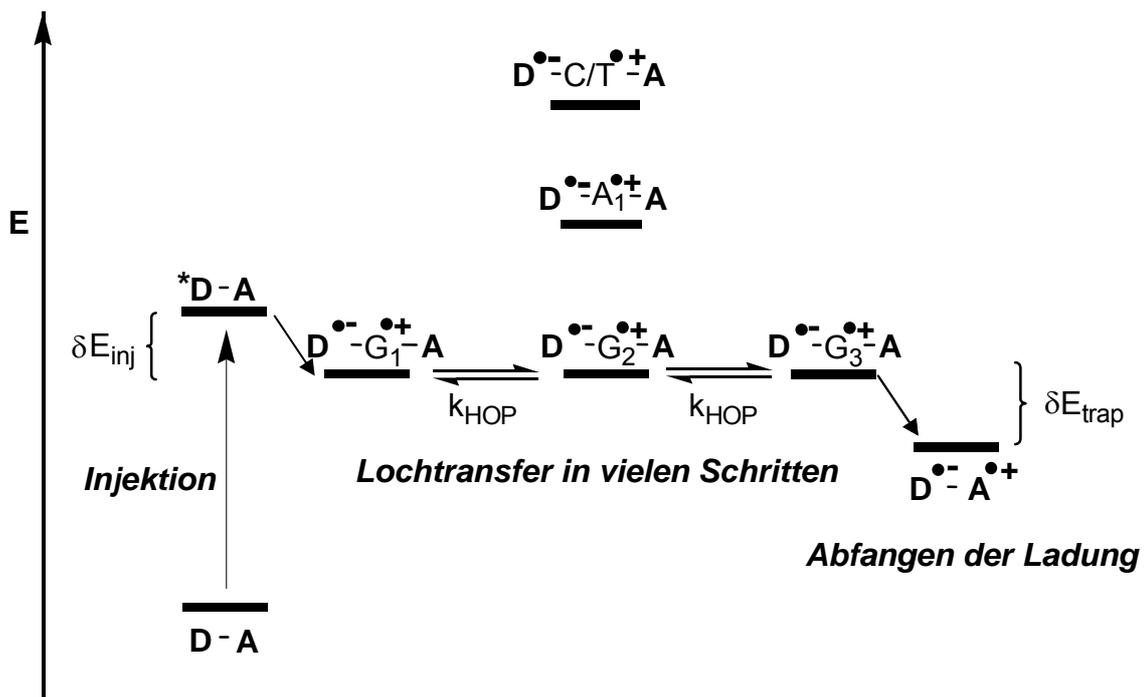


Abb. 2-7: Schematische Darstellung des Hopping-Mechanismus. Die Ladung wird in mehreren Schritten vom Donor **D** auf den Akzeptor **A** übertragen. Dabei können neben $G^{\bullet+}$ auch $A_1^{\bullet+}$ (Adeninradikalkationen) als intermediäre Ladungsträger fungieren.

Für die Ladungstransferrate ist hier nicht der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, sondern die Anzahl der dazwischen liegenden Hoppingschritte entscheidend. Jeder einzelne Hoppingschritt selbst stellt einen stark distanzabhängigen Tunnelprozess durch die dazwischen liegenden AT-Paare dar. Allerdings ist der Ladungstransfer nur schnell, wenn nicht mehr als drei AT-Paare zwischen den beiden Guaninen liegen. Bei einem größeren Abstand beobachtet man einen nur geringfügig langsameren Ladungstransfer, der kaum mehr distanzabhängig ist. Dieses unterschiedliche Verhalten wurde von *Giese et al.*^[73-76] mit einem Wech-

sel in den Hopping-Mechanismus erklärt, wobei hier beim Hopping Adenosinradikalkationen $A^{•+}$ als intermediäre Ladungsträger auftreten.^[73]

Diese These konnte in neueren Arbeiten von *Lewis et al.*^[77] letztes Jahr bestätigt werden. Durch zeitaufgelöste spektroskopische Experimente mit dem unten dargestellten Ladungsdonor-Akzeptor-System (s. Abb. 2-8) konnten die Ratenkonstanten des oxidativen Ladungstransfers in Abhängigkeit der Anzahl dazwischenliegender AT-Basenpaaren bestimmt werden (s. Abb. 2-9).

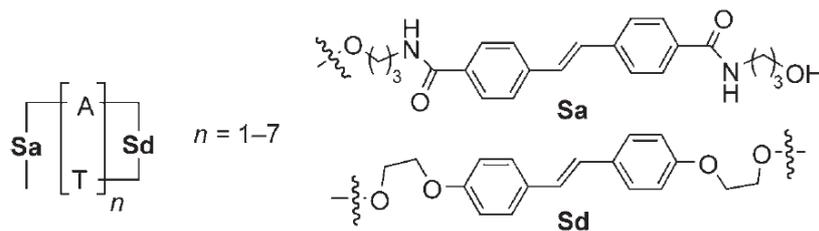


Abb. 2-8: Ladungsdonor-Akzeptor-System von *Lewis et al.*; Stilbendicarboxamid (Sa) als photoanregbarer Donor und Stilbendiether (Sd) als Lochakzeptor.^[77]

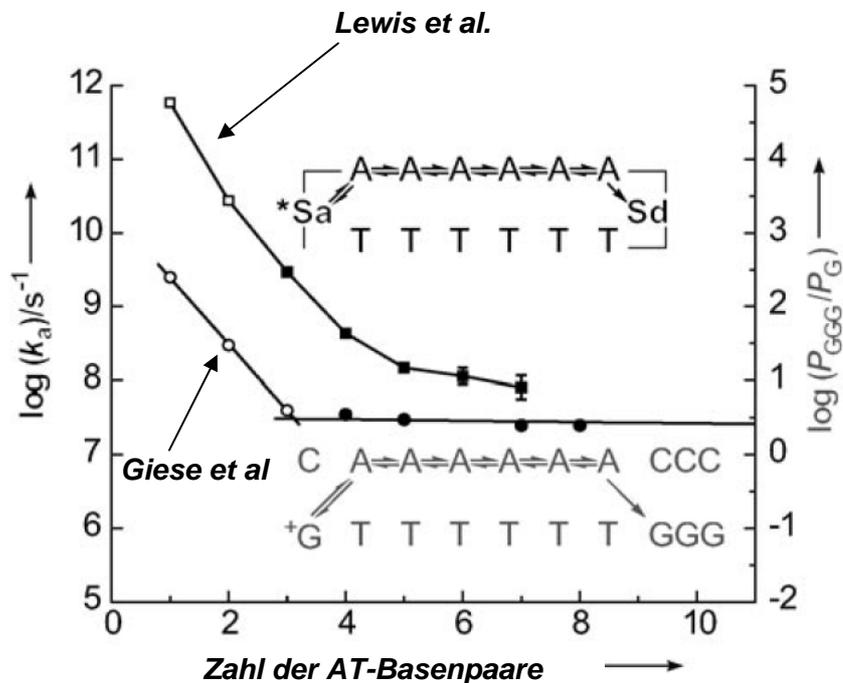


Abb. 2-9: Ratenkonstanten des oxidativen Ladungstransfers für *Lewis et al.*; Strangbruchresultate für *Giese et al.*^[73] Erläuterungen: offene Symbole (\square , \circ): Tunnelprozess; geschlossene Symbole (\blacksquare , \bullet): Hopping-Mechanismus.^[77]

Für ein bis drei Basenpaare ($n=1-3$) wurden sehr schnelle Ladungstransferraten bestimmt, die stark distanzabhängig sind (für $n = 1$: $k_{CT} \sim 580 \cdot 10^{-9} \text{s}^{-1}$, für $n = 3$: $k_{CT} \sim 3 \cdot 10^{-9} \text{s}^{-1}$). Für $n = 4$ bis $n = 7$ ändert sich der Ladungstransfer nur geringfügig mit dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor ($n = 4$: $k_{CT} \sim 0.4 \text{s}^{-1}$; $n = 7$: $k_{CT} \sim 0.08 \text{s}^{-1}$). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Arbeiten von *Giese et al.* überein (s. Abb. 2-9). Für eine Distanz von 3-4 AT-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor kann man von einem distanzabhängigen Tunnelprozess nach dem Superaustausch-Mechanismus ausgehen. Bei einem größeren Abstand ist der Ladungstransfer kaum mehr distanzabhängig und folgt einem Hopping-Mechanismus.

2.1.1.3 Biochemische Studien zum oxidativen Lochtransfer

In Gegenwart einer Vielzahl von photochemischen Oxidationsmitteln wird doppelsträngige DNA geschädigt. Diese Schädigungen treten bevorzugt an 5'-GG-Dubletts oder Triplets aufgrund ihrer leichten Oxidierbarkeit auf.^[78-80] Das primär erzeugte Guaninradikalkation $G^{\bullet+}$ führt durch Reaktionen mit H_2O oder O_2 zur Bildung von oxidativen Guaninschäden, abgekürzt mit dG^{ox} . Man vermutet, dass dabei zunächst 8-oxo-dG (7,8-Dihydro-8-oxo-2'-Desoxyguanosin) entsteht. Weitere Oxidationsprodukte des Guanins konnten identifiziert werden und einige wichtige sind in Abbildung 2-10 zusammengefasst.^[6, 63]

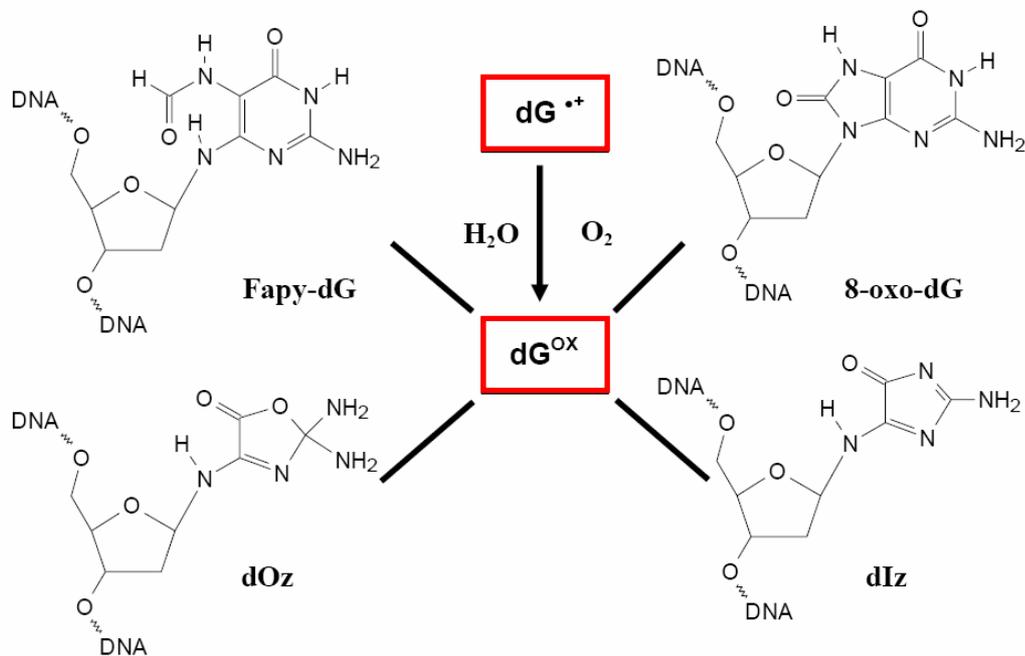


Abb. 2-10: Übersicht über die wichtigsten Oxidationsprodukte des Guanosins (dG^{ox}).

Erläuterungen: **Fapy-dG**: Formamidopyrimidin; **8-oxo-dG**: 8-Oxo-Guanin; **dOz**: Oxazolone; **dIz**: Imidazolone.^[6]

Um diese oxidativen Schäden nachweisen zu können, werden derartig modifizierte DNA-Stränge durch Behandlung mit starken Basen wie z. B. Piperidin bei erhöhter Temperatur an der Position der beschädigten Base G^{ox} gespalten. Die unterschiedlichen Spaltprodukte lassen sich durch Gelelektrophorese auftrennen und durch Markierung mit radioaktivem ^{32}P detektieren („*Phosphor Imaging*“).^[61]

Die gängigsten Photooxidantien für DNA sind Metallkomplexe von Rh(III)^[58, 68, 71, 81-86] und Ru(II)^[68, 87-94] mit Interkalatoren als Liganden oder organische Chromophore wie z. B. Derivate des Ethidiums^[23, 30] und Anthrachinons^[95-106] und Cyano-Benzochinon-modifizierte Uridine^[107-119] (s. Abb. 2-11).

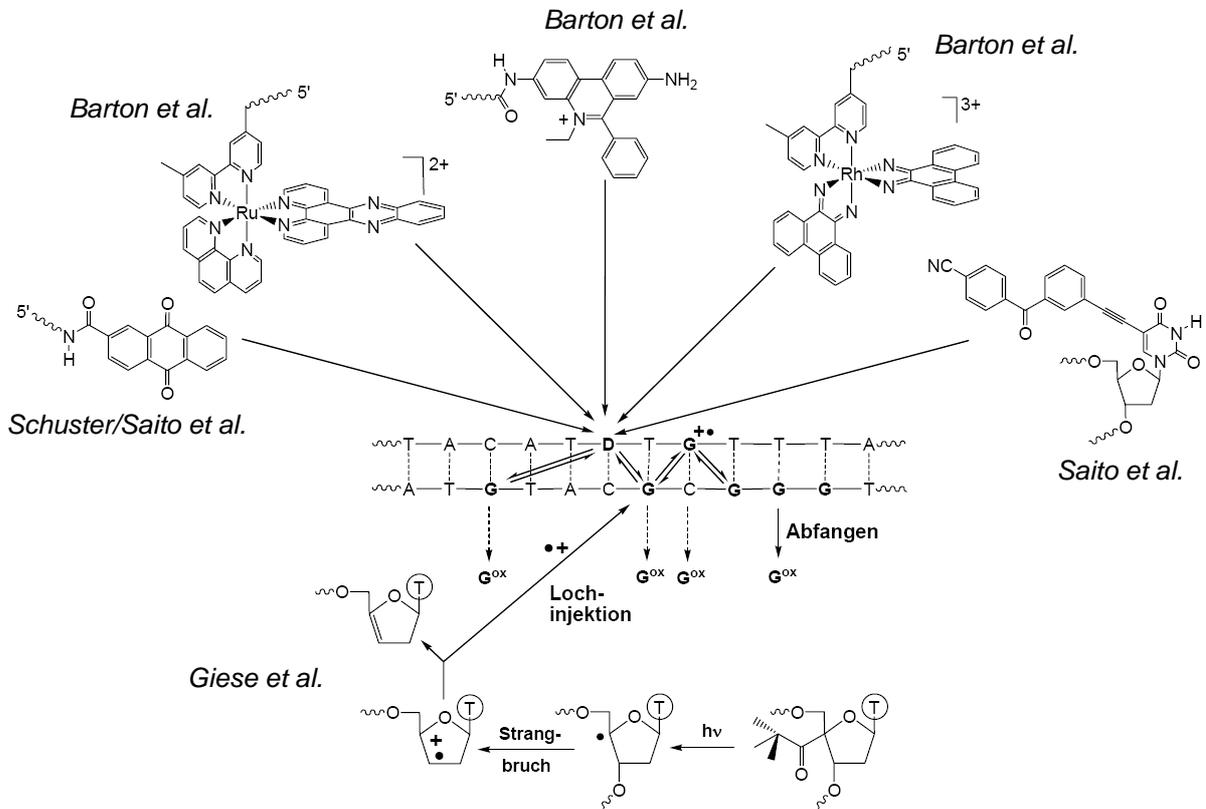


Abb. 2-11: Übersicht über verwendete Ladungsdonorsysteme zur Untersuchung des oxidativen Lochtransfers.

Diese Systeme unterscheiden sich grundlegend in ihren strukturellen Eigenschaften, ihren Redoxpotentialen und dem Absorptionsverhalten. Gemeinsam ist den Systemen, dass in allen Fällen ein effizienter Lochtransfer z. T. über sehr lange Distanzen ($> 200 \text{ \AA}$)^[71, 120] beobachtet werden konnte. Das System von *Giese et al.*^[74, 121-127] nimmt eine Sonderstellung ein, da hier durch eine photochemische Reaktion, Norrish-Typ-I-Reaktion, zunächst ein Radikalkation z. B. aus einem 4'-acylierten Thymidinderivat^[128] erzeugt wird. Diese radikalische Spezies besitzt ein höheres Oxidationspotential als G und führt zur Oxidation des nächstgelegenen Guanins.

2.1.1.4 Spektroskopische Studien zum oxidativen Lochtransfer

Einen Überblick über die wichtigsten spektroskopische Studien zum oxidativen Lochtransfer bietet Tabelle 2-1.

Tab. 2-1: Übersicht der wichtigsten spektroskopischen Untersuchungen des oxidativen Ladungstransfers.

<i>Ladungs-donor</i>	<i>Akzeptor</i>	β [\AA^{-1}]	k_{CT} [s^{-1}]	<i>Arbeitsgruppe</i>	<i>Jahr</i>
Ru(II)-	Rh(III)-Komplexe	0.2	10^9	Barton ^[129, 130]	1993
Ru(II)-	Rh(III)-Komplexe	1.0-1.5	10^6	Meade ^[131]	1995
Sa	G	0.64	10^8 - 10^{12}	Lewis, Wasielewski ^[54, 62, 132-148]	1997
E	Rh(III)-Komplex	-	10^{10}	Barton ^[22, 69, 130, 149-151]	1997
Acr	G	1.4	10^5 - 10^{10}	Tanaka ^[152, 153]	1998
E	Z	-	10^{12}	Barton, Zewail ^[29, 30, 69, 130, 149-151, 154, 155]	1999
Ap	G	0.1-1.0	10^9 - 10^{11}	Barton, Zewail ^[69, 130, 149-151, 156-159]	1999
Ap	G	0.75	10^6 - 10^7	Shafirovich, Geacintov ^[160-166]	2000
Acr	G; Z	2.0; 0.8	10^7 - 10^{12}	Michel-Beyerle ^[167-170]	2001
Py; Ptz	G	0.2-0.3	10^4	Majima, Kawai ^[171-176]	2001
Ru(II)-Komplex	In	-	$\geq 10^7$	Barton I ^[69, 87, 130, 149-151, 177, 178]	2002
Sa	Sd	0.4	10^8	Lewis, Wasielewski ^[56, 57, 134]	2004
E	Z	0.4	10^{10} - 10^{11}	Fiebig, Wagenknecht ^[179]	2006

Erläuterungen: **Acr:** Acridin; **Ap:** 2-Aminopurin; **E:** Ethidium; **G:** Guanin; **In:** 4-Methylindol; **Py:** Pyren; **Ptz:** Phenothiazin; **Sa:** Stilbendicarboxamid; **Sd:** Stilbendiether, **Z:** 7-Deazaguanin.

2.1.2 Reduktiver Elektronentransfer

Für den reduktiven Ladungstransfer sind im Gegensatz zum oxidativen Lochtransfer keine Folgereaktionen in der DNA unter natürlichen Bedingungen bekannt. Darüber hinaus wird eine höhere Effizienz gegenüber dem oxidativen Ladungstransfer vermutet, was von besonderem Interesse für die Nanotechnologie und DNA-Chiptechnologie ist.^[180-188] Dabei wird die Anfälligkeit des Ladungstransfers gegenüber Störstellen im Basenstapel ausgenutzt. Basenfehlpaarungen oder Basenschäden unterbinden bzw. schränken die Effizienz des Ladungstransfers ein. Dieses Prinzip macht man sich zu nutze, indem man elektrochemisch auslesbare DNA-Chips^[132, 149, 156, 167, 189, 190] einsetzt, um fragliche DNA-Sequenzen auf Mutationen zu untersuchen. Da diese Methode sehr empfindlich ist, können hier einzelne Punktmutationen, sog. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)^[15], innerhalb einer Gensequenz nachgewiesen werden. Derartige Nachweisverfahren sind z. B. für die Onkologie, Genetik, Virologie und Pharmakogenetik von großem Interesse.

2.1.2.1 Mechanismen

Erst Anfang der 1990er Jahre wurden erste Experimente zur Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers durchgeführt.^[129] Zunächst wurden die mechanistischen Modelle des oxidativen Lochtransfers auf den reduktiven Elektronentransfer übertragen.^[76] Analog zum oxidativen Ladungstransfer nimmt man auch hier einen Hopping- und einen Superaustausch-Mechanismus an. Beim Hopping-Mechanismus treten als intermediäre Ladungsträger Cytosin- und Thyminradikalanionen auf, $dC^{\bullet-}$ und $dT^{\bullet-}$, da dies die am leichtesten zu reduzierenden Basen sind ($E(dC/dC^{\bullet-}) = 1.6 \text{ V (vs. NHE)}$ und $E(dT/dT^{\bullet-}) = 1.7 \text{ V (vs. NHE)}$).^[31] Beide Spezies konnten als intermediäre Ladungsträger in Experimenten nachgewiesen werden.^[191-193]

In neueren Experimenten wird neben den beiden mechanistischen Modellen auch die Moleküldynamik der DNA mit einbezogen.^[29] Man nimmt an, dass die Voraussetzung für einen effizienten Ladungstransfer eine optimale Überlappung der zwischen Donor und Akzeptor liegenden Orbitale ist. Man bezeichnet diese Konzept als *base gating* und nimmt an, dass es sowohl für oxidativen wie reduktiven Ladungstransfer von Bedeutung ist.

2.1.2.2 γ -Puls-Radiolyse-Studien

Die ersten Erkenntnisse zum reduktiven Elektronentransfer in DNA wurden mit Hilfe von γ -Puls-Radiolyse-Studien durch *Sevilla* und *Anderson et al.* erhalten. [194-196] Der Ladungstransfer wurde hier durch γ -Strahlung ausgelöst und das in die DNA injizierte Elektron aus wässrigen Lösungsmitteln freigesetzt. Als Elektronenakzeptoren fungierten Interkalatoren wie z. B. Acridine. Durch ESR-Spektroskopie konnte die primäre Bildung des Nukleobasen-Radikalanions sowie dessen Zerfall beobachtet werden. Durch die Abgabe der überschüssigen Ladung auf einen interkalierten Elektronenakzeptor entsteht ein Interkalatorradikal, das sich spektroskopisch verfolgen lässt. Da in diesem Experiment der Ort der Elektroneninjektion sowie der Ort des Elektronenakzeptors nicht genau definiert sind, können hier nur begrenzt Schlüsse über den Mechanismus des reduktiven Elektronentransfers gezogen werden.

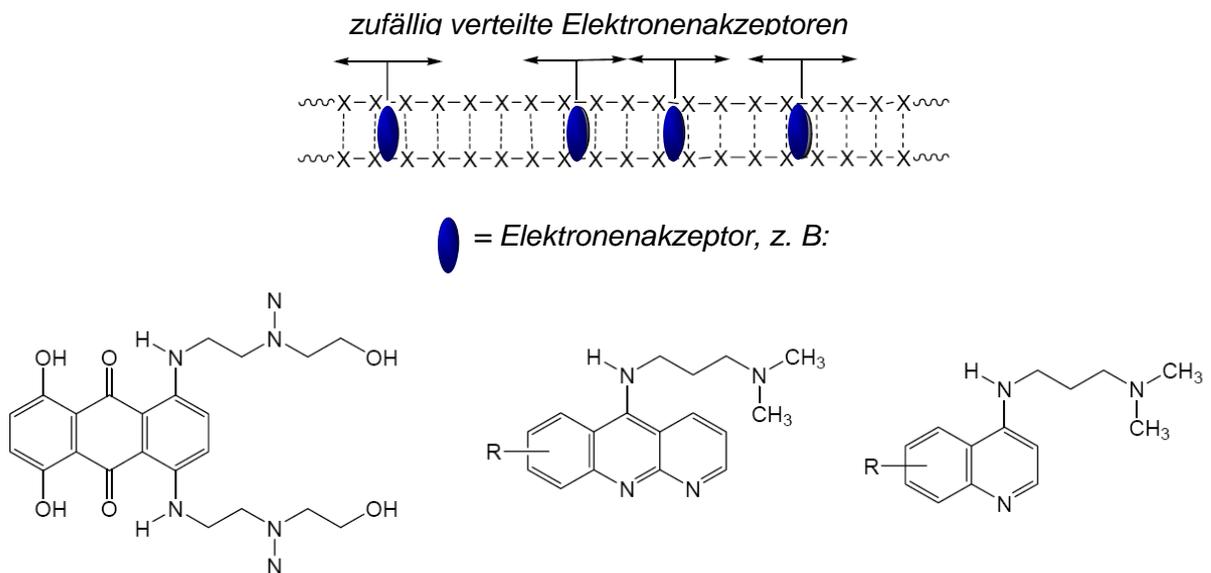


Abb. 2-12: Typischer Aufbau eines γ -Puls-Radiolyse-Experiments.

2.1.2.3 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 ausgelöst. Das Reduktionspotential des angeregten Elektronendonors muss mindestens zur Reduktion von Pyrimidinbasen ausreichen, um ein Elektron in die DNA übertragen zu können. In der Abb. 2-13 sind die wichtigsten Ladungsinjektoren zusammengefasst.

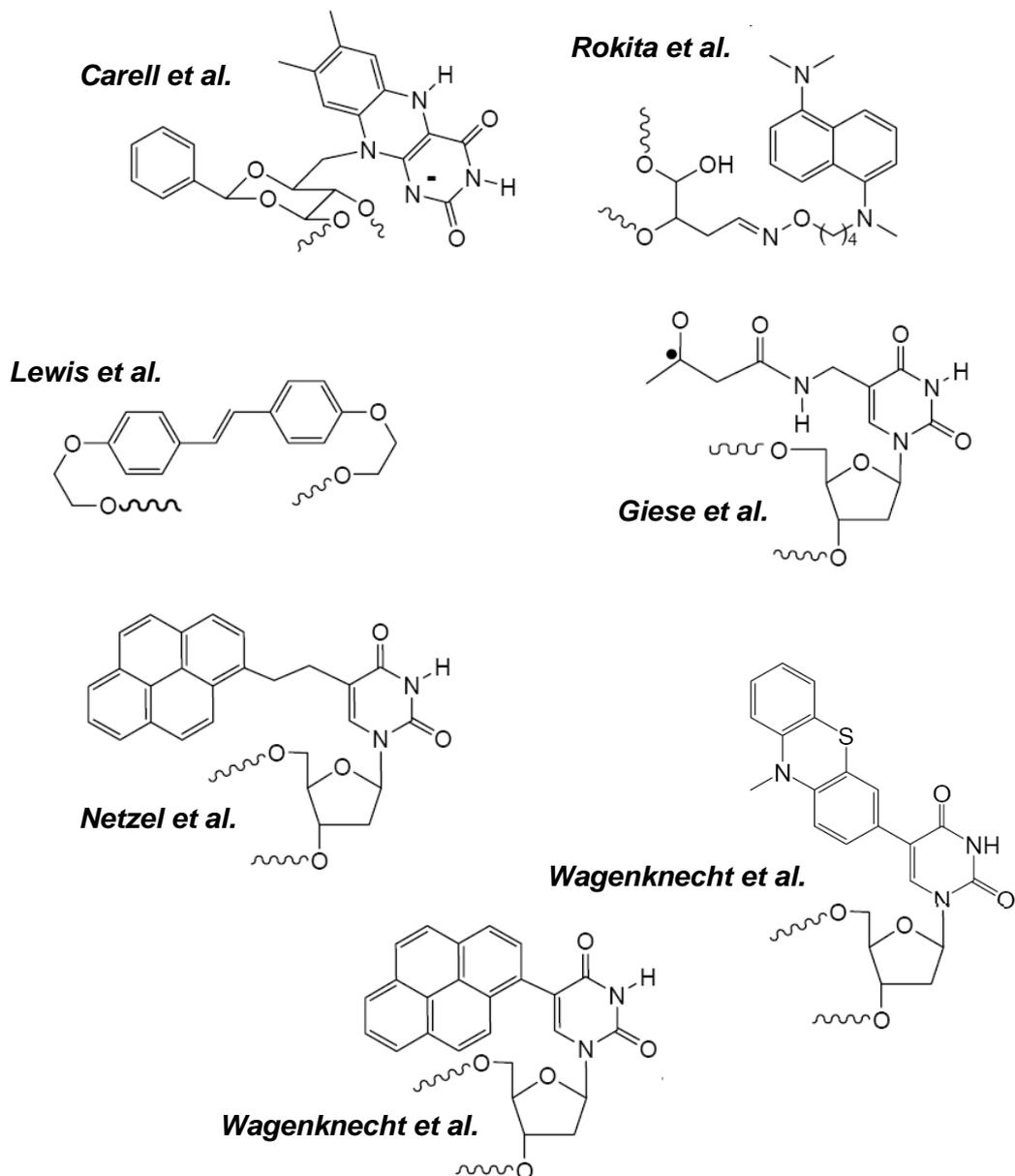


Abb. 2-13: Übersicht über verwendete Ladungsinjektoren zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch DNA.

Die gezeigten Systeme von *Carell et al.*^[197, 198], *Rokita et al.*^[199-201], *Giese et al.*^[202, 203], *Netzel et al.*^[204] und *Wagenknecht et al.*^[47-49, 205-208] unterscheiden sich deutlich in ihren Reduktionspotenzialen. Beispielsweise ist das von *Carell et al.*^[197, 198] synthetisierte Flavinderivat im angeregten Zustand, mit einem Reduktionspotenzial von -2.8 V, in der Lage sämtliche Nucleobasen zu reduzieren, wohingegen 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin^[47-49, 205-207] mit einem Reduktionspotential des Pyrens von -1.8V, gerade in der Lage Thymin ist zu reduzieren. Das von *Giese et al.*^[202, 203] eingesetzte Thyminderivat ist hervorzuheben, da hier die Injektion des Elektrons in die DNA aus dem Grundzustand erfolgt. Das gezeigte Ketylradikal wird durch photochemische Spaltung eines *tert*-Butylketons nach einer Norrish-Reaktion erzeugt. In neueren Arbeiten von *Wagenknecht et al.* wurde 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin, das über ein Reduktionspotential von -2.0 V verfügt, eingesetzt.^[208]

Da sich die Arbeit hauptsächlich mit dem oxidativen Lochtransfer befasst, wird hier nicht näher auf den reduktiven Ladungstransfer eingegangen werden.

2.1.3 Bisherige Untersuchungen des Ladungstransfers mit Ethidiumderivaten als Ladungsdonor

Da sich ein Großteil dieser Arbeit mit ethidiummodifizierten Oligonukleotiden zur Untersuchung des Ladungstransfers beschäftigt, sollen hier die wichtigsten Experimente mit Ethidium als redoxaktive Sonde ausführlicher erläutert werden.

2.1.3.1 Untersuchung des oxidativen Ladungstransfers

Photoangeregtes Ethidium kann in Abhängigkeit der potentiellen Reaktionspartner sowohl als Oxidations- wie Reduktionsmittel dienen. Für die DNA-Basen gilt, dass sich in der Rangfolge $dG > dA > dC \approx dT$ dG am leichtesten oxidieren und dT (dC) am leichtesten reduzieren lässt.

Anhand der *Rehm-Weller-Gleichung* (s. Glg. 2.1) lässt sich thermodynamisch abschätzen, ob der Ladungstransfer photoinduziert ablaufen kann. Mit einem Oxidationspotential von $E_0(E^{*+}/E^*) = 1.2$ V ergibt sich, dass photoangeregtes Ethidium nicht in der Lage ist, Guanin ($E_0(G/G^{*+}) = 1.3$ V) zu oxidieren. Folglich muss

ein Akzeptor eingesetzt werden, der über ein niedrigeres Oxidationspotential als G verfügt. In den im Folgenden vorgestellten Untersuchungen wurde 7-Deazaguanin (Z) dafür verwendet. Für die Triebkraft des oxidativen Lochtransfers ergibt sich dann mit $E(Z/Z^{•+}) = 1.0 \text{ V}$ ein Wert von 0.2 eV.

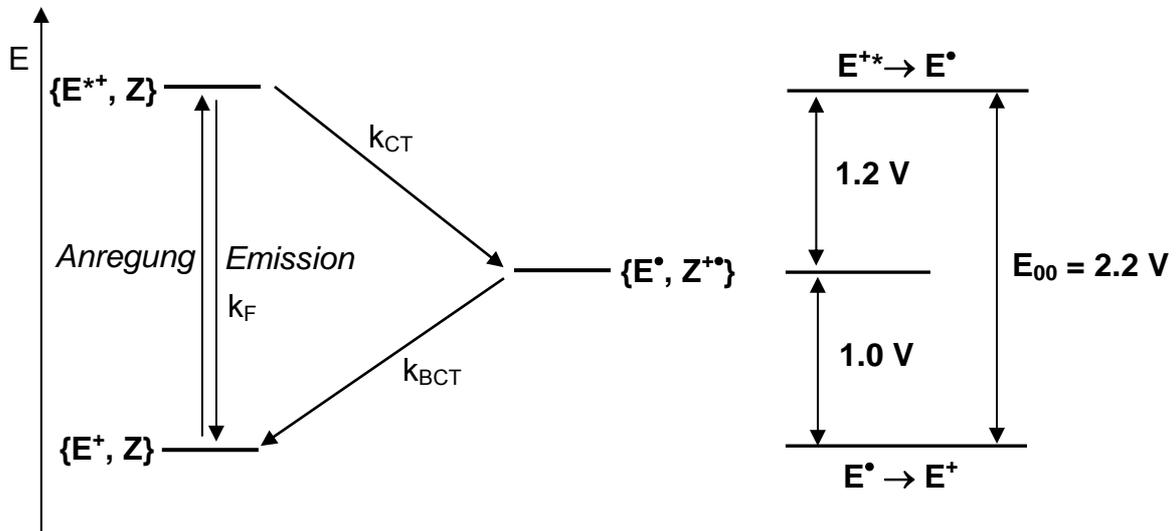


Abb. 2-14: Photoangeregtes Ethidium als Oxidationsmittel im System Ethidium-Deazaguanin (E/Z). Erläuterungen: k_{CT} : Rate des Ladungstransfers; k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

In früheren Arbeiten wurde Ethidium meist als Interkalator eingesetzt oder über einen Linker mit der DNA verknüpft, wie beispielsweise bei *Barton et al.* über eine 5'-Anknüpfung im Anschluss an die DNA-Synthese.^[22] Mit dem unten schematisch dargestellten System Ethidium-Deazaguanin (s. Abb. 2-15) konnten *Barton/Zewail et al.*^[29] durch zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen Raten für den oxidativen Lochtransfer bestimmen.

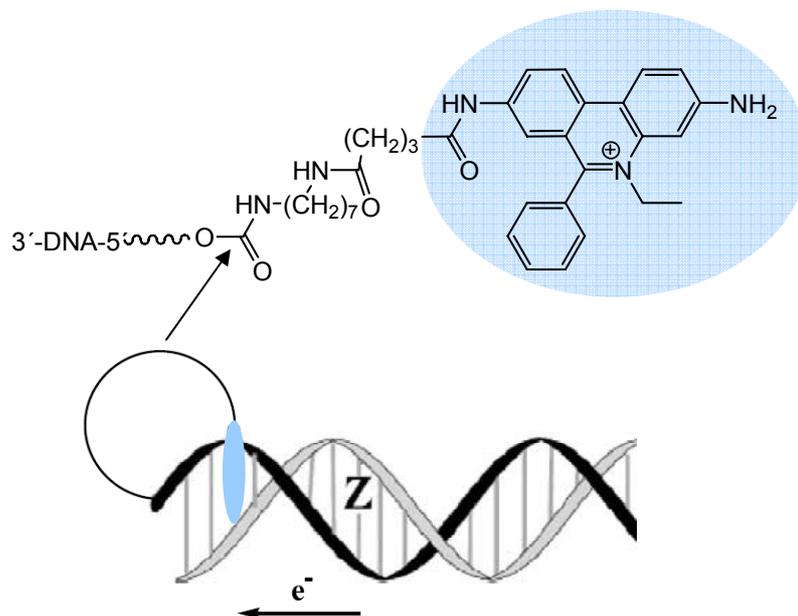


Abb. 2-15: Schematische Darstellung eines Duplex der Z und das angeknüpfte Ethidiumchromophor enthält.^[69]

Es wurden zwei sehr schnelle Raten im ps-Bereich (5 ps und 75 ps) für den oxidativen Ladungstransfer zwischen Ethidium und Deazaguanin bestimmt.^[29] Beide Raten waren nicht grundlegend vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängig. Dieses biexponentielle Zerfallsverhalten wurde mit der Zusammensetzung aus einer schnellen Ladungsinjektion in die DNA (5 ps) und einer langsameren konformationellen Umorientierung des Ethidium-Interkalators (75 ps), die erforderlich ist damit der eigentliche Ladungstransfer stattfinden kann, erklärt.^[29, 69, 130] Der Ladungstransfer selbst verläuft dann vermutlich mit einer schnelleren Rate. Die Umorientierungsphase scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein und konnte durch Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen bestätigt werden.^[130] Die Abnahme der Ladungstransfereffizienz bei längeren Distanzen wurde darauf zurückgeführt, dass aufgrund der Moleküldynamik der DNA im ps- bis ms-Bereich nur ein Bruchteil aller möglichen Konformationen den Ladungstransfer begünstigt. Der Ladungstransfer kann nur dann stattfinden wenn innerhalb der Lebensdauer des photoangeregten Ethidiums eine günstige Donor-Akzeptor-Konformation eingenommen werden kann. Dies Interpretation konnte durch zeit-

aufgelöste spektroskopische Untersuchungen von Ethidium und Deazaguanin in Wasser bestätigt werden.^[154]

Je mehr Basen zwischen Donor und Akzeptor liegen umso wahrscheinlicher ist der Anteil an schlecht gestapelten Konformationen (*base gating*) und daher steigt die Fluoreszenz des Ethidiums auch bei langen Distanzen zwischen Donor und Akzeptor an. Die Einführung einer C-A Fehlpaarung zwischen Ethidium und Deazaguanin führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz gegenüber dem richtig gepaarten Duplex. Die Fehlstelle kann als drastischeres Beispiel der beschriebenen dynamischen Basenstapelung interpretiert werden.^[69]

2.1.3.2 Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers

Photoangeregtes Ethidium kann nicht nur als Oxidationsmittel fungieren, sondern alternativ auch als Reduktionsmittel. Als geeigneter Elektronenakzeptor kann Methylviologen (Mv) dienen. Nach der Rehm-Weller-Gleichung ergibt sich für den reduktiven Ladungstransfer mit $E_0(\text{Et}^{2+\bullet}/\text{Et}^{3+}) = -0.52 \text{ V}^{[21, 26, 28]}$ und $E_0(\text{MV}^{2+}/\text{MV}^{+\bullet}) = -0.44 \text{ V}^{[209-211]}$ eine Triebkraft von ca. 100 mV. Für das strukturell ähnliche *N, N'*-Dimethyl-2,7-diazapyren (DAP) ist eine ähnliche Triebkraft zu erwarten.

In Arbeiten von *Fromherz et al.*^[26] 1986 konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz von in DNA interkalierten Ethidium durch externes Methylviologen aufgrund eines Elektronentransfers gelöscht wird. Die Rate des Elektronentransfers konnte mit $k_{\text{ET}} = 1.1 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Durch Elektronentransfer wird dabei das doppelt positiv geladene Ethidiumradikal $\text{E}^{2+\bullet}$ erzeugt, das dann G zu oxidieren vermag. In Experimenten zur Abhängigkeit des Ladungstransfers von der Sequenz konnte gezeigt werden, dass ein Strangbruch bevorzugt an Guaninen auftritt. In den folgenden Jahren konnte in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, dass die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiums von Methylviologen bzw. *N, N'*-Dimethyl-2,7-diazapyren durch Elektronentransfer effizient gelöscht wird.^[20, 26, 28] 1992 konnten *Harriman et al.* in dem Donor-Akzeptor-Paar Ethidium und DAP einen β -Wert von 0.91 \AA^{-1} ermitteln, was für einen stark distanzabhängigen Elektronentransfer spricht. Ein ähnlicher β -Wert ($\beta = 0.86 \text{ \AA}^{-1}$) ergab sich auch für das System Acridinorange (Ac)-DAP. Es wurden auch die Raten des Elektronentransfers sowie der Rückreaktion bestimmt. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen,

dass hier ein Superaustausch-Mechanismus vorliegt. Der Ladungstransfer war sequenzunabhängig.

In Tabelle 2-2 sind die wichtigsten Experimente zusammengefasst.

Tab. 2-2: Experiment zum reduktiven Ladungstransfer mit nicht kovalent gebundenen Ethidium als Donor.

Ladungsdonor	Akzeptor	β [\AA^{-1}]	k_{CT} [s^{-1}]	Arbeitsgruppe	Jahr
E	MV	-	10^{12}	<i>Fromherz et al.</i> ^[26]	1986
E	DAP	0.91	10^9	<i>Harriman et al.</i> ^[20]	1992
Ac	DAP	0.86	10^9	<i>Harriman et al.</i> ^[20]	1992
E	MV	-	-	<i>Kochevar et al.</i> ^[28]	1992

Erläuterungen: **Ac:** Acridin; **DAP:** N, N'-Dimethyl-2,7-pyren; **E:** Ethidium; **MV:** Methylviologen.

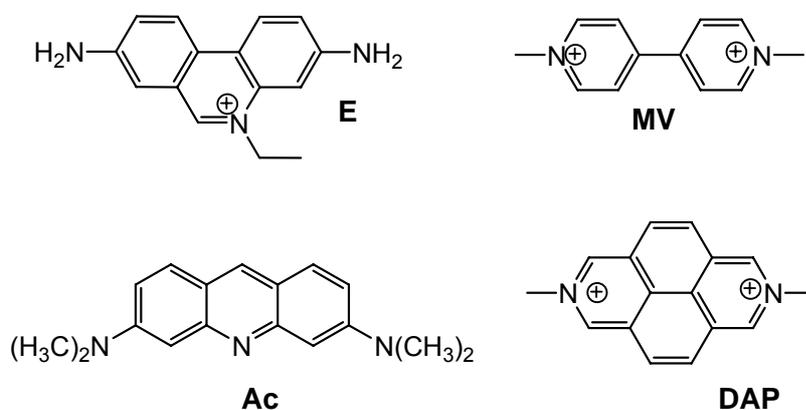


Abb. 2-16: Verwendete Ladungsdonoren und Akzeptoren.

Allerdings weisen diese Systeme einen großen Nachteil auf. Der Abstand zwischen Ethidium und dem Elektronenakzeptor ist nicht bekannt, da das Ethidium in den DNA-Basenstapel interkaliert ist und Methylviologen (bzw. DAP) als externer Quencher zugegeben wird. Man nimmt an, dass Methylviologen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an das Phosphodiester-Rückgrat der DNA

gebunden ist. Um genaueren Aufschluss über den reduktiven Elektronentransfer zu erhalten und die Abstandsabhängigkeit zu untersuchen, muss sich das Ethidium und der Elektronenakzeptor in genau definierten Abstand zueinander befinden. Dies ist nur über eine kovalente Anknüpfung bzw. den Einbau als artifizielle Basen, die das Chromophor trägt, in die DNA zu realisieren. Durch die bereits erwähnten Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnte Ethidium als artifizielle Base kovalent in DNA inkorporiert werden. Dies stellte den entscheidenden Schritt dar, um genauere Untersuchungen des reduktiven Ladungstransfers zu ermöglichen. Es konnte durch Titrationsexperimente mit Methylviologen gezeigt werden, dass das synthetisierte Ethidium-Nukleosid-Analoga durch die dabei beobachtete Fluoreszenzlöschung zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers geeignet ist.^[18]

2.2 Spektroskopische Methoden

2.2.1 UV/VIS - und Fluoreszenzspektroskopie

2.2.1.1 Grundlagen

Durch Absorption eines Lichtquants der richtigen Frequenz wird ein Molekül in einen energetisch höher gelegenen elektronischen Zustand angeregt. Diese elektronische Anregung erfolgt sehr schnell und benötigt ca. 10^{-15} s. Der Elektronenübergang erfolgt vertikal nach dem *Frank-Condon-Prinzip*, d. h. Kernbewegungen werden dabei vernachlässigt und die Kerne als stationär betrachtet.^[212, 213]

Im UV/Vis-Bereich (200 - 800 nm) sind die elektronischen Übergänge $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ bevorzugt.^[212] Die DNA absorbiert unterhalb von 300 nm, mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260$ nm. Will man die DNA mit Chromophoren kovalent modifizieren, ist es wichtig ein Chromophor zu wählen, dessen Absorptionsbereich außerhalb dem der DNA-Basen liegt. Dadurch wird eine selektive Anregung dieses Farbstoffmoleküls gewährleistet.

Während die Absorption sehr schnell verläuft, finden die Relaxationsprozesse aus dem angeregten in den Grundzustand deutlich langsamer ab. Dabei kann der

Übergang in den Grundzustand über strahlende und strahlungslose Prozesse erfolgen. Eine Relaxation durch Aussendung von Licht wird als Lumineszenz bezeichnet, wobei man zwischen Phosphoreszenz (spin-verbotener Übergang) und Fluoreszenz (Übergang mit gleicher Spinmultiplizität) unterscheidet. Die Fluoreszenz findet in ca. 10^{-12} s statt und die Phosphoreszenz innerhalb einer Zeitspanne von ca. 10^{-4} - 10^{-9} s.

Die Emission von Licht erfolgt nach der Regel von *Kasha*^[214] immer aus dem niedrigsten Schwingungsniveau des elektronisch angeregten S_1 -Zustands (s. Abb. 2-17).

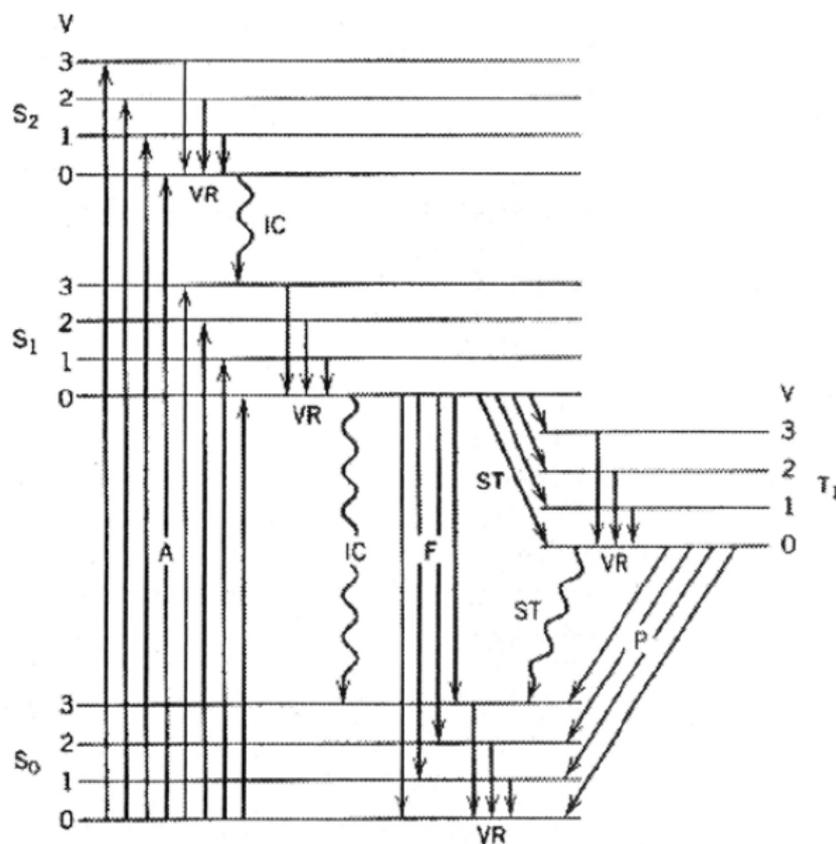


Abb. 2-17: Übersicht über die wichtigsten Anregungs- und Relaxationsprozesse (*Jablonski-Diagramm*)^[212]: **A** : Absorption, **VR**: vibronische Relaxation, **IC**: Internal Conversion, **F**: Fluoreszenz, **ST**: Inter-System-Crossing, **P**: Phosphoreszenz, **S**: elektronischer Singulett-Zustand, **T**: Triplett-Zustand, **V**: vibronischer Zustand.

Bei der Lumineszenz ist nach der Regel von *Stokes* ^[215] die Energie des emittierten Photons immer kleiner als die Energie des aufgenommenen Photons. Daher ist das Fluoreszenzspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu längeren Wellenlängen verschoben.

Die strahlungslosen Prozesse laufen mit 10^{-14} - 10^{-12} s deutlich schneller als die Lumineszenz ab. Strahlungslose Prozesse sind IC (*internal conversion*) und IST (*inter-system-crossing*). Hierbei handelt es sich um thermische Relaxationsvorgänge bei denen vibronische Energie freigesetzt wird. IC verläuft unter Erhalt der Spinmultiplizität, IST hingegen findet zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität statt (Singulett-Triplett-Übergang).

Neben den genannten strahlungslosen Relaxationsprozessen kann ein Molekül auch durch Elektronen- oder Energietransfer aus dem angeregten in den Grundzustand gelangen. Dabei wird ein Elektron bzw. die Anregungsenergie abgegeben. Diese Prozesse können intra- und intermolekular stattfinden. Diese beiden Vorgänge können zur Löschung der Fluoreszenzintensität beitragen und beeinflussen die Fluoreszenzlebensdauer τ_F .

Die Lebensdauer τ_F gibt die mittlere Lebensdauer eines Moleküls im angeregten Zustand wieder. Sie ist indirekt proportional zur Ratenkonstante der Fluoreszenzemission k_F .

$$\tau = \frac{1}{k_F} \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

Die Geschwindigkeitskonstante k_{ET} des Elektronentransfers kann bei zeitaufgelösten Messungen aus der mittleren Lebensdauer τ des angeregten Zustandes bestimmt werden. Hierbei ist τ_0 die Lebensdauer des angeregten Zustandes der Referenzverbindung, (mit einem fluoreszenten Donor, aber ohne Akzeptor) im Vergleich zur Lebensdauer τ des Donor-Akzeptor-Komplexes.

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

Die Quantenausbeute Φ_F ist definiert als der Anteil der Fluoreszenzintensität an der Summe aller strahlenden und strahlungslosen Relaxationsprozesse des angeregten Chromophors.

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum k_R} \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

Experimentell lässt sie sich aus dem Verhältnis der eingestrahlenen zur emittierten Lichtmenge bestimmen. Üblicherweise wird die integrierte Fluoreszenzintensität berechnet und ins Verhältnis zu einer Referenzsubstanz mit bekanntem Φ_F gesetzt. Die Quantenausbeute der Probe lässt sich dann nach folgender Formel bestimmen.^[216]

$$\Phi_F(\mathbf{P}) = \Phi_F(\mathbf{R}) \cdot \frac{A(\mathbf{R}) \cdot n_D^2(\mathbf{P}) \cdot F(\mathbf{P})}{A(\mathbf{P}) \cdot n_D^2(\mathbf{R}) \cdot F(\mathbf{R})} \quad (\text{Gleichung 2.7})$$

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

Nur in verdünnten Lösungen ($< 10^4$ mol/L) ist die Fluoreszenzintensität linear abhängig von der Konzentration. In konzentrierten Lösungen können Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren auftreten. Kommt es zu Wechselwirkungen zwischen einem Molekül im Grundzustand und einem Molekül im angeregten Zustand, so spricht man von einem *Exciplex*. Das Donor- und Akzeptormolekül teilen sich hierbei die Anregungsenergie sowie Ladung. Es kann auch zur Bildung eines intramolekularen Exciplexes kommen. Als Intermediat beim oxidativen Lochtransfer in 8-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyguanosin (PydG) entsteht ein Exciplex, der sich aus den beiden Spezies $\text{Py}^* \cdot \text{dG}$ und $\text{Py}^{\bullet-} \cdot \text{dG}^{\bullet+}$ zusammensetzt (s. Abb. 2-18).^[31, 47, 49, 152] Die elektronischen und spektroskopischen Eigenschaften dieser Intermediate weichen stark von den Eigenschaften der isolierten Bestandteile

Pyren und Desoxyguanosin ab. Man erhält breite unstrukturierte Emissionsbanden. ^[49]

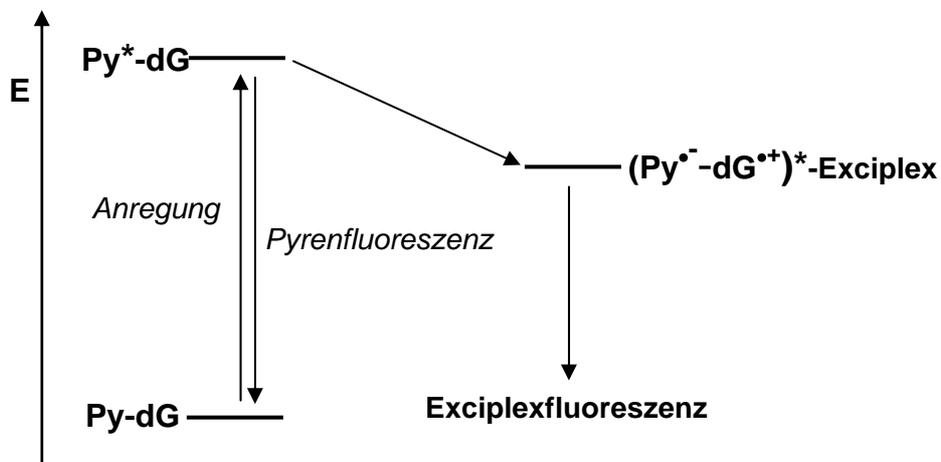


Abb. 2-18: Bildung des Exciplexes beim oxidativen Lochtransfer in PydG.

2.2.1.2 Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie

Diese Methode, sog. *Pump-Probe-Spektroskopie*, ermöglicht die Beobachtung von sehr kurzlebigen Zuständen, durch eine Zeitauflösung im fs-Bereich. Allerdings ist diese Methode weniger empfindlich als die Fluoreszenzspektroskopie. Nach Anregung des Chromophors (pump) mit einem kurzen Laserpuls einer geeigneten Wellenlänge, erfolgt mit einer definierten Zeitverzögerung die Abfrage der angeregten Zustände (probe) durch einen zweiten Laserpuls (s. Abb. 2-19).

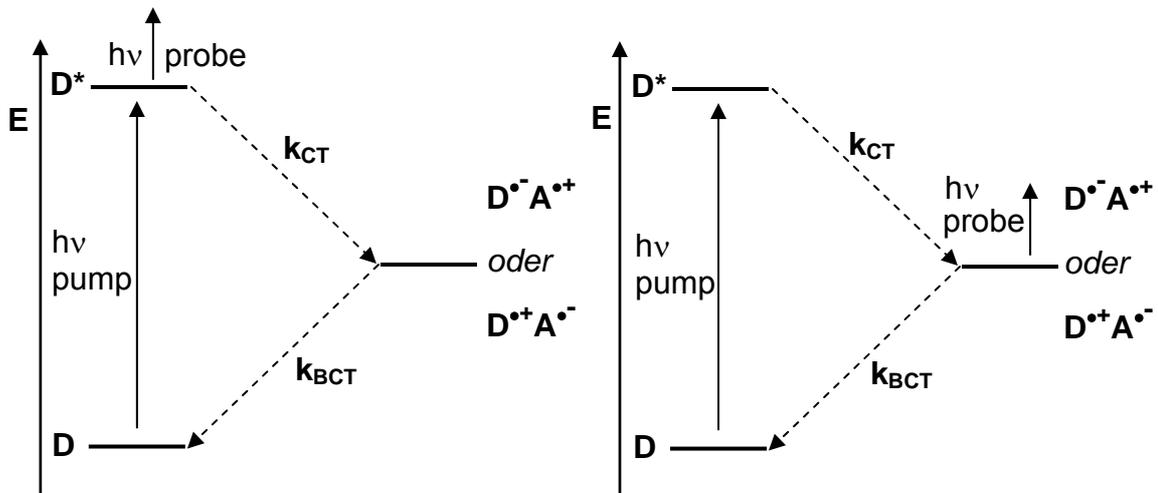


Abb. 2-19: Durch zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie können nach Anregung des Ladungsdonors **D** beliebige Zustände abgefragt und die Raten für den Ladungstransfer k_{CT} und Rückladungstransfer k_{BCT} bestimmt werden.

Der Abfragepuls ist ein unabhängiger Laserpuls, der so fokussiert wird, dass er durch den exakt gleichen Punkt in der Probe verläuft wie der Anregungspuls. Dadurch ist gewährleistet, dass die lokal erzeugten angeregten Zustände abgefragt werden. Durch kontinuierliches Durchschicken des Abfragepulses in definierten Zeitabständen, kann zu jedem Zeitpunkt die Absorption der gebildeten Intermediate aufgezeichnet werden. Liegt der Probepuls im Absorptionsbereich des Grundzustands, kann die Rate des Rückladungstransfers k_{BCT} bestimmt werden. Aus den erhaltenen zeitabhängigen Spektren lässt sich die Lebenszeit des angeregten Zustands ermitteln. Liegt der Abfragepuls im Fluoreszenzbereich des Chromophors, kommt es zu einer stimulierten Emission des angeregten Zustands. Die Entvölkerungsrate dieses Zustands kann man bestimmen.

Durch Verwendung des Weißlichtkontinuums für den Abfragepuls können alle Wellenlängen abgefragt werden und somit alle intermediären Zustände innerhalb des fs-Zeitfensters detektiert werden. Diese Methode wurde auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

2.2.2 Cyclovoltammetrie und Spektroelektrochemie

Mit Hilfe der Cyclovoltammetrie kann man die Redoxpotentiale von Verbindungen ermitteln. Man verwendet eine Drei-Elektroden-Anordnung, die sich aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode zusammensetzt. Die Messung erfolgt unter Argonatmosphäre unter Verwendung von trockenen organischen Lösungsmitteln. Um die Leitfähigkeit der Lösung zu erhöhen, wird Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAH) zugesetzt. An der Arbeitselektrode findet die Reduktion und Oxidation statt, die mit Hilfe der *Nernst*-Gleichung beschrieben werden können. Man legt dabei ein Potential an, das sukzessive mit konstanter Geschwindigkeit erhöht wird, sog. Vorschubspannung v , und misst den dadurch erzeugten Strom. Bei einem stattfindenden Redoxvorgang ändert sich der Strom drastisch und man erhält jeweils ein Signal, das dem anodischen und kathodischen Peakpotential entspricht. Aus diesen beiden Peakpotentialen E_p^{ox} und E_p^{red} lässt sich dann das Standardpotential, sog. Halbstufenpotential $E_{1/2}$, eines elektrochemischen Übergangs ermitteln.^[217]

$$E_{1/2} = \frac{E_p^{\text{ox}} + E_p^{\text{red}}}{2} \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

Um das das Absorptionsspektrum eines Radikals aufzeichnen zu können, muss es *in situ* erzeugt werden und direkt vermessen werden. Dies wird durch eine *spektroelektrochemische* Messung ermöglicht. Man bedient sich hierbei einer speziellen Meßzelle (s. Abb. 2-20), die mit einem Drei-Elektroden-Aufbau, ähnlich dem bei der CV, ausgestattet ist. Dadurch wird es ermöglicht, ein elektrisches Potential direkt an der Messzelle anzulegen und eine Radikalspezies zu generieren, die anschließend mittels eines Absorptionsspektrometers direkt vermessen wird.^[218]

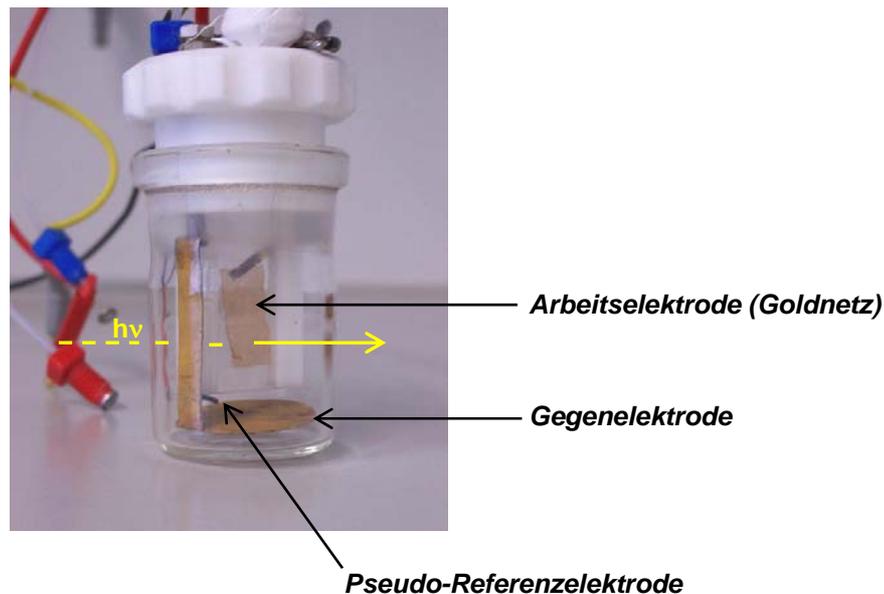


Abb. 2-20: Messzelle für Spektroelektrochemie. Es wird eine Quarzglasküvette verwendet und das Goldnetz ist zwischen zwei Quarzglasplatten eingespannt. Die Elektroden sind mit einem Potentiostaten verbunden. Vor der Messung wird die Zelle über Teflonschläuche mit Argon gespült.

Die Spektroelektrochemie eignet sich v. a. für relativ stabile Radikale, da sie im Gegensatz zur Cyclovoltammetrie wesentlich zeitintensiver ist.

2.2.3 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie (Zirkulardichroismus) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, nähere Informationen über die Konformation der hergestellten DNA-Duplexe zu erhalten.

Diese spektroskopische Methode wird zur Charakterisierung und Identifizierung von optisch aktiven Verbindungen eingesetzt. Die Chiralität eines Moleküls kann durch ein einziges asymmetrisches Kohlenstoffatom hervorgerufen werden, oder durch größere Strukturen wie z. B. die Helix der DNA. Der CD-Effekt eines Moleküls wird durch seine unterschiedlich starke Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht hervorgerufen. Diese Absorptionsunterschiede sind bedingt durch die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten ϵ des Moleküls für rechts und links polarisiertes Licht. Aufgetragen wird die Differenz der Absorption

$\Delta A = A_L - A_R$ bzw. der Extinktionskoeffizienten $\Delta \epsilon$ gegen die Wellenlänge. Häufig wird als Größe auch die molare Elliptizität Θ_λ ($\Delta A = \Theta_\lambda / 3298$)^[219] verwendet. Das CD-Spektrum erhält man aus dem ORD-Spektrum (Optische Rotationsdispersion) durch *Kronig-Kramers-Transformation*. Ist die Differenz $\epsilon_L - \epsilon_R > 0$ so bezeichnet man das Signal als positiven *Cotton-Effekt* und die Bande befindet sich oberhalb der Nulllinie. Ist die Differenz kleiner als 0, ergibt sich ein negativer *Cotton-Effekt* und die Bande erscheint unterhalb der Nulllinie im Spektrum.

Die DNA-Konformationen lassen sich mittels CD-Spektroskopie bestimmen. Die charakteristischen Banden von B-DNA sind ein Minimum bei 240 nm mit einem Nulldurchgang bei 260 nm. Man beobachtet hier bei kurzen Wellenlängen einen negativen und bei längeren Wellenlängen einen positiven *Cotton-Effekt*. Wird die DNA mit achiralen Chromophoren modifiziert, so kann ein CD-Signal des Farbstoffes beobachtet werden. Durch die chirale Umgebung der DNA wird ein CD-Signal im Absorptionsbereich des Farbstoffes induziert.

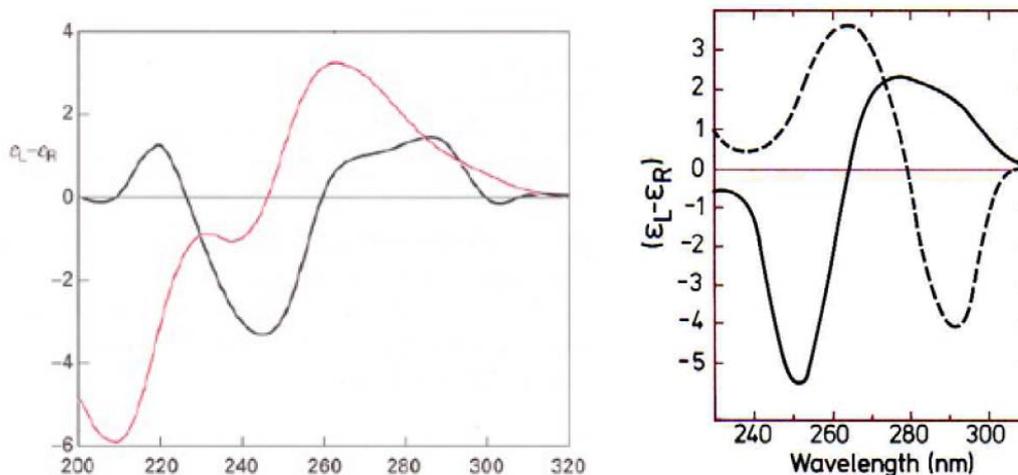


Abb. 2-21: CD-Spektren von A-, B- und Z-DNA: Übergang von B-DNA (—) in Z-DNA (—) (*links*); B-DNA (—) und Z-DNA (---) (*rechts*).^[220]

2.3 Synthesemethoden

2.3.1 DNA-Festphasensynthese

Die in den 1980er Jahren von *Letsinger*^[221, 222] entwickelte DNA-Festphasensynthese zählt heute zu den Standardverfahren zur Oligonukleotid-Darstellung. Das Prinzip der Festphasensynthese geht auf die von *Merifield*^[223] entwickelte Peptid-Festphasensynthese zurück. Als Träger der festen Phase dient sog. *Controlled Pore Glass (CPG)*, dessen Oberfläche mit primären Aminogruppen funktionalisiert ist. Über einen Linker, meist Succinat, ist das erste Nukleosid über seine 3'-OH-Gruppe kovalent mit dem CPG verankert. Derartig belegtes CPG ist für jede Nukleobase kommerziell erhältlich. Das Nukleosid ist an der 5'-OH-Gruppe mit einer 4,4'-Dimethoxytrityl-(DMT)-gruppe geschützt. Dabei handelt es sich um eine temporäre Schutzgruppe, die zu Beginn des Synthesesyklus mit Dichloressigsäure abgespalten wird. Da das orangefarbene Tritylkation über eine charakteristische Absorption ($\lambda = 470 \text{ nm}$) verfügt, lässt sich die Kupplungseffizienz jedes einzelnen DNA-Bausteins mitverfolgen. Exozyklische Aminofunktionen der Nukleobasen A, C und G sind durch permanente Schutzgruppen geschützt. Diese permanenten Schutzgruppen zeichnen sich dadurch aus, dass sie orthogonal zur 4,4'-Dimethoxytrityl-(DMT)-gruppe sind und erst nach der Festphasensynthese bei der Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase mit entfernt werden (s. Abb. 2-22).

Die Integration von artifiziellen DNA-Bausteinen benötigt oft abweichende Kupplungsbedingungen z. B. wegen des großen sterischen Anspruchs einer modifizierten Nukleobase oder wegen zu geringer Löslichkeit im Standardreagenz Acetonitril. Durch längere Kupplungszeiten, mehrere Kupplungszyklen und höhere Konzentrationen des Phosphoramidits der modifizierten Nukleobase lässt sich die Kupplungseffizienz erhöhen und ein erfolgreicher Einbau in Oligonukleotide erreichen. Die speziellen Bedingungen zur Synthese und Aufarbeitung der in dieser Arbeit eingesetzten modifizierten DNA-Bausteine werden bei der Synthese der entsprechenden Oligonukleotide erläutert.

Die Abspaltung des fertigen Oligonukleotids erfolgt mit konz. Ammoniak bei 55°C innerhalb von 10 h. Dabei werden auch die Cyanoethoxy-Schutzgruppen an den Phosphateinheiten durch β -Eliminierung entfernt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgte in dieser Arbeit durch präparative RP-HPLC.

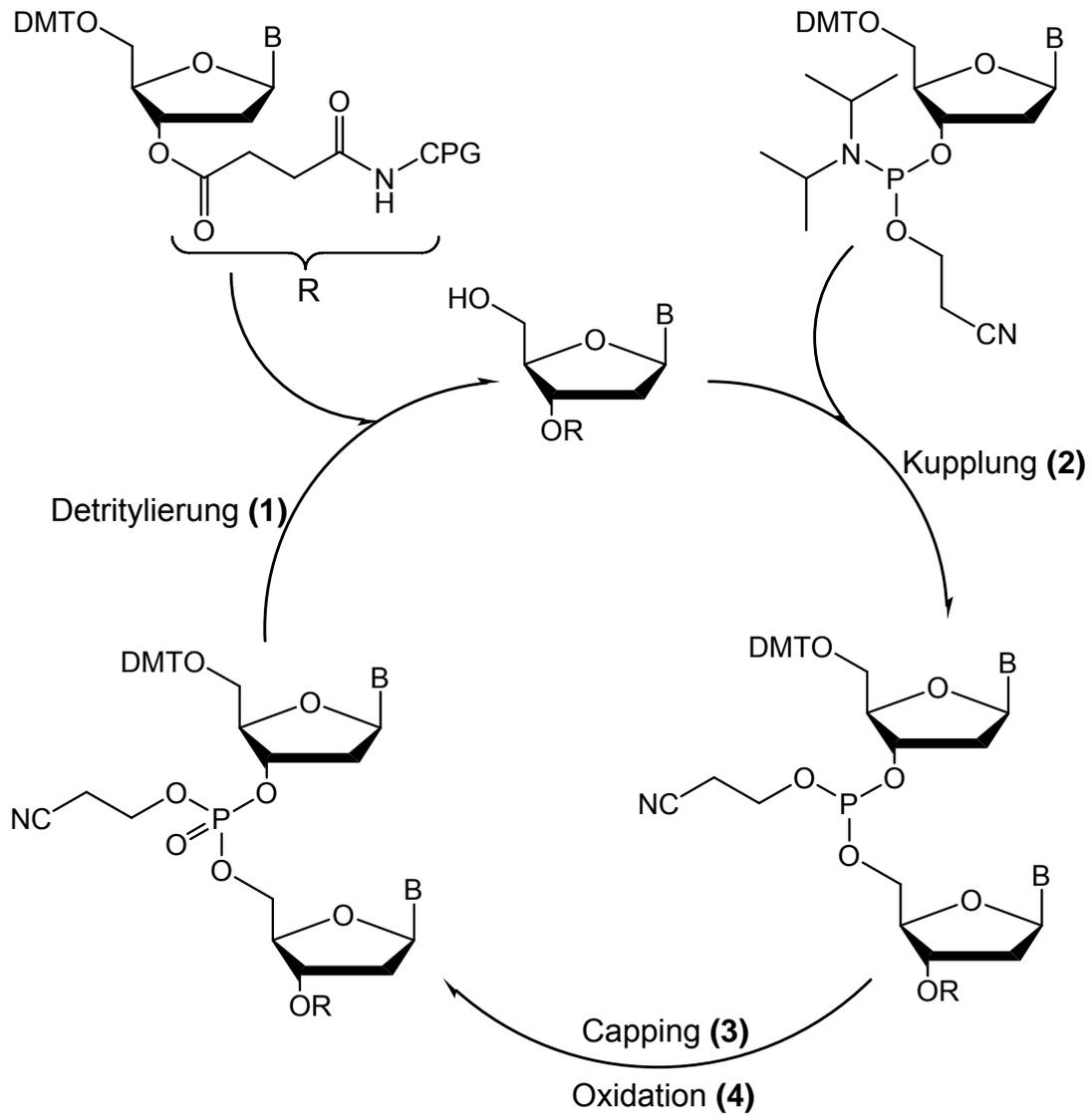


Abb. 2-22: Schematische Darstellung des Synthesesyklus der DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode: **(1)** 2% Dichloressigsäure, (DCM); **(2)** Tetrazol (ACN); **(3)** Acetanhydrid, N-Methylimidazol, Lutidin, (THF); **(4)** Iod, Lutidin, (H₂O).

2.3.2 Pd-katalysierte Kreuzkupplungen an Nucleosiden

Die Verknüpfung des Chromophors mit der Nucleobase über eine C-C-Bindung kann über verschiedene palladiumkatalysierte Kreuzkupplungsmethoden erfolgen.^[224] An Nucleosiden sind hauptsächlich die Heck-^[225], Stille-^[226, 227], Sonogashira-^[228] und Suzuki-Miyaura-Kupplung^[229, 230] angewendet worden. Die Suzuki-Miyaura-Kupplung ist in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht et al.* zur Synthese von pyrenmodifizierten Nucleosiden eingesetzt worden, unter anderem zur Darstellung von 8-(1-Pyrenyl)-2'-Desoxyguanosin (PydG)^[47], 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (PydU)^[47, 49] und 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (PtzdU)^[208] (s. Abb. 2-23).

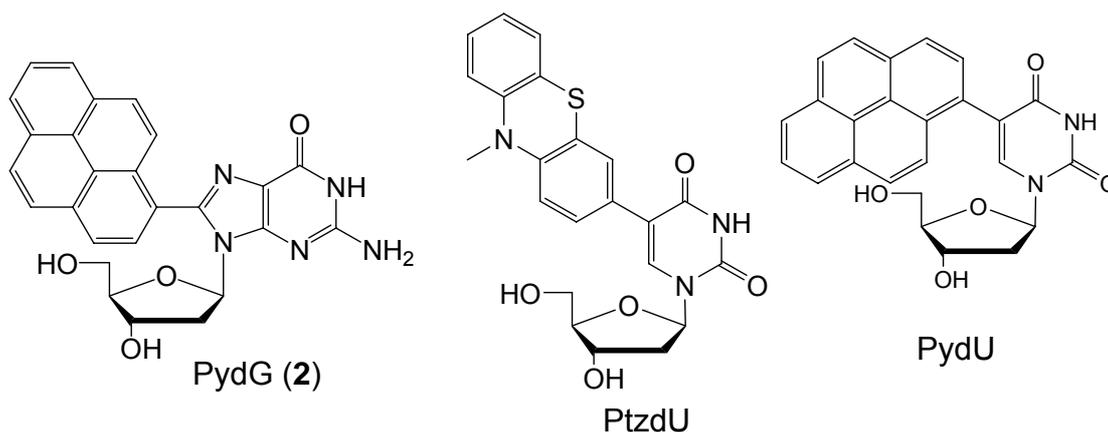


Abb. 2-23: Pyrenmodifizierte Nucleoside.

Die Verknüpfung der Pyreneinheit mit dem Nucleosid erfolgt über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktion^[231]. Diese Reaktion verläuft nach dem für palladiumkatalysierte Reaktionen typischen Katalysezyklus (s. Abb. 2-24). Diese Art der C-C-Verknüpfung zeichnet sich gegenüber anderen Palladium katalysierten Kreuzkupplungen wie u. a. Stille-^[232-235], Negishi-^[236] und Sonogashira-Reaktion^[236-241] durch die Toleranz vieler funktioneller Gruppen sowie die thermische und hydrolytische Stabilität der einsetzbaren Edukte aus. Bei der Suzuki-Kupplung werden Boronsäurederivate mit Aryl-, Alkenyl- oder Alkynylhalogeniden (v. a. Iodide und Bromide) umgesetzt. Die Transmetallierung kann nur stattfinden, wenn durch eine Base wie z.B. Natriumhydroxid eine tetravalente anionische Borspezies gebildet wird, die eine stark erhöhte Nucleophilie aufweist.

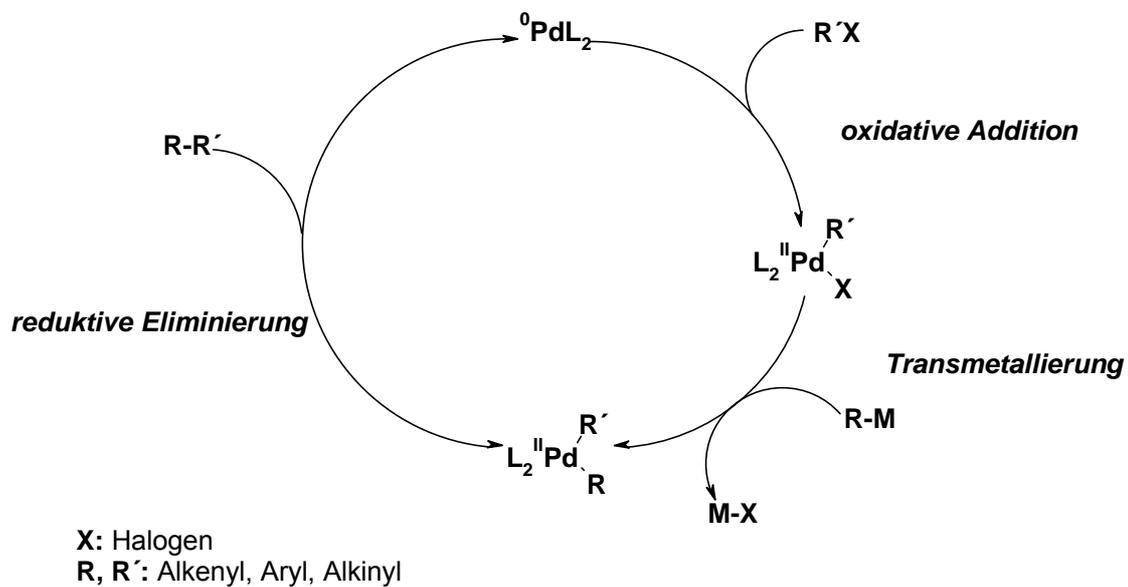


Abb. 2-24: Typischer Katalysezyklus palladiumkatalysierten Kreuzkupplungen.

2.4 SNP-Detektion

Unter Punktmutationen, sog. SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) versteht man veränderte Genabschnitte, die sich gegenüber der Wildtyp-Form nur in einem einzigen Basenpaar unterscheiden (s. Abb. 2-25).^[16, 242-245]

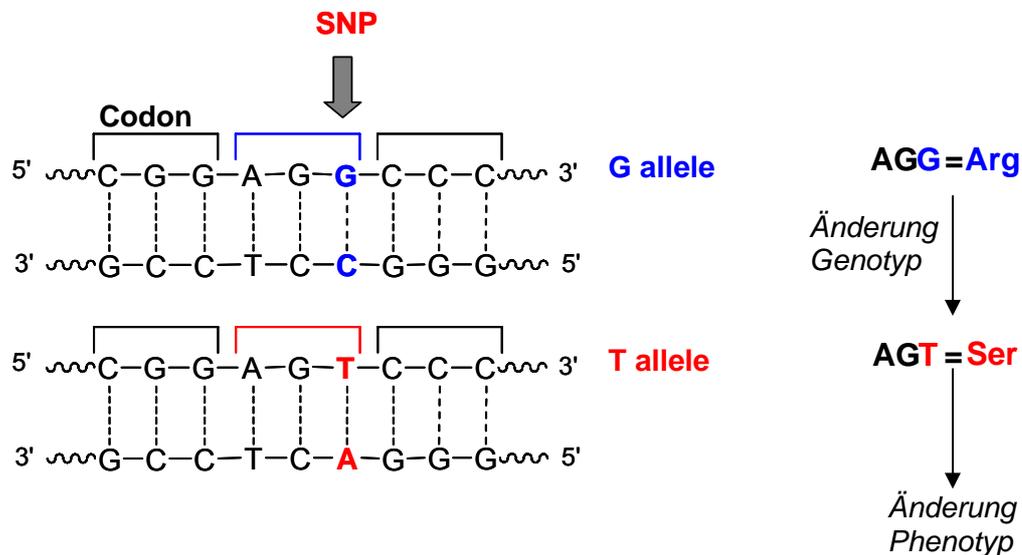


Abb. 2-25: Beispiel für SNP: Wildtyp-DNA (*oben*) und Mutante (*unten*).

Wird die Punktmutation von körpereigenen Reperaturmechanismen nicht behoben und liegt die Punktmutation in einer proteincodierenden Region, kann es bei der Translation zu einer veränderten Aminosäuresequenz des zu codierenden Proteins kommen. Eine Änderung des Phänotyps kann durch eine veränderte Proteinfunktion oder Expression, falls der SNP in einer Promoter-Region der DNA liegt, die Folge sein.^[16]

Tritt die Mutation in Keimzellen auf, so kann das zu vererbaren Krankheiten führen. Die SNP-Detektion ist daher von großer Bedeutung für die medizinische und pharmazeutische Diagnostik.^[16, 17] Die bisher eingesetzten Methoden lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Enzymatische und nicht-enzymatische Assays. Die wichtigsten werden im Folgenden vorgestellt.

2.4.1 Enzymatische Assays

Diese Assays zeichnen sich durch eine hohe Genauigkeit und Zuverlässigkeit der verwendeten Enzyme wie z. B. DNA-Polymerase^[246] oder Flap-Endonuklease^[247] bei der Erkennung von SNPs aus.

2.4.1.1 Single-Nucleotide Primer Extension

Der verwendete Primer ist komplementär zur DNA-Sequenz des Wildtyps sowie der Mutante und wird am 3'-Ende hybridisiert. Zur Verlängerung des Primers durch die DNA-Polymerase werden ddNTPs (Dideoxynucleosid Triphosphate) eingesetzt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Fluoreszenzfarbstoffe verfügen über unterschiedliche Emissionsmaxima, die für das entsprechende ddNTP charakteristisch sind.

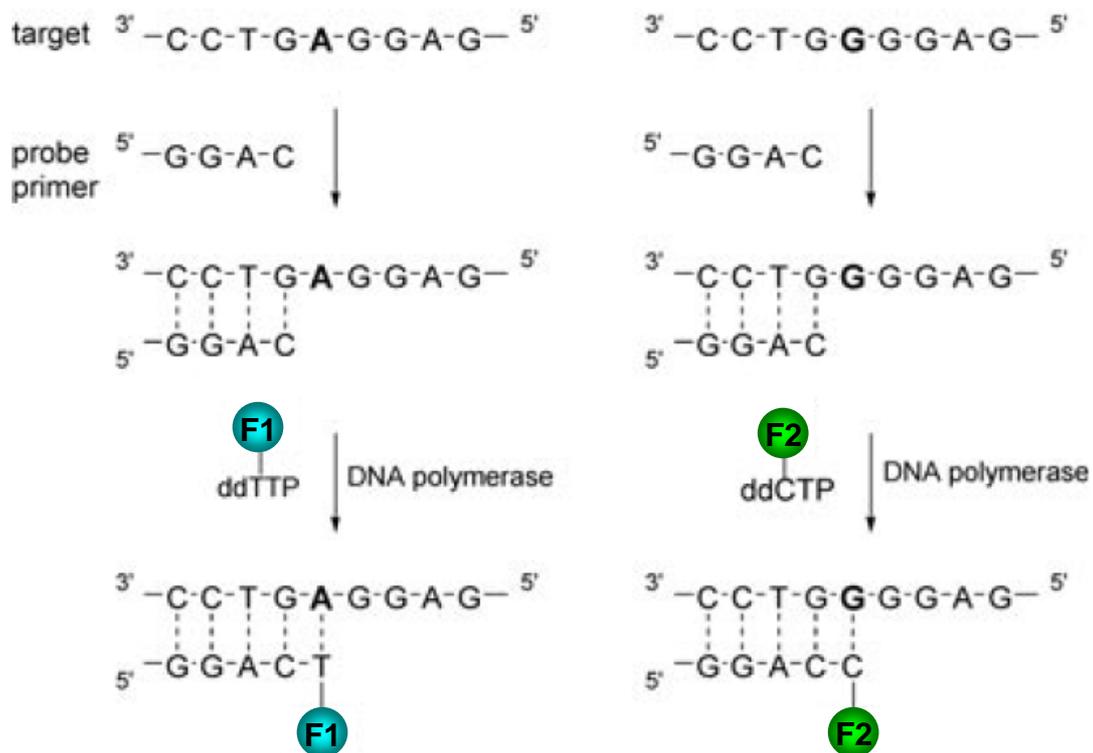


Abb. 2-26: Single-Nucleotide Primer Extension von DNA eines Wildtyps (*links*) und einer Mutante (*rechts*). ddNTPs: Dideoxynucleosid Triphosphate.^[16, 246]

Durch Einbau des komplementären ddNTPs gegenüber der zu untersuchenden Base in der Gensequenz, kann man aufgrund der charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften der Sonden erkennen, ob eine Mutation stattgefunden hat oder die Wildtyp-DNA vorliegt.

2.4.1.2 Invader Assay[®] [247]

Das Invader-Assay[®] beruht auf einer hochselektiven enzymkatalysierten Reaktion, die eine Detektion von Punktmutationen durch Fluoreszenz ermöglicht.

Beim Invader-Assay[®] werden zwei unterschiedliche Oligonukleotide eingesetzt, Invasiv- und Signalsonde, und das Enzym Flap-Endonuklease. Die Invasiv- sowie Signalsonde sind komplementär zur zu untersuchenden Basensequenz. Die Invasivsonde hybridisiert an dem 3'-Ende des SNP und die Signalsonde am 5'-Ende des SNPs. Die Signalsonde verfügt an ihrem 5'-Ende über eine sog. Flap-Region, die ein FRET-Paar (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) enthält, das zur Detektion genutzt wird. Die Signalsonde bildet mit der Invasivsonde einen Triplex. Das Enzym Flap-Endonuklease erkennt die Triplexstruktur und spaltet das 5'-Ende („Flap“) ab, wenn ein Strukturelement wie im Wildtyp (Abb. 2-27, *links*) vorliegt. Durch Abspaltung der „Flap“-Region wird der Energietransfer von dem Fluorophor zum Quencher unterbunden und man erhält ein Fluoreszenzsignal, das den Wildtyp anzeigt.

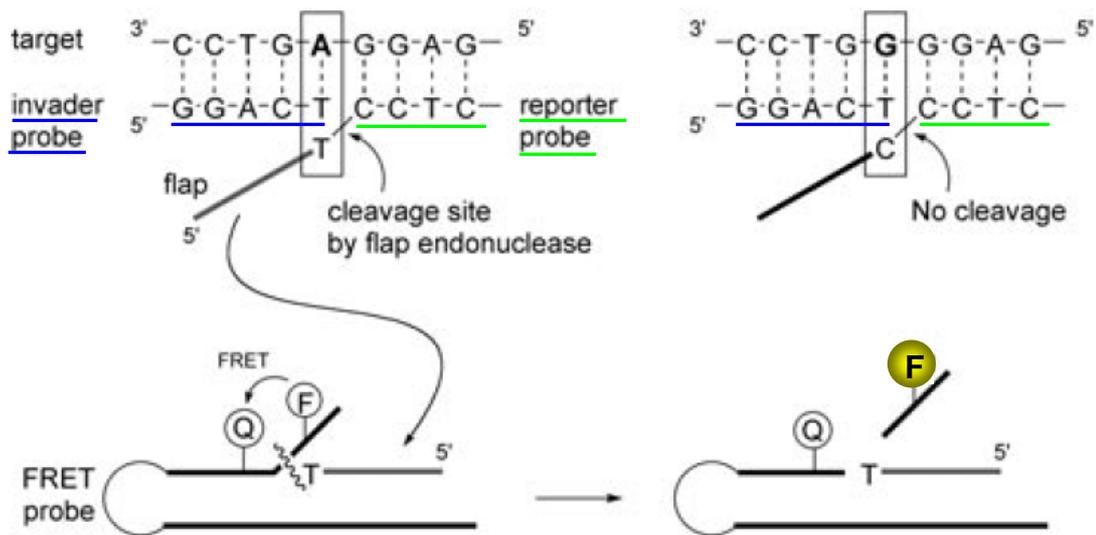


Abb. 2-27: Schematische Darstellung des Invader Assays.^[16, 247] Wildtyp (*links*); Mutante (*rechts*).

2.4.1.3 TaqMan Assay^{®[248]}

Das Prinzip des TaqMan[®]-Assays beruht auf der sequenzspezifischen Hybridisierung in Kombination mit PCR-Amplifikation. Die TaqMan-Probe ist mit einem Fluorophor und einem Quencher versehen. Sie hybridisiert mit der Sequenz, die die zu untersuchende Base enthält. Die Fluoreszenz des Quenchers ist aufgrund von FRET gelöscht. Ein Primer wird am 3'-Ende der zu untersuchenden Basensequenz hybridisiert und mit der Taq Polymerase verlängert. Dabei wird die TaqMan Probe durch den anwachsenden Primer verdrängt und durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase verdaut. Dadurch werden der Fluorophor und der Quencher räumlich voneinander getrennt, die Fluoreszenz steigt an.^[249] Das Assay beruht auf der sequenzspezifischen Hybridisierung der TaqMan Probe mit der zu untersuchenden Sequenz. Die Diskriminierung zwischen den einzelnen Sequenzen beruht auf der unterschiedlichen thermodynamischen Stabilität der gebildeten Duplexe. Allerdings sollte nicht unerwähnt bleiben, dass der thermodynamische Unterschied aufgrund einer einzigen Basenfehlpaarung oft sehr gering ist.

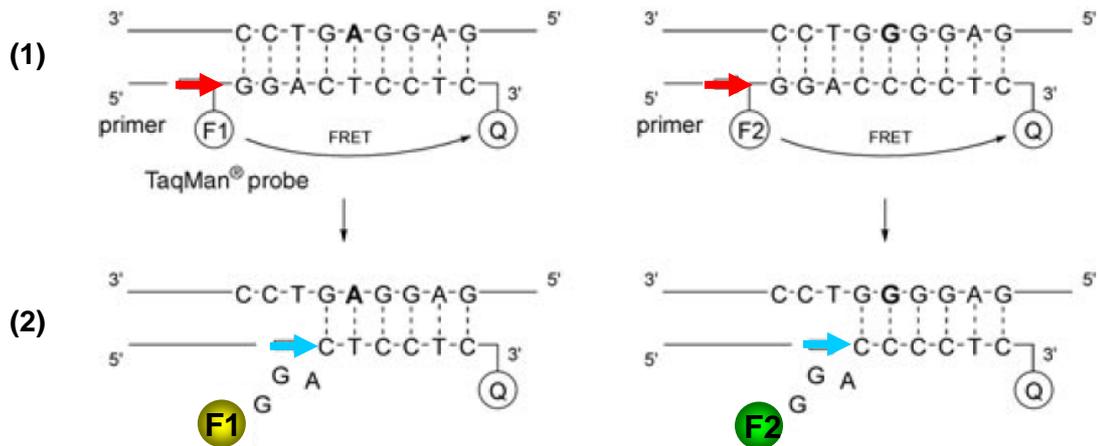


Abb. 2-28: Schematische Darstellung des TaqMan[®] Assays.^[16] **(1)** Verlängerung des Primers mit der Taq Polymerase; **(2)** Verdrängung der TaqMan Probe durch Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase. Wildtyp (*links*); Mutante (*rechts*).

2.4.2 Nichtenzymatische Assays

Die nichtenzymatischen Assays müssen die gleiche hohe Zuverlässigkeit bei der Erkennung von Basensequenzen gewährleisten, wie die bereits vorgestellten enzym-basierten Assays.

2.4.2.1 Allelspezifische Hybridisierung

Ein Standardverfahren in nicht-enzymatischen Assays zur Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutante stellt die Allel-spezifische Hybridisierung dar.^[250] Durch Verwendung von Allel-spezifischen Oligonukleotiden (ASO), die mit dem zu untersuchenden Sequenzabschnitt hybridisieren, erhält man im Wildtyp einen vollständig richtig gepaarten Duplex, im Fall der Mutante einem Duplex mit einer Basenfehlpaarung. Die allelspezifischen Oligonukleotide sind mit einer Fluoreszenzsonde markiert und auf einem festen Träger immobilisiert. Aufgrund der unterschiedlichen thermodynamischen Stabilität der Duplexe weist der fehlgepaarte Duplex eine niedrigere Schmelztemperatur auf. Daher kann bei bestimmten Bedingungen der fehl gepaarte Duplex dehybridisiert und durch Waschvorgänge vom richtig gepaarten Duplex abgetrennt werden, so dass das auslesbare Fluor-

reszenzsignal nur die richtig gepaarten Duplexe anzeigt. Allerdings ist die Diskriminierung zwischen fehl und richtig gepaarten Duplexen aufgrund der geringen Stabilitätsunterschiede problematisch.

2.4.2.2 Strang-Austausch-Methode

Die Strang-Austausch-Methode basiert auf kinetischen Unterschieden in der Duplexausbildung anstatt auf thermodynamischen Unterschieden in der Duplexstabilität zwischen richtig und fehl gepaarten Duplexen.^[251] Grundlage hierfür ist die Entdeckung, dass kammartig ausgebildete kationische Copolymere den Strangaustausch eines richtig gepaarten Duplexes mit einem komplementären Einzelstrang beschleunigen, nicht aber mit einem fehlgepaarten Strang. Ein Doppelstrang, der am 3'-Ende des einen Oligonukleotids und am 5'-Ende des anderen Oligonukleotids mit Fluorophoren markiert ist, dient als Sonde. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluorophore wird ein FRET ermöglicht. Wird nun ein komplementärer und ein nicht-komplementärer Einzelstrang in Anwesenheit des Copolymers hinzugegeben, findet ein Austausch mit dem komplementären Einzelstrang statt. Folglich wird der FRET unterbrochen und die Fluoreszenzintensität des Fluorophors F1 steigt an und kann detektiert werden (s. Abb. 2-29). Der Austausch des nicht-komplementären Einzelstranges erfolgt zu langsam.

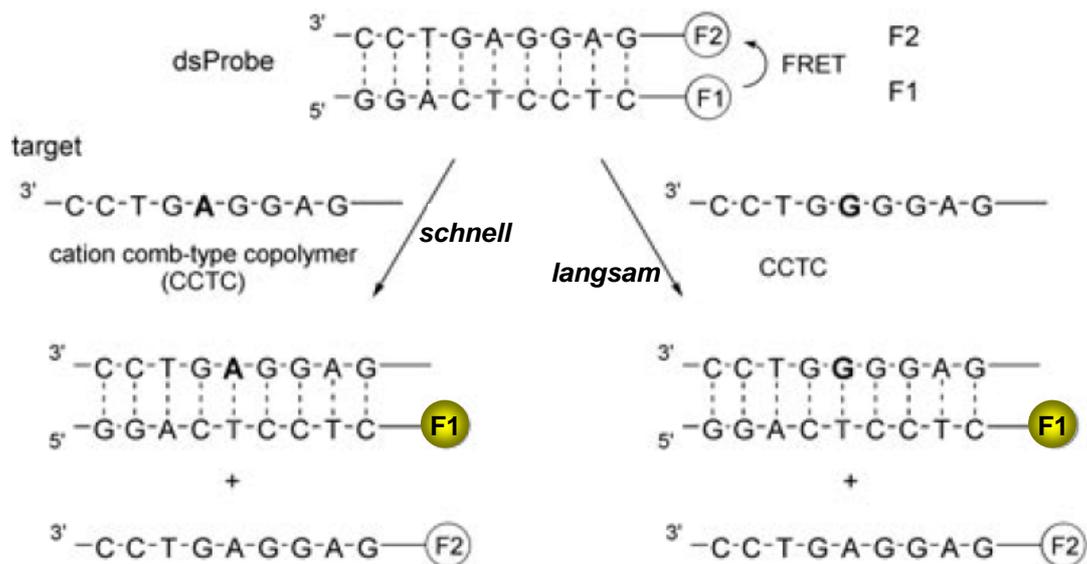


Abb. 2-29: Schematische Darstellung der Strang-Austausch-Methode.^[16]

2.4.2.3 Fluoreszenzmarkierte DNA-Basen und Fluoreszenzsonden als artifizielle Basen

Bei den sog. *Base-discriminating Fluorescent Probes* (BDF) handelt es sich fluoreszenzmarkierte Nucleobasen bzw. fluoreszente artifizielle Basen, die sich dadurch auszeichnen, dass ihr Emissionsverhalten empfindlich gegenüber der unmittelbaren elektronischen und strukturellen Umgebung ist.^[252-256]

Das Prinzip dieser Fluoreszenzsonden zur SNP-Detektion ist in Abb. 2-30 schematisch dargestellt. Die zu untersuchende DNA-Probe wird mit dem Analysatorstrang hybridisiert. Nur wenn die fragliche Base N mit der fluoreszenten Nucleobase eine korrekte Basenpaarung eingeht, ist ein starkes Fluoreszenzsignal zu beobachten. Im fehlgepaarten Duplex findet hingegen Fluoreszenzlöschung statt.

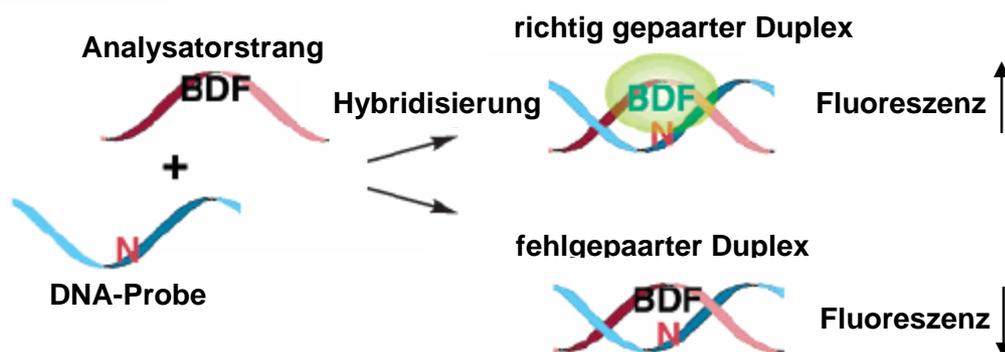


Abb. 2-30: Prinzip der BDFs: Diskriminierung der richtig und fehlgepaarten Stränge über Fluoreszenzdetektion. (N: zu untersuchende Base).^[252]

Für die zuverlässige und ausreichend sensitive Detektion von Basenfehlpaarungen durch fluoreszenzmarkierte Nucleoside oder fluoreszente Basensurrogate sind zwei Parameter entscheidend:

- (1) F/F_0 : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von ds-DNA (F) zu ss-DNA (F_0).
- (2) F/F' : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von richtig (F) und fehlgepaarter DNA (F').

Ein Beispiel für diese *Base-discriminating Fluorescent Probes* sind die von Saito *et al.* synthetisierten pyren-modifizierten Nucleosiden (s. Abb. 2-31).^[252-256]

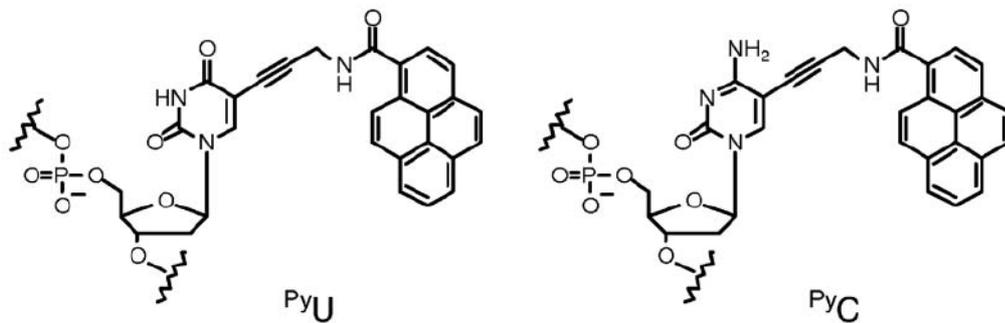


Abb. 2-31: Pyrenmodifizierte Nucleoside als *Base-discriminating Fluorescent Probes* (BDFs).^[252]

Sind die markierten Basen im Doppelstrang richtig gepaart, d.h. ^{Py}U mit A und ^{Py}C mit G so steigt die Fluoreszenz stark an. Befinden sich allerdings die entsprechend anderen drei Nucleobasen gegenüber so sinkt die Fluoreszenz auf einen Bruchteil ab. Die Fluoreszenzlöschung im Fall des fehlgepaarten Duplexes wird durch eine Interkalation des Pyrenderivats in den Basenstapel erklärt, wodurch es zu einer Fluoreszenzlöschung kommt. Im Fall des richtig gepaarten Duplexes befindet sich die Pyren-Einheit außerhalb der Helix in der großen Furche. Diese Art des Assays zeichnet sich durch die Einfachheit der Handhabung aus. Es ist relativ unempfindlich gegenüber pH-Wert, Salzkonzentration und Lösungsmittel, solange diese nicht die Ausbildung des Duplexes behindern. Darüber hinaus zeichnet es sich durch eine gute Diskriminierung zwischen richtig und fehl gepaarten Duplexen ($F/F' \sim 6$) aus.

In der Arbeitsgruppe Seitz *et al.* wurde als fluoreszente artifizielle Base Thiazolorange (TO) in PNA eingebaut (s. Abb. 2-32).^[257-262] Es wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz des TO beim Übergang von PNA zu PNA-DNA-Hybriden stark ansteigt ($F(ds)/F(ss) \sim 20$). Befindet sich eine Basenfehlpaarung in unmittelbarer Nachbarschaft zu Thiazolorange, so nimmt die Fluoreszenz im Vergleich zum richtig gepaarten Duplex ab ($F/F' \sim 5$). Somit lassen sich anhand der Fluoreszenzunterschiede Basenfehlpaarungen detektieren.

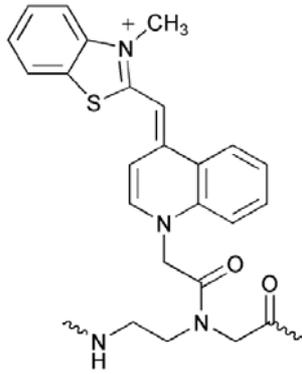


Abb. 2-32: Thiazolorange als *Base-discriminating Fluorescent Probe* (BDF).

Eine Übersicht wichtiger *Base-discriminating Fluorescent Probes* (BDF) wie z. B. perylenmodifiziertes Uridin von *Saito et al.*^[263], fluorenmodifiziertes Uridin von *Tucker et al.*^[264] und dem Anthracenbasensurrogat von *Kim et al.*^[265], bietet Abb. 2-33.

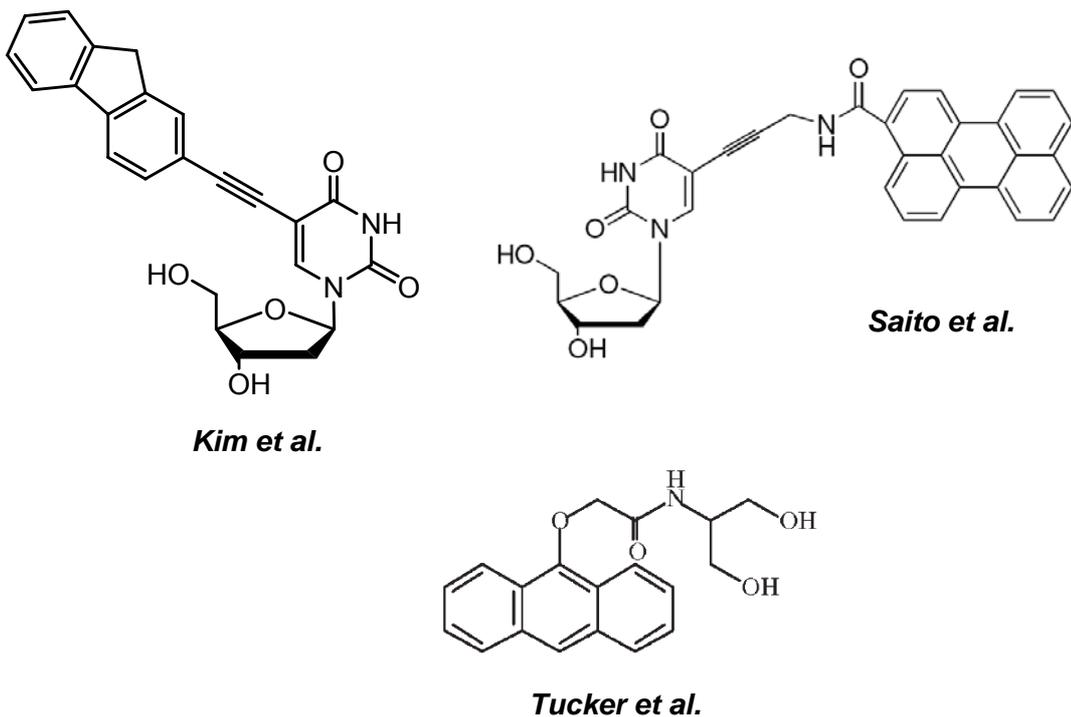


Abb.2-33: Beispiele für *Base-discriminating Fluorescent Probes* (BDF).

3 Ethidiummodifizierte Oligonukleotide

Die Mehrzahl der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente werden mit ethidiummodifizierten Oligonukleotiden durchgeführt (s. Abb. 3-1). Es handelt sich dabei formell um ein Phenanthridinchromophor (**1**), das aufgrund seiner engen Verwandtschaft (optisch wie strukturell) mit dem 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid (Ethidiumbromid) in der weiteren Arbeit als Ethidium bezeichnet wird. Der Einbau des Ethidiumchromophors als artifizielle Base in Oligonukleotide ist über konventionelle DNA-Festphasensynthese möglich und wird im Folgenden näher beschrieben.

3.1 Synthese und Charakterisierung der ethidiummodifizierten Nucleoside und Oligonukleotide

Es ist bekannt, dass Ethidium als photoanregbarer Donor Ladungstransferprozesse in DNA induzieren kann.^[20-29] Da photoangeregtes Ethidium aufgrund der Redoxpotentiale nicht in der Lage ist, die natürlichen DNA-Basen zu reduzieren oder oxidieren, müssen geeignete Ladungsakzeptoren zur Verfügung gestellt werden.^[26-28, 30-32] Um die Distanzabhängigkeit dieser Ladungstransferprozesse zu untersuchen, ist es unerlässlich, dass das Ethidiumchromophor an einer exakt definierten Position in den Basenstapel interkaliert und somit in einem genau festgelegten Abstand zum Ladungsakzeptor vorliegt. Der Einbau des Ethidiums als artifizielles Nucleosid in das Desoxyribosephosphatrückgrat der DNA gelingt über einen azyklischen Linker.^[18, 19]

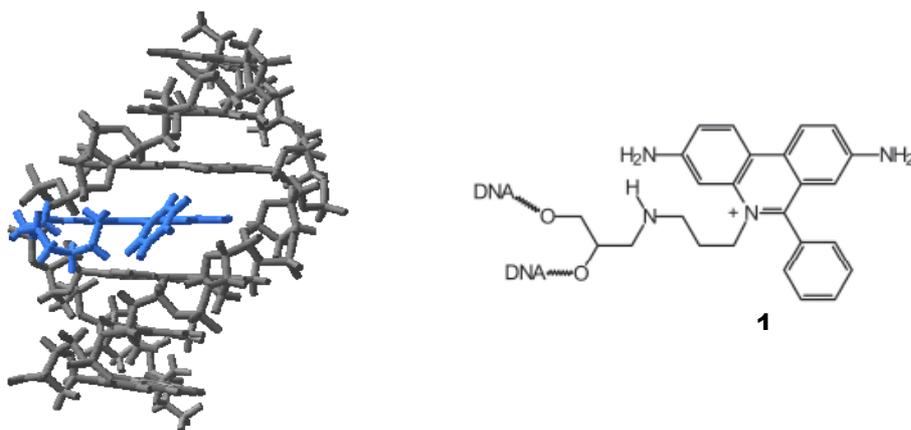


Abb. 3-1: Modell für Ethidium-modifizierte DNA.

Man verwendet als Linker (*S*)-1-Amino-propan-1,2-diol, um die Konfiguration am C-3' der 2'-Desoxyribose nachzuahmen (s. Abb. 3-2).



Abb. 3-2: (*S*)-1-Amino-propan-1,2-diol als Analogon der 2'-Desoxyribose, R = DNA-Base oder Basensurrogat.

Die Anknüpfung des Ethidiumchromophors über diesen azyklischen Linker stellt eine Alternative zum Einbau des Ethidiums als Ethidium-Nukleosid **4** dar (s. Abb. 3-3).

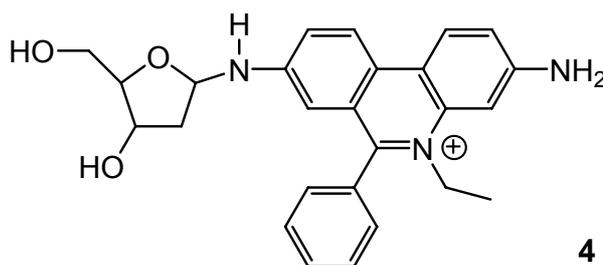


Abb. 3-3: Ethidium-Nukleosid **4**.

In Vorarbeiten ist gezeigt worden, dass die Synthese des Ethidiumnucleosids **4**, das über eine der exocyclischen Aminofunktionen glykosidisch mit dem 2'-Desoxyribosylfuranosid verknüpft ist, nicht in zufriedenstellenden Ausbeuten zu realisieren ist.^[42] Darüber hinaus trat bei der Behandlung des Glykosylamins mit konz. wässriger Ammoniaklösung, den Standardabspaltbedingungen der DNA vom festen Träger, Zersetzung durch Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen dem Ethidium und der 2'-Desoxyribosylfuranose-Einheit auf.^[42] Daher wurde die oben beschriebene alternative Route für den Einbau des Ethidiums über den azyklischen Linker in Oligonukleotide gewählt. Die Synthese des azyklischen Ethidium-Nucleosid-Analogons erfolgt ausgehend von kommerziell erhältlichem 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin und ist in der Literatur beschrieben.^[18, 19] Da diese Syntheseroute auch zur Herstellung anderer Ethidium-Nucleosid-Analoga

eingesetzt werden soll, ist sie hier deshalb noch mal zusammengefasst (s. Abb. 3-4).

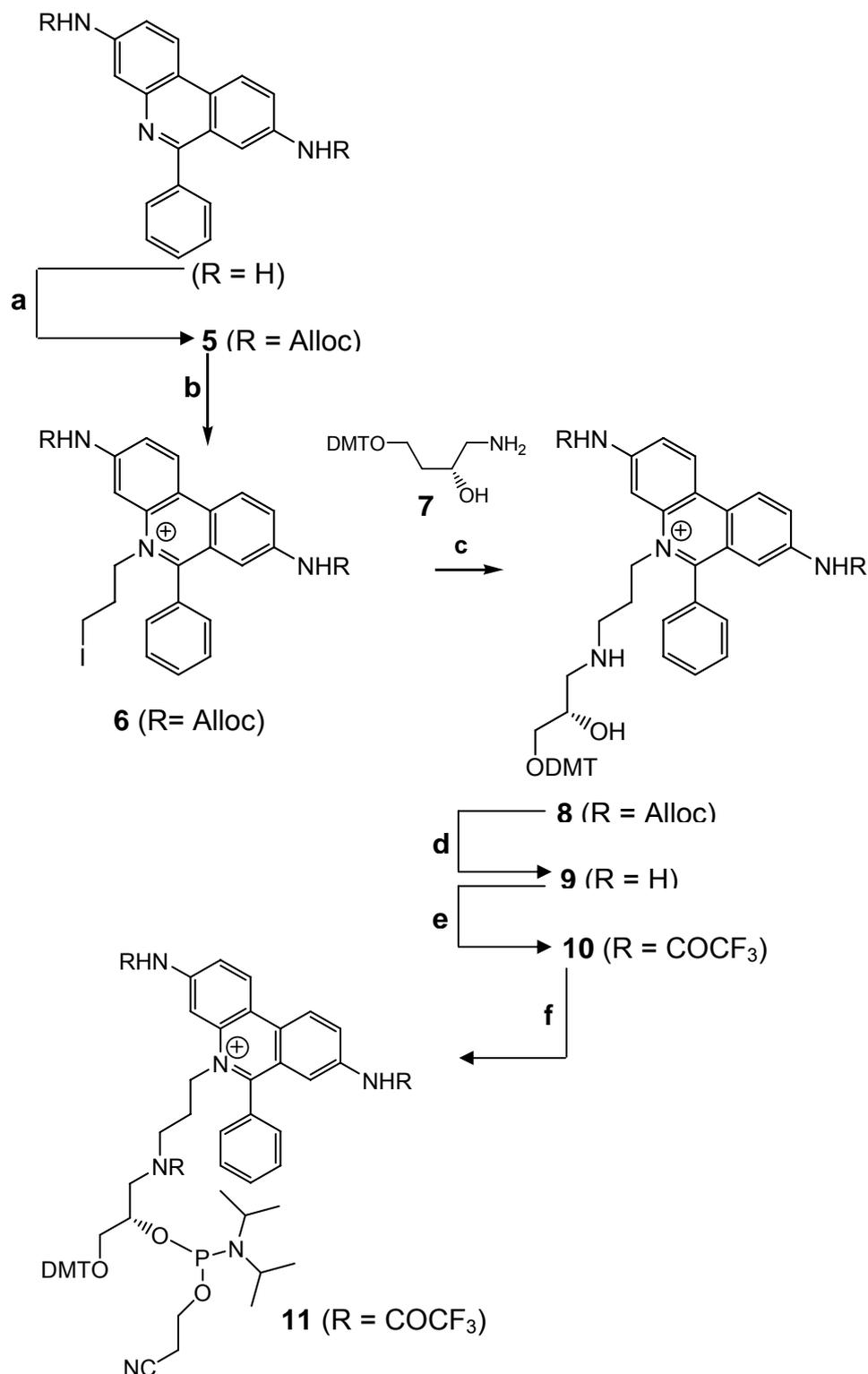


Abb. 3-4: Syntheschema zur Darstellung des DNA-Bausteins **11**:

(a) ClCOOCH₂CH=CH₂, DCM, RT, 24 h, 98 %; (b) I-(CH₂)₃-I, THF, 65°C, 9 d, 82 %; (c) **7**, DIPEA, DMF, RT, 55 h, 87 %; (d) Bu₃SnH, [Pd(Ph₃)₄], PPh₃, DCM/H₂O 300:1, RT, 90 min, 90 %; (e) (CF₃CO)₂O, DCM/Pyridin 5:1, 0°C, 10 min, RT, 10 min, 67 %; (f) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, DCM, RT, 45 min.

Zunächst werden die beiden exozyklischen Aminofunktionen in 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin mit Chlorameisensäureallylester geschützt. Diese Umsetzung verläuft nahezu quantitativ (98 %) und das Phenanthridinderivat **5** lässt sich durch Filtration isolieren. Anschließend wird mit 1,3-Diodpropan der Stickstoff in der 5-Position im Phenanthridingerüst alkyliert. Die Alkylierung benötigt zwar eine Reaktionszeit von 9 Tagen, aber bietet den Vorteil, dass das Produkt **6** aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Tetrahydrofuran, im Gegensatz zum Edukt **5**, ausfällt und durch Filtration abgetrennt und ohne weitere Reinigung umgesetzt werden kann. Durch Umsetzung des Iodids **6** mit dem Aminopropandiollinker **7** erhält man das Ethidium-Nukleosid **8**. Die nukleophile Substitution verläuft in Dimethylformamid unter Zusatz von DIPEA, um den entstehenden Iodwasserstoff abzufangen. Die Synthese des dafür benötigten Aminopropandiollinkers **7** ist in der Literatur beschrieben.^[18, 19, 266] Ausgehend von kommerziell erhältlichen (S)-1-Amino-propan-1,2-diol ist diese Verbindung über drei Syntheseschritte in guter Ausbeute zugänglich.

Im nächsten Schritt werden die Alloc-Schutzgruppen von **8** durch Trifluoracetylgruppen ersetzt. Dieser Austausch ist erforderlich, da bei der Palladium-katalysierten Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen nach der DNA-Festphasensynthese eine Allylübertragung auf eine der exozyklischen Aminofunktionen des Ethidiumchromophors beobachtet wurde und auch durch Überschuss verschiedener Allylakzeptoren (z. B. Dimedon) nicht verhindert werden konnte.^[33] Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen lässt sich optisch gut verfolgen, da bei Freisetzung der exozyklischen Aminogruppen ein Farbumschlag von gelb auf pink erfolgt. Dabei erhält man das Ethidium-Nukleosid **9**. Bei der Einführung der Trifluoracetylgruppen wird auch die sekundäre Aminfunktion des Linkers in **10** geschützt. Das Ethidium-Nukleosid **10** verfügt nur noch über eine reaktive Gruppe, die sekundäre Hydroxyfunktion. Dies ist Voraussetzung für eine möglichst quantitative Umsetzung zum entsprechenden Phosphoramidit **11**. Das Phosphoramidit **11** wird in Acetonitril gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Mit Hilfe eines modifizierten Kupplungsprotokolls mit einer Kupplungszeit von 1 h statt 1.5 min und drei Kupplungszyklen lässt sich eine gute Kupplungseffizienz erreichen (s. Abb. 3-5).^[33]

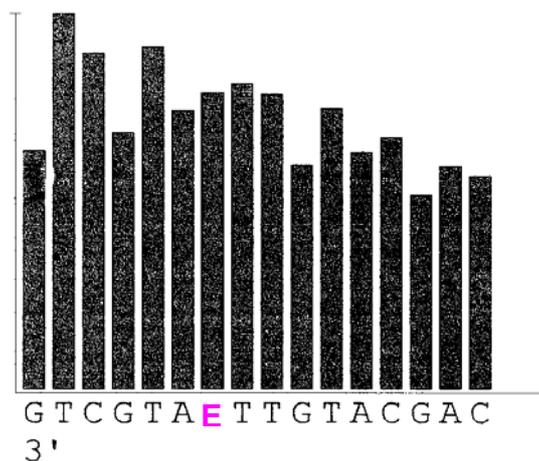


Abb. 3-5: Beispiel eines Tritylmonitors der erfolgreichen Synthese von ethidiummodifizierter DNA **E4**.

Die Abspaltung und Aufreinigung der ethidiummodifizierten Oligonukleotide erfolgt nach Vorschriften aus der Literatur.^[18, 19]

3.2 Ethidium als Loch- und Elektronendonator

Photoangeregtes Ethidium kann sowohl als Oxidations- sowie als Reduktionsmittel in Abhängigkeit von den Redoxpotentialen der potentiellen Reaktionspartner dienen. Da kein Ladungstransfer zwischen Ethidium und den natürlichen Basen aufgrund der Redoxpotentiale stattfinden kann, müssen geeignete Ladungsakzeptoren zur Verfügung gestellt werden. Mit einem Oxidationspotential von $E^0(E^{*+}/E^{\bullet}) = 1.2 \text{ V}^{[30]}$ ergibt sich aufgrund der *Rehm-Weller-Gleichung*, mit einer Singulett-Energie für die Photoanregung des Ethidiums mit $2.2 \text{ V}^{[30]}$, dass angeregtes Ethidium nicht in der Lage ist, Guanin ($E^0(G^{\bullet+}/G) = 1.3 \text{ V}^{[30, 31]}$) zu oxidieren. Daher wird 7-Deazaguanin (Z) als Ladungsakzeptor zur Verfügung gestellt, da es ein geringeres Oxidationspotential ($E^0(Z^{\bullet+}/Z) = 1.0 \text{ V}^{[30]}$) als G besitzt. Damit ergibt sich für den Gesamtprozess eine Triebkraft ΔG von ca. -0.2 eV . Es ist bekannt, dass Z die Fluoreszenz von photoangeregtem Ethidium^[267] aufgrund eines Ladungstransferprozesses löscht.^[20-30]

Da photoangeregtes Ethidium ($E(E^{2+}/E^{*+}) = -0.5 \text{ V}^{[28]}$) nicht in der Lage ist, die natürlichen DNA-Basen, von denen C und T die niedrigsten Redoxpotentiale besitzen ($E^0(T/T^{\bullet-}) = E^0(dC/dC^{\bullet-}) = -1.2 \text{ V}^{[32]}$), zu reduzieren, muss ein geeigneter Elektronenakzeptor bereitgestellt werden. Es kann 5-Nitroindol (N) verwendet werden, das ein Redoxpotential von $E^0(N/N^{\bullet-}) = -0.32 \text{ V}^{[34]}$ hat. Aufgrund der *Rehm-Weller-Gleichung* ergibt sich dann für den reduktiven Elektronentransfer zwischen E und N eine Triebkraft für ΔG von ca. -0.2 eV . Dieser Wert ist mit der Triebkraft für den oxidativen Lochtransfer zwischen Ethidium und Deazaguanin vergleichbar.^[179]

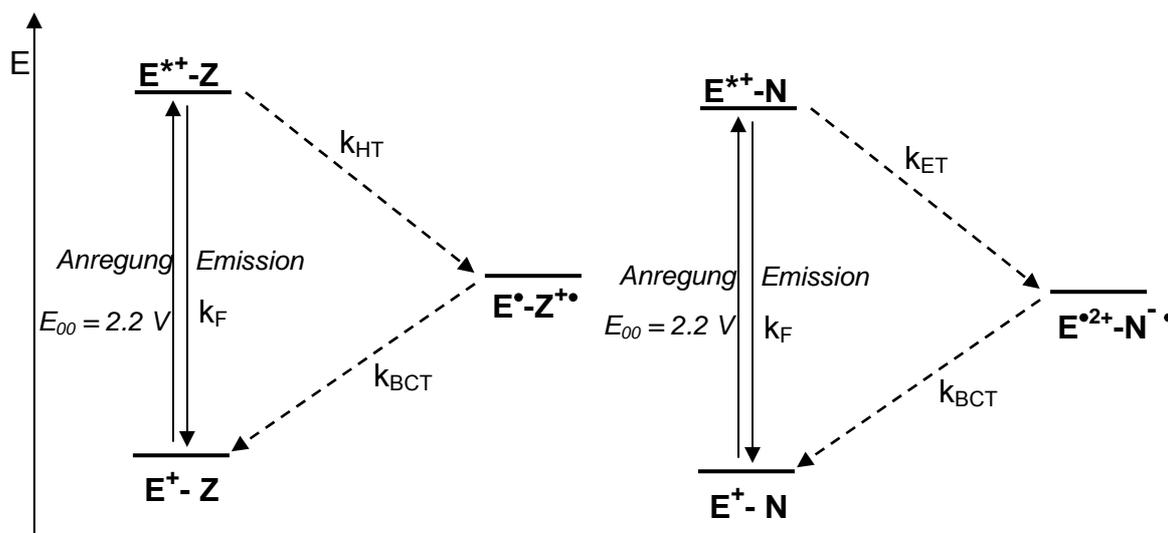


Abb. 3-6: Photoangeregtes Ethidium als Oxidationsmittel im System Ethidium-Deazaguanin und als Reduktionsmittel im System Ethidium-Nitroindol. Erläuterungen: k_{HT} : Rate des oxidativen Lochtransfers; k_{ET} : Rate des reduktiven Elektronentransfers; k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

3.2.1 Untersuchungen zur Abstandsabhängigkeit des Ladungstransfers im System Ethidium-Deazaguanin und Ethidium-Nitroindol

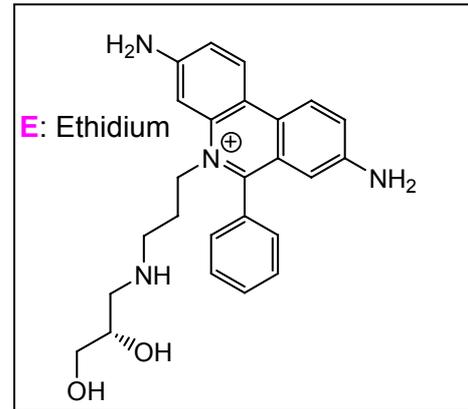
Um die Abstandsabhängigkeit des Ladungstransfers im System Ethidium-Deazaguanin und Ethidium-Nitroindol zu untersuchen, wurden neun Duplexe synthetisiert, die alle das Ethidiumnukleotid als Fluoreszenzsonde enthalten. In den Ladungstransferduplexen wird der Abstand zwischen E und dem Ladungsakzeptor Z (**E21/C26-E23/C28**) bzw. N (**E18/C26-E20/C28**) von einem bis drei Basenpaaren variiert. In den Kontrollduplexen **E15/C26-E17/C28** befindet sich anstelle des Ladungsakzeptors ein

Kontrollduplexe

E15 5'-TGC-ATG-CAG-TEA-CTG-AC-3'

E16 5'-GCA-TGC-AGT-TEA-CTG-AC-3'

E17 5'-CAT-GCA-GTC-TEA-CTG-AC-3'

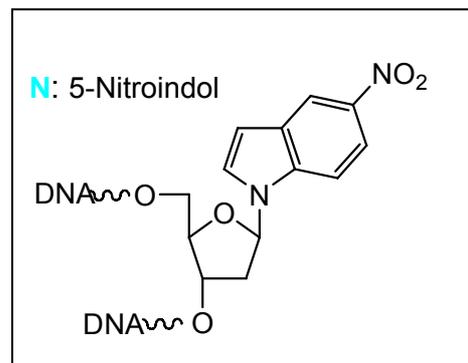


Ladungstransferduplexe (reduktiv)

E18 5'-TGC-ATG-CAN-TEA-CTG-AC-3'

E19 5'-GCA-TGC-ANT-TEA-CTG-AC-3'

E20 5'-CAT-GCA-NTC-TEA-CTG-AC-3'

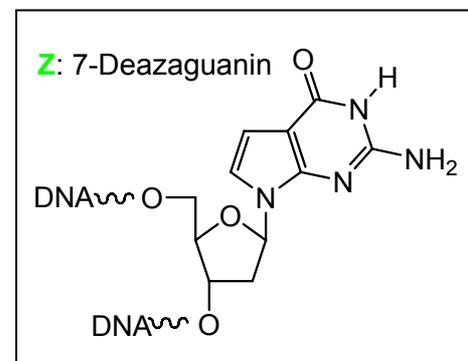


Ladungstransferduplexe (oxidativ)

E21 5'-TGC-ATG-CAZ-TEA-CTG-AC-3'

E22 5'-GCA-TGC-AZT-TEA-CTG-AC-3'

E23 5'-CAT-GCA-ZTC-TEA-CTG-AC-3'

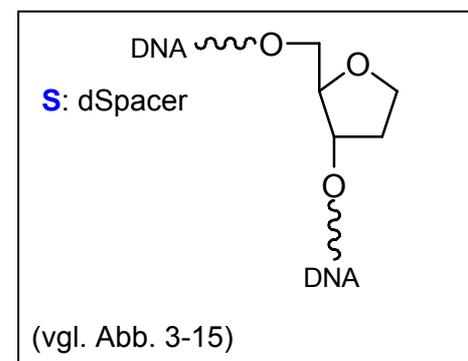


Gegenstränge zu E15-E23

C26 3'-ACG-TAC-GTC-AST-GAC-TG-5'

C27 3'-CGT-ACG-TCA-AST-GAC-TG-5'

C28 3'-GTA-CGT-CAG-AST-GAC-TG-5'



Nitroindol (N) stellt eine universelle Base dar, daher ist die Gegenbase beliebig wählbar.^[43, 44] Da Deazaguanin (Z) bevorzugt mit C paart, wurde es hier als Gegenbase zu Z eingesetzt. Um möglichst analoge Duplexe zu erhalten, wurde C auch als Gegenbase für N verwendet. Als Gegenbase des Ethidiums wird der *dSpacer* (S) verwendet, um eine optimale Interkalation des sterisch anspruchsvollen Ethidiumchromophors zu garantieren.^[18] Dies ist eine wichtige Bedingung für einen effizienten Ladungstransfer. Durch Absorptions- und CD-Messungen sowie Bestimmung der Schmelztemperaturen kann gezeigt werden, dass sich die Duplexe strukturell ähnlich verhalten. Die Absorptionsspektren aller Duplexe weisen das für interkaliertes Ethidium charakteristische Absorptionsmaximum bei $\lambda \sim 530$ nm auf (s. Abb. 3-7).^[18, 268-270]

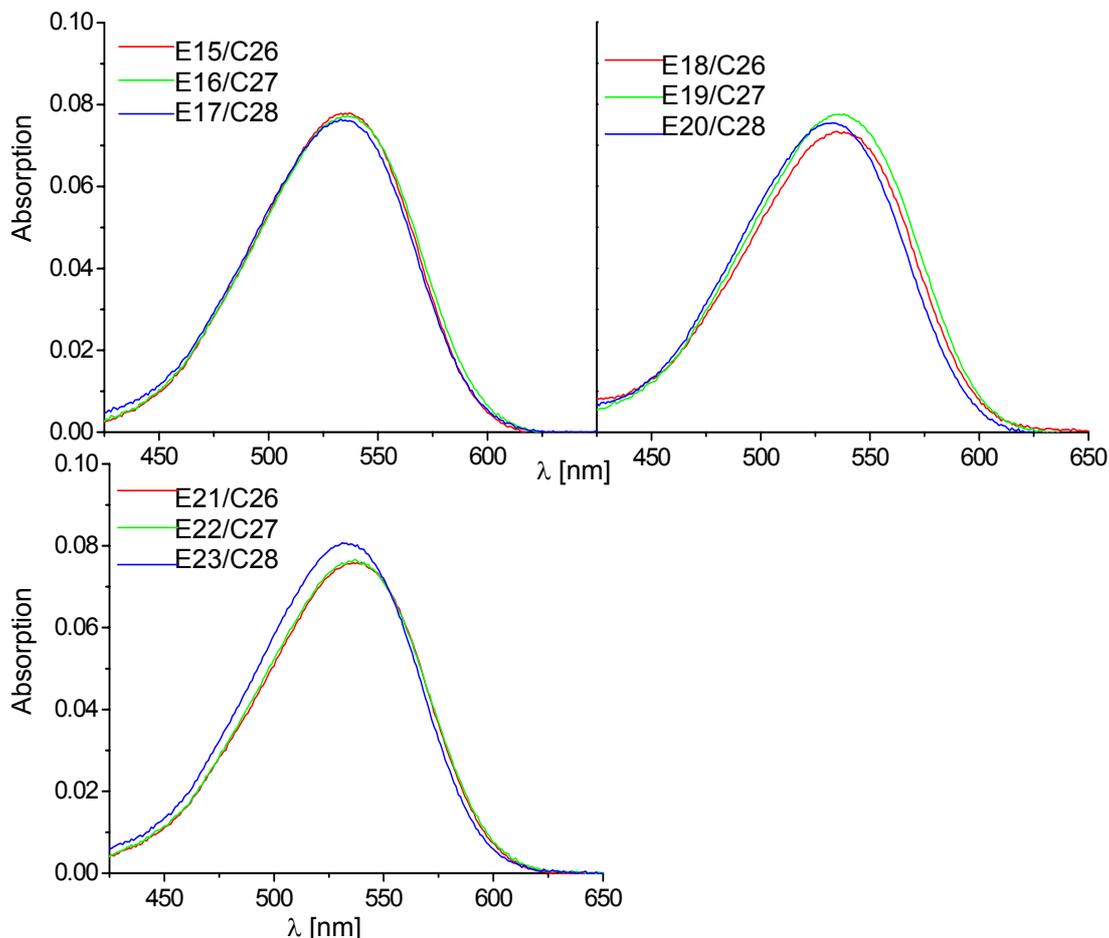


Abb. 3-7: Absorptionsspektren von DNA 12.5 μ M DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die CD-Spektren aller Duplexe zeigen, das für die B-DNA-Konformation typische Spektrum (s. Abb. 3-8). Zusätzlich zu den für die DNA charakteristischen Signalen ist auch hier, die für interkaliertes Ethidium typische, breite, schwach negative Bande zwischen 300 und 400 nm beobachtbar.^[271]

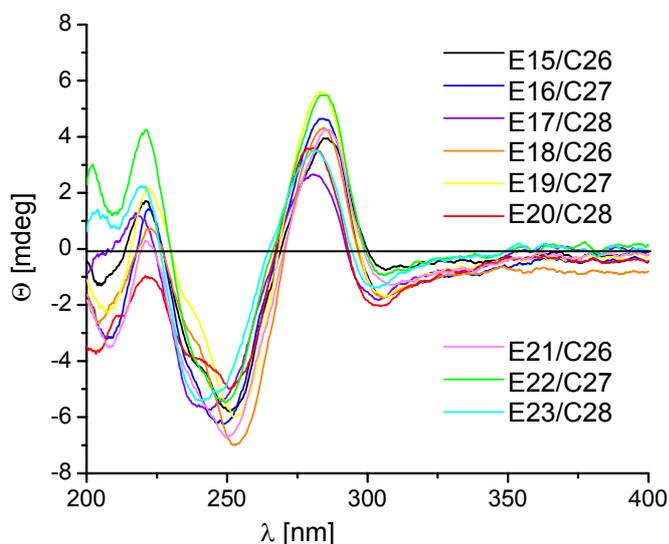


Abb. 3-8: CD-Spektren von 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die Duplexe **E15/C26-E17/C28** und **E21/C26-E23/C28** besitzen ähnliche Schmelztemperaturen im Bereich von 63-68°C. Die Schmelztemperaturen der Duplexe **E18/C26-E20/C28** liegen zwischen 55-59°C (s. Tab. 6.4 unter 6. Materialien und Methoden). Die Schmelzpunkterniedrigung dieser Duplexe ist auf die fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen des 5-Nitroindols mit der Gegenbase zurückzuführen. Es ist bekannt, dass 5-Nitroindol nur durch π - π -Wechselwirkungen des aromatischen Indolsystems mit den Nachbarbasen im Basenstapel zur Stabilisierung des Duplexes beitragen kann, da die Nitrogruppe ein sehr schwacher H-Brücken-Akzeptor ist.^[44] Dies führt zu einer Schmelzpunkterniedrigung gegenüber den unmodifizierten Duplexen, die in der Literatur beschrieben ist.^[44] Anhand der gezeigten strukturell ähnlichen DNA-Duplexe lässt sich direkt die Effizienz des oxidativen Lochtransfers und des reduktiven Elektronentransfers in den Donor-Akzeptor-Assays miteinander vergleichen.

Dazu wurden Fluoreszenzmessungen der Duplexe **E15/C26-E23/C28** durchgeführt. Die Duplexe **E15/C26-E17/C28** dienen als Kontrollduplexe (s. Abb. 3-9). Die Duplexe **E15/C26-E17/C28** ohne Ladungsakzeptor zeigen sehr ähnliche Fluoreszenzintensitäten, da hier kein Ladungstransfer stattfinden kann. Im Gegensatz dazu ist in den Duplexen **E18/C26-E20/C28** und **E21/C26-E23/C28** eine ähnlich starke Fluoreszenzlöschung zu beobachten, die mit zunehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor steigt (s. Abb. 3-10).

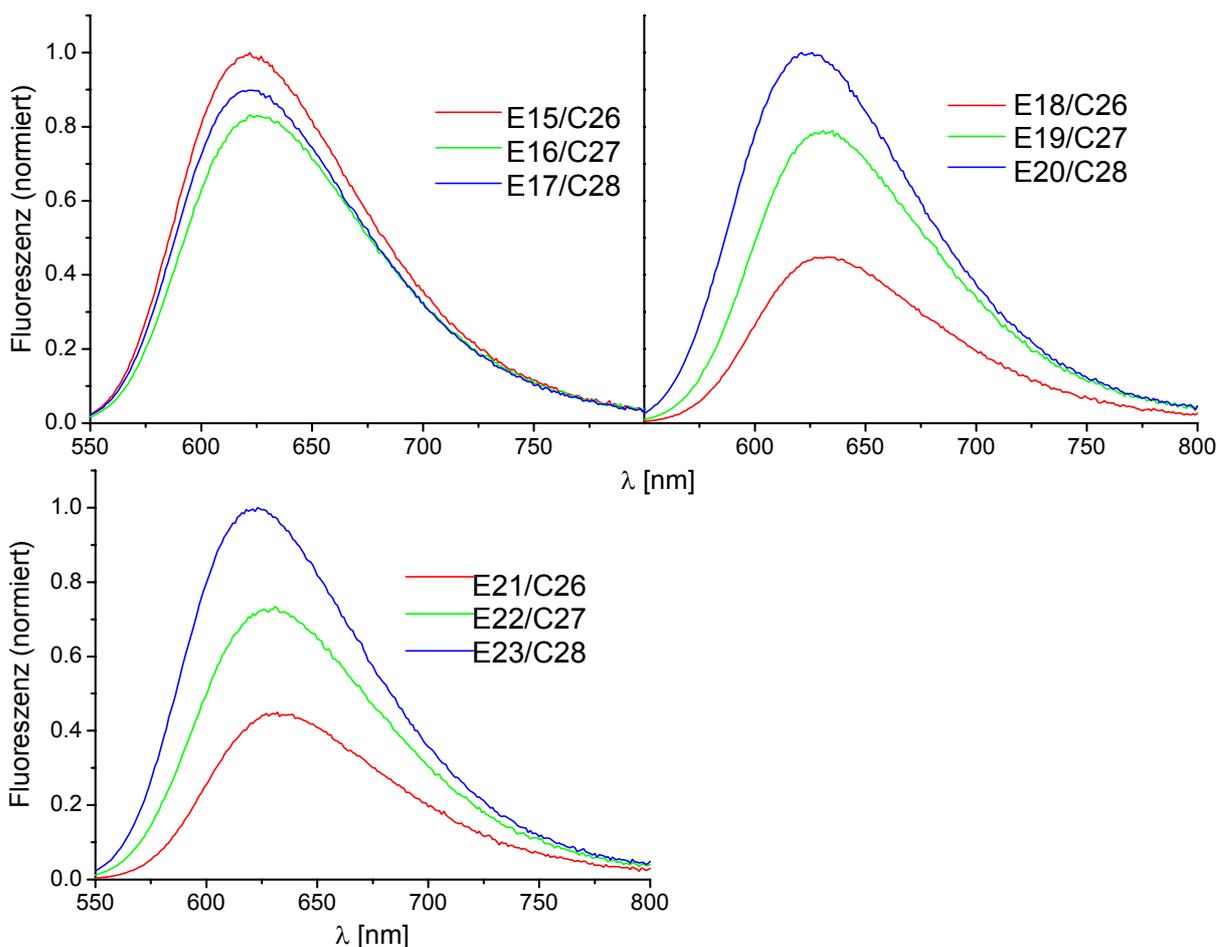


Abb. 3-9: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm) von DNA 12.5 μ M DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7).

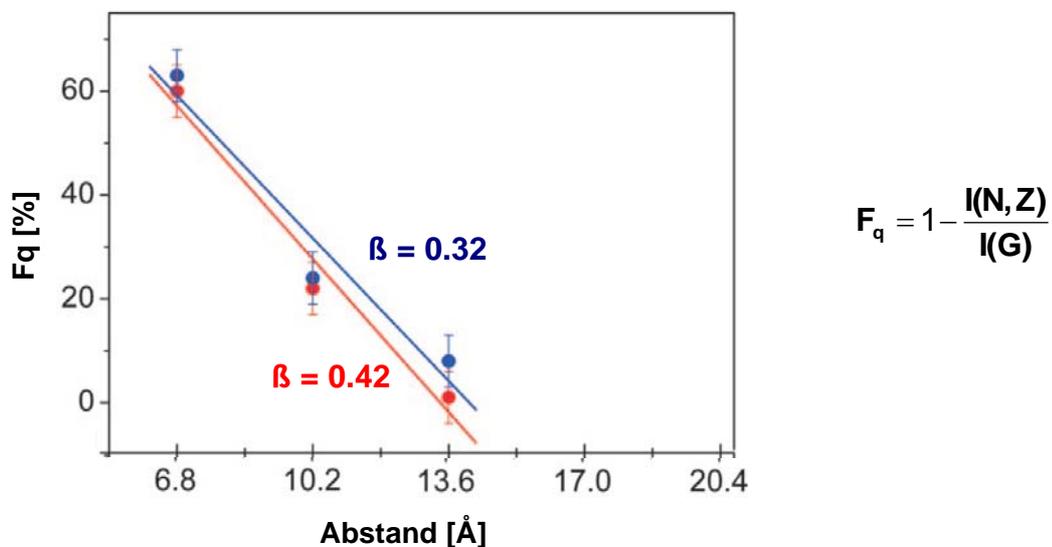


Abb. 3-10: Fluoreszenzlöschung F_q in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor in den DNA-Duplex-Sätzen **E18/C26-E20/C28** (—) und **E21/C26-E23/C28** (—), $\lambda_{exc} = 530 \text{ nm}$, $12.5 \mu\text{M}$ DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7). $I(\mathbf{N,Z})$: integrierte Fluoreszenzintensität der N- bzw. Z-Duplexe; $I(\mathbf{G})$: integrierte Fluoreszenzintensität der Kontrollduplexe.

Über eine Distanz von drei Basenpaaren sinkt die Fluoreszenzintensität auf unter 10 % für den oxidativen wie reduktiven Ladungstransfer ab. Diese Beobachtung ist mit der *Marcus-Theorie*, die den Ladungstransfer über den Superaustausch-Mechanismus beschreibt und typischerweise auf drei bis vier Basenpaare beschränkt ist, in Einklang. Der β -Wert für den oxidativen sowie reduktiven Ladungstransfer wurde bestimmt. Der β -Wert ist ein Parameter, der die Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers beschreibt. Beide β -Werte liegen mit 0.32 \AA^{-1} (für den reduktiven Ladungstransfer) und 0.42 \AA^{-1} (für den oxidativen Ladungstransfer) in einem ähnlichen Bereich. Für den Lochtransport durch DNA nach dem Super-Austausch-Mechanismus sind typische β -Werte 0.6 \AA^{-1} - 0.8 \AA^{-1} . Daher kann man in den beiden hier verwendeten Systemen einen Superaustausch annehmen.

3.2.2 Bestimmung der Reaktionsrate in den Systemen E-Z und E-N

Zeitaufgelöste Experimente zur Untersuchung des Ladungstransfers zwischen Ethidium und Deazaguanin wurden bereits 1999 von *Zewail et al.*^[29] am California Institute of Technology (Caltech) durchgeführt. In den dort verwendeten DNA-Duplexen (14-mere) ist das Ethidium über einen flexiblen Alkyllinker kovalent mit der 5'-Hydroxylgruppe endständig an die DNA geknüpft.^[22] In Abb. 3-11 und 3-12 sind die beiden unterschiedlichen Ethidium-Deazaguanin-Systeme gegenübergestellt.

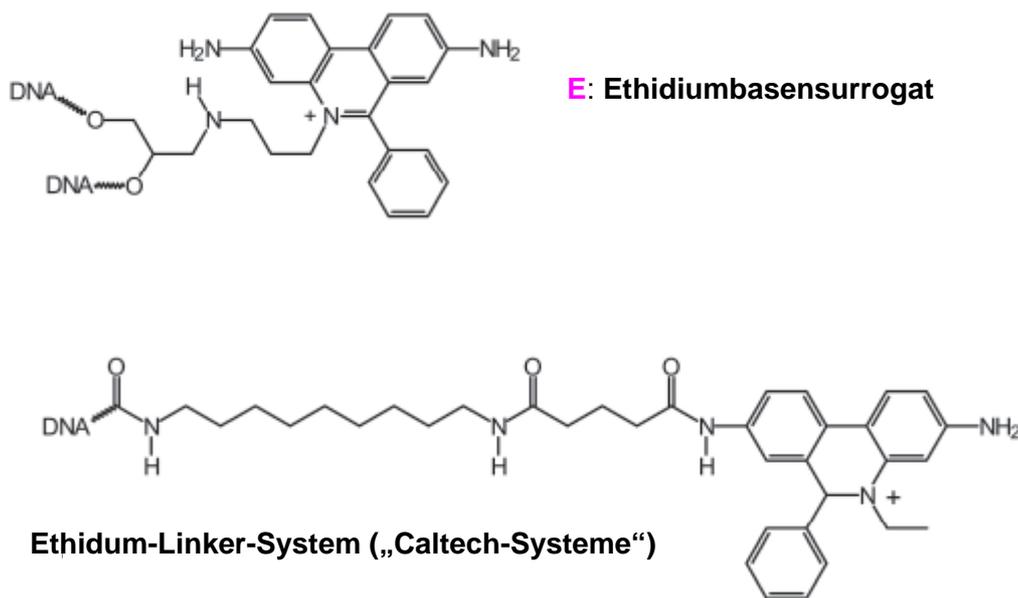


Abb. 3-11: Vergleich zwischen intern inkorporierten Ethidiumbasensurrogat **E** und endständig an die DNA über einen flexiblen Alkyllinker angeknüpftem Ethidium („Caltech-Systeme“).

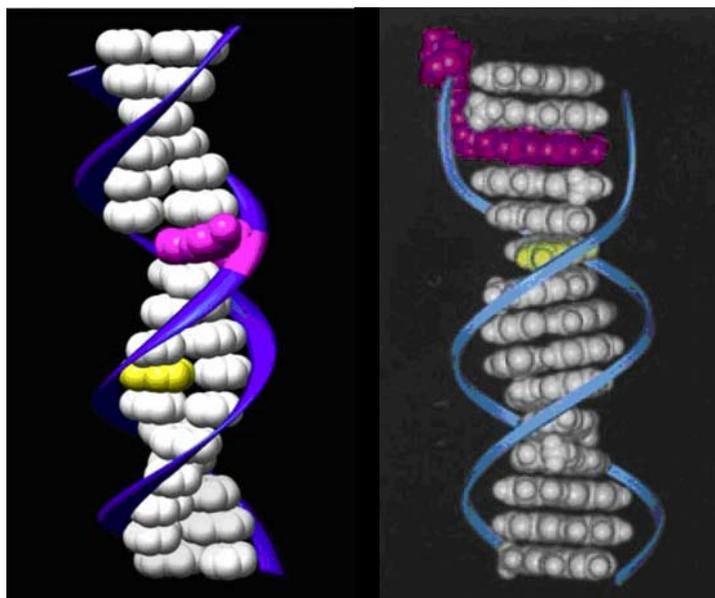


Abb. 3-12: Gegenüberstellung der Molekülmodelle eines DNA-Duplexes mit dem intern inkorporierten Ethidiumnukleotid (links)^[179, 272] und mit dem an der endständigen 5'-Hydroxygruppe angeknüpften Ethidium („Caltech System“).^[29]

Um die Ladungstransferraten für den oxidativen Lochtransfer im E-Z-System sowie für den reduktiven Elektronentransfer im E-N-System zu bestimmen, wurden zeitaufgelöste Messungen mittels femtosekundenaufgelöster Laserspektroskopie sowie Fluoreszenzlebensdauerbestimmung durchgeführt. Das Zerfallsverhalten des photoangeregten Ethidiums in den Duplexen **E15/C26**, **E18/C26** und **E21/C26** wurde untersucht (s. Abb. 3-13). In diesen Duplexen ist Ethidium durch ein Basenpaar von G, N bzw. Z getrennt.

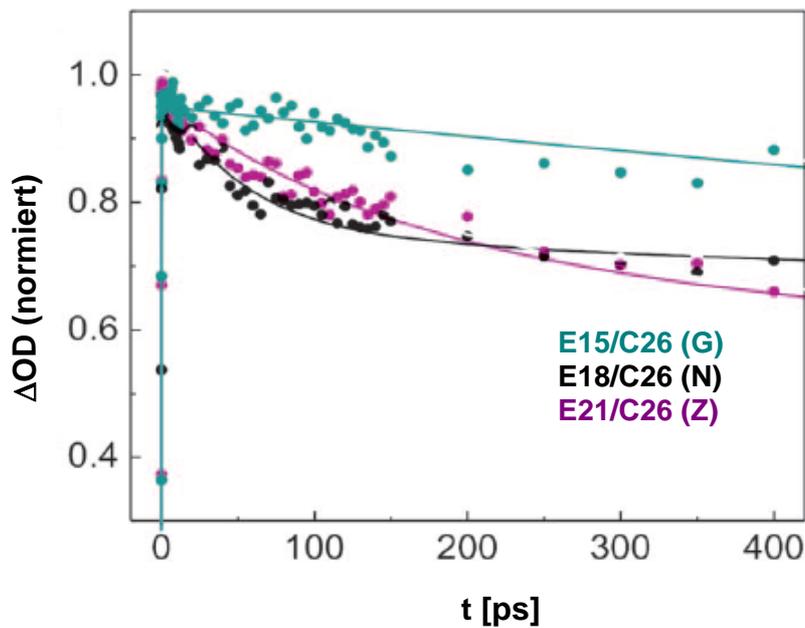


Abb. 3-13: Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie der DNA-Duplexe **E15/C26** (—), **E18/C26** (—) und **E21/C26** (—), $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$, $600 \mu\text{M}$ DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7), 250 mM NaCl .

Im Kontrollduplex **E15/C26** ist, wie erwartet aufgrund des fehlenden Ladungstransfers kein signifikanter Zerfall auf kurzer Zeitskala zu beobachten. Bei dem Duplex **E18/C26** lässt sich aus der Zerfallskurve eine Zeitkomponente von 50 ps (Amplitude 22%) und für Duplex **E21/C26** eine Zeitkomponente von 150 ps (Amplitude 27%) abschätzen. Die Amplituden der Zeitkomponenten repräsentieren den Teil der reaktiven Moleküle mit bereits optimaler Basenstapelung im Grundzustand. In allen Kontrollduplexen sowie in den Ladungstransferduplexen mit mehr als einem Basenpaar Abstand zwischen E und Z bzw. N konnte keine Zeitkomponente im ps-Bereich ermittelt werden. In diesen Ladungstransferduplexen erfolgt der Ladungstransfer folglich im ns-Bereich. Die Lebenszeiten des photoangeregten Ethidiums sind im Bereich von $2\text{-}25 \text{ ns}$, abhängig von der mikroskopischen Umgebung, z. B. typischerweise Wassermoleküle. ^[270]

Die Ladungstransferraten für **E19/C27-E20/C28** und **E22/C27-E23/C28** wurden mit Hilfe der Fluoreszenzlebenszeiten des photoangeregten Ethidiums im ns-Bereich ermittelt. Aufgrund des multiexponentiellen Zerfallsverhaltens ist nur eine Bestimmung der Größenordnung der Ladungstransferrate möglich. Die Ladungstransferrate lässt sich aus den mittleren Lebenszeiten des Donor-Akzeptor-Komplexes sowie der Referenzverbindung ohne Ladungsakzeptor bestimmen (s. unter 2, Glg. 2.2). Es ergeben sich mittlere Lebenszeiten von 12.8 ns für **E19/C27** und 14.5 ns für **E22/C27**. In beiden Duplexen sind der Donor und Akzeptor zwei Basenpaare voneinander entfernt. In dem entsprechenden Kontrollduplex **E16/C27** beträgt die mittlere Lebensdauer 15.5 ns. Die kürzeren Lebensdauern des photoangeregten Ethidiums in den Duplexen **E19/C27** und **E22/C27** belegen den Ladungstransferprozess. Befindet sich nur ein Basenpaar zwischen Donor und Akzeptor erhält man noch kürzere Lebenszeiten für die Ladungstransferduplexe. Für **E18/C26** ergibt sich ein Wert von 12.1 ns und für **E21/C26** 13.4 ns. Für den entsprechenden Referenzduplex **E15/C26** erhält man 16.6 ns. Dies steht in Einklang mit einem effizienteren Ladungstransfer und einer stärkeren Fluoreszenzlöschung, wenn der Abstand zwischen Ladungsdonor und Akzeptor ein Basenpaar nicht überschreitet. Die Lebenszeiten der Duplexe **E20/C28** ($\tau = 15.7$ ns) und **E23/C28** ($\tau = 16.3$ ns) sind nur geringfügig kleiner als beim korrespondierenden Referenzduplex **E17/C28** ($\tau = 16.7$ ns). Dies spiegelt die beobachtete geringfügige Fluoreszenzlöschung in diesen Ladungstransferduplexen wieder. Besonders auffallend ist, dass der reduktive sowie oxidative Ladungstransfer die gleiche Distanzabhängigkeit (ähnliche β -Werte) und ähnliche Fluoreszenzlebenszeiten des photoangeregten Ethidiums aufweisen.

Die Ladungstransferraten der Duplexe **E18/C26-E20/C28** und **E21/C26-E23/C28** unterscheiden sich dramatisch von denen des „Caltech-Systems“, wenn die Distanz mehr als ein Basenpaar beträgt (s. Abb. 3-14). Erstere sind um das vier- bis fünffache kleiner.

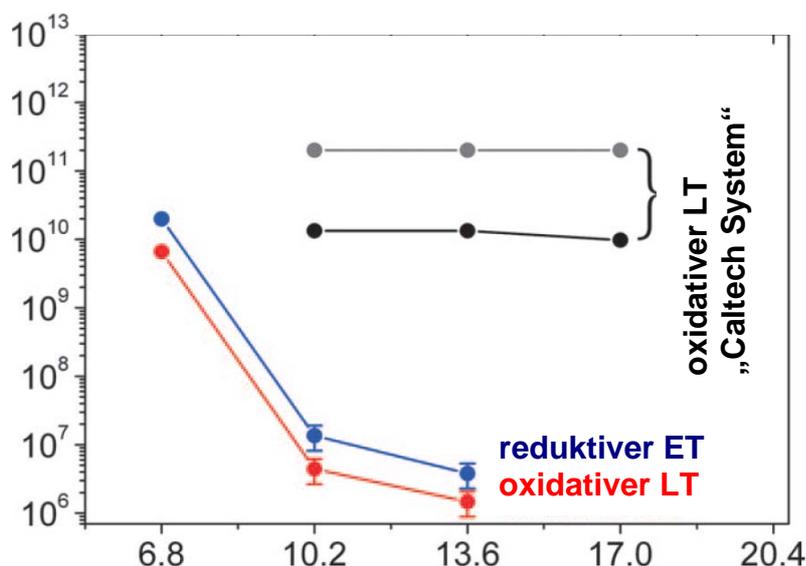


Abb. 3-14: Ladungstransferraten k_{CT} in den DNA-Duplex-Sätzen **E18/C26-E20/C28** (—) und **E21/C26-E23/C28** (—), $\lambda_{exc} = 530$ nm, $12.5 \mu M$ DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7). Die beiden dargestellten Ladungstransferraten für den oxidativen Lochtransfer (—), (—) sind der Literatur entnommen.^[29]

Durch zeitaufgelöste Anisotropiemessungen konnte gezeigt werden, dass die Interkalation des Ethidiums im „Caltech-System“ an einer bis auf ein Basenpaar genau definierten Stelle erfolgt. Durch die flexible Alkylkette des Linkers bleibt die Beweglichkeit des Ethidiums im Basenstapel erhalten (s. Abb. 3-11).^[29] Hier wurde keine Abhängigkeit der Ladungstransferrate von der Distanz zwischen dem Ethidium und dem Lochakzeptor Deazaguanin beobachtet. In den durchgeführten zeitaufgelösten Messungen der transienten Absorption sowie der Fluoreszenz des photoangeregten Ethidiums ergab sich ein biexponentielles Zerfallsverhalten. Die Abklingkurve wird von zwei Zeitkonstanten, ~ 5 ps ($k_{CT} \sim 2 \cdot 10^{11} s^{-1}$) und ~ 75 ps ($k_{CT} \sim 1 \cdot 10^{10} s^{-1}$)^[29] bestimmt, die beide keinerlei Distanzabhängigkeit aufweisen (s. Abb. 3-14). Aus zeitaufgelösten Experimenten ist bekannt, dass die Orientierungsrelaxation von freiem Ethidium in Wasser mit einer Zeitkonstante von ca. 70ps verläuft und die Fluoreszenzlöschung von E in bimolekularen Komplexen im

gleichen Zeitraum erfolgt. Somit scheint die Umorientierung des Ethidiums, die für den nachfolgenden Ladungstransfer erforderlich ist, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein. Aufgrund dieser Arbeiten kann man davon ausgehen, dass das Ethidium vor der Ladungsübertragung zwischen E und Z eine Umorientierung erfährt, die ratenlimitierend ist. Der Ethidiumbaustein scheint trotz seiner Interkalation in den Basenstapel über bestimmte Freiheitsgrade zu verfügen, die besetzt werden können. Die Lebensdauer von 5 ps wird denjenigen Molekülen zugeschrieben, in denen das Ethidium bereits im Grundzustand optimal mit den Nachbarbasen wechselwirkt und keine Umorientierung für einen effizienten Ladungstransfer nötig ist.^[29]

Basierend auf diesen älteren Ergebnissen am Caltech, können die neuen Ergebnisse wie folgt interpretiert werden: Die starke Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers bei Verwendung des rigiden Ethidiumnukleotids ist ein Indiz für den Einfluss von Moleküldynamik und Kernbewegungen auf die Effizienz des Ladungstransfers. Die Tatsache, dass der oxidative Lochtransfer sowie der reduktive Elektronentransfer über ein Basenpaar im ps-Bereich ablaufen zeigt, dass das Ethidiumchromophor elektronisch stark mit dem Basenstapel gekoppelt ist. Die Amplitude dieser schnellen Zeitkomponente entspricht dem Anteil an Molekülen die im angeregten Zustand keinerlei Umorientierung eingehen müssen, sondern unmittelbar am Ladungstransfer teilnehmen. Ein effizienter Ladungstransfer über große Distanzen ist aufgrund des rigiden Ethidiumnukleotids stark eingeschränkt bzw. nicht möglich, da das ein Ausschöpfen der konformationellen Freiheitsgrade voraussetzen würde. Diese Beziehung zwischen Ladungstransfer und Moleküldynamik wird als mechanistisches Konzept verstanden und als „*gating effect*“ bezeichnet.^[29, 69, 130]

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das E/Z- und E/N-Donor-Akzeptor-System erlaubt zum ersten Mal den direkten Vergleich zwischen reduktivem und oxidativem Ladungstransfer in einem strukturell sehr ähnlichen Assay. Durch zeitaufgelöste Messungen konnte gezeigt werden, dass der Ladungstransfer vom Ethidiumnukleotid zum Ladungsakzeptor bei einer Distanz von zwei oder mehr Basenpaaren drastisch abnimmt vor allem im Vergleich zum „Caltech System“. Dies ist der Fall sowohl für den oxidativen Lochtransfer als auch für den reduktiven Elektronentransfer. Durch Inkorporation des rigiden Ethidiumnukleosids wird die konformationelle Flexibilität des Ethidiums offenbar so stark eingeschränkt, dass die elektronisch notwendige Umorientierung des photoangeregten Ethidiums kaum bzw. nicht möglich ist („*gating effect*“). Ein Ladungstransfer über größere Distanzen kann somit nicht effizient und schnell stattfinden. Diese Ergebnisse unterstreichen den bedeutenden Einfluss der DNA-Dynamik auf die Distanzabhängigkeit und Geschwindigkeit des Ladungstransfers.

3.3 Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer im System Ethidium-Deazaguanin

Aufgrund der relativen Redoxpotentiale ist Ethidium nicht in der Lage die DNA zu oxidieren, um einen Ladungstransferprozess auszulösen. Wie bereits erläutert (s. unter 3.2), eignet sich für den oxidativen Lochtransfer 7-Deazaguanin (Z) als Ladungsakzeptor, da es ein geringeres Oxidationspotential ($E^0(Z^{\bullet+}/Z) = 1.0 \text{ V}$)^[30] als G aufweist. Mit einem Oxidationspotential von $E^0(E^{\bullet+}/E^{\bullet}) = 1.2 \text{ V}$ ^[30] ergibt sich aufgrund der *Rehm-Weller-Gleichung*, mit einer Singulett-Energie für die Photoanregung des Ethidiums mit 2.2 V ^[30], für den Gesamtprozess eine Triebkraft ΔG von ca. -0.2 eV . Es ist bekannt, dass Z die Fluoreszenz von photoangeregtem Ethidium^[267] aufgrund eines Ladungstransferprozesses löscht.^[20-30]

3.3.1 Einfluß von Basenfehlpaarungen auf den Lochtransfer

Durch Kombination von Ethidium als Fluoreszenzsonde und Deazaguanin (Z) als Ladungsakzeptor soll die Detektion von Basenfehlpaarungen und abasischen Stellen ermöglicht werden. Die sog. abasischen Stellen gehören zu den häufigsten spontanen DNA-Schäden. Das Ethidiumchromophor wird nach den zuvor beschriebenen Methoden in die DNA eingebaut.^[18, 19] Es wurden die folgenden vier Sätze von Duplexen, **DNA1-XY** bis **DNA4-XY**, synthetisiert, die jeweils zwei Basenpaare zwischen E und G (Kontrollduplexe) bzw. E und Z (Ladungstransferduplexe) enthalten (s. Tab. 3-1 bis 3-4). In den Duplex-Sätzen **DNA1-XY** und **DNA2-XY** wird das unmittelbar dem Ethidiumchromophor benachbarte Basenpaar variiert. In den Duplex-Sätzen **DNA3-XY** und **DNA4-XY** wird das Basenpaar, das sich direkt neben G bzw. Z befindet, verändert. Als Gegenbase des Ethidiums, das sich wie eine universelle Base verhält, wird willkürlich C gewählt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Gegenbase nur geringfügigen Einfluss auf die Interkalation des Ethidiums hat.^[19]

Der sog. *dSpacer* (S) ist das chemisch stabile Analogon der abasischen Stelle. Eine abasische Stelle entsteht z. B. durch Depurinierung von Oligonukleotiden. Das dabei gebildete Halbacetal steht im Gleichgewicht mit der reaktiven offenkettigen Aldehydform (s. Abb. 3-15). Der *dSpacer* zeigt keine aldehydspezifische

Reaktivität und ist daher zum Einbau in DNA geeignet. Das Phosphoramidit des *dSpacers* ist kommerziell erhältlich.

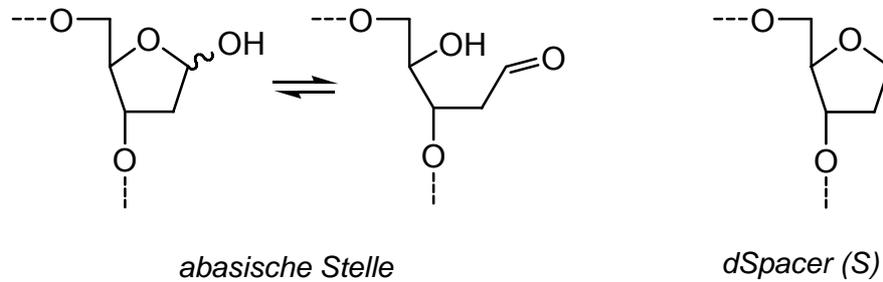


Abb. 3-15: *dSpacer* als Analogon der abasischen Stelle.

Kontrollduplexe (DNA1-XY)

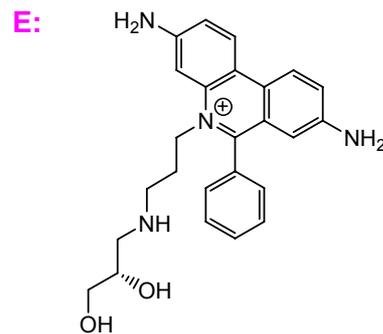
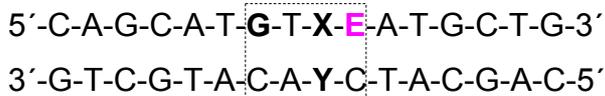


Tabelle 3-1: DNA1-XY (Kontrollduplexe)

XY	X = A	X = C	X = G	X = T
Y = A	E1/C16	E2/C16	E3/C16	E4/C16
Y = C	E1/C17	E2/C17	E3/C17	E4/C17
Y = G	E1/C18	E2/C18	E3/C18	E4/C18
Y = T	E1/C19	E2/C19	E3/C19	E4/C19
Y = S	E1/C20	E2/C20	E3/C20	E4/C20

Ladungstransferduplexe (DNA2-XY)

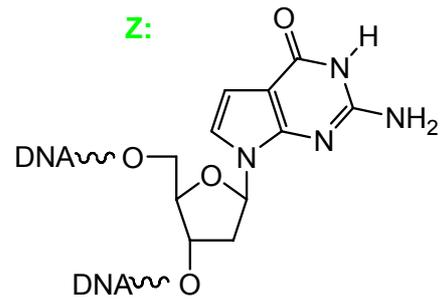
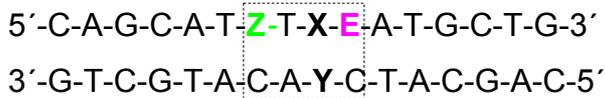
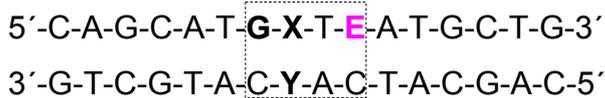


Tabelle 3-2: DNA2-XY (Ladungstransferduplexe).

XY	X = A	X = C	X = G	X = T
Y = A	E5/C16	E6/C16	E7/C16	E8/C16
Y = C	E5/C17	E6/C17	E7/C17	E8/C17
Y = G	E5/C18	E6/C18	E7/C18	E8/C18
Y = T	E5/C19	E6/C19	E7/C19	E8/C19
Y = S	E5/C20	E6/C20	E7/C20	E8/C20

Kontrollduplexe (DNA3-XY)

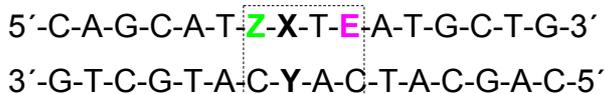


E: Ethidium

Z: 7-Deazaguanin

Tabelle 3-3: DNA3-XY (Kontrollduplexe)

XY	X = A	X = C	X = G	X = T
Y = A	E9/C16	E10/C16	E11/C16	E4/C16
Y = C	E9/C22	E10/C22	E11/C22	E4/C22
Y = G	E9/C23	E10/C23	E11/C23	E4/C23
Y = T	E9/C24	E10/C24	E11/C24	E4/C24
Y = S	E9/C25	E10/C25	E11/C25	E4/C25

Ladungstransferduplexe (DNA4-XY)**Tabelle 3-4: DNA4-XY** (Ladungstransferduplexe).

XY	X = A	X = C	X = G	X = T
Y = A	E12/C16	E13/C16	E14/C16	E8/C16
Y = C	E12/C22	E13/C22	E14/C22	E8/C22
Y = G	E12/C23	E13/C23	E14/C23	E8/C23
Y = T	E12/C24	E13/C24	E14/C24	E8/C24
Y = S	E12/C25	E13/C25	E14/C25	E8/C25

Die oben gezeigten Kontrollduplexe **DNA3-XY** wurden von einer Kollegin synthetisiert, charakterisiert, spektroskopisch untersucht und die Daten zur Verfügung gestellt.^[33]

Wie in Kapitel 3.2 gezeigt wurde, findet in den Kontrollduplexen **DNA1-XY** und **DNA3-XY** kein Ladungstransfer statt, es wird keine Fluoreszenzlöschung beobachtet. In den Duplexen **DNA2-XY** und **DNA4-XY** findet ein Ladungstransfer statt. In den Duplexen, die eine Basenfehlpaarung oder abasische Stelle aufweisen, wird aufgrund des ineffizienteren Ladungstransfers ein Fluoreszenzanstieg erwartet. In zahlreichen Studien ist gezeigt worden dass Basenfehlpaarungen oder abasische Stellen den Ladungstransfer behindern.^[92, 125, 273, 274] Allerdings ist in früheren Experimenten in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht et al.* für den Duplexsatz **DNA4-XY** beobachtet worden, dass überraschenderweise der gegenteilige Effekt auftrat. In den fehl gepaarten Duplexen stieg die Fluoreszenz im Vergleich zu den richtig gepaarten Duplexen an. Allerdings wurde hier das Ethidiumnukleosid als Racemat eingesetzt. Dabei war nicht in allen Fällen eine eindeutige Diskriminierung zwischen fehl und richtig gepaarten Duplexen möglich.^[33]

In den Absorptionsspektren aller Duplexe lässt sich ein Absorptionsmaximum bei $\lambda \sim 530$ nm beobachten, was charakteristisch für interkaliertes Ethidium ist.^[18, 268-270] Dies ist exemplarisch für **DNA2-CY** und **DNA4-CY** dargestellt (s. Abb. 3-16). Im Gegensatz dazu besitzt „freies“ Ethidium in wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum bei $\lambda \sim 480$ nm.^[275]

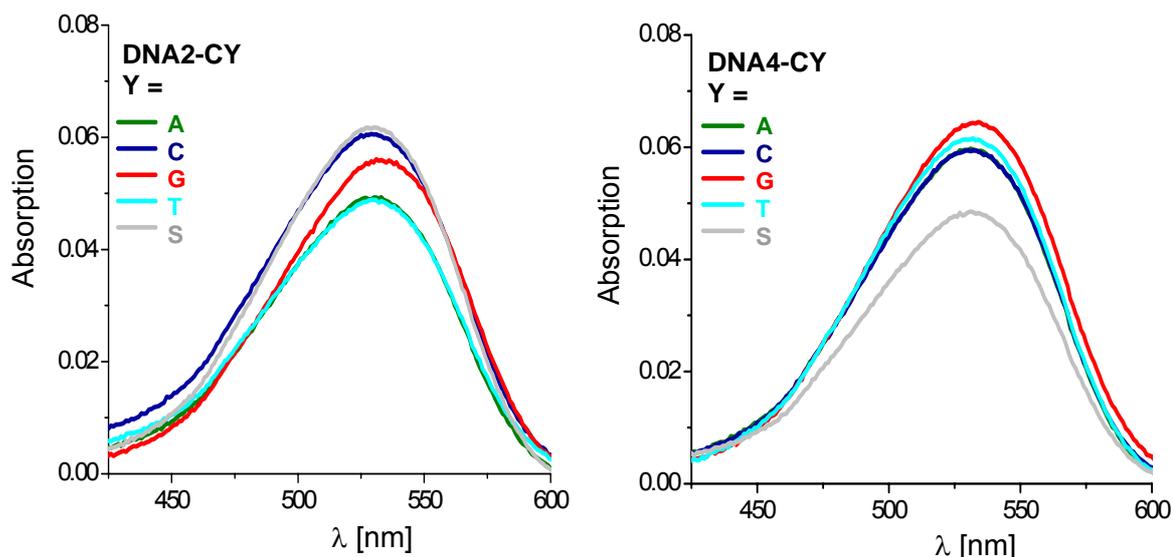


Abb. 3-16: Absorptionsspektren von 12.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Um den Einfluss von Basenfehlpaarungen auf den Ladungstransfer zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren der Duplexe **DNA2-XY** und **DNA4-XY** gemessen. Bei Anregung bei $\lambda = 530$ nm zeigen alle Duplexe ein Emissionsmaximum mit $\lambda \sim 628$ nm, was typisch für interkaliertes Ethidium ist (s. Abb. 3-17 bis 3-20).^[268-270] „Freies“ Ethidium in Wasser besitzt im Gegensatz dazu ein Emissionsmaximum bei $\lambda \sim 635$ nm und die Fluoreszenz ist durch Protonierung des angeregten Zustand deutlich gelöscht.^[275] Ähnliches Verhalten ergibt sich auch für ethidiummodifizierte Einzelstränge. Hier ist eine deutliche Fluoreszenzlöschung zu beobachten.^[18] Dies ist für die Einzelstränge **ss-DNA4-X** und die richtig gepaarten korrespondierenden Duplexe **DNA4-XY** exemplarisch dargestellt (s. Abb. 3-17).

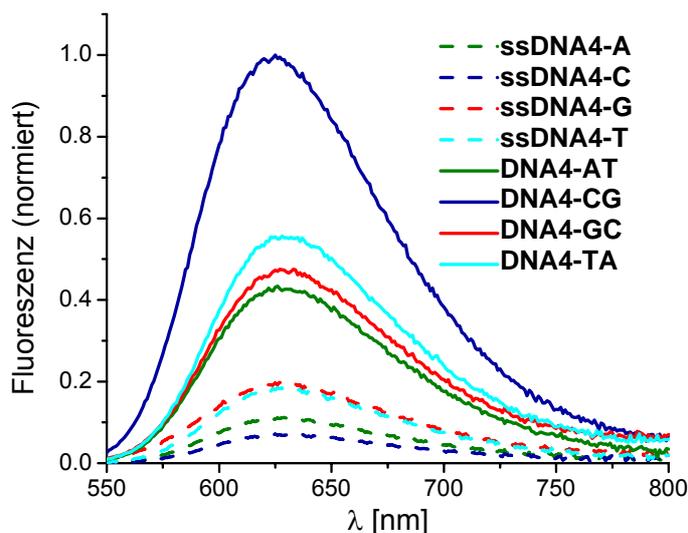


Abb. 3-17: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$) von **ssDNA4-X** und den korrespondierenden „matched“ Duplexen **DNA4-XY**, $12.5 \mu\text{M}$ DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7).

Jeweils die fünf Duplexe der DNA-Sätze **DNA1-XY** und **DNA3-XY** weisen innerhalb des experimentellen Fehlers gleiche Fluoreszenzintensitäten auf (s. Abb. 3-18, 3-19 und 3-20). Ist hingegen der Ladungsakzeptor Z im Duplex vorhanden, wird die Emission des angeregten Ethidiumchromophors deutlich gelöscht. In den richtig gepaarten Duplexen **DNA2-XY** und **DNA4-XY** (mit XY = AT, CG, GC, oder TA) ist die Fluoreszenzintensität gegenüber den Kontrollduplexen merklich erniedrigt (s. Abb. 3-18, 3-19 und 3-20). Die unterschiedlich starke Fluoreszenzlöschung kann mit der variierenden Effizienz des Ladungstransfers begründet werden. Bemerkenswerterweise zeigen die fehl gepaarten oder mit einer abasischen Stelle versehenen Duplexe eine stärkere Fluoreszenzlöschung als die richtig gepaarten Duplexe (s. Abb. 3-18, 3-19 und 3-20).

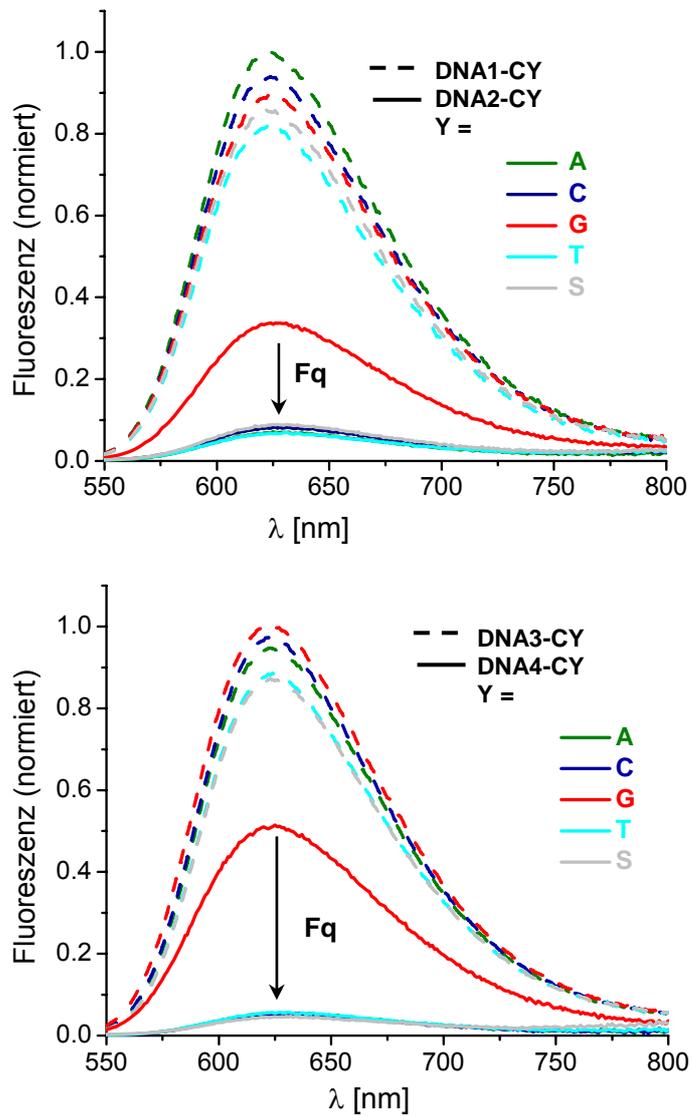


Abb. 3-18: Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 530 \text{ nm}$) von **DNA1-CY**, **DNA2-CY** und **DNA3-CY**, **DNA4-CY**, $12.5 \mu\text{M}$ DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7).

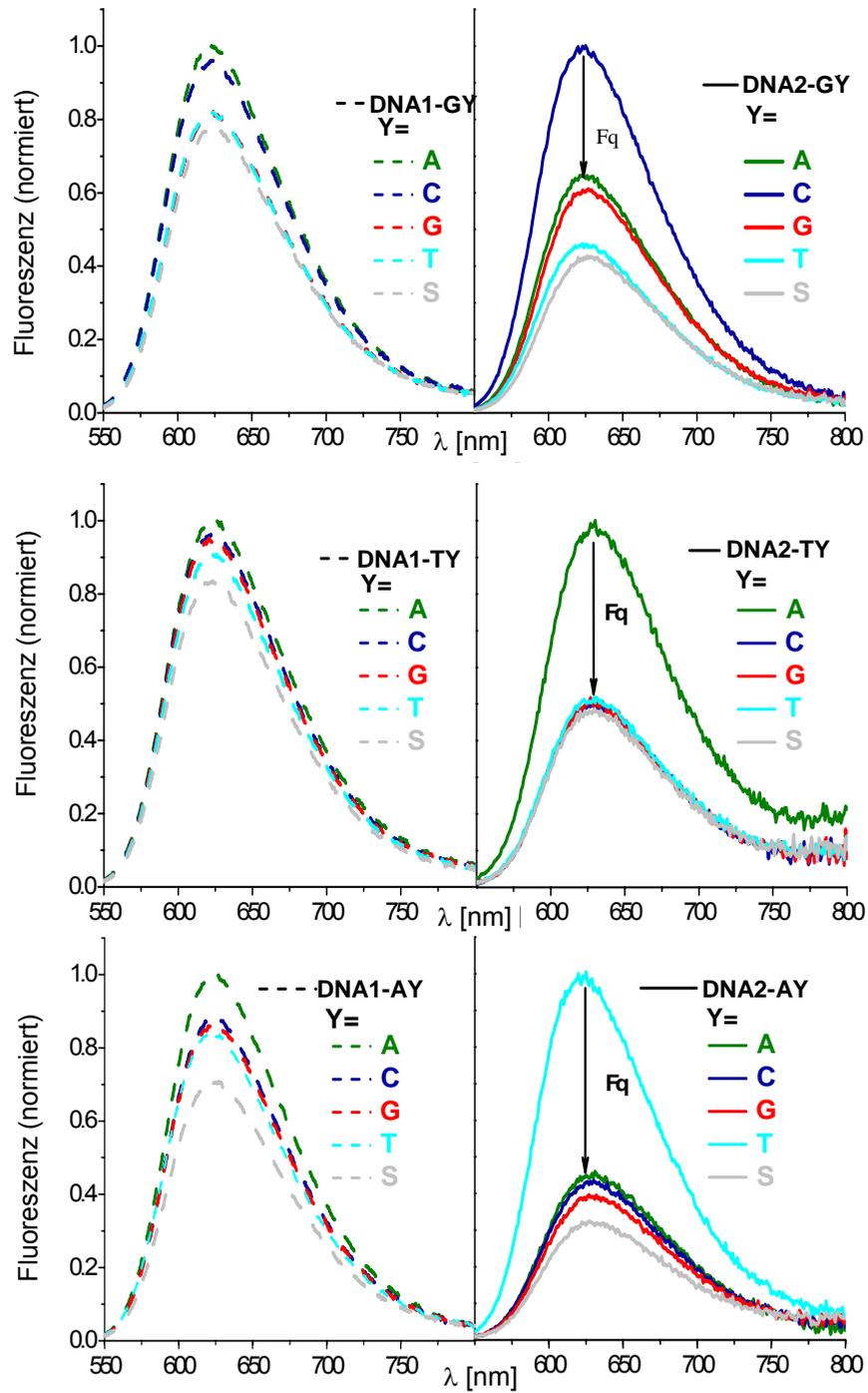


Abb. 3-19: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$) von **DNA1-XY**, **DNA2-XY**, $12.5 \mu\text{M}$ DNA, in 10 mM NaPi (pH 7).

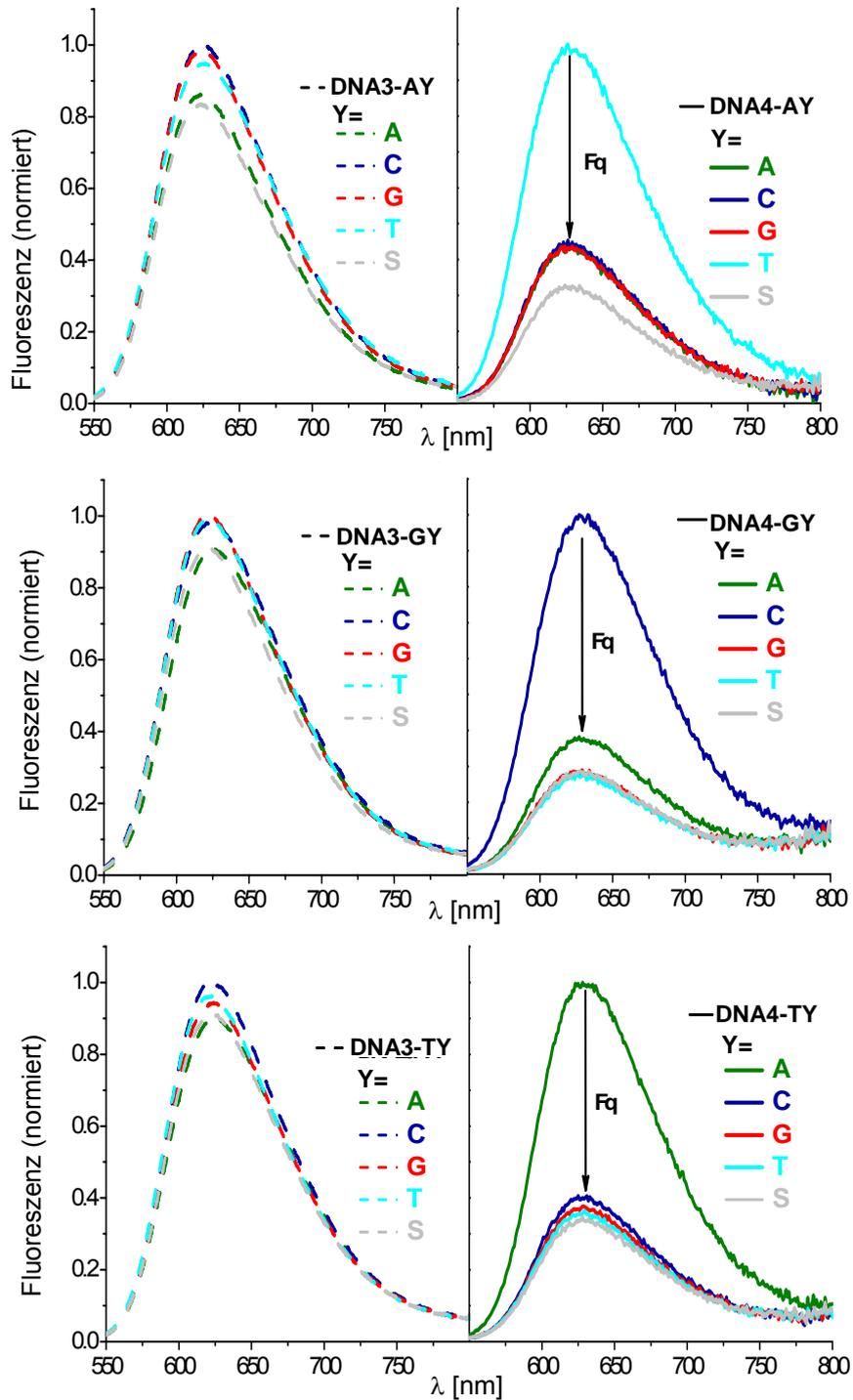


Abb. 3-20: Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 530 \text{ nm}$) von **DNA3-XY**, **DNA4-XY**, $12.5\mu\text{M}$ DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7).

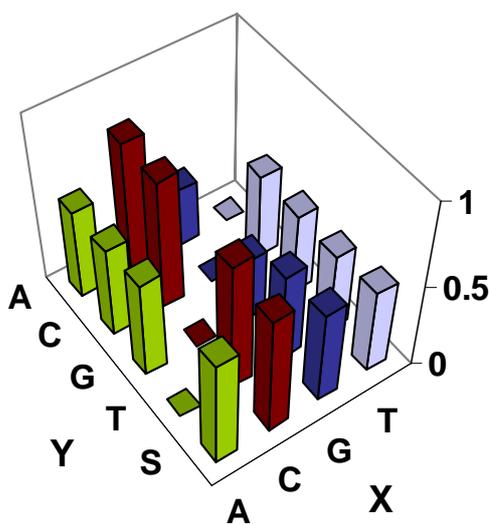
Es lässt sich feststellen, dass die Fluoreszenz am effizientesten gelöscht wird, wenn sowohl Z als Ladungsakzeptor zur Verfügung steht als auch sich eine Basenfehlpaarung oder eine abasische Stelle zwischen Ladungsdonor E und Z vorhanden ist. Dieses Phänomen ist in beiden Sätzen von Duplexen **DNA2-XY** und **DNA4-XY** zu beobachten. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen (s. Abb. 3-18, 3-19 und 3-20) können durch Berechnung von F_q (*Fraction quenched*) in Abhängigkeit der Art der Basenfehlpaarungen ($Y = A, C, G, T, S$; s. Tab. 3-5) graphisch zusammengefasst werden (s. Abb. 3-21). Der F_q -Wert gibt den Anteil der Fluoreszenzlöschung der fehl gepaarten Duplexe im Verhältnis zu den richtig gepaarten Duplexen wieder. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten innerhalb der beiden Duplexsätze **DNA2-XY** und **DNA4-XY** sind auf verschiedenen effiziente Ladungstransfervorgänge zurückzuführen und nicht allein auf strukturelle Unterschiede wie z. B. vollständige und partielle Interkalation des Ethidiumchromophors. Die gleichbleibend hohe Fluoreszenzintensität der Kontrollduplexe, unabhängig davon ob eine Basenfehlpaarung vorliegt oder nicht, zeigt, dass die diese Fluoreszenzlöschung allein durch den Ladungstransfer zu erklären ist.

Tabelle 3-5: Fraction quenched (**F_q**) der *mismatch*-Duplexe **DNA1b-XY** und **DNA2b-XY** im Vergleich zu den korrespondierenden richtig gepaarten Duplexen.

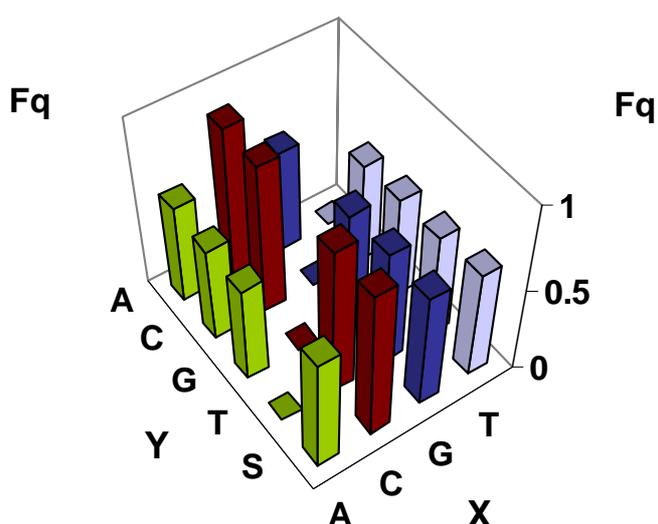
$$F_q = 1 - \frac{I(\text{mismatch})}{I(\text{match})}$$

I = integrierte Fluoreszenzintensität

DNA	Y = A	Y = C	Y = G	Y = T	Y = S
■ DNA1b-AY	0.53	0.54	0.58	–	0.64
■ DNA1b-CY	0.78	0.78	–	0.77	0.71
■ DNA1b-GY	0.35	–	0.38	0.53	0.56
■ DNA1b-TY	–	0.50	0.49	0.48	0.51
■ DNA2b-AY	0.58	0.56	0.57	–	0.67
■ DNA2b-CY	0.89	0.89	–	0.88	0.88
■ DNA2b-GY	0.60	–	0.68	0.69	0.68
■ DNA2b-TY	–	0.59	0.61	0.62	0.64



DNA2-XY



DNA4-XY

Abb. 3-21: F_q in Abhängigkeit der Basenfehlpaarungen für **DNA1b-XY** und **DNA2b-XY**.

Um eine von der B-DNA signifikant abweichende DNA-Konformation der fehl gepaarten Duplexe ausschließen zu können, wurden die Schmelzpunkte und die CD-Spektren aller Duplexe aufgenommen. Die Schmelzpunkte liegen alle in einem Bereich von 70-79°C (s. Tab. 6.4 unter 6. Materialien und Methoden). Dabei ergibt sich kein Hinweis auf Basenfehlpaarungen oder abasische Stellen in den Duplexe. Die CD-Spektren aller Kontroll- sowie Ladungstransferduplexe zeigen, den für die B-DNA-Konformation typischen Verlauf. Stellvertretend ist das hier für den DNA-Duplex-Satz **DNA4-CY** dargestellt (s. Abb. 3-22). Zusätzlich zu den für die DNA charakteristischen Signalen ist zwischen 300 und 400 nm eine breite, schwach negative Bande beobachtbar, die für interkaliertes Ethidium kennzeichnend ist.^[271]

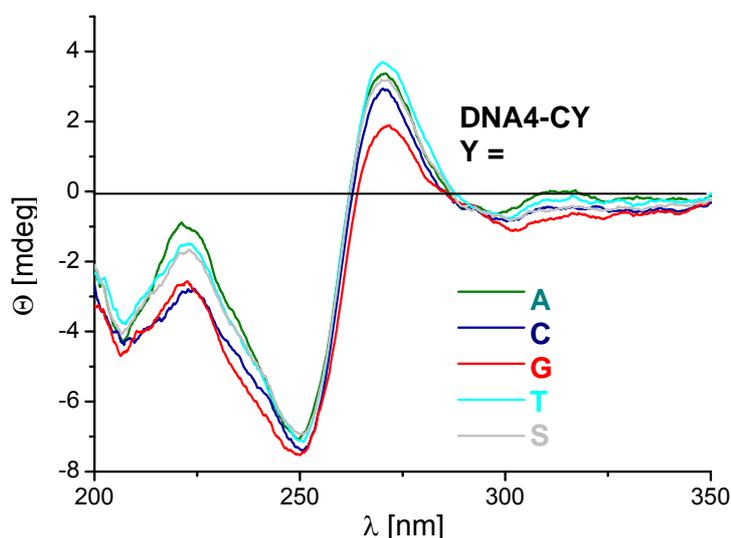


Abb. 3-22: CD-Spektren von 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Interessanterweise funktioniert das Assay besser, wenn sich die Basenfehlpaarung im Abstand von zwei Basenpaaren (**DNA4-XY**) vom Ethidium befindet (s. Tab. 3-5 und Abb. 3-21).

Auffällig ist, dass in diesem Assay Basenfehlpaarungen oder abasische Stellen zu einer stärkeren Fluoreszenzlöschung führen, was die Folge eines effizienteren Ladungstransfers ist. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den bereits erwähnten früheren Arbeiten.^[33] Eine mögliche Erklärung bieten auch zeitaufgelöste Studien an DNA-Duplexen, die über ein kovalent mit einem Linker angeknüpftes Ethidiumderivat verfügen. Hier konnte gezeigt werden, dass das Ethidiumderivat eine Reorganisationszeit von ca. 75 ps benötigt, um eine Konformation zu erlangen, die optimal in den Basenstapel interkaliert ist und nötig ist für einen anschließenden

den schnellen Ladungstransfer mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 ps.^[22, 29] In dem hier vorgestellten Assay ist es daher denkbar, dass diese Umorientierung des photoangeregten Ethidiums durch den Einbau als starres Ethidiumnukleosid unterbunden wurde und erst durch Basenfehlpaarungen die konformationelle Flexibilität wieder erlangt werden kann. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten^[33], ist jetzt durch Einsatz eines enantiomerenreinen Ethidiumnukleosids in allen Fällen eine eindeutige Diskriminierung zwischen fehl und richtig gepaarten Duplexen möglich (s. Abb. 3-21).

Durch Kombination der Fluoreszenzeigenschaften des Ethidiums sowie des Ladungstransfers ist es möglich Basenfehlpaarungen und abasische Stellen zuverlässig zu detektieren. Da die Fluoreszenzlöschung nicht auf das direkt benachbarte Basenpaar beschränkt ist, kann man zwei oder mehr Basenpaare auf einmal auf Fehlstellen untersuchen. Im folgenden Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, um drei Basenpaare, d. h. ein gesamtes Codon, auf Basenfehlpaarungen zu überprüfen.

Ein interessantes Target in der molekularen Diagnostik stellt das p53-Protein dar.^[276] Das p53-Protein fungiert in der Zelle als Tumor-Suppressor.^[277] Während des Zellzyklus sorgt das p53-Protein an bestimmten Kontrollpunkten dafür, dass die Proliferation von beschädigten Zellen gestoppt, repariert oder die Apoptose eingeleitet wird. Dadurch wird eine Schutzfunktion ausgeübt, die den Organismus vor der Entstehung von Tumoren bewahrt. Daher ist es nicht überraschend, dass in ungefähr der Hälfte aller humanen Tumore das p53 -Protein als Folge einer Mutation inaktiv ist.^[277] Das p53-Protein besteht aus den für einen Transkriptionsfaktor typischen Strukturelementen: Amino-terminale Transaktivierungsdomäne, DNA-Bindungsdomäne und Carboxy-terminale Tetramerisierungs- und Regulationsdomäne (s. Abb. 3-23). Über 95% der Mutationen liegen in der DNA-Bindungsdomäne, die für die Aktivierung der Transkription von entscheidender Bedeutung ist und deren Funktion sensibel gegenüber Mutationen ist. Bei ca. 75% der Mutationen handelt es sich um Punktmutationen (SNP = Single Nucleotide Polymorphism).^[276] Innerhalb der DNA-Bindungsdomäne gibt es sechs Codons in denen gehäuft Mutationen auftreten, den sog. *hot spots* (s. Abb. 3-23).^[276]

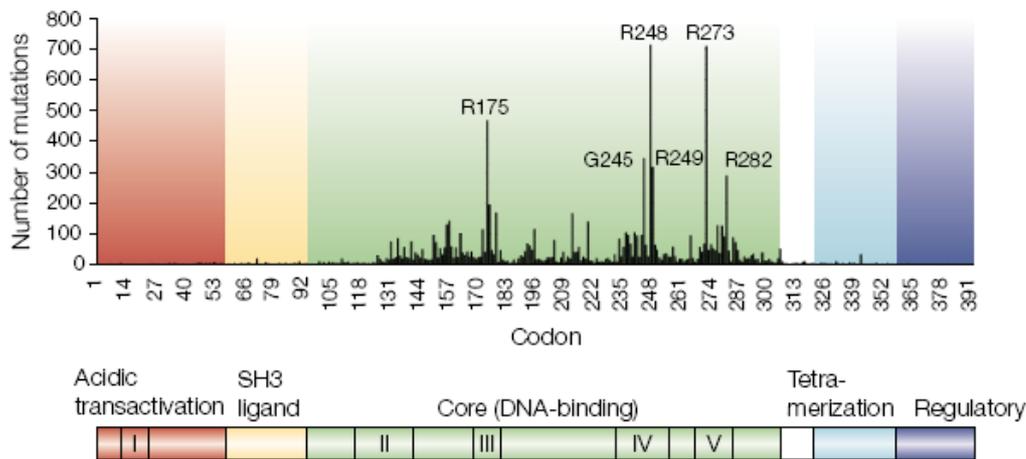


Abb. 3-23: Häufigkeit und Verteilung der cancerogenen Mutationen in p53.^[276]

Im Folgenden werden Vorversuche mit dem bereits erläuterten Ethidium-Deazaguanin-Assay beschrieben, um Punktmutationen innerhalb dieser sechs *hot-spot*-Regionen zu detektieren. Dazu wurden exemplarisch Ausschnitte aus dem p53-Gen gewählt, die zwei der sog. *hot-spot*-Regionen, Codon R249 und R282, enthalten.^[278] Die Sondenstränge **E25** und **E27** stellen die Gegenstränge zu den intakten Genabschnitten dar und enthalten das komplementäre Basentriplett des zu untersuchenden Codons, lokalisiert zwischen der Fluoreszenzsonde Ethidium und dem Ladungsakzeptor Z. Die Probenstränge **C29** und **C31** entsprechen dem intakten Genabschnitt, die Probenstränge **C30** und **C32** sollen jeweils als Modell für einen Probenstrang mit einer Punktmutation dienen. Im Fall von **C30** ist ein G gegen ein I ersetzt, was im Organismus zur Codierung von Serin anstelle von Arginin führen würde. In **C32** ist ein C durch ein T ausgetauscht, was den Einbau von Tryptophan anstatt Arginin in die Aminosäuresequenz zur Folge hätte. Die Duplexe **E24/C29** und **E26/C32** stellen die Kontrollduplexe dar, die statt des Deazaguanins ein Guanin beinhalten. Daher kann hier kein Ladungstransfer stattfinden und es sollte keine Fluoreszenzlöschung zu beobachten sein.

Kontrollduplexe

E24	5'-GGT-GAG-GAT-GGG- <u>CCT</u> - E CG-GTT-CAT-GCC3'	R249 Wildtyp
C29	3'-CCA-CTC-CTA-CCC- <u>GGA</u> -GGC-CAA-GTA-CGG-5'	
	Arg	
E24	5'-GGT-GAG-GAT-GGG- <u>CCT</u> - E CG-GTT-CAT-GCC-3'	R249S Mutante
C30	3'-CCA-CTC-CTA-CCC- <u>TGA</u> -GGC-CAA-GTA-CGG-5'	
	Ser	
E26	5'-TTC-CTC-TGT-GCG- <u>CCG</u> - E TC-TCT-CCC-AGG-3'	R282W Mutante
C31	3'-AAG-GAG-ACA-CGC- <u>GGC</u> -CAG-AGA-GGG-TCC-5'	
	Arg	
E26	5'-TTC-CTC-TGT-GCG- <u>CCG</u> - E TC-TCT-CCC-AGG-3'	R282 Wildtyp
C32	3'-AAG-GAG-ACA-CGC- <u>GGT</u> -CAG-AGA-GGG-TCC-5'	
	Trp	

Ladungstransferduplexe

E25	5'-GGT-GAG-GAT-GG Z - <u>CCT</u> - E CG-GTT-CAT-GCC3'	R249 Wildtyp
C29	3'-CCA-CTC-CTA-CCC- <u>GGA</u> -GGC-CAA-GTA-CGG-5'	
	Arg	
E25	5'-GGT-GAG-GAT-GG Z - <u>CCT</u> - E CG-GTT-CAT-GCC3'	R249S Mutante
C30	3'-CCA-CTC-CTA-CCC- <u>TGA</u> -GGC-CAA-GTA-CGG-5'	
	Ser	
E27	5'-TTC-CTC-TGT-GC Z - <u>CCG</u> - E TC-TCT-CCC-AGG-3'	R282W Mutante
C31	3'-AAG-GAG-ACA-CGC- <u>GGC</u> -CAG-AGA-GGG-TCC-5'	
	Arg	
E27	5'-TTC-CTC-TGT-GC Z - <u>CCG</u> - E TC-TCT-CCC-AGG-3'	R282 Wildtyp
C32	3'-AAG-GAG-ACA-CGC- <u>GGT</u> -CAG-AGA-GGG-TCC-5'	
	Trp	

Es wurden Fluoreszenzspektren der Kontrollduplexe, **E24/C29** und **E26/C32**, und der Analysatorstränge, **E25/C29** und **E27/C32**, aufgenommen (s. Abb. 3-24).

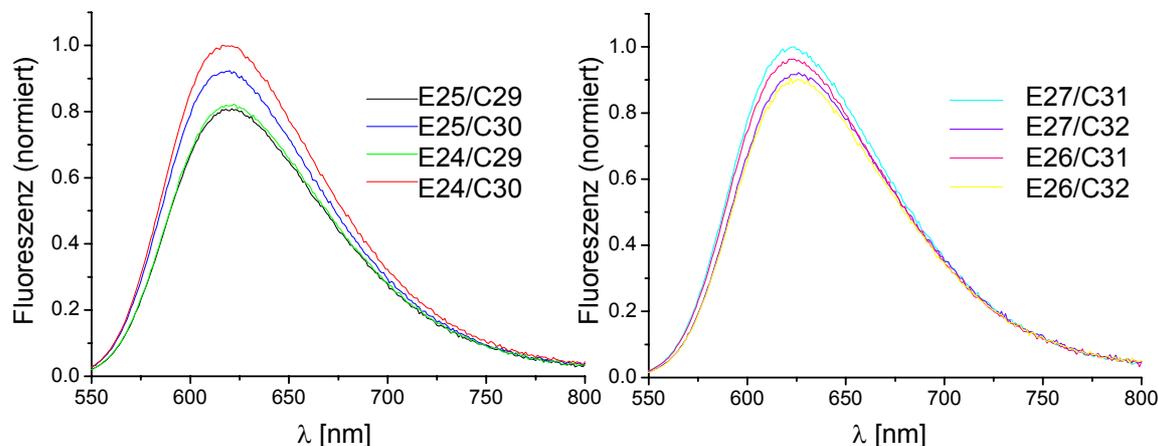


Abb. 3-24: Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 530$ nm) von DNA 12.5 μ M DNA, in 10 mM NaP_i (pH 7).

Die Ladungstransferduplexe zeigen alle innerhalb des experimentellen Fehlers analoge Fluoreszenzintensitäten, unabhängig davon, ob ein richtig (**E25/C29**, **E27/C31**) oder fehl gepaarter Duplex (**E25/C30**, **E27/C32**) vorliegt. Sie unterscheiden sich in ihrem Emissionsverhalten nicht von den Kontrollduplexen **E24/C29-E26/C32**. Da keine Fluoreszenzlösung in den Ladungstransferduplexen beobachtbar ist, scheint der Ladungstransfer über drei Basenpaare zu ineffizient zu sein. Diese starke Abstandsabhängigkeit steht in Einklang mit dem für Ethidium angenommenen Superaustausch-Mechanismus, für den eine Sensitivität gegenüber der Distanz zwischen Donor und Akzeptor charakteristisch ist.

Um eine von der B-DNA signifikant abweichende DNA-Konformation der fehl gepaarten Duplexe **E24/C30**, **E26/C32**, **E25/C30** und **E27/C32** ausschließen zu können, wurden die Schmelzpunkte und die CD-Spektren aller Duplexe aufgenommen. Die Schmelztemperaturen liegen alle in einem Bereich von 69-77°C (gemessen mit 100mM NaCl statt 250 mM NaCl; s. Tab. 8-9 unter 8. Materialien und Methoden). Die falsch gepaarten Duplexe weisen gegenüber den richtig gepaarten Duplexen einen um bis zu 7°C erniedrigte Schmelztemperatur auf.

Die CD-Spektren aller Kontroll- sowie Ladungstransferduplexe zeigen das für die B-DNA-Konformation typische Spektrum (s. Abb. 3-25). Zusätzlich zu den für die

DNA charakteristischen Signalen ist auch hier, die für interkaliertes Ethidium typische, breite, schwach negative Bande zwischen 300 und 400 nm beobachtbar.^[271]

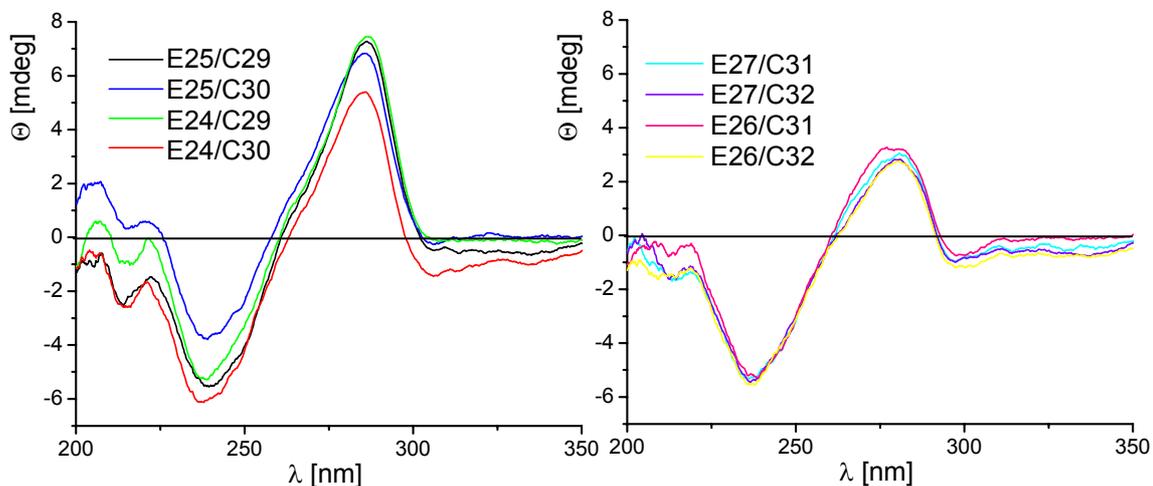


Abb. 3-25: CD-Spektren von 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

3.3.2 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass über eine Distanz von zwei Basenpaaren im System Ethidium-Deazaguanin jede Basenfehlpaarung bzw. die abasische Stelle als repräsentativer DNA-Schaden zuverlässig mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden kann. Es lässt sich feststellen, dass der Ladungstransfer im System Ethidium-Deazaguanin allerdings nur über zwei Basenpaare ausreichend effizient zu sein scheint, um die konformationellen Einflüsse der Basenfehlpaarungen zu reflektieren. Die angestrebte Untersuchung eines gesamten Codons innerhalb dieses Assays ist daher leider nicht möglich. Dies wurde beispielhaft an zwei wichtigen Mutationen des p53-Gens versucht. Mögliche Alternativen wären zum einen die Verwendung eines stärkeren Lochakzeptors oder zum anderen die Modifizierung des Ethidiumnukleosids, um einen besseren Ladungsdonor zu erhalten. Beides könnte zu einem effizienteren Ladungstransfer führen und die gewünschte Untersuchung über drei Basenpaare ermöglichen.

3.4 Einfluß der Linkerlänge des Ethidium-Nukleosids auf die spektroskopischen Eigenschaften

Wie im vorigen Abschnitt festgestellt wurde ist das Ethidiumbasensurrogat sehr rigide. Deswegen wurde versucht alternativ zu **1** ein Ethidiumbasensurrogat über einen Threoninollinker **12** in Oligonukleotide eingebaut.

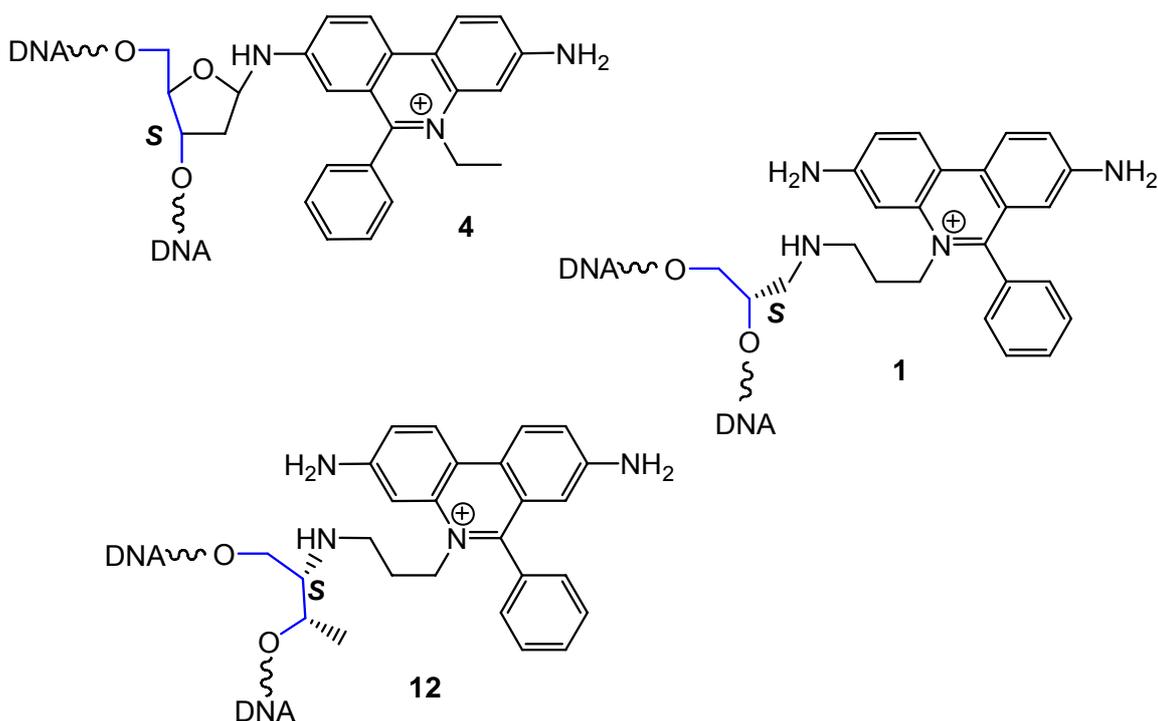


Abb. 3-26: Unterschiedliche Verknüpfungen des Ethidiums mit dem 2'-Desoxyribose-phosphatrückgrat der DNA: (**4**) über die 2'-Desoxyribose, (**1**) über einen Aminopropandiollinker oder (**12**) über einen D-Threoninollinker.

Analog zur 2'-Desoxyribose sind in D-Threoninol die primäre und sekundäre Hydroxygruppe über drei Kohlenstoffatome miteinander verknüpft (s. Abb. 3-26). Im Gegensatz dazu sind in dem bisher verwendeten Aminopropandiollinker die beiden Hydroxygruppen durch zwei Kohlenstoffatome voneinander getrennt, was eventuell zur Versteifung der DNA-Konformation im Bereich des Ethidiumchromophors beiträgt. Durch Verwendung des D-Threoninols als azyklischen Linker für die Inkorporation des Ethidiumchromophors erhofft man sich eine etwas er-

höhte Flexibilität in der DNA und dadurch eine verbesserte Interkalation. Möglicherweise ergäben sich daraus verbesserte Ladungsdonoreigenschaften, da die Umorientierung des photoangeregten Ethidiums in diesem System durch mehr konformationelle Freiheit erleichtert sein könnte. Der Einfluß der Linkerlänge auf die Emissionseigenschaften des Ethidiums soll im Folgenden untersucht werden.

3.4.1 Synthese von Ethidiummodifizierten Oligonukleotiden

Dazu wurde zunächst der DNA-Baustein **16** (s. Abb. 3-27) in Analogie zur bereits beschriebenen Synthese des Ethidium-Phosphoramidits **11** (s. Abb. 3-4) hergestellt. Die Umsetzung des Iodids **6** mit dem Threoninollinker **19** verläuft in Dimethylformamid unter Zusatz von DIPEA und man erhält das Ethidiumnukleosid **13**. Im nächsten Schritt werden die Alloc-Schutzgruppen durch Trifluoracetylgruppen ausgetauscht und man erhält das Ethidiumnukleosid **15**. Die Umsetzung zum Phosphoramidit **16** erfolgt unter Standardbedingungen.

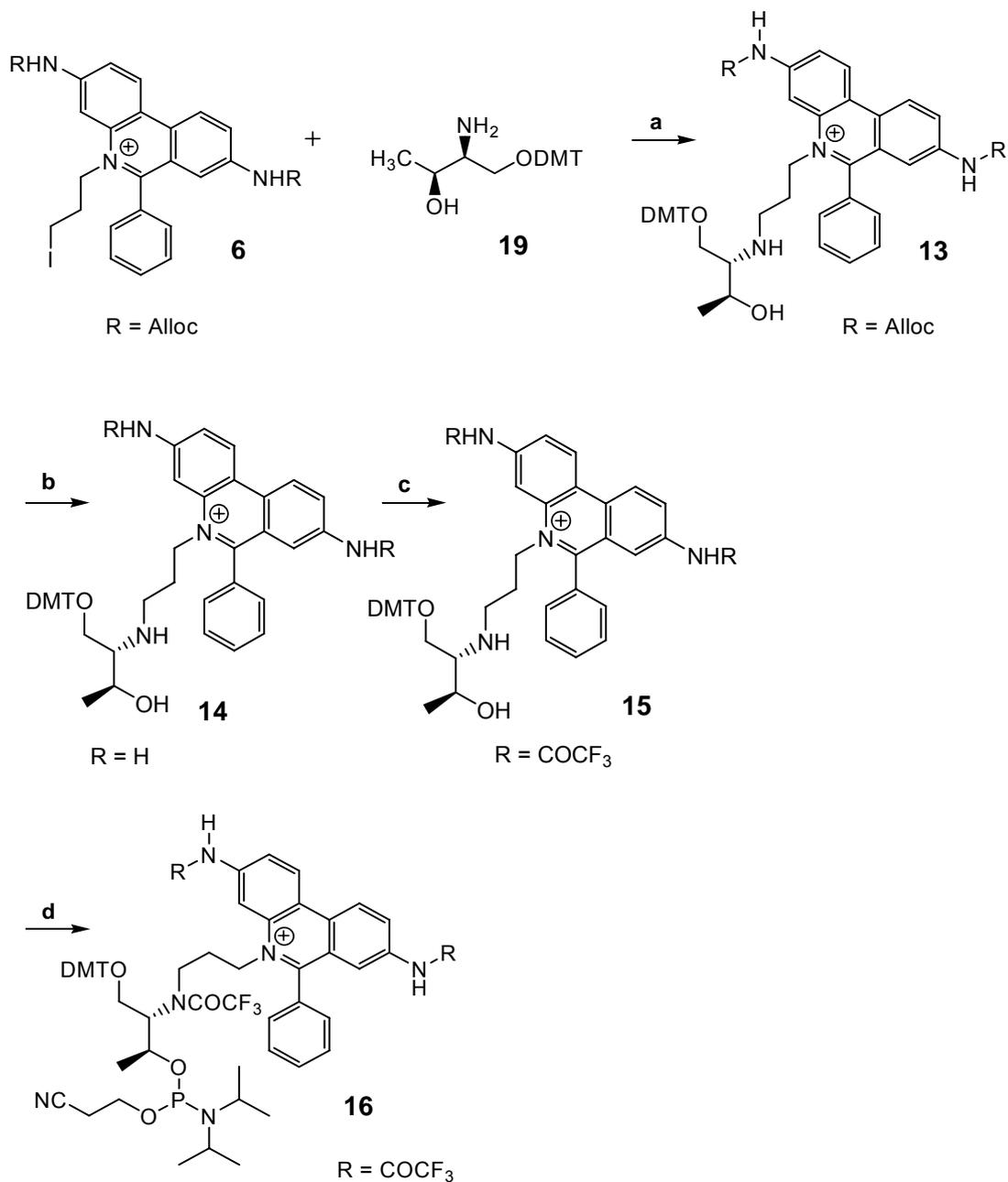


Abb. 3-27: Syntheschema des DNA-Bausteins **16**: (a) **19**, DIPEA, DMF, RT, 10 d, 89 %; (b) Bu₃SnH, [Pd(Ph₃)₄], PPh₃, DCM/H₂O 300:1, RT, 90 min, quant.; (c) (CF₃CO)₂O, DCM/Pyridin 5:1, 0°C, 10 min, RT, 10 min, 93 %; (d) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, DCM, RT, 45 min.

Die Synthese des Threoninollinkers **19** erfolgt analog zur Herstellung des Aminopropandiollinkers **7**^[18, 19, 266] (s. Abb. 3-28). Ausgehend von kommerziell erhältlichen (2S,3S)-2-Amino-butan-1,3-diol (D-Threoninol) lässt sich diese Verbindung in drei Schritten in guten Ausbeuten erhalten.

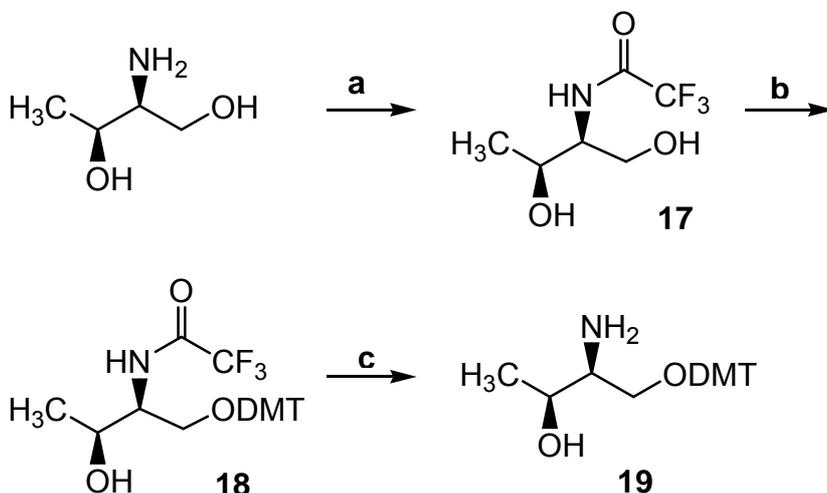


Abb. 3-28: Synthese des Threoninollinkers **19**: (a) $\text{CF}_3\text{COOCH}_3$, RT, 18 h, 89 %; (b) DMTCl, Pyridin, RT, 66 h, 65 %; (c) MeOH/ NH_3aq konz./THF 2:2:1, RT, 3 d, 86 %.

Zunächst wird die sekundäre Aminofunktion im D-Threoninol als Trifluoracetamid **17** geschützt und anschließend die primäre Hydroxyfunktion von **17** mit der Dimethoxytritylgruppe versehen. Eine Tritylierung der sekundären Hydroxygruppe wird unter den milden Reaktionsbedingungen nicht beobachtet. Die sekundäre Aminofunktion von **18** lässt sich unter basischen Bedingungen wieder freisetzen und man erhält den Aminobutandiollinker **19** in sehr guten Ausbeuten.

Das Ethidium-Phosphoramidit **16** wird in Acetonitril gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Es wird das gleiche modifizierte Kupplungsprotokoll wie für den Ethidiumbaustein **11** verwendet. Der Tritylmonitor zeigt den erfolgreichen Einbau des Phosphoramidits **16** (s. Abb. 3-29).

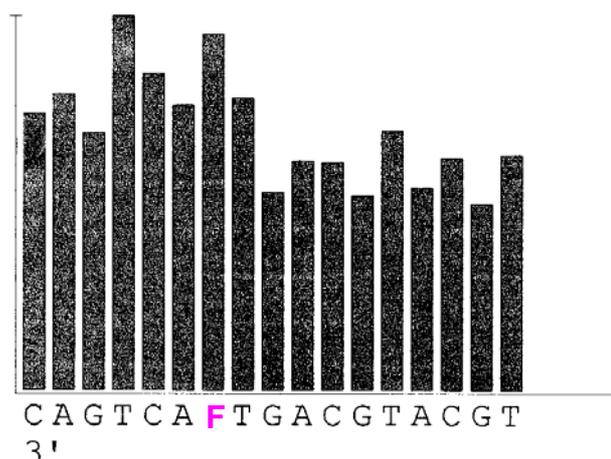


Abb. 3-29: Tritylmonitor der Synthese von Ethidium-modifizierter DNA **F28**.

Die Aufarbeitung der Oligonukleotide und Reinigung wurde analog zu den ethidiummodifizierten Oligonukleotiden **E1-E27** durchgeführt. Allerdings zeigten die HPLC-Spektren nach der Abspaltung vom festen Träger, dass hauptsächlich Abbrucholigonukleotide ohne E-Modifikation entstanden sind (s. Abb. 3-30). Das Nebenprodukt mit einer Retentionszeit von ca. ~ 32-33 min trat bei allen Synthesen der Oligonukleotidsequenzen **F28** und **F29** in variabler Intensität auf. Dieses Nebenprodukt weist eine Massendifferenz ΔM von ca. ~ + 90-100 g/mol (MALDI-TOF-MS) auf. Möglicherweise hat hier eine zweifache Acetylierung während des *Capping*-Schrittes der DNA-Festphasensynthese stattgefunden. Da die Acetylgruppe gegen die Aufarbeitungsbedingungen, die für die modifizierte DNA verwendet werden, stabil ist, sind hier eventuell acetylierte Oligonukleotide entstanden. Denkbar ist eine Acetylierung nur, wenn die Trifluoracetylenschutzgruppen an den beiden exocyclischen Aminogruppen des Phenanthridins bzw. an der sekundären Aminofunktion in der Linkereinheit vor bzw. während der DNA-Synthese abgespalten worden sind. Allerdings konnten solche Zersetzungsprodukte weder vor noch nach der Umsetzung zum Phosphoramidit **16** nachgewiesen werden (ESI-MS).

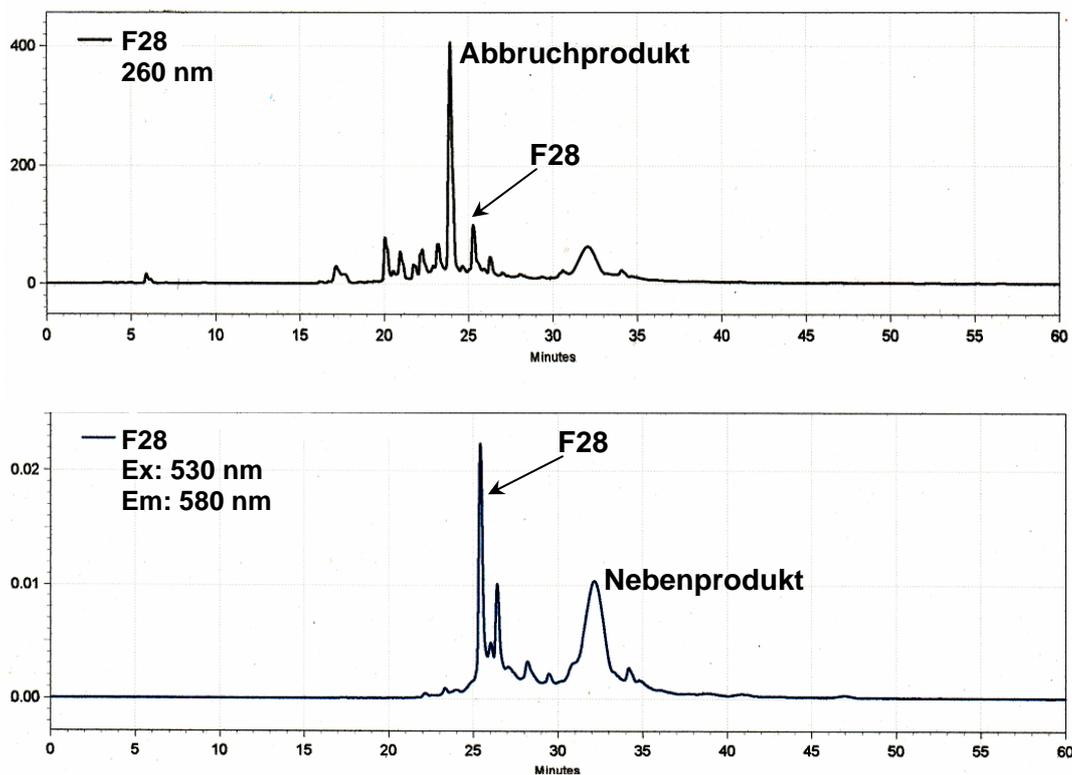
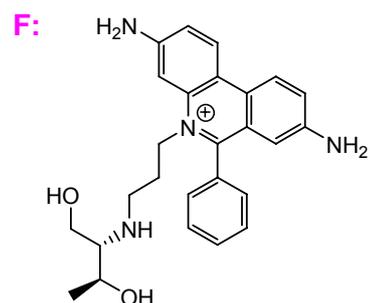
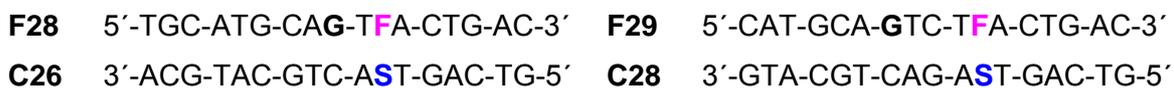


Abb. 3-30: HPLC-Spektrum des ethidiummodifizierten Stranges **F28** vor der präparativen Reinigung.

Die Sequenz der Oligonukleotide wurde analog zu den bereits untersuchten ethidiummodifizierten Strängen **E15** und **E17** gewählt. Dadurch lassen sich die spektroskopischen Eigenschaften der beiden Ethidiumnukleosidanaloga direkt miteinander vergleichen und der Einfluß der unterschiedlichen Linkerlänge kann untersucht werden.



3.4.2 Spektroskopische Untersuchungen der ethidiummodifizierten DNA

In den Absorptionsspektren aller Duplexe lässt sich ein Absorptionsmaximum bei $\lambda \sim 530$ nm beobachten, was charakteristisch für interkaliertes Ethidium ist (s. Abb. 3-31).^[18, 268-270] Die deutlich geringere optische Dichte bei 530 nm des Duplexes **F29/C28** konnte bisher nicht erklärt werden. Daher sind alle folgenden Experimente als vorläufig zu betrachten.

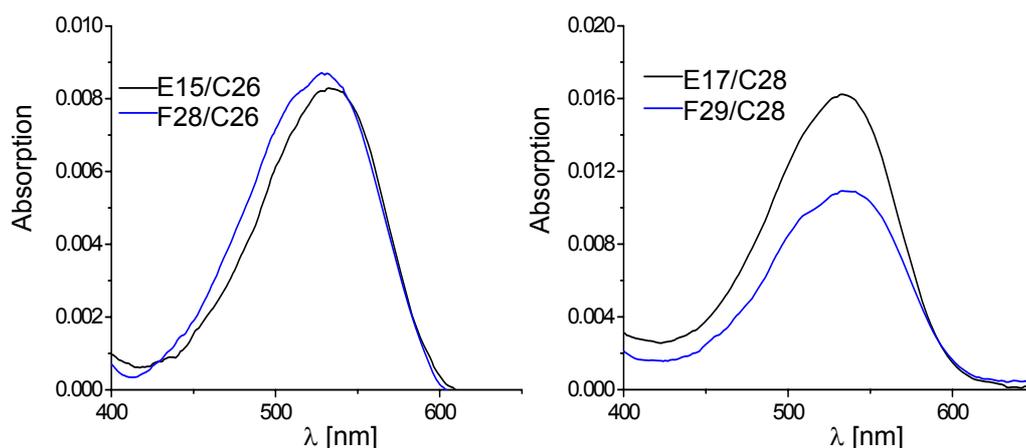


Abb. 3-31: Absorptionsspektren von DNA 2.5 μ M, in 10 mM NaP_i (pH 7).

Bei Anregung mit $\lambda = 530$ nm zeigen beide Duplexe **F28/C26** und **F29/C28** ein Emissionsmaximum bei $\lambda \sim 628$ nm, was typisch für interkaliertes Ethidium ist (s. Abb. 3-32).^[268-270] Die Fluoreszenzintensitäten sind korrigiert angegeben um eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen. Alle Duplexe zeigen innerhalb des experimentellen Fehlers ähnliche Emissionen. Besonders wichtig ist hervorzuheben, dass der längere Threoninollinker scheinbar keinen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Ethidiumchromophors hat.

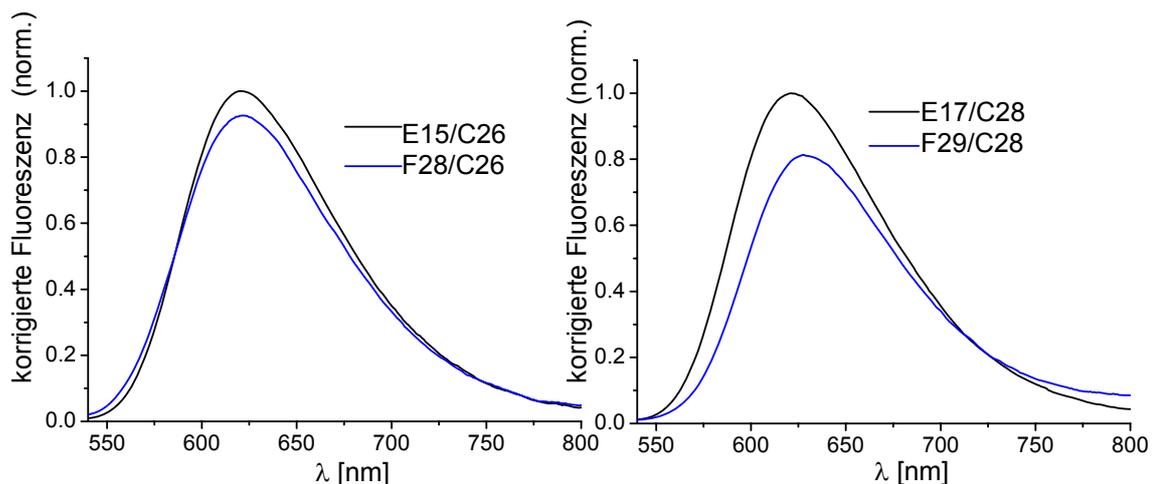


Abb. 3-32: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$) von DNA, $2.5 \mu\text{M}$, in 10 mM NaPi (pH 7).

Um die DNA-Struktur der Duplexe **F28/C26** und **F29/C28** zu untersuchen, wurden Schmelztemperaturen und CD-Spektren aufgenommen. Die CD-Spektren der beiden Duplexe **F28/C26** und **F29/C28** ähneln stark denen der Duplexe **E15/C26** und **E17/C28** (s. Abb. 3-33). Alle Duplexe zeigen, das für die B-DNA-Konformation typische Spektrum sowie eine breite, schwach negative Bande zwischen 300 und 400 nm, die für interkaliertes Ethidium kennzeichnend ist.^[271]

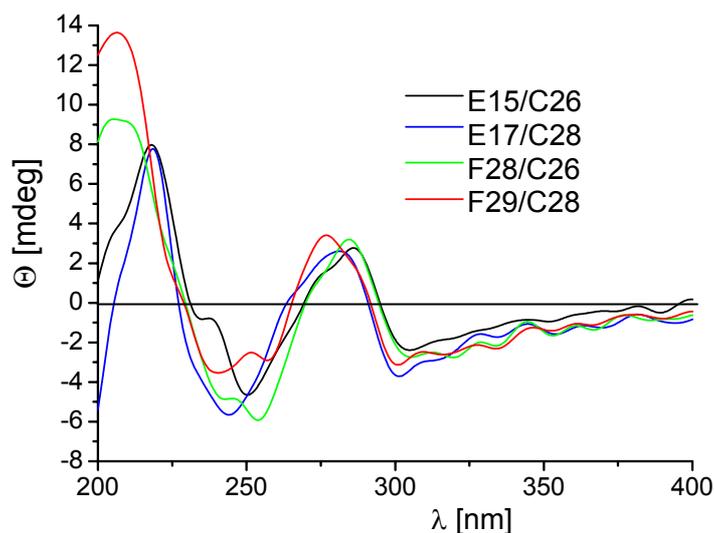


Abb. 3-33: CD-Spektren von $2.5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaPi (pH 7).

Es fällt auf dass die Schmelztemperaturen der Duplexe **F28/C26** und **F29/C28** um vier bis fünf Grad niedriger sind als die korrespondierenden Duplexe **E15/C26** und **E17/C28** (s. Tab. 3-6).

Tabelle 3-6: Schmelztemperaturen der Duplexe **E15/C26**, **E17/C28** und **F28/C26**, **F29/C28**, 2.2 μ M DNA in 10 mM NaP_i (pH 7), 250 mM NaCl.

DNA	Smp (260 nm) [°C]
E15/C26	66
E17/C28	64
F28/C26	62
F29/C28	59

3.4.3 Zusammenfassung

Ein Syntheseprotokoll wurde ausgearbeitet, dass es ermöglicht, das Ethidium als Basensurrogat über eine längere Linkereinheit in Oligonukleotide zu inkorporieren. In noch vorläufigen optisch-spektroskopischen Experimenten wurde gezeigt, dass die Verwendung des Threoninollinkers keine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Ethidiumchromophors zeigt. Es ist keine höhere Fluoreszenzintensität zu beobachten. Die thermische Stabilität der modifizierten Duplexe hat abgenommen. Bei einer ausgedehnteren Interkalation wäre aufgrund stärkerer π - π -Wechselwirkungen des Ethidiums mit den Nachbarbasen eine höhere Schmelztemperatur zu erwarten gewesen.

4 PydG-modifizierte Oligonukleotide

Pyrene und Pyrenchromophore eignen sich als photochemische Sonden zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen, da Pyren und eine Vielzahl von Derivaten spektroskopisch gut charakterisiert sind. In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von pyrenmodifizierter Nucleoside veröffentlicht worden, u. a. die C-Nucleoside von *Kool et al.*^[279-282], *Woski et al.*^[283], *Berlin et al.*^[51] und *Pedersen et al.*^[284], sowie die pyrenmodifizierten Uracilderivate von *Netzel et al.*^[50, 285] und *Pedersen et al.*^[284, 286]. Eine Übersicht einiger wichtiger, repräsentativ ausgewählter pyrenhaltiger Nucleoside gibt Abb. 4-1.

In Experimenten von *Netzel et al.* konnte gezeigt werden, dass die Löschung der Fluoreszenz des photoangeregten Zustands des Pyrens in Abhängigkeit der benachbarten Basen durch reduktiven oder oxidativen Lochtransfer erfolgen kann.^[285] Durch zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen an 5'-(1-Pyrenyl)-2'-Desoxyuridin (PydU) und 5-(1-Pyrenoyl)-2'-desoxyuridin (s. Abb. 4-1) konnten *Netzel et al.* zeigen, dass hier ein reduktiver Ladungstransfer im ns-Bereich stattfindet.^[50]

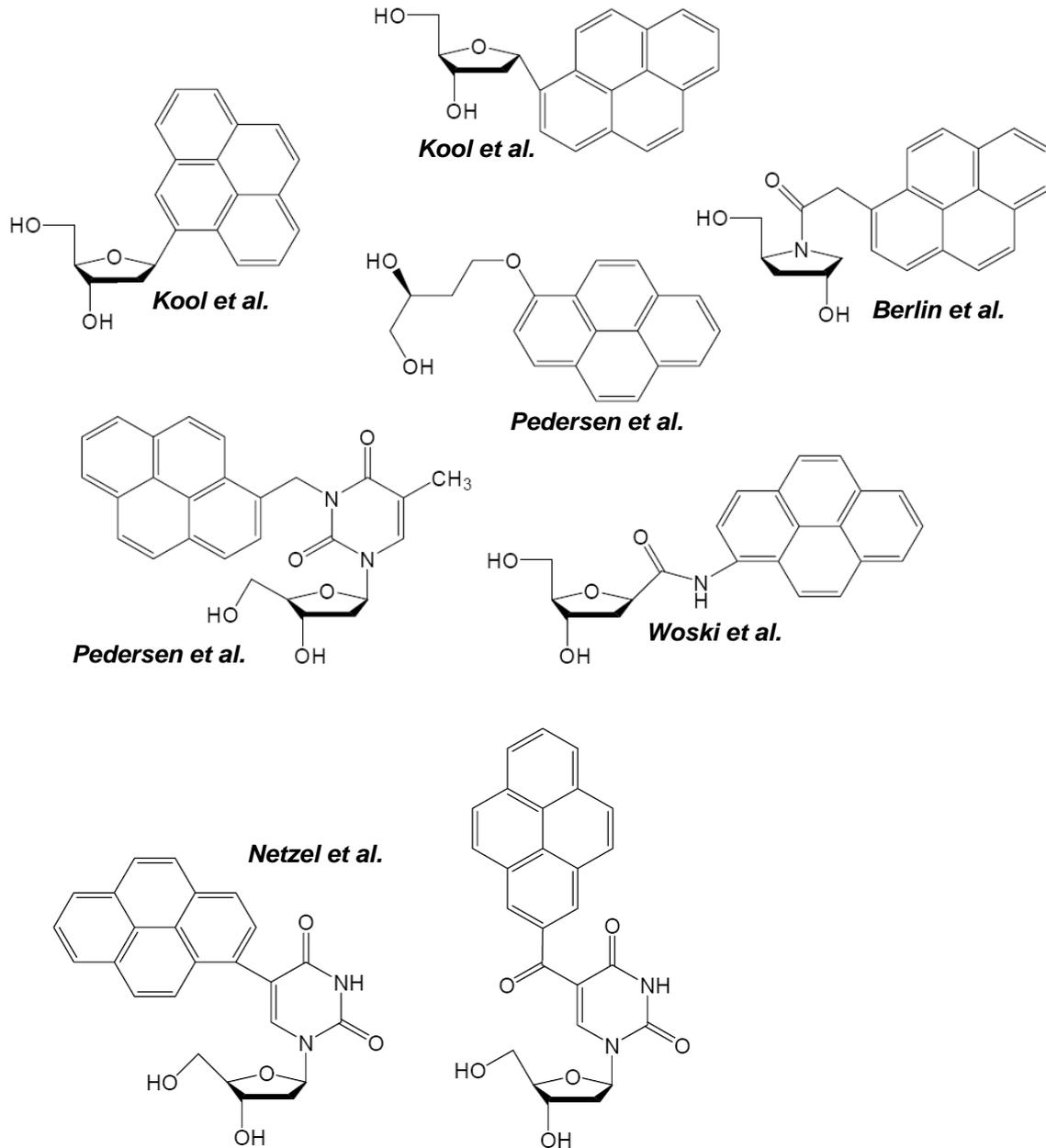


Abb. 4-1: Übersicht verschiedener pyrenhaltige Nucleoside und Pyrenbasensurrogate.

Für 8-(1-Pyrenyl)-2'-Desoxyguanosin (PydG, **2**) kann auf der Grundlage der *Rehm-Weller-Gleichung* mit den Redoxpotentialen für **Py** / **Py**^{•-} ($E_{\text{red}} = -1.9 \text{ V}$)^[287] und für **dG**^{•+} / **dG** ($E_{\text{ox}} = +1.3 \text{ V}$)^[31] und unter Berücksichtigung von $E_{00} = 3.25 \text{ V}$ für **Py**^{*}^[50] eine maximale Triebkraft ΔG von -0.1 eV für den oxidativen Lochtransfer vorausgesagt werden.^[47] In ps-zeitaufgelösten Experimenten von *Shafirovich et al.*^[165, 288] an strukturell ähnlichen Benzo[a]pyrenyl-2'-desoxyguanosin-

Derivaten konnte der oxidative Ladungstransfer auch experimentell bestätigt werden.

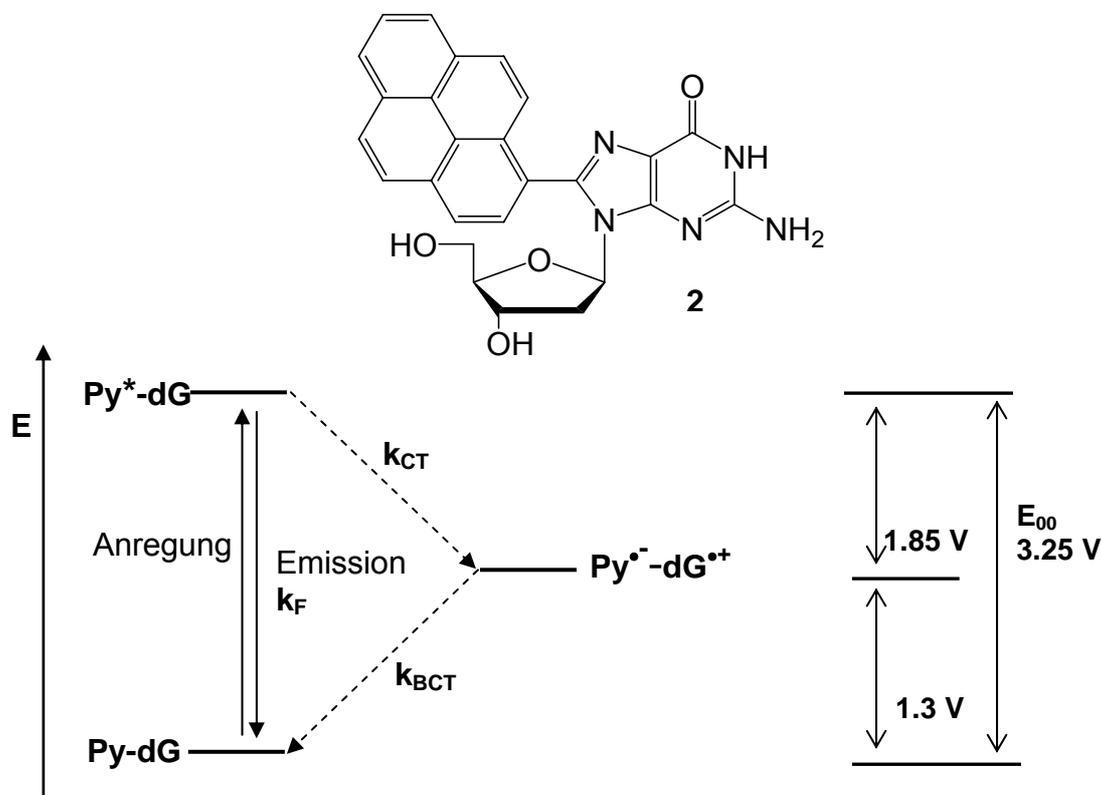


Abb. 4-2: Oxidativer Lochtransfer in PydG (**2**).

Durch Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein intramolekularer Lochtransfer in PydG unter Bildung der ladungstrennten Spezies $\text{Py}^{\bullet-}\text{-dG}^{\bullet+}$ erfolgt und dass dieser Lochtransfer abhängig ist vom pH-Wert. ^[35]

Um die Ladungstransferprozesse in der DNA, die durch Lochinjektion von PydG ausgelöst werden können, zu untersuchen soll 8-(1-Pyrenyl)-2'-Desoxyguanosin (PydG, **2**), mittels Standard-DNA-Festphasensynthese kovalent in Oligonukleotide eingebaut werden. Das pyrenmodifizierte Nucleosid ist gut zugänglich über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktion. ^[47]

4.1 Synthese von PydG (2)

Die Anknüpfung des Pyrenrestes an die 8-Position von 2'-Desoxyguanosin erfolgt über die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktion von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (**22**) mit 1-Pyrenylboronsäure (**21**).^[49] 8-Brom-2'-desoxyguanosin (**23**) lässt sich durch Bromierung von 2'-Desoxyguanosin in guten Ausbeuten mit NBS in Wasser bei neutralem pH-Wert erhalten und ist in der Literatur beschrieben.^[289]

Ausgehend von kommerziell erhältlichem Pyren, lässt sich 1-Brompyren (**20**) durch selektive Bromierung an der 1-Position des Pyrens mit CuBr_2 erhalten.^[290] Anschließend wird 1-Brompyren (**20**) durch Brom-Lithium-Austausch und anschließende Umsetzung mit Borsäuretrimethylester in 1-Pyrenylboronsäure^[291, 292] (**21**) in guten Ausbeuten überführt.

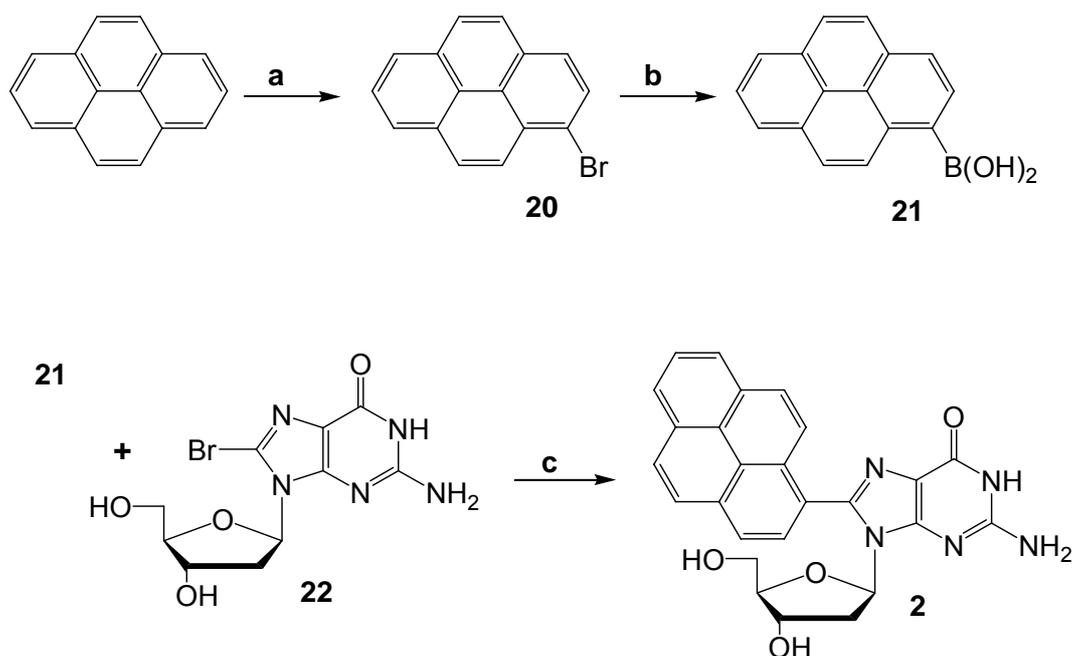


Abb. 4-3: Synthese von PydG (**2**): (a) CuBr_2 , (PhCl), 100°C, 2 h, 75 %; (b) 1. BuLi, 0°C, 30 min, 2. $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$, -78°C, 48 h, 3. HCl, H_2O , (1-3: als LM Et_2O) 75 %; (c) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, NaOH, (THF/MeOH/ H_2O), 60°C, 20 h, 58 %.

4.2 Spektroskopische Untersuchung von PydG (2)

Aufgrund von optisch-spektroskopischen Vorexperimenten mit PydG und der strukturellen Analogie zu Benzpyren-dG-Addukten, die von *Shafirovich et al.* [165, 288] intensiv studiert wurden, ist zu erwarten, dass 8-(1-Pyrenyl)-2'-Desoxyguanosin (PydG, **2**) als photochemische Sonde zur Untersuchung des oxidativen Lochtransfers geeignet ist. [31, 47, 49, 152] Die Photoanregung der Pyren-Einheit führt zur sehr schnellen Bildung einer ladungstrennten Spezies $\text{Py}^{\cdot-} - \text{dG}^{\cdot+}$. Die Triebkraft für diesen Prozess lässt sich aus den Redoxpotentialen für $\text{Py} / \text{Py}^{\cdot-}$ ($E_{\text{red}} = -1.9 \text{ V}$) [287] und für $\text{dG}^{\cdot+} / \text{dG}$ ($E_{\text{ox}} = +1.3 \text{ V}$) [31] auf der Grundlage der *Rehm-Weller*-Gleichung unter Berücksichtigung von $E_{00} = 3.25 \text{ V}$ für Py^* [50] abschätzen. Es ergibt sich eine maximale Triebkraft ΔG von -0.1 eV . [47]

Mit Hilfe der Cyclovoltammetrie wurde das tatsächliche Redoxpotential von PydG (**2**) in DMF bestimmt. Da in dem verwendeten Meßaufbau keine geeichte Referenzelektrode verwendet wurde, wurde das gemessene Redoxpotential mit dem gängigen Standard Ferrocen (Fc) geeicht.

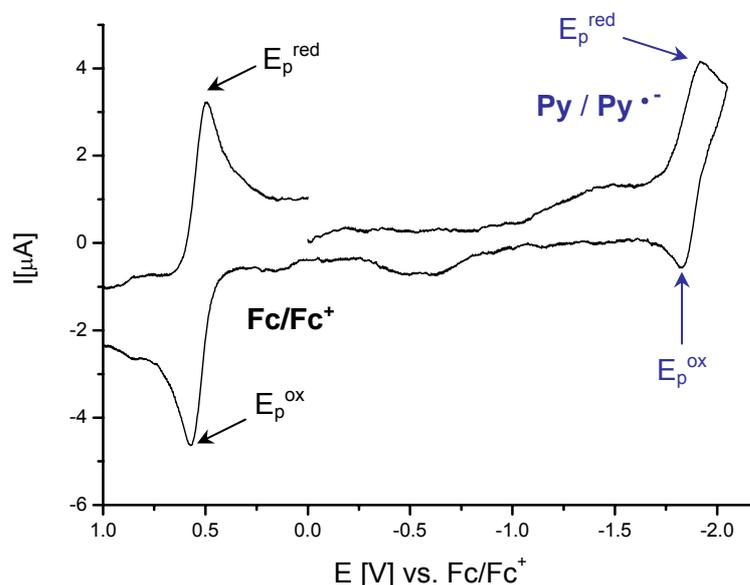


Abb. 4-4: Cyclovoltammogramm von PydG in DMF, $v = 250 \text{ mV/s}$, Leitsalz TBAH.

Für die Reduktion des Pyrens ergibt sich ein Halbstufenpotential $E_{1/2}$ von -2.41 V gg. Ferrocen. Die Peakseparation beträgt 92 mV , so dass die Reduktion als reversibel angenommen werden kann. Anhand von Tabellen lässt sich dann das

Redoxpotential von PydG gegenüber der Normal-Wasserstoffelektrode abschätzen (s. unter Kapitel 6). Man erhält dann ein Redoxpotential von $E_{\text{red}} = -2.1 \text{ V}$ (vs NHE) für $\text{Py-dG} / \text{Py}^{\cdot-}\text{-dG}^{\cdot+}$. Nach der *Rehm-Weller*-Gleichung lässt sich dann ΔG mit -0.15 eV bestimmen.^[293] Dieser Wert stimmt gut mit dem aus der Literatur bekannten Wert überein. Um die Bildung des Radikalanions $\text{Py}^{\cdot-}$ zu verfolgen, wurde eine spektroelektrochemische Messung durchgeführt (s. Abb. 4-5). Die Intensität der Absorptionsbande bei ca. 340 nm, die dem Pyren zuzuordnen ist, nimmt mit zunehmendem Potential ab. Es kommt zur Bildung einer neuen Bande bei ca. 470 nm, die dem Pyrenradikalanion $\text{Py}^{\cdot-}$ entspricht. Bei weiterer Erhöhung des Potentials wächst bei ca. 518 nm eine neue Bande, die dem Exciplex $\text{Py}^{\cdot-}\text{-dG}^{\cdot+}$ zugeschrieben werden kann, an. Der Exciplex liegt aufgrund der sehr starken elektronischen Kopplung zwischen Pyren und Guanosin über eine C-C-Einfachbindung vor.

Am Ende der Messung wird am Schluss noch einmal ein Spektrum ohne Potential gemessen. Im Idealfall sollte dann das Ausgangsspektrum wieder erhalten werden, d. h. die elektrochemische Reduktion ist reversibel, was bei der CV der Fall war (s. Abb. 4-4).

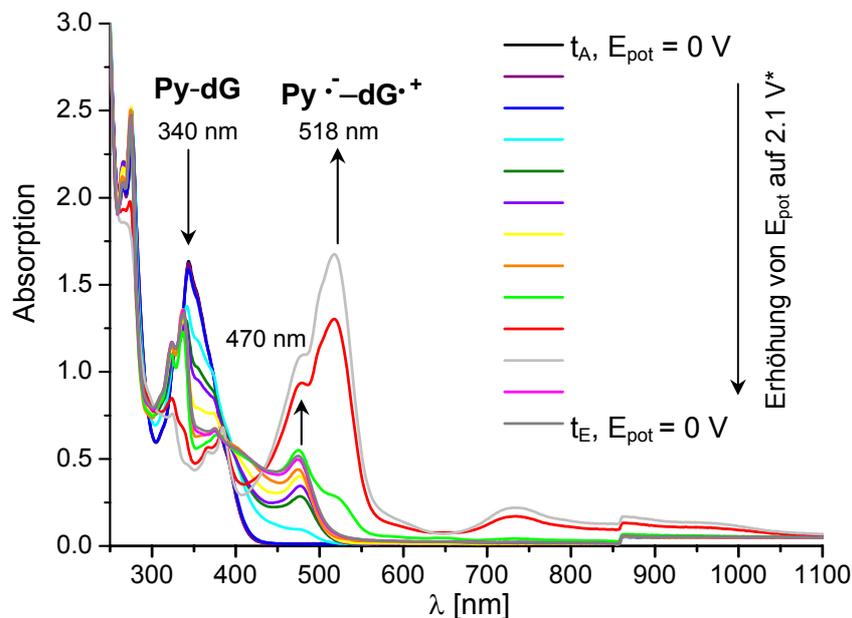


Abb. 4-5: Reduktion von PydG in DMF. *Das Potential wird sukzessive auf ca. 2.1 V (kein absoluter Wert) erhöht.

Allerdings lässt sich hier das Ausgangsspektrum nicht mehr erzeugen (s. Abb. 4-5). Es scheint hier eine chemisch irreversible Umwandlung des Moleküls stattgefunden zu haben. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, da sich die spektroelektrochemische Messung über einen deutlich längeren Zeitraum erstreckt und die Reversibilität des Redoxvorgangs stark abhängig von der Vorschubgeschwindigkeit v sein kann, d. h. von der Geschwindigkeit mit der das Potential verändert wird. Eine derartige irreversible Redoxchemie wird bei Nukleosiden oft beobachtet^[72] Abschließend lässt sich aufgrund der spektroelektrochemischen Messung feststellen, dass PydG als photoinduzierbarer Lochdonor über $dG \cdot^+$ in die DNA geeignet ist.

4.3 Synthese und Charakterisierung der PydG-modifizierten Oligonukleotide

Um PydG in der automatisierten DNA-Festphasensynthese einsetzen zu können, muss zunächst die exozyclische Aminofunktion in der 2-Position des Guanins als Amidin geschützt werden. Anschließend werden dann die 5'-OH-Funktion der 2'-Desoxyribose von **23** mit der 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe und die 3'-OH-Funktion von **24** mit der β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramiditgruppe versehen (s. Abb. 4-6).^[293]

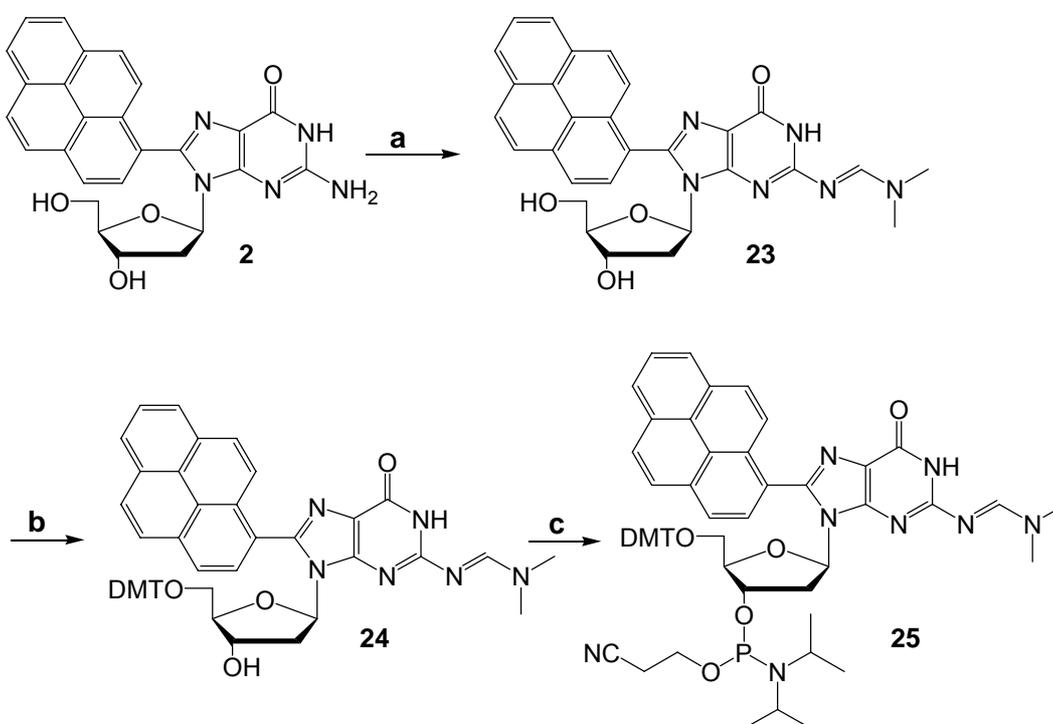


Abb. 4-6: Synthese des Phosphoramidits von PydG (**25**):

(a) : (CH₃)₂NCH(OCH₃)₂, (MeOH), RT, 18 h (quant.), (b). DMT-Cl, NEt₃, (Pyridin), RT, 36 h, (66 %), (c) ((i-Pr)₂N)P(OCH₂CH₂CN)(Cl), (DCM), RT, 45 min, (quant.).

Das Phosphoramidit **25** wird in DCM gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Um einen effizienteren Einbau zu erreichen, wurde ein modifiziertes Kupplungsprotokolls mit einer längeren Kupplungszeit (15 min anstatt 1.5 min) verwendet (s. Abb. 4-7).

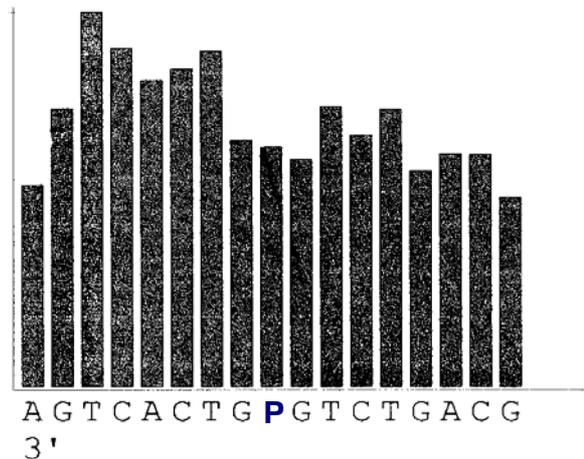
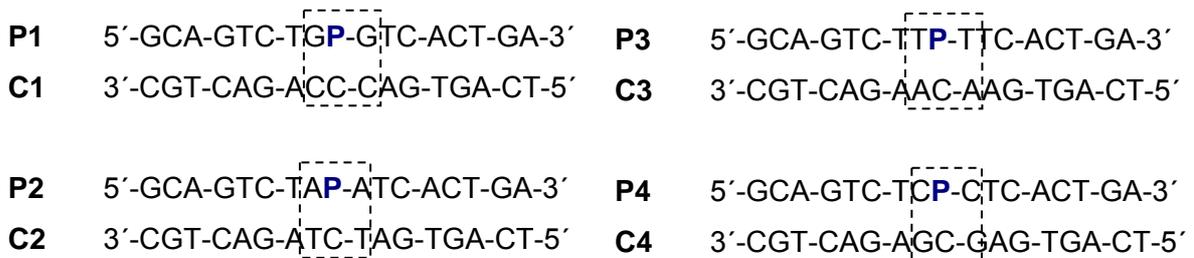


Abb. 4-7: Tritylmonitor der Synthese von PydG-modifizierter DNA **P1**.

Die Abspaltung und Aufarbeitung erfolgt nach Standardprotokoll. Die Aufreinigung der Oligonukleotide wurde mittels RP-HPLC durchgeführt, wobei die Absorption bei 340 nm, was der Absorption des Pyrenchromophors entspricht, zur Detektion verwendet wurde.

4.3.1 PydG als Hybridisierungssonde

Die PydG-enthaltenden Oligonukleotidsequenzen **P1-P4** tragen die Modifikation in der Mitte des Stranges, um die Einbindung des PydG in einen stabilen Duplexbereich zu ermöglichen. In den folgenden DNA-Sequenzen wird die Nachbarbasenumgebung des artifiziellen Nukleotids variiert. Als Gegenbase wird C verwendet, um im Idealfall die Ausbildung einer regulären Watson-Crick-Basenpaarung zu ermöglichen.



P = PydG

Allerdings ist aufgrund von NMR-Untersuchungen (NOESY an **2**) bekannt, dass PydG wegen der sterisch anspruchsvollen Pyreneinheit in die *syn*-Konformation gezwungen wird.^[47] Daher ist eine lokale Störung der DNA-Duplex-Struktur zu erwarten, da der Pyrenrest vermutlich partiell in den Basenstapel interkaliert ist.

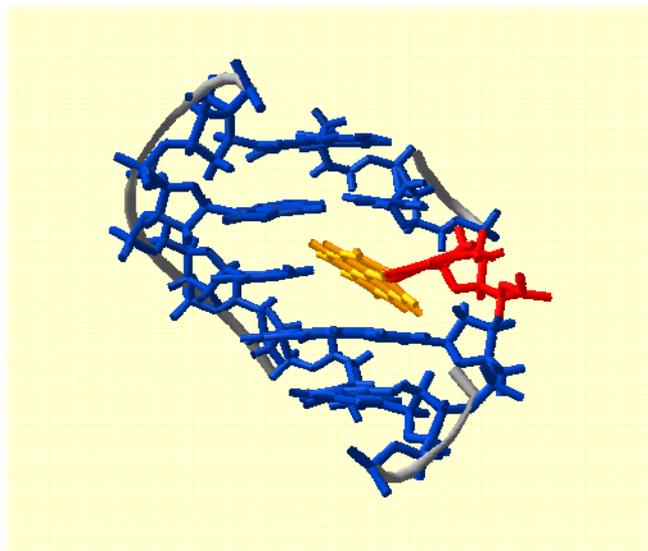


Abb. 4-8: Modell eines mit PydG-modifizierten Duplexes.

Diese Struktureinflüsse wurden spektroskopisch untersucht. Die Absorptionsspektren der PydG-modifizierten Einzelstränge **P1-P4** weisen ein für das Pyrenchromophor charakteristisches Absorptionsmaximum bei $\lambda = 350$ nm auf (s. Abb. 4-9). Die Duplexe **P1/C1-P4/C4** hingegen zeigen eine um ca. 20 nm bathochrom verschobene Absorptionsbande, was auf eine starke Wechselwirkung des Pyrens mit den Nachbarbasen innerhalb des Basenstapels hindeutet. Bemerkenswert ist, dass alle vier Duplexe ein gleichartiges Absorptionsverhalten im Pyrenbereich zeigen. Das Maximum liegt bei 370 nm und ist unabhängig von der unmittelbaren Umgebung des PydG.

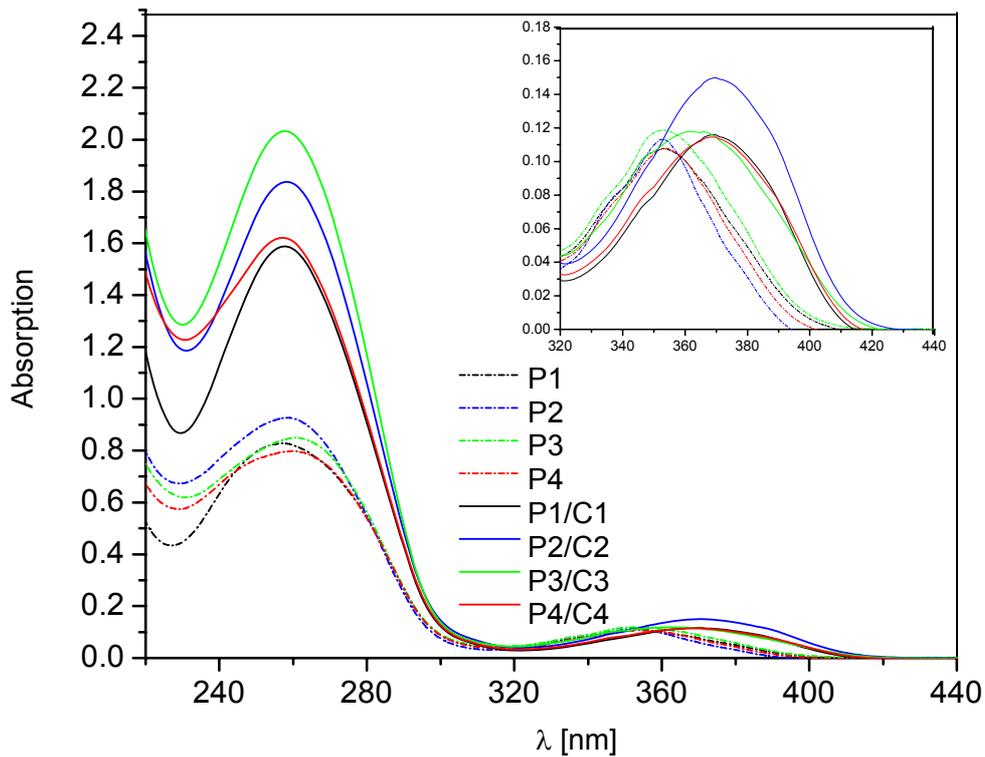


Abb. 4-9: Absorptionsspektrum von 5 µM Einzelstrang und Duplex in 10 mM NaPi (pH 7).

Um das unterschiedliche Absorptionsverhalten von PydG-modifizierten Einzel- und Doppelsträngen zu untersuchen wurden temperaturabhängige Absorptionsspektren der Duplexe aufgezeichnet. Alle vier Duplexe **P1/C1-P4/C4** weisen ein ähnliches Absorptionsverhalten in Abhängigkeit der Temperatur auf. Stellvertretend ist hier das Spektrum von Duplex **P2/C2** dargestellt (s. Abb. 4-10).

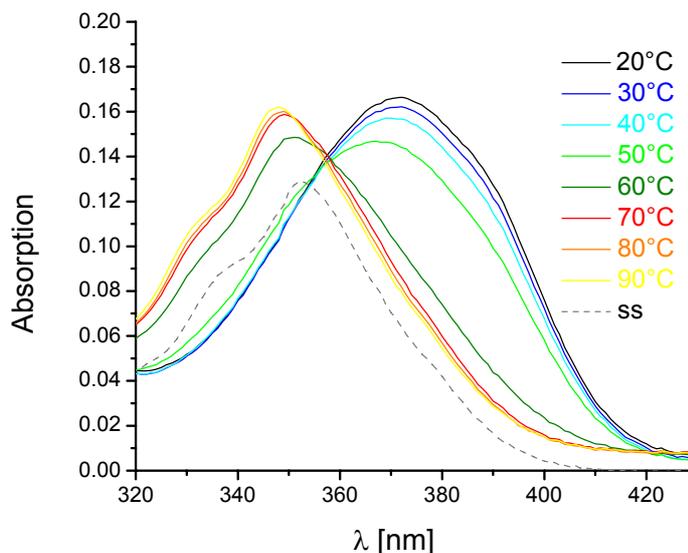


Abb. 4-10: Temperaturabhängige Absorption des Duplex P2/C2, 5 µM DNA in 10 mM NaPi (pH 7), 250 mM NaCl.

Mit zunehmender Temperatur ergibt sich eine hypsochrome Verschiebung von 370 nm nach 350 nm, was dann mit der Absorption des PydG-modifizierten Einzelstrangs übereinstimmt. Bemerkenswert ist, dass die Absorptionskurven einen isosbestischen Punkt bei ca. 360 nm aufweisen, woraus man auf einen konzentrierten Übergang von Duplex-DNA zu Einzelsträngen schließen kann. Diese Dehybridisierung findet zwischen 50 bis 60 °C statt, was gut mit der Schmelztemperatur der DNA korreliert.

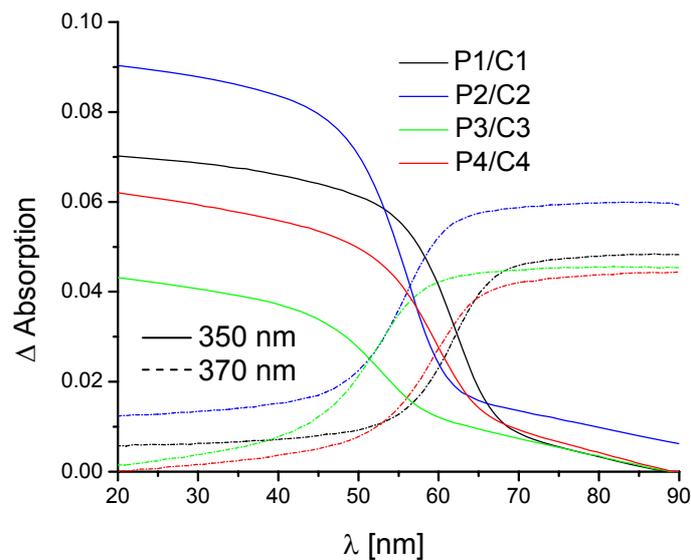


Abb. 4-11: Schmelzkurven der Duplexe P1/C1-P4/C4 bei 350 nm (—) und 370 nm (---), 5 μ M DNA in 10 mM NaP_i (pH 7), 250 mM NaCl.

Die „Schmelztemperatur“ bei 350 und 370 nm, die sich aus den Kurven ermitteln lässt (s. Abb. 4-11) stimmt sehr gut mit der bei 260 nm bestimmten Schmelztemperatur der Duplexe überein (s. Tab. 4-1).

Tabelle 4-1: Schmelztemperaturen der Duplexe P1/C1-P4/C4 bei 260, 350 und 370 nm, 2.5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7), 250 mM NaCl.

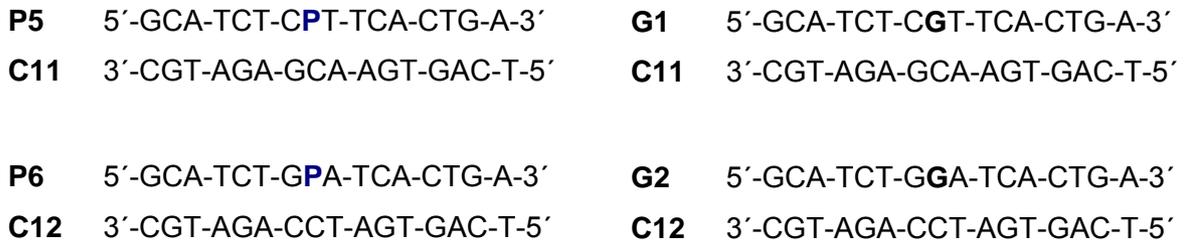
Duplex	Smp (260 nm) [°C]	Smp (350 nm) [°C]	Smp (370 nm) [°C]
P1/C1	63	66	64
P2/C2	58	57	57
P3/C3	52	54	54
P4/C4	59	60	61

Um den Einfluss der Gegenbase auf die PydG-Einheit zu untersuchen, wurden folgende Duplexe mit den PydG-modifizierten Oligonukleotiden **P2** und **P3** hergestellt und mit **P2/C2** und **P3/C3** verglichen:



Es ergeben sich für die fehl gepaarten Duplexe **P2/C5-P3/C10** ähnliche Schmelztemperaturen wie bei den richtig gepaarten Duplexen **P2/C2** und **P3/C3**. Die Gegenbase scheint keinerlei Einfluss auf die thermische Stabilität der Duplexe zu haben, was dafür spricht, dass sich die Guanineinheit des PydG und evtl. die entsprechende Gegenbase in einer extrahelikalen Position befinden (s. Abb. 4-8). Folglich sind keine Watson-Crick-Brücken im Basenpaar PydG-C mehr möglich.

Um den Einfluss der PydG-Einheit auf die Duplexstabilität näher zu untersuchen, wurden Referenzduplexe **G1/C11** und **G2/C12** hergestellt, bei denen statt PydG (wie in **P5/C11** und **P6/C12**) ein G eingebaut wurde.



Die Schmelztemperaturen der Duplexe **P5/C11** und **P6/C12** sind gegenüber denen der Referenzduplexe **G1/C11** und **G2/C12** um 10 bzw. 14 °C erniedrigt (s. Tab. 4-2). Die Einführung der PydG-Einheit führt also zu einer drastischen Abnahme der thermischen Stabilität des DNA-Duplexes. Dies lässt sich nur durch eine deutliche strukturelle Störung des DNA-Duplexes durch PydG erklären.

Tabelle 4-2: Schmelztemperaturen der fehl gepaarten Duplexe **P2/C5 - P3/C10**, richtig gepaarten Duplexe **P5/C11** und **P6/C12** und Referenzduplexe **G1/C11** und **G2/C12**, 2,5 µM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7), 250 mM NaCl.

fehlgepaarter Duplex	Smp [°C]	richtig gepaarter Duplex	Smp [°C]	Referenz-Duplex	Smp [°C]
P2/C5	57	P2/C2	58		
P2/C6	56	P5/C11	51	G1/C11	65
P2/C7	60	P6/C12	55	G2/C12	65
P3/C8	53	P3/C3	52		
P3/C9	53				
P3/C10	56				

Um den Einfluss der Nachbarbasen sowie der Gegenbase auf die Emissionseigenschaften des Pyrenchromophors zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen.

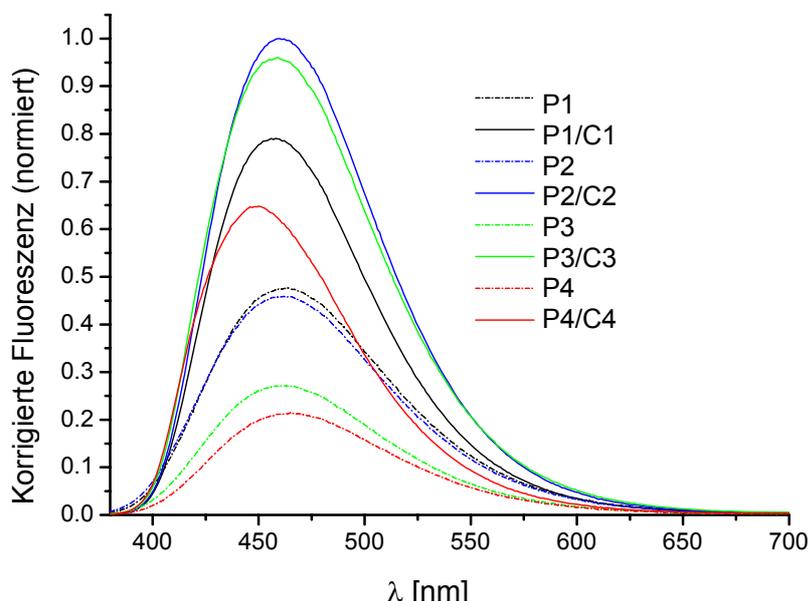


Abb. 4-12: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$) von $5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Alle vier PydG-modifizierten Duplexe **P1/C1–P4/C4** zeigen wie erwartet eine breite unstrukturierte Fluoreszenzbande, was typisch für einen Exciplex ist.^[47, 294, 295] Die Bildung des Exciplexes konnte in der spektroelektrochemischen Messung gezeigt werden (s. unter 4.2, Abb. 4-5). Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten können prinzipiell auf verschieden starke Stabilisierung des Exciplexes oder auf Ladungstransferprozesse zu den Nachbarbasen zurückgeführt werden. In den beiden Duplexen mit der geringsten Emission, **P1/C1** und **P4/C4**, befindet sich die PydG-Einheit in einer GC-Umgebung, so dass ein oxidativer Lochtransfer auf ein direkt benachbartes G im gleichen bzw. im Gegenstrang wahrscheinlich ist (s. Abb. 4-12).

Die Absorptionsspektren sowie Fluoreszenzspektren der fehl gepaarten Duplexe **P2/C5 - P3/C10** (s. Abb. 4-13, 4-14 und 4-15) unterscheiden sich nicht signifikant von denen der richtig gepaarten Duplexen **P2/C2** und **P3/C3** mit C als Gegenbase für PydG. Die Fluoreszenzintensitäten der fehl gepaarten Duplexe stimmen mit denen der richtig gepaarten Duplexe überein, was zeigt, dass die Gegenbase keinen Einfluss auf die Emission des PydG-Chromophors hat.

Es scheinen somit keine Watson-Crick-Brücken zwischen PydG und der Gegenbase vorzuliegen. Diese These wird gestützt von den Schmelzpunkten der fehlgepaarten Duplexen, die im gleichen Bereich wie die der richtig gepaarten Duplexe liegen.

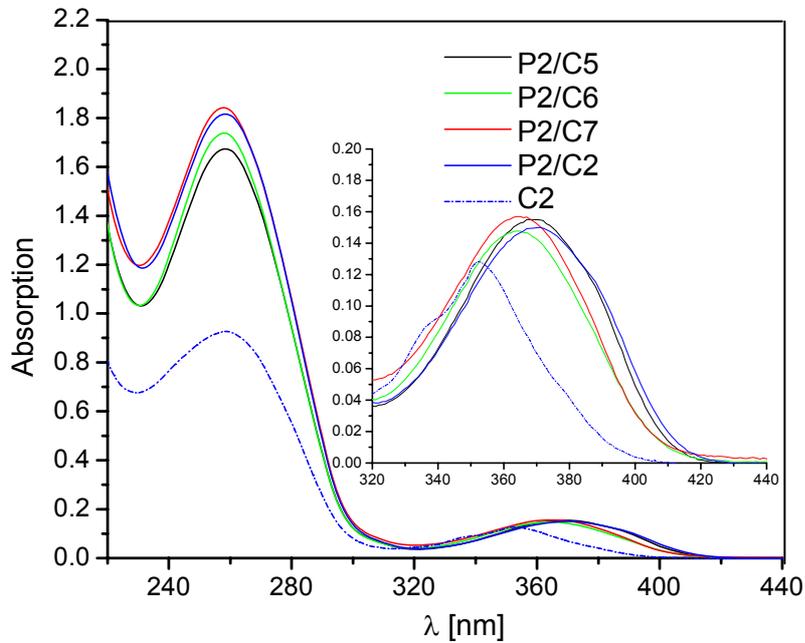


Abb. 4-13: Absorptionsspektrum von 5 µM DNA in 10 mM NaPi (pH 7).

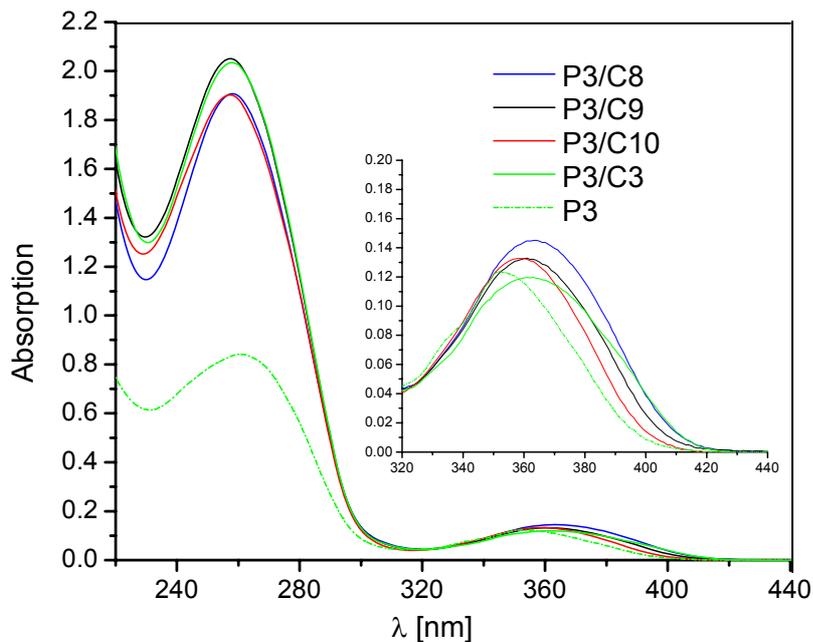


Abb. 4-14: Absorptionsspektrum von 5 µM DNA in 10 mM NaPi (pH 7).

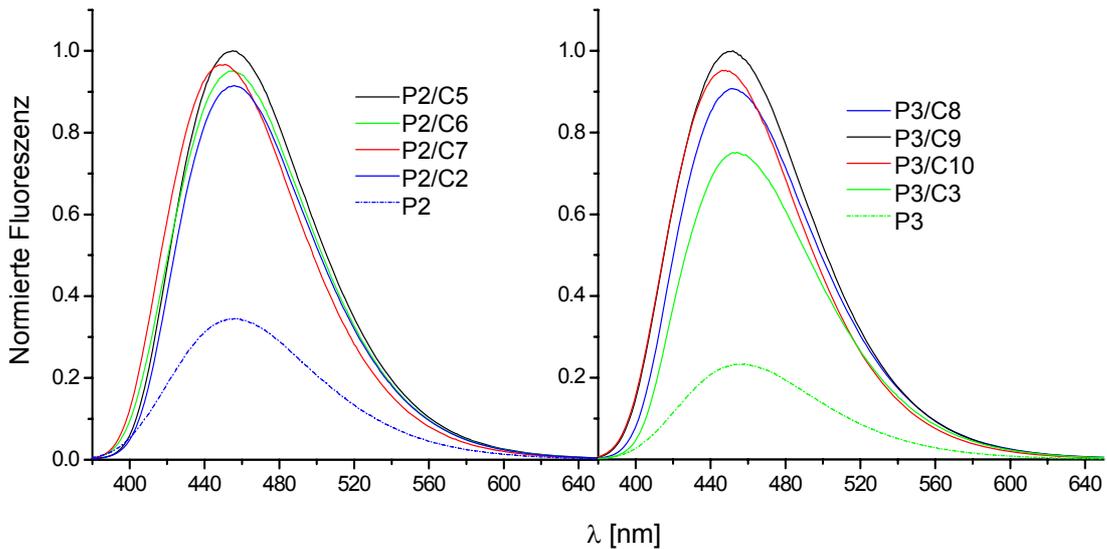


Abb. 4-15: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$) von $5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Es wurden Fluoreszenzspektren der Duplexe **P1/C1-P4/C4** mit Anregungswellenlängen zwischen $350\text{-}410 \text{ nm}$ aufgenommen. Bei allen Anregungswellenlängen ist die Emission des Duplexes gegenüber dem Einzelstrang deutlich erhöht. Um diese Fluoreszenzunterschiede besser zu verdeutlichen, wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten als Verhältnis der integrierten Emission des Duplexes zu dem des Einzelstranges aufgetragen (s. Abb. 4-16). Bei Anregungswellenlängen zwischen $390\text{-}410 \text{ nm}$ ist der Quotient am größten, bis zu ca. 23 für **P2/C2** bei $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$. In diesem Bereich sind die optischen Dichten der Duplexe gegenüber denen der Einzelstränge größer, wodurch eine relativ selektive Anregung der Duplexe ermöglicht wird.

Repräsentativ wurden die Quantenausbeuten (Φ) für die beiden Duplexe **P3/C3** und **P4/C4** sowie für die Einzelstränge **P3** und **P4** bei $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ermittelt. Man erhielt für den Duplex **P3/C3** für $\Phi_{\text{ds-DNA}}/\Phi_{\text{ss-DNA}} = 0.34/0.11$ und für den Duplex **P4/C4** für $\Phi_{\text{ds-DNA}}/\Phi_{\text{ss-DNA}} = 0.25/0.08$. Somit ergibt sich für $\Phi_{\text{ds-DNA}}/\Phi_{\text{ss-DNA}}$ ein Wert von ca. 3, was gut mit den relativen Fluoreszenzintensitäten (s. Abb. 4-16) übereinstimmt.

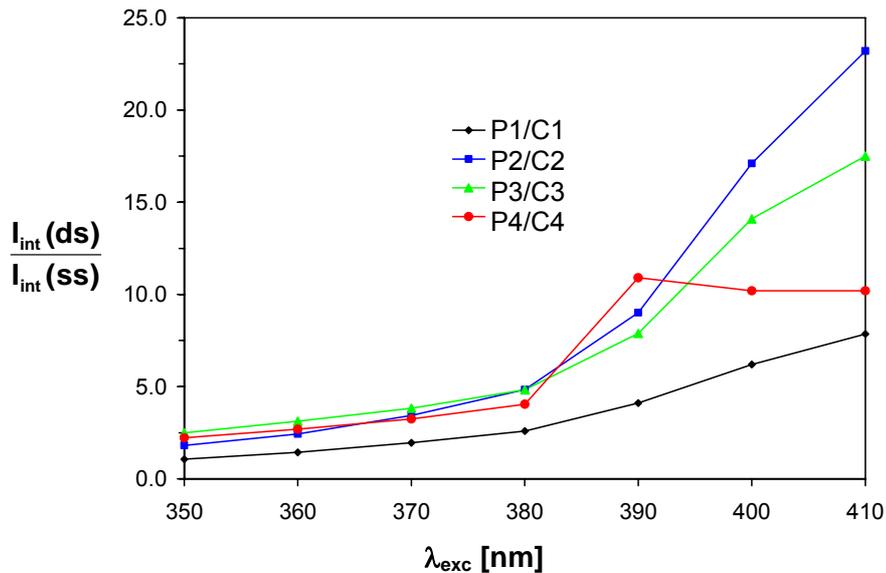


Abb. 4-16: Relative Fluoreszenzintensität I_{int} (Duplex zu Einzelstrang) von P1/C1-P4/C4 unterschiedlichen Anregungswellenlängen, 5 μM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Um näher zu untersuchen, ob das artifizielle PydG-Nukleotid eine signifikante Störung der DNA-Konformation verursacht, wurden CD-Spektren der richtig gepaarten Duplexe **P1/C1-P4/C4** sowie fehl gepaarten Duplexe **P2/C5-P3/C10** aufgenommen (s. Abb. 4-17).

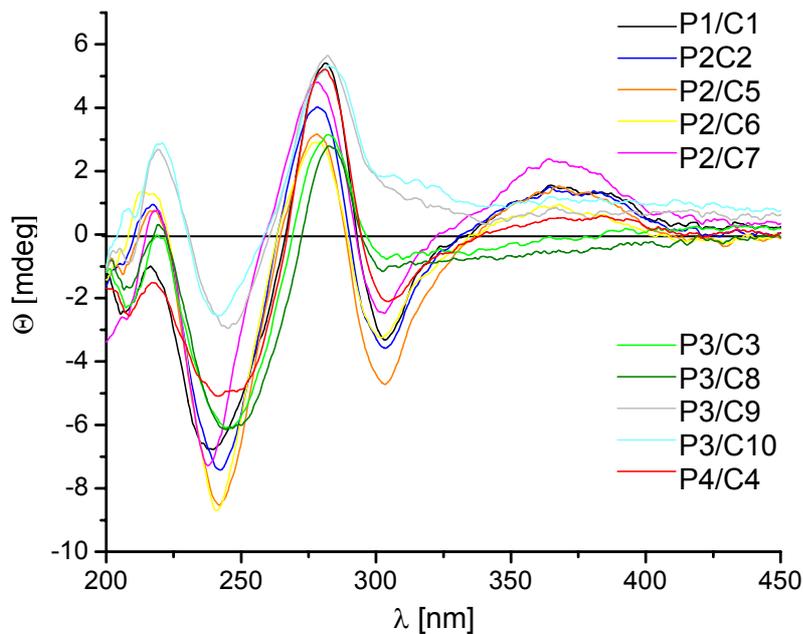


Abb. 4-17: CD-Spektren von 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

Alle Duplexe weisen den für B-DNA typischen Verlauf zwischen 200-300 nm mit einem Nulldurchgang bei ca. 260 nm auf. Zusätzlich zu diesen Signalen tritt bei allen Duplexen, außer **P3/C3-P3/C10**, eine scharfe negative Bande bei ca. 300 nm auf, die auf eine interkalierte Pyreneinheit hindeutet. Am intensivsten ist die negative Bande bei den Duplexen **P1/C1** und **P2/C2-P2/C7** zu beobachten. Hier befinden sich Pyrimidinbasen gegenüber der PydG-Einheit. Durch den geringeren sterischen Anspruch der Nukleobasen C und T im Gegensatz zu den Purinbasen kommt es vermutlich zu einer stärkeren Interkalation des Pyrens. Bei den Duplexen **P4/C4**, **P3/C3** und **P3/C8** ist zumindest ein schwaches negatives Signal bei ca. 300 nm zu sehen, wohingegen bei **P3/C9** und **P3/C10** in diesem Bereich kein scharfes Signal beobachtet wird. In den beiden Duplexen **P3/C9** und **P3/C10** befindet sich eine Purinbase gegenüber des PydG-Nukleotids, welche wahrscheinlich mit der Interkalation des Pyrens konkurriert. Insgesamt zeigen die CD-Spektren, dass durch das artifizielle Nukleotid die Duplex-Struktur nur lokal gestört wird und das Pyren in den Basenstapel zumindest partiell interkaliert ist. Die CD-Spektren der fehl gepaarten und richtig gepaarten Stränge zeigen ähnliche Kurvenverläufe, da die entsprechende Gegenbase sich vermutlich in einer extrahelikalen Position befindet und somit keinerlei signifikanten strukturellen Einfluss auf die unmittelbare Umgebung des PydG-Nukleotids im Duplex nimmt.

4.3.2 Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer im System PydG-Deazaguanin

Wie in der spektroelektrochemischen Messung (s. Kapitel 4.2, Abb.4-5) gezeigt, ist PydG (**2**) als photochemisch anregbarer Lochdonor^[31, 35] in DNA geeignet. Als Ladungs-akzeptor wurde 7-Deazaguanin (Z) eingesetzt, da es ein niedrigeres Oxidationspotenzial als Guanin besitzt. Das Oxidationspotential von Z beträgt 1.0 V.^[30] Dadurch sollte die Triebkraft für den oxidativen Lochtransfer gegenüber G um 0.3 eV erhöht sein. Es wurden PydG-modifizierte Oligonukleotidsequenzen **P10-P12** hergestellt, bei denen sich das Deazaguanin (Z) in einem Abstand von einem, zwei oder drei Basenpaaren vom Lochdonor PydG befindet. Die analogen Kontrollstränge **P7-P9**, bei denen an Stelle des Deazaguanins (Z) ein G eingebaut wurde, wurden ebenfalls synthetisiert. Als Gegenbase wird das bereits be-

schriebene Analogon der abasischen Stelle, der sog. *dSpacer*, eingesetzt. Dieses Analogon soll eine möglichst gute Interkalation der PydG-Einheit ermöglichen.

P7	5'-TGC-ATG-CAG-TPA-CTG-AC -3'	P10	5'-TGC-ATG-CAZ-TPA-CTG-AC -3'
C13	3'-ACG-TAC-GTC-AST-GAC-TG-5'	C13	3'-ACG-TAC-GTC-AST-GAC-TG-5'
P8	5'-GCA-TGC-AGT-TPA-CTG-AC -3'	P11	5'-GCA-TGC-AZT-TPA-CTG-AC -3'
C14	3'-CGT-ACG-TCA-AST-GAC-TG-5'	C14	3'-CGT-ACG-TCA-AST-GAC-TG-5'
P9	5'-CAT-GCA-GTC-TPA-CTG-AC -3'	P12	5'-CAT-GCA-ZTC-TPA-CTG-AC -3'
C15	3'-GTA-CGT-CAG-AST-GAC-TG-5'	C15	3'-GTA-CGT-CAG-AST-GAC-TG-5'

Z: Deazaguanin
S: dSpacer

Die Absorptionsspektren der Duplexe **P7/C13-P12/C15** (s. Abb. 4-18) zeigen wie erwartet die bathochrome Verschiebung von ca. 20 nm beim Übergang vom Einzelstrang zum Duplex. Bei den Emissionspektren (s. Abb. 4-19) lässt sich nur beim Duplex **P10/C13** eine geringe Fluoreszenzlöschung von ca. 10-20% beobachten. Hier befindet sich der Ladungsdonor PydG und der Ladungsakzeptor Z in einer kurzen Distanz mit einem dazwischenliegenden Basenpaar. Die beiden anderen Duplexe **P11/C14** und **P12/C15** mit Z zeigen kein deutlich verändertes Emissionsverhalten im Vergleich zu den Referenzduplexen **P8/C14** und **P9/C15**. Es lässt sich keine Fluoreszenzlöschung als Folge eines Ladungstransfers beobachten. Offensichtlich reicht die elektronische Kopplung zwischen Z und PydG nicht aus, um einen effizienten Ladungstransfer über mehr als ein dazwischen liegendes Basenpaar zu beobachten.

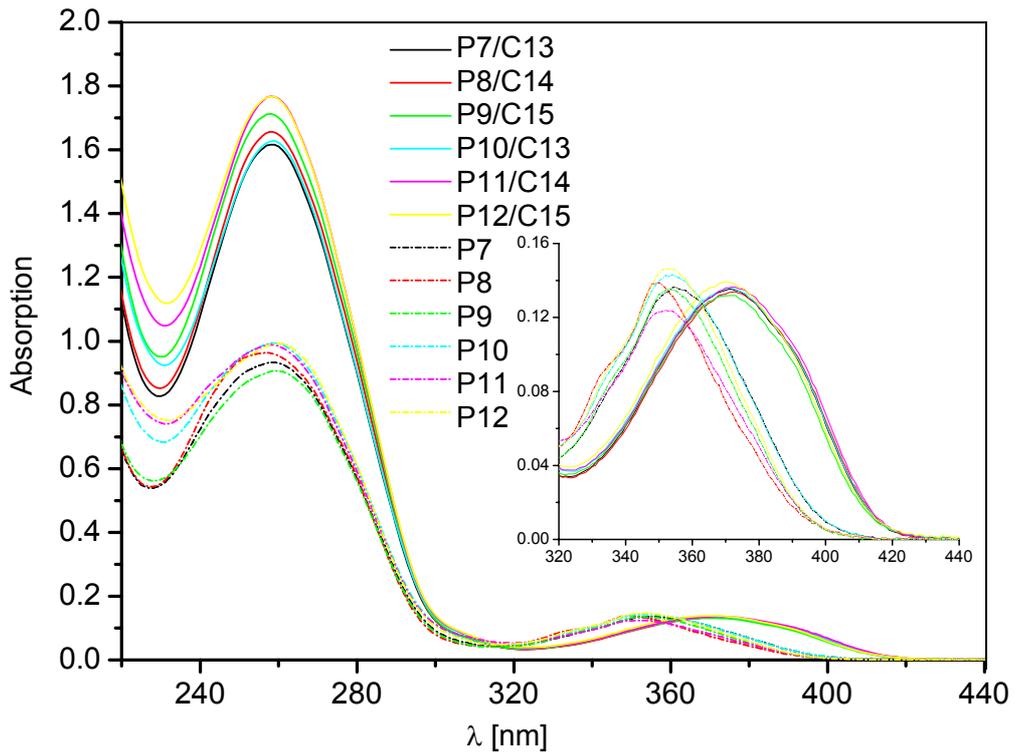


Abb. 4-18: Absorptionsspektrum von 5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i (pH 7).

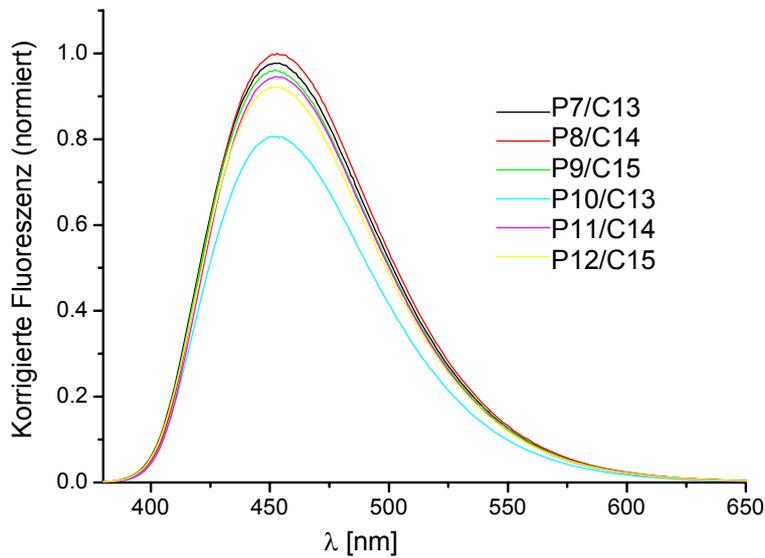


Abb. 4-19: Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 360$ nm) von 5 μ M DNA in 10 mM NaP_i (pH 7).

4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die unterschiedlichen Absorptions- und Emissionseigenschaften beim Übergang von einzel- zu doppelsträngiger DNA, stellt PydG eine interessante optische Sonde dar, mit der die DNA-Hybridisierung sowohl durch Absorptions- als auch Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden kann. Da die Gegenbase scheinbar keinerlei strukturellen und elektronischen Einfluss auf die PydG-Einheit ausübt, kann PydG als universelle Base betrachtet werden, was für eine Applikation als artifizielles Nukleotid und Hybridisierungssonde von Vorteil ist.

Die Untersuchung des oxidativen Lochtransfers im System PydG-Z über größere Distanz (> zwei Basenpaare) ist nicht möglich, da der Ladungstransfer zu wenig effizient ist. Hier muss ein geeigneter Akzeptor evtl. mit noch geringerem Oxidationspotential zur Verfügung gestellt werden, wodurch die Triebkraft des Ladungstransfers erhöht sein sollte. In neueren Arbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht et al.*^[296, 297] wurde Indol als Lochakzeptor eingesetzt. Hier konnte ein Ladungstransfer zwischen PydG und Indol beobachtet werden. Allerdings erwies sich dieses Donor-Akzeptor-System als nicht besonders sensitiv gegenüber Basenfehlpaarungen wie das bereits vorgestellte Ethidium-Z-Assay (s. Abschnitt 3.3.1). Zur SNP-Detektion kann es daher nicht eingesetzt werden.

4.4 Vergleich PydG-modifizierter Oligonukleotide mit C8-Arylamin-dG modifizierten Oligonukleotiden

Es ist bekannt, dass poly- und monozyklische aromatische Amine nach metabolischer Aktivierung im Körper kovalente Addukte mit den DNA-Basen bilden.^[298-301]

Im Besonderen an der C8-Position des 2'-Desoxyguanosins kommt es zur Reaktion mit den aromatischen Aminen.^[301, 302] Es besteht daher ein Interesse die mutagene Wirkung und die Struktur solcher DNA-Schäden näher zu untersuchen.

Zahlreichen Studien zur Mutagenität von C8-Addukten von Guaninen beschäftigen sich mit der durch die Substitution ausgelösten konformationellen Änderung in der DNA.^[303-308] In Arbeiten von *Gannett et al.*^[308] konnte gezeigt werden, dass der Einbau von C8-Phenylguanin in Oligonukleotide zu einer Bevorzugung der Z-gegenüber der B-DNA-Konformation führt. Für 8-oxo-dG ist bekannt, dass es durch die vorliegende *syn*-Konformation zur Bildung eines Hoogsten-Basenpaares mit Adenin kommt.^[309] Die Bevorzugung der *syn*-Konformation ist für C8-substituierte Guanine bekannt. Als Folge dieser Basenpaarung mit A wird bei der Replikation das ursprüngliche G-C-Paar durch ein G-T-Paar ausgetauscht. Eine Mutation hat sich manifestiert.^[304, 310-312]

Inwieweit die hier hergestellten C8-Arylamin-dG Addukte zur Strukturänderung in der DNA führen und welchen Einfluss sie auf die Duplexstabilität haben, soll im daher näher untersucht werden. Der Einfluss der modifizierten Nukleoside, C8-Arylamin-dG-Addukte und PydG, auf die Duplexstabilität soll miteinander verglichen werden.

4.4.1 Einbau von C8-Arylamin-dG in DNA

Durch die Synthese von Oligonukleotiden die C8-Arylamin-dG Addukte enthalten, soll es ermöglicht werden ihren Einfluss auf die DNA-Struktur zu untersuchen. Sehr effiziente Synthesen zur Herstellung von C8-Arylamin-dG modifizierten Oligonukleotiden wurde von *C. Meier et al.*^[301, 302, 313, 314] vorgestellt. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *C. Meier*, an der Universität Hamburg, wurden die folgenden Oligonukleotidsequenzen synthetisiert.

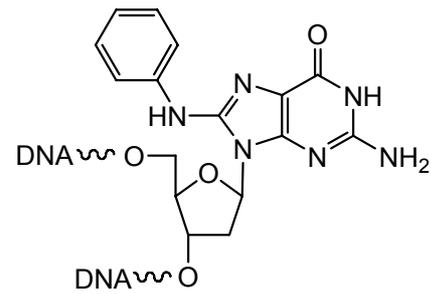
C8-Aryl-dG-modifizierte DNA

A30 5'-GCA-TCT-C**A**T-TCA-CTG-A-3'
C11 3'-CGT-AGA-GCA-AGT-GAC-T-5'

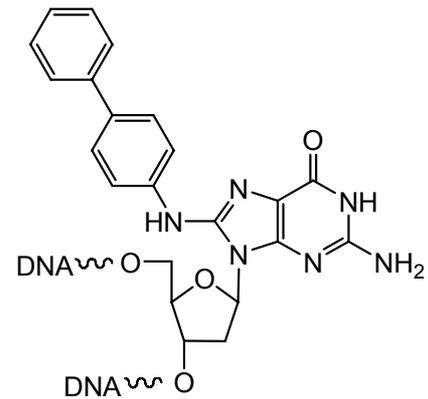
A31 5'-GCA-TCT-G**A**A-TCA-CTG-A-3'
C12 3'-CGT-AGA-CCT-AGT-GAC-T-5'

B32 5'-GCA-TCT-G**B**A-TCA-CTG-A-3'
C12 3'-CGT-AGA-CCT-AGT-GAC-T-5'

A:



B:

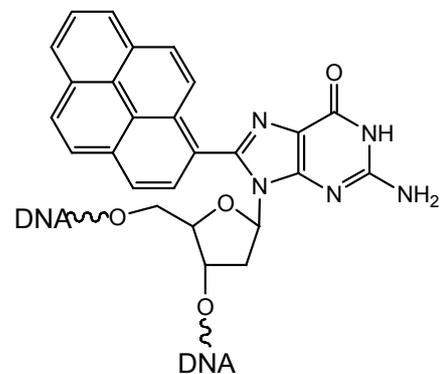


PydG-modifizierte DNA

P5 5'-GCA-TCT-C**P**T-TCA-CTG-A-3'
C11 3'-CGT-AGA-GCA-AGT-GAC-T-5'

P6 5'-GCA-TCT-G**P**A-TCA-CTG-A-3'
C12 3'-CGT-AGA-CCT-AGT-GAC-T-5'

P:



Referenzduplexe

G1 5'-GCA-TCT-C**G**T-TCA-CTG-A-3'
C11 3'-CGT-AGA-GCA-AGT-GAC-T-5'

G2 5'-GCA-TCT-G**G**A-TCA-CTG-A-3'
C12 3'-CGT-AGA-CCT-AGT-GAC-T-5'

Die C8-Arylamin-dG-Addukte **A** und **B** wurden als Phosphoramidite von Herrn N. Böge der Arbeitsgruppe *C. Meier*, zur Verfügung gestellt (s. unter 6. Materialien und Methoden). Der Einbau der Phosphoramidite erfolgte mit einem modifizierten Kupplungsprotokoll mit einer verlängerten Kupplungszeit von 60 min (s. unter 6. Materialien und Methoden). Dieses Kupplungsprotokoll wurde in Anlehnung an die vom Kooperationspartner optimierten Methoden erstellt. Der erfolgreiche Einbau der modifizierten Nucleoside lässt sich dem Tritylmonitor entnehmen (s. Abb. 4-20).

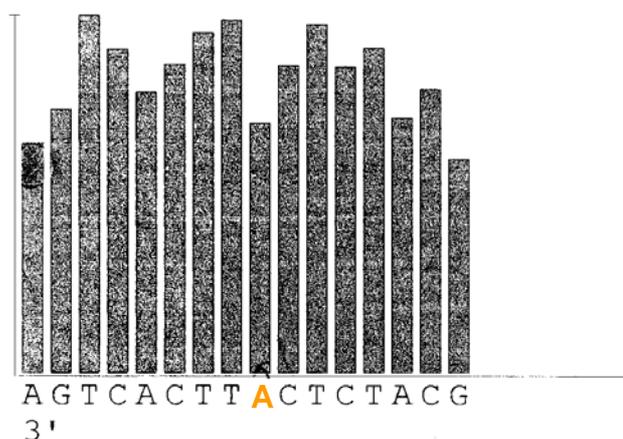


Abb. 4-20: Tritylmonitor der Synthese von C8-dG-Anilin-modifizierter DNA **A30**.

Die Aufarbeitung und Reinigung der modifizierten Oligonukleotide wird nach Standardbedingungen durchgeführt. Die Trennung mittels präparativer RP-HPLC erfolgte nach den typischen DNA-Absorptionsbanden bei 260 und 285 nm, da die C8-dG-Arylamin-Addukte keine charakteristische Absorption aufweisen (s. Abb. 4-21). Die Identität der modifizierten Oligonukleotide wurde mit MALDI-TOF-MS bestätigt.

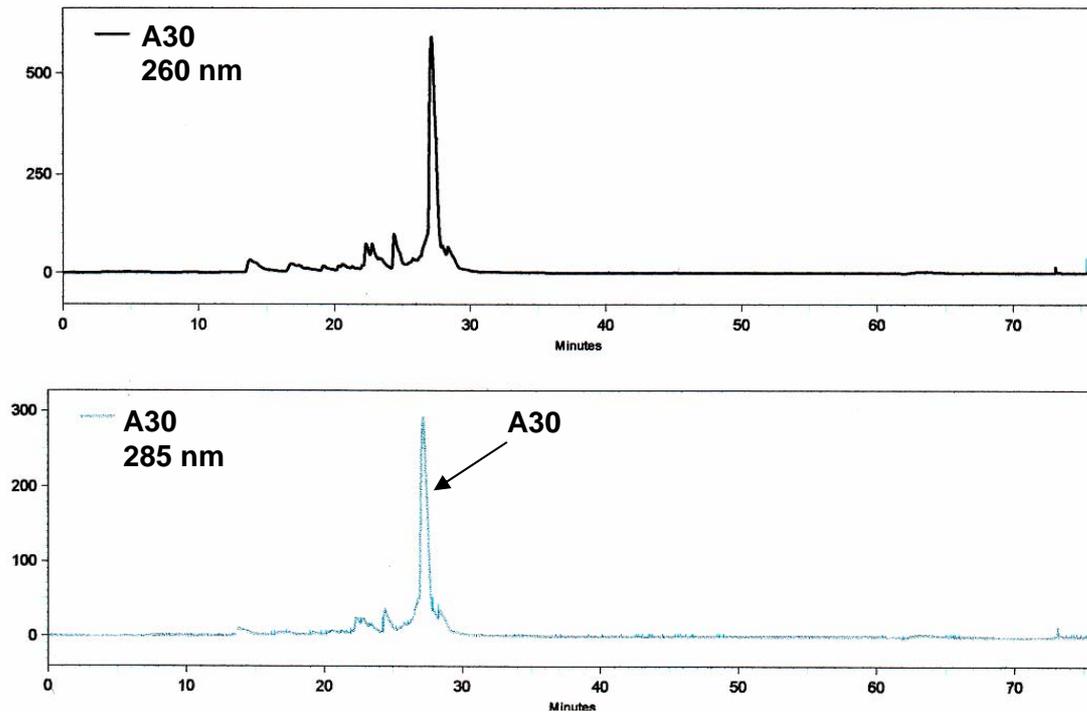


Abb. 4-21: HPLC-Spektrum des Anilin-modifizierten Stranges **A30** vor der präparativen Reinigung.

4.4.2 Spektroskopische Charakterisierung der Oligonukleotide

Die Absorptionsspektren des C8-Biphenyl-dG-modifizierten Oligonukleotids **B32** weisen im Einzelstrang sowie im Doppelstrang eine schwache breite Bande bei ca. ~300 -340 nm auf (s. Abb. 4-22). Diese Bande ist auf die Biphenyl-Einheit zurückzuführen. In den Oligonukleotiden **A30** und **A31** kann weder im Einzelstrang noch im Duplex eine signifikante Bande außerhalb des Absorptionsbereiches von unmodifizierter DNA beobachtet werden. Die Substitution mit einem Phenylring scheint kein ausreichend ausgedehntes π -System für die Anregung mit längerwelligem Licht zu schaffen.

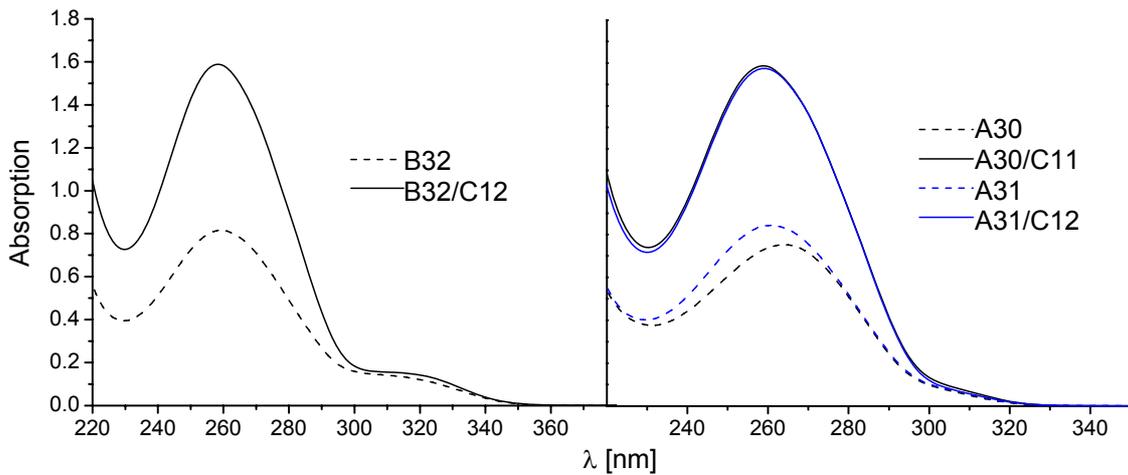


Abb. 4-22: Absorptionsspektren von Einzelstrang und Duplex, 5 μ M, 10 mM NaPi (pH 7).

Es wurden die Emissionseigenschaften des biphenylsubstituierten Oligonukleotids **B32** untersucht. Dazu wurde die Anregungswellenlänge im Bereich von 310-330 nm variiert (s. Abb. 4-23).

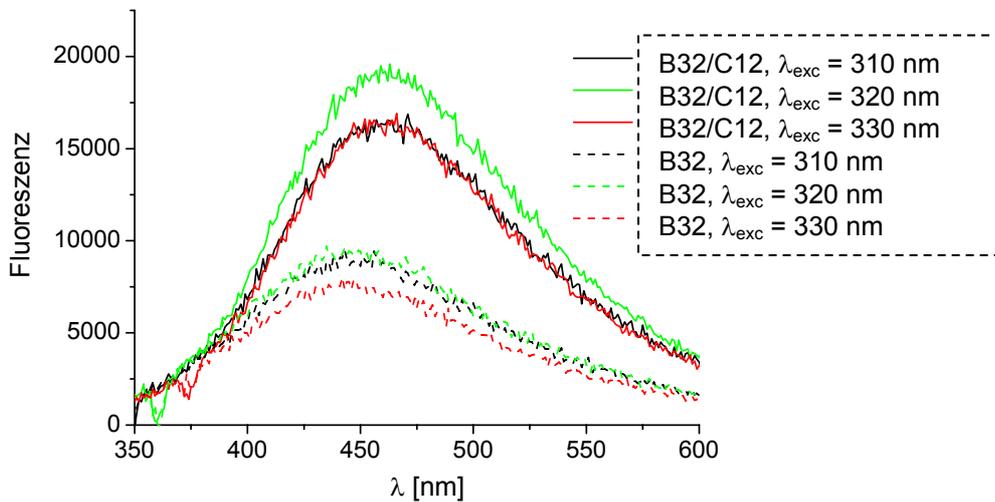


Abb. 4-23: Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 310-330$ nm) von 5 μ M DNA in 10 mM NaPi (pH 7).

Allerdings konnte keinerlei nennenswerte Fluoreszenz detektiert werden. Dies deutet auf eine effiziente Ladungsinjektion von photoangeregtem Biphenyl über das kovalent verbundene G in die DNA hin.

Um den Einfluss, der durch die C8-Arylamin-dG-Einheit ausgelöst, lokalen strukturellen Störung auf die Duplexstabilität zu untersuchen, wurden CD-Spektren aufgenommen sowie Schmelztemperaturen bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit den PydG-modifizierten Duplexen **P5/C11** und **P6/C12** sowie den Referenzduplexen **G1/C11** und **G2/C12** verglichen.

Die modifizierten Duplexe **A30/C11**, **A31/C12** und **B32/C12** weisen den für B-DNA typischen Verlauf zwischen 200-300 nm mit einem Nulldurchgang bei ca. 260 nm auf (s. Abb. 4-24). Zusätzlich zu diesen Signalen tritt bei dem Duplex **B32/C12** eine schwache negative Bande bei ca. 300 nm auf, die vermutlich auf die Biphenyl-Einheit zurückzuführen ist. Eventuell ist das ein Indiz darauf, dass die Biphenyl-Gruppe partiell interkaliert ist.

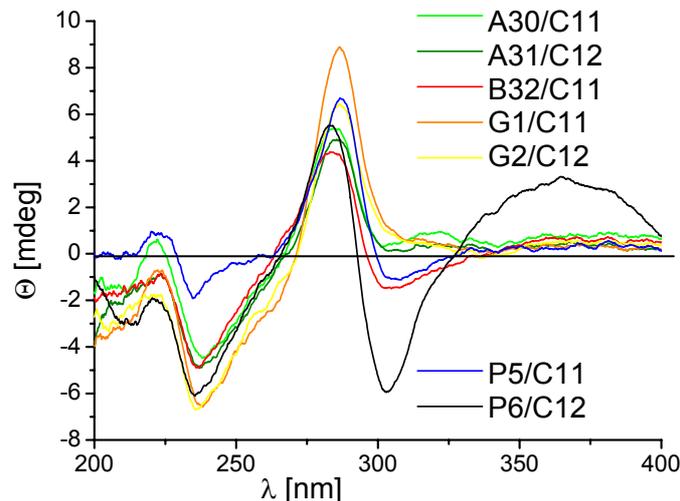


Abb. 4-24: CD-Spektren von 5 μ M DNA in 10 mM NaPi (pH 7).

Bei den PydG-modifizierten Duplexen tritt wie bereits erläutert (s. Kapitel 4.3) eine scharfe negative Bande bei ca. 300 nm auf, die auf eine interkalierte Pyrenereinheit hindeutet.

Die Schmelztemperaturen der Duplexe **A30/C11**, **A31/C12** und **B32/C12** liegen um 5-6°C unterhalb denen der unmodifizierten Referenzduplexe (s. Tab. 4-1). Die C8-Arylamin-dG-Addukte scheinen nur zu einer geringen Destabilisierung der DNA-Duplexe zu führen. Für die korrespondierenden PydG-modifizierten Duplexe **P5/C11** und **P6/C12** wird ein wesentlich drastischeres Absinken der Schmelztemperatur um 10-14°C beobachtet. Die geringere Destabilisierung der C8-

Arylamin-dG-modifizierten Duplexe ist wohl auf den kleineren sterischen Anspruch der Arylamine im Vergleich zum Pyren zurückzuführen.

Tabelle 4-3: Schmelztemperaturen der Duplexe A30/C11, A31/C12, B32/C11, P5/C11, P6/C12 und der Referenzduplexe G1/C11 und G2/C12 bei, 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i (pH 7), 250 mM NaCl.

Duplex	Smp [$^{\circ}\text{C}$]
A30/C11	59
A31/C12	60
B32/C12	59
G1/C11	65
G2/C12	65
P5/C11	51
P6/C12	55

4.4.3 Zusammenfassung

Der Einbau von C8-Addukten aus G und Arylaminen scheint zu keiner drastischen Destabilisierung des DNA-Duplexes zu führen, im Gegensatz zu PydG-modifizierten Duplexen. Im letzten Fall ist eine signifikante Abnahme der Schmelztemperatur zu beobachten. Dies ist wohl auf den kleineren sterischen Anspruch der Arylamine im Vergleich zum Pyren zurückzuführen. Die CD-Spektren sowie Schmelzpunkte verhalten sich ähnlich zu den Referenzduplexen. In neueren Arbeiten von *N. Böge et al.*^[314] konnte gezeigt werden, dass die C8-dG-Addukte mit Anilin, p-Toluidin, p-Anisidin sowie 4-Aminobiphenyl in Oligonukleotiden zu keiner signifikanten Strukturänderung des DNA-Duplexes führen. Um näheren Aufschluss über den Zusammenhang zwischen diesen C8-Addukten und ihrer Mutagenität zu erhalten, sind biochemische Studien erforderlich.

4.5 Synthese und optische Charakterisierung von BpdG(3)

4.5.1 Hintergrund

Benz[a]pyren zählt zu den potentesten Kanzerogenen innerhalb der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH).^[36] Die Kanzerogenität dieser Verbindung ist auf ihre metabolische Aktivierung im Körper, bei der das Cytochroms P450 eine entscheidende Rolle spielt, zurückzuführen. Man unterscheidet dabei zwei Hauptmechanismen, die Monooxygenierung (**A**) und die Ein-Elektronenoxidation (**B**) (s. Abb. 4-25).^[39, 315] Die Monooxygenierung führt zur Bildung von vier isomeren Diolepoxiden während die Ein-Elektronenoxidation zur Erzeugung des Benzpyrenradikalkations führt. Beides stellen stark elektrophile Spezies dar, die bevorzugt mit den elektronenreichen Purinen der DNA reagieren, im Besonderen mit den Aminogruppen von Adenin und Guanin. Diese kovalenten Addukte verbleiben in der DNA bis sie repariert werden, oder es zur spontanen Depurinierung kommt, wobei eine abasische Stelle in der DNA erzeugt wird.^[39] Besonders die durch die Einelektronenoxidation (**B**) gebildeten Addukte depurinieren leicht.^[39, 315] Im Fall des Guanins bzw. Desoxyguanosin konnten N2- und N7-Addukte sowie C8-Addukte als Hauptprodukte identifiziert werden.^[37] Diese Addukte konnten bisher nur in Experimenten durch elektrochemische bzw. enzymatische Oxidation von Benzpyren erzeugt werden.^[40, 41]

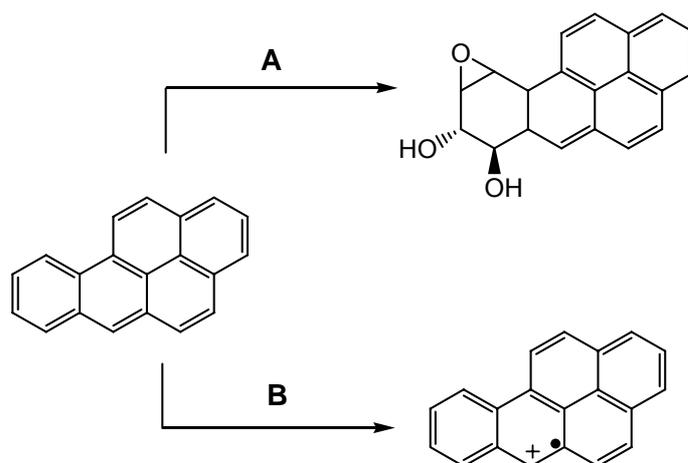


Abb. 4-25: Metabolische Aktivierung von Benz[a]pyren.

Die Depurinierungstendenz der Benzpyren-Addukte ist von entscheidender Bedeutung bei der Induktion von Tumoren^[38, 39], da die entstehenden abasischen Stellen zu den wichtigsten mutagenen DNA-Schäden zählen.^[316] Im Besonderen für 8-Benz[a]pyren-6-yl-2'-desoxyguanosin (**3**) ist die starke Labilität gegenüber Depurinierung in der Literatur beschrieben.^[38-41] Um näheren Aufschluss über die elektronischen und chemischen Eigenschaften dieses C8-Addukts zu erhalten, soll es zunächst chemisch synthetisiert und dann spektroskopisch untersucht werden.

4.5.2 Synthese von 8-Benz[a]pyren-6-yl-2'-desoxyguanosin

Die Verknüpfung der Benz[a]pyreneinheit mit dem Nucleosid erfolgte über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktion (s. Abb. 4-26).^[231] Die Anknüpfung des Benzpyrenrestes an das 2'-Desoxyguanosin erfolgte in Analogie zur PydG-Synthese^[47, 49] über die Reaktion von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (**22**) mit dem Boronsäure-Pinakolester (**27**).^[317] Dabei erhielt man 8-(6-benzo[a]pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (BpdG, **3**), im Gegensatz zur PydG-Synthese nur in Ausbeuten von 25 %. 6-Benzo[a]pyrenylboronsäure-Pinakolester (**27**) ist durch Umsetzung von 6-Brombenzo[a]pyren (**26**) mit 4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-Dioxaborolan (Pinakolboran) in moderaten Ausbeuten von 25-30 % zugänglich und orientiert sich an Vorschriften in der Literatur.^[318] Diese Reaktion verläuft unter Palladium-Katalyse und ist zur Darstellung von Boronsäure-Pinakolester aus Arylhalogeniden von *Masuda* beschrieben worden.^[319]

Die Darstellung von 6-Brombenzo[a]pyren (**26**) erfolgte durch Bromierung von kommerziell erhältlichen Benz[a]pyren (Bp) mit NBS in Tetrachlorkohlenstoff und ist in der Literatur beschrieben.^[320, 321] Die Darstellung der entsprechenden Boronsäure ausgehend von 6-Brombenzo[a]pyren durch Lithiierung mit *n*-Butyllithium und anschließender Umsetzung mit Trimethylborat in Analogie zur Synthese der 1-Pyrenylboronsäure^[291, 292] war nicht erfolgreich.

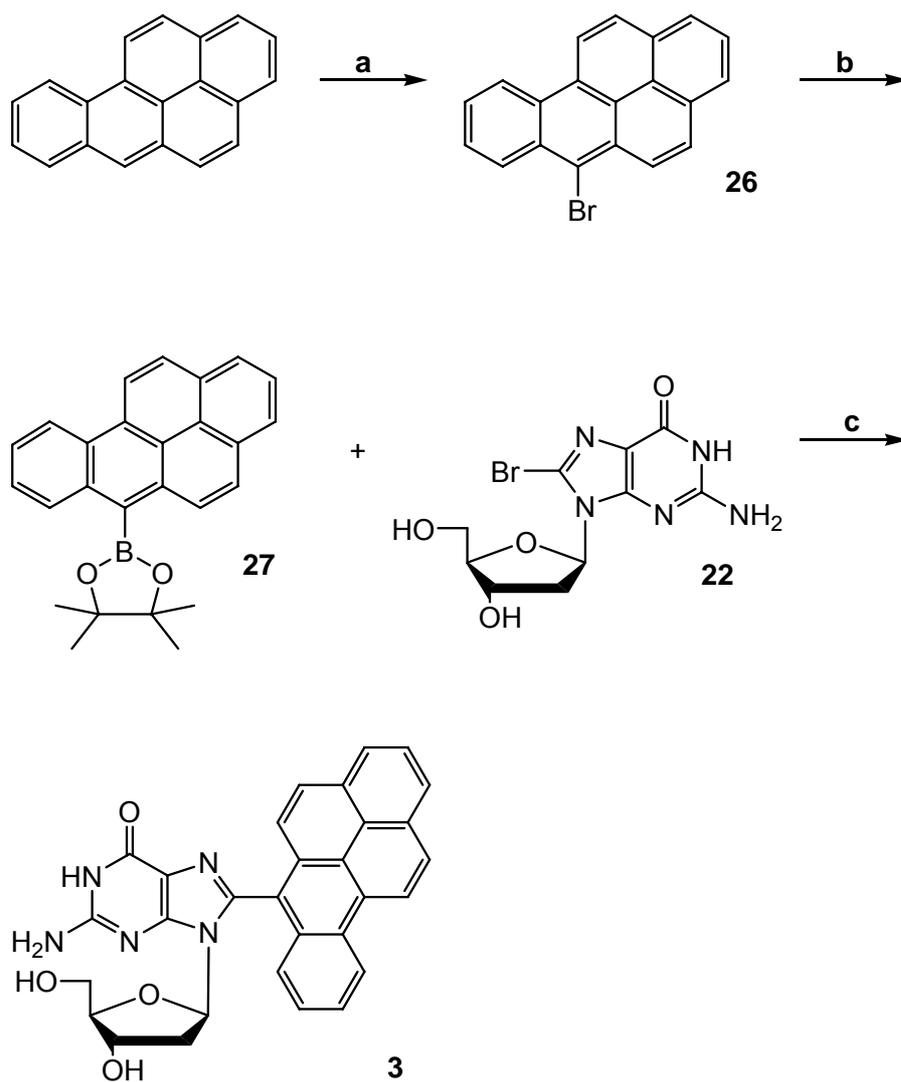


Abb. 4-26: Synthese von BpdG (**3**): (a) NBS, (CCl₄), 80°C, 3 h, 86 %; (b) Pinakolboran, NEt₃, PdCl₂dppf, (Dioxan), 100°C, 28 h, 25 %; (c) Pd(PPh₃)₄, NaOH, (THF/MeOH/H₂O), 60°C, 24 h, 25 %.

Zur Untersuchung des Nucleosids mittels optischer Spektroskopie wurde eine weitere Reinigung mit Hilfe von präparativer Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Man erhält dabei das Nucleosid als gelben Feststoff.

4.5.3 Spektroskopische Untersuchungen von BpdG (3)

Das Absorptionsspektrum von BpdG (3) in MeOH zeigt gegenüber Benz[a]pyren eine bathochrome Effekt im Bereich von 330 bis 420 nm (s. Abb. 4-27). Diese Rot-Verschiebung ist auf den elektronischen Einfluss der Guanineinheit auf das Benzpyren-Chromophor zurückzuführen. Um die elektronischen Eigenschaften von BpdG (3) unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden als Lösungsmittel Wasser-Methanol-Gemische verwendet. Aus Gründen der Löslichkeit war ein Gehalt von mindestens einem Prozent Methanol in Wasser unerlässlich. In den Lösungsmittelgemischen tritt eine zusätzliche Rot-Verschiebung und Verbreiterung der Absorptionsbanden gegenüber dem Nukleosid in reinem Methanol auf. Allerdings verhält sich BpdG in der DNA vermutlich eher ähnlich wie in Methanol als in Wasser. Dies konnte für pyrenmodifizierte Nucleoside in früheren Arbeiten gezeigt werden.^[295, 322]

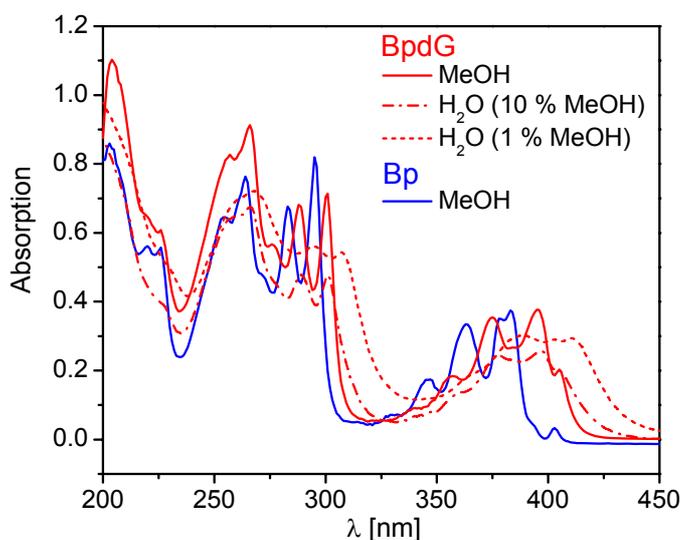


Abb. 4-27: Absorptionsspektren von BpdG (3) in MeOH und MeOH/H₂O im Vergleich zu Bp in MeOH.

Die Emissionsspektren von BpdG (**3**) in Methanol weisen breite Banden auf, die keinerlei Feinstruktur, wie sie vom Benzpyren bekannt ist, zeigen (s. Abb. 4-28). Die direkte C-C-Verknüpfung des Chromophors mit der Guanineinheit führt zu einer starken elektronischen Kopplung der beiden π -Systeme. Daher ist das C8-Addukt des Benzpyrens als ein einziges großes Chromophor zu betrachten, in dem die beiden aromatischen Systeme stark elektronisch miteinander wechselwirken. Die photochemische Anregung von BPdG führt zur Bildung eines intramolekularen Exciplexes, der den angeregten Zustand (Bp-dG)* sowie ladungsgeladene Spezies $\text{Bp}^{\bullet-}$ - $\text{dG}^{\bullet+}$ enthält. Dieser Exciplex zeigt eine breite, unstrukturierte Fluoreszenzbande, die lösungsmittelabhängige Maxima aufweist.^[294, 295, 322, 323]

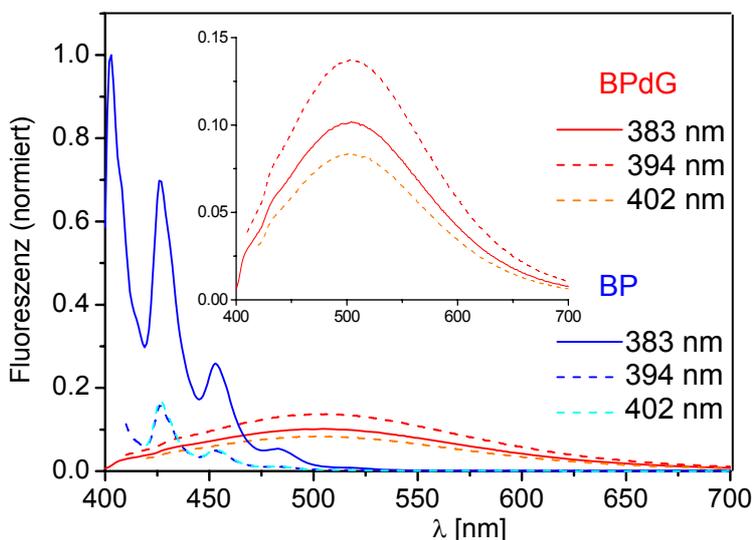


Abb. 4-28: Fluoreszenzspektren von BpdG (**3**) und Bp in MeOH, $\lambda_{\text{exc}} = 383 - 402$ nm.

Der intramolekulare Ladungstransfer konnte in früheren Arbeiten an Benzo[a]pyren-6-yl-2'-desoxyguanosin-Derivaten, die BpdG (**3**) elektronisch sehr ähneln, in ps-zeitaufgelösten transienten Absorptionsmessungen gezeigt werden.^[165, 288] Anhand der Redoxpotentiale, $E_0(\text{Bp}/\text{Bp}^{\bullet-}) = -1.65$ V (vs. NHE)^[287] und $E_0(\text{dG}^{\bullet+}/\text{dG}) = 1.3$ V^[31], der Singulett-Anregungsenergie des Benzpyrens $E_{00}(\text{Bp}^*) = 3.25$ V und der *Rehm-Weller-Gleichung* ergibt sich eine Triebkraft für diese Reaktion von ca. ~ -0.3 eV. Es ist denkbar, dass durch Bildung des ladungsgeladenen Zustandes in BpdG ein oxidativer Lochtransport in DNA ausge-

löst werden könnte, der eine oxidative Schädigung an benachbarten oder weiter entfernten Guaninen zur Folge hätte. Dies könnte zusätzlich zur bekannten mutagenen und karzinogenen Wirkung des BPdG beitragen.

Es ist daher vorstellbar, dass es unter Lichteinwirkung vermehrt zur Depurinierung von BPdG kommt. Um die Stabilität der glykosidischen Bindung unter Lichteinfluss zu untersuchen, wurde das Nucleosid mit Licht $\lambda > 305$ nm bestrahlt, wobei nur das Benzpyren-Chromophor aber nicht die Nucleobase angeregt wird. Zunächst wurde das Nucleosid in reinem Methanol über 5 h belichtet und der Verlauf über Aufnahme von Absorptionsspektren sowie HPLC-MS verfolgt. Dabei konnte keinerlei Zersetzung beobachtet werden. Als Kontrollreaktion wurde BPdG in Methanol mit 1 % Trifluoressigsäure (pH \sim 1.5) versetzt, was zur vollständigen Depurinierung zu **(28)** führte (s. Abb. 4-29, *rechts*).

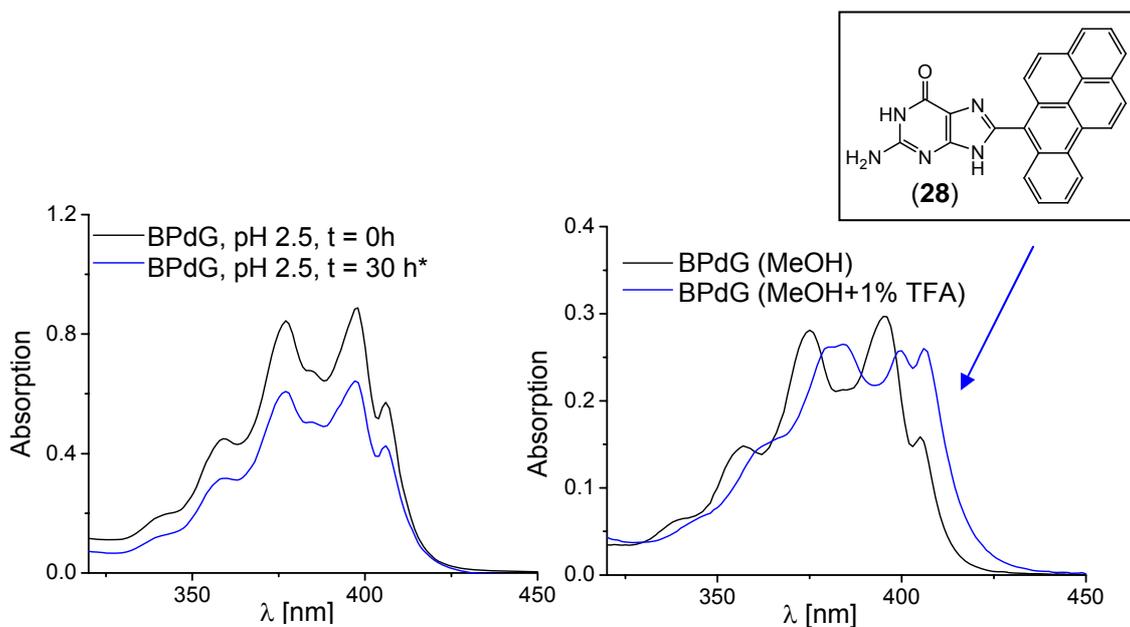


Abb.4-29: Absorptionsspektren von BpdG (**3**):
links: in MeOH/H₂O 1:1, pH = 2.5 (0.5 M Citratpuffer) nach 30h (Dunkelprobe)*; *rechts:* BPdG in MeOH mit 1% TFA (Kontrollexperiment).

Im Folgenden wurde untersucht, ob unter sauren Bedingungen der Lichteinfluss eine beschleunigte Depurinierung zur Folge hat. Dazu wurden Lösungen des Nucleosids in Wasser/Methanol 1:1 mit pH-Werten von 5, 4.5, 3.5 und 2.5 (jeweils mit Citratpuffer 0.5 M eingestellt) hergestellt. Dabei konnte allerdings bei pH $>$ 2.5 keinerlei Depurinierung beobachtet werden, weder im Dunkeln (nach 20 h) noch unter Lichteinfluss (nach 5 h). Nur bei einem pH-Wert von 2.5 fand Depuri

nierung statt. Dabei war nach 30h eine partielle Zersetzung des Nukleosids (**3**) zu beobachten (s. Abb. 6-5). Dies wurde durch die Abnahme der Intensität der Absorptionsbanden im Bereich von 300 bis 450 nm beobachtet. Die Depurinierung zu 8-(6-benzo[a]pyrenyl)-Guanosin (**28**) und Benz[a]pyren wurde durch HPLC-MS nachgewiesen. Das Ausmaß der Zersetzung wurde aus dem HPLC-Spektrum mit 30 % abgeschätzt. Diese Zersetzung wurde auch im Dunkeln beobachtet, war also nicht lichtabhängig.

4.5.4 Zusammenfassung

In BpdG (**3**) sind die Nukleobase und die Benzpyreneinheit über eine C-C-Einfachbindung miteinander elektronisch stark gekoppelt. BpdG zeigt eine typische Exciplex-Fluoreszenz, die durch breite unstrukturierte Banden im Vergleich zum Benz[a]pyren gekennzeichnet ist. Der photoinduzierte intramolekulare Ladungstransfer in BpdG trägt nicht zur bekannten Depurinierungsstabilität des Nukleosids bei. Dies konnte in den durchgeführten Belichtungsexperimenten gezeigt werden. Hier ergab sich eine überraschende Stabilität des Nukleosids gegenüber hydrolytischer Spaltung, die nur bei pH-Werten von ≤ 2.5 beobachtet werden konnte und unabhängig von Lichteinwirkung stattfindet. Um genaueren Aufschluss über mögliche lichtinduzierte Ladungstransferprozesse von BPdG in DNA, die eventuell zu seinem kanzerogenen Potential beitragen, zu erhalten sind weitergehende Untersuchungen in DNA notwendig.

5 Zusammenfassung

I. Um den oxidativen sowie reduktiven Ladungstransfer untersuchen zu können, wurden ethidiummodifizierte Oligonukleotide synthetisiert, die 7-Deazaguanin bzw. 5-Nitroindol, als geeignete Ladungsakzeptoren, jeweils im Abstand von ein bis drei Basenpaaren zum Ethidium als Ladungsdonor enthalten. Durch die strukturelle Ähnlichkeit des E/Z- und E/N-Donor-Akzeptor-Systems konnte zum ersten Mal der reduktive und oxidative Ladungstransfer miteinander verglichen werden. Durch zeitaufgelöste Messungen konnte gezeigt werden, dass der Ladungstransfer vom Ethidiumnukleotid zu dem Ladungsakzeptor beim reduktiven wie oxidativen Ladungstransfer stark distanzabhängig ist. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass beide Ladungstransferarten nach dem Superaustausch-Mechanismus ablaufen. Diese starke Abstandsabhängigkeit unterscheidet sich deutlich vom „Caltech System“. Das kann mit der eingeschränkten konformationellen Flexibilität des rigiden Ethidiums nucleosids, die die für einen effizienten Ladungstransfer notwendige Umorientierung des photoangeregten Ethidiums kaum bzw. nicht ermöglicht, erklärt werden („*gating effect*“). Dieses Ergebnis unterstreicht den bedeutenden Einfluss der DNA-Dynamik auf die Distanzabhängigkeit und Geschwindigkeit des Ladungstransfers.

Der Einfluss von Basenfehlpaarungen auf den oxidativen Lochtransfer im System Ethidium-Deazaguanin wurde detailliert untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass über eine Distanz von zwei Basenpaaren jede Basenfehlpaarung bzw. abasische Stelle zuverlässig mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden kann. Allerdings ist der Ladungstransfer im System Ethidium-Deazaguanin nur über zwei Basenpaare ausreichend effizient, um die konformationellen Einflüsse der Basenfehlpaarungen zu reflektieren. Versuche, Basenfehlpaarungen über eine Distanz von drei Basenpaaren Abstand zwischen Ethidium und Deazaguanin zu detektieren, waren nicht möglich. Die Untersuchung eines gesamten Codons, was beispielhaft an zwei wichtigen Mutationen des p53-Gens erprobt wurde, ist innerhalb dieses Assays daher leider nicht möglich.

Desweiteren wurde die Linkerlänge des Ethidiumbasensurrogats variiert. Dazu wurde ein Syntheseprotokoll ausgearbeitet, das es ermöglicht, das Ethidium als artifizielle Nukleobase über eine längere Linkereinheit, einen Threoninollinker, in Oligonukleotide einzubauen. In vorläufigen optisch-spektroskopischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Threoninollinkers zu keiner Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Ethidiumchromophors führt. Allerdings hat die thermische Stabilität der Duplexe mit der längeren Linkereinheit im Vergleich zur Verwendung des Aminopropandiollinkers abgenommen.

II. Es wurden PydG-modifizierte Oligonukleotide synthetisiert und detailliert spektroskopisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PydG eine interessante optische Sonde darstellt, mit der die DNA-Hybridisierung sowohl durch Absorptions- als auch Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden kann. Darüberhinaus zeichnet sich PydG als universelle Base aus, was für eine Applikation als artifizielles Nukleotid und Hybridisierungssonde von Vorteil ist. Desweiteren wurden Untersuchungen zum oxidativen Lochtransfer mit dem System PydG-Z durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Ladungstransfer nur über ein Basenpaar ausreichend effizient ist.

In Analogie zu den PydG-modifizierten Duplexen wurden C8-Arylamin-dG modifizierte Duplexe hergestellt und die Duplexstabilität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die C8-Arylamin-dG-Addukte im Gegensatz zur PydG-Einheit zu keiner drastischen Destabilisierung des DNA-Duplexes führt. Dies lässt sich mit dem kleineren sterischen Anspruch der Arylamine im Vergleich zum direkt C-C-verknüpften Pyren erklären.

In Analogie zu PydG wurde 8-(6-benzo[a]pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (BpdG) als potentiell cancerogener DNA-Schaden synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert. Aufgrund der starken elektronischen Kopplung der Nukleobase mit der Benzpyreneinheit beobachtet man eine typische Exciplex-Fluoreszenz. Durch Belichtungsexperimente konnte gezeigt werden, dass der photoinduzierte intramolekulare Ladungstransfer keinen Einfluss auf die Depurinierung des Nukleosids hat. Es ergab sich dabei eine überraschende Stabilität des Nukleosids gegenüber hydrolytischer Spaltung. Nur bei pH-Werten von ≤ 2.5 konnte Depurinierung beobachtet werden, die unabhängig von der Lichteinwirkung stattfindet.

6 Materialien und Methoden

6.1 Materialien und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Reagenzien stammten von den Firmen *Merck*, *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Eurogentech* und *ABCR*. Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, trockene Lösungsmittel von *Fluka* bezogen und unter Argon aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Reaktionsführung

Die Reaktionen wurden falls erforderlich unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6; 99,996 % Reinheit) bzw. unter Stickstoffatmosphäre (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) durchgeführt.

Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden fertig beschichtete DC-Alufolien der Firma *Merck* verwendet, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ belegt sind (Schichtdicke: 0.25 mm). Die Auswertung der DC-Platten erfolgte mittels Fluoreszenzlöschung bei 254 nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei 366 nm. Es wurden auch chemische Anfärbereagenzien verwendet:
MeOH/H₂SO₄ (2 %)-Lösung wurde v. a. zur Detektion von tritylierten Verbindungen eingesetzt. Das charakteristisch orangefarbene Tritylkation wurde nach Erhitzen mit dem Heißluftfön sichtbar. Für Amine wurde eine Ninhydrin (5 %)/Ethanollösung verwendet.
- Präparatives DC: Es wurden DC-Glasplatten der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 2 mm verwendet, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtet sind.
- Flash-Säulenchromatographie: Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 0.40-0.63 µm eingesetzt. Es wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[324] mit ca. 0.4

bar Überdruck chromatographiert. Die Auftragung der zu reinigenden Substanz erfolgte als Lösung im Laufmittel oder an Kieselgel adsorbiert.

HPLC

Reversed-Phase HPLC wurde mit einer Shimadzu HPLC-Anlage durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multi-diodenarray SPD-M10A). Für die Analytik der Oligonukleotide wurde eine Supelcosil LC-318-Säule (25 cm x 4.6 mm, *Supelco*) verwendet, für die semi-präparative Trennung eine Supelcosil LC-318 (25 cm x 10.0 mm, ID, 5 µm). Die Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5, Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) von 0-15% B (für unmodifizierte DNA) bzw. 0-30% B (für fluoreszenzmarkierte DNA) durchgeführt. Eluiert wurde mit 1 ml/min (analytisch) bzw. 2.5 ml/min (semi-präparativ). Für ethidium-modifizierte DNA-Stränge wurde eine *Supleco* Discovery BIO Wide Pore C5 für die Analytik (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) sowie für die semi-präparative Trennung (25 cm x 4.1 mm, 5 µm) eingesetzt.

Die Detektion der Oligonukleotide erfolgte bei 260 und 290 nm für nicht-fluoreszente DNA. Für PydG-modifizierte Oligonukleotide wurde die charakteristische Absorption des Pyrens bei 340 nm zur Trennung verwendet. Bei ethidium-modifizierten Oligonukleotiden wurde die Absorption bei 530 nm genutzt. Zusätzlich wurde Fluoreszenzdetektion (Anregung bei 530 nm, Messung bei 580 nm) eingesetzt.

Lyophilisation

Wässrige Lösungen wurden an einer Speed-Vac RC 10.22 der Firma *Joan* nach Ausfrieren mit flüssigem Stickstoff lyophilisiert.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese wurde an einem Expedite 8900 *Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Als feste Träger wurden CPGs mit 1 µmol Belegung (500 Å) verwendet. Phosphoramidite und CPG-säulen wurden bei *ABI*, *Glen Research* oder *Eurogentec*, Synthesizerchemikalien und Reagenzien bei *ABI* bezogen.

Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden an der TU München an einem *Finnigan LQC-ESI*-Spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden dafür in Acetonitril (LiChrosolv, *Merck*) aufgenommen und durch einen HPLC-Filter (0.45 μm , Firma *Satorius*) filtriert. Die MALDI-TOF Massenspektren der Oligonukleotide wurden an einem *Brucker Biflex III* Spektrometer im negativen Detektionsmodus aufgezeichnet. An der Universität Regensburg wurden ESI-Spektren von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie an einem *Finnigan TSQ 7000*-Spektrometer aufgenommen. Die Angabe der Signale erfolgt in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basissignals.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte an einem AC 250 bzw. DMX 500 Spektrometer der Firma *Brucker* bei 300 K. An der Universität Regensburg wurden die NMR-Spektren von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, NMR-Spektroskopie an Spektrometer *Brucker Avance 300* gemessen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen mit 5 mm Außendurchmesser und beinhalteten ca. 10 mg Substanz in 0.5 ml. Die Angabe der chemischen Verschiebungen δ erfolgt in ppm und bezieht sich auf Trimethylsilan als Nullpunkt. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hz.

Optische Spektroskopie

Für alle spektroskopischen Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, 1 cm-Quarzglas-Küvetten der Firma *Starna* verwendet und die Messungen bei RT durchgeführt.

Absorption

UV/VIS-Spektren wurden an einem *Varian Cary 100 Bio*-Spektrometer mit temperierbarem Küvettenblock aufgenommen. Dabei verwendete Einstellungen: SBW: 2.0 nm, Average time 0.1 s, Light source changeover 350 nm. Die Spektren wurden basislinienkorrigiert. Für Schmelztemperaturmessungen der Duplexe wurde das Programm *Thermal* mit einer Heiz- bzw. Kühlrate von 0.5-1.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ verwendet.

Bestrahlung

Die Bestrahlungsexperimente zu BpdG (**3**) wurden mit einer Xenonlampe (75 W *Oriel Instruments*) unter Verwendung eines cutoff-Filters ($\lambda > 305$ nm *Andover Corporation*) durchgeführt. Es wurden Lösungen von BpdG in MeOH/H₂O 1:1 mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt (pH: 2.5, 3.5, 4, 5; eingestellt mit 0.5 M Citratpuffer) und in einer 1 cm langen Quarzküvette bestrahlt. Mittels UV/VIS-Spektroskopie und HPLC-MS(ESI) wurden die Proben analysiert.

Fluoreszenz

Fluoreszenzspektren wurden an einem Fluoromax-3 Spektrometer (*Jobin-Yvon*) in Fluoreszenzküvetten aufgenommen. Dabei wurden die folgenden Einstellungen verwendet: Integration time 0.2 s, Increment 1.0 nm, Spaltbreite 2 nm. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert.

Bestimmung der Quantenausbeute

Zur Ermittlung der Quantenausbeute wurde eine schwefelsaure Quininsulfatlösung (0.1 N H₂SO₄) verwendet. Für verdünnte Quininsulfatlösungen $< 10^{-4}$ M gilt $\Phi_F = 0.546$.^[216]

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem J-715 Spektropolarimeter (*Jasco*) mit Thermostat PTC-150J (*Jasco*) aufgezeichnet und manuell basislinienkorrigiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Sensitivity 100 mdeg, data pitch 0.1 nm, scanning mode continuous, scanning speed 500 nm/min, response 0.5 s, band width 2 nm. Es wurde der Mittelwert aus fünf Messungen gebildet.

Cyclovoltammetrie (CV)

CV-Messungen wurden mit einer Drei-Elektroden-Anordnung aus Gegenelektrode, Pseudo-Referenzelektrode und Arbeitselektrode durchgeführt. Die Elektroden bestanden alle aus Platin. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten *EG&G Model 283* erzeugt, der mit der Software *Echem (EG&G)* angesteuert werden konnte. Es wurden trockene Lösungsmittel verwendet und die Messzelle vor der Messung mit Argon gespült. Da in dieser Messanordnung nur eine Pseudo-

referenzelektrode verwendet wurde, wurde im Rahmen der Messung Ferrocen, dessen Reduktionspotential bekannt ist, als Referenzstandard zugegeben. Die gemessenen Reduktionspotentiale lassen sich dann durch Umrechnung anhand von Tabellen gegenüber der Normal-Wasserstoffelektrode angeben.^[325]

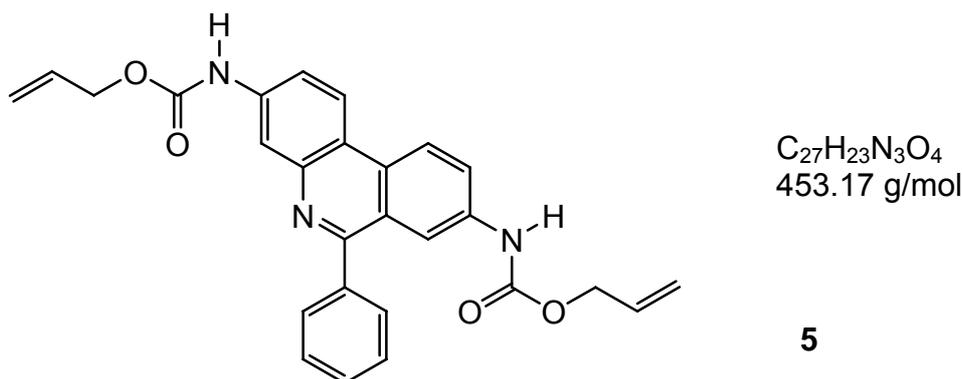
Spektroelektrochemische Messung (SEC)

Für die SEC-Messung wurde eine Quarzglaszelle verwendet. Ähnlich wie bei der CV wurde eine Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Als Arbeitselektrode wurde ein vergoldetes Nickelnetz (600 Linien/cm) eingesetzt. Die Gegenelektrode bestand aus V2A-Stahl, der erst vernickelt und anschließend vergoldet wurde. Als Pseudo-Referenzelektrode diente ein versilberter Platindraht. Das Goldnetz wurde zwischen zwei Quarzglasplatten eingespannt, die durch zwei dünne Glasplättchen auf einen Kapillarspalt von ca. 100 µm eingestellt und durch Kunststoffplatten fixiert wurden. Die zu untersuchende Lösung kann durch Kapillarkräfte in diesen schmalen Spalt diffundieren und steht somit in Kontakt mit dem Goldnetz, wo dann die Redoxreaktion stattfinden kann. Zur Lösung der zu untersuchenden Substanz wurden trockene Lösungsmittel verwendet (ca. 4 mL Probenvolumen) und die Zelle vor der Messung mit Argon durchspült. Das Potenzial wurde von einem Potentiostaten *AMEL* Modell 2053 geliefert und die Absorptionsänderung an einem *Perkin-Elmer* Lambda 9 Spektrometer aufgezeichnet. Mit dem Programm *Perkin-Elmer Pcess* konnte die Absorptionsmessung gesteuert werden.

6.2 Synthese von Ethidiumnukleosiden

Alle spektroskopischen Daten der Phenanthridinderivate **5-11** sind in Einklang mit den Daten in der Literatur.^[19]

Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (**5**)



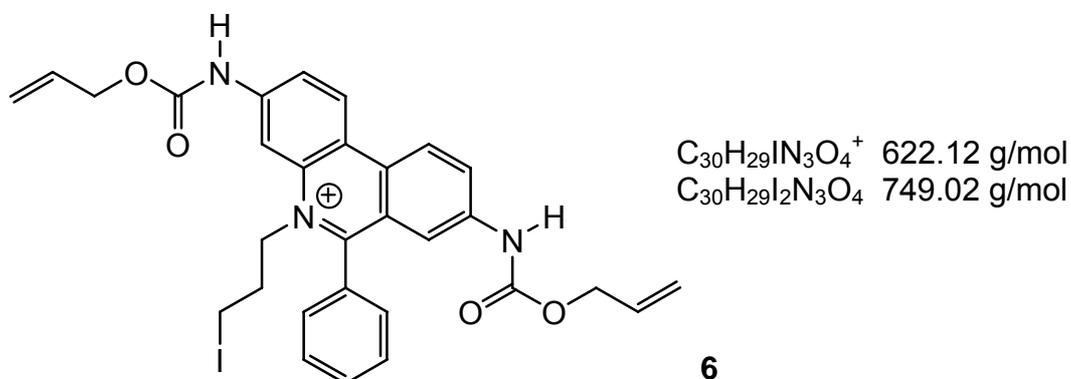
Unter Argonatmosphäre wurde 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin (5.0 g, 17.5 mmol) in 150 mL absolutem DCM suspendiert und vorsichtig Chlorameisensäureallylester (18.6 mL, 175 mmol, 10 eq) zugetropft. Nach 24 h Rühren bei RT wurde die Reaktion mit wässriger NH₃-Lösung (6 N, 100 mL) abgebrochen. Der braune Niederschlag wurde abfiltriert, mit H₂O gewaschen und im HV getrocknet. Man erhielt 7.76 g (98 % d. Th.) eines braunen Feststoffes.

DC (EE/MeOH/H₂O 6:2:1) R_f = 0.96

ESI-MS: m/z (%) 454.2 (100) [M + H]⁺, 338.4 (12) [M + H - 2 x C₃H₆O]⁺, 396.3 (24) [M + H - C₃H₆O]⁺

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.08 (s, 1H, NH), 10.06 (s, 1H, NH), 8.74 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H1), 8.64 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, H10), 8.28 (s, 1H, H4), 8.20 (s, 1H, H7), 7.96 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H9), 7.80 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H2), 7.68 (m, 2H, Ph), 7.57 (m, 3H, Ph), 6.10-5.90 (m, 2H, CH₂=CH), 5.37 (m, 2H, CH₂=CH), 5.24 (m, 2H, CH₂=CH), 4.67 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H, CH₂O), 4.60 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H, CH₂O).

Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodpropyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (6)



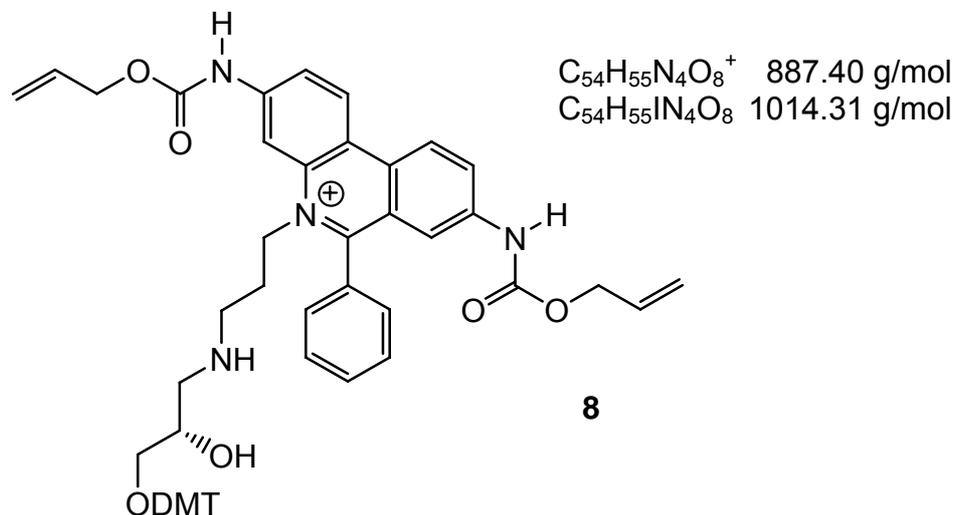
3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (**5**) (5.0 g, 11.0 mmol) wurde in 40 mL absolutem THF gelöst. Nach Zugabe von 13 mL 1,3-Diodpropan erhitze man 9 Tage unter Rückfluss. Danach wurde das ausgefallene Produkt abfiltriert, mit sehr wenig THF gewaschen und im HV getrocknet. Man erhielt 6.75 g (82 %) eines orangen Pulvers.

DC (DCM/MeOH 20:3) $R_f = 0.52$

ESI-MS: m/z (%) 622.1 (100) $[M]^+$, 564.2 (10) $[M - C_3H_6O]^+$, 466.5 (15)

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.53$ (s, 1H, NH, 3-Alloc), 10.32 (s, 1H, NH, 8-Alloc), 9.05 (d, $^3J = 9.4$ Hz, 1H, H1), 8.99 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, H10), 8.54 (s, 1H, H4), 8.24 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H9), 8.14 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1H, H2), 7.78 (s, 1H, H7), 7.85-7.72 (m, 5H, 6-Ph), 6.03 (m, 1H, $CH_2=CH$, 3-Alloc), 5.91 (m, 1H, $CH_2=CH$, 8-Alloc), 5.43 (dd, $^2J = 1.7$ Hz, $^3J = 17.4$ Hz, 1H, $CH_2=CH$, trans, 3-Alloc), 5.32 (dd, $^2J = 1.7$ Hz, $^3J = 17.8$ Hz, 1H, $CH_2=CH$, trans, 8-Alloc), 5.29 (dd, $^2J = 1.1$ Hz, $^3J = 10.5$ Hz, 1H, $CH_2=CH$, cis, 3-Alloc), 5.22 (dd, $^2J = 1.3$ Hz, $^3J = 10.4$ Hz, 1H, $CH_2=CH$, cis, 8-Alloc), 4.71 (m, 2H, H1'), 4.68 (m, 2H, OCH_2 , 3-Alloc), 4.55 (m, 2H, OCH_2 , 8-Alloc), 3.27 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, H3'), 2.41 (m, 2H, H2').

Synthese von (S)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-(3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino)-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (8)



Zu einer Lösung von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iod-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (1.124 g, 1.50 mmol) und DIPEA (0.45 mL, 3 mmol, 2.0 eq) in 60 mL DMF wurde die Verbindung (S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (649 mg, 1.65 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben und 40 h bei RT gerührt. Es wurde erneut (S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**6**) (236 mg, 0.60 mmol, 0.4 eq) und nochmals DIPEA (0.22 mL, 1.5 mmol, 1.0 eq) hinzugefügt und weitere 15 h bei RT belassen. Dann wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingeeengt und im Anschluss über FC (DCM/MeOH 100:3 + 0.1 % Pyridin, Eluent: DCM/MeOH 10:3 + 0.1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im HV erhielt man einen gelbbraunen Feststoff (1.32 g, 87 %).

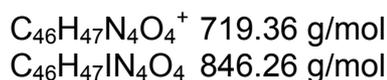
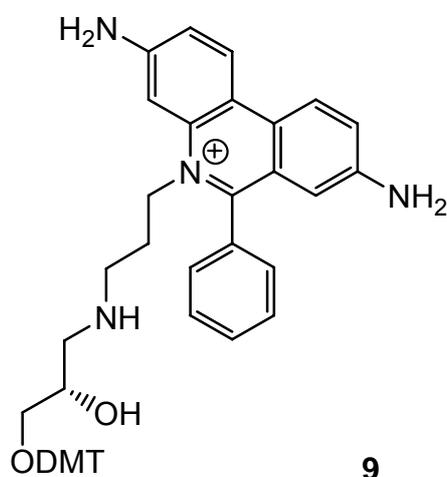
DC (DCM/MeOH 10:3) $R_f = 0.82$

ESI-MS: m/z (%) 887.4 (100) $[M]^+$, 585.4 (28) $[M + H - DMT]^+$, 303.4 (40) $[DMT]^+$, 468.4 (22)

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.66$ (s, 1H, NH, 3-Alloc), 10.38 (s, 1H, NH, 8-Alloc), 9.11 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, H1), 9.05 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, H10), 8.65 (s, 1H, H4), 8.28 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, 4J = 2.0 Hz, 1H, H9), 8.11 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, 4J = 1.4

Hz, 1H, H2), 7.78 (s, 1H, H7), 7.83-7.73 (m, 5H, 6-Ph), 7.38 (m, 2H, arom., DMT), 7.32-7.20 (m, 7H, arom, DMT), 6.88 (m, 4H, arom, DMT), 5.99 (m, 1H, CH₂=CH, 3-Alloc), 5.92 (m, 1H, CH₂=CH, 8-Alloc), 5.38 (dd, ²J = 1.7 Hz, ³J = 17.1 Hz, 1H, CH₂=CH, trans, 3-Alloc), 5.32 (dd, ²J = 1.7 Hz, ³J = 17.0 Hz, 1H, CH₂=CH, trans, 8-Alloc), 5.27 (dd, ²J = 1.3 Hz, ³J = 10.4 Hz, 1H, CH₂=CH, cis, 3-Alloc), 5.22 (dd, ²J = 1.3 Hz, ³J = 10.4 Hz, 1H, CH₂=CH, cis, 8-Alloc), 4.68 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂, 3-Alloc), 4.57 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂, 8-Alloc), 4.53 (m, 2H, H1'), 3.78 (m, 1H, CHOH), 3.69 (s, 6H, OMe), 2.96 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.74 (m, 2H, H3'), 2.74 (m, 1H, CH₂NH₂), 2.83 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.56 (m, 1H, CH₂NH₂), 2.10 (m, 2H, H2').

Darstellung von (S)-3,8-Bis-amino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (9)



9

Pd(PPh₃)₄ (20 mg, 0.02 mmol, 0.02 eq), PPh₃ (52 mg, 0.2 mmol, 0.2 eq) und Bu₃SnH (0.87 g, 3.0 mmol, 3.2 eq) wurden zu einer Lösung des Edukts (S)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-(3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino)-propyl)-6-phenylphenanthridinium Iodid (8) (0.95 g, 0.94 mmol) in abs. DCM (30 mL) und Wasser (0.1 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei RT gerührt, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mL Wasser abgebrochen und die Lösung im Vakuum bis zur Trockne einge-

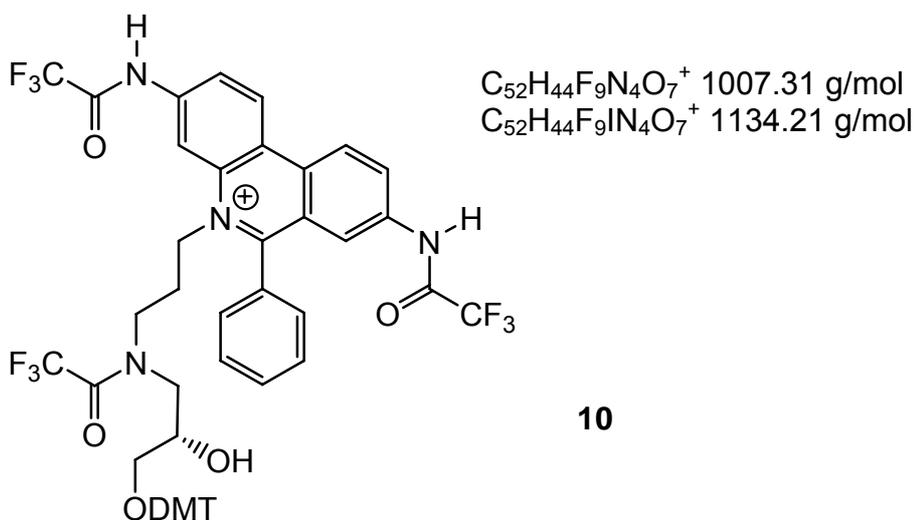
dampft. Das Rohprodukt wurde durch FC (Kieselgel, DCM/MeOH 100:5 + 0.1 % Pyridin, dann EE/MeOH/H₂O 6:2:2 + 0.1 % Pyridin) gereinigt. Man erhielt 0.71 g (90 % d. Th.) eines violetten Feststoffs.

DC (EE/MeOH/H₂O 6:2:2) R_f = 0.84

ESI-MS: m/z (%) 719.3 (100) [M]⁺, 303.3 (44) [DMT]⁺, 344.4 (83)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.69 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, H1), 8.63 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, H10), 7.70 (m, 5H, 6-Ph), 7.56 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, H9), 7.52 (s, 1H, H4), 7.39 (m, 2H, arom., DMT), 7.38 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, H2), 7.34-7.18 (m, 7H, arom, DMT), 6.89 (m, 4H, arom, DMT), 6.39 (s, 2H, 3-NH₂), 6.27 (s, 1H, H7), 5.51 (s, 1H, OH), 5.35 (s, 1H, 8-NH₂), 4.46 (m, 2H, H1'), 3.88 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.41 (s, 1H, NH), 3.01 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.96 (m, 2H, H3'), 2.95 (m, 1H, NCH₂CHOH), 2.85 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.69 (m, 1H, NCH₂CHOH), 2.18 (m, 2H, H2').

Synthese von (S)-3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-N-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (10)

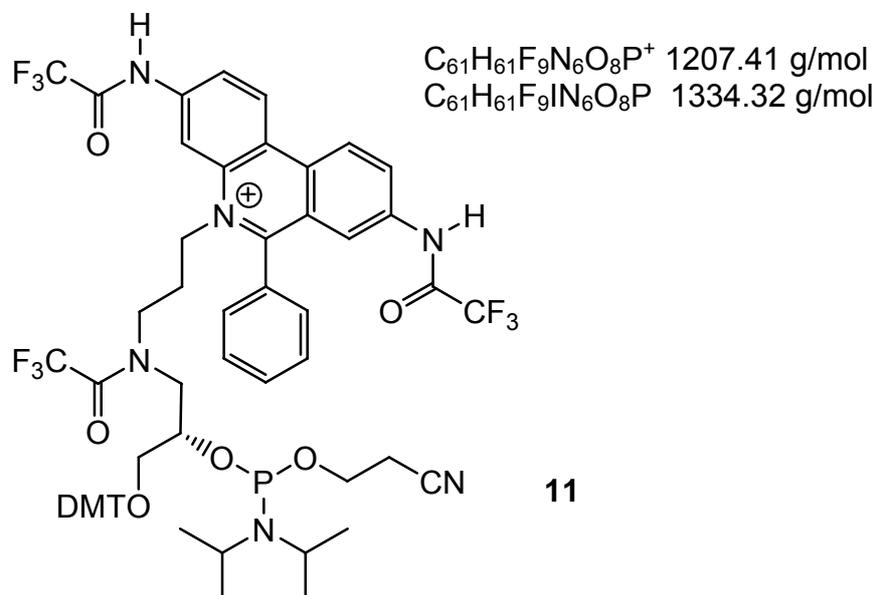


Unter einer Argonatmosphäre und bei 0 °C wurden Pyridin (0.9 mL, 11 mmol) und Trifluoressigsäureanhydrid (0.76 mL, 5.4 mmol, 6 eq) zu einer Lösung der

Ausgangsverbindung (S)-3,8-Bis-amino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (**9**) (0.77 g, 0.9 mmol) in abs. DCM (4.5 mL) gegeben. Die Lösung wurde für 10 min bei 0 °C und weitere 10 min bei RT belassen. Dann wurde mehrmals zügig mit ges. wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Solange bis der Trifluoracetyllester an der 2-Hydroxygruppe entschützt war. Die Entschützung wurde mittels ESI-MS kontrolliert. Anschließend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum Lösungsmittelreste entfernt. Man erhielt 0.68 g (67 % d. Th.) eines gelb-braunen Feststoffs.

ESI-MS: m/z (%) 1007.3 (100) [M]⁺, 303.3 (27) [DMT]⁺

Synthese von (S)-3,8-Bis-trifluoroacetyl-amino-5-{3-[(3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropyl-amino-phosphanyloxy]-propyl)-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (11**)**

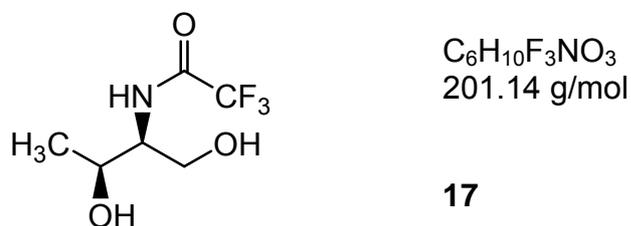


Das Edukt (S)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-[(3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl)-N-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (**10**) (889 mg, 0.78 mmol) wurde unter Argonatmosphäre

und Lichtausschluss in absolutem DCM (37 mL) gelöst und mit über Molsieb getrocknetem DIPEA (417 μ L, 2.34 mmol, 3 eq) versetzt. Nach Zugabe von 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropyl-chlorphosphor-amidit (285 mg, 268 μ L, 1.17 mmol, 1.5 eq) wurde 45 min bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels ESI-MS kontrolliert. War noch Edukt vorhanden, gab man erneut 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (190 mg, 179 μ L, 0.78 mmol, 1 eq) und DIPEA (139 μ L, 0.78 mmol, 1eq) zu und rührte weiter 30 min bei RT. Die organische Phase wurde einmal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach dreimaligem Koevaporieren mit Et₂O wurde das Phosphoramidit im HV getrocknet. Man nahm vollständigen Umsatz an und stellte nach 2 h Trocknen im Vakuum eine 0.2 M Lösung des Phosphoramidits **11** in abs. ACN (3.8 mL) her, die unmittelbar für die Oligonukleotidsynthese verwendet wurde.

ESI-MS: m/z (%) 1207.3 (100) [M]⁺, 303.3 (64) [DMT]⁺

Synthese von (2S,3S)-2N-(1,3-Dihydroxy-butyl)-trifluoracetamid (**17**)

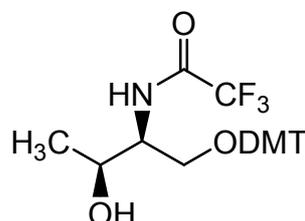


(2S,3S)-2-Amino-butan-1,3-diol (D-Threoninol) (600 mg, 5.71 mmol) wurde in 14 mL Trifluoressigsäure-methylester suspendiert und bei RT über Nacht gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum eingeeengt und dreimal mit Toluol (20 mL) koevaporiert. Man erhielt 1.01 g (89%) eines weißen Feststoffs.

DC (DCM/MeOH 10:3) R_f = 0.90

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, NH), 4.70 (m, 2H, CHOH, OH), 3.74 (m, 1H, CHNH), 3.67-3.71 (m, 1H, OH), 3.53-3.60 (m, 1H, CH₂OH), 3.46-3.48 (m, 1H, CH₂OH), 0.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 3H, CH₃).

Synthese von (2S,3S)-2N-(1-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-hydroxy-butyl)-trifluoracetamid (18)



$C_{27}H_{28}F_3NO_5$
503.51 g/mol

18

(2S,3S)-2N-(1,3-Dihydroxy-butyl)-trifluoracetamid (**17**) (573 mg, 2.85 mmol) wurde dreimal mit Pyridin (10 ml) koevaporiert, und anschließend in 8 mL abs. Pyridin gelöst. 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (1.05 g, 3.14 mmol, 1.1 eq) wurde zugegeben und 2 Tage unter Argonatmosphäre bei RT gerührt. Nach erneuter Zugabe von DMTCl (0.48 g, 1.43 mmol, 0.5 eq) wurde über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mit MeOH (1 mL) abgebrochen, 1 h bei RT belassen und am Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in 50 mL Essigsäureethylester gelöst und dreimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (25 mL) sowie zweimal mit H₂O (25 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde über FC gereinigt. Beginnend mit DCM in Gegenwart von 0.1% Pyridin wurde der MeOH-Gehalt schrittweise auf 2% erhöht. Nach Eindampfen erhielt man 928 mg (65%) eines gelben Öls.

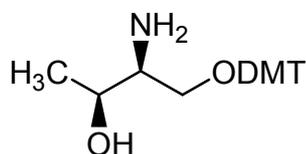
DC (DCM/MeOH 100:0.5) R_f = 0.17

ESI-MS: m/z (%) 526.0 (8) [M+Na]⁺, 303.3 (100) [DMT]⁺, 1028.9 (4) [2M+Na]⁺

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.25 (d, J = 8.22 Hz, 1H, NH), 7.21-7.40, 6.86-6.89 (m, 13 H, DMT), 4.70 (m, 1H, CHOH), 3.86-3.95 (m, 2H, OH, NHCH), 3.73 (s, 6H, OMe), 3.14-3.18 (dd, J = 3.57 und 9.33 Hz, 1H, CH₂ODMT), 2.94-2.99 (m, 1H, CH₂ODMT), 0.93 (d, J = 6.03 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 157.94, 156.73 und 156.25 (q ²J_{CF} = 36 Hz), 149.50, 144.81, 136.03, 135.57, 135.43, 129.55, 127.66, 127.51, 126.54, 123.80, 117.94 und 114.13 (q ¹J_{CF} = 288 Hz, CF₃), 113.00, 85.13 (OCPh₃), 64.68 (CHOH), 62.40 (CH₂ODMT), 56.03 (NHCH), 54.90 (OCH₃), 19.98 (CH₃).

Darstellung von (2S,3S)-2-Amino-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-butan-3-ol (19)



$C_{25}H_{29}NO_4$
407.5 g/mol

19

(2S,3S)-2N-(1-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-hydroxy-butyl)-trifluoracetamid (**18**) (928 mg, 1.84mmol) wurde in einer Mischung aus MeOH (11 mL), konz. wässriger NH_3 -Lösung (11 mL) und THF (5 mL) gelöst und 3 Tage bei RT gerührt. Nachdem MeOH und THF im Vakuum entfernt worden waren, wurde dreimal mit DCM (20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach zweimaligen Koevaporieren mit Diethylether (10 mL) und Eindampfen im Vakuum erhielt man das Produkt als weißen voluminösen Schaum (643 mg, 86%).

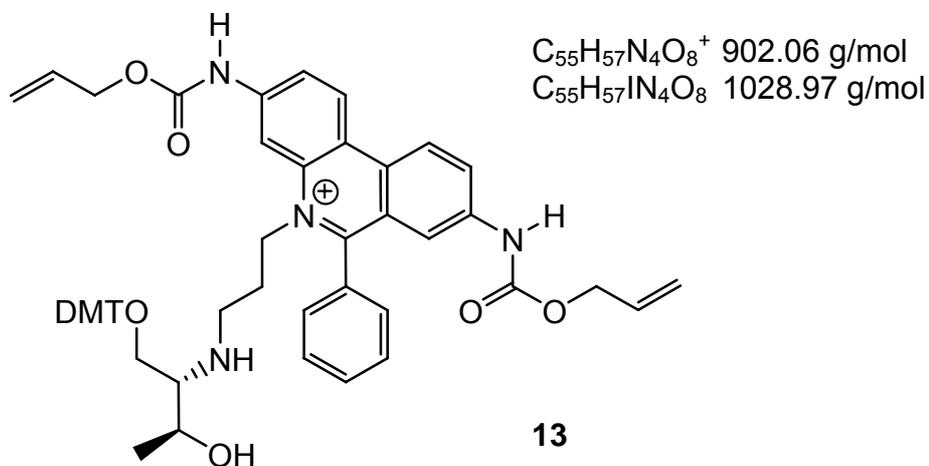
DC (DCM/MeOH 100:5) $R_f = 0.24$

ESI-MS: m/z (%) 430.1 (16) $[M+Na]^+$, 303.3 (100) $[DMT]^+$, 815.0 (8) $[2M+H]^+$

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 7.19-7.41$, $6.83-6.92$ (m, 13 H, DMT), 4.43 (m, 1H, $\underline{C}HOH$), 3.73 (s, 6H, OMe), 3.63 (m, 1H, OH), $2.99-3.04$ (m, 1H, $NH_2\underline{C}H$), $2.81-2.85$ (m, 1H, $\underline{C}H_2ODMT$), 2.58 (m, 1H, $\underline{C}H_2ODMT$), 0.95 (d, $J = 6.33$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 157.87$, 145.09 , 135.90 und $135.78, 129.63$, 127.65 , 126.44 , 112.99 , 85.06 (OCP $_3$), 66.55 ($\underline{C}HOH$), 65.09 ($\underline{C}H_2ODMT$), 56.54 ($NH_2\underline{C}H$), 54.91 (OCH $_3$), 20.06 (CH_3).

Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3(S)-hydroxy-2(S)-butylamino)-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (13)



Zu einer Lösung von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iod-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (**5**) (255 mg, 0.34 mmol) und DIPEA (0.1 mL, 0.68 mmol, 2.0 eq) in 14 mL DMF wurde (2S,3S)-2-Amino-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-butan-3-ol (**19**) (166 mg, 0.41 mmol, 1.2 eq) zugegeben und 5 Tage bei RT gerührt. Man gab erneut die Verbindung **19** (83 mg, 0.21 mmol, 0.6 eq) und nochmals DIPEA (75 μ L, 0.51 mmol, 1.5 equiv.) zu und rührte weitere 5 Tage bei RT. Dann wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt und im Anschluss über FC (DCM/MeOH 100:3 + 0.1 % Pyridin, Eluent: DCM/MeOH 10:3 + 0.1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im HV erhielt man einen gelbbraunen Feststoff (311 mg, 89 %).

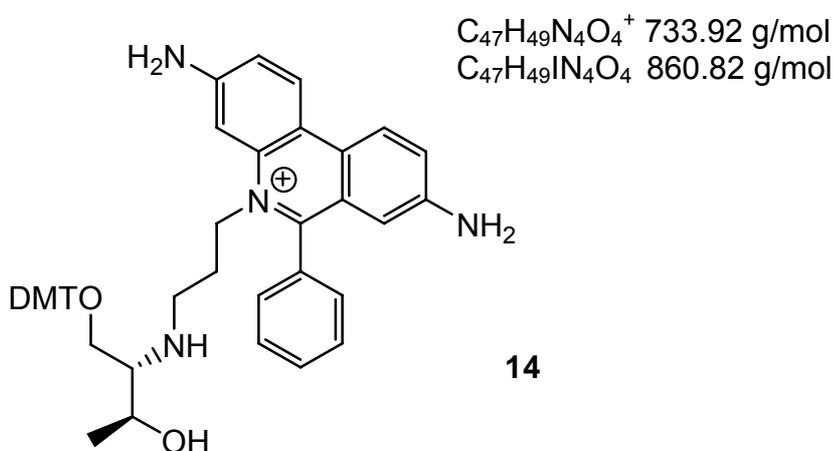
DC (DCM/MeOH 20:3) $R_f = 0.58$

ESI-MS: m/z (%) 901.4 (100) $[M]^+$, 599.3 (15) $[M + H - DMT]^+$, 303.3 (33) $[DMT]^+$, 468.3 (35)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.67$ (s, 1H, NH, 3-Alloc), 10.38 (s, 1H, NH, 8-Alloc), 9.08 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, H1), 9.02 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, H10), 8.57 (s, 1H, H4), 8.26 (m, 1H, H9), 8.10 (dd, $^3J = 9.1$ Hz, $4J = 1.1$ Hz, 1H, H2), 7.82-7.71 (m, 6H, 6-Ph, H7), 7.39-7.20 (m, 9H, arom, DMT), 6.88 (m, 4H, arom, DMT), 5.99 (m, 2H, $CH_2=CH$, 3- und 8-Alloc), 5.37 (m, 1H, $CH_2=CH$, trans, 3-Alloc), 5.30 (m, 1H, $CH_2=CH$, trans, 8-Alloc), 5.25 (m, 1H, $CH_2=CH$, cis, 3-Alloc), 5.21 (m, 1H,

$\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}$, cis, 8-Alloc), 4.67 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 2H, OCH_2 , 3-Alloc), 4.57 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 2H, OCH_2 , 8-Alloc), 4.73 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{OH}$), 4.63 (m, 2H, $\text{H}1'$), 3.72 (s, 6H, OMe), 3.08 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{ODMT}$, NHCH), 2.80 (m, 2H, $\text{H}3'$), 2.58 (m, 1H, CH_2ODMT), 2.09 (m, 2H, $\text{H}2'$), 0.93 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3).

Synthese von 3,8-Bis-amino-5-(3-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3(S)-hydroxy-2(S)-butylamino)-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (14)



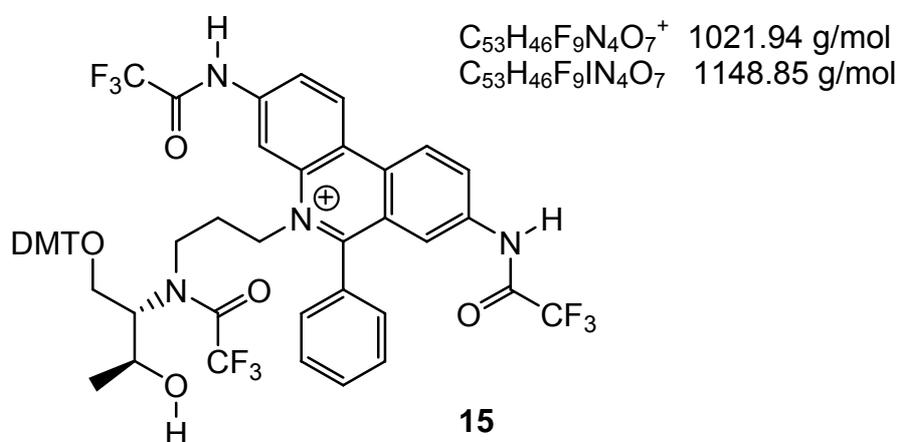
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.4 mg, 0.007 mmol), PPh_3 (19.4 mg, 0.07 mmol) und Bu_3SnH (0.36 mL, 0.4 g, 1.40 mmol) wurden zu einer Lösung von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3(S)-hydroxy-2(S)-butylamino)-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (**13**) (311 mg, 0.30 mmol) in abs. DCM (11 mL) und Wasser (36 μL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei RT gerührt, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen und die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wurde durch FC (Kieselgel, DCM/MeOH 100:5 + 0.1 % Pyridin, dann EE/MeOH/ H_2O 6:2:2 + 0.1 % Pyridin) gereinigt. Man erhielt 260 mg (quant.) eines violetten Feststoffs.

DC (EE/MeOH/ H_2O 6:2:2) $R_f = 0.60$

ESI-MS: m/z (%) 733.4 (100) $[\text{M}]^+$, 431.3 (13) $[\text{M} + \text{H} - \text{DMT}]^+$, 303.3 (85) $[\text{DMT}]^+$
 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.67$ (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, $\text{H}1$), 8.62 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, $\text{H}10$), 7.67 (m, 5H, 6-Ph), 7.51 (m, 2H, $\text{H}9$, $\text{H}4$), 7.36-7.20 (m, 10H, arom,

DMT, H₂), 6.86 (m, 4H, arom, DMT), 6.38 (s, 2H, 3-NH₂), 6.26 (s, 1H, H₇), 5.96 (s, 2H, 8-NH₂), 4.50 (m, 3H, H_{1'}, CH₂OH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.27 (m, 1H, NH₂CH), 3.00 (m, 2H, H_{3'}), 2.79 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.63 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.25 (m, 2H, H_{2'}), 0.92 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃).

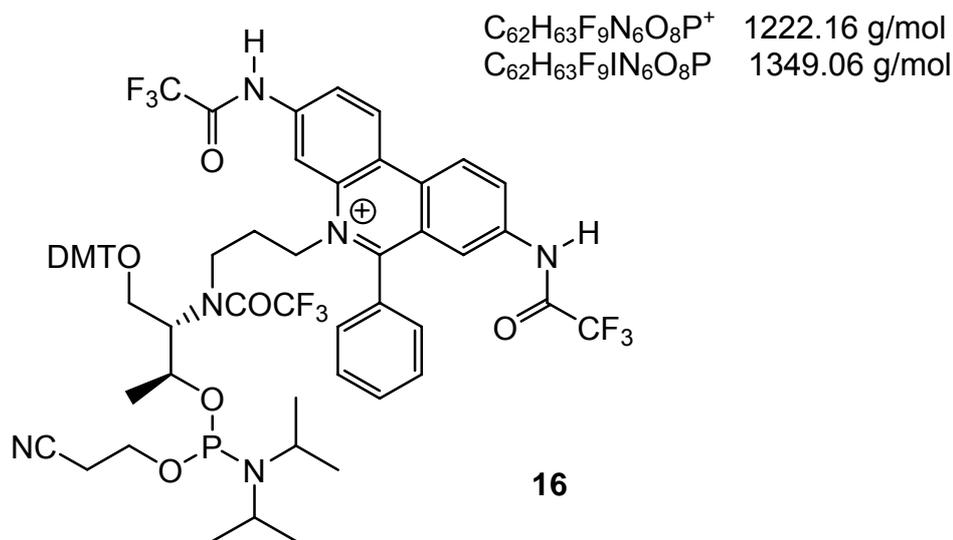
Synthese von 3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-(3-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-(S)-hydroxy-butyl-2-(S)-N-(trifluoroacetyl)amino)-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (15)



Unter einer Argonatmosphäre und bei 0 °C wurden Pyridin (0.4 mL, 4.89 mmol, 16 eq) und Trifluoressigsäureanhydrid (0.3 mL, 2.13 mmol, 7 eq) zu einer Lösung von 3,8-Bis-amino-5-(3-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-(S)-hydroxy-2(S)-butylamino)-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (**14**) (260 mg, 0.3 mmol) in abs. DCM (3 mL) gegeben. Die Lösung wurde für 10 min bei 0 °C und weitere 10 min bei RT belassen. Dann wurde mehrmals zügig mit ges. wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Solange bis der Trifluoracetylester an der 2-Hydroxygruppe entschützt war. Die Entschützung wurde mittels ESI-MS kontrolliert. Anschließend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum Lösungsmittelreste entfernt. Man erhielt 321 mg (93 %) eines gelbbraunen Feststoffs.

ESI-MS: m/z (%) 1021.3 (100) [M]⁺, 303.3 (38) [DMT]⁺

Synthese von 3,8-Bis-trifluoroacetyl-amino-5-(3-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-(S)-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropyl-amino]-phosphanyloxy]-butyl)-(S)-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (16)

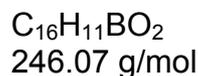
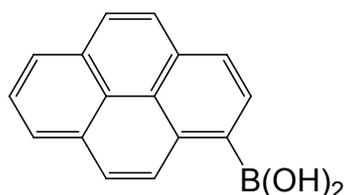


3,8-Bis-trifluoroacetyl-amino-5-(3-(1-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-(S)-hydroxy-butyl-2-(S)-N-(trifluoroacetyl)amino)-propyl))-6-phenyl-phenanthridin Iodid (**15**) (321 mg, 0.28 mmol) wurde unter Argonatmosphäre und Lichtabschluss in absolutem DCM (13 mL) gelöst und mit über Molsieb getrocknetem DIPEA (195 μ L, 1.12 mmol, 4 eq) versetzt. Nach Zugabe von 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit (132.6 mg, 125 μ L, 0.56 mmol, 2.0 eq) wurde 45 min bei RT gerührt. Die organische Phase wurde einmal mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach dreimaligem Koevaporieren mit Et_2O wurde das Phosphoramidit im HV getrocknet. Man nahm vollständigen Umsatz an und stellte nach 2 h Trocknen im Vakuum eine 0.2 M Lösung des Phosphoramidits **16** in abs. ACN (1.4 mL) her, die unmittelbar für die Oligonukleotidsynthese verwendet wurde.

ESI-MS: m/z (%) 1221.4 (100) $[M]^+$, 303.3 (39) $[DMT]^+$

6.3 Synthese des PydG-Phosphoramidits(2)

Synthese von 1-Pyrenylboronsäure (21)



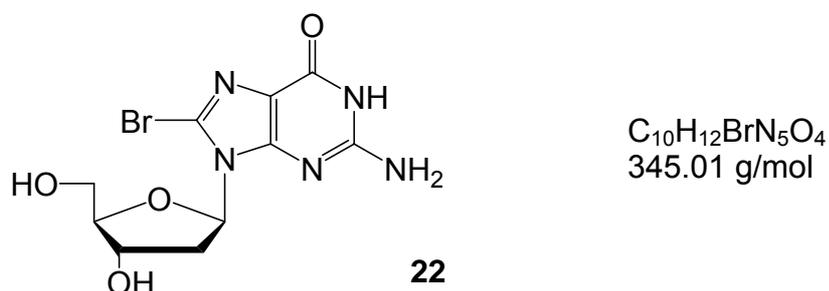
21

Unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss wurden 2.0 g (7.11 mmol) 3 in 100 ml absolutem Diethylether gelöst. Bei 0°C wurden 5.3 ml (8.53 mmol, 1.2 eq) einer 1.6 M BuLi-Lösung in Hexan vorsichtig zugegeben. Man ließ die Mischung auf Raumtemperatur kommen und 1 h rühren. 4 ml (35.6 mmol, 5 eq) B(OCH₃)₃ wurden in 10 ml absolutem Diethylether gelöst und auf -78°C gekühlt. Diese Lösung gab man langsam dem lithiierten Pyren bei -78° C über 30 min zu. Nach drei Stunden ließ man die Lösung auf RT kommen und 40 h rühren. Zur Aufarbeitung wurden 40 ml 2 M HCl zugegeben und 3 h gerührt. Es wurde dreimal mit 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen anschließend dreimal mit 70 ml Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wurde über FC gereinigt (Hexan/Essigsäureethylester 20:1, Elution 100 % EtOH). Man erhielt 1.32 g Produkt als gelben Feststoff (75 %).

DC (Hexan/Diethylether 3:1) R_f = 0.2

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.79 (m, 1H, H10), 8.66 (2H, s; B(OH)₂), 8.35 (d, J = 7.5 Hz; 1H, H-2), 8.14-8.30 (m, 6H), 8.04 (t, J = 7.5 Hz; 1H, H-7).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆): δ = 134.1, 132.6, 131.9, 131.5, 130.9, 130.5, 128.6, 127.6, 126.9, 126.0, 125.0, 124.1, 123.7, 123.1.

Synthese von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (22)

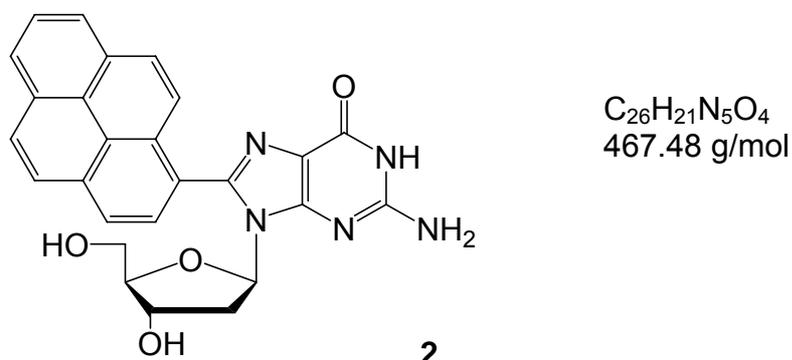
0.50 g (1.75 mmol) 2'-Desoxyguanosin-Monohydrat wurden in 10 mL Wasser (pH = 7) suspendiert und mit 343 mg (1.92 mmol, 1.1 eq) NBS versetzt. DC-Kontrolle zeigte nach 1 h die vollständige Umsetzung. Das Produkt wurde durch Filtration abgetrennt und im HV getrocknet. Es entstanden 516 mg (85 %) des rosafarbenen Produkts.

DC (EE/MeOH/H₂O 6:2:1) $R_f = 0.56$

ESI-MS: m/z (%) 346.0 und 348.0 (27) $[M + H]^+$, 230.1 und 232.1 (46) $[M - \text{Desoxy-ribose} + H]^+$, 713.0 und 715.0 (87) $[2M + Na]^+$

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 10.78$ (s, 1H, NH), 6.47 (s, 2H, NH₂), 6.14 (m, 1H, H1'), 5.30-5.10, 5.00-4.90 (m, 2H, 3'- und 5'-OH), 4.40-4.37 (m, 1H, H4'), 3.81-3.76 (m, 1H, H3'), 3.65-3.45 (m, 2H, H5'), 3.20-3.10 (m, 1H, H2'), 2.13-2.04 (m, 1H, H2').

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 155.34, 153.23, 151.90, 120.48, 117.38, 87.79, 84.96, 70.92, 61.94, 36.31$.

Synthese von 8-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyguanosin (**2**)

603 mg (1.7 mmol, 1.0 eq) 8-Brom-2'-desoxyguanosin (**22**), 598 mg (2.55 mmol, 1.5 eq) Pyren-1-yl-boronsäure (**21**), 196 mg (0.17 mmol, 0.1 eq) Pd(PPh₃)₄ und 1,36g (34 mmol, 20 eq) NaOH wurden in einer Mischung aus 60 mL THF, 30 mL Wasser und 30 mL MeOH gelöst. Die Lösung wurde 30 min mit Stickstoff entgast und 24 h bei 60 °C gerührt. Nachdem DC-Kontrolle den vollständigen Umsatz anzeigte, wurde mit festem NH₄Cl neutralisiert und mehrmals mit EE extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Die Reinigung durch FC (Kieselgel, DCM/Aceton 4:1, EE/MeOH 10:1 und EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5) lieferte 463 mg des gelblichen Produkts (58 %).

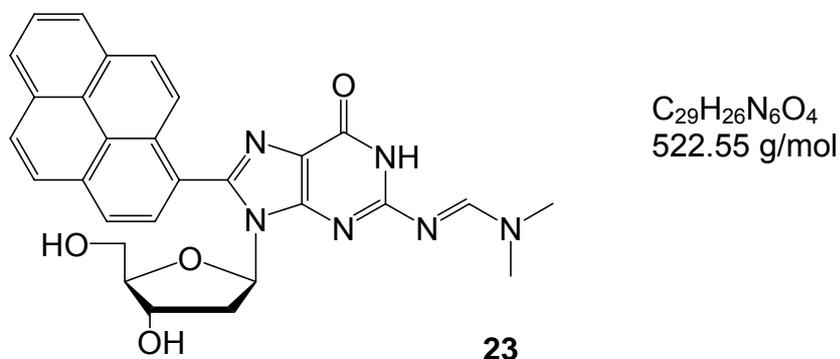
DC (EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5) R_f = 0.36

ESI-MS: m/z (%) 468.1 (45) [M + H]⁺, 352.4 (100) [M – Desoxyribose + H]⁺, 935.2 (87) [2M + H]⁺

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.87 (s, br, 1H, NH), 7.99-8.45 (m, 9H, Pyren), 6.47 (s, br, 2H, NH₂), 5.80 (t, J = 7.1 Hz, 1H, H1'), 4.93 (m, 2H, 5'-OH/3'-OH), 4.12 (m, 1H, H3'), 3.38-3.60 (m, 3H, H5'/H4'), 3.02 (m, 1H, H2'), 1.95 (m, 1H, H2').

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 158.52, 155.19, 152.87, 146.47, 132.82, 132.00, 131.51, 131.30, 129.74, 129.69, 128.47, 127.95, 127.21, 127.00, 126.11, 125.83, 125.67, 125.47, 124.97, 124.78, 118.84, 89.04 (C4'), 86.11 (C1'), 72.41 (C3'), 63.30 (C5'), 38.39 (C2').

Synthese von 2-N(Dimethylamino)methylen-8-(Pyren-1-yl)-2'-Desoxy-guanosin (23)



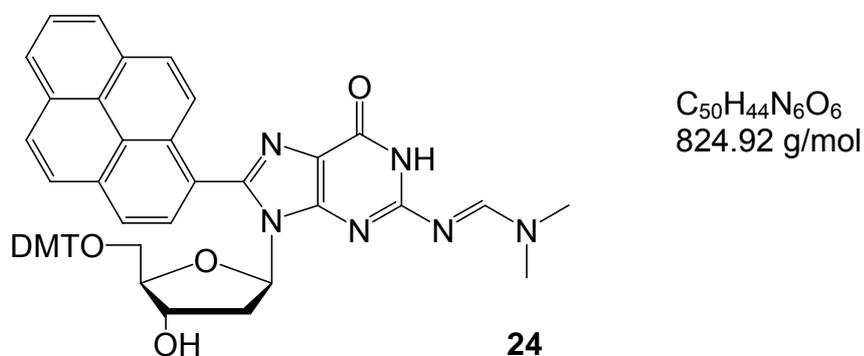
Py-dG (**2**) (168 mg, 0.36 mmol) wurde dreimal mit Pyridin (10 mL) koevaporiert, in abs. Methanol (12 mL) aufgenommen und mit *N,N*-dimethylformamid dimethyl acetal (0.24 ml, 1.8mmol, 5 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Argon bei RT über Nacht gerührt. Nach Eindampfen erhielt man das Produkt als gelben Feststoff (quant.).

DC (EE/MeOH/H₂O 10:1:1) $R_f = 0.20$

ESI-MS: m/z (%) 523.1 (34) $[M+H]^+$, 545.2 (8) $[M+Na]^+$, 407.4 (100) $[M - \text{Desoxyribose} + H]^+$, 1045.2 (53) $[2M + H]^+$, 1067.3 (16) $[2M+Na]^+$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.59 (br, 1H, N-H), 8.56-8.01 (m, 10 H, Pyren, N=C-H), 5.81 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, 1'-H), 5.03-4.95 (m, 2H, 5'-OH, 3'-OH), 4.23 (m, 1 H), 3.64 (m, 3H), 3.17 (br, 4H, N(CH₃)₂, 2'-H), 3.08 (s, 3H, N(CH₃)₂), 2.01 (m, 1H, 2'-H).

Synthese von 5'-O-Dimethoxytrityl-2-N-(Dimethylamino)methylen - 8-(Pyren-1-yl)-2'-Desoxyguanosin (**24**)



2-N(Dimethylamino)methylen-8-(Pyren-1-yl)-2'-Desoxyguanosin (**23**) (0.36 mmol) wurde dreimal mit Pyridin (10 ml) koevaporiert, und anschließend mit abs. Pyridin (12 ml), Et_3N (93 μ l, 0.73 mmol, 2.03 eq) und 4',4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (259 mg, 0.72 mmol, 2.0 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Argon bei RT über Nacht gerührt. Nach nochmaliger Zugabe von Et_3N (93 μ l, 0.73 mmol) und 4',4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (259 mg, 0.72 mmol) wurde die Reaktion für weitere 18 h gerührt. Die Reaktion wurde mit MeOH (5 ml) abgebrochen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch FC (Kieselgel, DCM/Aceton 4:1 + 0.1 % Pyridin; EE/MeOH 10:1 + 0.1 % Pyridin und EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5 + 0.1 % Pyridin) als gelber Feststoff (196 mg, 66 %) erhalten.

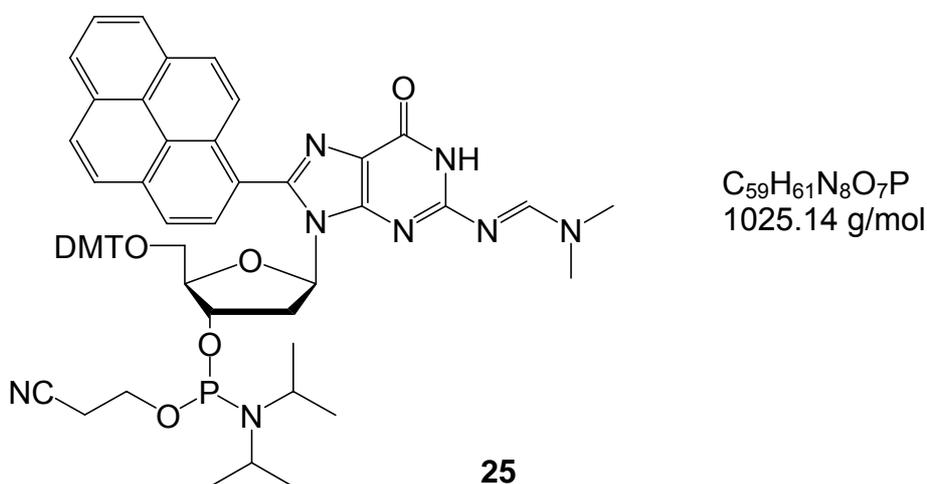
DC (EE/MeOH/H₂O 10:1:1) $R_f = 0.35$.

ESI-MS: m/z (%) 825.3 (34) $[M+H]^+$, 303.3 (6) $[DMT]^+$, 407.4 (32) $[M - \text{Desoxyribose} + H]^+$, 1649.5 (100) $[2M + H]^+$, 1672.5 (6) $[2M + Na]^+$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ =11.53 (br, 1H, N-H), 8.41-8.03 (m, 10 H, Pyren, N=C-H), 7.30-6.73 (m, 13H, DMT), 5.98 (m, 1H, 1'-H), 5.12 (br, 1H, 3'-OH), 3.71 (s, 6H, OCH₃), 3.70 (m, 1H, 4'-H), 3.16 (m, 1H, 5'-H), 3.05 (s, 3H, N(CH₃)₂), 3.00 (br, 4H, N(CH₃)₂, 2'-H), 2.91 (m, 1H, 5'-H), 2.08 (m, 1H, 2'-H), (3'-H unter H₂O-Signal in Probe).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ =167.86, 158.85, 158.53, 157.59, 151.21, 147.51, 145.87, 136.50, 131.65, 131.12, 130.99, 130.48, 130.37, 129.27, 128.51, 128.11, 127.63, 127.43, 126.92, 126.68, 125.69, 125.59, 125.21, 124.63, 124.40, 121.20, 113.81, 86.25 (C-4'), 84.67 (C-1'), 71.55 (C-3'), 65.02 (C-5'), 55.86 (OCH₃), 41.64 and 35.54 (N-CH₃), 38.63 (C-2').

Synthese von 5'-O-Dimethoxytrityl-2-N-(Dimethylamino)methylen-8-(Pyren-1-yl)-2'-Desoxyguanosin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl]-phosphoramidit] (25**)**



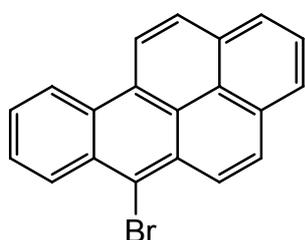
5'-O-Dimethoxytrityl-2-N-(Dimethylamino)methylen-8-(Pyren-1-yl)-2'-Desoxyguanosin (**24**) (140 mg, 0.17 mmol) wurde in abs.DCM (4.6 ml) gelöst. Nach Zugabe von Et₃N (141 μl , 1.02 mmol, 6 eq) und 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (0.96 μl , 0.43 mmol, 2.5 eq) wurde die Reaktionsmischung unter Argon bei RT 45 min gerührt. Durch zügiges Waschen der Reaktionsmischung mit ges. wäss. NaHCO₃-Lösung wurde die Reaktion abgebrochen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Abschließend wurde der Rückstand dreimal mit abs. Et₂O (5 ml) koevaporiert um das Phosphoramidit **25** als gelben Schaum zu erhalten. Man nahm vollständigen Umsatz an und stellte nach 2 h Trocknen im Vakuum eine 0.1 M Lösung von **25** in abs. DCM (1.6 mL) her, die unmittelbar für die Oligonukleotidsynthese verwendet wird.

DC(EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5) R_f = 0.69 (Doppelfleck mit Hydrolyseprodukt)

ESI-MS: m/z (%) 1025.1 (58) [M+H]⁺, 303.3 (40) [DMT]⁺, 407.3 (100) [M -Desoxyribose + H]⁺

6.4 Synthese des 8-(6-benzo[a]pyrenyl)-2'-desoxyguanosins()

Synthese von 6-Brombenzo[a]pyren(26)



C₂₀H₁₁Br
331.21 g/mol

26

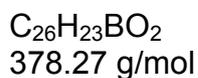
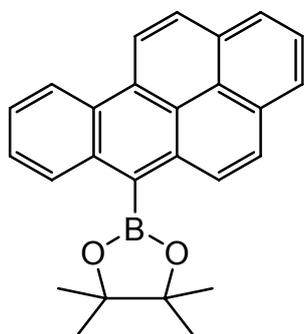
Benz[a]pyren (494 mg, 1.96 mmol) wurde in CCl₄ (50 mL) gelöst und mit NBS (356 mg, 2 mmol, 1.02 eq) 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Kühlung mittels Eisbad fiel ein gelber Niederschlag an, der durch Filtration isoliert wurde. Nach Umkristallisation aus Aceton erhielt man 554 mg eines gelben Feststoffs (85%).

DC (Hexan) R_f = 0.23

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 9.08 (m, 2H), 8.92 (m, 1H), 8.61 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 9 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 8.05 (m, 2H), 7.92 (m, 2H).

EI-MS: m/z 330.1 (100) und 332.1 (98) [M]⁺

Synthese von 6-Benzo[a]pyrenylboronsäurepinakolester (27)



27

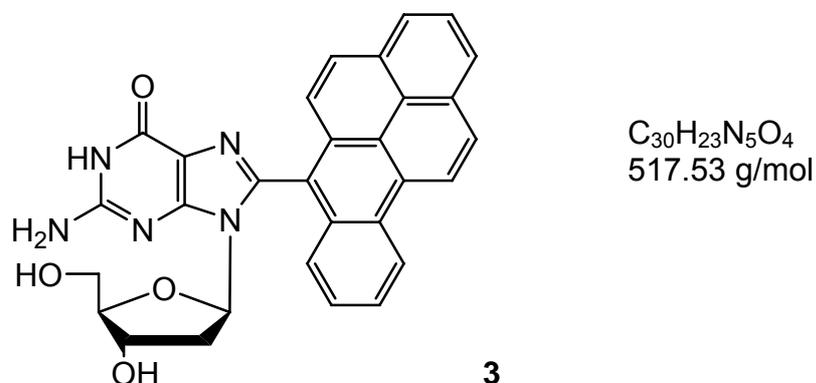
6-Brombenzo[a]pyren (**26**) (550 mg, 1.66 mmol) wurde mit 4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan (1.15 mL, 5.08 mmol, 3.1 eq), Et₃N (0.83 mL, 5.15 mmol, 3.1 eq), PdCl₂dppf (36.3 mg, 0.05 mmol, 0.03 eq), in abs. Dioxan (4 mL) unter Argon bei 100 °C unter Rückfluss 28 h erhitzt. Nach Extraktion mit Toluol wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingedampft. Nach FC (Kieselgel, Hexan/Toluol 1:1) erhielt man 127 mg (25%) eines gelben Feststoffs.

DC (Hexan/Toluol 1:1) R_f = 0.23

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9.08 (m, 2 H), 8.67 (m, 1 H), 8.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.24 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 8.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.97 (m, 2 H), 7.81 (m, 2 H), 1.66 (s, 12 H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 135.17, 134.82, 131.72, 131.58, 129.48, 129.14, 128.80, 128.65, 128.49, 128.16, 126.55, 126.36, 126.11, 126.0, 125.76, 125.42, 123.62, 123.57, 122.59, 85.03, 25.68.

HRMS (EI): *m/z* berechnet für C₂₆H₂₃O₂B [M]⁺ 378.17911, gefunden 378.17896.

Synthese von 8-(6-benzo[a]pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (**3**)

8-Brom-2'-desoxyguanosin (**22**) (106 mg, 0.31 mmol), 6-Benzo[a]pyrenylboronsäurepinakolester (**27**) 127 mg (0.34 mmol, 1.1 eq), 36 mg (0.031 mmol, 0.1 eq) Pd(PPh₃)₄ und 248 mg (6.2 mmol, 20 eq) NaOH wurden in einer Mischung aus 12 mL THF, 8 mL Wasser und 12 mL MeOH gelöst. Die Lösung wurde 30 min mit Stickstoff entgast und 24 h bei 60 °C gerührt. Nachdem DC-Kontrolle den vollständigen Umsatz anzeigte, wurde mit festem NH₄Cl neutralisiert und mehrmals mit EE extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Die Reinigung durch FC (Kieselgel, DCM/Aceton 4:1, EE/MeOH 10:1 und EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5) lieferte 40 mg des gelblichen Produkts (25 %). Zur Untersuchung des Nukleosids mittels optischer Spektroskopie wurde eine weitere Aufreinigung mit Hilfe von präparativer Dünnschichtchromatographie (SiO₂, EE/MeOH/H₂O 10:1:1) durchgeführt.

DC (EE/MeOH/H₂O 10:1:0.5) R_f = 0.40

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.90 (br s, 1 H, NH), 9.34 (m, 2 H, H-10, H-11), 8.57 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, H-12), 8.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-1), 8.27 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H, H-3), 8.08 (m, 2 H, H-2, H-4), 7.91 (m, 1 H, H-9), 7.83 (m, 1.5 H, H-8, H-7), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 0.5 H, H-7), 7.55 (d, *J* = 9.5 Hz, 0.5 H, H-5), 7.40 (d, *J* = 9.5 Hz, 0.5 H, H-5), 6.53 (br s, 2 H, NH₂), 5.47 (m, 1 H, H-1'), 4.36 (m, 1 H, H-3'), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 3.58 (m, 1 H, H-5'), 3.46 (m, 1 H, H-5'), 2.81 (m, 1 H, H-2'), 1.70 (m, 1 H, H-2').

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 157.49, 156.30, 154.27, 132.58 (C-7), 130.02 (C-12), 130.33 and 127.83 (C-4 and C-2), 128.05, 127.75 (C-1), 127.08 (C-3), 127.66 (C-9), 126.05, 125.93 (C-5), 123.43 and 124.94 (C-10 and C-11), 121.35, 88.80 (C-4'), 85.97 (C-1'), 71.93 (C-3'), 62.94 (C-5'), 37.39 (C-2').

HRMS (ESI/FTICR): m/z berechnet für C₃₀H₂₃N₅O₄ [M + H]⁺ 518.18228, gefunden 518.18207.

6.5 *Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden*

6.5.1 Allgemeines

DNA-Festphasensynthese

Die Oligonukleotide wurden im Synthesizer auf CPG-Säulen nach Standardprotokollen synthetisiert und am Ende der Synthese am 5'-Ende entschützt (*trityl-off*). Die artifiziellen DNA-Bausteine wurden in Aceonitrol (amidite diluent) aufgenommen und als 0.1 M Lösung in den Synthesizer eingebracht. Für die Ethidium-Phosphoramidite wurde analog zur Literatur eine 0.2 M Lösung verwendet.^[19] Das PydG-Phosphoramidit wurde in trockenem Dichlormethan gelöst und als 0.1 M Lösung eingesetzt.

Kupplungsprotokolle

Der Synthesizer pumpt Flüssigkeiten aus Vorratsflaschen in Pulsen von je 16 µl durch die Reaktionsgefäße. Ein Kupplungsprotokoll setzt sich aus Einzelschritten zusammen, 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. Der Einbau der Ethidium-DNA-Bausteine erfolgte nach einem in Vorarbeiten^[33] in unserer Gruppe entwickelten Kupplungsprotokoll mit einer verlängerten Kupplungszeit von 1 h und drei sich wiederholenden Kupplungszyklen. Der Einbau des PydG-Phosphoramidits erfolgte nach einem modifizierten Kupplungsprotokoll mit einer verlängerten Kupplungszeit (15 min statt 1.5 min). Das Phosphoramidit wurde, aufgrund seiner begrenzten Löslichkeit in ACN, in trockenem DCM aufgenommen und eine 0.1 M

Lösung hergestellt. Das Kupplungsprotokoll ist unten abgebildet. Um ein Ausfällen des Phosphoramidits in ACN zu vermeiden wurde die feste Phase unmittelbar nach der Kupplung mit DCM gespült.

```

/* -----
/*      Function                Mode  Amount  Time(sec)  Description
/*                               /Arg1  /Arg2
/* -----
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA      1      0  "Event out ON"
   0 /*Default            */ WAIT    0     1.5  "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      1      1  "START data collection"
   16 /*Dblk              */ PULSE   10     0  "Dblk to column"
   16 /*Dblk              */ PULSE   50     49  "Deblock"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE   40     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      0      1  "STOP data collection"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE   40     0  "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      2      0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                 */ PULSE    5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE    6     0  "Flush system with Act"
  23 /**6 + Act           */ PULSE    7     0  "Monomer + Act to column"
  23 /**6 + Act           */ PULSE    2    75  "Couple monomer"
   2 /*Act                 */ PULSE    4   300  "Weiterkuppeln!"
   1 /*Wsh                 */ PULSE    7  525  "MEHR Ausbeute!"
   1 /*Wsh                 */ PULSE    8     0  "Flush system with Wsh"
   7 /**9                 */ PULSE   25     0  "DCM wash"
   1 /*Wsh                 */ PULSE   40     0  "Wash"
$Capping
  12 /*Wsh A              */ PULSE   20     0  "Flush system with Wsh A"
  13 /*Caps               */ PULSE    8     0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A              */ PULSE    6    15  "Cap"
  12 /*Wsh A              */ PULSE   14     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
  15 /*Ox                 */ PULSE   15     0  "Ox to column"
  12 /*Wsh A              */ PULSE   15     0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
  13 /*Caps               */ PULSE    7     0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A              */ PULSE   30     0  "End of cycle wash"

```

Abb. 6-1: Kupplungsprotokoll für PydG. Kupplung des PydG-Phosphoramidits (rot), Waschvorgang mit DCM (blau). Erläuterungen: **Dblk:** Deblock (3 % Dichloressigsäure in DCM); **Wsh:** ACN; **Act:** 0.45 M Tetrazol in ACN; **Caps:** Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox:** Oxidizer (Wasser/THF/Pyridin).

Der Einbau des C8-Arylamin-dG-Phosphoramidite erfolgte nach einem modifizierten Kupplungsprotokoll mit einer verlängerten Kupplungszeit (1 h statt 1.5 min) und erhöhter Reagenzienmenge. Das Phosphoramidit wurde in ACN aufgenommen (0.1 M Lösung). Das Kupplungsprotokoll ist unten abgebildet.

```

/* -----
/*      Function              Mode  Amount  Time(sec)      Description
/*                               /Arg1   /Arg2
/* -----
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA      1      0      "Event out ON"
0 /*Default              */ WAIT    0      1.5    "wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      1      1      "START data collection"
16 /*Dblk                */ PULSE   10     0      "Dblk to column"
16 /*Dblk                */ PULSE   50     49     "Deblock"
38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE   40     0      "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      0      1      "STOP data collection"
38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE   40     0      "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      2      0      "Event out OFF"
$Coupling
1 /*Wsh                  */ PULSE   5      0      "A Flush system with Wsh"
2 /*Act                  */ PULSE   7      0      "A Flush system with Act"
23 /**6 + Act           */ PULSE   6      0      "A Monomer + Act to column"
23 /**6 + Act           */ PULSE   2      500    "A Couple monomer mod. 1"
2 /*Act                  */ PULSE   3      300    "A Couple monomer mod. 2"
23 /**6 + Act           */ PULSE   3      50     "A Couple monomer mod. 3"
23 /**6 + Act           */ PULSE   1      500    "A Couple monomer mod. 4"
2 /*Act                  */ PULSE   3      300    "A Couple monomer mod. 5"
1 /*Wsh                  */ PULSE   7      200    "A Couple monomer mod. 6"
2 /*Act                  */ PULSE   7      0      "B Flush system with Act"
23 /**6 + Act           */ PULSE   6      0      "B Monomer + Act to column"
23 /**6 + Act           */ PULSE   2      500    "B Couple monomer mod. 1"
2 /*Act                  */ PULSE   3      300    "B Couple monomer mod. 2"
23 /**6 + Act           */ PULSE   3      50     "B Couple monomer mod. 3"
23 /**6 + Act           */ PULSE   1      500    "B Couple monomer mod. 4"
2 /*Act                  */ PULSE   3      300    "B Couple monomer mod. 5"
1 /*Wsh                  */ PULSE   7      200    "B Couple monomer mod. 6"
1 /*Wsh                  */ PULSE   30     0      "B Flush system with Wsh"
$Capping
12 /*Wsh A               */ PULSE   20     0      "Flush system with Wsh A"
13 /*Caps                */ PULSE   8      0      "Caps to column"
12 /*Wsh A               */ PULSE   6      15     "Cap"
12 /*Wsh A               */ PULSE   14     0      "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
15 /*Ox                  */ PULSE   15     0      "Ox to column"
12 /*Wsh A               */ PULSE   15     0      "Flush system with Wsh A"
$Capping
13 /*Caps                */ PULSE   7      0      "Caps to column"
12 /*Wsh A               */ PULSE   30     0      "End of cycle wash"

```

Abb. 6-2: Kupplungsprotokoll für C8-Arylamin-dG. Kupplung des C8-Arylamin-dG-Phosphoramidits (rot), Erläuterungen: **Dblk:** Deblock (3 % Dichloressigsäure in DCM); **Wsh:** ACN; **Act:** 0.45 M Tetrazol in ACN; **Caps:** Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox:** Oxidizer (Wasser/THF/Pyridin).

Aufarbeitung

Die Abspaltung der Oligonukleotide von der festen Phase erfolgte mit konzentriertem Ammoniak. Pro CPG wurden 700 μl NH_3 verwendet. Bei 55°C wurde über Nacht erhitzt. Bei den ethidiummodifizierten Oligonukleotiden wurde nur 5.5 h bei 90°C erhitzt. Danach wurde das Trägermaterial abzentrifugiert, der Ammoniak an der *SpeedVac* entfernt und die wässrigen Proben lyophilisiert. Anschließend wurden die Proben in entionisiertem Wasser (280 μl pro CPG) resuspendiert und mittels semi-präparativer RP-HPLC gereinigt.

Identifizierung der Oligonukleotide durch MALDI-TOF-MS

Zur Ionisierung diente eine Matrix aus 50 mg/ml 3-Hydroxy-Picolinsäure in Acetonitril/ H_2O (1:1) und 50 mg/ml Diammoniumcitrat in H_2O im Verhältnis 9:1. Für eine Probe wurden ca. 1 μl DNA mit 20 μl Matrix vermischt.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Es wurden Stammlösungen der Oligonukleotide in entionisiertem Wasser hergestellt, deren Konzentration über die optische Dichte bei 260 nm bestimmt wurde. Der Extinktionskoeffizient des modifizierten Oligonukleotids wurde durch Addition aller Koeffizienten der einzelnen Nukleobasen bestimmt und mit einem Faktor von 0.9 multipliziert, um die Hypochromizität zu berücksichtigen.

Tabelle 6-1: Molare Extinktionskoeffizienten (ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]) modifizierter Nukleotide in DNA.

artifizielles Nukleotid	ϵ_{260} [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
PydG*	17.9
dS	0
Z	13.9
E, F	45.2
N	18.1

* experimentell bestimmt in MeOH

Für die C8-dG-Arylamin-Addukte wurde ϵ_{260} (dG) = 11.7 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet.

Hybridisierung von DNA-Duplexen

Der modifizierte Einzelstrang wurde mit 1.2 eq des komplementären Gegenstrangs versetzt, um eine quantitative Duplexbildung zu gewährleisten. In einem 10 mM Natriumphosphatpuffer NaP_i (pH 7) wurden die Einzelstränge 10 min bei 90°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt.

Schmelztemperaturmessungen

Für die Schmelztemperaturmessungen wurden Duplexlösungen in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl frisch hybridisiert. Die Messung erfolgte im Cary100 UV-Vis-Spektrometer bei 260, 350 oder 370 nm. Die Konzentration der Duplexlösungen war so hoch, dass sie eine Absorption von > 0.1 OD bei der verwendeten Wellenlänge aufwiesen (meist 2.5 bzw. 5 µM).

6.5.2 Verwendete Oligonukleotidsequenzen**Oligonukleotide mit einem Ethidium-Nukleotid (s. Kapitel 3.2-3.4)**

E15	5'-TGC-ATG-CAG-TEA-CTG-AC-3'	→ Kontrollduplexe:
		E15/C26, E16/C27, E17/C28
E16	5'-GCA-TGC-AGT-TEA-CTG-AC-3'	
E17	5'-CAT-GCA-GTC-TEA-CTG-AC-3'	
E18	5'-TGC-ATG-CAN-TEA-CTG-AC-3'	→ Ladungstransferduplexe:
		E18/C26, E19/C27, E20/C28
E19	5'-GCA-TGC-ANT-TEA-CTG-AC-3'	
E20	5'-CAT-GCA-NTC-TEA-CTG-AC-3'	N: 5-Nitroindol
E21	5'-TGC-ATG-CAZ-TEA-CTG-AC-3'	→ Ladungstransferduplexe:
		E21/C26, E22/C27, E23/C28
E22	5'-GCA-TGC-AZT-TEA-CTG-AC-3'	
E23	5'-CAT-GCA-ZTC-TEA-CTG-AC-3'	

Gegenstränge zu E15-E23:

C26 3'-ACG-TAC-GTC-**AS**T-GAC-TG-5' **S**:dSpacer

C27 3'-CGT-ACG-TCA-**AS**T-GAC-TG-5'

C28 3'-GTA-CGT-CAG-**AS**T-GAC-TG-5'

DNA1-XY-DNA4-XY:

DNA1-XY:

E1 5'-CAG-CAT-GT**A**-**E**AT-GCT-G-3'

E2 5'-CAG-CAT-GT**C**-**E**AT-GCT-G-3'

E3 5'-CAG-CAT-GT**G**-**E**AT-GCT-G-3'

E4 5'-CAG-CAT-GT**I**-**E**AT-GCT-G-3'

DNA2-XY:

E5 5'-CAG-CAT-**Z**T**A**-**E**AT-GCT-G-3'

E6 5'-CAG-CAT-**Z**T**C**-**E**AT-GCT-G-3'

E7 5'-CAG-CAT-**Z**T**G**-**E**AT-GCT-G-3'

E8 5'-CAG-CAT-**Z**T**I**-**E**AT-GCT-G-3'

E: Ethidium

Z: Deazaguanin

Gegenstränge zu DNA1-XY und DNA2-XY:

C16 3'-GTC-GTA-CA**A**-CTA-CGA-C-5'

C17 3'-GTC-GTA-CA**C**-CTA-CGA-C-5'

C18 3'-GTC-GTA-CA**G**-CTA-CGA-C-5'

C19 3'-GTC-GTA-CA**I**-CTA-CGA-C-5'

C20 3'-GTC-GTA-CA**S**-CTA-CGA-C-5'

Kontrollduplexe DNA1-XY:

E1/C16, E1/C17, E1/C18, E1/C19, E1/C20

E2/C16, E2/C17, E2/C18, E2/C19, E2/C20

E3/C16, E3/C17, E3/C18, E3/C19, E3/C20

E4/C16, E4/C17, E4/C18, E4/C19, E4/C20

Ladungstransferduplexe DNA2-XY:

E5/C16, E5/C17, E5/C18, E5/C19, E5/C20

E6/C16, E6/C17, E6/C18, E6/C19, E6/C20

E7/C16, E7/C17, E7/C18, E7/C19, E7/C20

E8/C16, E8/C17, E8/C18, E8/C19, E8/C20

DNA3-XY :E12 5'-CAG-CAT-ZAT-EAT-GCT-G-3'E13 5'-CAG-CAT-ZCT-EAT-GCT-G-3'E14 5'-CAG-CAT-ZGT-EAT-GCT-G-3'E8 5'-CAG-CAT-ZIT-EAT-GCT-G-3'**Gegenstränge zu DNA3-XY:**C16 3'-GTC-GTA-CAA-CTA-CGA-C-5'C22 3'-GTC-GTA-CCA-CTA-CGA-C-5'C23 3'-GTC-GTA-CGA-CTA-CGA-C-5'C24 3'-GTC-GTA-CIA-CTA-CGA-C-5'C25 3'-GTC-GTA-CSA-CTA-CGA-C-5'**Ladungstransferduplexe DNA3-XY:**

E12/C16, E12/C22, E12/C23, E12/C24, E12/C25

E13/C16, E13/C22, E13/C23, E13/C24, E13/C25

E14/C16, E14/C22, E14/C23, E14/C24, E14/C25

E8/C16, E8/C22, E8/C23, E8/C24, E8/C25

Kontrollduplexe

E24 5'-GGT-GAG-GAT-GGG-CCT-**ECG**-GTT-CAT-GCC3'
C29 3'-CCA-CTC-CTA-CCC-GGA-GGC-CAA-GTA-CGG-5'

E24 5'-GGT-GAG-GAT-GGG-CCT-**ECG**-GTT-CAT-GCC-3'
C30 3'-CCA-CTC-CTA-CCC-TGA-GGC-CAA-GTA-CGG-5'

E26 5'-TTC-CTC-TGT-GCG-CCG-**ETC**-TCT-CCC-AGG-3'
C31 3'-AAG-GAG-ACA-CGC-GGC-CAG-AGA-GGG-TCC-5'

E26 5'-TTC-CTC-TGT-GCG-CCG-**ETC**-TCT-CCC-AGG-3'
C32 3'-AAG-GAG-ACA-CGC-GGT-CAG-AGA-GGG-TCC-5'

Ladungstransferduplexe

E25 5'-GGT-GAG-GAT-GG**Z**-CCT-**ECG**-GTT-CAT-GCC3'
C29 3'-CCA-CTC-CTA-CCC-GGA-GGC-CAA-GTA-CGG-5'

E25 5'-GGT-GAG-GAT-GG**Z**-CCT-**ECG**-GTT-CAT-GCC3'
C30 3'-CCA-CTC-CTA-CCC-TGA-GGC-CAA-GTA-CGG-5'

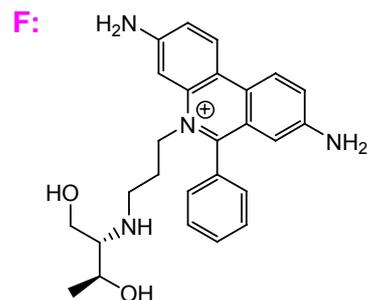
E27 5'-TTC-CTC-TGT-GC**Z**-CCG-**ETC**-TCT-CCC-AGG-3'
C31 3'-AAG-GAG-ACA-CGC-GGC-CAG-AGA-GGG-TCC-5'

E27 5'-TTC-CTC-TGT-GC**Z**-CCG-**ETC**-TCT-CCC-AGG-3'
C32 3'-AAG-GAG-ACA-CGC-GGT-CAG-AGA-GGG-TCC-5'

F28 5'-TGC-ATG-CAG-**TFA**-CTG-AC-3'

F29 5'-CAT-GCA-**GTC**-**TFA**-CTG-AC-3'

Duplexe: F28/C26, F29/C28



Oligonukleotide mit einem PydG-Nukleotid (s. Kapitel 4.3)

P1	5'-GCA-GTC-T G P-GTC-ACT-GA-3'	P = PydG
C1	3'-CGT-CAG-ACC-CAG-TGA-CT-5'	
P2	5'-GCA-GTC-T A P-ATC-ACT-GA-3'	
C2	3'-CGT-CAG-ATC-TAG-TGA-CT-5'	
P3	5'-GCA-GTC-T T P-TTC-ACT-GA-3'	
C3	3'-CGT-CAG-AAC-AAG-TGA-CT-5'	
P4	5'-GCA-GTC-T C P-CTC-ACT-GA-3'	
C4	3'-CGT-CAG-AGC-GAG-TGA-CT-5'	
P5	5'-GCA-TCT-C P T-TCA-CTG-A-3'	
C11	3'-CGT-AGA-GCA-AGT-GAC-T-5'	
P6	5'-GCA-TCT-G P A-TCA-CTG-A-3'	
C12	3'-CGT-AGA-CCT-AGT-GAC-T-5'	

Fehlgepaarte Duplexe

P2	5'-GCA-GTC-T A P-ATC-ACT-GA-3'	P3	5'-GCA-GTC-T T P-TTC-ACT-GA-3'
C5	3'-CGT-CAG-AT T -TAG-TGA-CT-5'	C8	3'-CGT-CAG-AA T -AAG-TGA-CT-5'
P2	5'-GCA-GTC-T A P-ATC-ACT-GA-3'	P3	5'-GCA-GTC-T T P-TTC-ACT-GA-3'
C6	3'-CGT-CAG-AT A -TAG-TGA-CT-5'	C9	3'-CGT-CAG-AA A -AAG-TGA-CT-5'
P2	5'-GCA-GTC-T A P-ATC-ACT-GA-3'	P3	5'-GCA-GTC-T T P-TTC-ACT-GA-3'
C7	3'-CGT-CAG-AT G -TAG-TGA-CT-5'	C10	3'-CGT-CAG-AA G -AAG-TGA-CT-5'

P7	5'-TGC-ATG-CAG-TPA-CTG-AC -3'	P10	5'-TGC-ATG-CAZ-TPA-CTG-AC -3'
C13	3'-ACG-TAC-GTC-AST-GAC-TG-5'	C13	3'-ACG-TAC-GTC-AST-GAC-TG-5'
P8	5'-GCA-TGC-AGT-TPA-CTG-AC -3'	P11	5'-GCA-TGC-AZT-TPA-CTG-AC -3'
C14	3'-CGT-ACG-TCA-AST-GAC-TG-5'	C14	3'-CGT-ACG-TCA-AST-GAC-TG-5'
P9	5'-CAT-GCA-GTC-TPA-CTG-AC -3'	P12	5'-CAT-GCA-ZTC-TPA-CTG-AC -3'
C15	3'-GTA-CGT-CAG-AST-GAC-TG-5'	C15	3'-GTA-CGT-CAG-AST-GAC-TG-5'

Z: Deazaguanin
S: dSpacer

C8-Arylamin-dG-modifizierte Oligonukleotide (s. Kapitel 4.4)

A30 5'-GCA-TCT-CAAT-TCA-CTG-A-3'

A31 5'-GCA-TCT-GAA-TCA-CTG-A-3'

B32 5'-GCA-TCT-GBA-TCA-CTG-A-3'

Hergestellte Duplexe: A30/C11, A31/C12, B32/C12

Unmodifizierte Oligonukleotide

G1 5'-GCA-TCT-CGT-TCA-CTG-A-3'

C11 3'-CGT-AGA-GCA-AGT-GAC-T-5'

G2 5'-GCA-TCT-GGA-TCA-CTG-A-3'

C12 3'-CGT-AGA-CCT-AGT-GAC-T-5'

6.5.3 Synthese und Charakterisierung von Ethidiummodifizierten Oligonukleotiden

Der Einbau des Ethidiumnukleotids (0.2 M in ACN) erfolgte nach einem optimierten Kupplungsprotokoll mit einer verlängerten Kupplungszeit von 60 min und drei Kupplungszyklen.^[18]

Tabelle 6-2: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten.

DNA-Strang	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
E1	5068	5072	194.1
E2	5044	5048	186.9
E3	5084	5093	190.8
E4	5059	5073	188.2
E5	5069	5073	197.5
E6	5045	5048	190.2
E7	5085	5088	194.2
E8	5060	5062	191.6
E12	5069	5076	197.5
E13	5045	5049	190.2
E14	5085	5088	194.2
E15	5359	5359	200.7
E16	5359	5363	200.7
E17	5319	5323	196.8
E18	5369	5376	208.3
E19	5369	5372	208.3
E20	5329	5336	204.3
E21	5358	5366	204.1
E22	5358	5352	204.1
E23	5318	5325	200.1
E24	8537	8550	289.6
E25	8536	8541	292.9
E26	8319	8328	257.9
E27	8318	8317	261.2
C26	5060	5060	155.5
C27	5060	5059	155.5
C28	5100	5099	159.5
E28	5374	5374	200.7
E29	5333	5331	196.8

Tabelle 6-3: Schmelzpunkte bei 260 nm von 2.5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i mit 250 mM NaCl.

DNA	Smp [°C]						
E1/C16	76	E3/C16	75	E5/C16	76	E7/C16	70
E1/C17	75	E3/C17	71	E5/C17	75	E7/C17	74
E1/C18	77	E3/C18	74	E5/C18	73	E7/C18	72
E1/C19	71	E3/C19	75	E5/C19	77	E7/C19	70
E1/C20	77	E3/C20	74	E5/C20	75	E7/C20	71
E2/C16	75	E4/C16	78	E5/C16	74	E8/C16	76
E2/C17	77	E4/C17	77	E6/C17	74	E8/C17	73
E2/C18	70	E4/C18	76	E6/C18	70	E8/C18	74
E2/C19	75	E4/C19	77	E6/C19	75	E8/C19	76
E2/C20	77	E4/C20	78	E6/C20	77	E8/C20	75

Tabelle 6-4: Schmelztemperaturen bei 260 nm von 2.5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i mit 250 mM NaCl.

DNA	Smp [°C]	DNA	Smp [°C]	DNA	Smp [°C]
E12/C16	72	E14/C16	76	E16/C27	65
E12/C22	72	E14/C22	72	E17/C28	64
E12/C23	77	E14/C23	77	E18/C26	59
E12/C24	74	E14/C24	75	E19/C27	56
E12/C25	71	E14/C25	72	E20/C28	55
E13/C16	72	E8/C22	75	E21/C26	68
E13/C22	71	E8/C23	79	E22/C27	63
E13/C23	72	E8/C24	75	E23/C28	64
E13/C24	72	E8/C25	76		
E13/C25	73	E15/C26	67		

Tabelle 6-5: Schmelztemperaturen bei 260 nm von 2.5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i mit 100 mM NaCl.

DNA	Smp [°C]	DNA	Smp [°C]
E24/C29	77	E26/C31	77
E24/C30	70	E26/C32	76
E25/C29	75	E27/C31	77
E25/C30	69	E27/C32	74

6.5.4 Synthese und Charakterisierung von PydG-modifizierten Oligonukleotiden

Der Einbau von PydG (0.1 M in DCM) erfolgte nach einem Kupplungsprotokoll mit verlängerter Kupplungszeit von 15 min und zusätzlichen Waschschritten.

Tabelle 6-6: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten.

DNA-Strang	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]	ε_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
P1	5425	5428	170.1
P2	5393	5394	176.8
P3	5375	5375	164.9
P4	5345	5348	162.2
P5	5031	5024	153.0
P6	5080	5077	162.9
P7	5409	5410	173.4
P8	5409	5417	173.4
P9	5369	5376	169.5
P10	5408	5408	176.8
P11	5408	5409	176.8
P12	5368	5365	172.8
C13	5060	5060	155.5
C14	5060	5059	155.5
C15	5100	5099	159.5

Tabelle 6-7: Schmelztemperaturen von 2.5 μM Duplex in 10 mM NaP_i mit 250 mM NaCl, bei unterschiedlichen Wellenlängen.

DNA-Duplex	Smp [$^{\circ}\text{C}$] bei 260 nm	Smp [$^{\circ}\text{C}$] bei 350 nm	Smp [$^{\circ}\text{C}$] bei 370 nm
P1/C1	63	66	64
P2/C2	58	57	57
P3/C3	52	54	54
P4/C4	59	60	61
P2/C5	57	54	
P2/C6	56	56	
P3/C8	53	51	

Tabelle 6-8: Schmelztemperaturen von 2.5 μM Duplex in 10 mM NaP_i mit 250 mM NaCl.

DNA-Duplex	Smp [$^{\circ}\text{C}$] bei 260 nm
P3/C9	53
P3/C10	56
P2/C7	60
P5/C11	51
P6/C12	55
P7/C13	59
P8/C14	55
P9/C15	54
P10/C13	60
P11/C14	55
P12/C15	55
G1/C11	65
G2/C12	65

7 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [2] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 411-415.
- [3] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, 17, 53-120.
- [4] D. Wang, D. A. Kreuzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.
- [5] S. Kawanashi, Y. Hiraku, S. Oikawa, *Mutation Res.* **2001**, 488, 65-76.
- [6] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [7] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Seide, *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press: Washington, 1995.
- [8] T. Carell, *Chimia* **1995**, 49, 365-373.
- [9] T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2491-2494.
- [10] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2203-2237.
- [11] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2865-2869.
- [12] D. H. Blohm, A. Guiseppi-Elie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 41-47.
- [13] M. C. Pirrung, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1276-1289.
- [14] A. Jung, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 372, 41-42.
- [15] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2003**, 21, 1192-1199.
- [16] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1623-1633.
- [17] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 7842-7849.
- [18] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1845-1847.
- [19] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 744-751.
- [20] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3656-3660.
- [21] S. J. Atherton, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 12025-12029.
- [22] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9861-9870.
- [23] D. B. Hall, S. O. Kelley, J. K. Barton, *Biochemistry* **1998**, 37, 15933-15940.
- [24] A. I. Kononov, E. B. Moroshkina, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyninen, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 535-541.
- [25] P. T. Henderson, E. Boone, G. B. Schuster, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 135-151.
- [26] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5361-5362.
- [27] S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 3993-3997.
- [28] D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochemistry* **1992**, 31, 11620-11625.
- [29] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6014-6019.
- [30] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 413-425.
- [31] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617-618.
- [32] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4701-4709.
- [33] N. Amann. Synthese von Ethidium- und Pyren-modifizierten Oligonukleotiden und deren Einsatz bei der Untersuchung des Ladungstransfers durch die DNA. Dissertation, TU München, 2004.
- [34] G. Kokkinidis, A. Kelaidopoulou, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 414, 197-208.

- [35] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878-1879.
- [36] A. Luch, *Chem. in unserer Zeit* **2001**, 35, 294-305.
- [37] N. V. S. Ramakrishna, F. Gao, N. S. Padmavathi, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan, R. L. Cerny, M. L. Gross, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, 5, 293-302.
- [38] P. D. Devanesan, S. Higginbotham, F. Ariese, R. Jankowiak, M. Suh, G. J. Small, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 1113-1116.
- [39] L. Chen, P. D. Devanesan, S. Higginbotham, F. Ariese, R. Jankowiak, G. J. Small, E. G. Rogan, E. L. Cavalieri, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 897-903.
- [40] E. G. Rogan, E. L. Cavalieri, S. R. Tibbels, P. Cremonesi, C. D. Werner, D. L. Nagel, K. B. Tomer, R. L. Cerny, M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4023-4029.
- [41] P. Cremonesi, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3561-3570.
- [42] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1685-1690.
- [43] D. Loakes, F. Hill, D. M. Brown, S. A. Salisbury, *J. Mol. Biol.* **1997**, 270, 426-435.
- [44] D. Loakes, D. M. Brown, *Nucl. Acids Res.* **1994**, 22, 4039-4043.
- [45] R. X.-F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. R. IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7671-7678.
- [46] L. Valis, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 36-38.
- [47] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.
- [48] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2978-2980.
- [49] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691.
- [50] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9119-9128.
- [51] I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, A. A. Petrov, S. V. Gontarev, Y. A. Berlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2081-2084.
- [52] L. Zhang, H. Long, G. E. Boldt, K. D. Janda, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 314-322.
- [53] A. Stutz, S. M. Langenegger, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3156-3163.
- [54] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, 277, 673-676.
- [55] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281-3289.
- [56] 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.
- [57] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11280-11281.
- [58] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1122-1130.
- [59] H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 2482-2506.
- [60] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374.
- [61] H.-A. Wagenknecht, *Chem. in unserer Zeit* **2002**, 36, 318-330.

- [62] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, 406, 51-53.
- [63] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503-520.
- [64] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, 431, 217-221.
- [65] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265-322.
- [66] J. R. Winkler, H. B. Gray, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 369-379.
- [67] M. R. Wasielewski, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 435-461.
- [68] M. E. Nunez, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 199-206.
- [69] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, 281, 409-428.
- [70] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12759-12765.
- [71] M. E. Núñez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 85-97.
- [72] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5541-5553.
- [73] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, 412, 318-320.
- [74] B. Giese, M. Spichy, S. Wessely, *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 449-453.
- [75] E. Furrer, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3623-3632.
- [76] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 51-70.
- [77] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, B. Cohen, M. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7982-7985.
- [78] I. Saito, T. Nakamura, K. Nakatani, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12686-12687.
- [79] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7063-7068.
- [80] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6406-6407.
- [81] F. Shao, M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17914-17919.
- [82] S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, 40, 5556-5564.
- [83] S. R. Rajski, S. Kumar, R. J. Roberts, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5615-5616.
- [84] T. T. Williams, D. T. Odom, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9048-9049.
- [85] M. E. Núñez, K. T. Noyes, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 403-415.
- [86] T. T. Williams, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1840-1841.
- [87] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9083-9092.
- [88] O. Schiemann, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 7214-7220.
- [89] E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2921-2925.
- [90] K. L. Nguyen, M. Steryo, K. Kurbanyan, K. M. Nowitzki, S. M. Butterfield, S. R. Ward, E. D. A. Stemp, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3585-3594.
- [91] K. D. Copeland, A. M. K. Lueras, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochemistry* **2002**, 41, 12785-12797.
- [92] P. K. Bhattacharya, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8649-8656.
- [93] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. C. Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 389-400.

- [94] E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, A. M. Jonkman, M. E. Arkin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, P. F. Barbara, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11458-11467.
- [95] K. Kino, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7373-7374.
- [96] S. Kanvah, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7341-7344.
- [97] S. M. Gasper, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12762-12771.
- [98] C.-S. Liu, R. Hernandez, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2877-2884.
- [99] N. W. Schlientz, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15732-15733.
- [100] C.-S. Liu, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6098-6102.
- [101] I. M. Abdou, V. Sartor, H. Cao, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6696-6697.
- [102] L. Sanii, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11545-11546.
- [103] A. K. Dotse, E. K. Boone, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6825-6833.
- [104] S. Kanvah, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11286-11287.
- [105] U. Santhosh, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10986-10987.
- [106] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10854-10855.
- [107] K. Nakatani, I. Saito, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 163-186.
- [108] C. Dohno, I. Saito, Chemical Approaches to Modulating Hole Transport Through DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 153-174.
- [109] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 416-417.
- [110] C. Dohno, A. Ogawa, K. Nakatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10154-10155.
- [111] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5066-5071.
- [112] A. Okamoto, K. Tanaka, K.-i. Nishiza, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5875-5880.
- [113] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9458-9463.
- [114] K. Nakatani, T. Yoshida, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2118-2119.
- [115] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6901-6904.
- [116] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 10041-10045.
- [117] C. Dohno, K. Nakatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14580-14585.
- [118] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5893-5894.
- [119] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9681-9682.
- [120] P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 8353-8358.
- [121] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12950-12955.
- [122] B. Giese, S. Wessely, M. Spormann, U. Lindemann, E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 996-998.
- [123] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 631-636.
- [124] B. Giese, E. Meggers, S. Wessely, M. Spormann, A. Biland, *Chimia* **2000**, 54, 547-551.

- [125] B. Giese, S. Wessely, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 3490-3491.
- [126] E. Meggers, D. Kusch, M. Spichy, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 459-462.
- [127] E. Meggers, A. Dussy, T. Schäfer, B. Giese, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 485-492.
- [128] A. Marx, P. Erdmann, M. Senn, S. Körner, T. Jungo, M. Petretta, P. Imwinkelried, A. Dussy, K. J. Kulicke, M. Zehnder, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 1980-1994.
- [129] 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.
- [130] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 67-115.
- [131] T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 352-354.
- [132] F. D. Lewis, J. Liu, X. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1026-1028.
- [133] F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 45-65.
- [134] 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*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 93-116.
- [135] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8206-8215.
- [136] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10002-10003.
- [137] 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.
- [138] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 159-170.
- [139] F. D. Lewis, Y. Wu, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12165-12173.
- [140] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12729-12731.
- [141] F. D. Lewis, Y. Wu, *J. Photochem. Photobiol. C* **2001**, 2, 1-16.
- [142] 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.
- [143] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14020-14026.
- [144] F. D. Lewis, J. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4850-4861.
- [145] F. D. Lewis, J. Liu, W. Weigel, W. Rettig, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12536-12541.
- [146] F. Lewis, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12037-12038.
- [147] 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.
- [148] 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.
- [149] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 320-329.
- [150] 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*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 27-76.
- [151] S. Delaney, J. K. Barton, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6475-6483.
- [152] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 158-161.
- [153] K. Fukui, K. Tanaka, M. Fujitsuka, A. Watanabe, O. Ito, *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, 50, 18-27.
- [154] T. Fiebig, C. Wan, S. O. Kelley, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1187-1192.
- [155] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16543-16550.
- [156] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14052-14055.
- [157] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, 283, 375-381.
- [158] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 5896-5900.
- [159] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, 3, 781-788.
- [160] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10924-10933.
- [161] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 4399-4408.
- [162] V. Shafirovich, N. E. Geacintov, Spectroscopic Investigation of Charge Transfer in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 175-196.
- [163] V. Shafirovich, N. E. Geacintov, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 237, 129-157.
- [164] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 8431-8435.
- [165] V. Y. Shafirovich, S. H. Courtney, N. Ya, N. E. Geacintov, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4920-4929.
- [166] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 137-139.
- [167] W. B. Davis, S. Hess, I. Naydenova, R. Haselsberger, A. Ogrodnik, M. D. Newton, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2422-2423.
- [168] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 342, 231-238.
- [169] 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.
- [170] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10046-10055.
- [171] K. Kawai, T. Majima, Spectroscopic Investigation of Oxidative Hole Transfer via Adenine Hopping in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 117-132.
- [172] K. Kawai, K. Miyamoto, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 912-915.
- [173] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, N. Ichinose, T. Majim, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12688-12689.
- [174] K. Kawai, H. Yoshida, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13232-13237.

- [175] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6842-6843.
- [176] K. Kawai, T. Majima, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 117-137.
- [177] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4400-4407.
- [178] J. Yoo, S. Delaney, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6640-6641.
- [179] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, (27), 10192-10195.
- [180] 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.
- [181] E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2002**, 20, 282-286.
- [182] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. d. Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10803-10812.
- [183] N. M. Jackson, M. G. Hill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 209-215.
- [184] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 770-772.
- [185] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144-146.
- [186] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, 398, 407-410.
- [187] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 4128-4158.
- [188] D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, 403, 635-638.
- [189] M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11713-11716.
- [190] B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 612-618.
- [191] S. Steenken, *Free Rad. Res. Comms.* **1992**, 16, 349-379.
- [192] S. Steenken, *Biol. Chem.* **1997**, 378, 1293-1297.
- [193] X. Li, Z. ai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 10115-10123.
- [194] Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 1460-1467.
- [195] 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.
- [196] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, 4827-4831.
- [197] C. Behrens, M. K. Cichon, F. Grolle, U. Hennecke, T. Carell, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 187-204.
- [198] 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*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 77-92.
- [199] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11480-11481.
- [200] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1839-1842.
- [201] S. E. Rokita, T. Ito, Chemical Probing of Reductive Electron Transfer in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 133-152.
- [202] O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 270-274.
- [203] 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.

- [204] S. T. Gaballah, J. D. Vaught, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 5927-5934.
- [205] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem-PhysChem* **2004**, 5, 706-712.
- [206] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4877-4883.
- [207] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 1637-1639.
- [208] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1871-1876.
- [209] L. Kittler, G. Löber, F. A. Gollmick, H. Berg, *J. Electroanal. Chem.* **1980**, 116, 503-511.
- [210] W. M. Clark, *Oxidation of Reduction Potentials of Organic Systems*. R. E. Krieger: Huntington New York, 1972.
- [211] L. Michaelis, E. S. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 1481-1494.
- [212] A. Sharma, R. G. Shulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1999.
- [213] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- [214] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, 9, 14-19.
- [215] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, 142, 463.
- [216] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, (8), 991-1024.
- [217] B. Speiser, *Chem. unserer Zeit* **1981**, 15, (2), 62-67.
- [218] J. Salbeck, *Anal. Chem.* **1993**, 65, (15), 2169-2173.
- [219] J. Reed, *Circular Dichroism as a Tool for Investigating Macromolecular Structure*. Walter de Gruyter: 1990; p 366-394.
- [220] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer: New York, 1984.
- [221] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3045-3046.
- [222] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [223] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [224] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1875-1916.
- [225] D. E. Bergstrom, *Nucleosides, Nucleotides* **1982**, 1, (1), 1-34.
- [226] V. Farina, S. I. Hauck, *Synlett* **1991**, 3, 157-159.
- [227] P. Herdewijn, L. Kerremans, P. Wigerinck, F. Vandendreissche, A. V. Aerschot, *Tet. Lett.* **1991**, 32, (34), 4397-4400.
- [228] G. T. Crisp, B. L. Flynn, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, (24), 6614-6619.
- [229] M. Hocek, A. Holý, I. Votruba, H. Dvoráková, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1817-1825.
- [230] M. Havelkova, M. Hocek, M. Cesnek, D. Dvorak, *Synlett* **1999**, 7, 1145-1147.
- [231] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- [232] D. Millstein, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4992-4998.
- [233] W. J. Scott, G. T. Crisp, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4630-4632.
- [234] W. J. Scott, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3033-3040.
- [235] A. M. Echavarren, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5478-5486.
- [236] E. Negishi, *Acc. Chem. Res.* **1982**, 15, 340-348.
- [237] T. R. Hoye, P. R. Hanson, A. C. Kovalsky, T. D. Ocain, Z. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9369-9371.
- [238] K. Sonogashira, Y. Toda, N. Hagihara, *Tetrahedron Letters* **1975**, 16, 4467-4470.

- [239] H. A. Dieck, R. F. Heck, *J. Organomet. Chem.* **1975**, 93, 259-263.
- [240] S. Takahashi, Y. Kuroyama, K. Sonogashira, N. Hagihara, *Synthesis* **1980**, 627-630.
- [241] P. Magnus, H. Annoura, T. Harling, *J. Org. Chem.* **1999**, 55, 1709-1711.
- [242] D. G. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbel, E. Robinson, M. Mittman, M. S. Morris, N. P. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E. S. Lander, *Science* **1998**, 280, 1077.
- [243] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, 234, 177.
- [244] A. J. Schafer, J. R. Hawkins, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 33.
- [245] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 505-508.
- [246] A.-C. Syvänen, *Human Mut.* **1999**, 13, 1-10.
- [247] R. Kwiatkowski, V. Lyamichev, M. d. Arruda, B. Neri, *Mol. Diagn.* **1999**, 4, 353.
- [248] K. J. Livak, *PCR Methods Appl.* **1995**, 4, 357.
- [249] P. Holland, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88, 7276.
- [250] R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, 86, 6230.
- [251] W. J. Kim, Y. sato, T. akaike, A. Maruyama, *Nat. Mater.* **2003**, 2, 815.
- [252] A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatami, I. Saito, *Mol. Biosyst.* **2006**, 2, 122-127.
- [253] A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *ChemBioChem* **2004**, 5, 958-963.
- [254] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4820-4827.
- [255] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Chem. Commun.* **2004**, 1704-1705.
- [256] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7827-7831.
- [257] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2203-2206.
- [258] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 69-77.
- [259] D. V. Jarikote, O. Köhler, E. Socher, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187-3195.
- [260] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2004**, 2674-2675.
- [261] O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938-2939.
- [262] V. Karunakaran, J. L. P. Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2954-2962.
- [263] S. S. Bag, Y. Saito, K. Hanawa, S. Kodate, I. Suzuka, I. Saito, *Bio. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 6338-6341.
- [264] N. Moran, D. M. Bassani, J.-P. Desvergne, S. Keiper, P. A. S. Lowden, J. S. Vyle, J. H. R. Tucker, *Chem. Commun.* **2006**, 5003-5005.
- [265] G. T. Hwang, Y. J. Seo, B. H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6528-6529.
- [266] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4977-4986.
- [267] L. J. P. Latimer, J. S. Lee, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 13849-13581.
- [268] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 269-282.
- [269] J.-B. LePecq, C. Paleotti, *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87-106.
- [270] I. John Olmsted, D. R. Kearns, *Biochemistry* **1977**, 16, 3647-3654.
- [271] K. S. Dahl, A. Pardi, J. Ignacio Tinoco, *Biochemistry* **1982**, 21, 2730-2737.

- [272] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comp. Chem.* **2004**, 25, 1605-1612.
- [273] S. R. Rajski, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutation Res.* **2000**, 447, 49-72.
- [274] B. Giese, S. Wessely, *The significance of proton migration during hole hopping through DNA.* 2001; p 2108-2109.
- [275] G. Cosa, K.-S. Focsaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 73, 585-599.
- [276] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nature Rev. Cancer* **2001**, 1, 68-76.
- [277] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, 408, 307-310.
- [278] P. Lamb, L. Crawford, *Mol. Cell. Biol.* **1986**, 6, 1379-1385.
- [279] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 990-1009.
- [280] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11590-11591.
- [281] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2213-2222.
- [282] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 936-943.
- [283] J. Frazer, S. M. Horner, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1279-1282.
- [284] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucleic Acids Research* **2002**, 30, 4918-4925.
- [285] M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 17461-17472.
- [286] S. A. El-Kafrawy, M. A. Zahran, E. B. Pedersen, *Heterocycl. Comm.* **1999**, 5, 539-542.
- [287] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 3865-3877.
- [288] D. O'Connor, V. Y. Shafirovich, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 9831-9839.
- [289] P. M. Gannett, T. P. Sura, *Synth. Commun.* **1993**, 23, 1611-1615.
- [290] D. J. McCaustland, A. B. Susan, J. C. Wiley, *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **1981**, (18), 1465-1470.
- [291] H. Suenaga, K. Nakashima, T. Mizuno, M. Takeuchi, I. Hamachi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1263-1267.
- [292] M. Beinhoff, W. Weigel, M. Jurczok, W. Rettig, C. Modrakowski, I. Brüdgam, H. Hartl, A. D. Schlüter, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3819-3829.
- [293] L. Valis, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3184-3187.
- [294] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3899-4031.
- [295] A. Trifonov, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 409, 277-280.
- [296] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 13, 2051-2054.
- [297] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Bio. Med. Chem.*, accepted.
- [298] H. G. Neumann, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, 112, 100.
- [299] F. A. Beland, F. F. Kadlubar, *Environ. Health Perspect.* **1985**, 62, 19.
- [300] C. Meier, S. Gräsl, *Synlett* **2002**, 802-804.
- [301] S. Gräsl, C. Meier, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 22, (5), 1119-1121.
- [302] S. Gräsl, C. Meier, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 22, 1119-1121.

- [303] R. H. Heflich, R. E. Neft, *Mutat. Res. Rev. Gen. Toxicol.* **1994**, 318, 73-174.
- [304] F. L. Page, A. Margot, A. P. Grollman, A. Sarasin, A. Gentil, *Carcinogenesis* **1995**, 16, 2779-2784.
- [305] V. I. Poltev, S. L. Smirnov, O. V. Issarafutdinova, R. Lavery, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1993**, 11, 293-301.
- [306] V. Yermilov, J. Rubio, M. Becchi, M. D. Friesen, B. Pignatelli, H. Ohshima, *Carcinogenesis* **1995**, 16, 2045-2050.
- [307] V. Shafirovich, S. Mock, A. Kolbanovskiy, N. E. Geacintov, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 591-597.
- [308] P. M. Gannett, S. Heavner, J. R. Draft, K. H. Shaughnessy, J. D. Epperson, N. L. Greenbaum, *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, 16, 1385-1394.
- [309] M. Kouchakdjian, V. Bodepudi, S. Shibutani, M. Eisenberg, F. Johnson, A. P. Grollman, D. J. Patel, *Biochemistry* **1991**, 30, 1403-1412.
- [310] S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollman, *Nature* **1991**, 349, 431-433.
- [311] J. Retel, B. Hoebee, J. E. F. Braun, J. T. Lutgerink, E. v. d. Akker, A. H. Wanamarta, H. Joenje, M. V. M. Lafleur, *Mutat. Res.* 299, 165-182.
- [312] V. Thivyanathan, A. Somasunderam, T. K. Hazra, S. Mitra, D. G. Gorenstein, *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 433-442.
- [313] N. Böge, C. Meier, In Universität Hamburg, Institut für organische Chemie.
- [314] N. Böge, S. Gräsl, C. Meier, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 9728-9738.
- [315] M. K. Lakshman, F. N. Ngassa, S. Bae, D. G. Buchanan, H.-G. Hahn, H. Mah, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6020-6030.
- [316] J. Lhomme, J.-F. Constant, M. Demeunynck, *Biopolymers* **1999**, 52, 65-83.
- [317] L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2005**, 2281-2284.
- [318] C. S. Krämer, T. J. Zimmermann, M. Sailer, T. J. J. Müller, *Synthesis* **2002**, 1163-1170.
- [319] M. Murata, T. Oyama, S. Watanabe, Y. Masuda, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 164-168.
- [320] F. Dewhurst, D. A. Kitchen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1972**, 710-712.
- [321] B. P. Cho, R. G. Harvey, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 5668-5678.
- [322] H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, Electron Transfer and Structural Dynamics in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 197-224.
- [323] T. Fiebig, K. Stock, S. Lochbrunner, E. Riedle, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 345, 81-88.
- [324] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, (14), 2923-2925.
- [325] M. A. Fox, M. Chanon, *Photoinduced Electron transfer. Part A. Conceptual Basis*. Elsevier: Amsterdam, 1988.