

Department Chemie, Lehrstuhl II für Organische Chemie
Technische Universität München

**Synthese von Ethidium- und Pyren-modifizierten
Oligonukleotiden und deren Einsatz bei der Untersuchung des
Ladungstransfers durch die DNA**

Nicole Amann

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. F. H. Köhler

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. H.-A. Wagenknecht
2. Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken
3. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Die Dissertation wurde am 24.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Chemie am 28.07.2004 angenommen.

für
Hedwig,
Franz
und
Katrin

"If the Lord Almighty had consulted me before embarking upon the Creation, I should have recommended something simpler."
Alphonso X, the Wise of Spain (1223-1284)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis September 2004 am Lehrstuhl II für Organische Chemie des Department Chemie der Technischen Universität München angefertigt. Prof. Dr. H. Kessler danke ich für die Bereitstellung optimaler materieller Arbeitsbedingungen. PD Dr. H.-A. Wagenknecht danke ich für die Betreuung der Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Eltern Hedwig und Franz J. Amann, ohne deren ständige Unterstützung (auch finanzieller Art) vor allem in den letzten Monaten die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre;
- meinen Geschwistern Katrin Amann und Christoph Schedensack;
- meinem Partner Robert Huber;
- den Korrekturlesern dieser Arbeit, speziell Jörg Auernheimer für seine engagierte und gründliche Arbeit beim mehrmaligen Lesen aller Teile und Tanja Schaffer für ihre schnelle Korrektur der Endversion und die hilfreichen Anregungen;
- allen Mitgliedern des JCF München für viel Spaß während der letzten 3 Jahre;
- meinen Laborkollegen und dem AK Kessler für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft;
- Mona Wolff für ihre Mitarbeit am Ethidiumprojekt;
- Rainer Haeßner und Alex Frenzel für ihre Hilfe bei Problemen mit NMR-Spektrometern und Computern;
- Burghard Cordes für die Aufnahme der Massenspektren, Frau Machule und Frau Bruckmaier für die Unterstützung bei administrativen Fragen;
- den Praktikanten Christian Meermann, Michael Stadler, Maria Eiberle, Christopher Helsen, Ulrike Maurer, Julia Höck und Robert Huber für ihre Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Themenstellung

1.1	Motivation und Hintergrund	1
1.2	Inhalt dieser Arbeit	3

2 Hintergrund

2.1	Elektronentransfer-Reaktionen	7
2.1.1	Die Entwicklung der <i>Marcus</i> -Theorie	7
2.1.2	Mathematische Beschreibung	10
2.1.2.1	<i>Thermodynamik</i>	10
2.1.2.2	<i>Unterscheidung der photoinduzierten Ladungstransferprozesse</i>	12
2.1.2.3	<i>Kinetik</i>	14
2.2	Fluoreszenz	20
2.2.1	Quantenmechanische Beschreibung	20
2.2.2	Fluoreszenzanalytik	22
2.3	Spektroskopische Methoden	31
2.3.1	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	31
2.3.2	Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie	32

3 Elektronentransfer in DNA

3.1	Bedeutung des Ladungstrfers in DNA	34
3.1.1	Biologische Relevanz	34
3.1.2	Protein-DNA-Wechselwirkungen	39
3.1.3	Chiptechnologie	40
3.1.4	Nanotechnologie	44

3.2	Einteilung der Ladungstransferprozesse in DNA	48
3.2.1	Oxidativer Ladungstransfer und -transport	49
3.2.1.1	<i>Superaustausch-Mechanismus</i>	50
3.2.1.2	<i>Loch-Hopping-Mechanismus</i>	51
3.2.1.3	<i>Experimente zum oxidativen Ladungstransfer und -transport</i>	53
3.2.2	Reduktiver Ladungstransfer und -transport	55
3.2.2.1	<i>Reduzierbarkeit der DNA-Basen</i>	55
3.2.2.2	<i>Experimente zum reduktiven Ladungstransfer und -transport</i>	56
4	Synthese und Charakterisierung von fluoreszenzmarkierten Nukleosiden und Oligonukleotiden	
4.1	DNA-Festphasensynthese	63
4.1.1	Die Phosphoramidit-Methode	63
4.1.2	Die automatisierte DNA-Synthese	64
4.2	Synthese von Ethidium-modifizierten Nukleosiden und Oligonukleotiden und Untersuchungen des Ladungstransfers	66
4.2.1	DNA-Assays mit Ethidium als fluoreszenter DNA-Sonde	66
4.2.2	Synthese und Charakterisierung der Ethidium-modifizierten Nukleoside und DNA-Bausteine	74
4.2.3	Synthese und Charakterisierung der Ethidium-modifizierten DNA und Experimente zum Ladungstransfer	103
4.2.3.1	<i>Einfluss der Umgebung auf die artifizielle Base</i>	103
4.2.3.2	<i>Untersuchungen zum reduktiven Ladungstransfer im System Ethidium-Methylviologen</i>	109
4.2.3.3	<i>Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer im System Ethidium-Deazaguanin</i>	109
4.2.3.4	<i>Untersuchung des Lochtransfers im System Ethidium-Deazaguanin in Abhängigkeit von Basenfehlpaarungen</i>	114
4.2.3.5	<i>Bestimmung der Reaktionsrate im System Ethidium-Deazaguanin</i>	124
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	126

4.3	Pyren-modifizierte Nucleoside und Oligonucleotide zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransportes in DNA	127
4.3.1	DNA-Assays mit Pyren als fluoreszenter DNA-Sonde	127
4.3.2	Synthese und Charakterisierung der Pyren-modifizierten Nucleoside	130
4.3.3	Experimente zum Ladungstransfer in Py-dU und Py-dG	138
4.3.4	Synthese und Charakterisierung der Pyren-modifizierten Oligonucleotide	146
4.3.5	Spektroskopische Untersuchung des reduktiven Elektronentransportes in Pyren-modifizierter DNA	150
4.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	153
5	Zusammenfassung	155
6	Experimenteller Teil	
6.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen	160
6.2	Liste der synthetisierten Verbindungen	164
6.3	Synthese der markierten Nucleosidbausteine	167
6.4	Allgemeine Bemerkungen zur DNA-Synthese und -Analytik	210
6.5	Synthese der Oligonucleotide und DNA-Duplexe	220
7	Literatur	236

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	eindimensional, zweidimensional
Å	Ångström
A	Adenin
A	Absorption
A	Akzeptor
A	Anregung
A*	angeregtes Akzeptormolekül
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ac	Acridin
ACN	Acetonitril
[d ₃]-ACN	Trideuteroacetonitril
<i>AIDS</i>	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Alloc	Allyloxycarbonyl
All	Allyloxycarbonyl
<i>ANTP</i>	<i>Antennapedia Homeodomain Binding Protein</i>
Ap	Aminopurin
a. u.	<i>arbitrary unit</i>
<i>b</i>	breit
B	Base
β	Konstante für die Abstandsabhängigkeit von ET-Prozessen
<i>BET</i>	<i>back electron transfer</i>
bpy	2,2'-Bipyridin
BrdG	8-Brom-2'-desoxyguanosin
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
Bu	Butyl
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
bzgl.	bezüglich

bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C</i>	<i>Coulomb</i> -Energie
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
<i>COSY</i>	<i>Correlated Spectroscopy</i>
<i>CPG</i>	<i>Controlled Pore Glass</i>
<i>CT</i>	<i>charge transfer</i>
D	Donor
D*	angeregtes Donormolekül
d	Duplett
d	Tag
δ	chemische Verschiebung
ΔG	freie Enthalpie
ΔG^\ddagger	freie Enthalpie des Übergangszustandes
ΔH^\ddagger	Aktivierungsenthalpie
ΔS^\ddagger	Aktivierungsentropie
DAP	<i>N, N'</i> -Dimethyl-2,2-diazapyren
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCE	Dichloressigsäure
DCM	Dichlormethan
[d ₂]-DCM	Dideuterodichlormethan
dd	Doppeldublett
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl <i>diisopropyl</i> amin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
[d ₆]-DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DMT-Cl	Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

<i>DQF-COSY</i>	Doppelquantengefiltertes <i>COSY</i>
d. Th.	des Theoretischen
E	Ethidium
E*	photoangeregtes Ethidium
<i>e</i>	Elementarladung
ϵ	Extinktionskoeffizient
η	empirische Konstante: $1 \leq \eta \leq 2$
E ⁰	Normalpotential
<i>E</i> ₀₀	Energie des <i>HOMO-LUMO</i> -Übergangs
<i>E</i> _a	Aktivierungsenergie
<i>E</i> _{ox}	Oxidationspotential
<i>E</i> _{red}	Reduktionspotential
EE	Essigester
equiv.	Äquivalent
<i>ET</i>	<i>electron transfer</i>
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
<i>ESI</i>	<i>electrospray ionization</i>
<i>ESI-FTICR</i>	<i>ESI-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
<i>ESI-MS</i>	ESI-Massenspektometrie
<i>ESI-HRMS</i>	<i>ESI-High Resolution Mass Spectrometry</i>
<i>ESR</i>	Elektronenspinresonanz
<i>exp</i>	Exponent
F	Fluoreszenz
f	Femto
Φ	Quantenausbeute
Φ_F	Quantenausbeute der Fluoreszenz
FADH	Flavinadenindinucleotid-H
Fapy	Formamidopyrimidin
FC	Flash-Chromatographie
<i>FC</i>	<i>Frank-Condon</i>
<i>FISH</i>	<i>Fluorescence in situ Hybridisation</i>
Fl	Flavin

FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
<i>FRET</i>	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
fs	Femtosekunde
G	Guanin
g	Gramm
ges.	gesättigt
GOH	8-Hydroxy-7,8-dihydroguanylradikal
H	Hexan
h	Stunde
h	<i>Heisenberg</i> -Konstante
ħ	$h/2\pi$
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
<i>HOMO</i>	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>HMQC</i>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
<i>HSQC</i>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
hν	Energie eines Lichtquants der Wellenlänge λ
HV	Hochvakuum (0.05 Torr)
Hz	Hertz
I	Inosin
I_A	Intensität (Absorption)
I_F	Intensität (Fluoreszenz)
IC	<i>Internal Conversion</i>
IdU	5-Iod-2'-desoxyuridin
In	Indol
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Iz	Imidazolon
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin

k	Reaktionsrate
k_B	<i>Boltzmann</i> -Konstante
k_{BET}	Ratenkonstante einer BET-Reaktion
k_{ET}	Ratenkonstante einer ET-Reaktion
k_F	Ratenkonstante der Fluoreszenz
k_{IC}	Ratenkonstante <i>IC</i>
k_{ISC}	Ratenkonstante <i>ISC</i>
k_Q	Ratenkonstante <i>Quenching</i>
konz.	konzentriert
L	Liter
λ	Wellenlänge
λ	Reorganisationsenergie
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
λ_i	innere Reorganisationsenergie
λ_s	Solvensreorganisationsenergie
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
M	molar
M	Molekül
M*	elektronisch angeregtes Molekül
m	Meter
m	Milli
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MALDI-TOF-MS	<i>MALDI - Time of Flight - Mass Spectrometry</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
[d ₃]-MeOH	Trideuteromethanol
[d ₄]-MeOH	Tetradeuteromethanol
<i>M. Hba I</i>	Cytosin Methyltransferase
MHz	Megahertz
min.	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter

mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>ter</i> butylether
<i>Mut Y</i>	Mutante Q237W von <i>M. Hba I</i>
MX	Mitoxantron
<i>MW</i>	<i>Molecular Weight</i>
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
μ	Mikro
μmol	Mikromol
mV	Millivolt
N	Normal
N	Naphthalin
n	Nano
NBS	N-Bromsuccinimid
NC	Nitroacridin
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<i>NOE</i>	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
<i>NOESY</i>	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NQ	Nitrochinolin
ns	Nanosekunde
NWE	Normalwasserstoffelektrode
8-oxo-dG	8-Oxo-2'-desoxy-guanin
Oz	Oxazon
P	Phosphoreszenz
P	Wahrscheinlichkeit
<i>PCET</i>	<i>Proton Coupled Electron Transfer</i>
PCQ	Pyrolochinolinchinon
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PG</i>	<i>Protecting Group</i>
Ph	Phenyl
<i>pH</i>	<i>potentia Hydrogenii</i>
phi	9,10-Phenanthrenchinondiimin

pm	Pikometer
ppm	<i>part per million</i>
ps	Pikosekunde
<i>p</i> TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
Py	Pyren
Py-dG	8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin
Py-dU	5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin
Q	<i>Quencher</i>
Q*	angeregter <i>Quencher</i>
q	Quartett
R	Rydberg-Konstante
R	Abstand zwischen D und A
r, <i>rac</i>	racemisch
RP	<i>Reverse Phase</i>
RP-HPLC	<i>Reverse Phase HPLC</i>
R. <i>PvuII</i>	Restriktionsenzym
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROE	<i>Rotating Frame Overhauser Enhancement</i>
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
ROH	Alkohol
RT	Raumtemperatur
S ₀	Singulett-Elektronenkonfiguration (Grundzustand)
S ₁	Singulett-Elektronenkonfiguration (1. angeregter Zustand)
s	Singulett
<i>SAM</i>	<i>Self Assembled Monolayer</i>
Sd	Stilbendiether
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
sog.	sogenannt
<i>SoxR</i>	Regulationsprotein in <i>E. coli</i>
SR	Schwingungsrelaxation
St	Stilben
T ₁	Triplett-Elektronenkonfiguration
T	Temperatur

T	Thymin
t	Triplett
τ_0	Lebensdauer
τ_F	Fluoreszenz-Lebensdauer
TBP	<i>TATA-Box-Binding Protein</i>
tBu	<i>tert</i> Butyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMDN	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,5-diaminonaphthalin
TMS	Tetramethylsilan
<i>TOCSY</i>	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
U	Uracil
UV	Ultraviolett
verd.	verdünnt
V	Volt
V_0	Matrizelement der maximalen elektronischen Kopplung
V	Matrizelement der elektronischen Kopplung
<i>vs</i>	<i>versus</i>
X	beliebige DNA-Base
Z	7-Deazaguanin
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der *IUPAC-IUB-Kommission*² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke, die aus dem Englischen übernommen wurden, sind *kursiv* geschrieben.

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

1.1 Motivation und Hintergrund

Elektronentransfer-Prozesse sind in allen Bereichen der Naturwissenschaften anzutreffen. Ihre Bedeutung erstreckt sich gleichermaßen auf Chemie, Biologie und Physik.^[1] Beispielhaft seien hier Prozesse auf dem Gebiet der Biochemie, wie Photosynthese oder Atmungskette,^[2] Prozesse der organischen und anorganischen Halbleitertechnik^[3], Methoden der Elektrochemie sowie Chemolumineszenz^[4] genannt. Aber auch auf den ersten Blick triviale Prozesse, wie das Rosten von Metallen, basieren auf den Mechanismen des Elektronentransfers. Diese scheinbar willkürlich ausgewählten Beispiele haben eine Gemeinsamkeit. Sie laufen alle nach dem gleichen Grundschema ab: Ein Elektron wird von einem Donorsystem auf ein Akzeptorsystem übertragen.

Eine umfassende theoretische Beschreibung und Erklärung vieler Elektronentransfer-Phänomene gelang *Rudolph A. Marcus*, der 1992 für die von ihm verfasste Elektronentransfer-Theorie^[5] den Nobelpreis erhielt. Mit Hilfe der neu eingeführten Parameter Reorganisationsenergie und elektronische Kopplungsstärke lassen sich die Elektronentransferraten berechnen und somit Aussagen über die Kinetik der verschiedensten Elektronentransfer-Prozesse machen.

Wurden die ersten Experimente auf dem Gebiet des Elektronentransfers noch an einfachen Modellen wie $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ durchgeführt, weitete man die Untersuchungen bald auf komplexere Systeme aus, wie sie z. B. biochemische Systeme darstellen. Mit Hilfe der *Marcus*-Theorie konnte erklärt werden, warum der Elektronentransfer zwischen Metall-Ionen in Lösung wesentlich langsamer verläuft als zwischen von Proteinen chelatisierten Metall-Ionen. Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen Reorganisationsenergien. Für die Übertragung von Elektronen zwischen Ionen in wässriger Lösung ist eine Reorganisation der umgebenden Wassermoleküle nötig.^[6] Bei Proteinen sind die Metallzentren im Inneren des Proteins meist an Schwefel- oder Stickstoffatome koordiniert und nicht von einer Hydrathülle umgeben. Der Elektronentransfer wird somit beschleunigt. Erstaunlicherweise ist ein Elektronentransfer zwischen Proteinen auch ohne direkten Kontakt zwischen Donor- und Akzeptorsystem möglich.^[7]

Diese spezifischen weitreichenden Elektronentransfer-Reaktionen über Entfernungen von 10 Å bis hin zu 15 Å sind Grundlage der Funktion vieler Redoxreaktionen katalysierender Proteine,^[8,9] wobei die genauen Mechanismen oft noch kontrovers diskutiert werden. Frühe Arbeiten gingen ausschließlich von Tunnelprozessen aus.^[10] Allerdings ist bei diesem Modell eine direkte Kopplung zwischen Akzeptor und Donor nötig. Für größere Distanzen ($> 10 \text{ Å}$) wurde das Modell erweitert: Elektronische Zustände von verbrückenden Strukturen ermöglichen eine Kopplung zwischen Donor- und Akzeptorsystem über einen Superaustausch-Mechanismus.^[11] Solche Brücken können z. B. aus kovalenten Bindungen oder Wasserstoffbrücken bestehen. Alternativ zu diesem Leitfähigkeitsmodell für Proteine wurde der *Hopping*-Mechanismus^[12] an Beispielpeptiden entwickelt. Die Ladung wird bei diesem Modell in mehreren Schritten vom Donor zum Akzeptor transportiert.

Weitreichende Elektronentransfer-Prozesse treten auch bei einer weiteren wichtigen Klasse biologischer Makromoleküle auf, der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Bereits kurz nach der Aufklärung der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick*^[13] wurde auf Grund der ausgeprägten π - π -Wechselwirkungen im Basenstapel über die Möglichkeit eines Ladungstransfers entlang der Helixachse diskutiert.^[14] Eine Vielzahl von Experimenten beschäftigt sich seitdem mit diesem Thema.^[15-19]

Die entscheidende Motivation ist durch die biologische Relevanz bedingt: Viele beobachtbare Schäden der DNA, die zu Mutationen und Krebsentstehung führen können, sind die Folge des Auftretens von radikalischer Ladung in DNA.^[20] Der Ort der Radikalbildung, die zum Beispiel durch die Bestrahlung mit Licht ausgelöst werden kann, und die Stellen der eigentlichen Schädigung können durch Ladungstransferreaktionen räumlich deutlich separiert sein. Für das Verständnis des Ladungstransfers in DNA und die Entstehung von DNA-Schäden *in vivo* ist eine grundlegende Erforschung dieses Prozesses und der Einflussfaktoren unumgänglich. Dieses Wissen kann dann zur Entwicklung neuartiger Therapeutika und diagnostischer Werkzeuge für Krankheiten genutzt werden, die mit DNA-Schäden in Verbindung stehen.

Mit der wachsenden Bedeutung der Genomforschung in den letzten zehn Jahren ging die Entwicklung einer hocheffizienten Analytik einher, um zahlreiche Probleme parallel untersuchen zu können. Dabei stellt die Realisierung von DNA-Chips die bedeutendste Entwicklung dar.^[21] Die Verwendung des Elektronentransportes durch die DNA stellt eine neue und brauchbare Methode für die Entwicklung empfindlicher DNA-Sensoren und -Chips dar. Damit können Einzelbasenmutationen und DNA-Schäden unabhängig von deren benachbarten Basensequenzen nachgewiesen werden, was oftmals durch die bislang verwendeten Methoden nicht möglich war (siehe dazu Kapitel 3.1.3).

Auch die fortschreitende Miniaturisierung elektronischer und mechanischer Bauteile hat zu verstärktem Interesse an DNA als Bauteil in der Nanotechnologie geführt.^[22] Zur Zeit wird DNA hauptsächlich als Templat zur Aggregation von Partikeln eingesetzt (Metallhaltige DNA als Leiter, *Nanowires* auf DNA-Basis^[23,24]), es gibt jedoch erste Ansätze, sich die Leitfähigkeit der DNA in der Nanotechnologie, zum Beispiel in Schaltelementen zu Nutze zu machen (siehe Kapitel 3.1.4).^[25,26]

Ein weiteres, sich schnell entwickelndes Gebiet ist *DNA-Computing*, d. h. Rechnen mit DNA. Der Artikel von *Leonard M. Adleman* 1994 in *Science*^[27] gab den Anstoß zu einer Reihe von Forschungsarbeiten, deren Fernziel die Entwicklung eines Computers auf DNA-Basis ist. Allerdings sind bisher lediglich Grundlagen^[28] geschaffen worden und der Zeitpunkt einer praktischen Anwendung ist nicht absehbar (siehe Kapitel 3.1.4).

1.2 Inhalt dieser Arbeit

In den vergangenen Jahren konnten durch zahlreiche experimentelle und theoretische Untersuchungen große Fortschritte beim Verständnis des Ladungstransfers in DNA erzielt werden. Für diese Untersuchungen wurde eine Reihe neuer Modellsysteme synthetisiert, um damit detaillierte Informationen über Ladungs- und Energietransfer-Prozesse in der DNA zu erhalten.^[30,34,134,201-203,214,216-220] Hilfreich war dabei, dass seit einigen Jahren zeitaufgelöste Laserspektroskopie im Femtosekundenbereich betrieben werden kann. Das ermöglicht eine sehr detaillierte Betrachtung der Zustände eines Moleküls nach photochemischer Anregung. So können in fluoreszenzmarkierten DNA-Molekülen der zeitliche Verlauf der Folgereaktionen nach der Anregung beobachtet und daraus Schlussfolgerungen über die Geschwindigkeit von Ladungstransfer-Prozessen gezogen werden. Die natürlichen DNA-Basen sind aufgrund der kurzen Lebenszeiten ihrer angeregten Zustände nicht oder nur sehr bedingt zur Untersuchung des Ladungstransfers geeignet. Eine Voraussetzung für die Anwendung optisch-spektroskopischer Methoden ist die Anwesenheit redoxaktiver, kovalent verknüpfter chromophorer Gruppen in der DNA.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese von fluoreszenten artifiziellen DNA-Basen als Modelle für die zwei grundsätzlich möglichen Ladungstransfer-Prozesse durch die DNA: den reduktiven Elektronentransfer und den oxidativen Lochtransfer. Die hier vorgestellten artifiziellen Basen-Analoga nutzen Pyren und Ethidium als Fluorophore. Teil I befasst sich mit der Synthese von Ethidium-modifizierten Nukleosid-Analoga, Teil II beschreibt die Synthese von Pyren-haltigen Nukleosiden als Fluoreszenzsonden.

Einige der hier synthetisierten artifiziellen DNA-Basen sind ausreichend stabil, um durch die automatisierte DNA-Festphasensynthese an definierter Stelle in Oligodesoxynukleotide eingebaut zu werden und erfüllen damit die wichtigsten Voraussetzungen, um als Modellsysteme für (zeitaufgelöste) spektroskopische Untersuchungen zu dienen.

Dadurch ist eine wichtige Grundlage für das Design von Donor-Akzeptor-Systemen gegeben, die – eine unterschiedliche Beobachtungswellenlänge von fluoreszentschem Donor bzw. Akzeptor vorausgesetzt – eine Bestimmung der Elektronentransferraten für oxidativen und reduktiven Ladungstransfer ermöglichen und zum grundlegenden Verständnis dieser Prozesse beitragen.

Teil I: Synthese Ethidium-haltiger Nukleoside und Oligonukleotide

Ethidium (E) ist einer der am besten untersuchten DNA-Interkalatoren.^[29] Photoangeregtes Ethidium kann abhängig vom Design des Ethidium-DNA-Assays sowohl einen oxidativen Lochtransfer als auch einen reduktiven Elektronentransfer induzieren.

Da photoangeregtes Ethidium aufgrund seines Oxidationspotentials selbst nicht in der Lage ist, die natürlichen DNA-Basen zu oxidieren, wird in Untersuchungen zum Lochtransfer die leicht oxidierbare artifizielle Base 7-Deazaguanin (Z) als Ladungsakzeptor eingesetzt.^[29] In Experimenten zum Elektronentransfer durch photoangeregtes Ethidium kann Methylviologen als Ladungsakzeptor verwendet werden.^[31-33]

In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von Femtosekunden- und Pikosekunden-zeitaufgelösten Experimenten zum Ladungstransfer in DNA von unterschiedlichen Arbeitsgruppen publiziert worden.^[16,30,34] Bis auf eine Ausnahme wurde ein exponentieller Abfall mit zunehmender Distanz zwischen Ladungsdonor und Akzeptor festgestellt. Bei Messungen von *Zewail et al.*^[30] an einem System, bestehend aus interkaliertem Ethidium als Ladungsdonor, das über einen Alkyl-Linker mit einem 5'-OH-Ende der DNA-Duplexe verknüpft ist, und 7-Deazaguanin als Ladungsakzeptor konnte keine Distanzabhängigkeit der Rate festgestellt werden. Eine entscheidende Schwachstelle dieser Untersuchungen am Ethidium-DNA-System ist durch die Art der Anknüpfung des Ethidiums bedingt: Auf Grund der Linkerlänge ist die Interkalationsstelle von Ethidium nur mit einer Genauigkeit von \pm einem Basenpaar bekannt. Das Probenmaterial ist somit inhomogen. Dieser Umstand ist ungeeignet für eine detaillierte Betrachtung durch zeitlich hochaufgelöste fs-Laserspektroskopie.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein neuartiger Ethidium-DNA-Assay (Abbildung 1) für Experimente zum Ladungstransfer in DNA entwickelt werden, das ein Ethidiumderivat als artifizielle Base enthält und somit die strukturellen Schwachstellen bisheriger Systeme umgeht. Zu diesem Zweck werden verschiedene Ethidium-Nukleosidanaloga synthetisiert, charakterisiert, mit den für die DNA-Festphasensynthese nötigen Gruppen versehen und über die automatisierte DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramidit-Methode als artifizielle Base in Oligonukleotide eingebaut.

Anschließend sollen spektroskopische Untersuchungen – vor allem Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie – sowohl am Ethidium-Deazaguanin-System (oxidativer Ladungstransfer) als auch am System Ethidium-Methylviologen (reduktiver Ladungstransfer) durchgeführt werden. Durch zeitaufgelöste Messungen sollen, falls möglich, die Ladungstransferraten bestimmt werden. Abschließend sind Voruntersuchungen im Hinblick auf eine Eignung des Systems zur Detektion von Basenfehlpaarungen geplant.

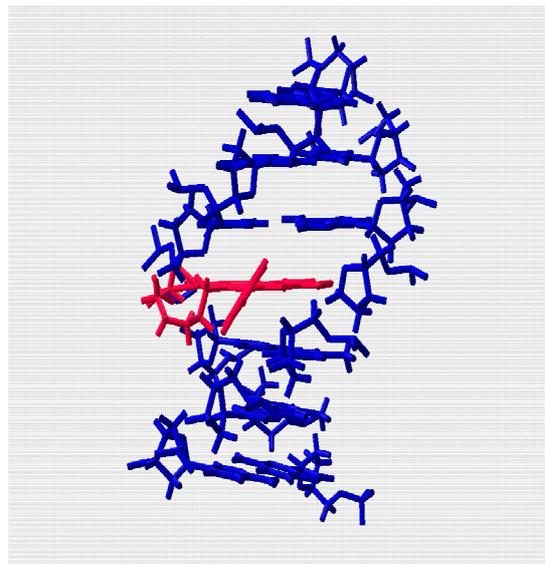


Abb. 1: *Modell eines Ethidium-bhaltigen DNA-Duplexes.*

Teil II: Synthese Pyren-modifizierter Nucleoside und Oligonucleotide

Pyrene und Pyrenderivate eignen sich gut als photochemische Systeme zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen. Pyren-markierte Oligonucleotide wurden bereits von *Netzel et al.* hergestellt, um die Löschung der Fluoreszenz des photoangeregten Pyrens in Abhängigkeit der benachbarten Basen zu untersuchen. Je nach benachbarter DNA-Base konnte ein Ladungstransfer ausgehend vom photoangeregten Pyren sowohl als oxidativer Lochtransfer als auch als reduktiver Elektronentransfer erfolgen.^[34]

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Pyren-modifizierten Nucleoside 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU) und 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (Py-dG) hergestellt und charakterisiert werden. Die Besonderheit liegt darin, dass durch die Verknüpfung des Pyrens mit unterschiedlichen DNA-Basen selektiv entweder ein reduktiver Elektronentransfer (bei Py-dU) oder ein oxidativer Lochtransfer (bei Py-dG) erzeugt werden kann und damit die verschiedenen Ladungstransportprozesse durch die DNA untersucht werden können. Damit erlaubt das Design dieses DNA-Systems spektroskopische Experimente zum bisher noch wenig untersuchten reduktiven Elektronentransport durch die DNA.

Durch den Einbau der Py-dU-Gruppe in DNA-Duplexe wird aus dem photochemisch induzierbaren, intramolekularen Elektronentransfer eine Elektroneninjektion in die DNA erreicht. Durch die Anknüpfung der Pyrene außerhalb des Basenstapels kann auf die sonst übliche Interkalation des Ladungsdonors verzichtet werden. Auf diese Weise wird die DNA-Struktur nur geringfügig gestört, da sich die Pyren-Einheit in der großen Furche befindet (Abbildung 2). Das System erlaubt damit auch die Untersuchung der Frage, in wie weit der Elektronentransport an eine Protonierung gekoppelt ist.

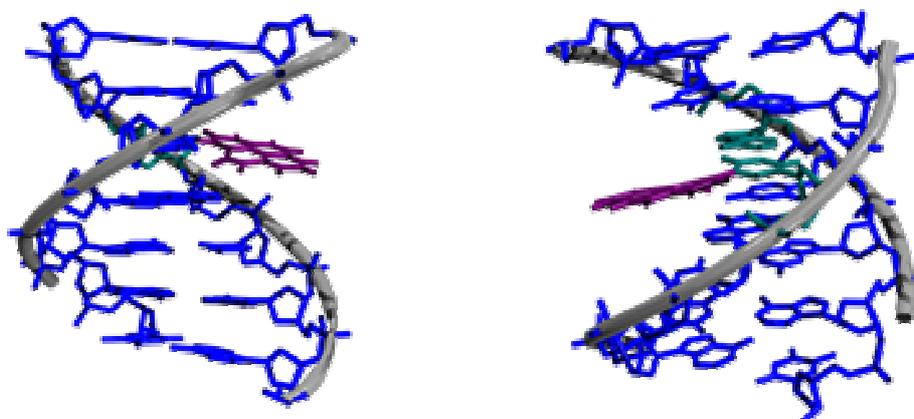


Abb. 2: Modell eines Pyren-haltigen DNA-Duplexes, aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet.

2 Hintergrund

2.1 Elektronentransfer-Reaktionen

Rudolph A. Marcus erhielt 1992 den Nobelpreis für Chemie für seinen Beitrag zur Theorie von Elektronentransfer-Reaktionen in chemischen Systemen. Er untersuchte den Elektronentransfer zwischen Molekülen in Lösung; ein Prozess, der in den unterschiedlichsten Bereichen der Chemie von grundlegender Bedeutung ist. Beispiele sind Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese, Chemolumineszenz („kaltes Licht“), elektrisch leitende Polymere, Korrosion sowie elektrochemische Synthesen und Analytik.^[5,6]

Der Elektronentransfer zwischen zwei Molekülen ist eine denkbar einfache chemische Reaktion. Obwohl keine Bindungen gebrochen werden, finden Änderungen in der Struktur der reagierenden Moleküle sowie deren Nachbarn statt. Diese Änderungen ermöglichen dem Elektron, zwischen Molekülen zu „springen“ (*leaping electrons*).

Marcus konnte zwischen 1956 und 1965 einfache mathematische Beschreibungen für diese Elementarvorgänge auf molekularer Ebene liefern und damit die Raten des Elektronentransfers der unterschiedlichsten Prozesse berechnen und verständlich machen.^[5] Einige seiner Vorhersagen widersprachen allerdings den bisherigen Vorstellungen in der Chemie und waren außerdem experimentell zur damaligen Zeit schwer zu beweisen. Die endgültige Bestätigung dieser Vorhersagen gelang erst Ende der 80er Jahre.^[36]

2.1.1 Die Entwicklung der Marcus-Theorie

Wenn zwei Moleküle in Lösung eines oder mehrere Elektronen austauschen, findet eine Kombination aus Reduktion und Oxidation statt (Redoxprozess), ein Molekül gibt Elektronen ab (Oxidation), das andere nimmt Elektronen auf (Reduktion).

Im einfachsten Fall wird ein einzelnes Elektron von einem Molekül auf ein anderes übertragen. Die Struktur von Molekülen und ihrer Umgebung ändert sich kurzzeitig, die Energie des gesamten Systems nimmt zu, das Elektron „springt“. Aktivierungsenergie muss aufgewendet werden, damit das Elektron die Energiebarriere überschreiten kann. Die Höhe dieser Barriere bestimmt die Geschwindigkeit der Reaktion. Dieser Elementarprozess kann durch die *Eyring*-Theorie beschrieben werden.

Die Rate k ist von mehreren Konstanten (k_B , h , R) sowie von der Temperatur, der Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger und der Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger eines Systems abhängig (Gleichung 1):

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{RT}}$$

Gl. 1: Bestimmung der Reaktionsrate k nach der Eyring-Theorie: k_B = Boltzmann-Konstante, h = Heisenberg-Konstante, R = Rydberg-Konstante, T = absolute Temperatur, ΔH^\ddagger = Aktivierungsenthalpie, ΔS^\ddagger = Aktivierungsentropie.

Anfang der 50er Jahre wurde der Zugang zu radioaktiven Isotopen geschaffen und es konnte die Geschwindigkeit von Elektronentransfer-Reaktionen zwischen Metall-Ionen in Lösung gemessen werden. Einige dieser Reaktionen waren erstaunlich langsam angesichts der Tatsache, dass „nur“ ein Elektron übertragen wurde. Man verstand damals nicht, wieso eine so unbedeutende Änderung zu einer überraschend hohen Energiebarriere führen sollte. Die in den folgenden Jahren entwickelte *Marcus*-Theorie konnte diese Befunde erklären.

Der *Marcus*-Theorie liegen zwei Annahmen zu Grunde. Zum einen müssen die an einer Elektronentransfer-Reaktion beteiligten Moleküle während der Reaktion schwach aneinander gebunden sein – d. h. räumlichen Kontakt haben – um eine Anwendung der klassischen physikalischen Theorie anstelle einer quantenmechanischen Beschreibung zu erlauben. Zum anderen wird angenommen, dass die Lösungsmittelmoleküle in der unmittelbaren Umgebung ihre Position ändern und so die Energie des Systems erhöhen können. Ein Elektron kann ausschließlich zwischen zwei Zuständen gleicher Energie „springen“. Mit Hilfe der *Marcus*-Theorie kann die nötige Änderung der Molekülenergie und damit auch die Höhe der Energiebarriere berechnet werden.^[5]

Die Erweiterung des *Marcus*-Modells zeigt, dass der Betrag der Energiebarriere in zwei Faktoren teilbar ist, die den Reaktionspartnern zugerechnet werden können. Außerdem ist der Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Änderung der freien Energie – d. h. die Triebkraft der Reaktion – zugänglich. Die mathematische Formulierung der Triebkraft ergibt eine quadratische Gleichung, die die unten dargestellte Parabel beschreibt (Abbildung 3).

Die Konsequenz daraus ist die Folgende: ab einer ausreichend großen Triebkraft sollte – entgegen der chemischen Intuition – die Reaktion mit zunehmender Triebkraft langsamer werden, man spricht dabei vom sogenannten invertierten Bereich. *Marcus* nannte bereits 1965 als mögliche Beispiele dafür bestimmte Chemolumineszenzreaktionen. Ende der 80er Jahre konnte dieser Teil der *Marcus*-Theorie durch mehrere Experimente bestätigt werden.^[35,36]

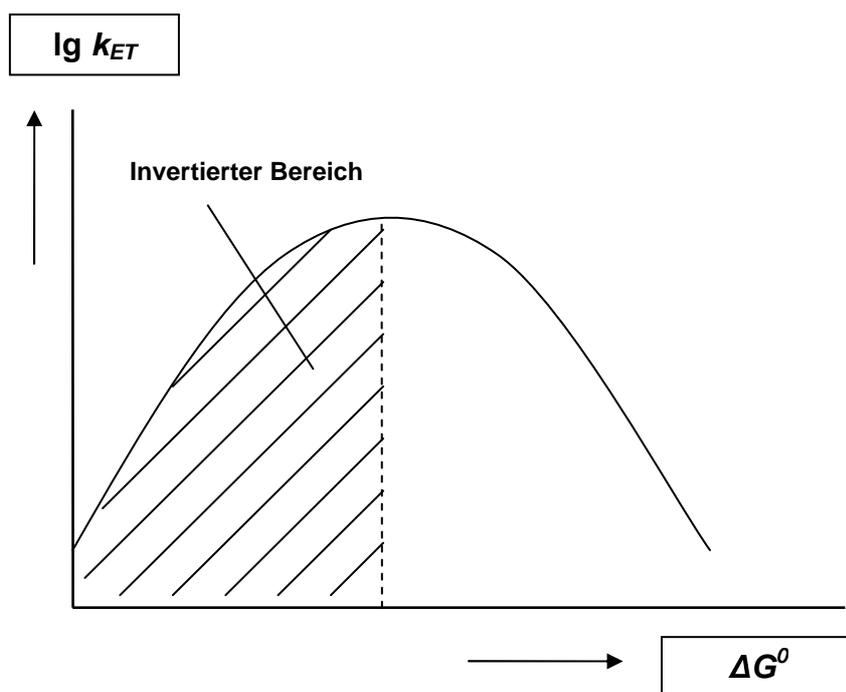


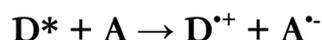
Abb. 3: Die Parabel beschreibt den Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit (logarithmische Skala) und der Triebkraft der Reaktion, links der invertierte Bereich.

Die detaillierte mathematische Beschreibung der Zusammenhänge sowie die exakte Gleichung zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Triebkraft einer Reaktion ist in den folgenden beiden Abschnitten aufgeführt.

2.1.2 Mathematische Beschreibung

2.1.2.1 Thermodynamik

Der photoinduzierte Elektronentransfer zwischen einem angeregten Donormolekül D^* und einem Akzeptormolekül A kann durch folgende prinzipielle Gleichung formuliert werden:



Wie *Rehm* und *Weller* zeigen konnten, lässt sich die freie Standardenthalpie des Elektronentransfers zwischen zwei neutralen Donor- und Akzeptor-Einheiten in einem Medium mit einer statischen Dielektrizitätskonstante ϵ über Gleichung 2 abschätzen.^[37,38]

$$\Delta G = e[E_{ox}(D) - E_{red}(A)] - E_{00} + C$$

Gl. 2: *Abschätzung von ΔG durch die Rehm-Weller-Gleichung:^[38] ΔG = freie Enthalpie, e = Elementarladung, $E_{ox}(D)$ = Oxidationspotential des Donors, $E_{red}(A)$ = Reduktionspotential des Akzeptors, E_{00} = Energie des HOMO-LUMO-Übergang des Donors, C = Änderung der Coulomb-Energie.*

Der Term $e[E_{ox}(D) - E_{red}(A)] - E_{00}$ stellt den Grenzwert von ΔG für eine Ladungstrennung in einem polaren Medium in unendlich großem Abstand dar. ΔG muss noch korrigiert werden: zum einen um die Coulomb-Energie, die bei der Annäherung der Ionen auf den Zentrenabstand R frei wird, und zum anderen um die Solvatationsenergie der entstehenden Ionen.

$E_{ox}(D)$ und $E_{red}(A)$ sind die Oxidations- bzw. Reduktionspotentiale von Donor und Akzeptor im Grundzustand. Sie sind ein Maß für die Lage des *HOMO* am Donor und des *LUMO* am Akzeptor. E_{00} ist die Energie des *HOMO-LUMO*-Übergangs im Donor, die aus dem Absorptionsspektrum erhalten werden kann.

C ist – verglichen mit den anderen Größen – im Regelfall sehr klein und kann in guter Näherung vernachlässigt werden. Im Folgenden wird deshalb $C = 0$ angenommen.

Der Zusammenhang zwischen ΔG , $E_{ox}(D)$, $E_{red}(A)$ und E_{00} lässt sich graphisch wie folgt zusammenfassen (Abbildung 4):

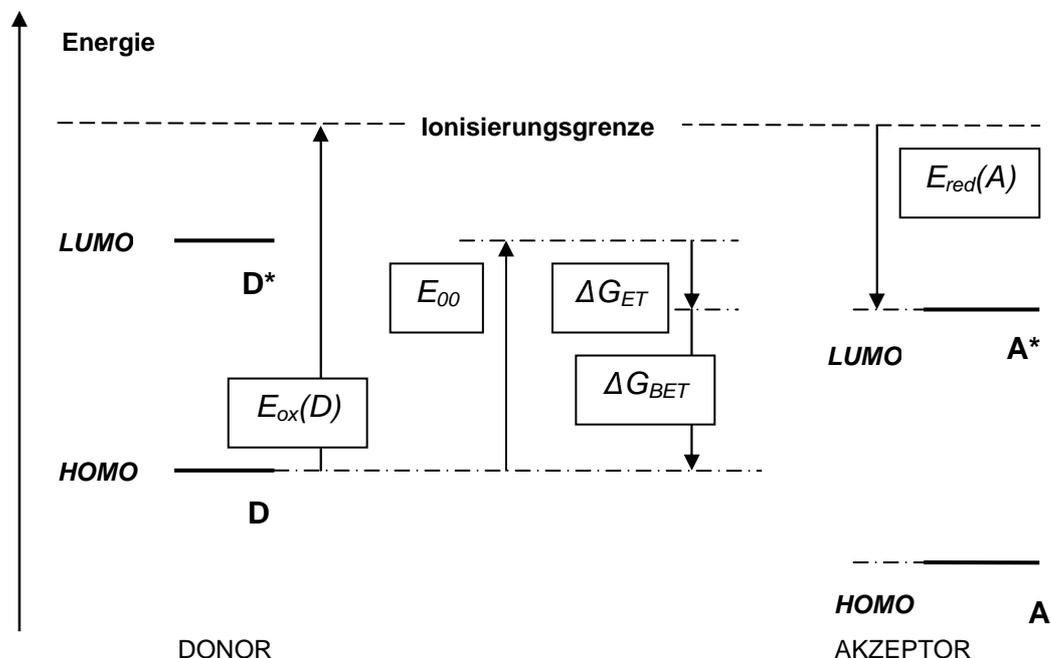


Abb. 4: Energetische Verhältnisse beim photoinduzierten Elektronentransfer: ET = Kennzeichnung einer Elektronentransfer-Reaktion, BET = Kennzeichnung einer Rück-Elektronentransfer-Reaktion.

Die freie Reaktionsenthalpie ΔG_{BET} für die Ladungsrekombination, also den Rückelektroentransfer, lässt sich aus der obigen Abbildung nach Gleichung 3 bestimmen.^[38]

$$\Delta G_{BET} = -\Delta G - E_{00}$$

Gl. 3: Freie Reaktionsenthalpie ΔG_{BET} für die Rekombination.

Eine Berechnung der freien Reaktionsenthalpie der Ladungsrekombination ist unter Einbeziehung der Rehm-Weller-Gleichung möglich (Gleichung 4).^[37]

$$\Delta G_{BET} = e[-E_{ox}(D) + E_{red}(A)] - C$$

Gl. 4: Freie Reaktionsenthalpie ΔG_{BET} .

Die Reaktionsenthalpie ΔG_{BET} gibt einerseits Auskunft über die Triebkraft für die Rekombinations-Reaktion der getrennten Ladungen zurück in den neutralen Ausgangszustand. Andererseits stellt sie den Betrag der Energie dar, der im ladungsgetretenen Zustand als Redoxgradient gespeichert ist und einer Nutzung maximal zur Verfügung stehen kann.

2.1.2.2 Unterscheidung der photoinduzierten Ladungstransferprozesse

Photoinduzierte Ladungstransferprozesse können wie folgt unterschieden werden: Der photoangeregte Donor D^* kann entweder als Oxidations- oder als Reduktionsmittel dienen, je nach relativer Lage der Grenzorbitale der beteiligten Moleküle. Wenn man sich nur auf *HOMO* und *LUMO* des Donor-Akzeptor-Komplexes beschränkt, kann man Elektronentransfer von Lochtransfer prinzipiell unterscheiden.

1. Photoinduzierter Elektronentransfer

Der Elektronentransfer findet zwischen den *LUMOs* von Donor und Akzeptor statt. Man spricht in diesem Fall vom photoinduzierten Elektronentransfer. k_{ET} ist die Rate des Elektronentransfers, k_{BET} ist die Rate der Rückreaktion (Abbildung 5).

2. Photoinduzierter Lochtransfer

Alternativ kann das photoangeregte Elektron bei entsprechender Lage der Orbitale einen Elektronenübergang zwischen den *HOMOs* von Donor und Akzeptor auslösen. Man spricht in diesem Fall vom photoinduzierten Lochtransfer, da der Vorgang formal auch als Transfer eines fehlenden Elektrons (Loch) von Donor zu Akzeptor betrachtet werden kann. Auch hier besteht die Möglichkeit der Rückreaktion (Abbildung 6).

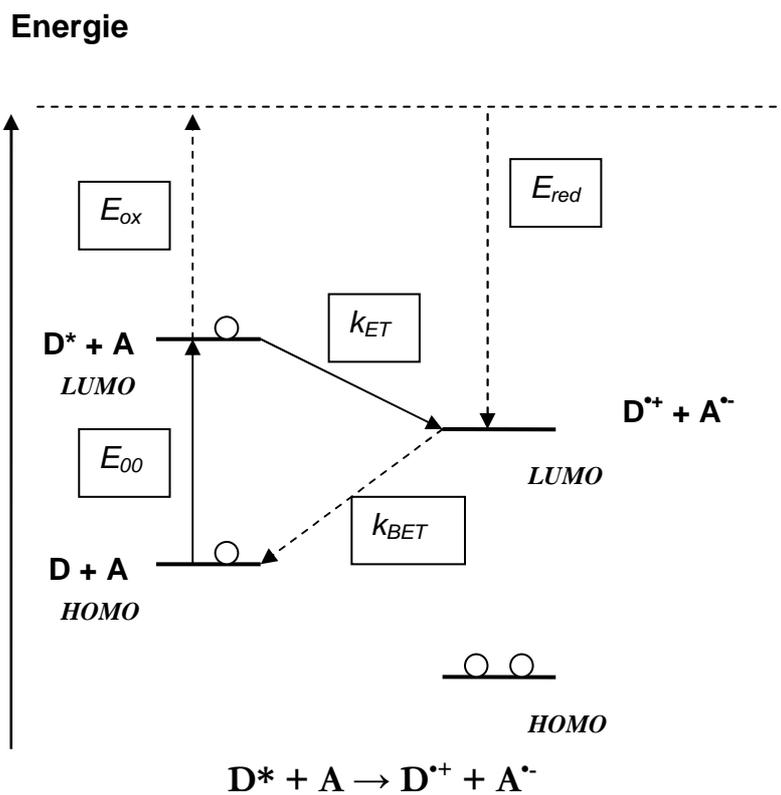


Abb. 5: Photoinduzierter Elektronentransfer.

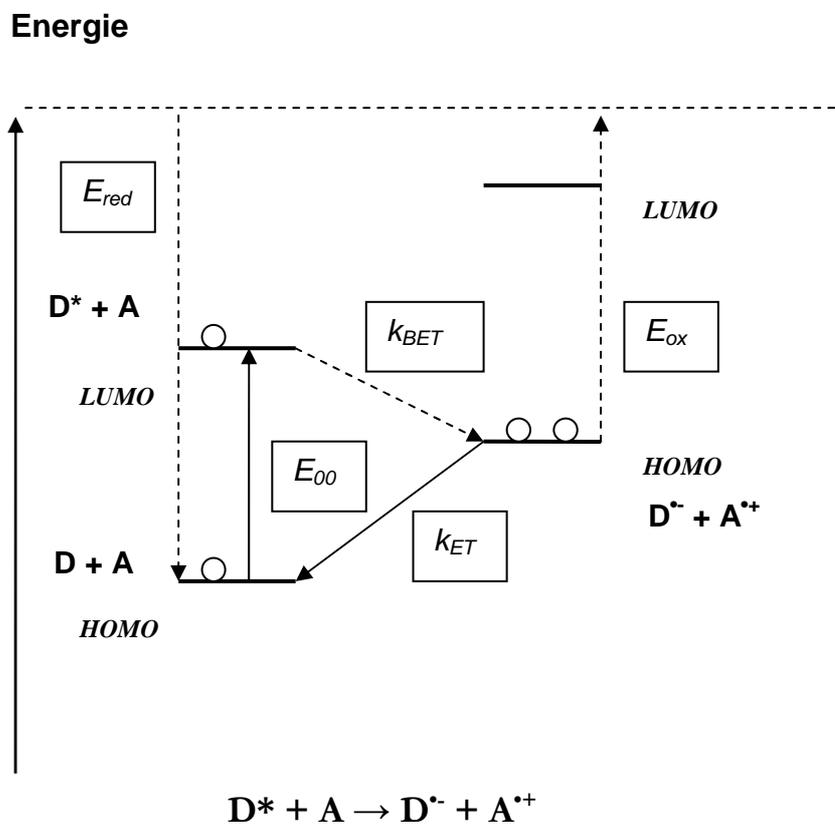


Abb. 6: Photoinduzierter Lochtransfer.

In vielen Fällen ist der Rückladungstransfer langsamer als der Elektronentransfer selbst, obwohl die Triebkraft größer ist (invertierter Bereich). Eine Erklärung kann durch die *Marcus*-Theorie gegeben werden.

Durch Abschätzung von ΔG kann nun geklärt werden, ob ein Elektronentransfer-Prozess thermodynamisch möglich ist. Damit ist jedoch noch keine Aussage über die Geschwindigkeit der Reaktion getroffen. Die Bestimmung der Reaktionsdynamik ist der Kernpunkt der *Marcus*-Theorie.^[39]

2.1.2.3 Kinetik

Das klassische Modell der Elektronentransfer-Reaktion zur näherungsweise Berechnung der Aktivierungsenthalpie – der wichtigsten Größe für den Elektronentransfer – wurde von *Marcus* entwickelt.^[5] Es gehen folgende wichtige Näherungen ein:

1. Klassisches Modell und quantenmechanische Beschreibung

Die atomaren Freiheitsgrade können entweder klassisch oder quantenmechanisch behandelt werden. Wenn $\hbar\omega \approx k_B T$ ist, kann – wie in der ursprünglichen *Marcus*-Theorie – der klassische Fall angenommen werden. Dies ist bei Elektronentransferprozessen normalerweise gewährleistet. Falls $\hbar\omega \gg k_B T$ ist, muss zur quantenmechanischen Beschreibung übergegangen werden, wie sie der *Marcus-Levich-Jortner*-Gleichung zugrunde liegt. Die Temperaturabhängigkeit von k_{ET} wird dann deutlich besser beschrieben. Bei tiefen Temperaturen und im invertierten Bereich muss eine quantenmechanische Behandlung des Elektronentransfers erfolgen.^[40] Die klassische Theorie zur Erklärung von Elektronentransfer-Reaktionen geht vom Modell des klassischen Oszillators aus. Es werden bei Edukt und Produkt identische, harmonische Potentiale angenommen.^[39]

2. Nicht-adiabatischer und adiabatischer Fall^[41]

Der Unterschied zwischen nicht-adiabatischem und adiabatischem Elektronentransfer bezieht sich auf die Größe der elektronischen Wechselwirkung der potentiellen Energie von Edukt und Produkt. Im nicht-adiabatischen Fall ist die Aufspaltung am *crossing point* klein, d. h. die Schwingung des Eduktmoleküls an eben dieser Stelle kann im Produktzustand enden. Am Schnittpunkt liegen Zustände identischer Energie, aber unterschiedlicher elektronischer Konfiguration vor. Dieser Fall tritt ein, wenn die Größe der Wechselwirkung klein gegenüber der thermischen Energie $k_B T$ ist. Im adiabatischen Fall kommt es zu einer starken Vermischung der Wellenfunktionen. Es gibt keinen *crossing point*, die Potentialkurven weichen sich aus. Jede Schwingung des Eduktmoleküls in diesem Bereich resultiert in einem Produktzustand. Dieser Fall tritt ein, wenn die Energie der Wechselwirkung groß gegenüber $k_B T$ ist.

In der Realität liegt ein Fall zwischen diesen beiden Grenzen vor, es wird im Folgenden vom nicht-adiabatischen Fall ausgegangen (schwache Kopplung, lange Abstände). Der Elektronentransfer tritt erst ein, wenn der angeregte Donor-Akzeptor-Komplex durch Umorientierung der inneren Kernkoordinaten sowie Reorganisation der Umgebung (Orientierung der Lösungsmittelmoleküle) die Energie der Gleichgewichtslage des ladungsgetrennten Zustands erreicht hat.

Die folgende Abbildung 7 zeigt eine eindimensionale Darstellung dieser mehrdimensionalen Kernpotentialoberfläche. D-A bezeichnet den Zustand des Systems (Donor-Akzeptor-System) vor der Reaktion, D^+A^- den Zustand danach. Es werden zur Vereinfachung harmonische Potentiale mit gleichen Kraftkonstanten angenommen.

Zunächst befindet sich das System in der Nähe des Gleichgewichts des Ausgangszustands. Da der Elektronentransfer im Vergleich zu den Bewegungen der schweren Kerne schnell abläuft, findet er nach dem *Franck-Condon-Prinzip* ohne Änderung der Kernkoordinaten statt (vertikaler Übergang). Der Übergang ist daher energetisch nur möglich, wenn sich das System in der Nähe der Konfiguration befindet, an der sich die Potentialflächen schneiden. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Elektronentransfer stattfindet, wenn das System den Schnittpunkt durchläuft, wird durch die elektronische Wechselwirkung gegeben. Nach der Reaktion nimmt das System schnell das neue Gleichgewicht ein.^[39]

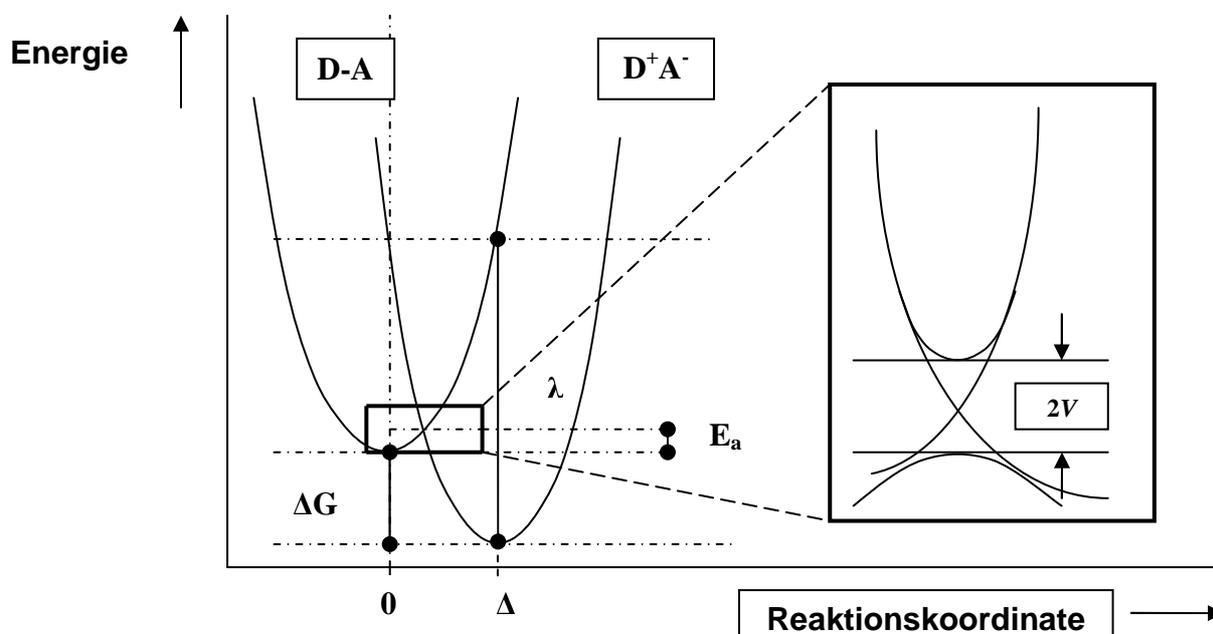


Abb. 7: Eindimensionale Darstellung der Kernpotentialoberfläche. Im adiabatischen Fall beträgt die Aufspaltung am crossing point $2V$, im nicht-adiabatischen Fall schneiden sich die Kurven im crossing point. V ist dabei das Matrixelement der elektronischen Kopplung zwischen den beiden Zuständen.

Der nicht-adiabatische Fall kann mit Hilfe der Störungstheorie^[42] beschrieben werden. Es gilt mit dem nach der Zustandsdichte gewichteten *Franck-Condon-Faktor* (FC) und mit V^2 als dem Matrixelement der elektronischen Kopplung zwischen Donor und Akzeptor (Gleichung 5):^[5,36,39]

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} V^2 FC$$

Gl. 5: Rate k_{ET} in Abhängigkeit von V und FC .

Der *Franck-Condon-Faktor* hängt von λ , T und ΔG^\ddagger ab und kann wie folgt formuliert werden (Gleichung 6):

$$FC = \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(-\frac{(\lambda - \Delta G^\ddagger)^2}{4\lambda k_B T}\right)$$

Gl. 6: *Franck-Condon-Faktor* FC .

Eine Kombination von Gleichung 5 und Gleichung 6 liefert Gleichung 7:^[5]

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{V^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(-\frac{(\lambda - \Delta G^\ddagger)^2}{4\lambda k_B T}\right)$$

Gl. 7: Gleichung der Elektronentransfer-Reaktion nach Marcus: k_{ET} = Ratenkonstante der Elektronentransfer-Reaktion, λ = Reorganisationsenergie, ΔG^\ddagger = Freie Energie der Aktivierung, k_B = Boltzmann-Konstante, T = absolute Temperatur, V^2 = Matrixelement der elektronischen Kopplung.

Dabei ist V^2 wie folgt definiert (Gleichung 8):

$$V^2 = V_0^2 \exp(-\beta R)$$

Gl. 8: Bestimmung von V^2 : V_0^2 = Matrixelement der maximalen elektronischen Kopplung, β = Konstante für die Abstandsabhängigkeit von Elektronentransfer-Prozessen.

Aus der Kombination von Gleichung 7 und Gleichung 8 wird der exponentielle Zusammenhang zwischen k_{ET} und dem Abstand R deutlich (Gleichung 9):

$$k_{ET} \sim \exp(-\beta R)$$

Gl. 9: *Abstandsabhängigkeit von k_{ET} .*

k kann also in Abhängigkeit von vier Einflussgrößen und der Temperatur bestimmt werden. Da k_B eine Konstante und T bekannt ist, müssen ΔG^\ddagger und λ berechnet werden. Die Bestimmung von ΔG wurde bereits im Abschnitt Thermodynamik vorgestellt. Unter der Annahme, dass sich die Form der Kernpotentialkurve bei der Reaktion nicht ändert, lässt sich die Aktivierungsenthalpie nach Gleichung 10 berechnen:^[5]

$$\Delta G^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G}{\lambda} \right)^2 = \frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda}$$

Gl. 10: *Berechnung der Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger .*

ΔG ist hier die bereits oben eingeführte freie Enthalpie des Elektronentransfers. In diese Formel geht außerdem die Reorganisationsenergie λ ein. λ ist die Änderung der freien Energie, die benötigt wird, um die Produktkonfiguration zu erreichen und die Lösungsmittelmoleküle so zu verschieben, dass sie das Produkt optimal lösen. Die Reorganisationsenergie setzt sich aus zwei Größen zusammen (Gleichung 11): aus der Solvensreorganisationsenergie λ_s (enthält die Änderung durch Umordnung der Solvensmoleküle eines dielektrischen Mediums) und aus der inneren Reorganisationsenergie λ_i (enthält die Vibrationsanteile):^[42]

$$\lambda = \lambda_s + \lambda_i$$

Gl. 11: *Reorganisationsenergie λ .*

Der Zusammenhang zwischen der Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger , der freien Enthalpie ΔG und der Reorganisationsenthalpie λ kann anhand der Lage der Potentialflächen von Ausgangs- und Endzustand des Elektronentransfers veranschaulicht werden.^[42] Es lassen sich drei mögliche Fälle diskutieren (Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10):^[36]

A. Normalbereich ($-\Delta G < \lambda$)

Bei zunehmendem Betrag von ΔG nimmt die Aktivierungsenthalpie ab und somit die Elektronentransfer-Rate zu.

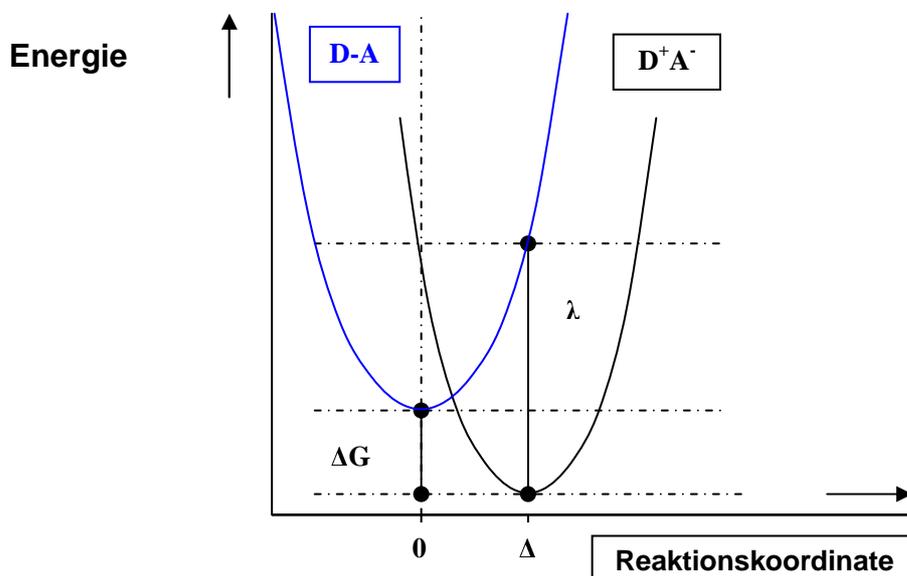


Abb. 8: Potentialdiagramm im Normalbereich.

B. Aktivierungsloser Bereich ($-\Delta G \approx \lambda$)

Wenn die Potentialkurve von D^+A^- diejenige von DA in deren Minimum schneidet, wird $-\Delta G = \lambda$ und damit $\Delta G^\ddagger = 0$. Im Bereich um diesen Punkt hat die Abhängigkeit der Elektronentransfer-Rate von ΔG ihr Maximum.

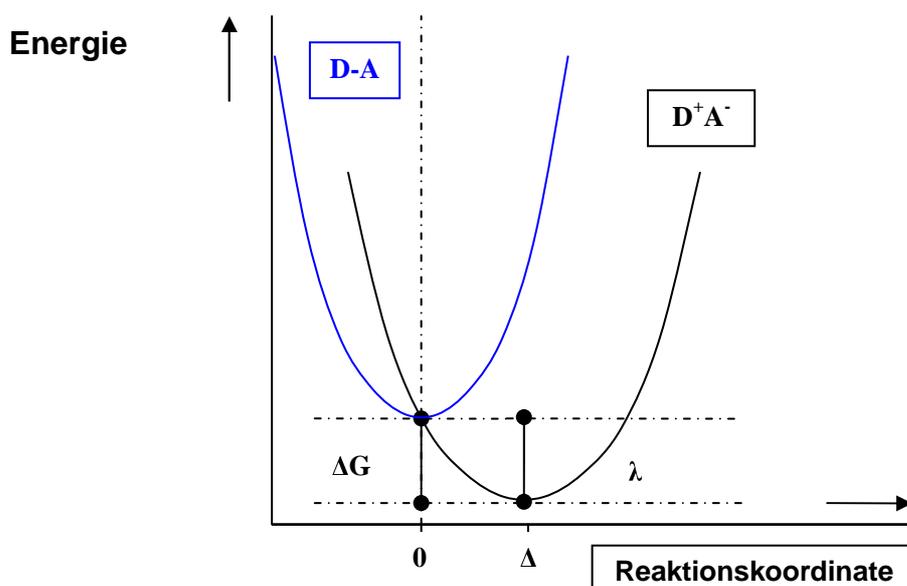


Abb. 9: Potentialdiagramm im aktivierungslosen Bereich.

C. Invertierter Bereich ($-\Delta G > \lambda$)

In diesem Bereich führt eine Erhöhung der Triebkraft zu einer Verlangsamung des Elektronentransfers.

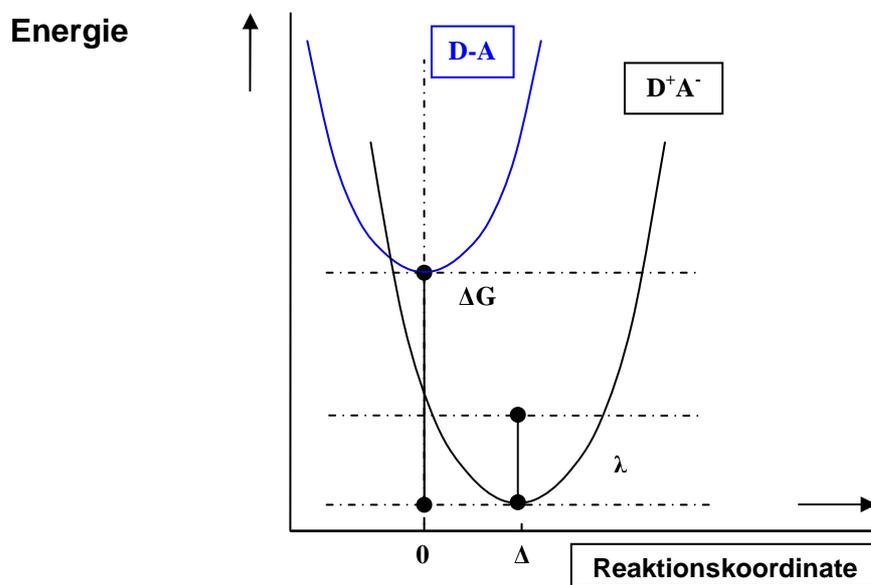


Abb. 10: Potentialdiagramm im invertierten Bereich.

2.2 Fluoreszenz

Unter Lumineszenz versteht man ganz allgemein die Lichtaussendung elektronisch angeregter Atome und Moleküle. Elektronische Anregung erfordert stets die Zufuhr von Energie, was auf vielfältigste Weise geschehen kann. Beruht das Leuchten auf biologischen Stoffumwandlungen, spricht man von Biolumineszenz, ist eine chemische Reaktion mit Lichtaussendung verbunden, spricht man von Chemolumineszenz.

Viele Moleküle und molekulare Systeme zeigen bei Lichtbestrahlung – besonders mit energiereicher UV-Strahlung – eine ganz spezifische Lichtemission, die mit dem Begriff Photolumineszenz belegt ist. Hierbei handelt es sich vornehmlich um sog. Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

2.2.1 Quantenmechanische Beschreibung

Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheiden sich lediglich in der elektronischen Natur der Ausgangszustände der das Licht aussendenden Moleküle. Sie gehen vom ersten angeregten Singulett-Zustand (antiparalleler Spin, S_1) bzw. vom ersten angeregten Triplett-Zustand (paralleler Spin, T_1) aus. Durch Bestrahlung mit Licht im Bereich von 200 nm bis 1500 nm können die für die Lumineszenz interessanten Übergänge $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ sowie intramolekulare *charge-transfer*-Übergänge angeregt werden. Die Anregung verläuft schnell (10^{-15} s), die Folgeprozesse sind wesentlich langsamer.

Wird ein Molekül in einen Schwingungszustand eines höheren elektronischen Zustands angeregt, so relaxiert es innerhalb von etwa 10^{-14} s strahlungslos zum vibronischen Grundzustand des S_1 -Zustandes, von dem aus der elektronische Grundzustand S_0 über unterschiedliche Prozesse erreicht werden kann (Regel von *Kasha*). Im Falle der Fluoreszenz wird die Energiedifferenz ΔE (S_1-S_0) in Form eines Lichtquants abgegeben (in 10^{-7} s bis 10^{-9} s), im Falle der Phosphoreszenz wird Licht mit der Energie $\Delta E = (T_1-S_0)$ abgegeben; aufgrund des spinverbotenen Übergangs ist dieser Prozess wesentlich langsamer (10^{-2} s bis 10^{-4} s).

Wenn ein Molekül nach Lichtabsorption keine Fluoreszenz zeigt, so muss die Anregungsenergie beim Übergang in den elektronischen Grundzustand auf andere Weise abgeführt werden. Hierfür kommen der strahlungslose Energietransfer auf andere Moleküle (Fluoreszenzlöschung oder -*quenching*), (photo-)chemische Reaktionen, aber vor allem der „interne Energietransfer“, also die Energieumverteilung innerhalb eines Moleküls in Frage.

2.2.2 Fluoreszenzanalytik

Zwei unterschiedliche Aspekte sind für die Fluoreszenzanalytik bedeutsam. Zum einen ist die Identifikation und (mit Einschränkungen) die Konzentrationsbestimmung fluoreszierender Komponenten möglich. Zum anderen stellen fluoreszente Stoffe Sonden („probe“) dar, die selbst kleinste zeitliche (im Nanosekunden-Bereich) und funktionelle Veränderungen aus der submikroskopischen Welt detektieren können.

Ein grundlegender Unterschied zwischen Absorptions- und Fluoreszenzanalytik liegt in der Messmethodik. Die Absorption einer Spezies ist nach *Lambert-Beer* definiert. Gemessen wird der Lichtanteil, der nicht absorbiert wurde, die Bestimmung der Absorption ist also eine indirekte Nachweismethode. Die Gerätedispersion kann zwar durch Vergleich mit einer Referenz eliminiert werden, ist aber durch die Differenzbildung der Intensitäten (mit und ohne Probe) zwei bis drei Größenordnungen weniger empfindlich als eine Fluoreszenzmessung. Bei schwach absorbierenden Proben muss ein kleiner Unterschied zweier großer Signale detektiert werden.

Fluoreszenzmessungen sind dem gegenüber relativ, aber direkter Natur. Es wird unmittelbar das von der fraglichen Spezies emittierte Licht gemessen. Allerdings ist eine Korrektur des Spektrums bezüglich der Apparatedispersion aufgrund der fehlenden Referenz schwierig; eine objektive Messvorschrift fehlt. Fluoreszenzdaten sind immanent mit einem vergleichsweise großen absoluten Fehler behaftet, sowohl bzgl. der Wellenlänge (± 5 nm), als auch bzgl. der Signalgröße (± 10 %).

Trotzdem ist die Fluorometrie im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie informativer: während bei der Absorptionsspektroskopie als einziger Messparameter die Absorption A bestimmt werden kann, gestattet die Fluoreszenzspektroskopie die Messung einer ganzen Reihe voneinander unabhängiger Parameter wie etwa Quantenausbeute, Lebensdauer oder *Stokes*-Verschiebung. Die im Rahmen dieser Arbeit wichtigen Parameter werden im Folgenden erläutert.^[43]

1. Quantenausbeute

Eine wichtige Größe zur Charakterisierung eines Fluorophors ist dessen Quantenausbeute (Gleichung 12). Die Quantenausbeute Φ_F ist definiert als das Verhältnis von Fluoreszenzemission k_F zur Summe aus Fluoreszenzemission k_F und allen weiteren (meist strahlungslosen) Prozessen k_p , die nach Anregung des Fluorophors ablaufen.

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_i} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET}} = \frac{k_F}{\Sigma k}$$

Gl. 12: Definition der Quantenausbeute Φ_F , wobei k_F die Ratenkonstante der Fluoreszenzemission und k_i die Summe der Ratenkonstanten aller strahlungsloser Prozesse ist.

Da die Ratenkonstanten der einzelnen Prozesse in der Regel nicht bekannt sind, wird die Quantenausbeute aus dem Verhältnis von eingestrahlt Lichtquanten und emittierten Fluoreszenzquanten bestimmt (Gleichung 13):

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A}$$

Gl. 13: Bestimmung der Quantenausbeute Φ_F aus den Messwerten Fluoreszenzintensität I_F und eingestrahelter Intensität I_A .

Für spektroskopische Untersuchungen ist die Quantenausbeute der Fluoreszenz entscheidend. Nur bei einem ausreichend großen Wert von Φ_F ist eine sinnvolle Nutzung des Fluorophors als Sonde möglich. In den seltensten Fällen erreicht die Quantenausbeute den maximal möglichen Wert von 1, ein Beispiel dafür ist Ethidiumbromid.^[39]

2. Lebensdauer

Die Lebensdauer τ_F ist wie folgt definiert (Gleichung 14):

$$\tau_F = \frac{1}{k_F}$$

Gl. 14: Definition der Lebensdauer τ_F .

Die Lebensdauer τ_F ist der Reziprokwert der Ratenkonstante der Fluoreszenzemission und gibt die durchschnittliche Lebensdauer eines Moleküls im angeregten Zustand vor seiner Rückkehr in den Grundzustand an. Für die Fluoreszenzemission liegen typische Werte im Bereich von 10 Nanosekunden. Die Lebensdauer des Fluorophors limitiert die Beobachtung von dynamischen Prozessen mit dem gewählten Chromophor als Sonde.

Die Geschwindigkeitskonstanten des Elektronentransfers können bei zeitaufgelösten Messungen über die mittlere Lebensdauer τ der angeregten Zustände bestimmt werden. Bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen hängt die Geschwindigkeitskonstante k_{ET} mit der Lebensdauer τ der angeregten Zustände wie in Gleichung 15 dargestellt zusammen, wobei τ_0 die Lebensdauer des angeregten Zustands der Referenzverbindung (d. h. mit fluoreszentelem Donor, jedoch ohne Akzeptor) im Vergleich zur Lebensdauer τ des Donor-Akzeptor-Komplexes ist.

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}$$

Gl. 15: *Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{ET} eines Elektronentransfers aus der Zustandslebensdauer.*

3. Lösungsmittelleffekte

Das Lösungsmittel kann durch seine Polarität und seine Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, einen deutlichen Einfluss auf angeregte Zustände ausüben. Wenn sich die Polarität eines Chromophors bei der Absorption von Lichtenergie ändert, kann der angeregte Zustand – je nach der Polarität des Lösungsmittels – stabilisiert oder auch destabilisiert werden. Der angeregte Zustand eines Fluorophors, der durch Anregung polarer wird, ist in einem polaren Lösungsmittel besser stabilisiert als der Grundzustand. Dadurch nähern sich die Energieniveaus an und es wird eine Rotverschiebung des emittierten Lichts beobachtet. Der *Stokes-Shift* wird dann umso deutlicher sein, je polarer das gewählte Lösungsmittel ist.

Es kann zusätzlich durch die Anregung zu Änderungen im Lösungsmittel kommen, zum Beispiel kann sich auch die Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, verändern. Auch dadurch kann die Lage der Energieniveaus gegeneinander verschoben werden. Auch der Einbau eines Chromophors in ein großes Molekül – wie beim Einbau fluoreszenter Nucleoside in DNA – kann elektronische Spektren stark beeinflussen, da das Innere der DNA von der Polarität her eher mit Acetonitril als mit Wasser vergleichbar ist. Die hier erwähnten Lösungsmittelleffekte sind nicht auf die Fluorometrie beschränkt, sondern treten bei allen Arten von elektronischen Spektren auf.^[43]

4. *pH*-Einfluss

Die Lebensdauer fluoreszenter Moleküle im S_1 -Zustand bewegt sich im Bereich von 10^{-11} s bis hin zu 10^{-7} s. Einige chemische Reaktionen sind ausreichend schnell, um mit den photophysikalischen Prozessen konkurrieren zu können. Zu diesen Reaktionen gehören Protonentransfer-Prozesse in Lösung.

Da sich die Elektronenverteilung beim Übergang des Chromophors vom Grundzustand in den angeregten Zustand ändert, kann sich auch die Acidität oder Basizität des Chromophors bei der Anregung verändern. Chemische Reaktionen dieser Spezies führen eventuell zu mehreren Arten lumineszenter Moleküle, obwohl der Grundzustand selektiv angeregt wurde. Dann sind die Spektren von der Konzentration acider oder basischer Spezies abhängig; die Quantenausbeute verändert sich mit dem *pH*-Wert und spiegelt die Kinetik aller Vorgänge ausgehend vom S_1 -Zustand wieder.

In diesem Zusammenhang ist auch der protonengekoppelte Elektronentransfer (*proton coupled electron transfer*, PCET) zu nennen. PCET ist ein in Biochemie und Elektrochemie häufig anzutreffender Reaktionspfad des Ladungstransports; als Beispiele seien Vorgänge im Photosynthesesystem II bei der Wasserspaltung und Cytochromoxidase C genannt.^[44]

5. Konzentrationseffekte

Die Intensität der Fluoreszenz-Emission steigt nur im Bereich sehr geringer Konzentrationen (10^{-4} M) linear mit der Konzentration des Fluorophors an. Schon ab Konzentrationen im Bereich von 10^{-2} M sind deutliche Abweichungen von der Linearität zu beobachten. Bei weiter steigender Konzentration kann es zu Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen kommen.

Die Energieübertragung von einem angeregten Molekül auf ein Molekül im Grundzustand wird mit zunehmender Konzentration wahrscheinlicher.^[39]

6. Quenching-Prozesse

Jeder Prozess, der die Intensität eines emittierenden Fluorophors mindert, wird als *Quenching* bezeichnet. Wechselwirkungen des Grundzustands oder des angeregten Zustands mit anderen Molekülen in Lösung führen zum *Quenching*. Dynamisches *Quenching* durch Stoßprozesse wird dabei vom statischen *Quenching* – durch Komplexbildung von *Quencher* und Fluorophor – unterschieden.

Dynamisches *Quenching* während der Lebensdauer des angeregten Zustands hängt von den Diffusionseigenschaften der beteiligten Moleküle und deren Konzentrationen ab.

Diese strahlungslosen Prozesse stellen eine Parallelreaktion zur Emission dar und verringern die Quantenausbeute (Abbildung 12).

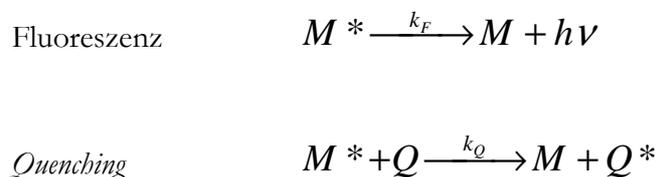


Abb. 12: Die konkurrierenden Prozesse Fluoreszenz und Quenching, dabei ist M^* das angeregte Molekül und Q der Quencher.

Die Quantenausbeute wird durch Quenching-Prozesse verringert. Dabei geht neben der Ratenkonstante des Quenching-Vorgangs k_Q auch die Konzentration $[Q]$ des Quenchers mit ein (Gleichung 16):

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_i} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} + k_Q[Q]} = \frac{k_F}{\Sigma k}$$

Gl. 16: Auswirkung des Quenching auf die Quantenausbeute Φ_F .

Die experimentelle Bestimmung der Quantenausbeute erfolgt, wie in Gleichung 13 beschrieben, durch Messung von eingestrahlenen Lichtquanten und emittierten Fluoreszenzquanten.

Durch die Quenching-Prozesse entstehen oft reaktive Intermediate, die in schnellen Folgereaktionen zu stabilen Produkten weiterreagieren. Wenn bei der Quenching-Reaktion Energie übertragen wird, entsteht aus Q das angeregte Molekül Q^* . Q^* kann nun auch alle physikalischen und chemischen Reaktionspfade eines angeregten Moleküls beschreiten.^[39]

7. Energietransfer und Elektronentransfer

Das Molekül, das nach Aufnahme eines Lichtquants in einen angeregten Zustand übergegangen ist, muss nicht gleichzeitig für die weiteren photochemischen Folgeprozesse verantwortlich sein. Vielmehr kann es seine Energie auf andere Moleküle übertragen. Es gibt zwei verschiedene Mechanismen des intermolekularen Energietransfers: zum einen Energietransfer durch Elektronenaustausch über kurze Distanzen (im Bereich der Moleküldimension) und zum anderen Energietransfer durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen über längere Distanzen (Abbildung 13).

Die Anregungsenergie kann durch Elektronenaustausch übertragen werden. Wenn die beiden Tauschpartner – das angeregte Donormolekül und das Akzeptormolekül im Grundzustand – stark polarisiert sind, kann sich ein metastabiler Komplex zwischen beiden Molekülen im angeregten Zustand bilden. Der Austausch-Mechanismus ist ein Phänomen, das nur bei kleinen Abständen – d. h. Überlappung der Orbitale von Donor und Akzeptor oder eine Entfernung im Bereich der Molekülausdehnung – auftritt. Die Elektronen in den Grenzorbitale können bei diesem engen Kontakt ausgetauscht werden und übertragen die Anregungsenergie von D^* auf A. Am effektivsten ist der Austausch-Mechanismus, wenn die Grenzorbitale-Energien ähnlich sind, d. h. die Wellenlänge der Fluoreszenzemission in etwa der Wellenlänge der Absorption von A entspricht.

Wenn die beiden Partner ungleich sind, bezeichnet man den Komplex als Exciplex (*excited complex*), wenn sie gleich sind, als Excimer (*excited dimer*). Der metastabile Komplex besitzt andere Eigenschaften als das angeregte Donormolekül. Das Maximum der Strahlungsemission durch Komplexe ist gegenüber der von Einzelmolekülen verschoben, so dass sich das Auftreten von photochemisch aktiven dimeren (oder polymeren) Komplexen an den Emissionsspektren erkennen lässt. Als Beispiel kann die Fluoreszenz von Pyren in n-Heptan dienen. In geringer Konzentration (10^{-5} M) kollidieren zu wenige angeregte Moleküle mit Molekülen im Grundzustand, um eine nennenswerte Anzahl von Excimeren zu bilden. Erhöht man die Konzentration auf das 100-fache, so ist die Wahrscheinlichkeit für Molekülkollisionen bei weitem höher, so dass die eingestrahlenen Quanten fast ausschließlich durch Excimere emittiert werden.^[43] Sollten sich D^* und A nicht in unmittelbarer Nähe befinden, dann besteht die Möglichkeit eines Energietransfers durch – räumlich weitreichende – Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Das angeregte Molekül stellt einen schwingenden Dipol-Oszillator dar. Statt die Anregungsenergie in Form einer elektromagnetischen Schwingung abzustrahlen, kann die Schwingungsenergie von dem Elektron eines benachbarten Moleküls direkt übernommen werden (*resonance transfer*). Das Phänomen wird als FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) bezeichnet.

Wichtige Faktoren, die diesen Prozess beeinflussen, sind: die Überlappung des Emissionsspektrums des Donor-Chromophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Chromophors, die Orientierung der Übergangsdipole von D^* und A sowie deren Abstand.

Die Übertragungswahrscheinlichkeit im Resonanzfall, d. h. wenn die Frequenzen von Donor- und Akzeptormolekül übereinstimmen, ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands der Molekülzentren. Eine Übertragung zwischen gleichen Molekülen erfolgt in der Regel ohne Energieverlust, im Falle unterschiedlicher Molekülart wird die Energiedifferenz als Wärme abgegeben.^[39]

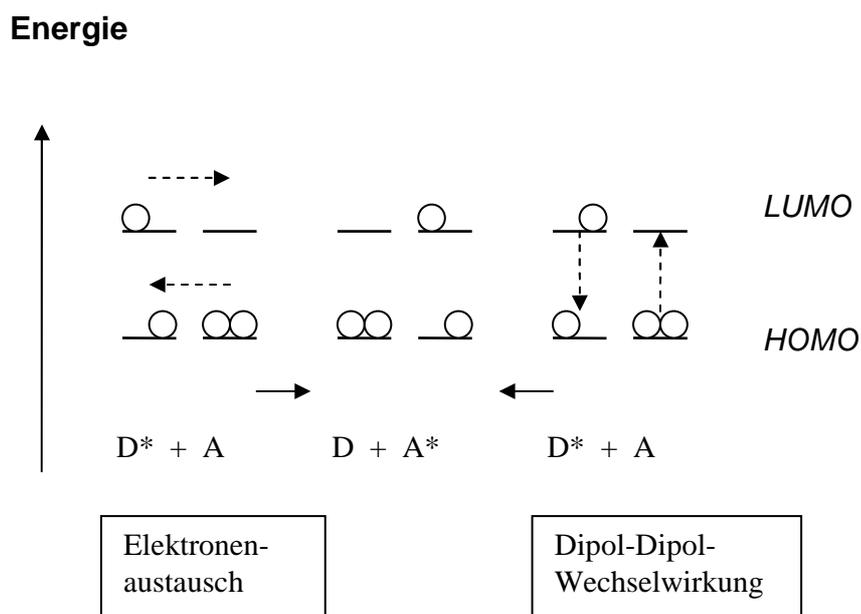


Abb. 13: Energieübertragung durch Elektronenaustausch.

FRET kann genutzt werden, um den Abstand von Fluorophoren in Makromolekülen im Bereich von etwa 10 Å bis hin zu 90 Å zu bestimmen.

Als eine weitere Möglichkeit zur Energieübertragung von D^* auf A kann ein Elektronenübergang zwischen D^* und A dienen. Je nach der relativen Lage der Orbitale der beteiligten Spezies kann D^* bei der Ladungstrennung oxidiert oder reduziert werden, wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben.^[39]

8. Fluoreszenz-Markierung von Oligonukleotiden

Intrinsische Fluorophore sind natürliche Bestandteile einer Probe, zum Beispiel die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin in Peptiden. Im Gegensatz zu Peptiden gibt es in DNA keine natürlich vorkommende Fluoreszenz. Die Fluoreszenz der natürlichen Nukleotide A, C, G und T bzw. U in DNA bzw. RNA ist extrem schwach.^[164] Die angeregten Zustände aller Basen zeigen sehr kurze Lebensdauern im Bereich einiger Pikosekunden und geben keine detaillierten Informationen über ihre Umgebung, da die Signale über alle Basen des betrachteten Oligonukleotids gemittelt sind.^[165-167]

Ein Vorteil der Abwesenheit natürlicher Fluoreszenz in DNA ist die Tatsache, dass Fluoreszenz-Signale artifizierlicher, fluoreszenter Basen-Analoga ohne „Hintergrund-Rauschen“ beobachtet werden können.

Da die natürlichen DNA-Basen keine nennenswerte Fluoreszenz besitzen, werden artifizielle Basen-Analoga entwickelt, die nach ihrer Insertion in DNA-Sequenzen intrinsische Fluoreszenzsonden darstellen. Viele verschiedene, zum Teil sehr gut charakterisierte Analoga zur Nutzung in DNA sind bekannt.^[168] Diese Fluorophore werden bei Untersuchungen der DNA zu einer Probe dazugegeben, die nicht die gewünschten spektralen Eigenschaften besitzt. Die eingesetzten Fluorophore sollten idealerweise eine hohe Fluoreszenz-Intensität – die empfindlich auf Änderungen der Umgebung reagiert – besitzen, stabil während längerer oder wiederholter Bestrahlung sein und weder die Struktur des Makromoleküls noch den beobachteten Prozess stören.^[169]

Die Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren hat unterdessen vielfältige Anwendungen gefunden; speziell bei Messungen, die früher auf eine radioaktive Markierung angewiesen waren. Beispiele hierfür sind die DNA-Sequenzierung,^[170,171] die *fluorescence in situ hybridisation (FISH)*^[172-175] sowie die *polymerase chain reaction (PCR)*.^[176,177]

Die zur Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden verwendeten Sonden können aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 14).^[178]

- A** mit artifiziellen Basen modifizierte Duplexe
- B** mit artifiziellen Basen modifizierte Duplexe, bei denen ein Teil der artifiziellen Base in die große Furche ragt
- C** modifizierte Duplexe mit Haarnadel-Struktur
- D** Duplexe, bei denen ein organischer oder anorganischer Interkalator kovalent über einen flexiblen Linker angebunden ist

Bei den Gruppen A, B und C kann die artifizielle Base durch die automatisierte DNA-Festphasensynthese eingeführt werden. Alternativ können die Modifikationen durch Reaktionen an der festen Phase nach der DNA-Synthese eingeführt werden, wie für die Gruppen B und D.

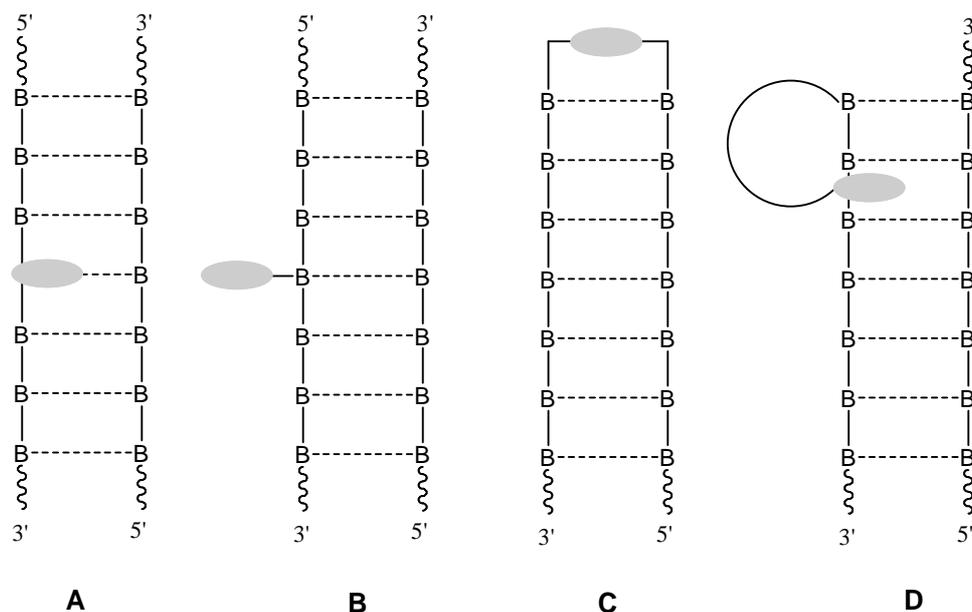


Abb. 14: *Verschiedene Prinzipien der Fluoreszenzmarkierung von DNA.*

Die Änderungen in den Fluoreszenzeigenschaften (vor allem die Intensität der Emission, Lebenszeiten und Anisotropie) des betrachteten Fluorophors – sowohl isoliert als auch in Komplexen – werden genutzt, um Makromolekül-Wechselwirkungen zu untersuchen. Speziell Nukleinsäure-Basen-Analoga wurden intensiv genutzt, um Bindungskinetiken von Makromolekül-Wechselwirkungen von Nukleinsäuren,^[179-188] Faltungsprozesse,^[189-193] Grundlagen des Energietransfers^[194,195] und Ladungstransfers durch DNA^[138,168,196] aufzuklären.

Weitere neue Fluorophore wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt, charakterisiert und zu Untersuchungen des Ladungstransfers durch die DNA genutzt: Pyren-modifizierte artifizielle Nukleoside (Py-dU und Py-dG) und Ethidium-modifizierte Nukleosid-Analoga.

2.3 Spektroskopische Methoden

Fluoreszenzmessungen können im Allgemeinen auf zwei Arten durchgeführt werden: als *steady-state*-Messung und als zeitaufgelöste Messung.

Bei *steady-state*-Messungen wird mit permanenter Einstrahlung und Beobachtung der Vorgänge gearbeitet. Da die Elementarprozesse bei der Fluoreszenz typischerweise auf der ns-Skala ablaufen, herrschen meist *steady-state*-Bedingungen, denn das Gleichgewicht zwischen Anregung und Zerfall wird fast augenblicklich nach der Photoanregung erreicht.

Zeitaufgelöste Messungen zeigen die zeitliche Abhängigkeit eines Fluoreszenzparameters wie Intensität der Emission, Lebenszeit oder Anisotropie. Dafür wird die Probe mit einem Puls angeregt, der kürzer ist als die Zerfallszeit des angeregten Zustands. Das Detektionssystem muss Vorgänge innerhalb der ns-Zeitskala abfragen können. Die Messungen sind sehr aufwendig, geben aber wertvollen Informationen über Struktur, Flexibilität und Konformationen eines Makromoleküls, die bei *steady-state*-Messungen gemittelt werden.

2.3.1 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Mit einem Laserpuls geeigneter Wellenlänge wird ein Fluoreszenzfarbstoff D in einen angeregten elektronischen Zustand versetzt. Durch eine zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzlöschung ist eine Bestimmung der Rate für die Rückkehr in den Grundzustand möglich.^[16] Existiert ein alternativer strahlungsloser Relaxationskanal, so besteht die Möglichkeit einer beschleunigten Fluoreszenzlöschung. Ein solcher alternativer Relaxationsweg durch Ladungstrennung besteht, wenn sich das Chromophor innerhalb eines geeigneten Redoxsystems befindet. Dabei wird die Ladung vom angeregten Fluoreszenzfarbstoff D* auf einen geeigneten Akzeptor A übertragen. Der Ladungstransfer steht in Konkurrenz zum Relaxationsprozess durch Fluoreszenz. Die Rate dieses Ladungstransfers beträgt k_{ET} , die des Rückladungstransfers k_{BET} (Abbildung 15).

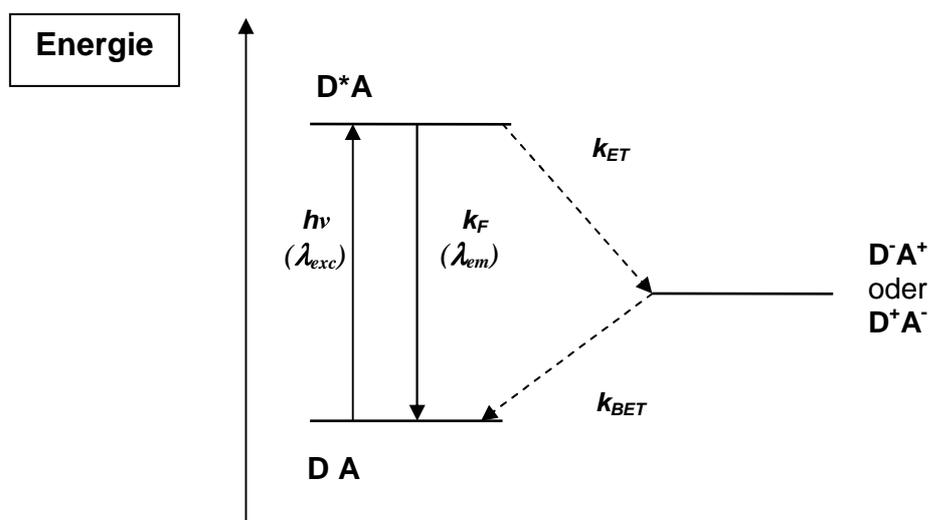


Abb. 15: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie mit Ladungstransfer zwischen D und A .

Die beobachtbare Größe der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie ist die Löschung des angeregten Zustands. Über einen Vergleich der Abklingkurven des Chromophors außerhalb und innerhalb des Donor-Akzeptor-Systems lässt sich die eigentliche Rate k_{ET} des Ladungstransfers bestimmen: Die Geschwindigkeitskonstante k_{ET} ist die Differenz der reziproken Lebensdauer τ^{-1} des Chromophors im Donor-Akzeptor-System und der reziproken Lebensdauer τ_0^{-1} des Chromophors in Abwesenheit eines Akzeptors, wie in Gleichung 15 beschrieben.

Der Vorteil dieser Messmethode liegt in der hohen Empfindlichkeit und der geringen Menge an benötigtem, fluoreszenzmarkiertem Material. Das Zeitfenster dieser Messungen liegt zwischen 10 ps und 10 ns.

2.3.2 Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie

Eine höhere Zeitauflösung bis in den Femtosekundenbereich (bis hin zu 10 fs) erreicht man mit der zeitaufgelösten Transientenabsorptionsspektroskopie.^[16] Mit dieser Methode, die auch als *pump-probe*-Spektroskopie bezeichnet wird, können sowohl Anregungs- als auch Relaxationsprozesse des Chromophors beobachtet werden, indem die Absorption auftretender Intermediate abgefragt wird. Allerdings ist sie weit weniger empfindlich als die Fluoreszenzspektroskopie. Über einen kurzen Laserpuls entsprechender Wellenlänge wird das Chromophor angeregt („*pump*“). Ein zweiter, unabhängiger Laserpuls mit beliebiger Wellenlänge („*probe*“) wird in kurzen Zeitabständen durch die Probe geschickt und kann von entstehenden intermediären Zuständen absorbiert werden (Abbildung 15).

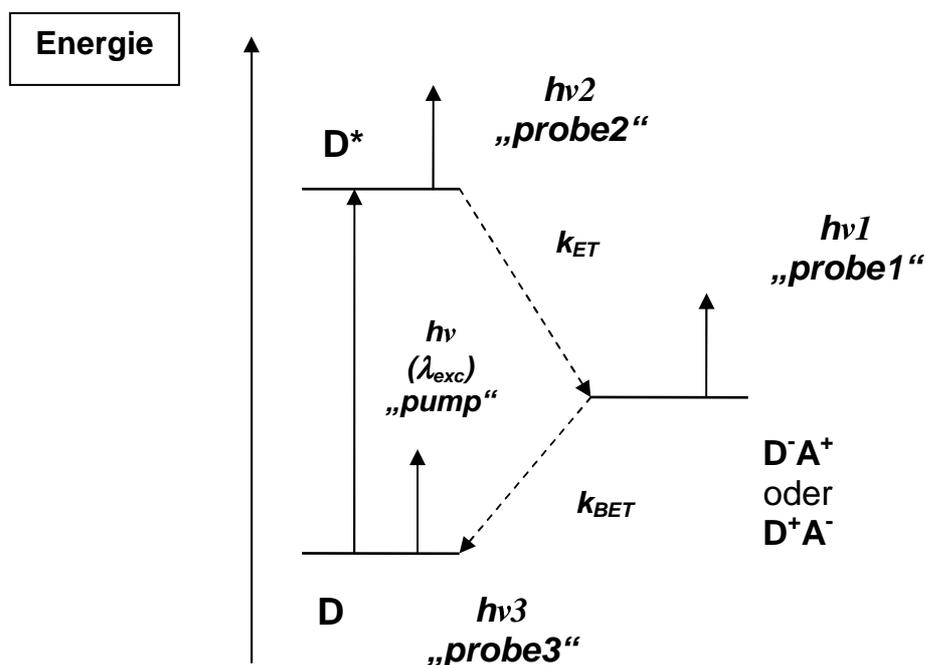


Abb. 16: Abfrage von Intermediaten durch pump-probe-Spektroskopie.

- 1 Liegt der Abfragepuls außerhalb der Fluoreszenzbande, so kann die Besetzungswahrscheinlichkeit jedes beliebigen intermediären Zustands – wie zum Beispiel des ladungstrennten Zustands – ermittelt werden.
- 2 Liegt er innerhalb, kommt es zu stimulierter Emission. Damit lässt sich die Entvölkerungsrate des angeregten Zustands S_1 ermitteln.
- 3 Liegt der Abfragepuls im Bereich der Grundzustandsabsorption, so lässt sich die Rate k_{BET} ermitteln.

Es ist prinzipiell möglich, alle Wellenlängen gleichzeitig mit einem Weißlichtkontinuum abzufragen, dann ist allerdings eine Zeitkorrektur für die einzelnen Wellenlängen erforderlich. Die Absorption einer Probe mit oder ohne vorherige Anregung wird gemessen und die Änderung der optischen Dichte gegen die Zeit aufgetragen. Abhängig vom beobachteten Prozess – Absorption, stimulierte Emission, *bleaching* oder Rücktransfer in den Grundzustand – können die Messwerte positiv oder negativ sein. Die Amplituden und Lebensdauern der Spezies aus den erhaltenen Spektren liefern die Raten von Fluoreszenz, Ladungstrennung und Ladungsrekombination.

3 Elektronentransfer in DNA

3.1 Bedeutung des Ladungstransfers in DNA

3.1.1 Biologische Relevanz

Viele beobachtbare Schäden an der DNA sind eine Folge von Radikalreaktionen und können somit in unmittelbarem Zusammenhang mit Ladungstransferprozessen stehen. Werden diese Schäden nicht durch zelluläre Reparaturmechanismen erkannt und behoben, kann dies zu Mutationen und Krebsentstehung führen.^[20,45] Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Tumorsuppressor-Gen p53. Es sorgt über die Expression des Proteins p53 dafür, dass die Zelle bei Genschäden entweder ihr Wachstum einstellt oder kontrollierten Suizid (Apoptose) begeht.^[46]

Radikale können durch verschiedene äußere Einflüsse wie Strahlung (zum Beispiel Röntgen-, Höhen- oder radioaktive Strahlung und UV-Licht), Sauerstoffradikale oder Alkylierungsreagentien entstehen.^[47] Der Ort der Radikalbildung und der eigentlichen Schädigung können durch Ladungstransferprozesse jedoch räumlich getrennt sein. Für das Verständnis der Bewegung radikalischer Ladung in DNA und die Entstehung von DNA-Schäden *in vivo* ist eine grundlegende Erforschung dieser Prozesse und der Einflussfaktoren unumgänglich. Auf diese Weise könnten sich neue Ansätze für Diagnostik und Therapie der physiologischen Folgen oxidativer DNA-Schäden ergeben.^[48]

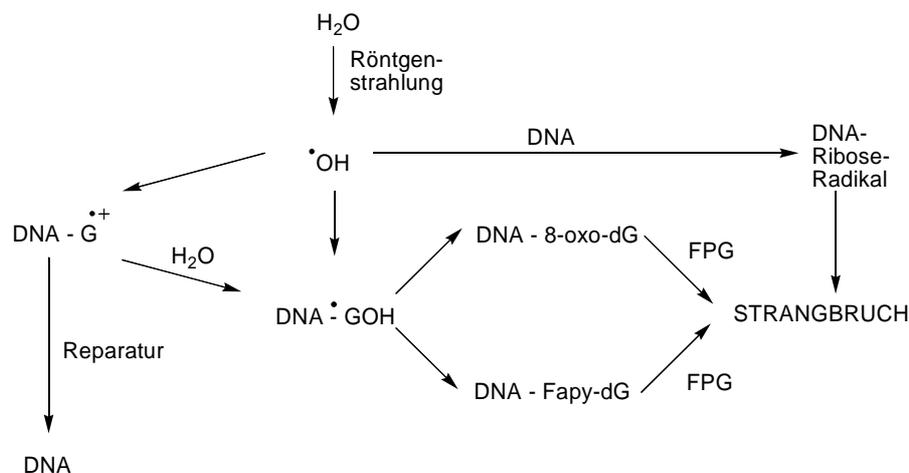


Abb. 17: Radikalische DNA-Schädigung und Folgeprozesse: 8-oxo-dG = 8-Oxo-Guanin, Fapy = Formamidopyrimidin, FPG = Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase, DNA•GOH = 8-Hydroxy-7,8-dihydroguanylradikal.^[50]

Ein wichtiger Vorläufer der radikalischen DNA-Schädigungen stellt das $G^{\bullet+}$ -Radikalkation dar (Abbildung 17).^[49] Es kann mit Molekülen in seiner Umgebung (O_2 oder H_2O) zu verschiedenen Oxidationsprodukten (G^{ox}) reagieren und somit Ausgangspunkt einer mutativen DNA-Schädigung sein, falls die Oxidationsprodukte nicht durch einen Reparaturmechanismus erkannt werden (Abbildung 18).^[48,51]

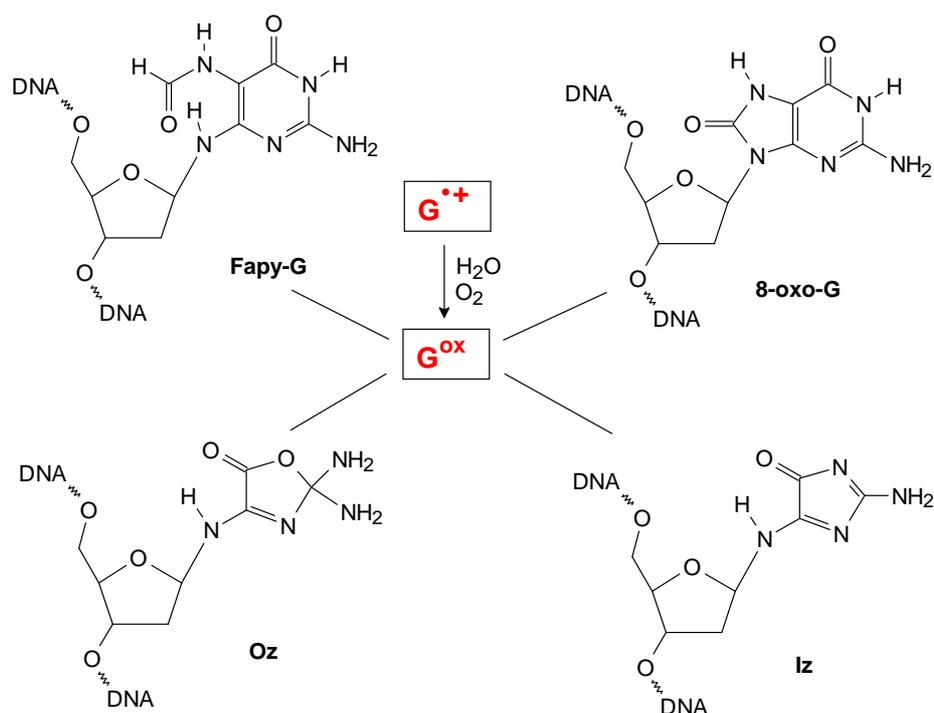


Abb. 18: Mögliche Oxidationsprodukte des Guanins mit Formamidopyrimidin-(Fapy-G), 8-Oxoguanin- (8-oxo-G), Oxazolone- (Oz) oder Imidazolone-Struktur (Iz), die aus dem G-Radikalkation entstehen können.^[52,53]

Als Beispiel für die mutagene Wirkung eines Oxidationsprodukts von Guanin sei hier 8-Oxo-2'-desoxy-guanosin (8-oxo-dG) genannt.^[54] Liegt es in der *anti*-Konformation vor, bildet es wie Guanosin mit Cytidin ein *Watson-Crick*-Basenpaar. Kommt es allerdings zu einem Konformationswechsel zur *syn*-Konformation, so wird bei der ersten Replikation eine *Hoogsteen*-Basenpaarung zu Adenosin ausgebildet. Bei der zweiten Replikation dieses Stranges wird 8-oxo-dG gegen Thymin ausgetauscht. Das ursprüngliche GC-Paar ist somit durch ein TA-Paar ersetzt worden (Abbildung 19).

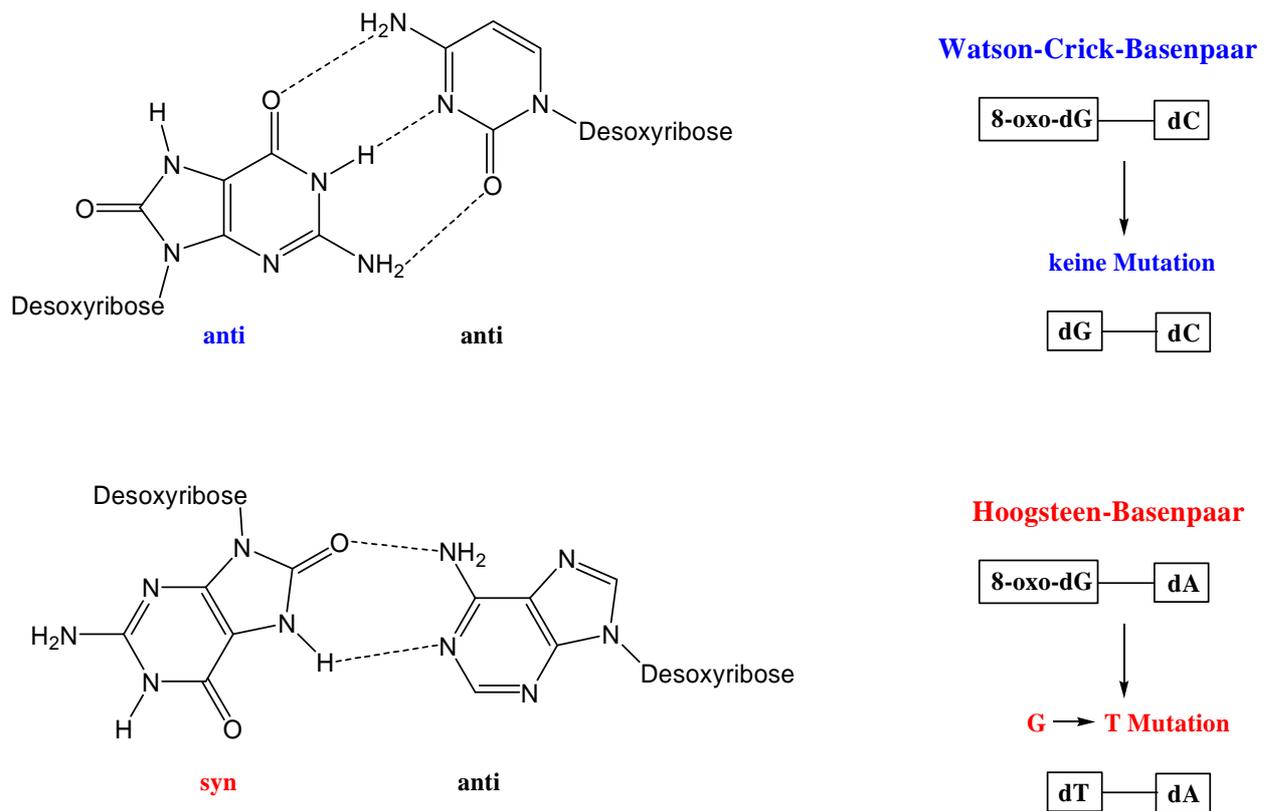


Abb. 19: Mutation als Folge oxidativer Schädigung des Guanins: aus einem GC-Paar bildet sich über 8-oxo-G ein AT-Basenpaar.^[48,51]

Ein weiteres Oxidationsprodukt, Fapy-dG, wurde kürzlich synthetisiert^[55-57] und in Replikationsversuchen eingesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass Fapy-dG deutlich mutagener ist als das länger bekannte 8-oxo-dG.^[57] Der Mechanismus einer Induzierung von Strangbrüchen nach einer Photooxidation und Bildung eines G-Radikalkations ist inzwischen genauer bekannt: zwei mögliche Wege der weiteren Reaktion konnten identifiziert werden: Dabei kann in einem Fall das G-Radikalkation zum 8-Hydroxyguanin reagieren, hierbei wurde kein Strangbruch beobachtet. Im anderen Fall reagiert das G-Radikalkation durch zweimalige H-Abstraktion zum Ribose-Radikal und in der Folge zum Strangbruch. Der Ort der primären Schädigung eines Guanins muss dabei nicht dem Ort des Strangbruchs entsprechen, da die positive Ladung des G^{+} eine hohe Beweglichkeit besitzt und in der DNA wandern kann.^[58] Die von *Melvin et al.* aufgeklärten Reaktionswege sind in Abbildung 20 schematisch aufgeführt.^[59]

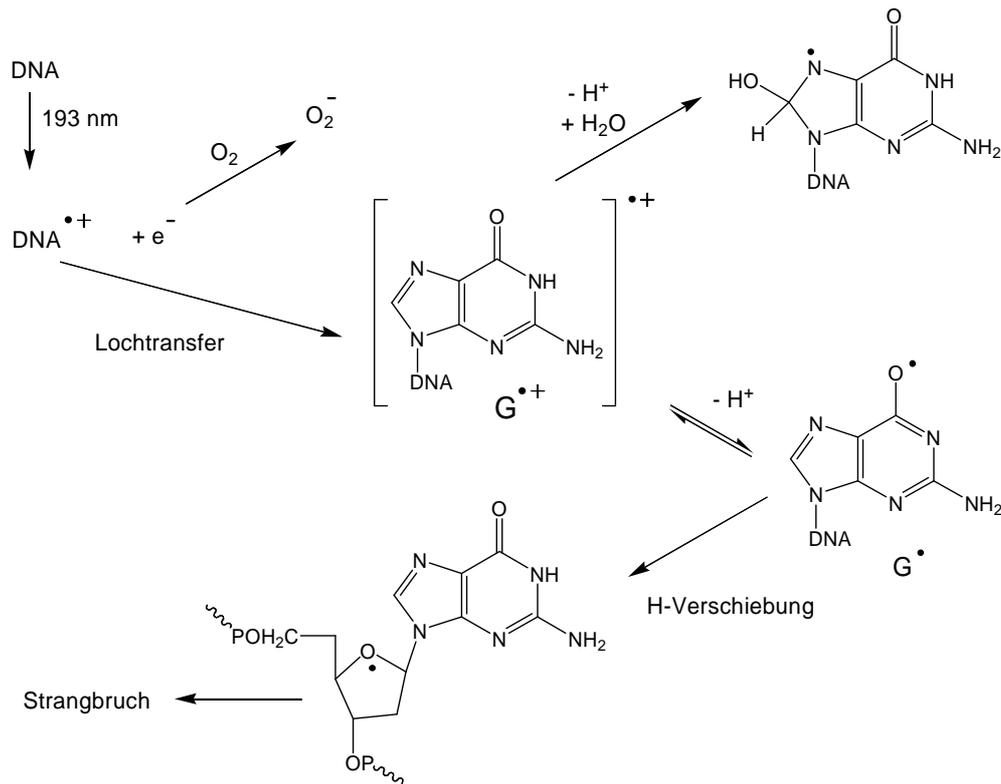


Abb. 20: Mögliche Reaktionswege, die zum Strangbruch nach einer Photooxidation führen können.^[59]

Weitere sehr detaillierte Untersuchungen der Reaktionen aller Basen-Radikalkationen – speziell von G•+ und dessen Folgeprodukt 8-oxo-dG – in wässrigen, sauerstoffhaltigen Lösungen wurden von *Cadet et al.* durchgeführt.^[60]

Die Spekulationen bezüglich oxidativer Schädigung gehen um ein Vielfaches über die bisher bekannten Mechanismen hinaus: oxidative Prozesse werden zum Beispiel für den Alterungsprozess von Zellen verantwortlich gemacht.^[54] Es wird vermutet, dass guaninreiche Sequenzen am Rande der nichtcodierenden Abschnitte des Genoms als „Radikalfallen“ fungieren und so codierende Sequenzen vor einer Mutation als Folge von oxidativen radikalischen Prozessen schützen sollen. Ebenso könnte die Biokristallisation des Erbgutes einen Schutz gegen oxidative Schädigung darstellen,^[61,62] da dadurch das Ladungstransfervermögen der DNA erhöht wird. Experimentelle Beweise hierfür konnten aber bisher nur Wenige erbracht werden.^[63]

An den Enden der Chromosomen befinden sich die so genannten Telomere. Sie stabilisieren die Enden der Chromosomen und verhindern, dass sich mehrere Chromosomen verbinden. Telomer-DNA enthält typische Basensequenzen, die reich an Guanin sind (5'-TTAGGG-3') und in Gegenwart von Kaliumionen charakteristische Quadruplex-Strukturen ausbilden.

Erst kürzlich wurde eine derartige Telomer-Struktur publiziert.^[64] Telomere stellen ein interessantes *Target* für die Medizinalchemie und Biologie dar, da sie eine wichtige Rolle beim Alterungsprozess und bei der Entstehung von Krebs spielen. Die Telomere in menschlichen Fibroblasten werden bei jeder Zellteilung um durchschnittlich 90 Basenpaare verkürzt. Diese Verkürzung ist umso drastischer (bis zu 500 Basenpaaren), wenn die Zelle unter oxidativem Stress steht.^[51] Dabei wurde festgestellt, dass konkret die Bildung von 8-oxo-G in den GGG-Triplets in Anwesenheit von Photosensitizern zu einer beschleunigten Verkürzung der Telomere führt (Abbildung 21).

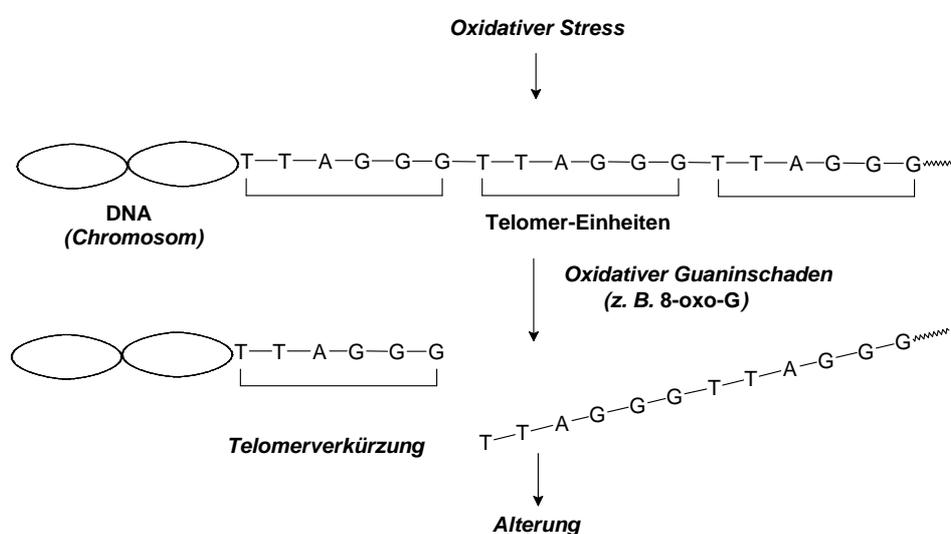


Abb. 21: Verkürzung von Telomeren durch oxidativen Stress.^[51]

Es wird daher vermutet, dass die Telomer-DNA oxidative radikalische Ladung abfängt.^[54] Durch das Verkürzen der Telomere im Laufe des Alterns eines Organismus würde diese Schutzfunktion nach und nach verringert, was zur Folge hat, dass DNA-Schäden vermehrt auftreten und typische Auswirkungen des Alterns auch phänotypisch sichtbar werden. Es existieren derzeit verschiedene Modelle für die Erkennung von DNA-Schäden durch Reparaturproteine.

Im Zusammenhang mit der Diskussion um die biologische Relevanz der DNA-übertragenen Ladungstransferprozesse wurde vorgeschlagen, dass diese bei der DNA-Erkennung eine Rolle spielen können.^[65] Bei einem derartigen Szenario würde die Intaktheit des Basenstapels durch kurze Ladungstransferprozesse zwischen zwei redoxaktiven DNA-gebundenen Proteinen überprüft. Die elektronische Schnittstelle zwischen den Proteinen und der DNA erscheint dabei als entscheidend. Hier könnten zum Beispiel interkalierte Aminosäuren oder redoxaktive Kofaktoren eine Rolle spielen.

In der Tat sind viele Reparaturenzyme bekannt, die über derartige Kofaktoren verfügen. Ein bekanntes Beispiel ist die DNA-Photolyase, die TT-Dimere durch eine photoinduzierte Elektronenübertragung von *FADH* als Kofaktor spaltet, d. h. repariert.^[66,67] Andere Beispiele sind die Endonuklease III (EndoIII) und *MutY*, die $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster als redoxaktive Kofaktoren an der Bindungsstelle zwischen dem Protein und der Nukleinsäure enthalten.^[68,69] *Barton et al.* gelang es kürzlich, den Fe-S-Cluster von *MutY* über einen DNA-übertragenen Ladungstransferprozess zu reduzieren.^[68,69] Die Redoxchemie spielt außerdem eine kritische Rolle bei der Regulation der Transkription. So ist die Transkription häufig an einen bestimmten Redoxzustand von Proteinen, wie zum Beispiel bei *SoxR*^[70] und *FNR*,^[71] gebunden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz der zahlreichen Hinweise der Zusammenhang zwischen Redoxchemie bzw. Ladungstransfer und der Erkennung von DNA-Schäden bisher noch schlecht verstanden ist.

3.1.2 Protein-DNA-Wechselwirkungen

Die meisten Studien zum Ladungstransfer durch die DNA wurden mit Duplexen in wässriger Pufferlösung durchgeführt. Unter physiologischen Bedingungen liegt DNA aber proteingebunden vor. Da bereits geringfügige Störungen der DNA-Konformation einen deutlichen Effekt auf den Ladungstransfer haben, ist es nicht verwunderlich, dass sich durch DNA-bindende Proteine die Ladungstransfereigenschaften der DNA beeinflussen lassen.^[72-75] Als Beispiel sei hier die Cytosin-Methyltransferase *HhaI* genannt: Dieses *Base-Flipping*-Enzym dreht nach der Bindung an die DNA das Ziel-Cytosin aus dem Basenstapel heraus, um es in seiner Enzymtasche zu modifizieren. Das dadurch in der DNA entstandene „Loch“ wird durch die aliphatische Seitenkette eines Glutamins gefüllt. Diese Störung der π - π -Wechselwirkungen im Basenstapel spiegelt sich in einer Abnahme der Leitfähigkeit wieder.^[75,76] Bei Verwendung einer bestimmten Mutante des Enzyms, die an der Stelle des Glutamins ein Tryptophan enthält, wird keine Abnahme der Leitfähigkeit festgestellt:

Anstatt der aliphatischen Glutamin-Seitenkette interkaliert die aromatische Seitenkette von Tryptophan in den Basenstapel und ersetzt so elektronisch die herausgedrehte Base. Die π - π -Wechselwirkungen im Basenstapel werden nicht unterbrochen (Abbildung 22).

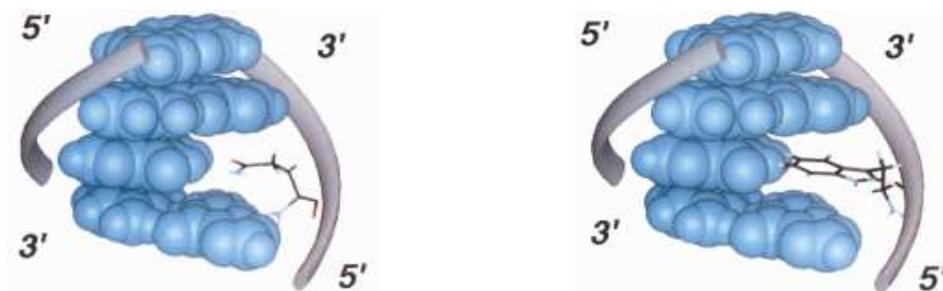


Abb. 22: Die Cytosin-Methyltransferase *HbaI* dreht das Ziel-Cytosin aus dem Basenstapel heraus. Das entstandene „Loch“ in der DNA wird durch die Aminosäure Glutamin im natürlichen Enzym (links) oder Tryptophan in der Mutante (rechts) gefüllt.

In ähnlicher Weise bewirkt das *TATA-Box-Binding Protein* (TBP) eine Minderung der Ladungstransfer-Effizienz.^[75] Es verursacht durch Insertion zweier Phenylalanin-Seitenketten zwei Knicke in der DNA und stört so die π - π -Wechselwirkungen der Basen.^[77] Im Gegensatz dazu können auch Proteine, die durch ihre Bindung die DNA-Konformation nicht signifikant verändern, den Ladungstransfer beeinflussen. Das Restriktionsenzym *R. PvuII* und der Transkriptionsfaktor *ANTP* erhöhen die Effizienz des Ladungstransfers, indem sie die Struktur an der Bindungsstelle versteifen und damit Fluktuationen der DNA-Konformation vermindern.^[75]

3.1.3 Chiptechnologie

Der Nachweis pathologischer Veränderungen am Genom hat in der medizinischen und pharmakologischen Forschung erhebliche Bedeutung. Dabei ist die Detektion von mutagenen DNA-Schäden und Basenfehlpaarungen hervorzuheben, da sie zu schwerwiegenden Folgen für die Gesundheit führen können, wie zum Beispiel Krebs oder vererbte Krankheiten.

Es hat sich unterdessen herausgestellt, dass die detaillierte und exakte Analyse von Punktmutationen (*SNP single nucleotide polymorphism*) nicht nur für die Untersuchung der Genetik einer Population und der Pharmakogenetik, sondern auch für die klinische Diagnose von Krebs sowie für das Verständnis etlicher viraler Krankheiten, wie zum Beispiel *AIDS*, entscheidend ist.^[78]

Prinzipiell kann der Nachweis von Basenfehlpaarungen (Punktmutationen) und von DNA-Schäden entweder homogen (in Lösung) oder heterogen (immobilisiert auf einem festen Träger) erfolgen. Aufgrund der einfacheren Automatisierbarkeit und der damit schnellen parallelen Analyse vieler Proben hat sich die heterogene Detektion bei der Entwicklung der DNA-Mikroarrays und DNA-Chips in den vergangenen 10 Jahren durchgesetzt.^[21,79]

Die meisten kommerziell erhältlichen Chips detektieren Hybridisierungsunterschiede. Das bedeutet, dass der Nachweis von Fehlpaarungen auf dem Prinzip basiert, dass ein Einzelstrang, der eine Mutation oder eine beschädigte DNA-Base enthält, eine niedrigere Bindungsenergie zum Sensorstrang auf dem Chip aufweist als ein vollständig intakter und komplementärer Einzelstrang. Basenfehlpaarungen und Basenschäden werden demnach durch ihre verminderte Assoziation mit dem Sensorstrang nachgewiesen. In der Regel werden diese Mikroarrays durch optische Methoden, meist durch die Messung der Fluoreszenz-Intensität ausgelesen.^[80] Dafür muss der DNA-Einzelstrang, der als Sensorstrang auf der Chip- oder Mikroarray-Oberfläche immobilisiert ist, mit einer geeigneten Fluoreszenzsonde modifiziert werden.^[81] DNA-Chips, die über Fluoreszenz ausgelesen werden, sind außergewöhnlich empfindlich gegenüber sehr geringen Substanzmengen und haben ein unteres Detektionslimit von etwa 10^7 Molekülen pro cm^2 . Der Nachteil dieses Konzepts ist seine stark limitierte Anwendbarkeit, weil sich die Bindungsenergieunterschiede zwischen fehlerhaften und korrekten Duplexen oft nur sehr geringfügig unterscheiden und darüber hinaus deutlich vom Kontext der DNA-Basensequenz abhängig sind. Das bedeutet, dass die Genauigkeit der existierenden Ausleseverfahren für diagnostische Zwecke oft nicht ausreicht.

In den letzten Jahren entstanden zahlreiche Arbeiten, bei denen Fluoreszenzsonden eingesetzt wurden, deren Emissionseigenschaften wie zum Beispiel Fluoreszenz-Intensität oder die Lage des Emissionsmaximums empfindlich auf Unterschiede in der unmittelbaren Nachbarschaft reagieren. Auf diese Weise können benachbarte DNA-Schäden oder Basenfehlpaarungen erkannt und nachgewiesen werden. In den aktuellen Arbeiten wurden zu diesem Zweck Oligonukleotide mit einer ganzen Reihe verschiedener Fluoreszenzsonden kovalent verknüpft, wie zum Beispiel Phenanthrolin,^[82] Pyren,^[83] Benzopyridopyrimidin,^[84] Aminonaphthyridin,^[85] Pterin^[86] oder Thiazolorange.^[87]

Ein Nachteil dieses Vorgehens ist, dass der Nachweis von Einzelbasenmutationen oder DNA-Schäden nur in unmittelbarer Nachbarschaft der Fluoreszenzsonde erfolgen kann. Es muss also zuvor genau bekannt sein, an welchen Stellen solche Punktmutationen gehäuft auftreten. Exakt an diesen Stellen muss dann der Marker kovalent im Einzelstrangoligonukleotid als Sensor eingebaut werden. Ein weiterer Ansatz ist die Detektion mit Hilfe des DNA-übertragenen Ladungstransfers. Es ist aus zahlreichen Studien zum DNA-übertragenen Ladungstransfer bekannt, dass diese Prozesse eine sehr hohe Empfindlichkeit sowohl gegenüber lokalen Störungen der DNA-Konformation als auch Unterbrechungen der π - π -Wechselwirkungen im Basenstapel aufweisen.^[65,88-91]

Als Alternative zu fluoreszenzbasierten Methoden in der Chipstechnologie sollen Einzelstrangoligonukleotide auf Elektrodenoberflächen immobilisiert und entweder kovalent oder alternativ nicht kovalent durch Interkalation mit einer redoxaktiven Sonde versehen werden. Ein effizienter Ladungstransfer findet nur im intakten Duplex aus Sensorstrang und intaktem Probenmaterial statt und wird elektrochemisch detektiert. Punktmutationen oder beschädigte Basen unterbrechen den Elektronentransfer und das elektrochemische Signal bleibt aus. Eine ganze Reihe sehr verschiedener DNA-Schäden und Einzelbasenmutationen können so detektiert werden (Abbildung 23).

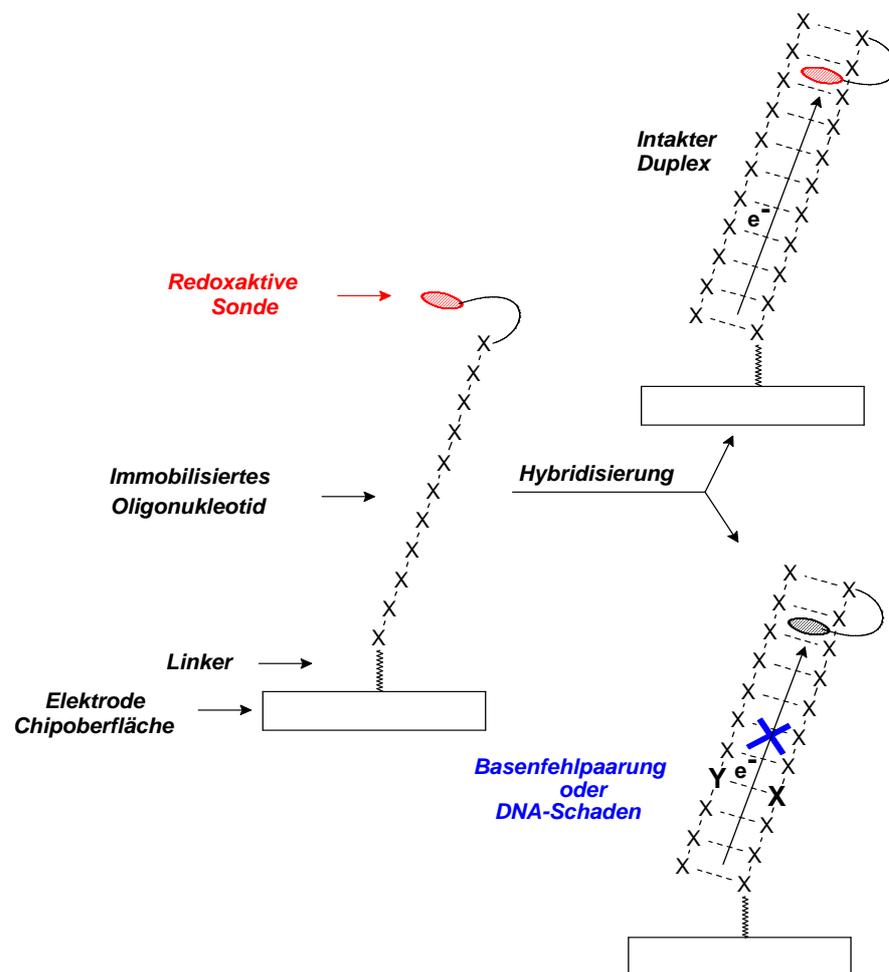


Abb. 23: Prinzipieller Aufbau von DNA-Chips mit elektrochemischem Ausleseverfahren.

Von Barton *et al.* wurde der Elektronentransfer durch an Goldelektroden gebundene DNA-Duplexe beschrieben.^[92-95] Als Redoxmarker diente mit Daunomycin (A in Abbildung 24) modifiziertes G. Untersucht wurde nun der Elektronentransfer zwischen Goldelektrode und Daunomycin.

Bereits eine einzige Basenfehlpaarung unterbrach diesen Ladungstransfer fast vollständig, während der Abstand zwischen modifiziertem Guanin und Elektrode keinen Einfluss hatte. Für Routineanwendungen ist die Modifikation einer Base jedoch umständlich. Eine Weiterentwicklung stellt daher die Verwendung von Metylenblau (D in Abbildung 24) als Redoxmarker dar. Metylenblau wird dem Assay zugegeben und interkaliert unspezifisch in die DNA-Duplexe.^[94]

Eine Modifikation der Einzelstränge entfällt somit. Pyrrolochinolinquinon (PCQ, B in Abbildung 24^[63]) und Ferrocen-markiertes Uridin (C in Abbildung 24) konnten in weiteren Experimenten ebenfalls erfolgreich als redoxaktive Verbindungen für das elektrochemische Auslesen der DNA-Chips eingesetzt werden (Abbildung 24).^[48,51-53]

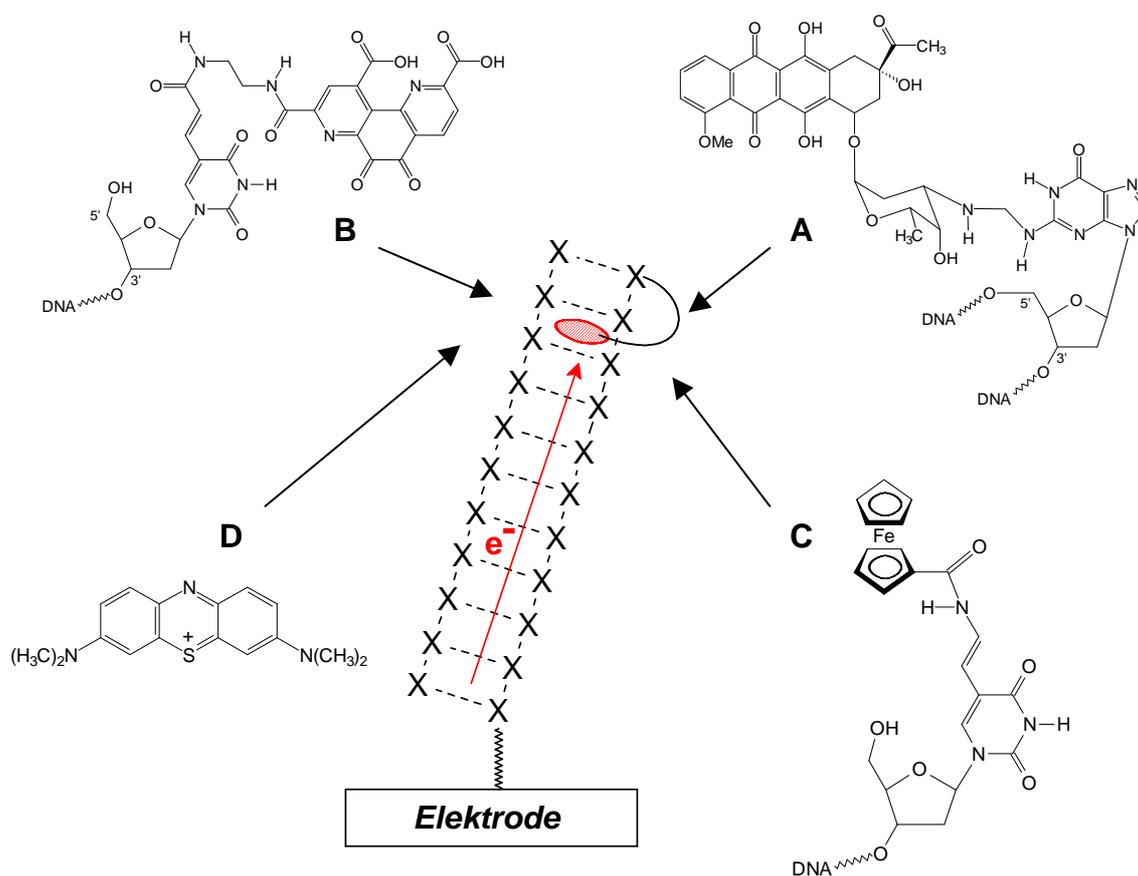


Abb. 24: Wichtige Beispiele für redoxaktive Verbindungen, die beim elektrochemischen Auslesen von DNA-Chips eingesetzt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verwendung des Elektronentransports durch DNA eine brauchbare Methode für die Entwicklung deutlich empfindlicherer DNA-Sensoren und -Chips darstellt. Einzelbasenmutationen und DNA-Schäden können unabhängig von der Sequenz der Nachbarbasen nachgewiesen werden. Das Fernziel dieser Forschung ist, die Empfindlichkeit der Detektion so weit zu erhöhen, dass auf die – momentan oft vorgeschaltete – Vervielfältigung des genetischen Materials durch die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) verzichtet werden kann. Ein Nachteil für Chips dieses Typs ist allerdings, dass in der Regel Einzelstrang-Oligonukleotide mit Alkylthiolat-Linkern verknüpft und als selbst assoziierende Monoschichten (*Self Assembled Monolayer SAM*) auf Goldelektroden aufgebracht werden müssen.

Zusammen mit den Gegensträngen werden DNA-Filme ausgebildet. Eine einheitliche und reproduzierbare Präparation, aber vor allem die eindeutige Charakterisierung dieser DNA-Filme ist sehr aufwendig und kompliziert. Außerdem ist bislang wenig über die genaue Anordnung der Duplexe in diesen Filmen, wie zum Beispiel der Winkel zur Elektrodenoberfläche, bekannt. Deshalb wird immer wieder angezweifelt, dass der Ladungstransfer tatsächlich durch den Basenstapel der DNA übertragen wird.^[93-97]

3.1.4 Nanotechnologie

Im Zuge der immer weiter fortschreitenden Miniaturisierung elektronischer und mechanischer Bauteile haben vermehrt Biomoleküle das Interesse der Materialwissenschaftler geweckt. Die Kombination verschiedenster Werkstoffeigenschaften in einem einzigen Molekül erlauben Größenordnungen im μm - und nm -Bereich für Bauteile. Die DNA ist dabei von besonderem Interesse für die Konstruktion von Bauteilen in der Nanotechnologie.^[98] Trotz ihrer einfachen Bauweise lässt sie sich durch die Spezifität ihrer *Watson-Crick*-Basenpaarungen leicht programmieren. Automatisierte Festphasensynthese macht jede denkbare Sequenz zugänglich, und die Polymerase-Ketten-Reaktion (*PCR*) liefert diese in gewünschter Menge. Zudem existiert eine Vielzahl natürlicher Werkzeuge in Form von Enzymen, die ein exaktes Maßschneiden der DNA-Stränge auf atomarer Ebene zulassen. Somit ist die Desoxyribonukleinsäure ein gut geeignetes Material für die Nanotechnologie.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von DNA-Nanopartikeln in den unterschiedlichsten Formen hergestellt (Abbildung 25). Als Beispiel seien die Arbeiten von *Seeman* genannt. Eine Möglichkeit der praktischen Anwendung hat sich bislang allerdings noch nicht geboten, die Nutzung bestimmter Bauteile für *DNA-Computing* wird diskutiert.^[99]

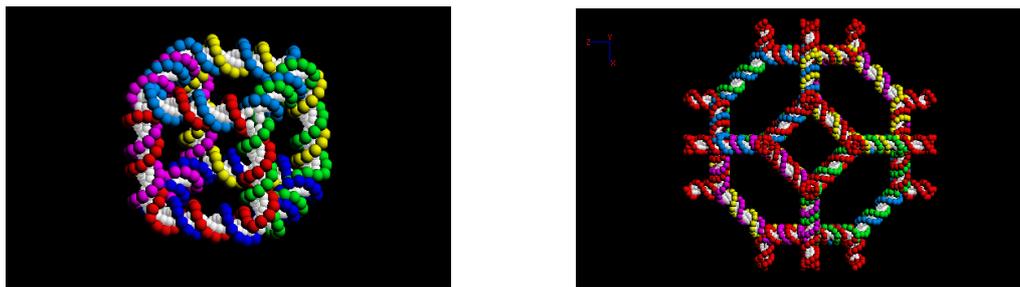


Abb. 25: Von Seeman *et al.* hergestellten DNA-Nanopartikel: links der „cube“ aus sechs DNA-Doppelsträngen aufgebaut, rechts das „truncated octahedron“, das aus 14 zyklischen Duplexen besteht.^[100-102]

Die Idee der DNA als „molekularer Draht“ greifen auch Arbeiten auf, die artifizielle DNA-Basen mit Chelatliganden – sogenannten Ligandosiden – synthetisieren. In den letzten zwei bis drei Jahren wurde eine ganze Reihe solcher Nukleosidmimetika publiziert,^[103-105] bei denen die Wasserstoffbrücken durch eine metallvermittelte Basenpaarung ersetzt wurden. Einige Beispiele sind in Abbildung 26 aufgeführt.

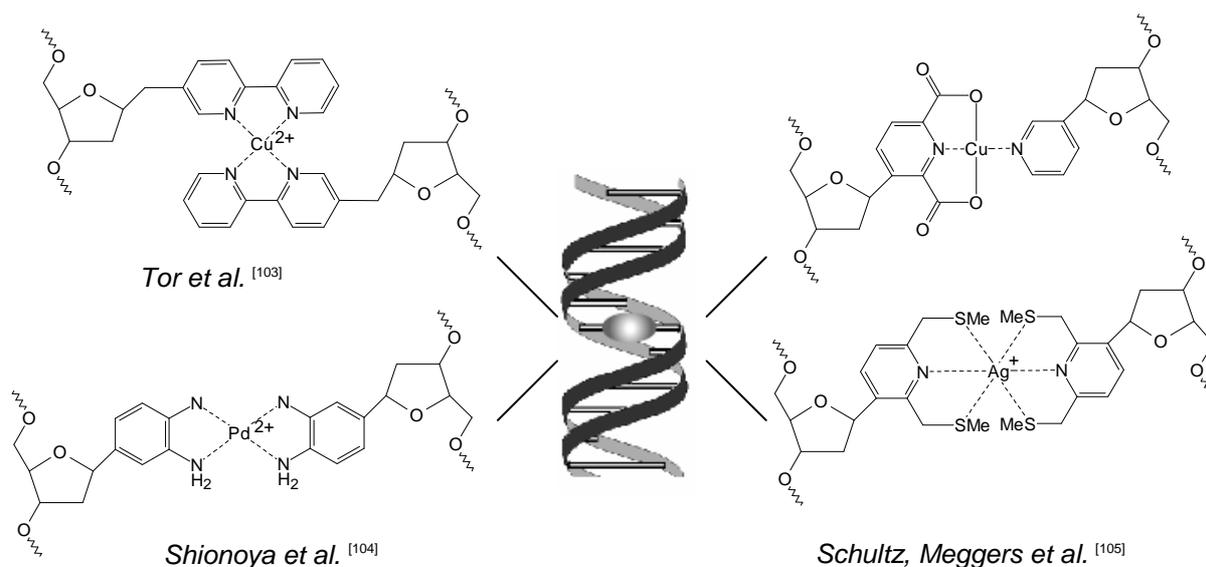


Abb. 26: Metallvermittelte Basenpaarung: von *Tor et al.*^[103], *Shionoya et al.*^[104] und *Schultz und Meggers et al.*^[105] synthetisierte Ligandoside.

Durch die Komplexierung von Metallionen im Inneren einer DNA-Doppelhelix versucht man, die Leitfähigkeit der DNA zu erhöhen, ohne dabei ihre Stabilität zu beeinträchtigen. Auf diese Weise ist die Entwicklung neuer anorganischer und bioorganischer Bauelemente in Nanogröße vorstellbar. Als Beispiel sei die metallhaltige DNA (M-DNA) von *Shionoya et al.*^[23] genannt, in der Cu(II)-Ionen im Inneren einer DNA-ähnlichen Struktur „gestapelt“ sind (Abbildung 27).

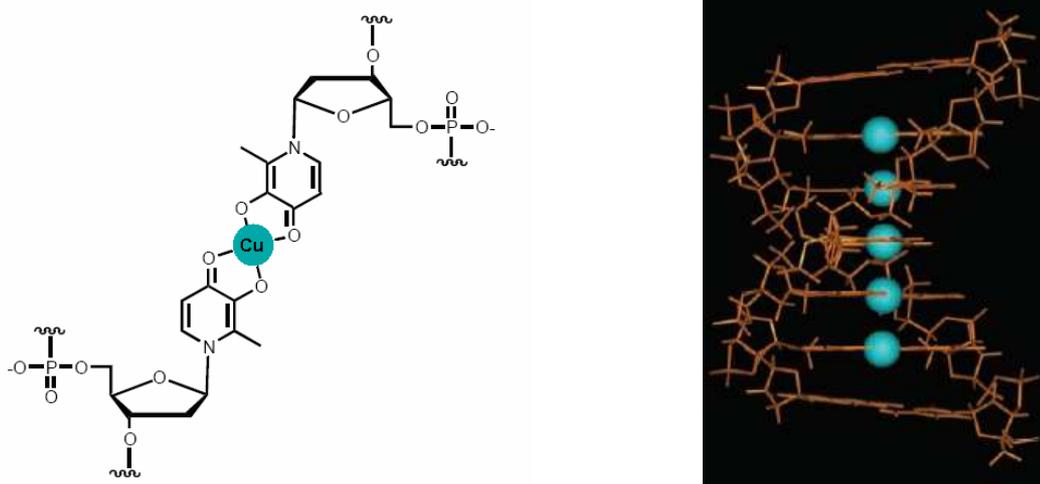


Abb. 27: Leitfähige, kupferhaltige DNA von Shionoya et al.^[23]

DNA wird derzeit hauptsächlich als Templat für die Aggregation von Nanopartikeln eingesetzt, wie zum Beispiel von *Braun et al.* bei der „Beschichtung“ von DNA mit Silberionen.^[106] Die Leitfähigkeit des Biopolymers wird dabei bislang nicht ausgenutzt. Mit den Erkenntnissen zu den Ladungstransfereigenschaften ist es jedoch denkbar, DNA direkt als halbleitende Verbindung zweier elektrischer Pole, sozusagen als „Draht“ einzusetzen.^[107] Durch elektrostatisches Einfangen gelingt es, ein einzelnes Oligonukleotid zwischen zwei Elektroden zu fixieren, um damit Strom-Spannungskurven zu ermitteln. Obwohl die Versuchsanordnung keinerlei Beweis für einen Elektronentransport durch die Nukleobasen der DNA führen kann, stellt sie doch eindrucksvoll die Größenordnungen dar, in der derzeit solche Forschung und Technik betrieben werden können (Abbildung 28).

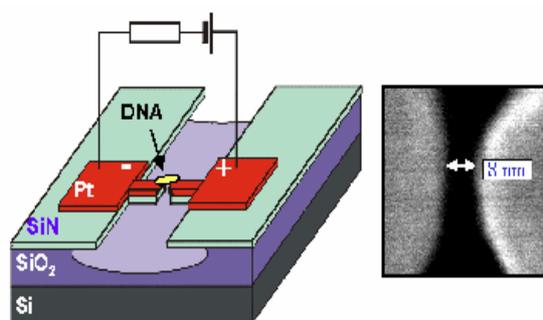


Abb. 28: Zwischen zwei Elektroden gefangenes DNA-Molekül, der Abstand der beiden Elektroden beträgt 8 nm.^[107]

Es gibt Überlegungen, Schalter aus DNA zu entwerfen, die den reversiblen Übergang von B- in Z-DNA ausnutzen und somit elektrische und mechanische Energie gleichermaßen übertragen können.

Im hier vorgestellten Beispiel (Abbildung 29) sind an zwei Punkten der Oligodesoxynukleotide Fluoreszenzfarbstoffe angebracht, die ihr optisches Verhalten mit dem Abstand voneinander ändern.^[25]

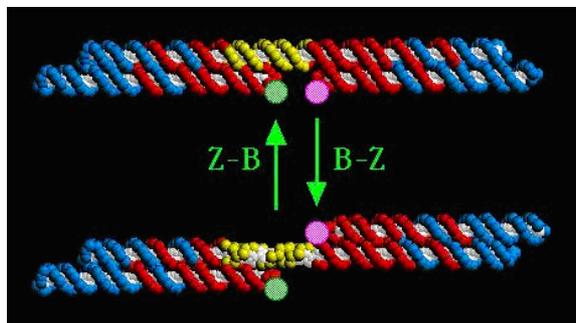


Abb. 29: Modell eines DNA-Bauteils aus ineinander verdrehten Strängen, das die Konformationsumwandlung von der B- in Z-Form nutzt. Der Konformationswechsel wird durch Zugabe bzw. Entfernen von Hexaamincobalt(III)chlorid zur DNA-Lösung erreicht.^[25]

Die Erbsubstanz DNA ist ein unglaublich kompakter Datenträger: In einem Gramm DNA ließe sich die Information von einer Billion CDs unterbringen. Synthetisierte DNA-Moleküle können nicht nur Information speichern: Dank den Fortschritten der Gentechnik lassen sich DNA-Moleküle auch zum Berechnen von mathematischen Problemen einsetzen.^[108-110]

Im Jahre 1994 gelang es *Adleman*,^[27] erstmals in einem Experiment Molekularbiologie zu einer Berechnung einzusetzen, indem er ein mathematisches Problem in ein DNA-Molekül codierte. Seither wurde in vielen Arbeiten untersucht, inwieweit sich molekularbiologische Methoden dazu verwenden lassen.^[108-110]

DNA-Computer könnten mit riesigen Datenmengen parallel rechnen. *Adleman* konnte zeigen, dass sich das „Problem der Hamiltonschen Wege“ auf DNA übersetzen lässt und damit berechnet werden kann. Die notwendigen molekularbiologische Verfahren (DNA-Polymerasen, Ligasen, Nukleasen, Gel-Elektrophorese) zur praktischen Umsetzung sind vorhanden.

Das theoretische Potential (Rechengeschwindigkeit, Arbeitsspeicher, Haltbarkeit der Daten) ist dem der Siliziumtechnologie überlegen. Der Einsatz scheint sich jedoch nur zu lohnen, wenn eine zu lösende Aufgabe mit herkömmlichen Computern enorm lange braucht. Ein Beispiel dafür könnten Verschlüsselungsalgorithmen sein.^[27,108-110]

3.2 Einteilung der Ladungstransferprozesse in DNA

Zu den oft widersprüchlichen experimentellen Ergebnissen des Ladungstransportes in DNA wurden verschiedene Theorien formuliert. Bereits die ersten theoretischen Modelle sagen voraus, dass Elektronen mit Geschwindigkeiten im ps-Bereich von Base zu Base springen.^[111] Sowohl die Idee der DNA als „molekularer Draht“^[26,112] als auch die Vorstellung von DNA als Isolator^[113] wurden durch theoretische Arbeiten unterstützt. In neueren Arbeiten werden zusätzlich die Beschreibung von DNA als Halbleiter^{22]} und als Supraleiter^[114] vorgestellt.

Inzwischen ist klar, dass vor allem die Lage der Potentiale von Donor und Akzeptor im Vergleich zur dazwischen liegenden DNA-Brücke entscheidend für den Mechanismus ist.^[115] Prinzipiell können Ladungstransferprozesse als reduktiver Lochtransfer oder oxidativer Elektronentransfer interpretiert werden, wie schon in Kapitel 2 vorgestellt. Sowohl der oxidative Lochtransfer als auch der reduktive Elektronentransfer wird in den meisten Untersuchungen photochemisch durch Anregung eines geeigneten Chromophors ausgelöst.

A. Oxidativer Lochtransfer und -transport

Nach einer Photoanregung des Chromophors wird ein Elektron der DNA oder des Akzeptors (A) auf ein Chromophor (D^*) übertragen. Die Bewegung der dadurch erzeugten positiven radikalischen Ladung kann formal als oxidativer Lochtransport durch die DNA interpretiert werden.

B. Reduktiver Elektronentransfer und -transport

In diesem Fall wird ein Elektron des angeregten Chromophors (D^*) in die DNA injiziert oder auf den Akzeptor übertragen, die DNA wird somit reduziert. Diese Elektroneninjektion ist der Ausgangspunkt für einen reduktiven Elektronentransport durch die DNA.

Das Auftreten von reduktivem Elektronentransfer oder oxidativem Lochtransfer hängt von der relativen energetischen Lage der Orbitale ab. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 30 veranschaulicht. Der oxidative Lochtransfer erfolgt *HOMO*-kontrolliert, der reduktive Elektronentransfer dagegen *LUMO*-kontrolliert. Damit wird deutlich, dass diese Unterscheidung nicht nur ein Formalismus ist, der die unterschiedliche Bewegungsrichtung des Elektrons berücksichtigt.

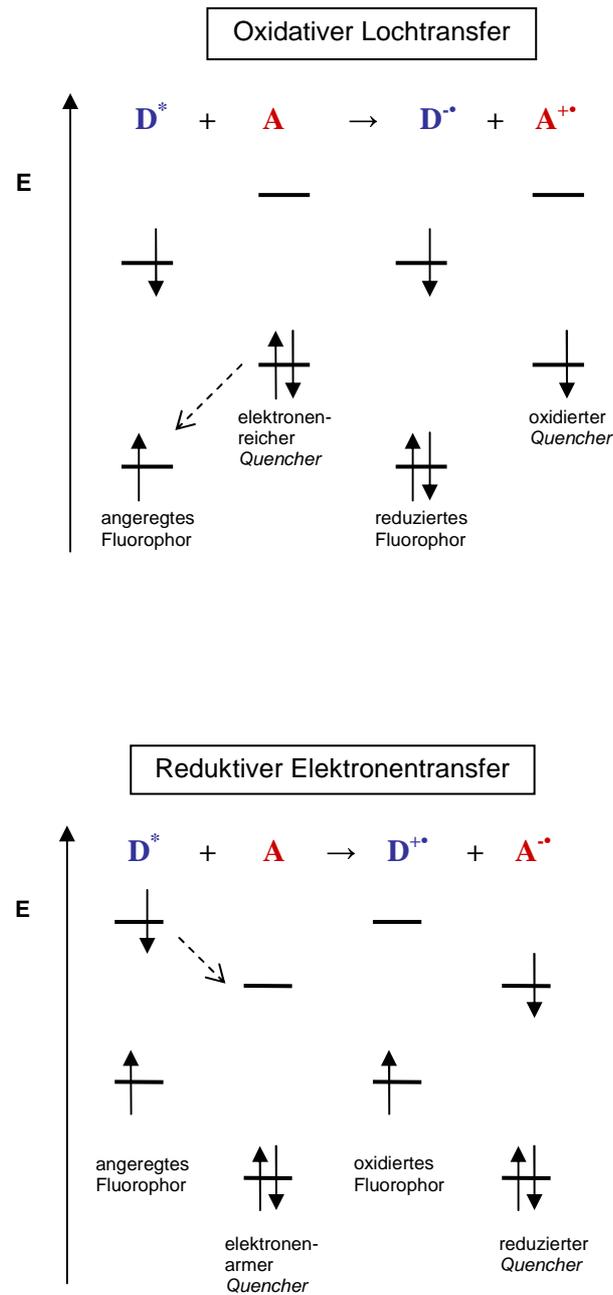


Abb. 30: Oben: beim oxidativen Lochtransfer wird ein Elektron aus dem HOMO des Ladungsakzeptors (A) in das HOMO des Chromophors (D) verschoben. Unten: beim reduktiven Elektronentransfer wird ein Elektron aus dem LUMO von D in das LUMO von A überführt.

3.2.1 Oxidativer Ladungstransfer und -transport

Der Superaustausch- und der *Hopping*-Mechanismus stellen die beiden Hauptmechanismen dar, die geeignet sind, um oxidative Lochtransferprozesse in der DNA zu beschreiben. Entscheidend für das Auftreten des jeweiligen Mechanismus ist die relative Lage der Energieniveaus von D^* und A zur DNA-Brücke.

3.2.1.1 Superaustausch-Mechanismus

Beim Ladungstransfer über den Superaustausch-Mechanismus handelt es sich um einen Tunnelprozess zwischen Akzeptor A und Donor D (Abbildung 31).

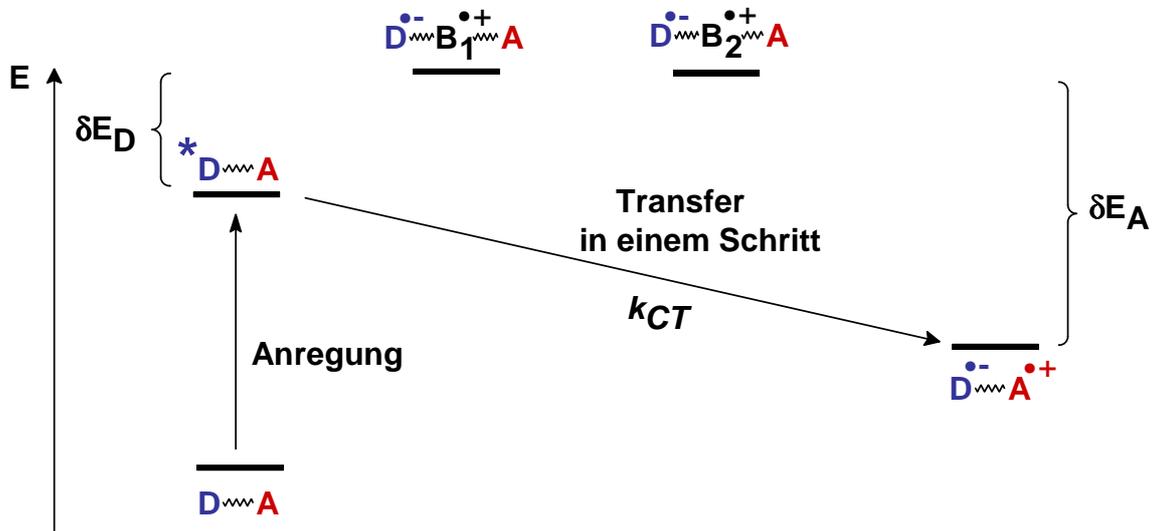


Abb. 31: Schematische Darstellung der relativen Lage der beteiligten elektronischen Zustände beim Superaustausch-Mechanismus (D = Donor, A = Akzeptor, B = Base).

Zu dieser Form des Ladungstrfers kommt es, wenn der angeregte Zustand des Donors D^* ein geringeres Energieniveau als die DNA-Brücke besitzt.^[116,117] Die wichtigste Konsequenz, die sich daraus ergibt, ist, dass die Ladung zu keinem Zeitpunkt auf einer Base der DNA-Brücke lokalisiert ist: Spektroskopisch beobachtbare Radikale der Nucleobasen als Intermediate des Ladungstrfers sind somit ausgeschlossen. Lediglich die Produktradikale nach erfolgter Ladungstrennung sind prinzipiell beobachtbar.

Die Wahrscheinlichkeit für den Tunnelvorgang einer Ladung ist von der Höhe und Länge der Barriere, in diesem Fall der DNA-Brücke, bestimmt. Eine exponentielle Abnahme der Übertragungsgeschwindigkeit mit dem Abstand ist dafür charakteristisch. Diese Distanzabhängigkeit wird nach der klassischen Elektronentransfertheorie von Marcus^[5] über folgende vereinfachte Beziehung in Gleichung 17^[36,118] beschrieben (wie schon in Kapitel 2 ausführlich behandelt):

$$k_{ET} \sim e^{-\beta \cdot R}$$

Gl. 17: Distanzabhängigkeit nach Marcus : k_{ET} = Ladungstrferrate [s^{-1}], R = Abstand zwischen Donor und Akzeptor [\AA], β = Parameter für die Distanzabhängigkeit [\AA^{-1}].

Der Faktor β ist ein für jedes Medium charakteristischer Wert und dient als Vergleichswert für die Distanzabhängigkeit unterschiedlicher Ladungstransfersysteme. Die Leitfähigkeit eines Mediums ist umso besser, je kleiner β ist. Für Proteine wurden typische β -Werte von 1.0 \AA^{-1} bis zu 1.5 \AA^{-1} erhalten.^[113] Für DNA experimentell ermittelte β -Werte weisen dagegen eine weite Streuung von 0.1 \AA^{-1} bis 1.4 \AA^{-1} auf.^[119] Der Wert von 1.4 \AA^{-1} ^[120] hat sich allerdings als Fehlinterpretation herausgestellt.^[121]

Typische β -Werte für einen DNA-übertragenen Ladungstransfer nach dem Superaustausch-Mechanismus liegen in der Größenordnung von 0.6 \AA^{-1} - 0.8 \AA^{-1} . In einigen Experimenten wurden sehr kleine β -Werte ($\leq 0.1 \text{ \AA}^{-1}$) gemessen, die auf eine nur wenig ausgeprägte Distanzabhängigkeit schließen lassen. Dafür wurde ein alternatives mechanistisches Modell, der Loch-*Hopping*-Mechanismus entwickelt. Somit ist der Ladungstransfer in DNA mit dem in Proteinen vergleichbar, was erstaunt angesichts der regelmäßigen Struktur der DNA mit gestapelten und elektronisch wechselwirkenden DNA-Basen.

3.2.1.2 Loch-*Hopping*-Mechanismus

Beim *Hopping*-Mechanismus wird die Ladung in mehreren Schritten vom Donor D^* zum Akzeptor A transportiert. Entscheidend hierfür ist wiederum die relative Lage der Energieniveaus von Donor, Akzeptor und DNA-Brücke: Kann der niedrigste Schwingungszustand des angeregten Donors in Resonanz mit einem der vielen stark entarteten Schwingungszustände der DNA treten, so ist mit einem Ladungstransfer durch *Hopping* zu rechnen. Die Ladung wird dabei in mehreren *Hopping*-Schritten durch die DNA-Brücke transportiert. Im Gegensatz zum Superaustausch-Mechanismus können prinzipiell Radikalkationen der Nukleobasen als Intermediate zwischen den einzelnen *Hopping*-Schritten nachgewiesen werden (Abbildung 32).

Als intermediärer Ladungsträger tritt im Falle des oxidativen Lochtransfers das Guanin-Radikalkation auf, da Guanin das niedrigste Oxidationspotential der Nukleobasen aufweist (1.3 V bzgl. NWE).^[122] Auch konnten in gelelektrophoretischen Experimenten zum DNA-Ladungstransfer in der Regel nur Oxidationsprodukte des Guanins detektiert werden. In neueren Ansätzen wird bei guaninarmen Sequenzen auch Adenin als intermediärer Ladungsträger in Betracht gezogen,^[123,124] da Adenin ein vergleichbares Oxidationspotential hat (1.4 V bzgl. NWE).^[122]

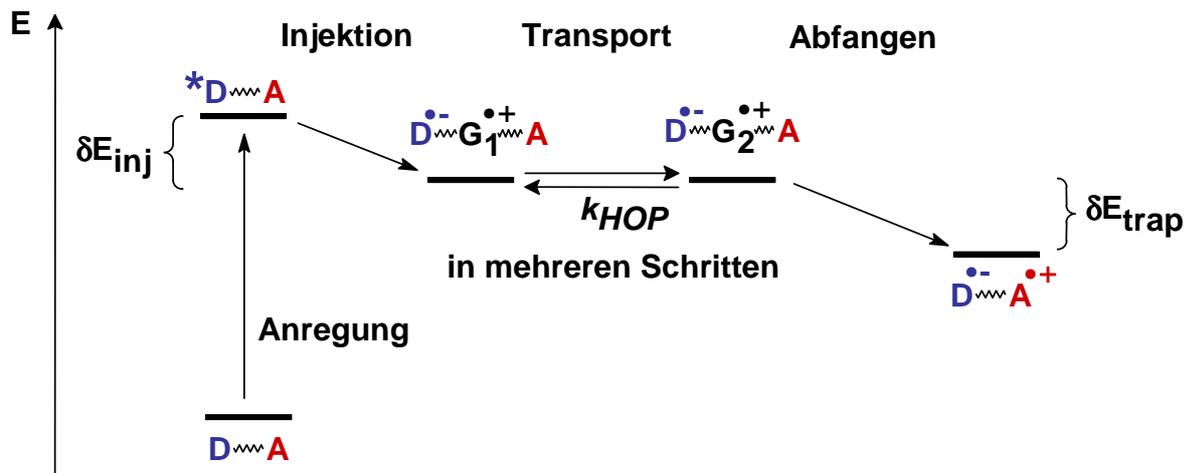


Abb. 32: Schematische Darstellung der relativen Lage der beteiligten elektronischen Zustände beim Hopping-Mechanismus. (D = Donor, A = Akzeptor, B = Base).

Nach jedem *Hopping*-Schritt, der für sich alleine gesehen einen Tunnelprozess durch AT-Basenpaare darstellt, ist die Ladung auf einer Guanin-Base lokalisiert. Die Geschwindigkeit wird nicht durch die Gesamtdistanz zwischen D und A sondern durch die Zahl der *Hopping*-Schritte bestimmt. Geschwindigkeitsbestimmend ist der längste *Hopping*-Schritt. Dieser Zusammenhang lässt sich durch Gleichung 18 beschreiben:^[118,125,126]

$$k_{ET} = P \times N^\eta$$

Gl. 18: Bestimmung der Rate nach dem Hopping-Mechanismus. k_{ET} = Ladungstransferrate, P = Wahrscheinlichkeit eines Hopping-Schrittes, N = Gesamtzahl der Hopping-Schritte, η = empirische Konstante ($1 \leq \eta \leq 2$).

Lewis et al. konnte die Rate für einen einzelnen GG-*Hopping*-Schritt zu $k_{HOP} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ ermitteln.^[49] Ein weiteres Modell ist der Phononen-unterstützte Polaron-*Hopping*-Mechanismus. Dieses Modell für Radikalkationen ist von der Erklärung des Ladungstransports in leitenden Polymeren abgeleitet und berücksichtigt, dass Ladungen in DNA eine lokale Änderung der Struktur (sog. Polarone) induzieren. Im Falle des Lochtransfers werden Radikalkationen der einzelnen Nukleobasen durch eine räumliche Annäherung der benachbarten Nukleobasen stabilisiert.^[127-129] Dieser Mechanismus stellt kein abschließendes Modell dar, sondern ist eine diskutierte Modifizierung des Loch-*Hopping*-Mechanismus und wurde auch ausführlich in theoretischen Arbeiten belegt.^[130]

3.2.1.3 Experimente zum oxidativen Ladungstransfer und -transport

Wegen der biologischen Relevanz oxidativer DNA-Schäden richteten die meisten Arbeitsgruppen ihre Aufmerksamkeit auf den oxidativen Ladungstransfer. Ziel der meisten Experimente war die Erzeugung einer positiven Ladung in der DNA sowie die Untersuchung der Bewegung dieser radikalischen Ladung. Eine Einteilung dieser Experimente kann in spektroskopische und biochemische Untersuchungen erfolgen. Die im Hinblick auf die vorliegende Arbeit bedeutsamen Experimente zum oxidativen (und reduktiven) Ladungstransfer mit Ethidium sind in Kapitel 3.2 detailliert besprochen.

1. Spektroskopische Methoden

Die ersten Studien zum oxidativen Ladungstransfer wurden mit organischen und anorganischen Interkalatoren durchgeführt, die nicht kovalent an die Oligonukleotide gebunden waren.^[31-33,131-134] Der Nachteil dieser Modellsysteme liegt darin, dass zum einem die Entfernung zwischen den Redoxpartnern unbekannt ist und zum anderen eine Überlagerung mehrerer Interkalatoren innerhalb der DNA nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Die sich aus diesen Experimenten ergebenden Befunde sind somit wenig aussagekräftig und schlecht untereinander vergleichbar. Die entscheidende Verbesserung brachte die Verwendung kovalent an die Oligonukleotide gebundener Interkalatoren. Mit diesen Systemen wurde es möglich, systematisch durch spektroskopische Untersuchungen die Abhängigkeit des Ladungstransfers vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor und von der Basensequenz zu ermitteln.

Aus diesen Experimenten zog man folgende wichtige Schlussfolgerungen (Tabelle 1):

- 1) Der Lochtransfer über den Superaustausch-Mechanismus ist auf kurze Distanzen limitiert ($<10 \text{ \AA}$).
- 2) Der Ladungstransfer über kurze Distanzen erfolgt extrem schnell ($k_{ET} = 10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$).
- 3) Der typische β -Wert für den Ladungstransfer in DNA liegt zwischen 0.6 \AA^{-1} und 0.8 \AA^{-1} .
- 4) Die Interkalation von Donor und Akzeptor ist Voraussetzung für einen schnellen und effizienten Ladungstransfer.

Tab. 1: Übersicht über die spektroskopischen Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer

Ladungsdonor / Akzeptor	kovalent gebunden	β [Å ⁻¹]	k_{ET} [s ⁻¹]	Arbeitsgruppe	Jahr
Ru(II) / Rh(III) Komplexe	ja	0.2	10 ⁹	Barton ^[131]	1993
Ru(II) / Rh(III) Komplexe	ja	1.0-1.5	10 ⁶	Meade ^[132]	1995
St / G	ja	0.64	10 ⁸ -10 ¹²	Lewis ^[133]	1997
E / Rh(III) Komplex	ja	-	10 ¹⁰	Barton ^[134]	1997
Ac / G	ja	1.4	10 ⁵ -10 ¹⁰	Tanaka ^[120]	1998
E / Z	ja	-	10 ¹²	Barton/Zewail ^[30]	1999
N / A	ja	-	10 ⁹	Lewis ^[135]	1999
Ap / G	ja	0.1-1.0	10 ⁹ -10 ¹⁰	Barton ^[136]	1999
Ap / G	ja	0.75	10 ⁶ -10 ⁷	Shafirovich ^[137]	2000
Ap / G	ja	0.6	10 ⁹ -10 ¹¹	Barton/Zewail ^[138]	2000
Ac / G, Ac / Z	ja	-	10 ⁷ -10 ¹²	Michel-Beyerle ^[139]	2001
Ru(II)Komplex / In	ja	-	≥10 ⁷	Barton ^[140]	2002

Abkürzungen: A = Adenin, Ac = Acridin, Ap = 2-Aminopurin, E = Ethidium, G = Guanin, In = 4-Methylindol, N = Naphthalin, St = Stilbendicarboxamid, Z = 7-Deazaguanin.

2. Biochemische Methoden

Die Untersuchung des oxidativen Ladungstransports kann am einfachsten über Gelelektrophorese erfolgen. Als gängige Photooxidantien wurden dazu Metallkomplexe wie Rh(III)- und Rh(II)-Komplexe oder organische Interkalatoren wie Ethidium- und Anthrachinon-Derivate, mit Cyanobenzochinon modifiziertes Uridin sowie mit einer photoreaktiven Gruppe versehene 2'-Desoxyribonukleoside verwendet. Diese Systeme weisen große Unterschiede in Hinblick auf Struktureigenschaften, Redoxpotentiale und Anregungswellenlängen auf. Aus diesem Grund ist der Vergleich der gewonnenen Ergebnisse nur bedingt möglich (Abbildung 33).

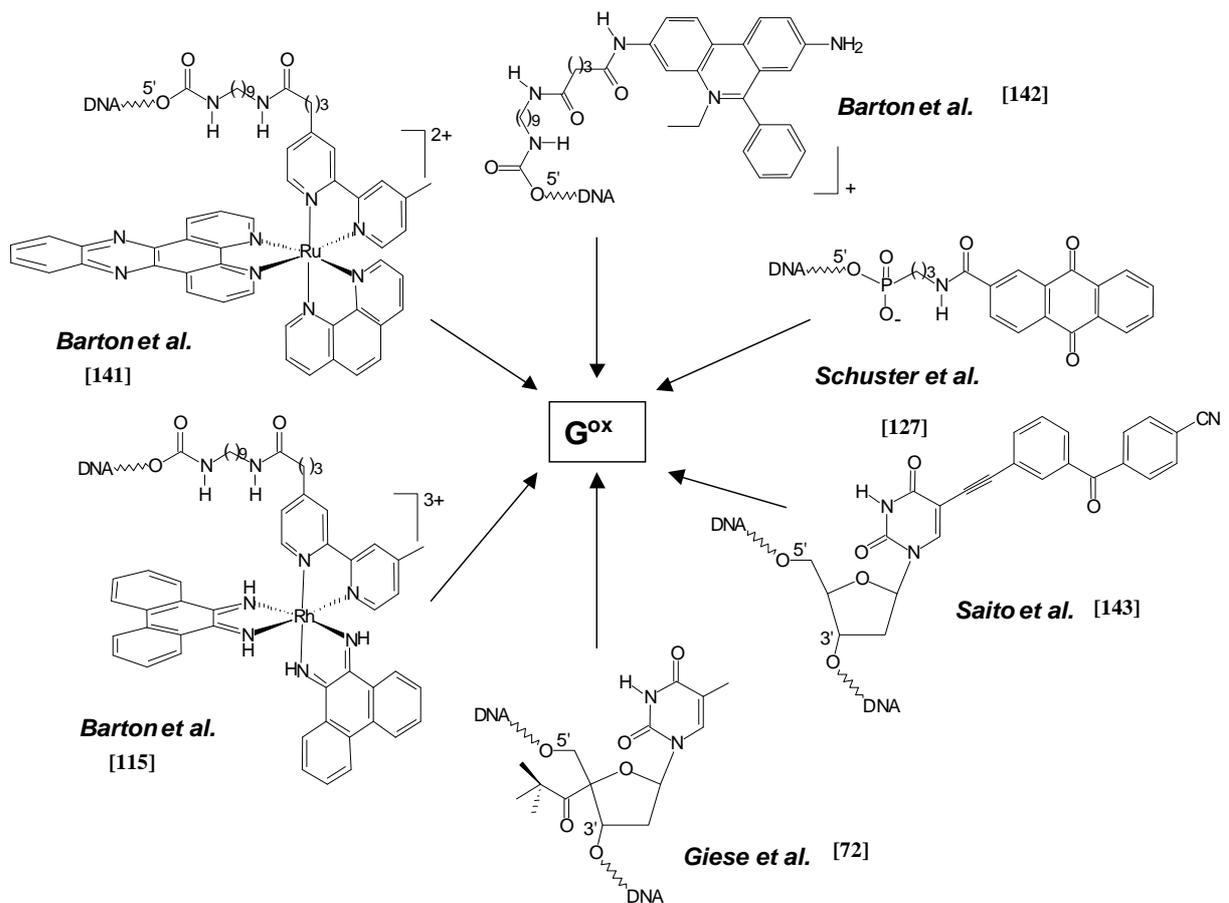


Abb. 33: Beispiele von Photooxidationsmitteln, die zur Untersuchung des Lochtransportes in DNA verwendet wurden: DNA-Assays von Barton et al.,^[115,141,142] Schuster et al.,^[127] Giese et al.^[72] und Saito et al.^[143]

3.2.2 Reduktiver Ladungstransfer und -transport

3.2.2.1 Reduzierbarkeit der DNA-Basen

Im Gegensatz zum oxidativen Ladungstransfer beschäftigen sich bis vor wenigen Jahren nur wenige Untersuchungen mit dem reduktiven Elektronentransfer. Alle vorhandenen Informationen beruhen auf γ -Puls-Radiolysestudien. Erst in den letzten drei Jahren wurden neue DNA-Systeme publiziert, mit denen die systematische Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers bzw. des Transportes von Überschusselektronen in DNA möglich wurde. Allerdings existiert bis jetzt noch kein geeignetes Donor-Akzeptor-System für zeitaufgelöste Messungen.

Als Trend für die Reduzierbarkeit der DNA-Basen hat sich trotz der Ungenauigkeit der irreversiblen, experimentell bestimmten Potentiale die Reihenfolge $T, U \approx C > A > G$ etabliert.^[144,145] Dieser Trend konnte auch durch theoretische Betrachtungen bestätigt werden.^[146,147] Detailliertere Berechnungen der Elektronenaffinitäten der DNA-Basen in Oligonukleotiden in Abhängigkeit von der Basensequenz deuten darauf hin, dass 5'-XCY-3' und 5'-XTY-3' die stärksten Elektronenakzeptoren sind, wenn X und Y die Pyrimidinbasen C oder T darstellen.^[148] Sowohl aus theoretischer als auch aus experimenteller Sicht sind demnach T und C die am leichtesten reduzierbaren Basen mit ähnlichen Reduktionspotentialen.

Zur Beschreibung des reduktiven Elektronentransfers wurden die etablierten Mechanismen des Lochtransfers auf das Problem des reduktiven Elektronentransfers und der Wanderung von Überschusselektronen übertragen. Dementsprechend wurde für den Elektronentransfer über große Distanzen ($> 10 \text{ \AA}$) ein Elektronen-*Hopping*-Mechanismus formuliert, bei dem alle Basenpaare involviert sind, weil beide Pyrimidin-Radikalanionen $C^{\cdot-}$ und $T^{\cdot-}$ als potentielle intermediäre Ladungsträger in Frage kommen.^[149] Die beiden Radikalanionen $C^{\cdot-}$ und $T^{\cdot-}$ weisen jedoch eine stark unterschiedliche Basizität auf. Somit könnte eine Protonierung von $C^{\cdot-}$ und $T^{\cdot-}$ durch die komplementäre DNA-Base oder durch Wassermoleküle aus der Umgebung das Elektronen-*Hopping* behindern.

3.2.2.2 Experimente zum reduktiven Ladungstransfer- und transport

Die im Hinblick auf diese Arbeit wichtigen Untersuchungen an Pyren-modifizierten Nukleotiden sind in Kapitel 3.2 detailliert beschrieben.

1. γ -Puls-Radiolyse-Studien

Bis 2001 stammten die meisten Erkenntnisse über den reduktiven Elektronentransfer in DNA aus γ -Puls-Radiolysestudien die vor allem von *Sevilla et al.*^[45,73,74,150,151] und von *Anderson et al.*^[152] durchgeführt wurden. Viele dieser Studien wurden in gefrorenem Eis oder glasartigen, wässrigen LiBr-Lösungen mit Duplex-DNA durchgeführt. Als Elektronenakzeptor dienten Interkalatoren wie z. B. Ethidium, Acridine und Chinoline oder in den DNA-Strang eingebaute Bromderivate der Nukleobasen (5-Brom-6-hydroxy-5,6-dihydrothymin, 8-Bromguanin, 5-Bromcytosin). Wird die so präparierte DNA einer γ -Bestrahlung ausgesetzt, werden solvatisierte Elektronen erzeugt. Diese sind in der Lage DNA zu reduzieren und können somit einen Ladungstransfer induzieren. Die Beobachtung des Ladungstransfers zwischen primär gebildeten Nukleobasen-Radikalanionen und Akzeptor erfolgte hauptsächlich über ESR-Spektroskopie.

Der größte Nachteil dieses experimentellen Aufbaus besteht darin, dass sowohl die Elektroneninjektion als auch das Abfangen des Elektrons nicht an definierten Stellen erfolgen kann. Trotzdem können einige bemerkenswerte und grundlegende Aussagen und Vorschläge aus diesen Studien gezogen werden.

Unterhalb von 77 K erfolgt der Elektronentransfer in DNA über den Superaustausch-Mechanismus. Der temperaturunabhängige Durchschnittswert der Distanzabhängigkeit der Elektronentransferrate wurde zu $\beta = 0.9 \text{ \AA}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert zeigt deutlich, dass DNA bei 77 K kein besonders effektives Medium für den Elektronentransfer darstellt. Oberhalb von 130 K wurde in D_2O die irreversible Deuterierung von T detektiert, die in Konkurrenz zum Elektronentunnelprozess auftritt und daher als irreversible Abfangstelle für das Elektron fungiert. Oberhalb von 170 K ändert sich der Elektronentransfer-Mechanismus hin zu einem thermisch aktivierten Prozess, bei dem auch $C^{\cdot-}$ als intermediärer Elektronenträger auftritt (Abbildung 34).

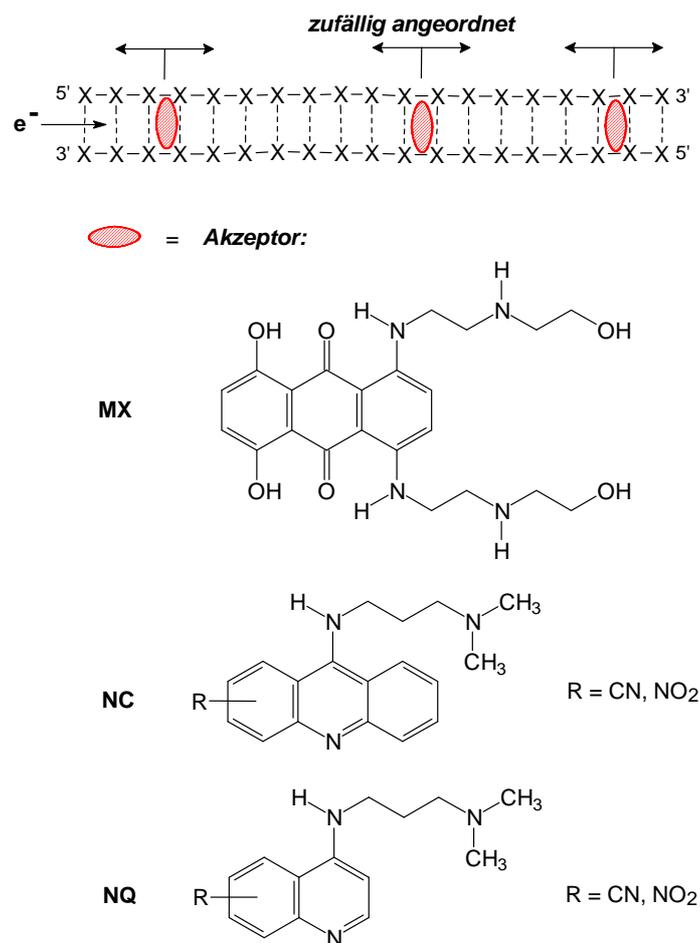


Abb. 34: Elektronenakzeptoren, die bei den γ -Puls-Radiolyse-Studien verwendet wurden; MX = Mitoxandron, NC = Nitroacridin, NQ = Nitrochinolin.

2. Flavine als Elektronen-Donor

In dem von *Carell et al.*^[153,154] verwendeten System dient ein *open-backbone* Thymin-Dimer (TT) als Elektronenakzeptor und Flavin (FI), welches als artifizielle Nukleobase in DNA-Duplexe eingebaut wurde, als Ladungsdonor. In reduzierter und deprotonierter Form ist Flavin in der Lage, Thymin-Dimere aus der Distanz zu spalten. Der damit einhergehende Strangbruch kann durch HPLC analysiert und quantifiziert werden. Der Ladungstransfer ist somit chemisch analysierbar (Abbildung 35).

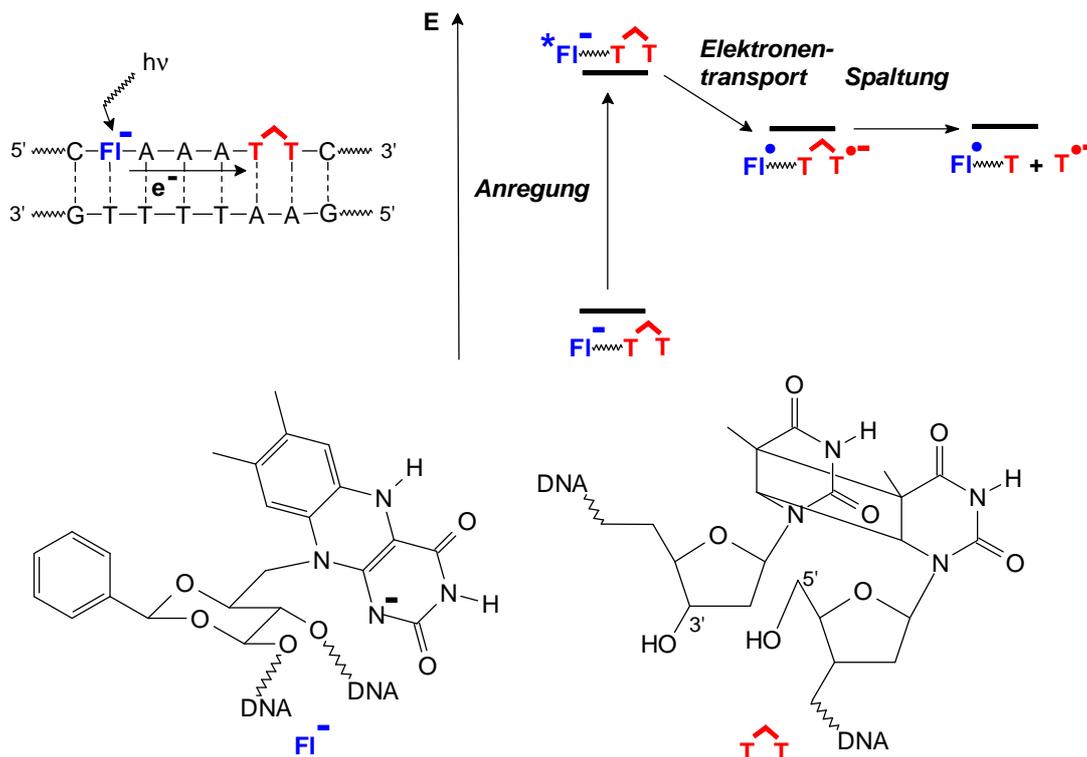


Abb. 35: Spaltung eines Thymin-Dimers durch ein Flavin-Nukleosid als Folge eines Ladungstransfers.^[153-157]

Die Spaltung des *open-backbone* TT-Dimers kann als chemische Folgereaktion eines reduktiven Elektronentransfers durch den DNA-Basenstapel interpretiert werden. Diese Interpretation stützt sich im Wesentlichen auf die bekannten Redoxeigenschaften des Flavin-Interkalators in reduziertem und deprotoniertem Zustand und auf die Beobachtung, dass eine Basensequenzabhängigkeit, die typisch für ein Loch-*Hopping* wäre, nicht auftrat. Anhand der beobachteten Ausbeuten der TT-Dimerspaltung kann auf die unterschiedliche Effizienz des Elektronentransfers geschlossen werden. Es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der TT-Dimerspaltung nicht von der Richtung und nur sehr schwach von der Distanz zum Flavinderivat abhängt. Das weist darauf hin, dass ein thermisch aktivierter Elektronen-*Hopping*-Prozess vorliegt, was wiederum in Einklang mit den zuvor diskutierten Ergebnissen der Radiolyse-Studien steht.^[158]

3. Stilbendiether als Elektronen-Donor

Die Dynamik der Elektroneninjektion mittels Stilbendiethern in DNA-Hairpins wurde vor kurzem von *Lewis et al.*^[159] untersucht. In dieser Studie dient der Stilbendiether (Sd) als Elektronendonator und die DNA-Basen T und C als Elektronenakzeptoren. Die Dynamik der Elektroneninjektion wurde mit Hilfe der ps-zeitaufgelösten Laserspektroskopie gemessen. Es ist bemerkenswert, dass die Elektroneninjektionsraten größer sind, wenn T als Elektronenakzeptor verwendet wird und kleiner sind, wenn C verwendet wird. Das deutet darauf hin, dass das Reduktionspotential von T etwas niedriger liegen muss als das von C (Abbildung 36).

Lewis et al. stellten außerdem fest, dass die Elektroneninjektionsraten geringe Unterschiede aufweisen, wenn C als Elektronenakzeptor in unterschiedlichen Basenpaaren verwendet wird. Das deutet darauf hin, dass sich das Reduktionspotential bei unterschiedlichen Wasserstoffbrücken geringfügig ändert. Protonen-gekoppelte ET-Prozesse (PCET) sind somit wichtig bei der Beschreibung des reduktiven Elektronentransfers in DNA.

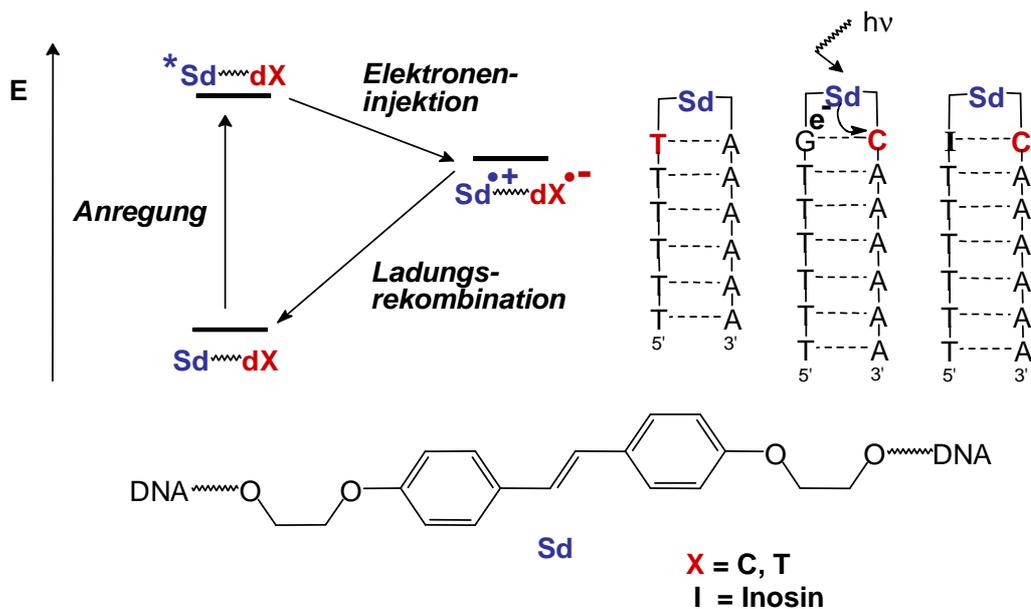


Abb. 36: Stilbendiether-Assay^[159,160]

4. TMDN als Elektronendonator

Rokita et al. nutzen das sehr niedrig liegende Reduktionspotential (-2.8 V) des angeregten Zustands von *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,5-diaminonaphthalin (TMDN). Durch eine optische Anregung bei 325 nm wird der Chromophor selektiv angeregt. Dabei wird BrdU als Akzeptor eingesetzt. Der Nachweis des Uridin-5-yl-Radikals erfolgt durch einen baseninduzierten Strangbruch und anschließende gelelektrophoretische Analyse.

Durch Variation des Abstands zwischen TMDN und BrdU kann ein β -Wert von 0.3 \AA^{-1} bestimmt werden. Die Ergebnisse werden durch thermisch aktiviertes *Hopping* erklärt (Abbildung 37).^[161]

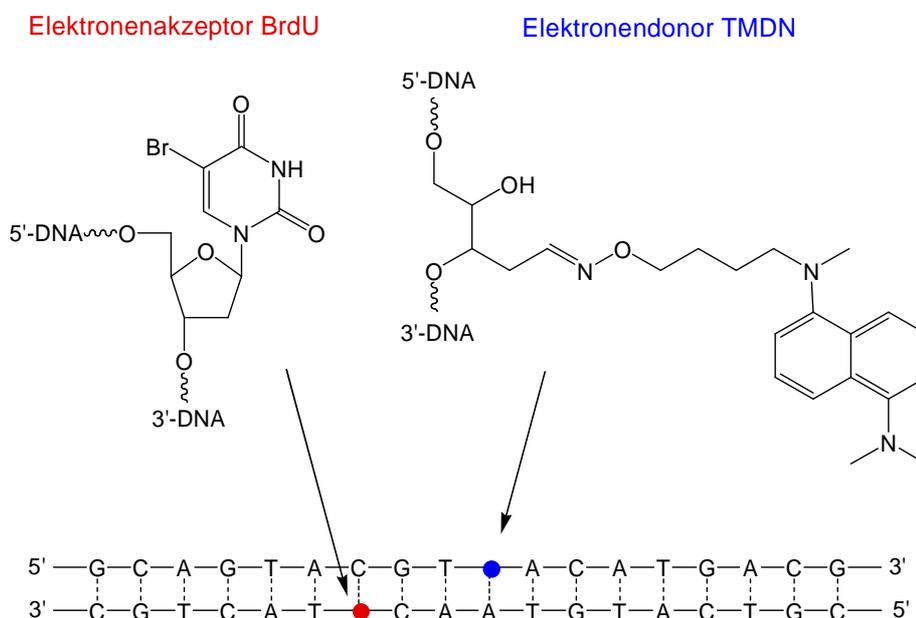


Abb. 37: DNA-Assay von Rokita et al.^[162]

5. Dialkylketon-modifiziertes Thymin als Elektronendonator

Giese et al. synthetisierten vor kurzem ein Dialkylketon-modifiziertes Thymin^[163] das nach der Bestrahlung (UV-Licht, $\lambda < 320 \text{ nm}$) gezielt ein Elektron in DNA-Duplexe übertragen kann (Abbildung 38). Da Thymin ein weniger negatives Reduktionspotential als das Dialkylketon besitzt, wird Thymin nach einer photoinduzierten *Norrish*-Spaltung durch ein Elektron des Ketylradikalanions reduziert.^[145,222] Die Entstehung des Thyminradikals kann durch ESR-Spektroskopie verfolgt werden.^[163] Das Überschuss-Elektron ist in der DNA beweglich und kann in einem *open-backbone* TT-Dimer durch das injizierte Elektron eine Cycloreversion und dadurch einen Strangbruch induzieren. Die zwei kurzen Produktstränge können gelelektrophoretisch nachgewiesen werden.^[163] Bei größeren Abständen zwischen T_x und $T=T$ nimmt die Effizienz der Dimerspaltung ab. Diese Beobachtung lässt auf einem *Hopping*-Mechanismus schließen.

Sind in einem DNA-Duplex zwei *open-backbone* TT-Dimere (Abbildung 38) beidseitig des modifizierten Thymins vorhanden, so wird eine Spaltung beider TT-Dimere, allerdings in unterschiedlicher Ausbeute, beobachtet. Ein Elektron kann also mehr als ein TT-Dimer öffnen; der Vorgang ist jedoch richtungsabhängig.^[144-146,163]

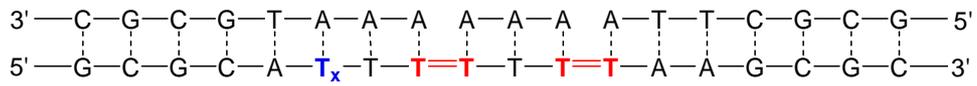
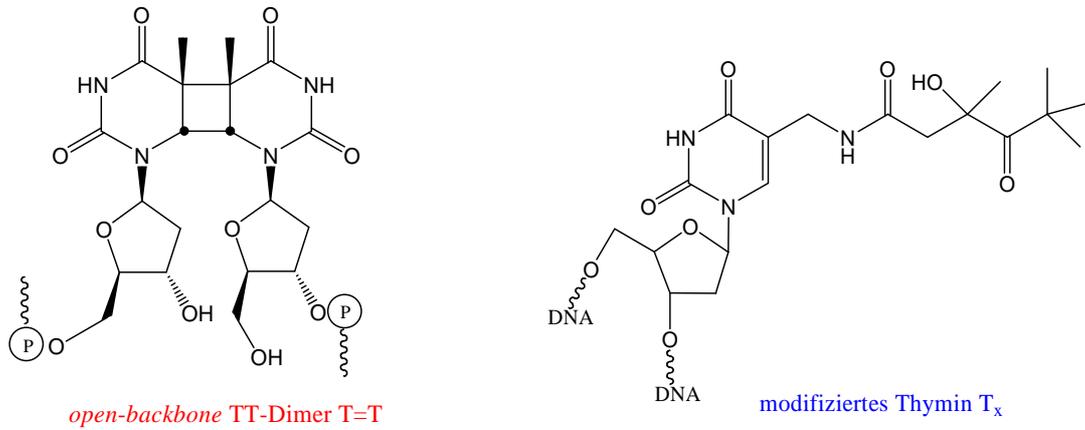


Abb. 38: DNA-Assay von Giese et al.^[163]

4 Synthese und Charakterisierung von fluoreszenzmarkierten Nukleosiden und Oligonukleotiden

Zur Untersuchung des Ladungstransfers bedient man sich eines geeigneten DNA-Donor-Akzeptor-Systems, das in der Regel aus DNA und einer kovalent gebundenen oder interkalierten Redoxsonde besteht. Untersuchungen an solchen Modellsystemen lassen sich im Allgemeinen in folgende drei Schritte unterteilen:

- Die DNA wird mit redoxaktiven Sonden markiert.
- Durch photo- oder elektrochemische Anregung wird ein Ladungstransfer induziert.
- Durch spektroskopische, biochemische oder elektrochemische Methoden werden die Ladungstransferprozesse beobachtet bzw. die daraus resultierenden Produkte untersucht.

Die in Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und zu Untersuchungen des Ladungstransfers verwendeten redoxaktiven Sonden müssen grundsätzlich für die automatisierte Festphasensynthese mit der Phosphoramiditsynthese geeignet sein. Erst dadurch ist der routinemäßige Einsatz der Bausteine auch für eine große Anzahl von Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit des Ladungstransfers gewährleistet.

4.1 DNA-Festphasensynthese

4.1.1 Die Phosphoramidit-Methode

Die Routinesynthese von Oligonukleotiden erfolgt heutzutage mit Hilfe der DNA-Festphasensynthese. Das Prinzip der Festphasensynthese wurde 1963 von Merrifield^[223] für Peptide eingeführt und von Letsinger^[224,225] auf die Synthese von Oligonukleotiden übertragen. Als Träger der festen Phase wird meist silanisertes Silikatmaterial, sog. *Controlled Pore Glass* (CPG) eingesetzt (Abbildung 39).^[226,227]

Die Oberfläche des CPG ist mit einem *Spacer* mit terminaler NH₂-Gruppe funktionalisiert. Dieser *Spacer* ist nötig, um die reaktiven Zentren aus dem Einflussbereich der Oberfläche zu bringen. Über einen weiteren *Linker*, meist Succinat, ist das erste Nucleosid an der 3'-OH Gruppe mit dem CPG verbunden. Derart belegtes CPG mit verschiedenen Porengrößen ist kommerziell erhältlich.

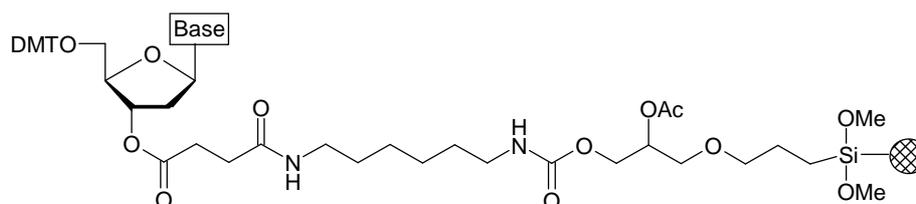


Abb. 39: Mit einem geschützten Nucleosid beladenes CPG-Material.^[227]

Im Gegensatz zur Biosynthese verläuft die chemische Oligonukleotidsynthese wegen der höheren Reaktivität primärer OH-Gruppen vom 3'-Ende zum 5'-Ende des DNA-Strangs. Als temporäre Schutzgruppe für die 5'-OH-Gruppe wird die unter sauren Bedingungen gut abspaltbare Dimethoxytritylgruppe (DMT) verwendet. Durch Messung der Absorption des bei der Abspaltung auftretenden Tritylkations ist es möglich, die Effizienz der Kupplung zu überwachen.

Als permanente Schutzgruppen für die exocyclischen Aminofunktionen der Nucleobasen werden meist Acyl-Schutzgruppen^[228] (zum Beispiel Benzoyl- oder *Isobutyryl*-Gruppen) verwendet. Daneben werden bei Purinbasen auch amidinartige Schutzgruppen wie zum Beispiel die *N,N*-Dimethylformiminogruppe eingesetzt, da diese weniger anfällig für eine säurekatalysierte Depurinierung sind.^[229,230] Nach der Oligonukleotidsynthese lässt sich die Bindung des Oligonukleotids an die feste Phase durch alkalische Hydrolyse spalten. Unter diesen Bedingungen werden auch die permanenten Schutzgruppen abgespalten.

4.1.2 Die automatisierte DNA-Synthese

Das am häufigsten durchgeführte Protokoll für die automatisierte Festphasensynthese von Oligonukleotiden ist die Phosphoramidit-Methode (Abbildung 40) über Phosphittriesternach Caruthers.^[231] Als Alternative sind unter anderem die nur selten angewendete Phosphotriester-^[232-235] und die H-Phosphonat-Methode zu nennen.^[236,237]

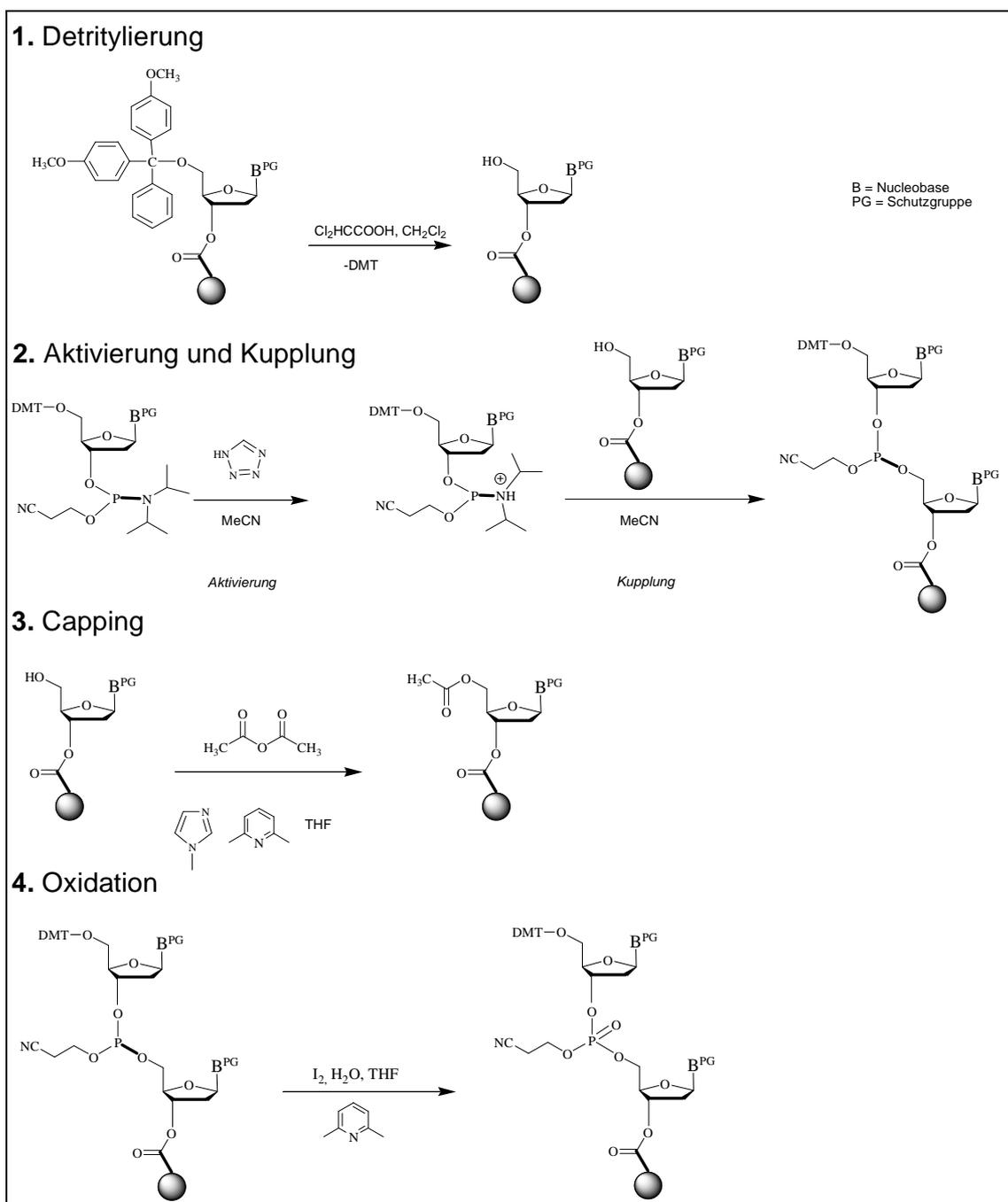


Abb. 40: Schematische Darstellung der automatisierten Festphasensynthese nach der Phosphoramidit-Methode.^[224,225]

Die Oligonukleotidsynthese nach der Phosphoramidit-Methode lässt sich in vier Schritte unterteilen: Tritylabspaltung (*Deblocking*), Aktivierung/Kupplung, *Capping* und Oxidation.

- 1. Tritylabspaltung (*Deblocking*):** Die DMT-Schutzgruppe des terminalen Nucleosids wird mit 2 % Dichloressigsäure in DCM abgespalten. Man erhält so eine freie Hydroxyfunktion in 5'-Position zur Anknüpfung des nächsten Nucleotids.
- 2. Aktivierung und Kupplung:** Zur Kupplung wird das zugesetzte Phosphoramidit mit Tetrazol aktiviert (Abbildung 41). Die Aktivierung erfolgt nach folgendem Mechanismus:^[238]

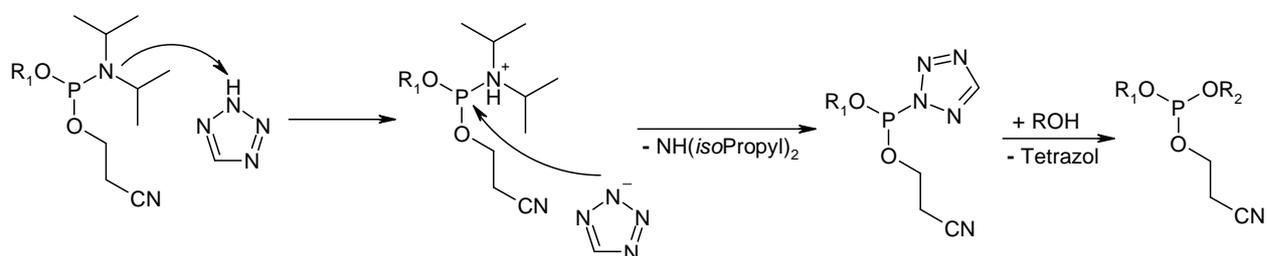


Abb. 41: Mechanismus der Phosphoramiditaktivierung durch Tetrazol.

Die Aktivierung wird durch die Protonierung des Amins durch Tetrazol eingeleitet. Das Tetrazolid-Anion verdrängt nun die Diisopropylammonium-Gruppe in einer nukleophilen Substitution am Phosphor. Die so generierte Zwischenstufe reagiert danach mit der 5'-Hydroxygruppe des terminalen Nucleosids.

- 3. *Capping*:** Alle 5'-Hydroxygruppen, die im Kupplungsschritt nicht reagiert haben, werden durch Essigsäureanhydrid acetyliert. Als Kupplungsaktivator dient *N*-Methylimidazol. Auf diese Weise werden nicht korrekt verlängerte Oligonukleotide aus dem Zyklus entfernt und können nach der DNA-Aufarbeitung besser abgetrennt werden.
- 4. Oxidation:** Durch Iod in wässriger THF-Lösung wird der Phosphitriester zum Phosphorsäuretriester oxidiert. 2,6-Lutidin wird als Base zugesetzt, um den entstehenden Iodwasserstoff abzufangen. Nach erfolgter Synthese wird das Oligonukleotid mit konz. Ammoniak bei 55 °C vom CPG-Träger abgespalten. Unter diesen Bedingungen werden ebenfalls die permanenten Schutzgruppen der Basen sowie die β -Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphat abgespalten.

4.2 Synthese von Ethidium-modifizierten Nukleosiden und Oligonukleotiden und Untersuchung des Ladungstransfers

4.2.1 DNA-Assays mit Ethidium als fluoreszenter DNA-Sonde

Die intensiv violett gefärbte Verbindung 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid, manchmal auch als Homidiumbromid bezeichnet, ist unter ihrem Handelsnamen Ethidium bekannt geworden. Die Substanz und erste Derivate wurden 1930 synthetisiert, die Nutzung als Medikament in der Tiermedizin gegen Trypanosomosis begann etwa 1950.^[197] Der Einsatz gegen Parasitenkrankheiten (speziell die Schlafkrankheit) beim Menschen ist nicht mehr üblich, da der Verdacht auf gesundheitliche Risiken besteht: *Schuster et al.* konnten zeigen, dass photoangeregtes Ethidium in vorgeschädigter sog. *bulged DNA* zu irreversiblen Schäden führt, die von DNA-Reparatur-Enzymen oft nicht mehr erkannt werden.^[198] Bekannt ist Ethidium jedoch vor allem durch seinen Einsatz als Anfärbereagenz für DNA nach einer Gelelektrophorese in der Biologie und Biochemie.

Im Folgenden wird auf die spektralen Eigenschaften und die Redoxchemie von Ethidium eingegangen, dann werden einige – im Hinblick auf die Arbeit – wichtige Experimente vorgestellt.

Nach einer Photoanregung von Ethidium bei 302 nm bzw. bei 523 nm wird eine Emission bei 630 nm gemessen (Abbildung 42). Die Fluoreszenz-Intensität von Ethidium steigt bei der Einlagerung in einen DNA-Duplex im Vergleich zum Einzelstrang stark an, da die Lebensdauer in DNA das sechsfache (24.5 ns) der Lebensdauer des freien Fluorophors (4.2 ns) beträgt.^[199]

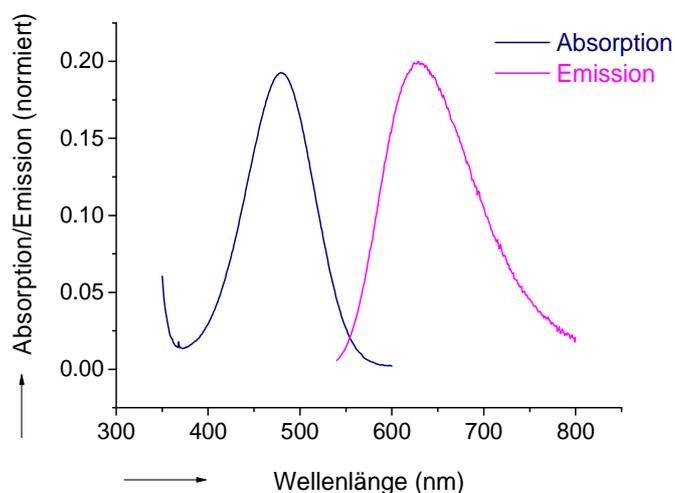


Abb. 42: Optische Eigenschaften von Ethidium: Absorption und Emission (Anregung bei 530 nm) von Ethidiumbromid in Wasser (pH 7).

Ethidium wurde in den bislang publizierten Arbeiten meist über einen Linker an die DNA angebunden, entweder wie bei *Florentiev et al.*^[201,202] über das unten dargestellte Phosphoramidit oder wie bei *Barton et al.*^[30,134] über eine 5'-Anknüpfung im Anschluss an die DNA-Synthese.^[30] In einigen weiteren Experimenten (so zu Beispiel von *Fromberz et al.*,^[31] *Kochevar et al.*,^[32] *Harriman et al.*^[212]) wurde Ethidium als Interkalator verwendet. Zusätzlich existiert eine Vielzahl patentierter Ethidium-haltiger Verbindungen für einen Einsatz als nicht kovalent gebundene Interkalatoren; meist ist der Chromophor über einen Linker an weitere funktionelle Gruppen gebunden wie im exemplarisch gezeigten Beispiel von *Dervan et al.*^[203]

Während von *Florentiev et al.*^[201,202] keine Experimente zum Ladungstransfer durch die DNA durchgeführt wurden, konnten *Barton et al.* den in Abbildung 43 gezeigten Ethidiumbaustein für Messungen zum oxidativen Ladungstransfer einsetzen. Als Elektronendonator diente 7-Deazaguanin (Z); die Details der spektroskopischen Experimente sind im Weiteren in Hinblick auf die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse des Systems Ethidium-Deazaguanin ausführlich dargestellt. Außerdem untersuchten *Barton et al.* den Lochtransfer zwischen dem linker-verbundenen Ethidiumderivat (siehe Abbildung 43: $E^0(\text{Et}^{2+}/\text{Et}^{*+}) = -0.9 \text{ V}$)^[200] und dem Rh(III)-Komplex $\Delta\text{-Rh}(\text{ph})_2\text{bpy}^{3+}$ als Reduktionsmittel mit $E^0(\text{Rh(III)}/\text{Rh(II)}) = -0.03 \text{ V}$.^[134]

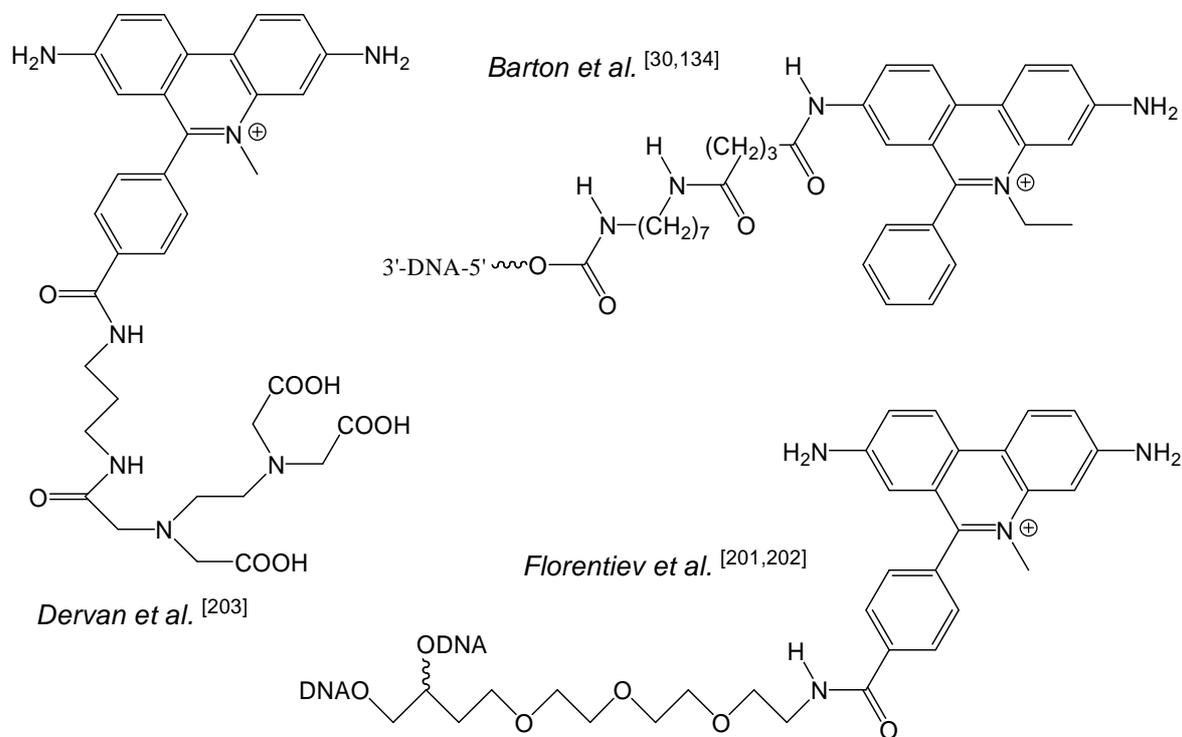


Abb. 43: Von *Barton et al.* und *Florentiev et al.* verwendete Ethidium-baltige DNA-Assays sowie ein Beispiel der zahlreichen patentierten DNA-Interkalatoren, hier von *Dervan et al.*^[30,134,201-203]

Photoangeregtes Ethidium kann sowohl als Oxidationsmittel als auch als Reduktionsmittel dienen. Entscheidend hierfür sind die Redoxpotentiale der potentiellen Reaktionspartner. Im Falle der DNA haben sich für die Oxidationspotentiale der DNA-Basen die von *Steenken et al.* publizierten Werte als Standard durchgesetzt: G ist demnach am leichtesten oxidierbar (1.3 V bzgl. NWE) und C und T am leichtesten reduzierbar (-1.2 V bzgl. NWE).^[122,145] Allerdings muss die Umgebung der betrachteten Base in der DNA berücksichtigt werden, da sie die Redoxpotentiale deutlich beeinflussen kann. So sinken zum Beispiel die Oxidationspotentiale von G über GG zu GGG.^[204] Im Folgenden werden die von *Steenken* angegebenen Ein-Elektron-Redoxpotentiale $E^0(\text{dX}/\text{dX}^\bullet)$ bzw. $E^0(\text{dX}^{\bullet+}/\text{dX})$ bzgl. NWE verwendet.

Eine rechnerische Abschätzung, in welche Richtung der Ladungstransfer stattfindet, ist über die *Rehm-Weller-Gleichung*^[205] (vgl. Kapitel 2) möglich. Mit ihrer Hilfe kann abgeschätzt werden, ob die entsprechende Ladungstrennung thermodynamisch günstig ist oder nicht. Es gilt für den reduktiven Elektronentransfer bzw. den oxidativen Lochtransfer mit Ethidium (E) und X als DNA-Base:

$$\Delta G = E^0(E^{2+\bullet}/E^+) - E^0(\text{dX}/\text{dX}^{\bullet-}) - E_{00} \quad \text{reduktiver Elektronentransfer}$$

$$\Delta G = -E^0(E^+/E^{\bullet}) + E^0(\text{dX}^{\bullet+}/\text{dX}) - E_{00} \quad \text{oxidativer Lochtransfer}$$

$E^0(\text{Ox}/\text{Red})$ stellt dabei das jeweilige Standardnormalpotential (bzgl. NWE) dar, E_{00} beschreibt die Singulett-Energie von Ethidium bei der Photoanregung (2.2 V)^[200] und kann aus dem Absorptionsspektrum erhalten werden.

Mit einem Oxidationspotential von $E^0(E^{\bullet+}/E^{\bullet})$ von 1.2 V^[200] ergibt sich, dass photoangeregtes Ethidium (E^{\bullet}) nicht in der Lage ist, G (1.3 V)^[122,200] zu oxidieren. Es muss also für Experimente zum Lochtransfer mit E^{\bullet} ein Akzeptor bereitgestellt werden, der ein niedrigeres Oxidationspotential als G besitzt. In den im Folgenden vorgestellten Untersuchungen wurde dafür 7-Deazaguanin (Z) mit einem Oxidationspotential von 1.0 V^[200] genutzt. Damit kann für den Gesamtprozess eine Triebkraft von etwa 200 mV angenommen werden (Abbildung 44). Es ist bekannt, dass die bereits zuvor nachgewiesene Löschung der Fluoreszenz von Ethidium in DNA durch Z^[206] auf einen Ladungstransfer zurückzuführen ist.

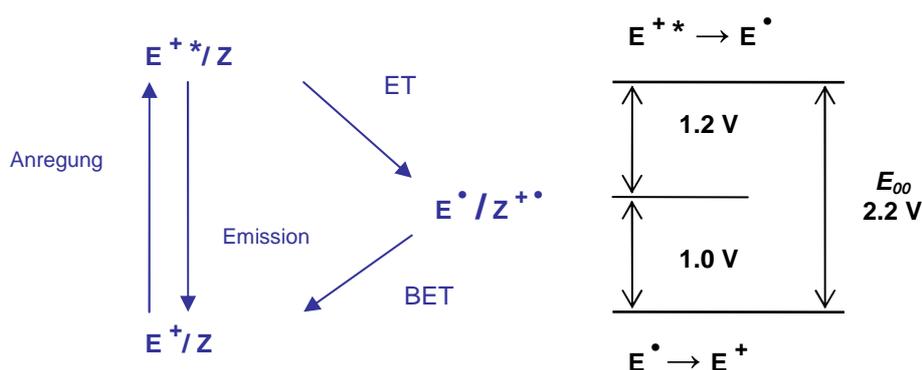


Abb. 44: Photoangeregtes Ethidium E^* als Oxidationsmittel im System Ethidium-Deazaguanin.

In den vergangenen Jahren sind eine Reihe von Femtosekunden- und Pikosekunden-zeitaufgelöste Experimente zum Ladungstransfer in DNA von unterschiedlichen Gruppen publiziert worden (siehe Kapitel 3.2.1).^[30,34] Bis auf eine Ausnahme ergibt sich in allen Fällen ein exponentieller Abfall der Rate mit zunehmender Distanz zwischen Ladungsdonor und -akzeptor in der DNA. Die Ausnahme ist das Experiment von *Zewail et al.*,^[30] bei dem als Lochdonor Ethidium (E) verwendet wurde, das kovalent über einen Linker mit dem 5'-Ende des Oligonukleotids verknüpft wurde (vgl. Abbildung 45). Statt der exponentiellen Abstandsabhängigkeit zeigen die Messungen an diesen Systemen keine Abhängigkeit der Rate von der Distanz zu 7-Deazaguanin (Z) als Lochakzeptor. Die Amplitude des Signals (transiente Absorption des photoangeregten Ethidiums) zeigt allerdings eine so starke Abstandsabhängigkeit, dass der Ladungstransfer nur über eine Distanz von maximal fünf Basenpaare detektiert werden konnte.

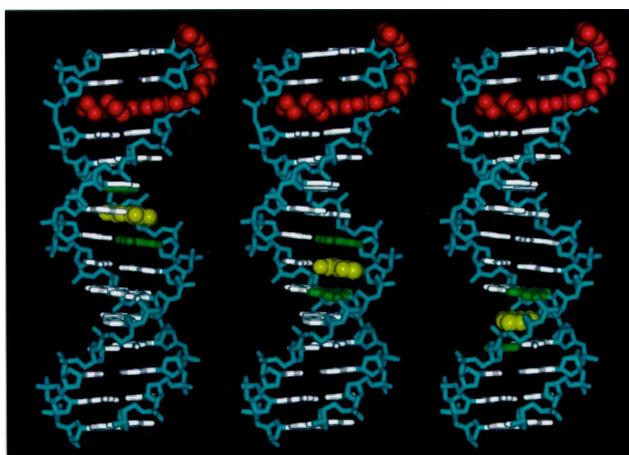


Abb. 45: DNA-Assay von *Zewail et al.* mit Ethidium (E) als Lochdonor und 7-Deazaguanin (Z) als Lochakzeptor. Der Abstand zwischen E und Z beträgt etwa 14 Å, 20 Å und 27 Å (von links nach rechts).^[30]

Eine geringe Abstandsabhängigkeit der Ladungstransferrate wird gewöhnlich durch das Auftreten des *Hopping*-Mechanismus erklärt, bei dem G-Radikalkationen als intermediäre Ladungsträger auftreten. Das photoangeregte Ethidium (E*) ist nicht in der Lage, G zu oxidieren. Demnach kann hier kein *Hopping*-Mechanismus als Erklärung für die fehlende Abstandsabhängigkeit herangezogen werden. Damit wirft der Ethidium-DNA-Assay fundamentale mechanistische Fragen auf, die trotz erheblicher theoretischer Betrachtung^[207,208] gegenwärtig noch ungeklärt sind. Obwohl neben den zeitaufgelösten Messungen an interkaliertem Ethidium auch eine Reihe von spektroskopischen Vorexperimenten an „freiem“ Ethidium in Wasser gemacht wurden,^[209] deren Ergebnisse bei der Interpretation der DNA-Daten mit einbezogen wurden, weisen die *Zewail*schen Systeme intrinsische Schwachstellen auf. Das Hauptproblem liegt dabei in der Frage, wie das Ethidium mit der DNA wechselwirkt. Zwar haben Vorarbeiten gezeigt, dass das Ethidium interkaliert ist, dass ein direkter Kontakt zwischen E und Z ausgeschlossen werden kann und dass die sog. Kreuzinterkalation zwischen den Oligonukleotiden bei den im Experiment verwendeten Konzentration ausgeschlossen werden kann.^[142,200] Endgültige Klarheit über die tatsächliche Struktur des Ethidiums in DNA konnte damit allerdings nicht herbeigeführt werden. Hinzu kommen strukturelle Unsicherheiten, die aus Inhomogenitäten im Probenmaterial resultieren. Gelexperimente zeigen, dass das Ethidium sowohl zwischen dem zweiten und dem dritten als auch zwischen dem dritten und vierten Basenpaar im Oligonukleotid interkaliert ist. Daraus folgt, dass zumindest zwei verschiedene E-Z-Abstände vorliegen, deren jeweilige Mengenanteile nicht bekannt sind.

Die zeitaufgelösten Messungen der transienten Absorption sowie der Fluoreszenz aus dem primär angeregten Ethidium in den DNA-Proben haben klar ein biexponentielles Zerfallsverhalten ergeben. Keine der beiden Zeitkonstanten (~ 5 ps und ~ 75 ps) zeigte dabei eine Abhängigkeit vom Abstand zwischen E und Z. Obgleich man diese Raten den beiden Subensembles mit verschiedenen E-Z-Abständen zuschreiben könnte, wird diese Interpretation nicht durch andere Experimente, wie zum Beispiel zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie, unterstützt. Es wurde gezeigt, dass die Orientierungsrelaxation des freien Ethidiums in Wasser mit einer Zeitkonstanten von ca. 70 ps verläuft und dass die Fluoreszenzlöschung von E in bimolekularen Komplexen mit Z ebenfalls in 70 ps erfolgt.^[30] Hieraus muss man schließen, dass eine Umorientierung des Ethidiums – die geschwindigkeitsbestimmend ist – der eigentlichen Ladungsübertragung im Komplex vorausgeht. Neuere theoretische Betrachtungen ergaben, dass der beobachtete biexponentielle Zerfall durch die Fluktuation der DNA-Struktur erklärt werden kann.^[208]

Betrachtet man die DNA-Experimente vor diesem Hintergrund, so scheint die Schlussfolgerung plausibel, dass auch in DNA ein beträchtlicher Teil des angeregten Ethidiums vor der eigentlichen Ladungsübertragung eine Strukturrelaxation eingeht. Wenn dies der Fall ist, dann hat die beobachtete Lebensdauer von 75 ps nicht direkt etwas mit der Ladungsübertragung zu tun, sondern deutet vielmehr darauf hin, dass das Ethidium trotz seiner Interkalation noch über bestimmte Freiheitsgrade verfügt.

Die Lebensdauer von 5 ps wird denjenigen Ethidium-Konformationen zugeschrieben, die optimal mit den benachbarten DNA-Basen wechselwirken, d. h. eine starke elektronische Z-E-Kopplung ermöglichen. Es ist aber aus den bisher durchgeführten Experimenten nicht eindeutig zu schließen, dass das bereits der maximalen Ladungstransfer-Rate entspricht. Es wäre durchaus denkbar, dass der eigentliche Ladungstransfer noch sehr viel schneller ist. In diesem Fall wäre auch die gefundene Abstandsabhängigkeit nicht die, die den reinen Ladungstransfer charakterisiert.

Auf der anderen Seite gibt es durchaus theoretische Modellvorstellungen, die eine nicht vorhandene Abstandsabhängigkeit der Ladungstransferdynamik in DNA erklären können. Man könnte sich zum Beispiel vorstellen, dass die elektronische Wellenfunktion des Ethidiums unmittelbar nach der Photoanregung sehr diffus ist, d. h. delokalisiert wird. Eine solche Delokalisierung hätte eine starke elektronische Kopplung zu ladungsgetrennten Zuständen zur Folge, in denen ein Loch vom Ethidium auf die benachbarten Basenpaare übertragen würde.

Durch die DNA-Basendynamik könnte eine diffuse Dynamik der positiven Ladung initiiert werden, die schließlich zur Ausbildung einer Ladungsdomäne auf der Zeitskala von einigen 100 fs führt. In Abwesenheit einer Lochfalle (wie zum Beispiel Z) hat diese Ladungsdomäne exakt die Lebensdauer des angeregten Ethidiums (E^*). Befindet sich allerdings eine solche Lochfalle innerhalb des Ausbreitungsraumes der Domäne, so kommt es zu einer irreversiblen Ladungsübertragung von E auf Z. Ein solcher Mechanismus hätte weitreichende Konsequenzen für das Verständnis von Ladungsübertragung in DNA.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass die Zeitauflösung des Experimentes verbessert werden muss. Noch wichtiger aber ist es, die strukturellen Unsicherheiten und konformationellen Inhomogenitäten des Probenmaterials zu vermeiden.

Wie bereits erwähnt, kann photoangeregtes Ethidium nicht nur ein Oxidationsmittel, sondern auch ein Reduktionsmittel sein. In Gegenwart eines geeigneten Elektronenakzeptors kann photoangeregtes Ethidium einen Elektronentransfer durch DNA induzieren. Mit den oben vorgestellten Abschätzungen nach der *Rehm-Weller*-Gleichung kann die Eignung von Methylviologen (MV^{2+}) oder strukturell ähnlichen Molekülen wie DAP^{2+} ($DAP = N,N'$ -Dimethyl-2,7-diazapyren) begründet werden. Es ergibt sich – mit Methylviologen als Oxidationsmittel – und damit $E_{00} = 2.2 \text{ V}$, mit $E^0(Et^{2+\bullet}/Et^+) = 1.68 \text{ V}^{[200]}$ sowie mit $E^0(Et^{2+\bullet}/Et^{*\bullet}) = -0.52 \text{ V}^{[31-33]}$ und $E^0(MV^{2+}/MV^{+\bullet}) = -0.44 \text{ V}^{[210,211,221]}$ eine Triebkraft von etwa 100 mV. Bei der Verwendung von DAP sind die energetischen Verhältnisse ähnlich (siehe Abbildung 46).

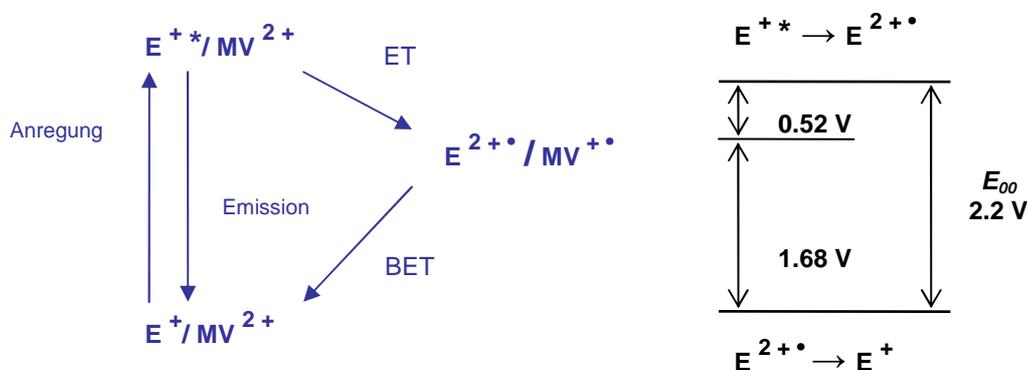


Abb. 46: Photoangeregtes Ethidium als Reduktionsmittel im System Methylviologen-Diazaguanin.

Methylviologen löscht die Fluoreszenz des photochemisch angeregten Ethidiums als Folge eines Elektronentransfers. 1986 zeigten *Fromberg et al.*, dass die Fluoreszenz von in DNA interkaliertes Ethidium durch externes Methylviologen gelöscht werden kann.^[31] Die Untersuchungen ergaben eine Rate des Elektronentransfers von $k_{ET} = 1.1 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$. 1992 konnten *Kochevar et al.* zwei mögliche Reaktionswege einer DNA-Schädigung nach photochemisch induzierten Elektronentransfer im System Ethidium-Methylviologen aufzeigen. MV^{2+} *quencht* die Fluoreszenz des photoangeregten Ethidiums. Es entsteht das doppelt positiv geladene Ethidiumradikalkation $Et^{2+\bullet}$, das im Gegensatz zu photoangeregtem Ethidium in der Lage ist, G zu oxidieren. Experimente zur Sequenzspezifität zeigten, dass ein Strangbruch bevorzugt bei Guanin zu beobachten ist. Die Angabe des Abstands zwischen interkaliertem, nicht kovalent angeknüpftem Ethidium und G ist allerdings problematisch, eine Reaktionsrate konnte nicht bestimmt werden.^[32]

1992 ermittelten auch *Harriman et al.* bei einem Ladungstransferexperiment mit interkaliertem Ethidium und DAP^{2+} einen β -Wert in der Größenordnung von 0.91 \AA^{-1} . Auch im System Acridinorange (Ac)- DAP^{2+} wurde ein stark abstandsabhängiger Elektronentransfer ermittelt: der β -Wert beträgt 0.86 \AA^{-1} .^[212] Zusätzlich wurden die Raten des Elektronentransfers ($k_{ET} = 1.1\text{-}1.5 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ in beiden Systemen) und die Raten der Rückreaktion ($k_{ET} = 4.2\text{-}5.8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ in beiden Systemen) gemessen. Für die Rückreaktion wurde ein β -Wert von 1.5 \AA^{-1} ermittelt. Die Ergebnisse werden durch einen Superaustausch-Mechanismus erklärt. Es wurde ein sequenzunabhängiger Ladungstransfer festgestellt.^[213]

Tab. 2: Experimente zum reduktiven Ladungstransfer mit Ethidium als Donor. Abkürzungen: Ac = Acridin, DAP = N,N'-Dimethyl-2,7-diazapyren, E = Ethidium, MV = Methylviologen.

Ladunsdonor/ Akzeptor	kovalent gebunden	$\beta [\text{\AA}^{-1}]$	$k_{ET} [\text{s}^{-1}]$	Arbeitsgruppe	Jahr
E / MV	nein	-	10^{12}	<i>Fromberg</i> ^[31]	1986
E / DAP	nein	0.91	10^9	<i>Harriman</i> ^[212]	1992
Ac / DAP	nein	0.86	10^9	<i>Harriman</i> ^[212]	1992
E / MV	nein	-	-	<i>Kochevar</i> ^[32]	1992

Alle Arbeiten (Tabelle 2) zeigen, dass die charakteristische Fluoreszenz des DNA-interkalierten Ethidiums von Methylviologen effizient gelöscht wird. Der Schwachpunkt aller dieser Experimente ist die Tatsache, dass der Abstand zwischen Ethidium und Methylviologen nicht bekannt ist, da Ethidium in die DNA interkaliert und Methylviologen als externer *Quencher* zugegeben wird. Es wird davon ausgegangen, dass Methylviologen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an das Phosphodiester-Rückgrat der DNA gebunden ist.

Zum Verständnis des reduktiven Ladungstransfers von Ethidium ist es also essentiell, ein definiertes System zu synthetisieren, d. h. sowohl Ethidium als auch Methylviologen kovalent anzuknüpfen bzw. artifizielle Basen, die diese Chromophore enthalten, zugänglich zu machen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl bei Untersuchungen zum oxidativen als auch zum reduktiven Ladungstransfer die entscheidende Schwachstelle aus der Art der Anknüpfung des Ethidiums resultiert. Entweder ist die Interkalations-Position des Ethidiums unbekannt oder auf Grund der Linkerlänge die Interkalationsstelle von Ethidium nur mit einer Genauigkeit von \pm einem Basenpaar bekannt. Zusätzlich kann die sogenannte Kreuzinterkalation zwischen den Oligonukleotiden nicht ausgeschlossen werden. Das Probenmaterial ist somit inhomogen.

Dieser Umstand ist ungeeignet für eine detaillierte Betrachtung durch eine zeitlich hochaufgelöste fs-Laserspektroskopie.

Im Rahmen dieser Arbeit ist daher geplant, einen neuartigen Ethidium-DNA-Assay (Abbildung 47) für Experimente zum Ladungstransfer in DNA zu entwickeln, welcher das Ethidium als artifizielle Base enthält und somit die Schwachstellen bisheriger Systeme umgeht. Zu diesem Zweck sollen Ethidium-Nukleosidanaloga synthetisiert, mit den für die DNA-Festphasensynthese nötigen Gruppen versehen und als artifizielle Base in Oligonukleotide eingebaut werden.

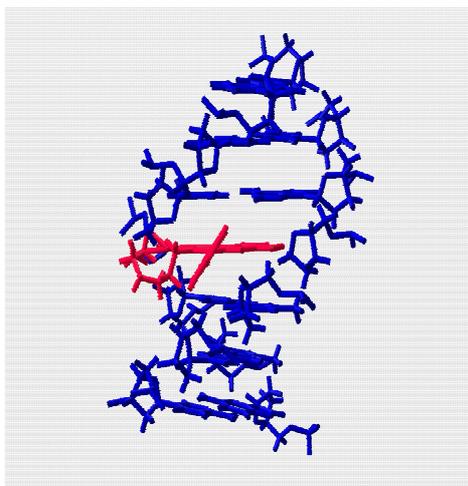


Abb. 47: *Ethidium als artifizielle Base in DNA.*

4.2.2 Synthese und Charakterisierung der Ethidium-modifizierten Nukleoside und DNA-Bausteine

Das Ziel dieses Teils der Arbeit ist die Herstellung eines Phosphoramidites, das die routinemäßige Herstellung Ethidium-markierter Oligonukleotide am DNA-Synthesizer ermöglicht. Auf diese Weise sollen DNA-Assays zur spektroskopischen Untersuchung von Ladungstransfer-Prozessen entwickelt werden. Sowohl der photoinduzierte Lochtransfer (im System Ethidium-Deazaguanin) als auch der Elektronentransfer (im System Ethidium-Methylviologen) können dann untersucht werden (siehe Kapitel 3).

In Vorarbeiten war versucht worden, ein Ethidium-Nukleosid herzustellen, in dem Ethidium über eine der exozyklischen Aminogruppen glykosidisch mit dem 2'-Desoxyribofuranosid verknüpft ist (Abbildung 48). Glykoside mit Ethidium als Aglykon, wie z. B. 3-*N*- oder 8-*N*-Glucuronosylethidium, sind bekannt, weil sie als Metaboliten von Ethidium in höheren Organismen identifiziert wurden.^[239]

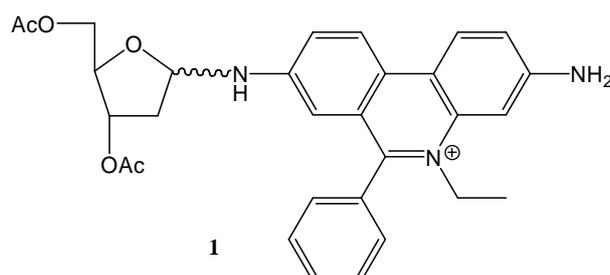


Abb. 48: Ethidium-Nucleosid **1**.^[240]

Obwohl die Struktur **1** ein N,O-Acetal enthält, wurde angenommen, dass die Resonanzstabilisierung in dem aromatischen System des Ethidium-Grundgerüsts die Stabilität des Glykosylamins gegenüber saurer oder basischer Hydrolyse gewährleistet.

Die ersten Derivatisierungen von Ethidium wurden von *Walls et al.*,^[241] *Watkins et al.*,^[242] *Berg et al.*^[243] und *Firth et al.*^[244] durchgeführt. In neueren Arbeiten von *Schacht et al.* wird gezeigt, dass die NH₂-Gruppe in Position 3 des Ethidium-Grundgerüsts durch Resonanzstabilisierung der positiven Ladung deaktiviert ist, weswegen die selektive Modifikation oder Derivatisierung der NH₂-Gruppe in Position 8 möglich ist (Abbildung **49**).^[245]

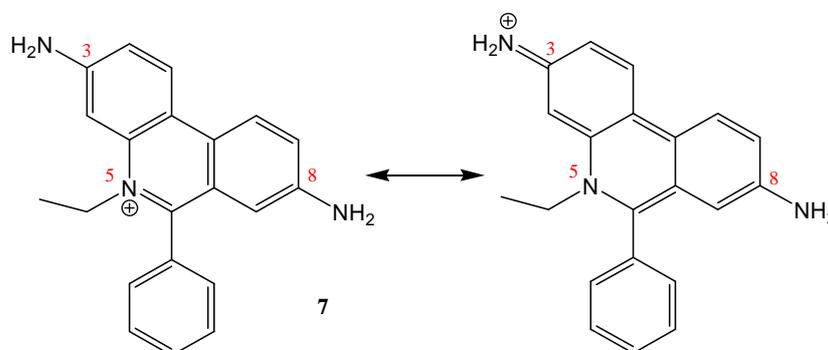


Abb. 49: Die Resonanzstabilisierung der positiven Ladung deaktiviert die Reaktivität der NH₂-Gruppe in Position 3 von Ethidium (**7**).

Die Stabilität des Ethidium-Nucleosids **1** wurde im Hinblick auf den Einsatz am DNA-Synthesizer getestet. Es wurde angenommen, dass die Behandlung mit Dichloressigsäure und mit konz. NH₄OH die kritischen Bedingungen darstellen (zu den Bedingungen der DNA-Festphasensynthese mit der Phosphoramidit-Methode vgl. Kapitel **4.1**). Die Glykoside waren unter trockenen sauren Bedingungen, wie sie während der Tetrazol-aktivierten Kupplung oder der Dichloressigsäure-aktivierten Abspaltung der Trityl-Schutzgruppen vorliegen, stabil.

Diese Beobachtung bestätigte die zuvor formulierte Vermutung, dass die Mesomerie im Ethidium-Grundgerüst das Glykosylamin **1** stabilisiert. Allerdings spaltet sich die Glykosidbindung unter basisch trockenen und basisch wässrigen Bedingungen, wie sie typischerweise bei der DNA-Aufarbeitung verwendet werden. Damit war das Nukleosid für die Oligonukleotidsynthese prinzipiell nicht geeignet.

Wegen der beobachteten Instabilität des Ethidium-Nukleosids **1** unter basischen Bedingungen erschien es sinnvoll, Ethidium nicht glykosidisch, sondern als Amid zu verknüpfen (Abbildung 50).

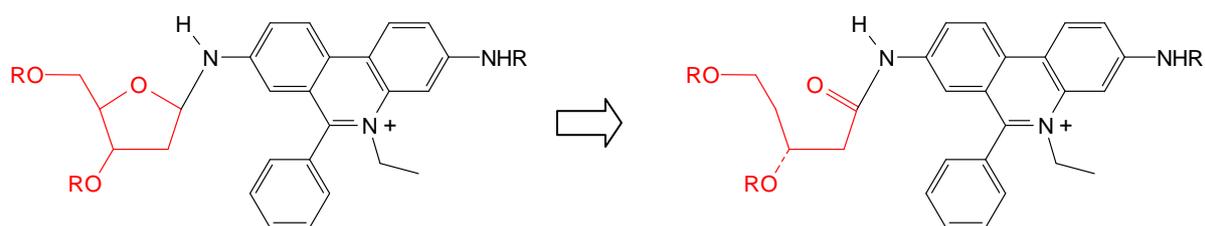


Abb. 50: Anknüpfung der Ethidium-Einheit über eine Amid-Bindung.

Amid-verknüpfte Oligonukleotid-Ethidium-Konjugate wurden bereits von *Barton et al.* beschrieben.^[134] Der (3R),5-Dihydroxypentansäure-Teil des in Abbildung 50 dargestellten Ethidiumderivats soll strukturell das 2'-Desoxyribofuranosid in **1** nachahmen. Ausgehend vom kommerziell erhältlichen (3R)-Acetoxy-glutarsäuremonoethylester (**2**) soll die *isopropylidengeschützte* Carbonsäure **6** in vier Schritten synthetisiert, mit der Ethidiumeinheit verknüpft und nach der Acetalspaltung mit den für eine DNA-Festphasensynthese nötigen Schutzgruppen versehen werden (Abbildung 51). Die Herstellung von (3R),5-Dihydroxypentansäuremethylester (**4**) ist in der Literatur bereits beschrieben worden.^[246]

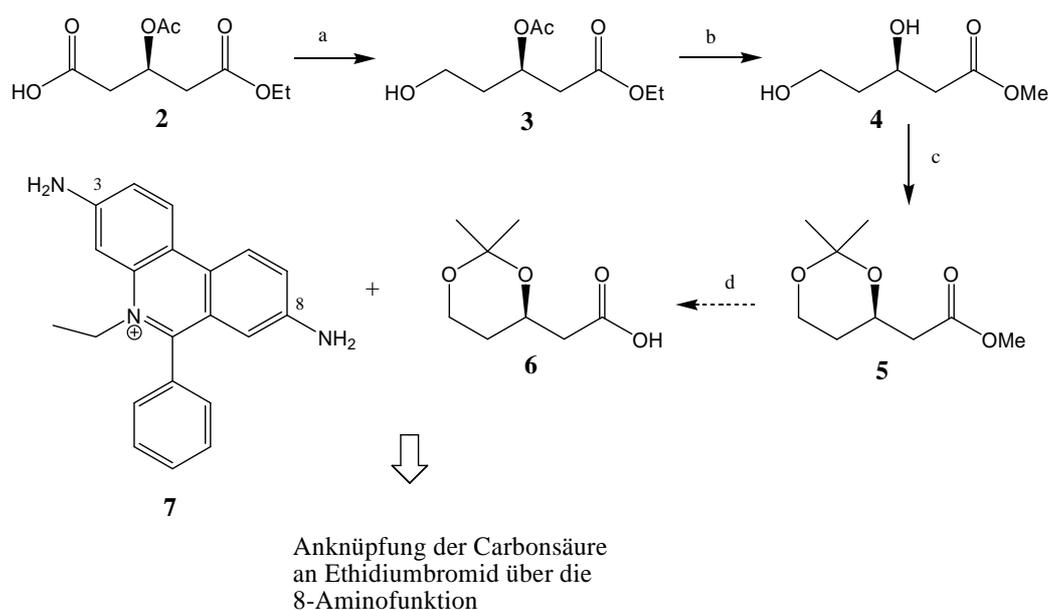


Abb. 51: Synthese von **6** ausgehend von (3R)-Acetoxy-glutarsäuremonoethylester : **a:** $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ (1.1 equiv.), THF, RT, 20 h, 90 %, **b:** TFA (4.5 equiv.), MeOH, 50 °C, 60 h, 60 %, **c:** $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$ (1.0 equiv.), $p\text{TsOH}$ (0.1 equiv.), DCM, 40 °C, 2 h, 90 %, **d:** LiOH Monohydrat (10 equiv.), THF/ H_2O =1/1, RT, 12 h.

Der (3R),5-Dihydroxypentansäuremethylester (**4**) wurde nach Reduktion von **2** mit $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ und anschließender Esterspaltung von **3** mit TFA/MeOH erhalten und die Isopropylidenschutzgruppe durch Reaktion mit 2,2-Dimethoxypropan eingeführt. Das Zielprodukt der Verseifung, **6**, konnte allerdings nicht durch Ausschütteln mit einem organischen Lösungsmittel isoliert werden, da es eine zu hohe Wasserlöslichkeit besitzt.

Um die Wasserlöslichkeit der freien Carbonsäure zu verringern, wurden die beiden Hydroxyfunktionen von **4** alternativ durch eine Benzylidengruppe geschützt^[247] und die Esterfunktion von **8** wurde mit aq. LiOH gespalten.^[248-250] Hier konnte die freie Carbonsäure **9** ohne Probleme isoliert werden (Abbildung 52).

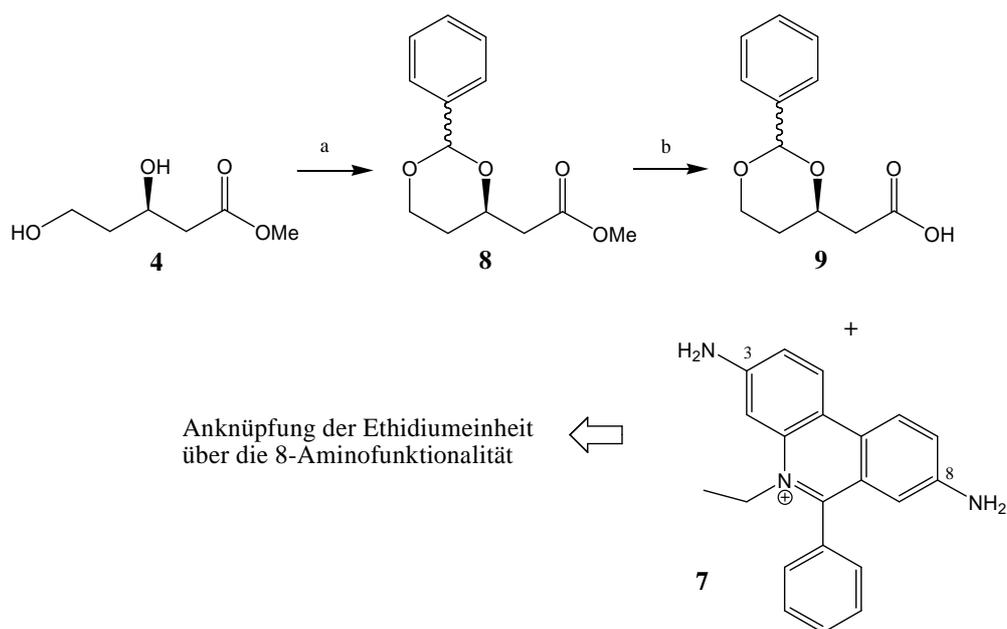


Abb. 52: Alternative Synthesestrategie durch Einführung einer Benzylidenschutzgruppe. **a:** $\text{Ph-CH}(\text{OCH}_3)_2$ (1.0 equiv.), $p\text{TsOH}$ (0.1 equiv.), DCM, 40 °C, 2 h, 63 %, **b:** LiOH Monohydrat (20 equiv.), THF/ H_2O =1/1, RT, 12 h, 64 %.

Das azyklische Ethidium-Nukleosid-Analogon 8-[(3'R)-1',3'-Dihydroxy-4'-yl]-acetamido-3-amino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium-Acetat (**11**) wurde wie im Folgenden beschrieben ausgehend von **7** und **9** synthetisiert (Abbildung 53): Bei der ersten Variante wurde zunächst die Carboxylfunktion von **9** durch die Reaktion mit *Isobutylchlorformiat* aktiviert.^[251] Die anschließende Reaktion des gemischten Anhydrids **10** mit **7** ergab das gewünschte Kupplungsprodukt **11** in guten Ausbeuten (70 %). Es wurden nur Spuren des 3,8-disubstituierten Ethidiumderivates als Nebenprodukt durch HPLC-MS nachgewiesen.

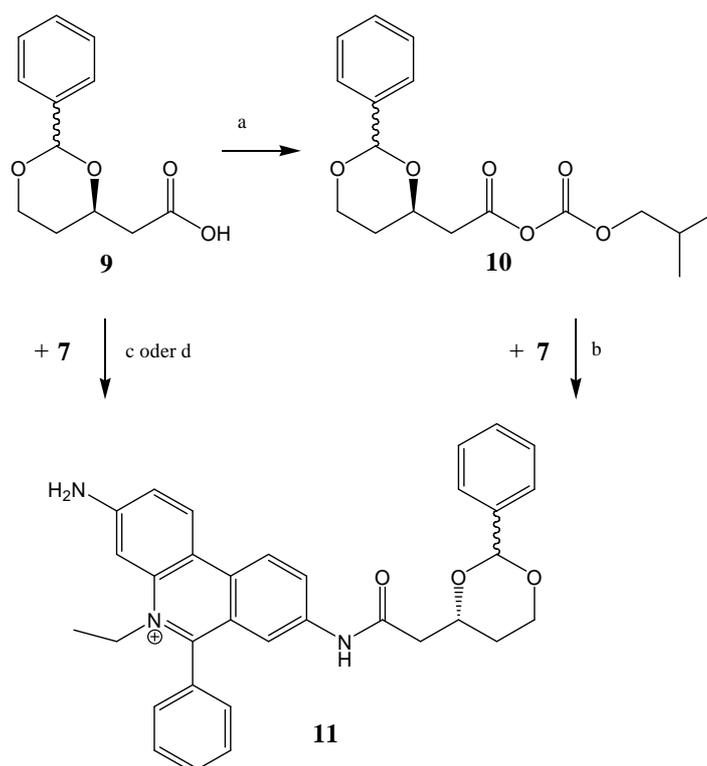


Abb. 53: Synthese des Bausteins 8-[(3'R)-1',3'-Dihydroxy-4'-yl]-acetamido-3-amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium Acetat (**11**): **a:** 4-Ethylmorpholin (1.1 equiv.), Isobutylchlorformiat (1.1 equiv.), THF, RT, 10 min, quant., **b:** **7** (1.0 equiv.), DMF, 70 °C, 48 h, 70 %, **c:** DCC (1.1 equiv.), DMAP (0.5 equiv.), DMF, 70 °C, 48 h, 60 %, **d:** HATU (1.0 equiv.), HOAt (1.0 equiv.), DMF, RT, 12 h, 80 %.

Alternativ wurde versucht, die Carbonsäure **9** mit **7** in der Gegenwart typischer Peptidkupplungsreagentien, wie HATU/HOAt^[252] oder DCC/DMAP,^[245] zur Reaktion zu bringen (Abbildung 53). Beide Reaktionen ergaben das gewünschte Produkt **11** in vergleichbaren Ausbeuten (60-80 %). Allerdings unterschieden sich die beiden Reaktionen in der Menge des 3,8-disubstituierten Ethidium-Derivates als Nebenprodukt. Mit HATU/HOAt wurden nur Spuren davon gebildet, während mit DCC/DMAP etwa 14 % dieses Nebenproduktes gebildet wurden.

Abschließend konnte die Benzyliden-Schutzgruppe von **11** mit *p*TsOH abgespalten werden (Abbildung 54). Das Ethidium-Derivat **12** wurde durch 2D-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert. Wie bei dem Ethidium-Nukleosid **1** wurde die Stabilität von **12** unter den typischen Bedingungen der automatisierten Oligonukleotid-Synthese getestet.

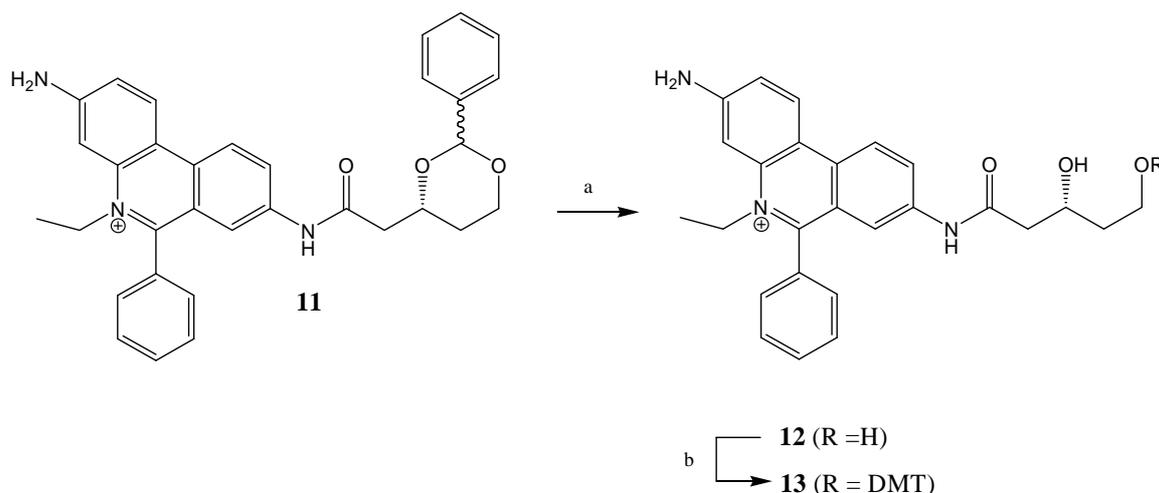


Abb. 54: Abspaltung der Acetalschutzgruppe von **11** und Tritylierungsversuch: **a:** *p*TsOH (0.1 equiv.), MeOH, RT, 30 min, 89 %, **b:** DMTCI (2.0 equiv.), Pyridin, RT, 20 h.

Im Gegensatz zu **1** verhielt sich das Ethidium-Derivat **12** sowohl unter sauren als auch unter basischen Bedingungen stabil. Das bedeutet, dass das Ethidium-Derivat **12** prinzipiell als DNA-Baustein für die Herstellung Ethidium-markierter Oligonukleotide geeignet erscheint. Die Absorptions- und Emissionseigenschaften von **12** wurden in MeOH und ACN als typische organische Lösungsmittel mit bzw. ohne Wasserstoffbrücken untersucht. Die UV/Vis-Absorption der Verbindung **12** war in beiden Lösungsmitteln sehr ähnlich, die Emission allerdings sehr unterschiedlich (Abbildung 55).

Die Fluoreszenzintensität von **12** war in ACN etwa 3.7 mal höher als in MeOH. Dieses Absorptions- und Emissionsverhalten ist dem des Ethidiums (**7**) ähnlich^[199] und bestätigt, dass in Verbindung **12** tatsächlich nur eine der beiden Aminogruppen derivatisiert wurde. Eine Amidkupplung an beiden exozyklischen Aminofunktionen des Ethidium-Grundgerüsts würde das Absorptionsmaximum hypsochrom verschieben, wie schon durch vergleichende Messungen an 8-Acetyl- und 3,8-Di-acetyl-substituiertem Ethidium-Derivaten gezeigt werden konnte.^[253]

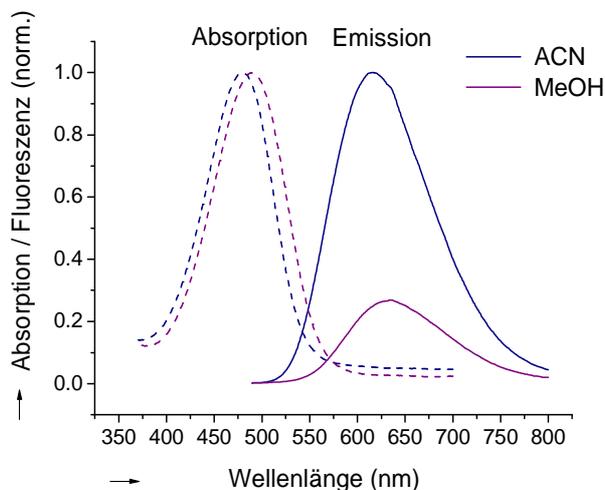


Abb. 55: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **12** in MeOH und ACN, Anregung bei 500 nm.

Die freie 3-Aminofunktion des Bausteins **12** muss vor einem Einsatz in der DNA-Festphasensynthese mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen werden, da die Aminofunktion ansonsten sowohl bei der Tritylierung als auch bei der Synthese des Phosphoramidits zu Konkurrenzreaktionen führen könnte. Dadurch wird jedoch eine Instabilität in Position 8 verursacht. Beim Versuch, **13** durch die Tritylierung von **12** unter Standardbedingungen herzustellen, konnte eine meist quantitative Spaltung der Amidbindung durch entsprechende Bruchstücke nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass die Acetylierung der Aminofunktion in Position 3 des Ethidium-Grundgerüsts zu einer erhöhten Labilität der Amidbindung in Position 8 führt.^[240,253]

Ein ähnliches Verhalten wurde bereits zuvor am Ethidium-Nukleosid **1** beobachtet. Deshalb ist der Baustein **12** trotz der dargestellten spektroskopischen Ähnlichkeit mit Ethidium nicht als Ethidium-modifiziertes Phosphoramidit einsetzbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Einbau von Ethidium in Oligonukleotide durch eine Verknüpfung über eine der exozyklischen Aminofunktionen aufgrund der Beobachtungen und Erfahrungen mit den Ethidium-Derivaten **1** und **12** nicht sinnvoll ist. Daher erscheint eine Anknüpfung an das Oligonukleotid über den Stickstoff in Position 5 des Ethidium-Grundgerüsts vielversprechender (Abbildung **56**). Entsprechende Derivatisierungen ausgehend vom inzwischen kommerziell erhältlichen 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin (**16**)^[258,259] wurden bereits durchgeführt.^[260]

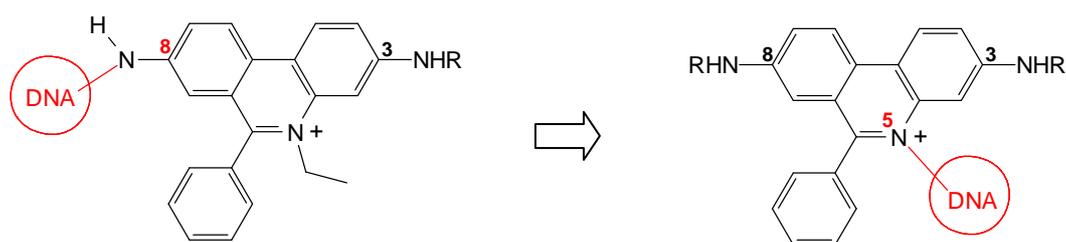


Abb. 56: Änderung der Synthesestrategie: Anknüpfung der Ethidium-Einheit durch Alkylierung von Phenanthridin in der 5-Position.

Der entsprechende Baustein 3-Amino-propan-1,2-diol (**17**) ist kommerziell erhältlich und soll als azyklisches Analogon für die 2'-Desoxyriboseeinheit natürlicher Nucleoside dienen. Der Aminozucker **17** soll über einen Linker an das Phenanthridin **16** gebunden werden. Als geeigneter Linker wurde 1,3-Diodpropan gewählt. 1,3-Dibrompropan erwies sich in Voruntersuchungen als zu unreaktiv für die Alkylierungsreaktion.^[253] Vor der Alkylierung müssen die beiden Aminogruppen von 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin (**16**) mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden. Anschließend kann in der Alkylierungsreaktion der Linker eingeführt werden, der abschließend mit dem Baustein **17** zum Nucleosid-Analogon **23** verknüpft werden kann (Abbildung 57).

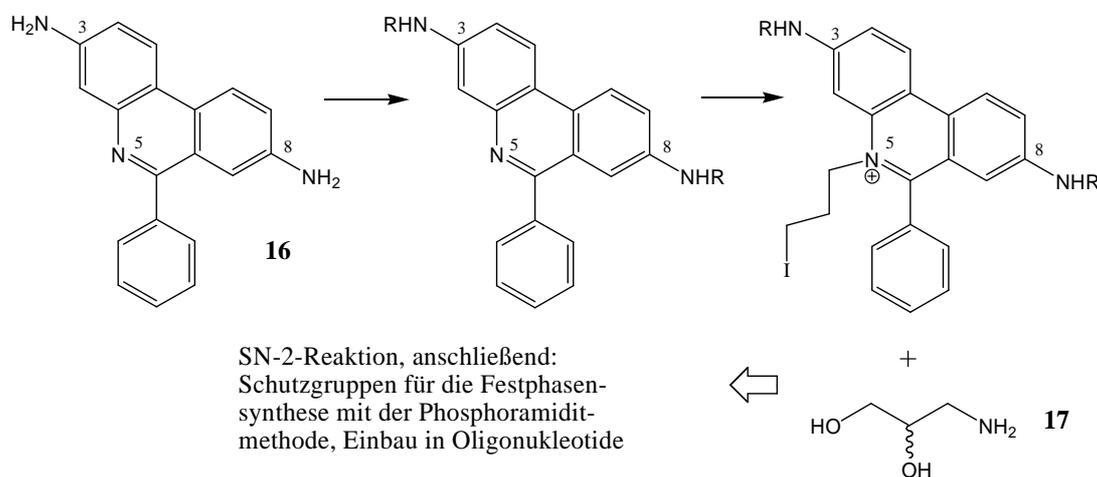


Abb. 57: Synthesestrategie zur Anknüpfung des Phenanthridins in Position 5.

Besonders kritisch erwies sich die Wahl der Schutzgruppen für die beiden exozyklischen Aminofunktionen des Phenanthridinium-Grundgerüsts. Die Verwendung einer Acetylschutzgruppe stellte sich als nicht geeignet heraus. Zwar lässt sich der 3,8-diacetylierte Phenanthridin-Baustein **18** problemlos synthetisieren (Abbildung 58). Die Testabspaltung der Acetylschutzgruppen von **18** unter den Bedingungen der DNA-Festphasensynthese (NH_4OH , 55°C , 10 h) scheiterte allerdings.

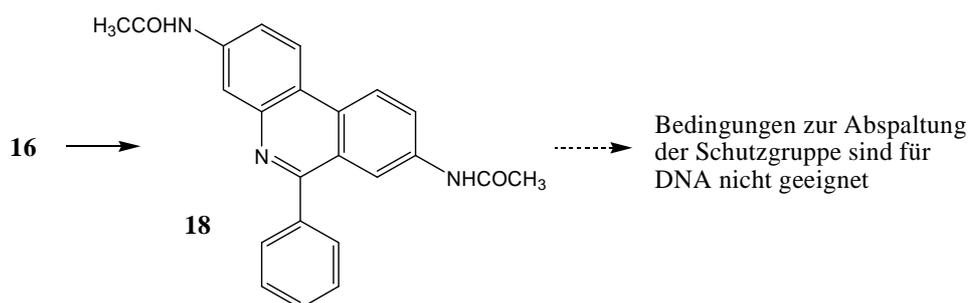


Abb. 58: Synthese von **18**: Ac_2O (20 equiv.), DCM, RT, 24 h, 99 %.

Deshalb wurde die Eignung der wesentlich labileren Trifluoracetamid-Schutzgruppe geprüft. Auch hier ist das trifluoracetamid-geschützte Phenanthridin **19** in hohen Ausbeuten zugänglich (Abbildung 59). Der Vorversuch zur Alkylierung der Verbindung **19** mit 1,3-Diodpropan führt allerdings zu einer Abspaltung der Schutzgruppen durch im Reagenz enthaltene Säurespuren.

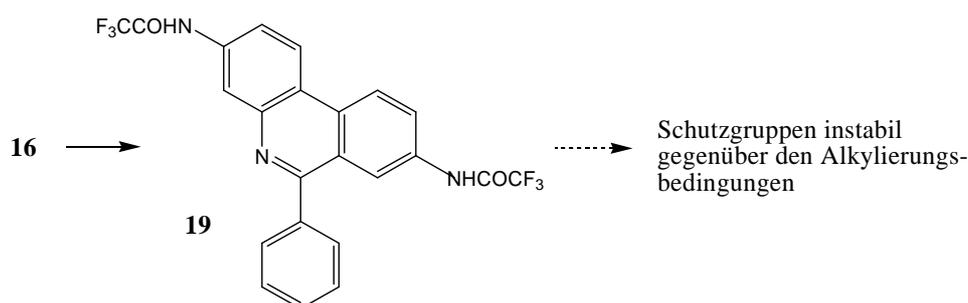


Abb. 59: Synthese von **19**: $(\text{TFA})_2\text{O}$ (3.0 equiv.), DCM, RT, 24 h, 86 %.

Als Alternative wurde deshalb die *Isobutyramid*-Schutzgruppe gewählt. *Isobutyryl*-Gruppen werden standardmäßig bei der DNA-Synthese zum Schutz von exozyklischen Aminofunktionen der DNA-Basen verwendet.^[261] Bei der Synthese des Bausteins **22** wird zunächst 6-Phenyl-3,8-diaminophenanthridin (**16**) mit zwei *Isobutyryl*-Gruppen geschützt (Abbildung 60).

Danach wird der Stickstoff in Position 5 von **20** mit 1,3-Diiodpropan alkyliert. Das Produkt **21** wird in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit dem Aminozucker **17** umgesetzt (Abbildung 60). Auf diese Weise wird in guten Ausbeuten der Baustein **22** erhalten. Zu analytischen Zwecken wurden die beiden *Isobutyroyl*-Gruppen mit HBr abgespalten (**23**).

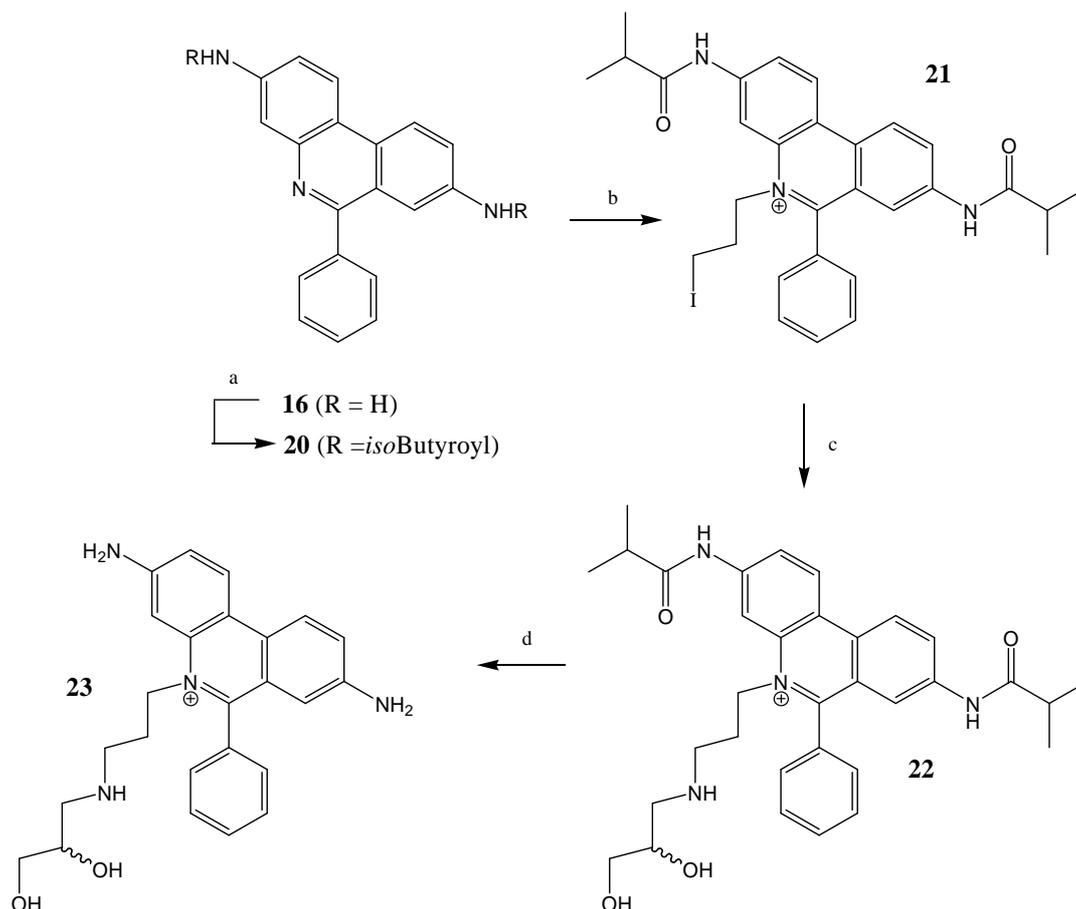


Abb. 60: Synthese von **21**, **22** und **23**: **a**: Isobuttersäureanhydrid (2.0 equiv.), DCM, RT, 18 h, 89 %, **b**: 1,3-Diiodpropan, 40 °C, Ultraschall, 2 h, dann 150 °C, 6 h, 77 %, **c**: **17** (1.0 equiv.), Et₃N (20 equiv.), DMF, RT, 18 h, 54 %, **d**: 48 % HBr (in H₂O), 80 °C, 3 h, quant.

Um den Einfluss der beiden *Isobutyroyl*-Schutzgruppen auf die optischen Eigenschaften zu bestimmen, wurde von den Verbindungen **22** und **23** das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Der Unterschied der Absorption ist mit dem bloßen Auge zu erkennen. Während eine Lösung der Verbindung **22** in MeOH eine gelbe Farbe aufweist, ist die Lösung von Verbindung **23** in MeOH rot-violett gefärbt, der typischen Farbe von Ethidium (**7**) in MeOH. Die entschützte Verbindung **23** verhält sich in Absorption und Fluoreszenz ähnlich wie Ethidium (**7**) (Abbildung 61).

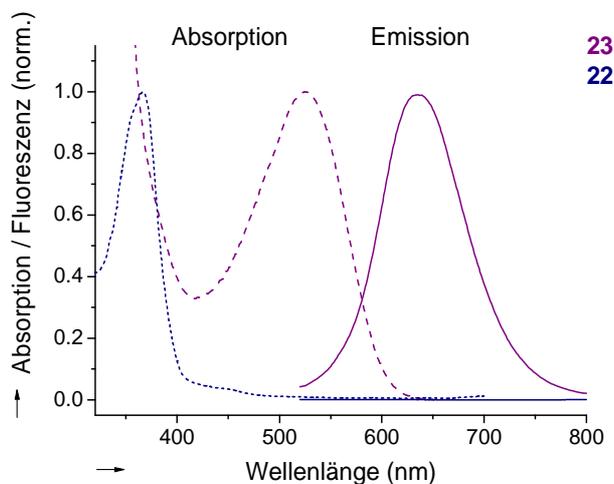


Abb. 61: Absorption und Fluoreszenz der beiden Ethidium-Derivate **22** und **23**, Anregung bei 500 nm.

Zur Herstellung des fertigen DNA-Bausteins **25** muss zunächst die primäre Hydroxygruppe von **22** mit der DMT-Gruppe versehen werden und die verbleibende sekundäre Hydroxygruppe von **24** zum Phosphoramidit umgesetzt werden (Abbildung **62**).

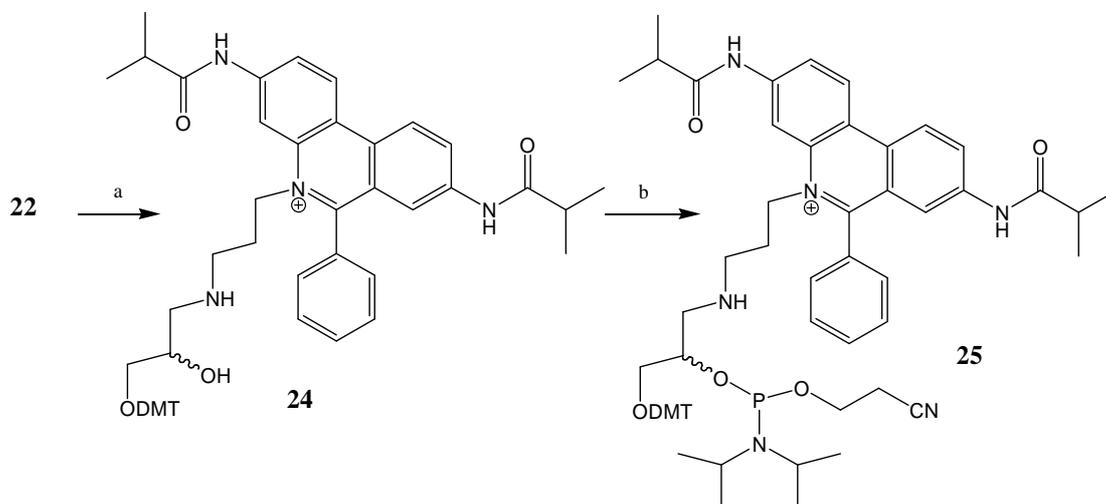


Abb. 62: Synthese des DNA-Bausteins **25**: **a**: DMTCl (3.0 equiv.), Pyridin, RT, 20 h, 67 %, **b**: (*i*Pr₂N)P(OCH₂CH₂CN)(Cl) (1.1 equiv.), DIPEA (3.0 equiv.), DCM, RT, 12 h, quant.

Die Trityldaten eines Einbauversuchs mit dem DNA-Baustein **25** am DNA-Synthesizer zeigen einen erfolgreichen Einbau in die Oligonukleotide (Abbildung **63**). Für den Einbau Ethidiumhaltiger Phosphoramidite müssen die Standard-Protokolle zum Einbau in DNA variiert werden, um einen signifikanten Abfall der Einbaueffizienz nach dem Einbau des Ethidium-Nukleosidanalogons **25** zu verhindern.

Um die Kupplungseffizienz zu erhöhen, wurden folgende Bedingungen verändert: die Konzentration des Phosphoramidits, die Kupplungszeit sowie die Anzahl der Kupplungszyklen. Die Optimierung des Kupplungszyklus und die in dieser Arbeit verwendeten Kupplungsprotokolle sind in Kapitel 6 abgebildet.

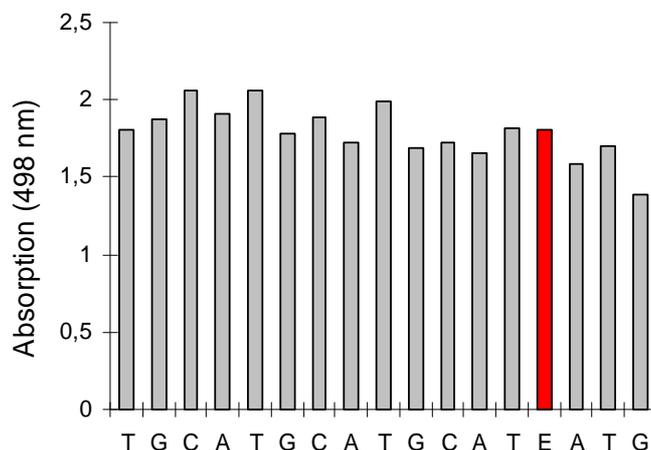


Abb. 63: *Trityl*-daten des Einbaus von **25** in DNA, Sequenz: 3'-TGC-ATG-CAT-GCA-TEA-TG-5'.

Bei der anschließenden Aufarbeitung der modifizierten Oligonukleotide musste allerdings festgestellt werden, dass die beiden *Isobutyryl*-Schutzgruppen der Oligonukleotid-Konjugate unter den typischen DNA-Aufarbeitungsbedingungen in konz. NH_4OH nicht abgespalten werden. Das lässt sich an dem Absorptionsverhalten ($\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$) feststellen, die Lösung blieb bei der DNA-Aufarbeitung gelb. Daher wurde versucht, mit dem Ethidium-Derivat **22** eine erfolgreiche Abspaltung der beiden *Isobutyryl*-Gruppen auszuarbeiten (Tabelle 3). Zahlreiche Versuche mit verschiedenen Säuren und Basen, unter trockenen und wässrigen Bedingungen blieben erfolglos. Ausschließlich die Behandlung mit starken wässrigen Säuren (wie zum Beispiel 48 % HBr) bei erhöhter Temperatur spaltete die Amidbindungen in der Verbindung **22**. Diese Bedingungen können bei der Oligonukleotid-Aufarbeitung allerdings nicht angewendet werden.

Tab. 3: Bedingungen für Abspaltung der Isobutyrylschutzgruppen bei **22**.^[262,263]

Abspaltungsbedingungen	Ergebnis ^a
2 % DCE in ACN, RT, 6 h	Keine Reaktion
40 % HOAc, RT, 6 h	Keine Reaktion
HBr/H ₂ O, 60 °C, 2 h	Reaktion zum Produkt
NH ₄ OH conc., 60 °C, 10 h	Keine Reaktion
NaOH/MeOH, 60 °C, 8 h	Keine Reaktion
Cs ₂ CO ₃ in DMF, RT, 4 h	Keine Reaktion
<i>p</i> TsOH/MeOH, RT, 6 h	Keine Reaktion
Ethanolamin/MeOH/Hydrazin, RT, 6 h	Keine Reaktion

^a: Nachweis durch HPLC-MS (ESI)

Aus diesem Grund musste die Schutzgruppenstrategie nochmals überdacht werden. Sinnvoll erschien es, anstelle von Isobutyryl-Schutzgruppen Allyloxycarbonyl-Schutzgruppen (Alloc) zu verwenden, die unter Pd(0)-Katalyse gut abgespalten werden können.^[254] Diese Strategie hat den Vorteil, dass sie für DNA verwendet werden kann, da die Alloc-Abspaltung typischerweise im neutralen oder basischen Milieu durchgeführt wird und dadurch eine Säurehydrolyse der DNA vermieden wird. Ein wichtiger Punkt bei der Pd(0)-katalysierten Abspaltung ist die vollständige Entfernung der Metallionen nach der Reaktion, da sonst sowohl Struktureinflüsse als auch eine Zersetzung der DNA stattfinden können. Deshalb ist eine Entschützung der DNA nach der DNA-Festphasensynthese und vor der Abspaltung vom CPG sinnvoll, um Pd-Ionen sicher abtrennen zu können. Die DNA-Synthese und die nachfolgende Entschützung mit den vollständig Alloc-geschützten Nukleosiden dA, dC, dG und T wurden von *Noyori et al.* erfolgreich durchgeführt.^[256]

Dementsprechend musste ein neues Ethidium-Derivat **28** hergestellt werden, bei dem die beiden exozyklischen Aminofunktionen in Position 3 und 8 des Ethidium-Grundgerüsts mit Alloc-Schutzgruppen ausgestattet sind. In Testexperimenten mit analytischen Mengen verlief die Abspaltung der beiden Alloc-Schutzgruppen von **26** wie erwartet quantitativ innerhalb weniger Minuten (0.1 equiv. Pd(0)-Katalysator, 10 equiv. Dimedon, THF, RT, 30 min).

Die Herstellung der Verbindung **28** verläuft analog der Herstellung der Verbindung **22** und mit vergleichbaren Ausbeuten. Ausgehend von 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin (**16**) werden zunächst die beiden NH₂-Gruppen mittels Chlorameisensäureallylester als Allyloxycarbonyle geschützt. Anschließend wird **26** an der N-5 Position mit 1,3-Diiodpropan alkyliert. Dazu wird **26** bei 40 °C für 2 h unter Anwendung von Ultraschall in 1,3-Diiodpropan gelöst und anschließend 6 h unter Rückfluss erhitzt. Das Alkylierungsmittel dient dabei gleichzeitig als Lösungsmittel. Die Abtrennung des Produkts **27** erfolgt mittels HPLC. Die geringe Ausbeute von etwa 30 % d. Th. konnte auch durch längere Reaktionszeiten nicht gesteigert werden.

27 wird nun in einer nukleophilen Substitution mit 3-Amino-propan-1,2-diol (**17**) bei RT zur Reaktion gebracht. Das durch HPLC abgetrennte Produkt **28** wird mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTCl) zum Ethidium-Nukleosidanalogon **30** umgesetzt und durch FC gereinigt (Abbildung **64**). Auffallend ist hier der hohe DMTCl-Bedarf von vier Äquivalenten.

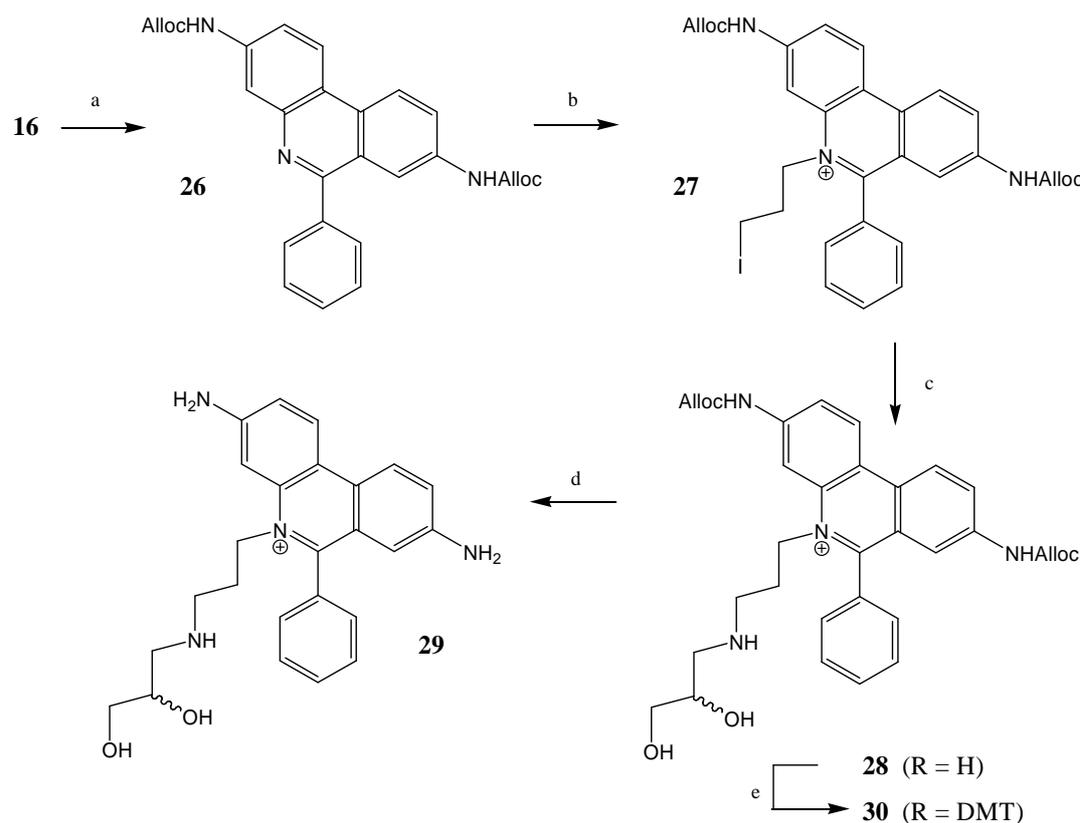


Abb. 64: Synthese der Bausteine **26**, **27**, **28** und **29**: **a**: Chlorameisensäureallylester (10 equiv.), DCM, RT, 24 h, 86 %, **b**: 1,3-Diiodpropan, 40 °C, Ultraschall, 2 h, dann 150 °C, 6 h, 30 %, **c**: **17** (1.0 equiv.), Et₃N (20 equiv.), DMF, RT, 12 h, quant., **d**: Pd(PPh₃)₄ (20 equiv.), Pyridin, RT, 1 h, quant., **e**: DMTCl (4.0 equiv.), Pyridin, RT, 20 h, 44 %.

Vom Ethidium-Derivat **28** wurde das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum aufgenommen und mit dem des Ethidium-Derivats **29** verglichen (Abbildung **65**). Hier ist der Unterschied der Absorption mit dem bloßen Auge zu erkennen. Während eine Lösung der Verbindung **28** in MeOH eine gelbe Farbe aufweist, ist die Lösung von Verbindung **29** in MeOH rot-violett gefärbt, der typischen Farbe von Ethidium (**7**) in MeOH.

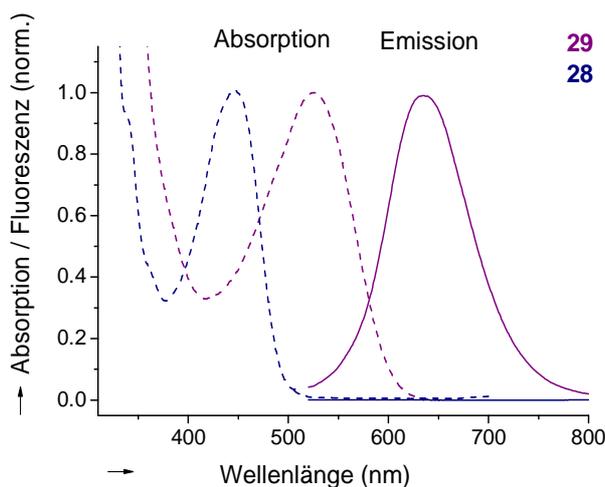
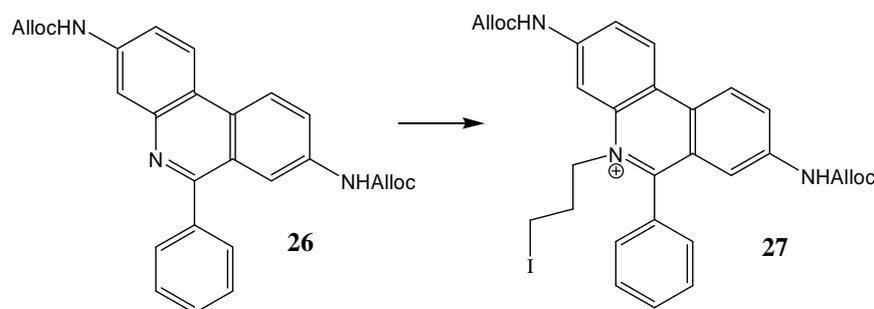


Abb. 65: Absorption und Fluoreszenz der beiden Ethidium-Derivate **28** und **29**, Anregung bei 500 nm.

Der oben beschriebene Syntheseweg weist allerdings zwei gravierende Nachteile auf: Zum einen ist die Ausbeute des Alkylierungsschrittes mit 30 % der limitierende Faktor der Synthese und zum anderen ist die Reinigung der Zwischenstufe **28** aufwendig und mindert die Ausbeute deutlich. Für die routinemäßige Synthese phenanthridiniumhaltiger Oligonukleotide ist es aber unabdingbar, größere Substanzmengen rasch und in guten Ausbeuten herstellen zu können. Durch die Arbeit von R. Huber^[264] konnten sowohl die Alkylierungsreaktion als auch die Gesamtausbeute des Phosphoramidits durch eine veränderte Synthesestrategie optimiert werden. Der Alkylierungsschritt ist mit nur 30 % Ausbeute die limitierende Reaktion der in Tab. 4 dargestellten Synthese und bietet somit das größte Potential zur Steigerung der Gesamtausbeute. Ausgehend von einer Reaktionsführung, bei der das Alkylierungsmittel 1,3-Diiodpropan auch als Lösungsmittel diente, wurden Lösungsmittel und Alkylierungsreagenz variiert. In den organischen Standardlösungsmitteln wie z. B. MeCN, MeOH, EtOH, DCM, CHCl₃, DMF, Diethylether, *tert*-Butylmethylether und Dioxan ist die Löslichkeit von **26** und **27** nahezu identisch, in THF ist das Produkt **27** jedoch wesentlich schlechter löslich als das Edukt **26**. Zur Darstellung von **27** wird **26** mit einem Überschuss an 1,3-Diiodpropan in THF gelöst und unter Rückfluss erhitzt.

Da **26** in THF gut löslich ist, entfällt hier die Behandlung der Reaktionslösung mit Ultraschall, wie sie bei der Verwendung von 1,3-Diiodpropan als Solvens nötig ist. Das Produkt kristallisiert aus der Reaktionslösung aus. Nach dem Waschen des Niederschlags mit THF erhält man **27** ohne Verunreinigungen in 82 % Ausbeute. Der Reinigungsschritt mittels HPLC entfällt somit. Entsprechend des niedrigeren Siedepunkts von THF erniedrigt sich die Reaktionstemperatur von 150 °C auf 65 °C, wodurch sich auch die Reaktionszeit von 8 h auf 9 d erhöht (Tabelle 4). Diese wesentlich mildere Alkylierungsvorschrift ist allerdings nicht für alle Schutzgruppen geeignet: so wird bei dem Trifluoracetamid-geschützten Phenanthridin **19** als Edukt eine Abspaltung der Schutzgruppen beobachtet.

Tab. 4: Optimierung der Alkylierungsreaktion zur Synthese von **27**.



Alkylierungsreagenz	Lösungsmittel	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
I-(CH ₂) ₃ -I	I-(CH ₂) ₃ -I	8 h, 150 °C	30 %
I-(CH ₂) ₃ -I	THF	9 d, 65 °C	82 %

Ein weiterer Nachteil der Synthese des Ethidium-Nukleosidanalogs **27** nach obigem Syntheschema (Abbildung 64) ist die aufwendige Reinigung der Zwischenstufe **28**. Die Abtrennung von **28** aus der Reaktionsmischung ist entweder durch HPLC-Trennung oder durch Säulenchromatographie mit Wasser- und ACN-haltigen Laufmittel-Mischungen möglich. Aufgrund des kleinen R_f-Werts der Verbindung **28** treten hohe Verluste bei der Reinigung durch an Kieselgel adsorbiertes Produkt auf. Zusätzlich ist nach der Säulenchromatographie die Abtrennung des gelösten Kieselgels notwendig, was zu einer Ausbeute-Minderung führt. Aus diesem Grund soll **27** nicht mit 3-Amino-propan-1,2-diol (**17**) sondern mit 1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**34**) umgesetzt werden. Die Zwischenstufe **28** wird somit umgangen.

Die Synthese von 1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**34**) ist in der Literatur beschrieben^[265] und erfolgt ausgehend von 3-Amino-propan-1,2-diol (**17**). Bei einer direkten Umsetzung von **17** mit DMTCl verursacht die freie Aminofunktion eine Reihe von Nebenreaktionen und macht so den Einsatz einer Schutzgruppe erforderlich. Als Schutzgruppe wurde die Trifluoracetylgruppe (TFA-Gruppe) ausgewählt, da sie leicht unter basischen Bedingungen abspaltbar und somit orthogonal zur DMT-Gruppe ist. Die Einführung dieser Schutzgruppe gelingt mit Trifluoressigsäuremethylester. Dieses relativ milde *N*-Trifluoracetylierungsreagenz weist gegenüber dem Standardreagenz Trifluoressigsäureanhydrid mehrere Vorteile auf:

- Eine selektive *N*-Trifluoracetylierung ist auch in Gegenwart von Hydroxygruppen möglich^[266]
- Der niedrige Siedepunkt von Trifluoressigsäuremethylester von 42 °C erlaubt eine vollständige Entfernung des im Überschuss eingesetzten Reagenzes durch Destillation im Vakuum.
- Als Nebenprodukt entsteht Methanol. Auch dieses kann durch Destillation im Vakuum vollständig entfernt werden.

Auf diese Weise erhält man *N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid (**32**) nahezu quantitativ (99 % d. Th). Die Einführung der DMT-Gruppe in **32** gelingt nun nach Standardvorschrift mit DMTCl. Ein Überschuss an DMTCl ist zu vermeiden, da sonst als Nebenreaktion auch die sekundäre Hydroxyfunktion trityliert wird. Nach Reinigung mittels FC erhält man **33** in 82 % Ausbeute. Im letzten Schritt wird die TFA-Gruppe mit wässriger NH₃-Lösung quantitativ abgespalten (Abbildung 66).

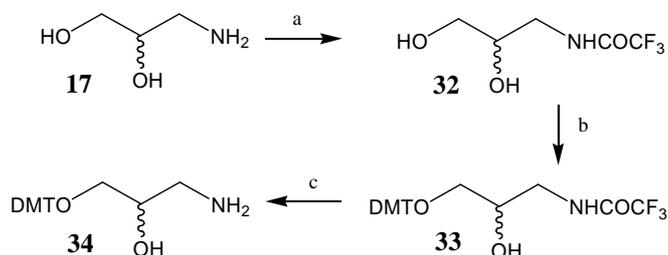


Abb. 66: Synthese von 1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**34**) ausgehend von 3-Amino-propan-1,2-diol (**17**): **a:** Trifluoressigsäuremethylester, RT, 12 h, 99 %, **b:** DMTCl (1.0 equiv.), RT, 12 h, 82 %, **c:** NH₄OH/MeOH, RT, 12 h, quant.

1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**34**) ist somit über drei Stufen in 82 % Ausbeute gut zugänglich. Während bei der Einführung der DMT-Gruppe in **28** vier Äquivalente DMTCl erforderlich sind, konnte der Bedarf bei **33** auf ein Äquivalent reduziert werden. Dies ist weniger als Kostenfaktor zu sehen, vielmehr erleichtert es die Reinigung des tritylierten Produkts.

34 kann nun mit **27**, wie im Folgenden dargestellt, umgesetzt werden (Abbildung 67):

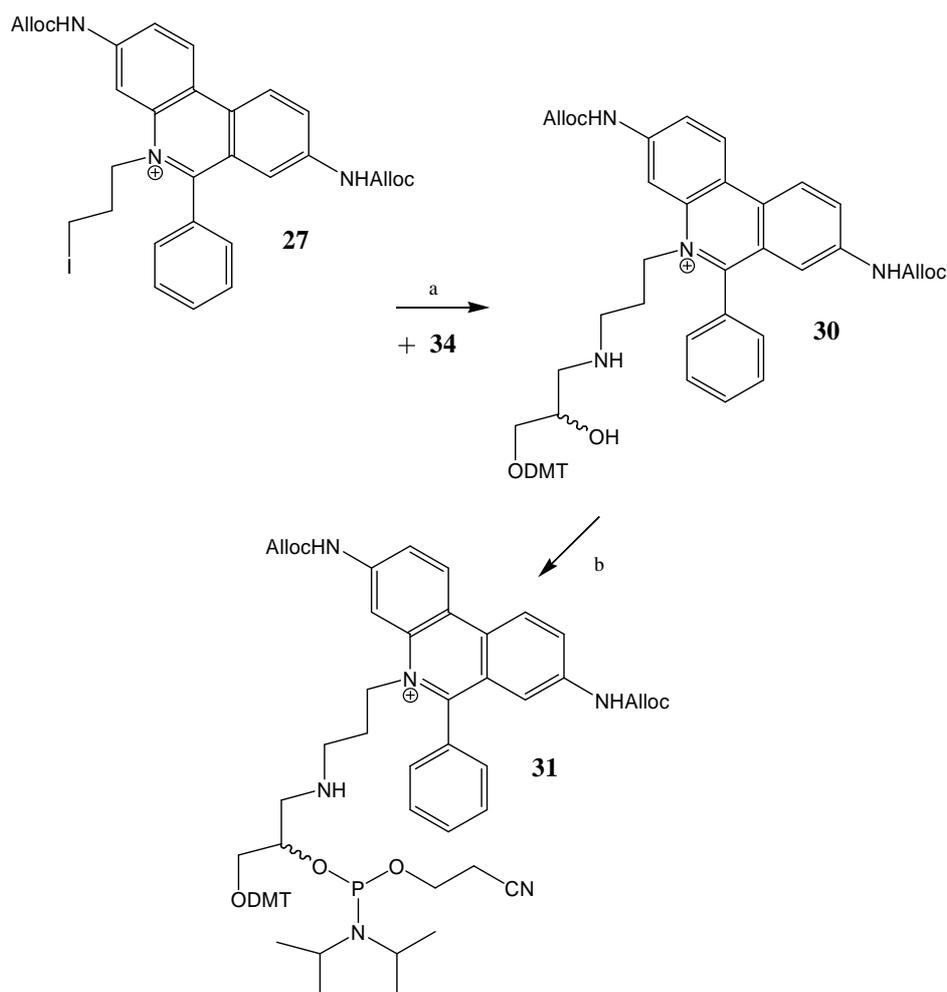


Abb. 67: Synthese von **30** ausgehend von **34** und **27** und Synthese des Phosphoramidits **31**: **a:** **34** (1.5 equiv.), DMF, TEA, RT, 55 h, 91 %, **b:** (*i*Pr₂N)P(OCH₂CH₂CN)(Cl) (1.0 equiv.), DIPEA (3.0 equiv.), DCM, RT, 12 h, quant.

Um eine vollständige Umsetzung von **27** zu erreichen, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, das Amin **34** im Überschuss auf zwei Portionen verteilt zuzugeben: Man setzt zuerst **27** mit 1.1 equiv. **34** und 2.0 equiv. DIPEA bei RT in DMF um, gibt nach 40 h erneut 0.4 equiv. **34** und 1.0 equiv. DIPEA zu und rührt weitere 15 h bei RT.

Nach Reinigung mittels FC erhält man **30** mit einer Ausbeute von 91 %. Die Base DIPEA ist nötig, um bei der Reaktion entstehendes HI zu neutralisieren. Dadurch werden saure Bedingungen, die zur Abspaltung der DMT-Schutzgruppe führen würden, vermieden.

Durch die verbesserte Alkylierungsreaktion und die Umstellung der Synthesestrategie konnte die Gesamtausbeute bezogen auf **30** von 19 % (Abbildung 64) auf 73 % (Abbildungen 66 und 67) erhöht und somit fast vervierfacht werden. Durch diese Syntheseoptimierung ist **30** schnell, effizient, sauber und in größeren Mengen zugänglich. Die Grundvoraussetzungen für einen routinemäßigen Einbau in DNA sind somit erfüllt und der DNA-Baustein **31** kann aus dem Ethidium-Derivat **30** hergestellt werden.

Die erfolgreiche Einführung von **31** in Oligonukleotide lässt sich durch die im Folgenden abgebildete Trityl Daten belegen (Abbildung 68).

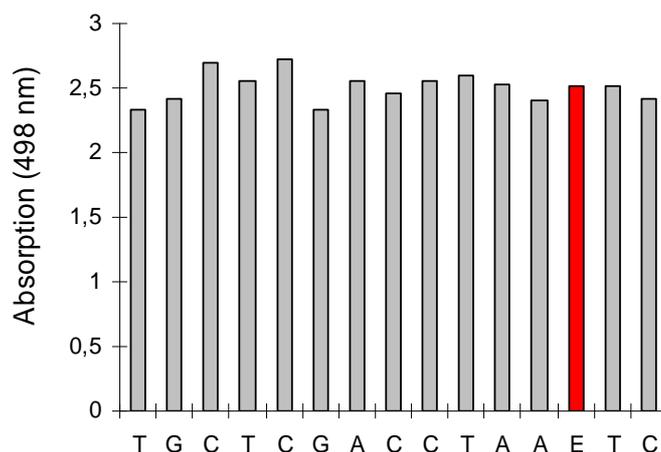


Abb. 68: Trityl Daten der DNA-Festphasensynthese von 3'-TGC-TAC-GAC-CTA-ETC-5' mit dem Ethidium-haltigen Phosphoramidit **31**, optimierte Synthese.

Die Alloc-Schutzgruppen der Ethidium-Oligonukleotid-Konjugate wurden anschließend unter Pd(0)-Katalyse abgespalten.^[267] Dazu wurde das Oligonukleotid auf der festen Phase belassen, damit die Reagenzien in großem Überschuss eingesetzt werden können und anschließend einfach abtrennbar sind (Tabelle 5).

Tab. 5: Bedingungen für die Abspaltung der Allocschutzgruppe von Oligonukleotiden.^[255,256]

Abspaltungsbedingungen	Ergebnis ^a
Dimedon, Pd[(PPh ₃) ₄], THF, RT, 30 min	Produkt entsteht
Pyridin, Pd[(PPh ₃) ₄], THF, RT, 30 min	Keine Reaktion
MeOH, Pd[(PPh ₃) ₄], THF, RT, 30 min	Produkt entsteht in Spuren
TEA, Pd[(PPh ₃) ₄], THF, RT, 30 min	Keine Reaktion
DIPEA, Pd[(PPh ₃) ₄], THF, RT, 30 min	Keine Reaktion

^a: Nachweis durch MALDI-MS

Die erfolgreiche Abspaltung kann mit dem bloßen Auge verfolgt werden, da die Farbe der festen Phase von gelb ($\lambda_{max} = 480$ nm) nach rot-violett ($\lambda_{max} = 530$ nm) umschlägt (Abbildung 69).

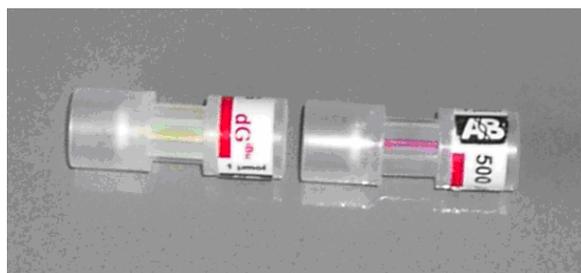


Abb. 69: CPG einer Testsequenz (vgl. Abbildung 73) vor (links) und nach (rechts) der Abspaltung der Allocschutzgruppe.

Anschließend wurden die Ethidium-modifizierte Oligonukleotide nach dem Standardprotokoll von der festen Phase abgespalten und aufgearbeitet. Bei der anschließenden HPLC-Analytik der Roh-DNA konnte allerdings kein Hauptprodukt identifiziert werden (Abbildung 70). Auch die Analytik der Roh-DNA mit MALDI-TOF-MS konnte keinen Nachweis des gewünschten Oligonukleotids liefern. Die DNA-Entschützung lieferte reproduzierbar zu hohe Massen.

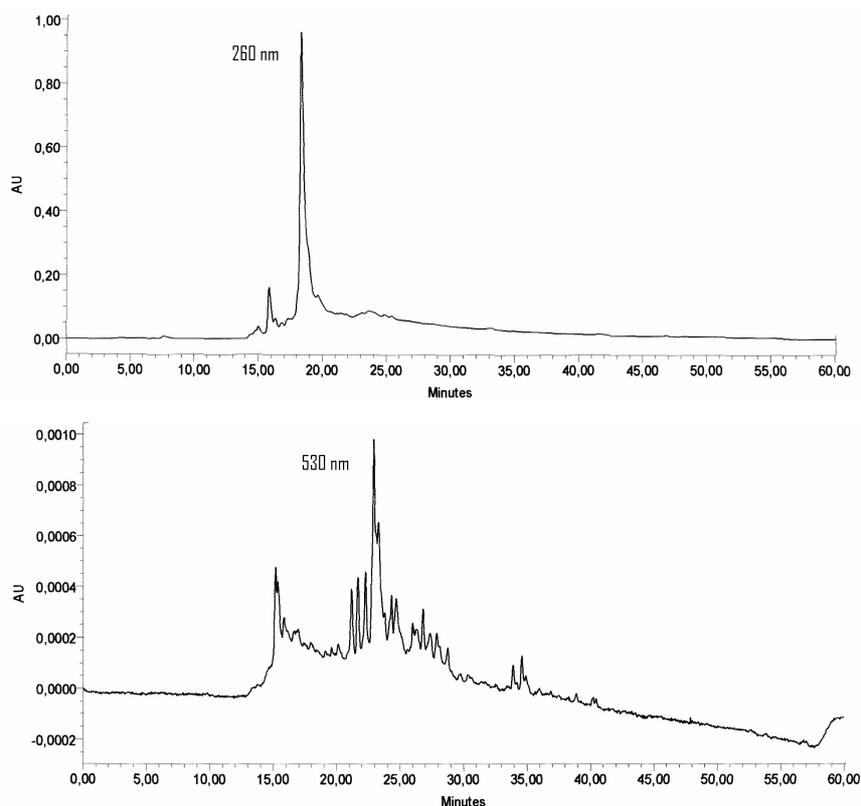


Abb. 70: HPLC-Analytik einer Testsequenz (siehe Abbildung 73) nach der DNA-Festphasensynthese mit dem Ethidium-haltigen Phosphoramidit **31** bei 260 nm (oben) und 530 nm (unten): es kann kein Ethidium-haltiges Hauptprodukt identifiziert werden.

Diese Beobachtungen können den folgenden Grund haben: **30** weist zwei reaktive Positionen auf: eine Hydroxygruppe und ein sekundäres Amin. Versucht man nun, **30** zum Phosphoramidit **31** umzusetzen, ist ein eindeutiger Verlauf der Phosphorylierungsreaktion nicht gewährleistet, da prinzipiell sowohl eine *O*- als auch eine *N*-Phosphorylierung möglich ist. Ein *N*-phosphoryliertes Phosphoramidit kann zu Nebenreaktionen bei der DNA-Synthese führen. Zusätzlich scheinen bei der Palladium-katalysierten Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen Nebenreaktionen wie eine Alloc-Übertragung (Nachweis durch MALDI-MS) aufzutreten. Deshalb muss die Synthesestrategie erneut geändert werden.

Im Hinblick auf die weitere Synthese ist es sinnvoll, die Schutzgruppenstrategie so zu ändern, dass die Abspaltung der Allyloxycarbonyl-Schutzgruppen bereits während der Nukleosidsynthese und nicht erst nach erfolgter Oligonukleotidsynthese durchgeführt wird. Auf diese Weise kann ein Kontakt von DNA mit Palladium gänzlich vermieden werden. Zusätzlich soll die sekundäre Aminofunktion in **30** mit der gleichen Schutzgruppe modifiziert werden. Die Auswahl der Schutzgruppe erfolgt nach folgenden Kriterien:

- Die Schutzgruppe muss kompatibel zu den Bedingungen der DNA-Festphasensynthese, das heißt orthogonal zur DMT-Gruppe sein.
- Die Schutzgruppe muss unter Nukleosid-verträglichen Bedingungen abspaltbar sein.
- Es muss eine selektive Modifikation der Aminogruppe in Gegenwart einer Hydroxygruppe möglich sein.

Eine Schutzgruppe, die alle genannten Anforderungen erfüllt, ist die Trifluoracetyl-Schutzgruppe. Sie ist gegenüber den Bedingungen der DNA-Festphasensynthese stabil und wird bei der Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase durch wässrigen NH_3 gleichzeitig mit den permanenten Schutzgruppen der natürlichen Basen abgespalten.

Die Synthese des Ethidium-haltigen Phosphoramidits konnte nun wie folgt durchgeführt werden: Der Baustein **30** wird, wie oben beschrieben (Abbildungen **66** und **67**), synthetisiert. Dann können die Alloc-Schutzgruppen durch Pd(0)-Katalyse abgespalten (**29**) und durch Trifluoracetylschutzgruppen (**35**) ersetzt werden. Gleichzeitig wird bei diesem Schritt die sekundäre Aminofunktion des Linkers geschützt. Dann kann **35** in einem weiteren Schritt zum Phosphoramidit (**36**) umgesetzt werden. Die Einführung einer Trifluoracetylschutzgruppe schon vor der Alkylierung von 3,8-Diamono-6-phenyl-phenanthridin ist nicht möglich, da sie instabil gegenüber den Bedingungen der Alkylierung mit 1,3-Diiodpropan ist.

Der erste Schritt, die Palladium-katalysierte Abspaltung der Allyloxycarbonyl-Schutzgruppen folgt dem Mechanismus der Palladium-katalysierten Allylübertragung.^[268,269] Da Dimedon bereits erfolgreich als Nukleophil zur Abspaltung von Allyloxycarbonyl-Schutzgruppen exozyklischer Aminofunktionen in DNA Basen verwendet wurde,^[256] wurden die ersten Abspaltungsversuche an Baustein **30** mit Dimedon durchgeführt. Die erfolgreiche Abspaltung kann mit bloßen Auge verfolgt werden, da die Farbe der Lösung von gelb nach violett umschlägt. Zusätzlich wurden verschiedene andere Nukleophile für diese Reaktion am Ethidium-Derivat **30** getestet (Tabelle **6**). Dazu wurde **30** mit dem jeweiligen Nukleophil und $\text{Pd}[(\text{PPh}_3)_4]$ im Überschuss umgesetzt und nach 30 min. mittels HPLC-MS analysiert. Der Anteil der Nebenprodukte wurde aus den HPLC-MS-Daten abgeschätzt.

Tab. 6: *Abspaltungsbedingungen an 30 für die Alloc-Abspaltung nach der Einführung eines Ethidium-haltigen Phosphoramidits in Oligonukleotide. Die Detektion erfolgte durch ESI-HPLC-MS.*

Nukleophil (Allylakzeptor)	Produkt	Nebenprodukte
Dimedon ^[127]	86 %	14 %
Anilin	80 %	20 %
3-Amino-propan-1-ol	nahezu quantitativ	Spuren
Benzylamin	82 %	18 %
Morpholin ^[127]	86 %	14 %
Bu ₃ SnH / H ₂ O ^[126]	quant.	nicht nachweisbar

Die Abspaltung mit Bu₃SnH/H₂O stellte sich als am besten geeignet heraus. Das gewünschte Produkt kann chromatographisch gereinigt werden. Eine Allylübertragung auf DNA-Basen als mögliche Nebenreaktion kann durch den großen Überschuss an Bu₃SnH unterdrückt werden.

Der nächste Schritt, die Schützung der exozyklischen Aminofunktionen, erfolgt gleichzeitig mit der Schützung der sekundären Aminofunktion von **29**. Die Verwendung von TFA-Schutzgruppen für alle drei reaktiven Positionen erscheint ideal, da zu erwarten ist, dass diese während der Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase ebenfalls abgespalten werden. Die Reaktion wird mit Trifluoressigsäureanhydrid in einer DCM/Pyridin-Mischung im Verhältnis 5/1 durchgeführt (Abbildung 71). Das Produkt kann chromatographisch gereinigt werden. **35** ist relativ instabil und zersetzt sich nach einigen Tagen durch den Einfluss von Luftfeuchtigkeit unter Abspaltung der TFA-Schutzgruppen.

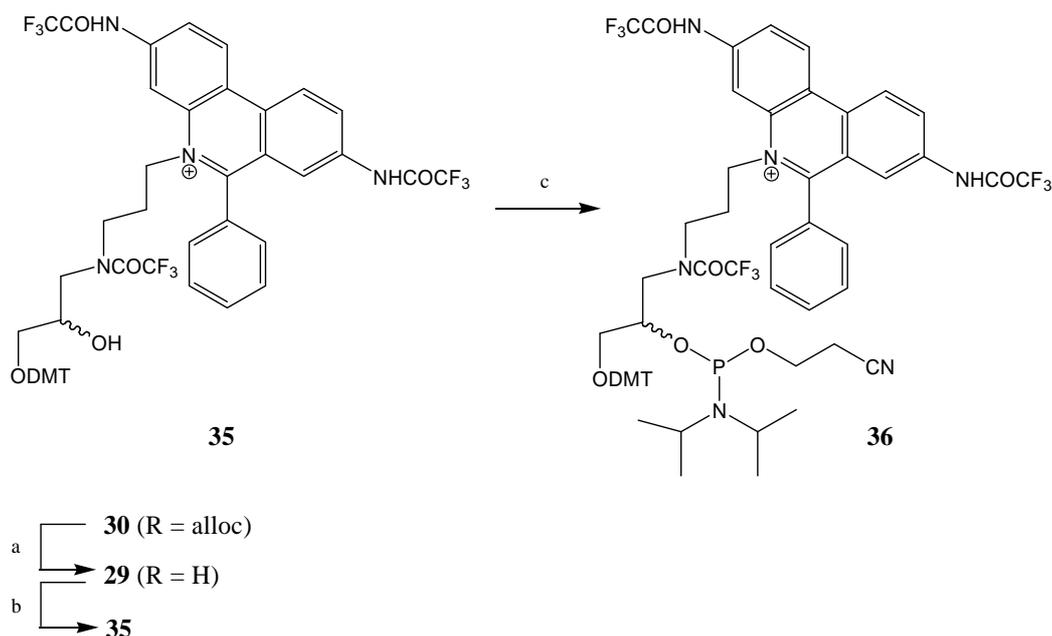


Abb. 71: Synthese von **36**, ausgehend von **30**: **a:** $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.02 equiv.), PPh_3 (0.2 equiv.), Bu_3SnH (3.0 equiv.), $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ (0.1 %), RT, 90 min, 97 %, **b:** Trifluoressigsäureanhydrid (6.0 equiv.), 0 °C, 10 min, RT, 10 min, 59 %, **c:** $(i\text{Pr}_2\text{N})\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})(\text{Cl})$ (1.1 equiv.), DIPEA (3.0 equiv.), DCM , RT, 12 h, 50 %.

Die Umsetzung von **35** zum Phosphoramidit wird, wie schon mehrfach beschrieben, unter Standardbedingungen ausgeführt und liefert das Phosphoramidit **36**. Der Baustein **36** kann dann für eine DNA-Synthese unter den in Kapitel 6 beschriebenen, optimierten Bedingungen eingesetzt werden. Die Tritylaten einer Kupplung sind im Folgenden exemplarisch abgebildet und zeigen eine gute Kupplungseffizienz (Abbildung 72).

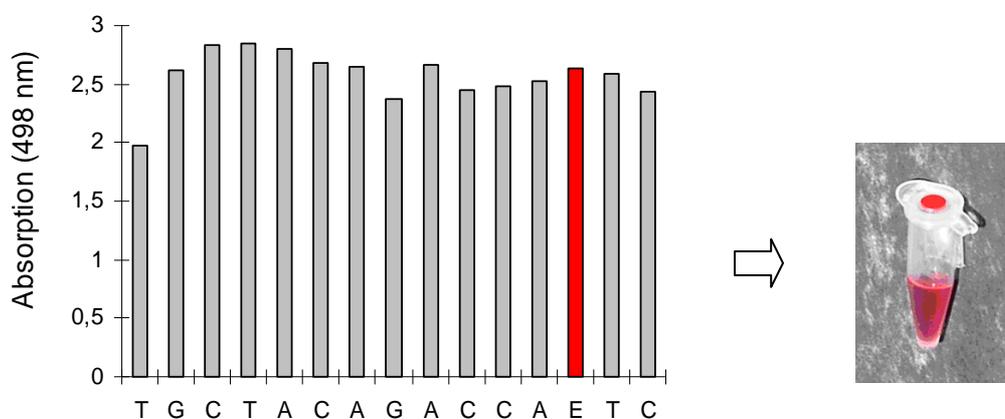


Abb. 72: Tritylaten der DNA-Festphasensynthese von 3'-TGC-TCG-ACC-TAA-**E**TC-5' und abgespaltene DNA.

Zur Abspaltung der Schutzgruppe und zur Abspaltung der DNA vom CPG-Harz wird 5 h bei 50 °C mit NH_4OH behandelt. Wenige Minuten nach Beginn der Abspaltung wird der Farbumschlag von gelb zu rot-violett beobachtet (Abbildung 73).

Die HPLC-Analytik nach der Abspaltung vom CPG zeigt, dass im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Experimenten selektiv die Schutzgruppen ohne Nebenreaktionen entfernt werden können und die gewünschte ethidium-modifizierte DNA als Hauptprodukt entsteht (Abbildung 73). Da mit dem Phosphoramidit **36** eine racemische Verbindung eingesetzt wurde, entstehen in der chiralen Umgebung der Oligonukleotide zwei Diastereomere, die im HPLC-Spektrum als zwei Peaks sichtbar werden. Ein Problem ist allerdings die Verwendung eines racemischen Bausteins. Das Verhältnis der Enantiomere nach dem Einbau in DNA ist durch die jeweilige DNA-Sequenz beeinflusst und kann sich – schon bei geringen Unterschieden in der Sequenz – deutlich ändern.

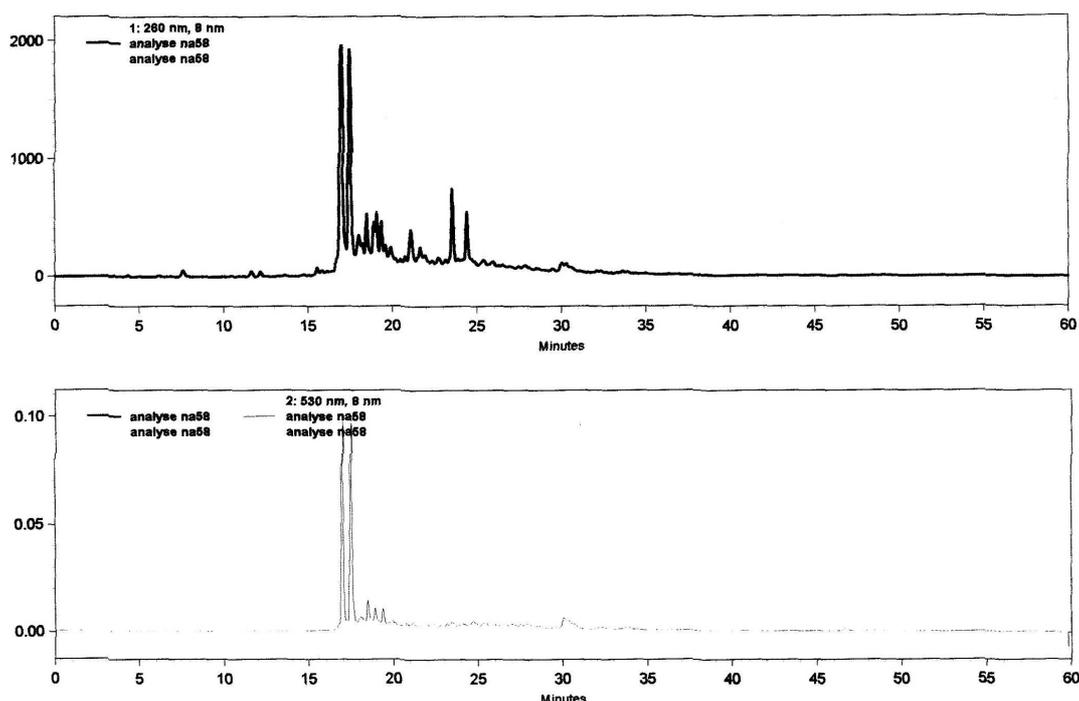


Abb. 73: Exemplarische Darstellung der HPLC-Analyse der Rohprodukte nach der Abspaltung vom CPG, Gradient 0-30 % in 45 min, Sequenz: 3'-GTC-GTA-ETA-ZTA-CGA-C-5'.

Die Reinigung der Roh-DNA erfolgt mit Hilfe der Fluoreszenz-Analytik (Anregung 530 nm, Emission 580 nm), sowie mit Hilfe der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 530 nm. Das gereinigte Produkt wird anschließend zur Kontrolle der Reinheit nochmals durch HPLC analysiert (Abbildung 74).

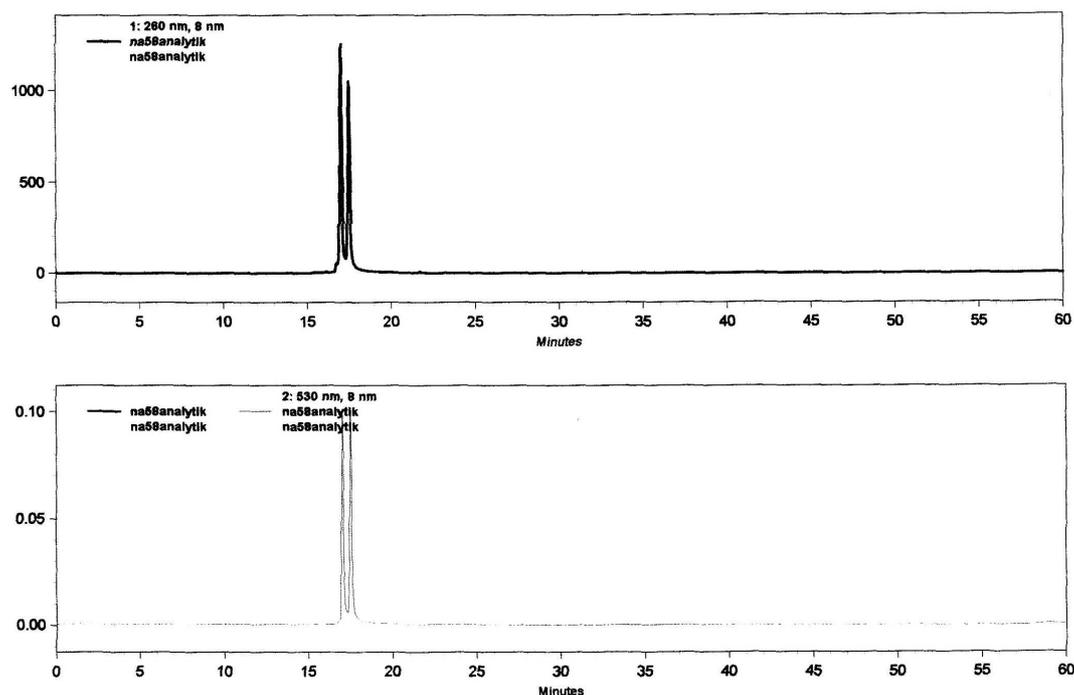


Abb. 74: Exemplarische Darstellung der HPLC-Analyse nach der chromatographischen Reinigung, Gradient 0-30 % in 45 min, Sequenz: 3'-GTC-GTA-ETA-ZTA-CGA-C-5'.

Nach der chromatographischen Reinigung wird die Masse des Oligonukleotids durch MALDI-TOF-MS bestimmt.

Um strukturell einheitliche Oligonukleotide zu erhalten, muss anstelle des racemischen Bausteins **36** das enantiomerenreine Phosphoramidit hergestellt werden. Nachdem mit **36** ein Ethidiumhaltiges Phosphoramidit synthetisiert werden konnte, wird die Synthesesequenz mit einem enantiomerenreinen Baustein wiederholt. Als Ausgangsverbindung wird das *S*-konfigurierte Amin (*S*)-1-Amino-propan-1,2-diol **S-17** verwendet, das kommerziell erhältlich ist. Die *S*-Konfiguration soll die Konformation der 2'-Desoxyribose nachahmen (Abbildung 75).

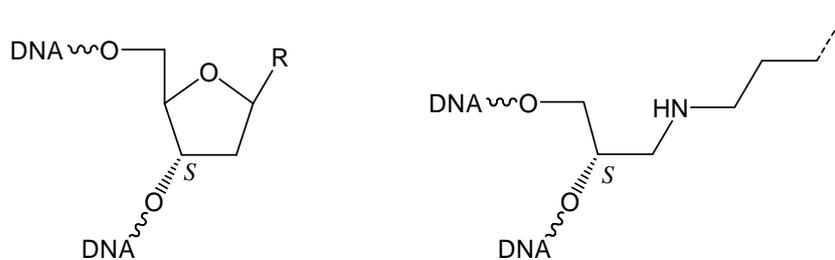


Abb. 75: Vergleich der 2'-Desoxyribose in DNA (links) und des *S*-konfigurierten Amins (rechts).

Die Reaktionsbedingungen bei der Synthese des Bausteins **S-36** entsprechen denen der Synthese des racemischen Bausteins **36** (Abbildung 76 und Abbildung 77).

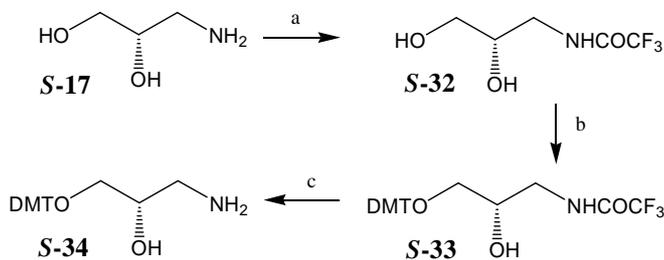


Abb. 76: Synthese von (*S*)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (**S-34**) ausgehend von **S-17**:^[264] **a:** Trifluoressigsäuremethylester, RT, 12 h, 99 %, **b:** DMTOCl (1.0 equiv.), RT, 12 h, 82 %, **c:** NH₄OH/MeOH, RT, 12 h, quant.

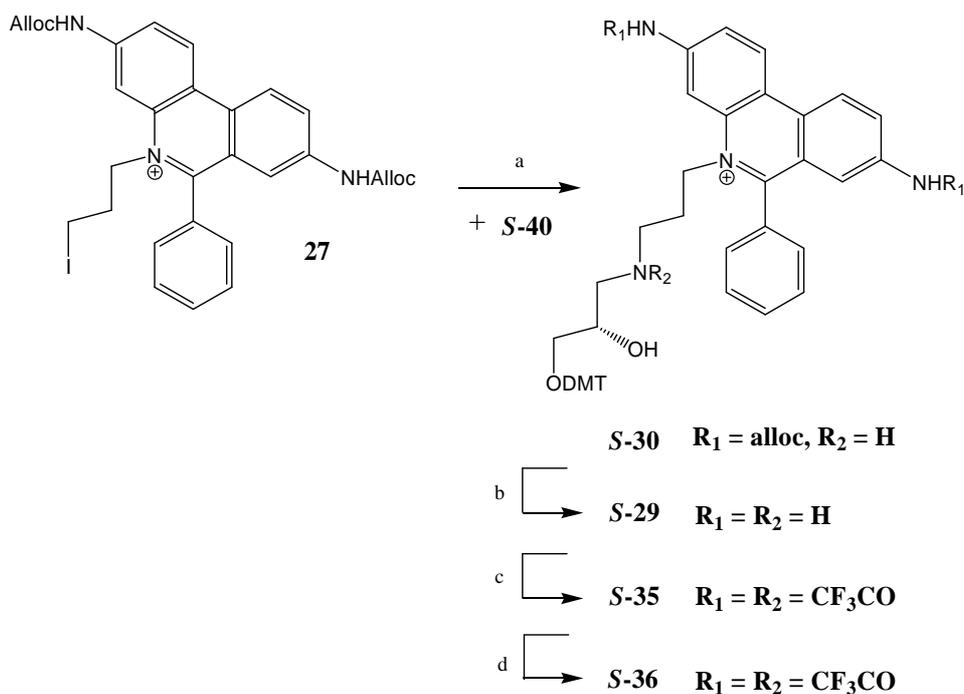


Abb. 77: Synthese von **S-36** ausgehend von **S-40** und **27**: **a:** **S-40** (1.5 equiv.), DMF, TEA, RT, 55 h, 87 %, **b:** Pd(PPh₃)₄ (0.02 equiv.), PPh₃ (0.2 equiv.), Bu₃SnH (3.0 equiv.), DCM/H₂O (0.1 %), RT, 1 h, 90 %, **c:** Trifluoressigsäureanhydrid (6.0 equiv.), 0 °C, 10 min, RT, 10 min, 67 %, **d:** (*i*Pr₂N)P(OCH₂CH₂CN)(Cl) (1.1 equiv.), DIPEA (3.0 equiv.), DCM, RT, 12 h, 90 %.

Das Phosphoramidit **S-36** kann in der automatisierten Festphasensynthese nach der Phosphoramidit-Methode in Oligonukleotide eingebaut werden. Die Kupplungsausbeuten entsprechen denen des Einbaus von **36** (siehe Abbildung 72).

Entsprechend der Erwartung ist es deutlich erkennbar, dass die Anzahl der *Peaks* durch den Einsatz der enantiomerenreinen Verbindung **S-36** auf einen *Peak* reduziert ist (Abbildung 78).

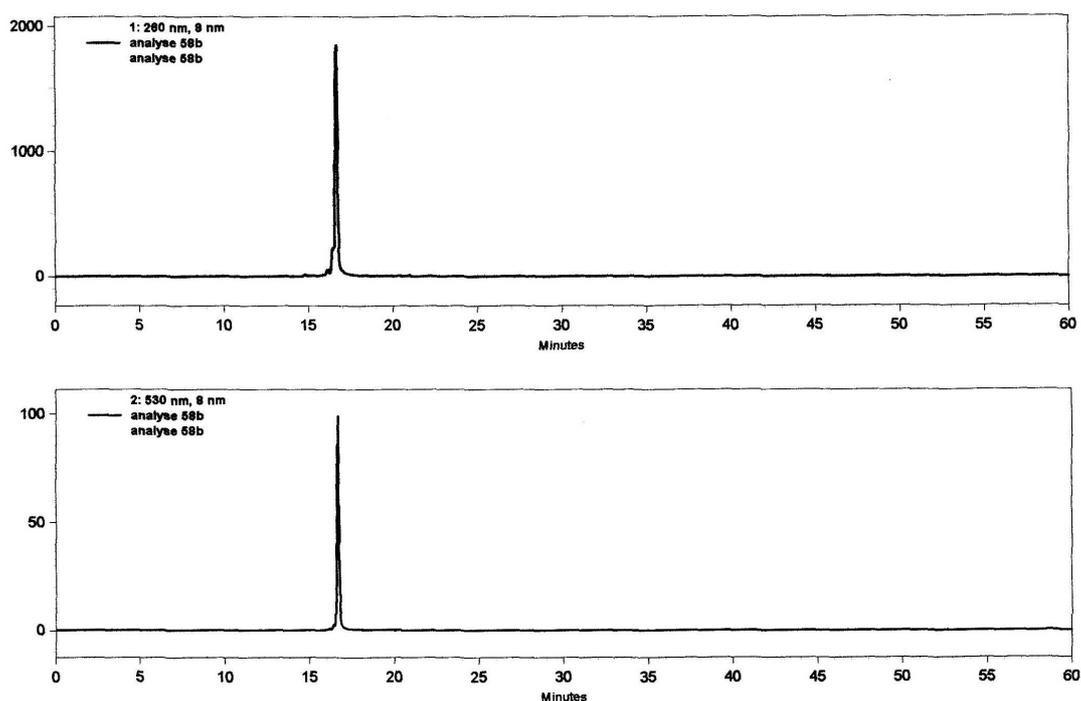


Abb. 78: HPLC-Analyse nach der chromatographischen Reinigung, Gradient 0-30 % in 45 min, Sequenz: 3'-GTC-GTA-ETA-ZTA-CGA-C-5'.

Durch die oben beschriebene Entwicklung und Optimierung der Synthese eines Ethidiumhaltigen Phosphoramidits **S-36** wird mit Hilfe einer modifizierten Kupplungsvorschrift der reproduzierbare und selektive Einbau von Ethidium in Oligonukleotide ermöglicht.

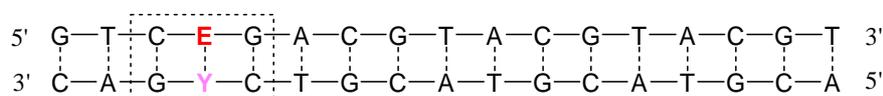
4.2.3 Synthese und Charakterisierung der Ethidium-modifizierten DNA und Experimente zum Ladungstransfer

In Kapitel 4.2.2 wurde die Synthese Ethidium-haltiger Oligonukleotide vorgestellt. Nach dem Einbau von **S-36** in Oligodesoxynukleotide soll das System Ethidium-DNA spektroskopisch charakterisiert werden. Dabei soll geklärt werden, ob die artifizielle Base in die Doppelhelix interkaliert oder ob sich die Ethidium-Einheit außerhalb des Basenstapels befindet. Zusätzlich muss untersucht werden, inwieweit die sterisch relativ anspruchsvolle Ethidium-Einheit die B-DNA-Konformation stört und welche Base am besten als komplementäre Base geeignet ist.

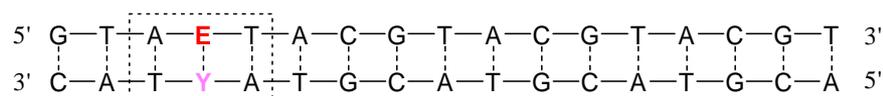
Im Anschluss an die Charakterisierung des Systems sollen Experimente zur Eignung des Bausteins in Modellsystemen zur Untersuchung des reduktiven und oxidativen Ladungstransfers durch die DNA durchgeführt werden. Als weitere Experimente sind zeitaufgelöste Messungen zur Bestimmung der Rate des von photoangeregtem Ethidium ausgehenden Lochtransfers geplant. Zusätzlich soll der Einfluss von Basenfehlpaarungen auf den DNA-übertragenen oxidativen Ladungstransfer untersucht werden.

4.2.3.1 Einfluss der Umgebung auf die artifizielle Base

Für die Untersuchungen zum Einfluss der Nachbar- und Gegenbase auf die optischen Eigenschaften der Ethidium-haltigen Base wurden die Duplexe **13-22** synthetisiert. Die Duplexe **13-17** enthalten die artifizielle Base (E) von GC-Paaren umgeben, die Duplexe **18-22** enthalten E von AT-Paaren umgeben. Im Gegenstrang wurde die zu E komplementäre Base variiert. Sowohl alle natürlichen Basen T, G, C und A als auch der sog. *dSpacer* Y als sterisch wenig anspruchsvolle Base wurden verwendet (Abbildung 79).



13-17



18-22

Abb. 79: Duplexe **13-17** (oben) und Duplexe **18-22** (unten), Y = *dSpacer* (**13** und **18**), A (**17** und **22**), C (**16** und **21**), G (**15** und **20**), T (**14** und **19**).

Der sog. *dSpacer* ist das „chemisch stabile“ Analogon der sog. *abasic site*. Eine *abasic site* entsteht z. B. durch Depurinierung von Oligonukleotiden. Das dabei gebildete Halbacetal steht im Gleichgewicht mit der reaktiven offenkettigen Aldehyd-Form (Abbildung 80). Der *dSpacer* zeigt keine aldehydspezifische Reaktivität und ist deshalb für den Einbau in DNA geeignet. Das Phosphoramidit des *dSpacer* ist kommerziell erhältlich.

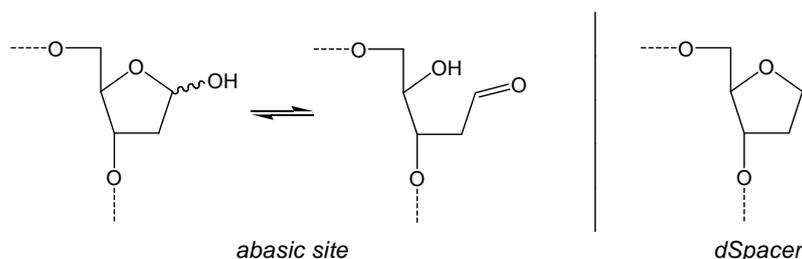


Abb. 80: Der *dSpacer* als „chemisch stabiles“ Analogon der *abasic site*.

Die Duplexe **13-22** sollen durch optische Spektroskopie charakterisiert werden und die Eigenschaften mit denen von Ethidium interkaliert in *poly(dGdC)-poly(dCdG)* und *poly(dAdT)-poly(dTdA)* verglichen werden. Zusätzlich werden die Ergebnisse mit den experimentellen Daten von „freiem“ Ethidium – d. h. in Wasser gelöst – verglichen.^[29,199,271-274]

Um zu klären, ob die artifizielle Base eine signifikante Störung der DNA-Konformation bewirkt, werden die CD-Spektren der Duplexe **13-22** gemessen (Abbildung 81). Zusätzlich zu der für die DNA typischen Signale zwischen 200 nm und 300 nm ist eine breite, schwach negative Bande zwischen 300 nm und 400 nm beobachtbar, die spezifisch bei interkaliertem Ethidium auftritt.^[275]

Die CD-Spektren von an Makromoleküle gebundenem, aber nicht interkaliertem Ethidium weisen diese negative Bande nicht auf.^[276] Dies deutet bereits darauf hin, dass die artifizielle Base E in den Basenstapel interkaliert vorliegt.

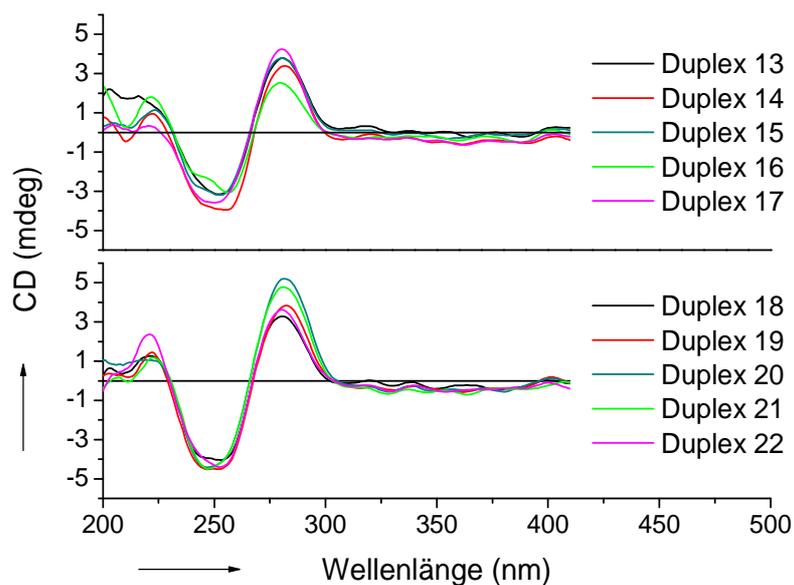


Abb. 81: CD-Spektren der Duplexe **13-17** (oben) und **18-22** (unten). Die Lösungen enthalten $2.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Die Schmelzpunkte der Duplexe **13-17** liegen in einem engen Bereich von $63\text{-}66 \text{ }^\circ\text{C}$, die Schmelzpunkte der Duplexe **18-22** bewegen sich im Bereich von $52\text{-}55 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tabelle 7). Der deutliche Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist darauf zurückzuführen, dass die Duplexe **13-17** neun GC-Paare besitzen, die Duplexe **18-22** dagegen nur sieben GC-Paare.

Tab. 7: Schmelzverhalten der Duplexe **13-22**. Die Lösungen enthalten $2.5 \mu\text{M}$ Duplex und 250 mM NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Duplex	T_m	Duplex	T_m
13	$63 \text{ }^\circ\text{C}$	18	$52 \text{ }^\circ\text{C}$
14	$63 \text{ }^\circ\text{C}$	19	$55 \text{ }^\circ\text{C}$
15	$66 \text{ }^\circ\text{C}$	20	$55 \text{ }^\circ\text{C}$
16	$64 \text{ }^\circ\text{C}$	21	$53 \text{ }^\circ\text{C}$
17	$64 \text{ }^\circ\text{C}$	22	$54 \text{ }^\circ\text{C}$

Im Anschluss wurden die Absorptionsspektren aller Duplexe **13-22** gemessen (Abbildung **82**). Die Absorptionsspektren aller Duplexe **13-22** zeigen ein Maximum im Bereich von 521 nm bis 533 nm, was typisch für interkaliertes Ethidium ist.^[29,271-274] Es gibt keinen nennenswerten Unterschied zwischen den Absorptionsspektren der Duplexgruppe **13-17** (GC-Umgebung) und der Duplexgruppe **18-22** (AT-Umgebung). Außerdem ändern sich die Absorptionseigenschaften des Chromophors nicht wesentlich in Abhängigkeit von der komplementären Base. Die Interkalation des Ethidiums scheint nicht signifikant von der Art der Gegenbase abzuhängen. Das Ergebnis ist insofern überraschend, als die artifizielle Base sterisch den Platz eines gesamten Basenpaares beanspruchen sollte. Eine Erklärung dafür ist eine zumindest teilweise extrahelikale Position der Gegenbase zu E, um die bestmögliche Interkalation des Ethidiums zu ermöglichen.

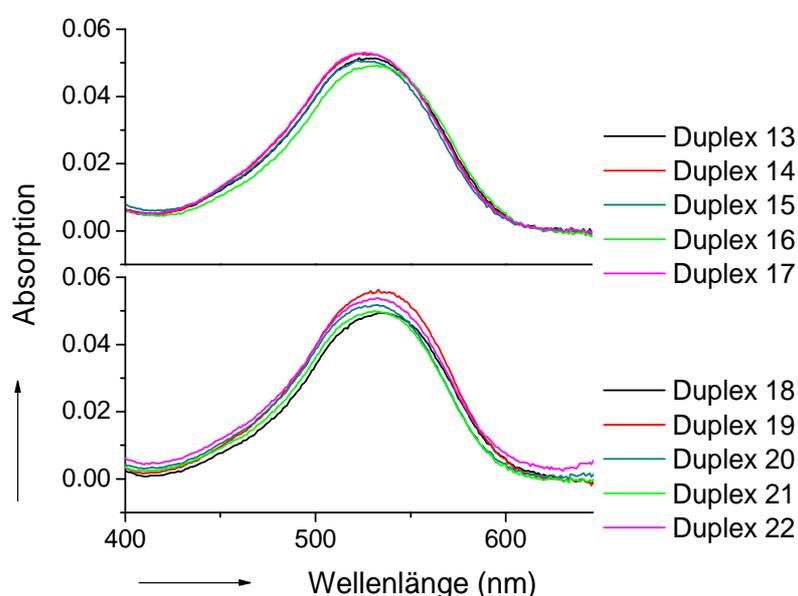


Abb. 82: Absorptionsspektrum der Duplexe **13-17** (oben) und **18-22** (unten). Die Lösungen enthalten $12.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Von den Duplexen **13** und **18**, bei denen der *dSpacer* Y die Gegenbase zu E ist, wurde exemplarisch die Temperaturabhängigkeit des Absorptionsverhaltens untersucht (Abbildung **83**). Bei 10°C liegt das Maximum der Absorption von Duplex **13** bzw. **18** bei 530 nm bzw. 535 nm . Das ist typisch für interkaliertes Ethidium.^[29,271-274] Das Absorptionsspektrum von „freiem“ Ethidium in wässriger Lösung zeigt im Vergleich dazu ein Maximum bei etwa 480 nm . Bei 90°C liegt das Maximum bei 503 nm bzw. 515 nm . Diese Werte sind immer noch deutlich höher als die 480 nm bei „freiem“ Ethidium.^[277]

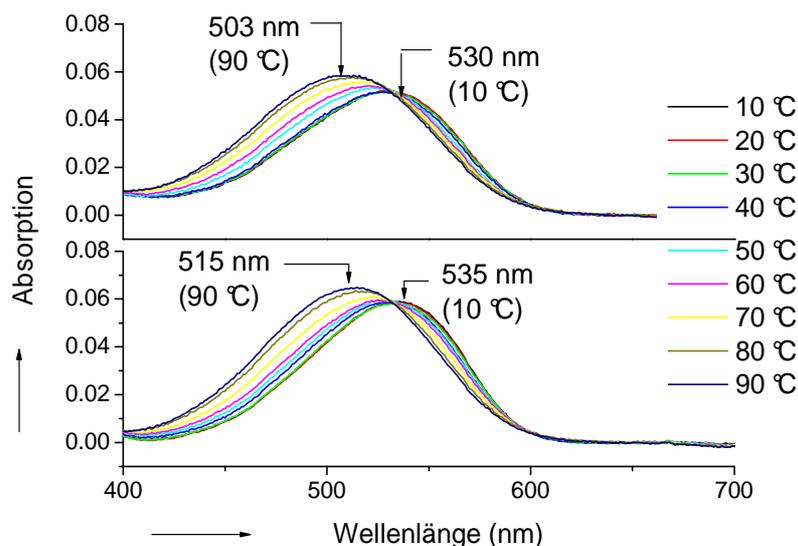


Abb. 83: Temperaturabhängige UV/Vis-Absorptionsspektren der Duplexe **13** (oben) und **18** (unten). Die Lösungen enthalten $12.5 \mu\text{M}$ Duplex, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Aus den Messungen kann geschlossen werden, dass die Interkalation auch bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ noch nicht vollständig zusammenbricht. Es tritt also bereits im Einzelstrang z. T. eine Stapelung von der Ethidium-Einheit mit den Nachbarbasen auf. Ein weiterer Hinweis dafür ist, dass die UV-Absorption von Ethidium-haltigen Oligonukleotiden im Einzelstrang bei Raumtemperatur nicht bei 480 nm , sondern bei 520 nm liegt.

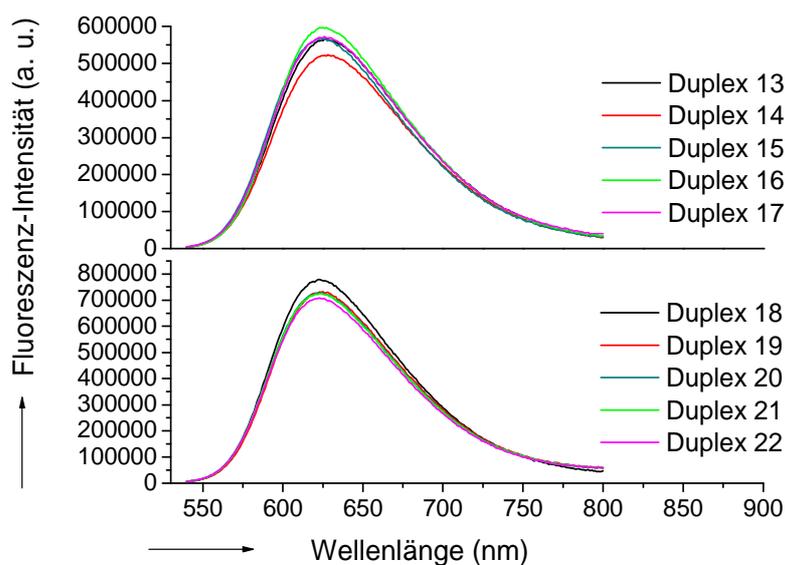


Abb. 84: Steady-state Fluoreszenzmessungen der Duplexe **13-17** (oben) und **18-22** (unten), Anregung bei 530 nm . Die Lösungen enthalten $12.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Die *steady-state* Fluoreszenzmessungen (Abbildung 84) der modifizierten Duplexe wurden mit einer Anregungswellenlänge von 530 nm aufgenommen. Das Emissionsmaximum liegt bei allen Duplexen im Bereich von 623 nm bis 626 nm. Dieser Wert ist typisch für interkaliertes Ethidium.^[29,271-274] Das Emissionsmaximum von „freiem“ Ethidium in Wasser liegt bei 635 nm.^[277] Weder die unterschiedlichen Gegenbasen noch die unterschiedliche Umgebung (GC- bzw. AT-Paare) beeinflussen die Emissionseigenschaften von Ethidium. Dies äußert sich in nahezu identischen Emissionsmaxima und relativen Quantenausbeuten aller Duplexe **13-22**. Die Messungen zeigen auch hier die gewünschte Ähnlichkeit der optischen Eigenschaften der artifiziellen Base und interkaliertem, nicht kovalent gebundenem Ethidium.

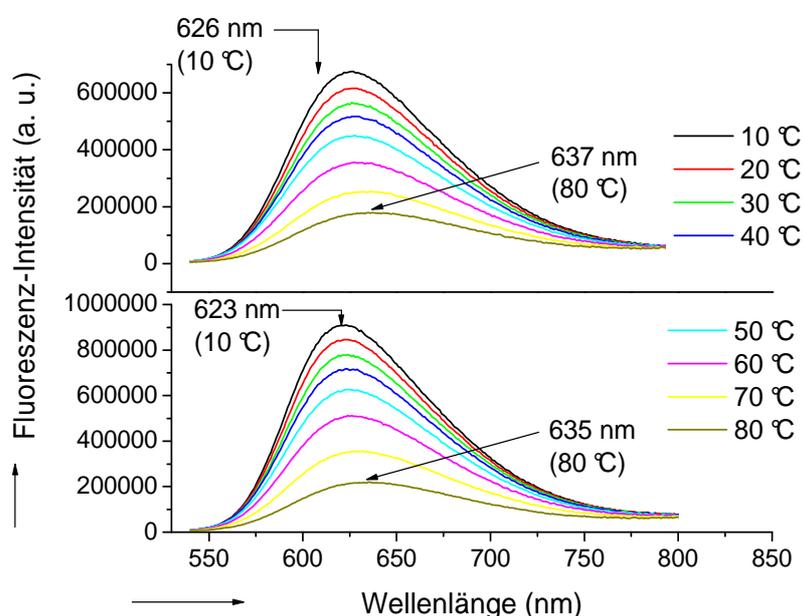


Abb. 85: Temperaturabhängige Fluoreszenz der Duplexe **13** (oben) und **18** (unten), Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12,5 μ M Duplex, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Wie schon bei den Absorptionmessungen wurde auch hier die Temperaturabhängigkeit untersucht (Abbildung 85). Es fällt auf, dass die Quantenausbeute der Fluoreszenz mit steigender Temperatur deutlich abnimmt. Es ist bekannt, dass in Wasser die Fluoreszenz durch eine Protonierung des angeregten Zustands gelöscht wird, während dies bei interkaliertem Ethidium nicht der Fall ist, da die beiden Aminofunktionen durch die DNA vor einer Protonierung geschützt werden.^[270,273,274]

Auch bei den Duplexen **13** und **18** ist die Intensität der Emission bei 90 °C im Vergleich zu den Werten bei 10 °C deutlich gelöscht. Die Quantenausbeute sinkt bei 90 °C auf 20-35 % der ursprünglichen Duplexquantenausbeute bei 10 °C.

Zusätzlich ist bei 90 °C das Maximum der Emission bei 637 nm bzw. 635 nm zu beobachten, dies entspricht in etwa dem Wert von „freiem“ Ethidium.^[277] Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das hergestellte Ethidium-haltige DNA-System die Interkalation der Ethidium-Einheit in den Basenstapel ermöglicht.

4.2.3.2 Untersuchungen zum reduktiven Ladungstransfer im System Ethidium-Methylviologen

Es soll geklärt werden, ob das hier eingeführte Modellsystem für Untersuchungen zum reduktiven Ladungstransfer ausgehend von photoangeregtem Ethidium geeignet ist. Dazu wurden die Duplexe **13** und **18** exemplarisch mit Methylviologen-dichlorid-trihydrat (MV^{2+}) versetzt. Beginnend mit 0.2 equiv. MV^{2+} und bei sukzessiver Zugabe von 0.2 equiv. MV^{2+} wird die Fluoreszenz-Intensität gemessen. Wie aus Abbildung **86** hervorgeht, kann MV^{2+} die Fluoreszenz von photoangeregtem Ethidium löschen und erfüllt damit die Anforderungen.

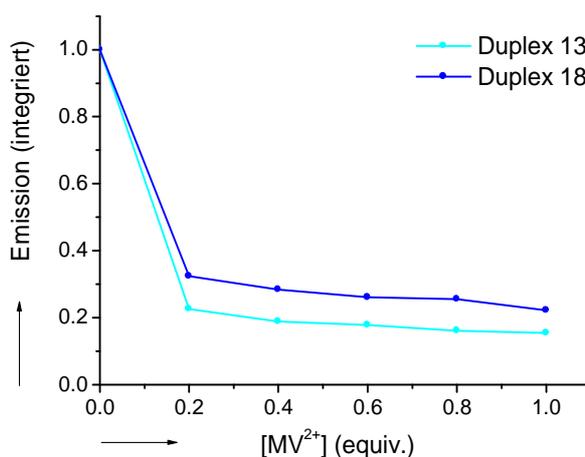
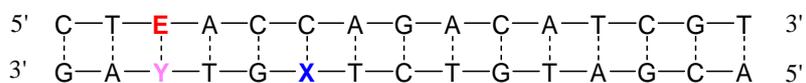


Abb. 86: Elektronentransferexperimente mit Duplex **13** und Duplex **18**, Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μ M Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7. Methylviologen (MV) wird zugesetzt.

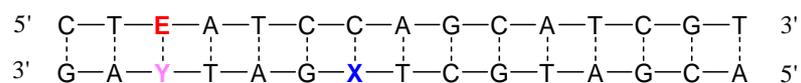
4.2.3.3 Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer im System Ethidium-Deazaguanin

Die folgenden Untersuchungen betreffen den von photoangeregtem Ethidium ausgehenden oxidativen Lochtransfer durch die DNA. In einem ersten Experiment sollte die Eignung der artifiziellen Base im Modellsystem Ethidium-Deazaguanin überprüft werden. Dafür wurden die Duplexe **29-34** synthetisiert. Diese bestehen aus einem Ethidium-haltigen Oligonukleotid und einem Gegenstrang, der in verschiedenen Abständen Deazaguanin (Z) enthält. Als Gegenbase für E wurde der *dSpacer* Y gewählt (Abbildung **87**).

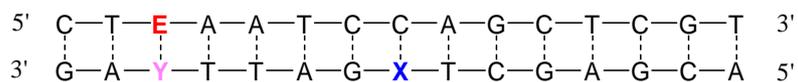
Die Sequenzen sind identisch mit den DNA-Duplexen, die von *Barton/Zewail et al.* (siehe dazu ausführlich Kapitel 4.2.1) untersucht wurden.^[30,134]



29: X = G, 30: X = Z



31: X = G, 32: X = Z



33: X = G, 34: X = Z

Abb. 87: Duplexe 29-34.

In den Duplexen 30, 32 und 34 besteht ein Abstand von zwei, drei und vier Basenpaaren zwischen E und Z. Die Duplexe 29, 31 und 33 sind Kontroll-Duplexe, in denen kein Ladungstransfer stattfinden kann, weil Z durch G ersetzt wurde. Man erwartet bei 30, 32 und 34 im Vergleich zu 29, 31 und 33 eine Löschung der Fluoreszenz durch DNA-übertragenen Lochtransfer. Außerdem sollte bei zunehmendem Abstand zwischen E und Z die Effizienz des Ladungstransfer-Prozesses abnehmen.

Die CD-Spektren der sechs Duplexe zeigen die B-DNA-Konformation (Abbildung 88).

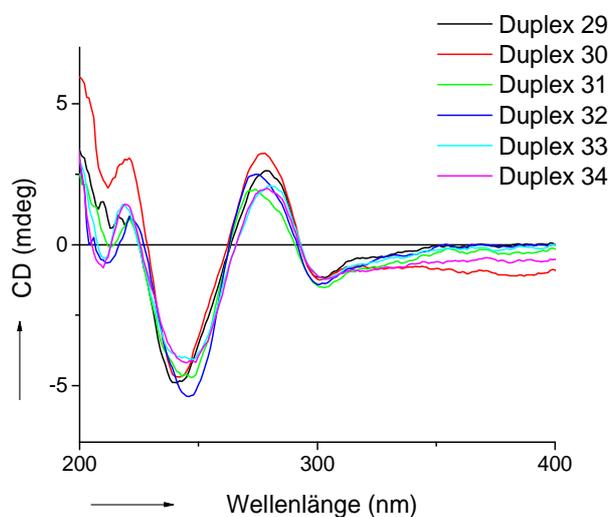


Abb. 88: CD-Spektren der Duplexe **29-34**. Die Lösungen enthalten $2.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Die Schmelzpunkte der Duplexe **29-34** zeigen einen Unterschied von $4\text{-}5 \text{ }^\circ\text{C}$ zwischen den Duplexen **30, 32** und **34**, die E und Z enthalten und den Duplexen **29, 31** und **33**, die lediglich E beinhalten (Tabelle 8). Der zusätzliche Einbau von Z in die Oligonukleotide scheint die Struktur leicht zu destabilisieren.

Tab. 8: Schmelzpunkte (T_m) der Duplexe **29-34**. Die Lösungen enthalten $2.5 \mu\text{M}$ Duplex und 250 mM NaCl in Phosphatpuffer (10 mM), pH 7.

Duplex	T_m	Duplex	T_m
29	$64 \text{ }^\circ\text{C}$	30	$60 \text{ }^\circ\text{C}$
31	$63 \text{ }^\circ\text{C}$	32	$58 \text{ }^\circ\text{C}$
33	$64 \text{ }^\circ\text{C}$	34	$59 \text{ }^\circ\text{C}$

Das Absorptionsmaximum liegt im Bereich von 530 nm und es kann davon ausgegangen werden, dass E in die DNA interkaliert vorliegt (Abbildung 89).

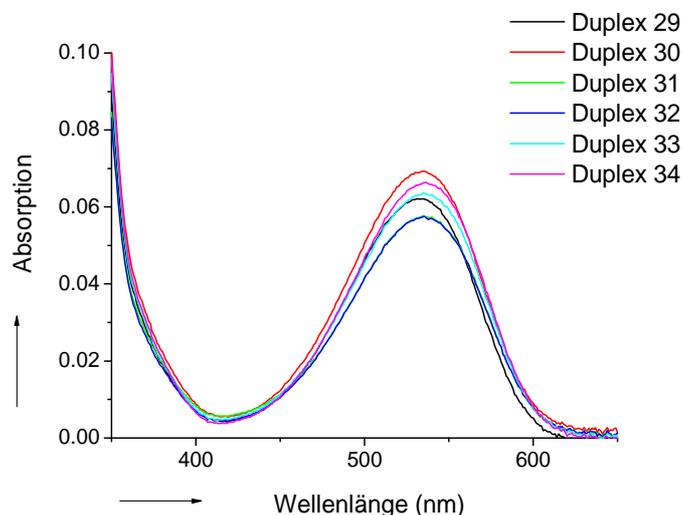


Abb. 89: Absorptionsspektrum der Duplexe 29-34. Die Lösungen enthalten 12.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Der Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten der Duplexe 29, 31 und 33 mit denen der Duplexe 30, 32 und 34 zeigen, dass Z die Fluoreszenz des photoangeregten E löscht (Abbildung 90).

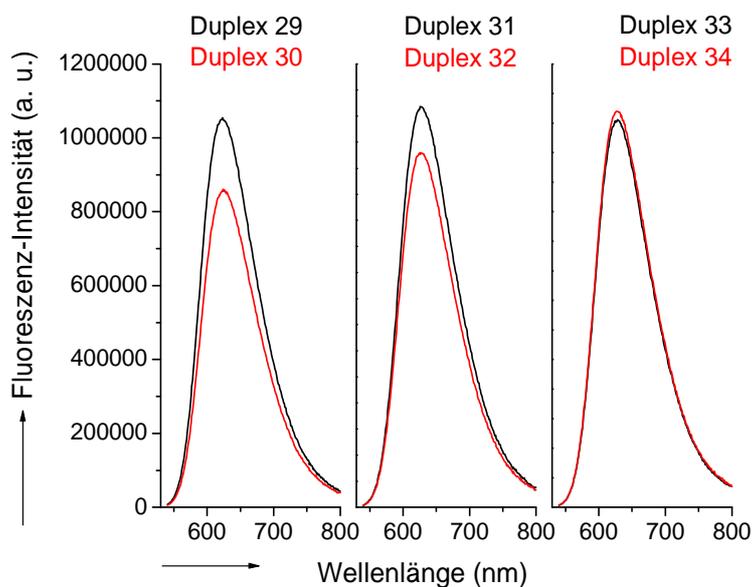


Abb. 90: Steady-state Fluoreszenzmessungen der Duplexe 29-34, Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Es findet also ein oxidativer Lochtransfer zwischen E und Z statt. Die Fluoreszenz der Duplexe **30**, **32** und **34** ist im Vergleich zu **29**, **31** und **33** reduziert, in allen Fällen liegt die Löschung im Bereich von 10-20 %. Es kann zusätzlich festgestellt werden, dass im Falle der Duplexe **29** und **30**, d. h. bei einem Abstand von zwei Basenpaaren zwischen E und Z, die Abnahme stärker ist als bei einem größeren Abstand zwischen E und Z. Nachteilig ist, dass der Unterschied zwischen den Duplexen **29/30**, **31/32** und **33/34** relativ gering ausfällt. Es müssen bei Messungen zum oxidativen Ladungstransfer in dem hier vorgestellten System kleine Unterschiede zweier großer Werte detektiert werden, was die Genauigkeit beeinflusst.

Die zeitaufgelösten Messungen der Duplexe **29-34** (Abbildung **91**) zeigen, dass ein Unterschied zwischen den Lebensdauern der angeregten Zustände zwischen den Duplexen **29/30**, **31/32** und **33/34** kaum feststellbar ist. Die Lebensdauern liegen in allen Duplexen bei 16 ns bis 18 ns.

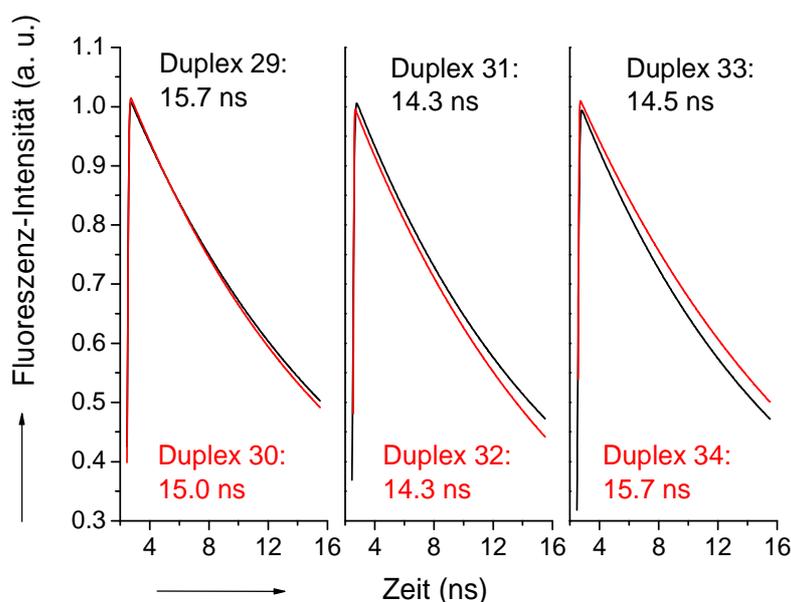


Abb. 91: Zeitaufgelöste Messungen der Duplexe **29-66**. Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 625 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Wie in Kapitel **4.2.1** beschrieben, wurde von *Barton/Zewail et al.*^[30,134] bei zeitaufgelösten Experimenten im System Ethidium-DNA ein biexponentielles Zerfallsverhalten mit Lebensdauern von 5 ps und 75 ps gemessen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl die Orientierungsrelaxation von „freiem“ Ethidium in Wasser als auch die Fluoreszenzlöschung von E in bimolekularen Komplexen mit Z mit Zeitkonstanten von etwa 70 ps erfolgt. Daraus wurde geschlossen, dass die Umorientierung des Ethidiums geschwindigkeitsbestimmend ist und der eigentlichen Ladungsübertragung im Komplex E-Z vorausgeht.

Die Lebensdauer von 5 ps wurde derjenigen Ethidium-Konformation zugeschrieben, die bereits optimal mit den benachbarten DNA-Basen wechselwirkt.

Im Gegensatz zu über einen Linker angeknüpft, interkaliertes Ethidium bei *Barton/Zewail et al.* ist die Ethidium-haltige artifizielle Base im hier vorgestellten DNA-Assay fest „fixiert“ im Basenstapel und besitzt wahrscheinlich eine wesentlich geringere Beweglichkeit. Dadurch kann die für einen effizienten Ladungstransfer nötige Umorientierung des angeregten Ethidium in eine für den Ladungstransfer optimale Konformation erschwert oder sogar verhindert sein.

4.2.3.4 Untersuchung des Lochtransfers im System Ethidium-Deazaguanin in Abhängigkeit von Basenfehlpaarungen

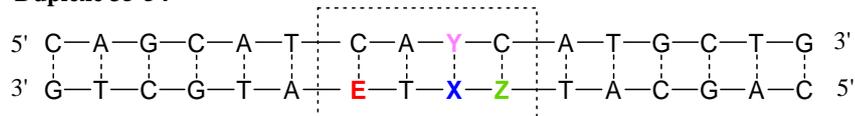
In diesem Experiment wird der Einfluss von Basenfehlpaarungen auf die Effizienz des Ladungstransfers im System Ethidium-Deazaguanin untersucht. Der DNA-übertragene Ladungstransfer ist ein Prozess, der bekanntermaßen sehr empfindlich auf lokale Störungen der regelmäßigen DNA-Konformation reagiert, die typischerweise mit Basenfehlpaarungen und beschädigten Basen einhergehen.^[65,88-91] Dieses Verfahren wird bei DNA-Chips angewendet, wie in Kapitel 3.1 ausführlich besprochen. Langfristiges Ziel des Experiments kann die Entwicklung neuer DNA-Chips auf Basis des DNA-übertragenen Ladungstransfers sein, die durch Fluoreszenzmessung ausgelesen werden können. Vorteile wären hier die hohe Empfindlichkeit der Ladungstransfer-Prozesse sowie die Möglichkeit der homogenen oder heterogenen Anwendung. Der Verzicht auf die aufwendige Präparation und Charakterisierung von selbstassoziierenden Monoschichten (*SAM*) bei DNA-Chips wäre von Vorteil. Die Detektion bei einer Anwendung in Lösung wäre leicht automatisierbar.

Für die Untersuchung werden fluoreszenzmarkierte Sensorstränge synthetisiert, die sowohl E als auch Z enthalten und mit verschiedenen Probesträngen hybridisiert. Im Falle intakter Duplexe sollte ein Ladungstransfer stattfinden, der durch die Löschung der Fluoreszenz detektiert werden kann. Im Falle von Basenfehlpaarungen sollte die Effizienz des Ladungstransfers durch die konformationelle Störung vermindert sein, was durch eine verminderte Löschung sichtbar wird. Für diese Untersuchungen wurden die DNA-Duplexe **35-74** synthetisiert. Die Duplexe **35-54** enthalten E und Z im Abstand von zwei Basenpaaren. Als Gegenbase zu E wurde in allen Strängen willkürlich C gewählt. Die Duplexe **55-74** sind Kontroll-Oligonukleotide. Sie enthalten nur E, Z wurde durch G ersetzt. Hier kann also kein DNA-übertragener Ladungstransfer stattfinden.

Die zwei Basenpaare zwischen E und Z bzw. zwischen E und G bestehen in allen Fällen aus einem AT-Paar und einem Basenpaar, das variiert wird (Tabelle 9). Die Duplexe mit korrekter Basenpaarung (*match*) sind **38, 42, 46** und **50** sowie **58, 62, 66** und **70**. Die Duplexe **39, 44, 49** und **54** sowie **59, 64, 69** und **74** enthalten eine *abasic site*, alle anderen Duplexe enthalten einzelne Basenfehlpaarungen (*mismatch*).

Tab. 9: Nummerierung der Duplexe **35-74**, Ladungstransfer-Duplexe **35-54** (oben) und Kontroll-Duplexe **55-74** (unten). Die intakten Duplexe sind markiert.

Duplexe 35-54

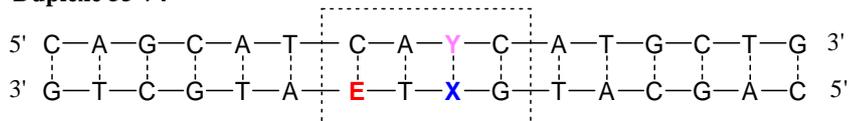


X = A, C, G, T

Y = A, C, G, T, dSpacer

XY	Y = A	Y = C	Y = G	Y = T	Y = dSpacer
X = A	35	36	37	38	39
X = C	40	41	42	43	44
X = G	45	46	47	48	49
X = T	50	51	52	53	54

Duplexe 55-74



X = A, C, G, T

Y = A, C, G, T, dSpacer

XY	Y = A	Y = C	Y = G	Y = T	Y = dSpacer
X = A	55	56	57	58	59
X = C	60	61	62	63	64
X = G	65	66	67	68	69
X = T	70	71	72	73	74

Bei allen Duplexen wurde zunächst die B-DNA-Konformation durch CD-Spektroskopie überprüft, anschließend fand die Charakterisierung durch Absorptionsspektroskopie, *steady-state* Fluoreszenzspektroskopie und durch die Bestimmung des Schmelzverhaltens statt.

Die Emission der intakten Duplexe **38**, **42**, **46** und **50**, die E und Z enthalten, zeigt im Vergleich mit den intakten Duplexen **58**, **62**, **66** und **70**, die lediglich E enthalten, dass der photoinduzierte oxidative Ladungstransfer zu einer deutlichen Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität führt (Abbildung 92).

Das Emissionsmaximum bei 628 nm ist typisch für interkaliertes Ethidium.^[29,271-274]

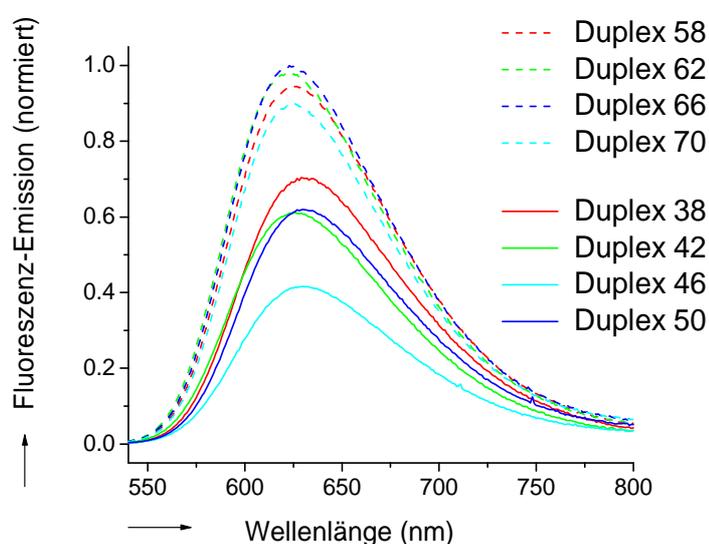


Abb. 92: *Steady-state Fluoreszenzmessungen der Duplexe 38, 42, 46 und 50 sowie 58, 62, 66 und 70, Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μ M Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.*

Die beobachtete Fluoreszenzlöschung kann wiederum auf einen Ladungstransfer zwischen photoangeregtem Ethidium und Deazaguanin zurückgeführt werden. Die Quantenausbeute der Duplexe **38**, **42** und **50** wird um 25-37 % der ursprünglichen Emission (Duplexe **58**, **62** und **70**) reduziert. Der Ladungstransfer ist bei den Duplexen **58/38**, **62/42** und **70/50** gering im Vergleich zu der Löschung von 53 % der ursprünglichen Emission bei den Duplexpaar **66/46**. Dort liegt ein CG-Basenpaar vor. Es ist bekannt, dass ein G in der 3'-Position von Z das lokale Oxidationspotential in den Bereich von GG-Paaren absenkt und so einen effizienteren Lochtransfer ermöglicht.^[204] Die Ergebnisse wurden durch zeitaufgelöste Messungen bestätigt, die im folgenden Kapitel 4.2.2.5 dargestellt werden.

Im Folgenden werden jeweils die spektroskopischen Eigenschaften der intakten Duplex (Ladungstransfer- und Kontroll-Duplex) mit den jeweils drei Fehlpaarungen und der *abasic site* verglichen. Das CD-Spektrum aller Duplexe **35-74** und aller Kontrollduplexe (**55-74**) bestätigt die B-DNA-Konformation (Abbildung **93**).

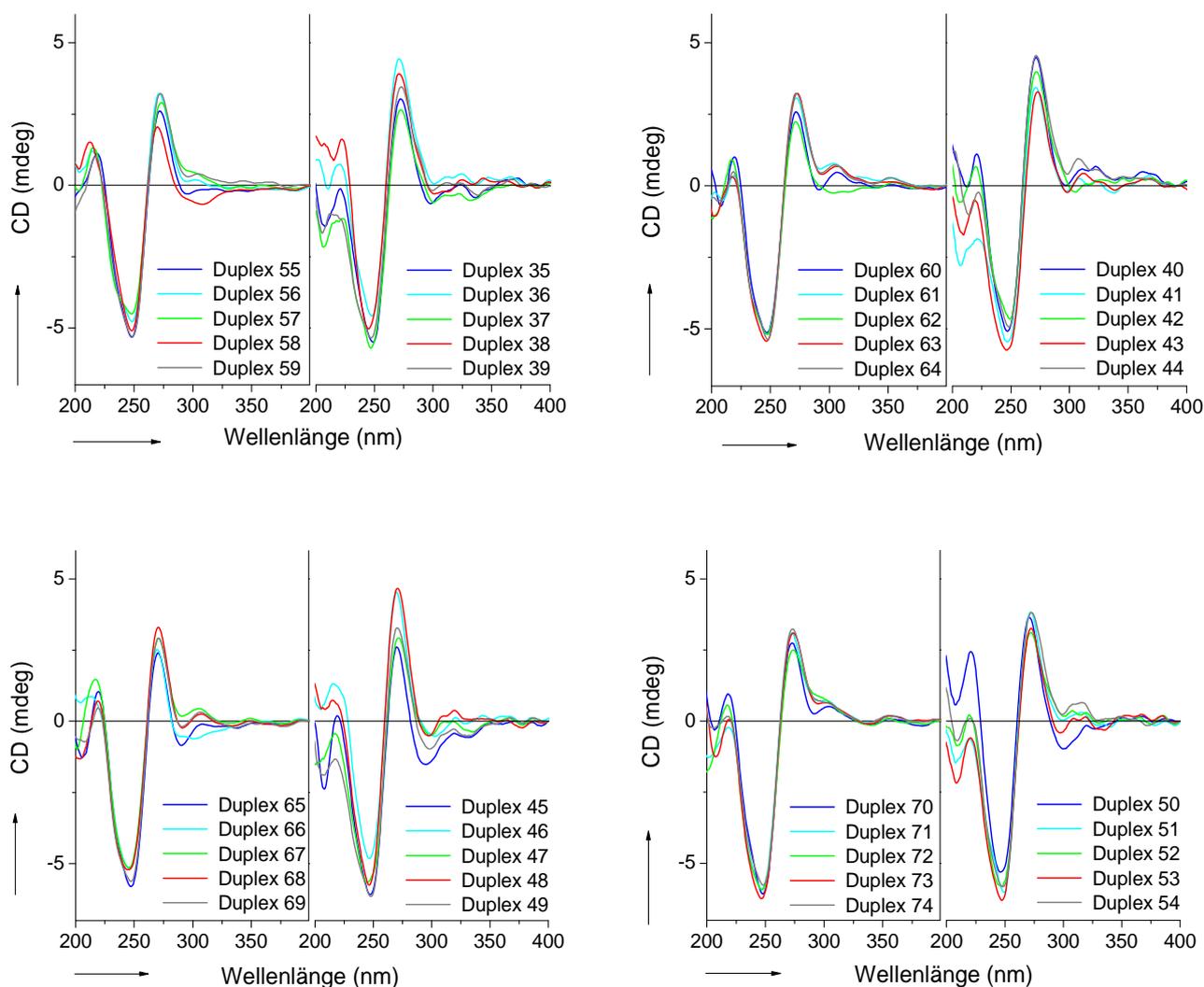


Abb. 93: CD-Spektren der Duplexe **35-74**.
Die Lösungen enthalten 2.5 μ M Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Das Absorptionsmaximum aller Duplexe befindet sich im Bereich von 530 nm bis 535 nm, Ethidium ist also in die DNA-Helix interkaliert, wie schon in Kapitel 4.2.2.1 ausführlich begründet (Abbildung 94).

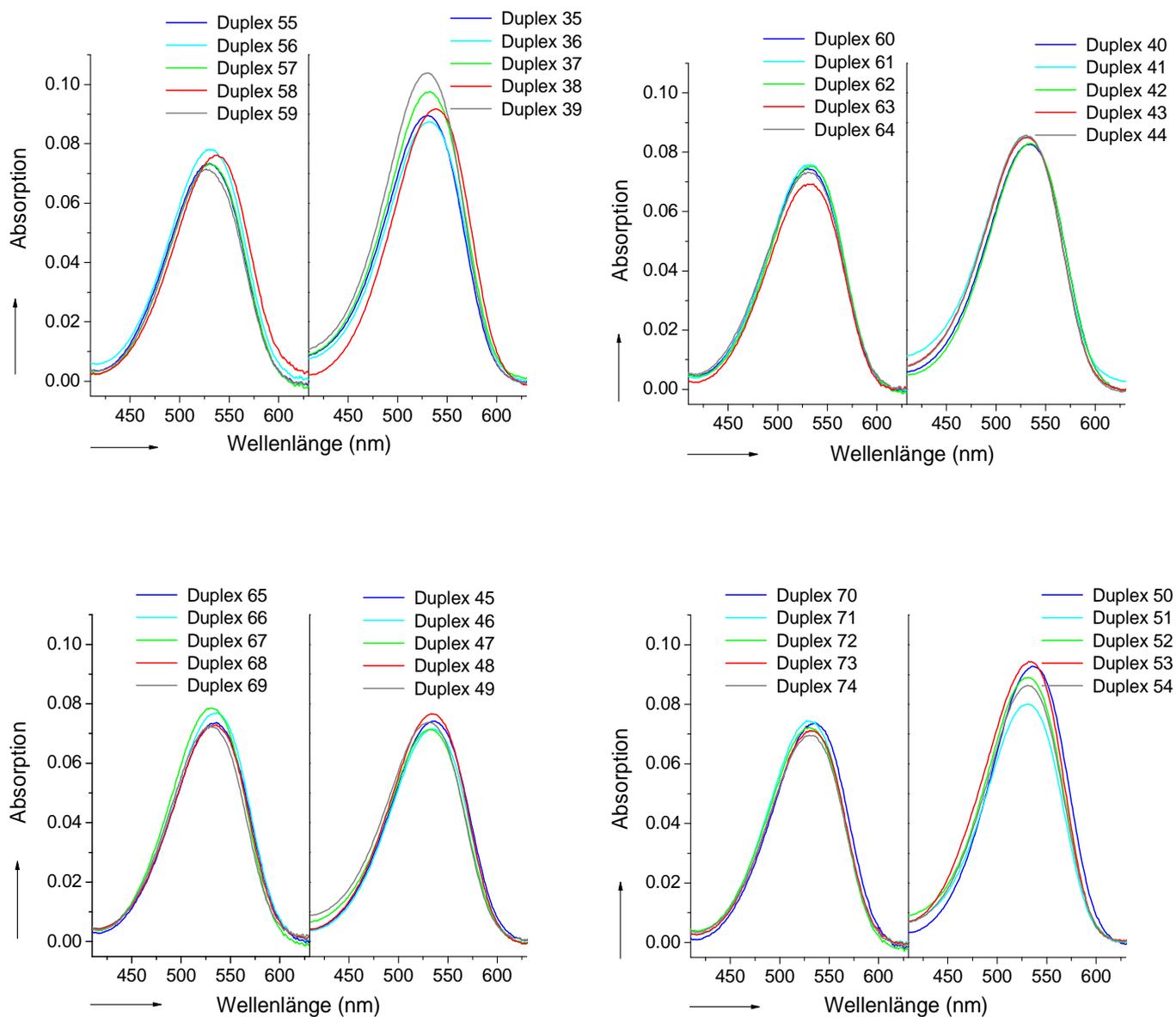


Abb. 94: Absorptionsspektrum der Duplexe 35-74.
Die Lösungen enthalten 12.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Die *steady-state* Fluoreszenzmessungen aller Duplexe **35-74** sind im Folgenden dargestellt. Es wird erwartet, dass jeweils innerhalb der *Sets* **55-59**, **60-64**, **65-69** und **70-74**:

- die Quantenausbeute bei allen Kontroll-Duplexen **55-74** in der gleichen Größenordnung liegt, da eine Basenfehlpaarung keinen Einfluss auf die Fluoreszenz des photoangeregten Ethidiums haben sollte.
- die Quantenausbeute in den Duplexen **35-54** – hier ist prinzipiell ein Ladungstransfer zwischen E und Z möglich – sollten im Vergleich niedriger als bei den entsprechenden Kontroll-Duplexen sein.
- wie schon in Kapitel **3.1.3** ausführlich besprochen, sollte eine Basenfehlpaarung den Ladungstransfer zwischen E und Z vermindern und so eine weniger deutliche Löschung der Fluoreszenz des photoangeregten Ethidiums auftreten als beim intakten Duplex.

Die Messung der *steady-state* Fluoreszenz zeigt eine auffällige Abweichung vom erwarteten Verhalten: während die Quantenausbeuten der Kontroll-Duplexe **55-59** ähnlich und deutlich größer als bei den entsprechenden Ladungstransfer-Duplexen **35**, **36**, **37** und **39** sind, zeigt der intakte Duplex **38** (TA) überraschenderweise eine höhere Quantenausbeute als die fehlgepaarten Duplexe **35**, **36**, **37** und **39** (Abbildung 95). Eigentlich sollte beim intakten Duplex **38** der Ladungstransfer zwischen E und Z zunehmen und die Fluoreszenz – im Vergleich mit **58** – dadurch zumindest zum Teil gelöscht werden.

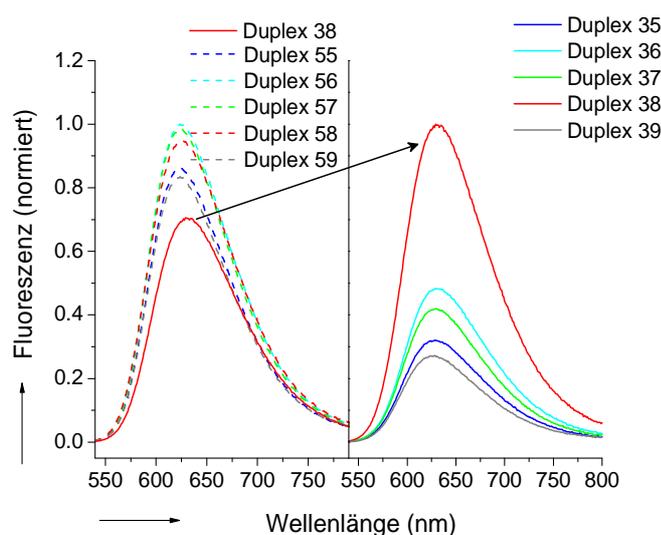


Abb. 95: *Steady-state* Fluoreszenzmessungen der Duplexe **55-59** und **35-39**, Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Bei der Messungen der Fluoreszenz zeigt sich auch bei den Duplexen **40-44** ein ähnlich auffälliges Verhalten. Der intakte Duplex **42** besitzt im Vergleich zu den fehlgepaarten Duplexen **40, 41, 43** und **44** eine deutlich erhöhte Emission (Abbildung **96**).

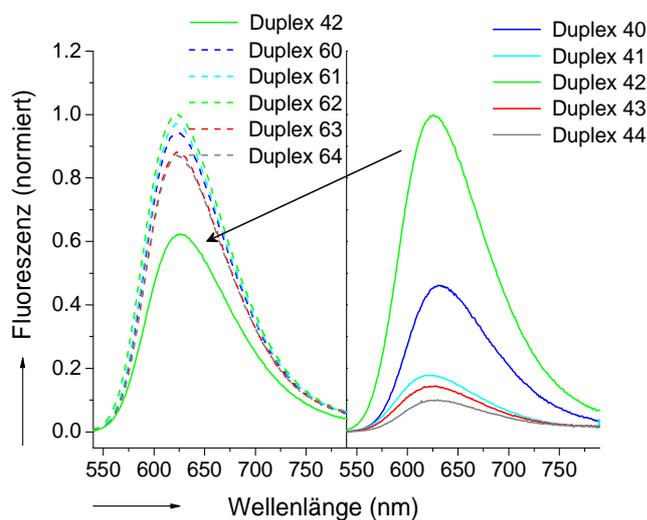


Abb. 96: *Steady-state Fluoreszenzmessungen der Duplexe **55-59** und **35-39**, Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.*

Auch bei der Messung der *steady-state* Fluoreszenz der Duplexe **45-49** und **65-69** ist ein ähnlich auffälliges Verhalten zu beobachten (Abbildung **97**). Der intakte Kontroll-Duplex **66** zeigt im Vergleich zu den fehlgepaarten Kontroll-Duplexen eine deutlich niedrigere Quantenausbeute. Dies kann dadurch erklärt werden, dass in Duplex **66** ein GG-Paar das Redoxpotential soweit erniedrigt,^[204] dass ein Lochtransfer stattfinden kann. Die Unterschiede zwischen Kontroll-Duplex und Ladungstransfer-Duplex werden damit geringer bzw. sind nicht mehr nachweisbar. Der intakte Duplex **46** (CG) besitzt zwar im Vergleich mit dem Kontrollstrang **66** eine erhöhte Quantenausbeute, aber auch die Duplexe **45** (AG) und **48** (TG) besitzen eine ähnliche hohe Intensität der Emission; allerdings weichen sie im Gegensatz zu **46** nicht von der Intensität des Kontrollstrangs (**65** und **68**) ab. Die Beobachtung, dass die Sequenz eines Duplexes – wenn sie GG-Paare enthält – auf den Unterschied der Quantenausbeuten auswirkt, stellt eine Limitierung des Assays dar.

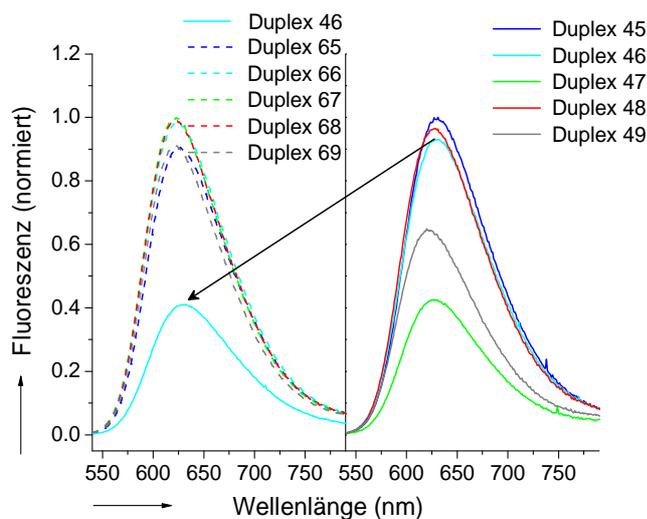


Abb. 97: *Steady-state Fluoreszenzmessungen der Duplexe 55-59 und 35-39, Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.*

Auch bei der Messung der Fluoreszenzspektren der Duplexe 70-74 und 50-54 zeigt sich ein auffälliges Verhalten von Duplex 50 im Vergleich zu 70 (Abbildung 98). Allerdings ist auch bei 53 (TT) die Quantenausbeute gegenüber 51, 52 und 54 stark erhöht, jedoch nicht im Vergleich zu 73. Dafür gibt es derzeit noch keine Erklärung.

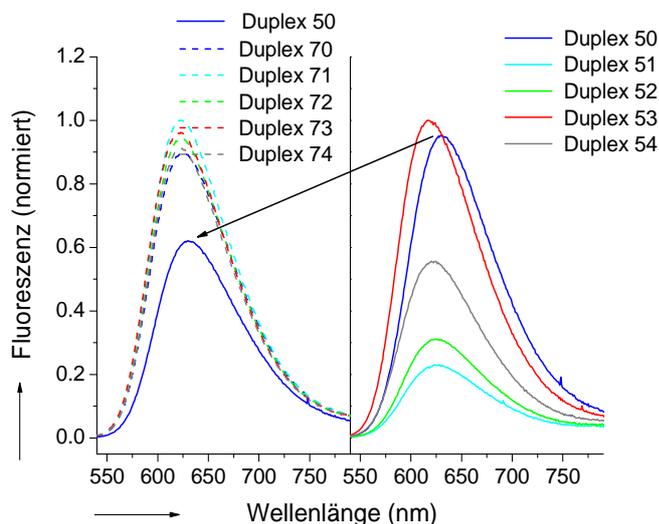


Abb. 98: *Steady-state Fluoreszenzmessungen der Duplexe 55-59 und 35-39, Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.*

Die Ergebnisse aller oben aufgeführten Fluoreszenzmessungen können durch die Berechnung von Fq (*fraction quenched*) dargestellt werden. Fq ist dabei definiert als (Gleichung 19):

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

Gl. 19: Definition von Fq (*Fraction quenched*).

Dabei ist $I(\text{match})$ die integrierte Fluoreszenz-Intensität des intakten Duplexes und $I(\text{mismatch})$ die der fehlgepaarten Duplexe bzw. der *abasic site*-haltigen Duplexe. Je deutlicher der Unterschied zwischen den Intensitäten, desto größer ist Fq , je geringer der Unterschied, desto kleiner ist Fq . Im Falle des intakten Duplexes wird Fq definitionsgemäß Null. Bei dieser Auftragung kann der intakte Duplex sofort identifiziert werden, wie aus der im Folgenden dargestellten Abbildung 99 hervorgeht.

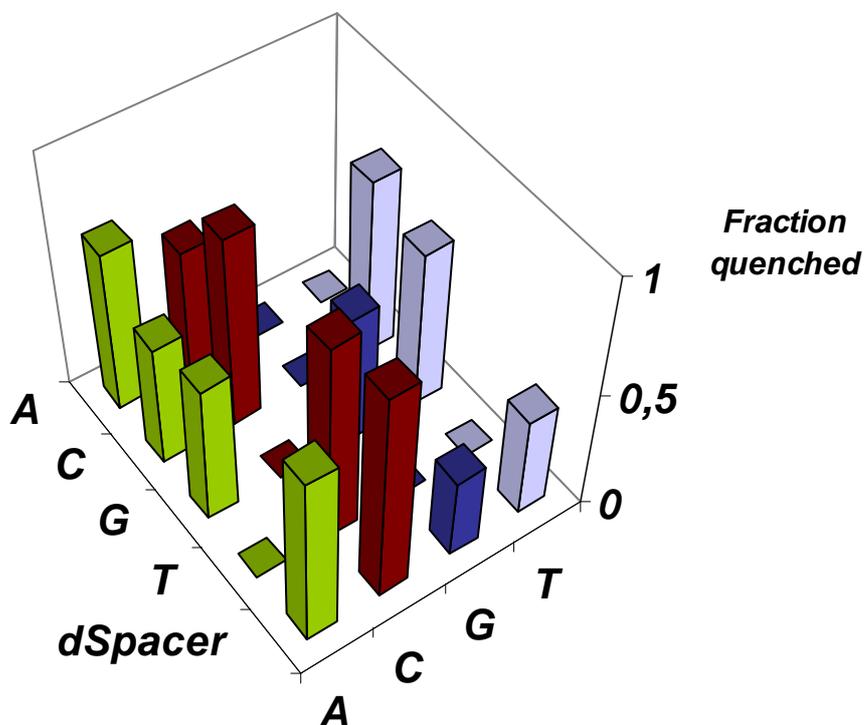


Abb. 99: Fq in Abhängigkeit der Basenfehlpaarungen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Basenfehlpaarungen auf den Ladungstransfer im System Ethidium-Deazaguanin nicht den Erwartungen entsprechen. Anstelle einer Behinderung des Ladungstransfers durch eine strukturelle Störung – sichtbar durch eine unveränderte Fluoreszenz-Emission im Vergleich zum Kontroll-Duplex – ist die Emission bei *mismatch*-Duplexen reduziert, wohingegen die Quantenausbeute bei intakten Duplexen im Vergleich zum Kontroll-Oligonukleotide drastisch erhöht ist.

Um eine abweichende DNA-Struktur der intakten Duplexe ausschließen zu können, wird das Schmelzverhalten aller Duplexe untersucht (Tabelle 10). Dabei kann festgestellt werden, dass alle Schmelzpunkte im Bereich von 71-78 °C liegen und keinen Hinweis auf die Anwesenheit von Fehlpaarungen oder einer *abasic site* aufweisen. Die Schmelzpunkte der intakten Duplexe **38**, **42**, **46** und **50** unterscheiden sich von den Schmelzpunkten der Kontroll-Duplexe **58**, **62**, **66** und **70** um 1-3 °C.

Tab. 10: Schmelzverhalten der Duplexe **35-74**. Die Lösungen enthalten 2.5 μ M Duplex und 250 mM NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Duplex	T _m						
35	72 °C	45	73 °C	55	71 °C	65	72 °C
36	73 °C	46	74 °C	56	74 °C	66	71 °C
37	74 °C	47	75 °C	57	76 °C	67	76 °C
38	72 °C	48	74 °C	58	74 °C	68	71 °C
39	72 °C	49	71 °C	59	71 °C	69	75 °C
40	73 °C	50	75 °C	60	72 °C	70	74 °C
41	73 °C	51	74 °C	61	72 °C	71	72 °C
42	75 °C	52	78 °C	62	74 °C	72	76 °C
43	73 °C	53	74 °C	63	73 °C	73	72 °C
44	74 °C	54	73 °C	64	74 °C	74	73 °C

Eine Erklärung für die oben beschriebenen Ergebnisse können die Arbeiten von *Barton* und *Zemil* liefern,^[30,134] die zeigen, dass ein kovalent über einen Linker an DNA-Duplexe angebundenes Ethidiumderivat eine Reorganisationszeit von ca. 75 ps benötigt, bevor ein schneller Ladungstransfer mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 ps stattfinden kann.

In dem hier vorgestellten DNA-Assay kann diese Reorganisation des Ethidiums durch den Einbau des Phenanthridinium-Heterozyklus als artifizielle Base behindert sein. Bei Anwesenheit einer Basenfehlpaarung oder einer *abasic site* könnte die strukturelle Freiheit zumindest teilweise wieder hergestellt sein. Dadurch könnte durch die erhöhte Flexibilität des Ethidiums eine für den Ladungstransfer optimale Konformation eingenommen werden. Im Gegensatz zum intakten Duplex wäre somit der Ladungstransfer zwischen photoangeregtem Ethidium und Z bei strukturellen Störungen effizienter.

4.2.3.5 Bestimmung der Reaktionsrate im System Ethidium-Deazaguanin

Abschließend wurden exemplarisch zeitaufgelöste Messungen durch Femtosekunden-aufgelöste Laserspektroskopie (siehe Kapitel 2) durchgeführt, um die Rate des Lochtransfers zwischen E und Z zu bestimmen. Dabei wurden die Duplexe **66** und **46** sowie die Duplexe **70** und **50** verglichen. Während in den Duplex **46** und **50** ein Ladungstransfer möglich ist, dienen die Duplex **66** und **70**, die anstelle von Z ein G besitzen, zur Kontrolle. Wie schon in Kapitel 4.2.2.3 vorgestellt, kann durch den Ladungstransfer eine Abnahme der Quantenausbeute um ca. 50 % bzw. 35 % beobachtet werden (Abbildung 100).

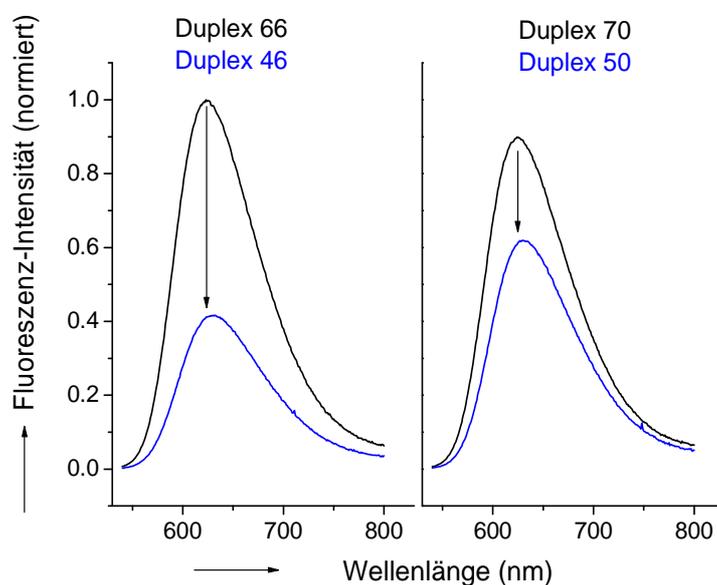


Abb. 100: *Steady-state Fluoreszenz-Emission der Duplexe 46 und 66 und der Duplexe 50 und 70. Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 12.5 μ M Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.*

Die zeitaufgelösten Messungen der Duplexe **46** und **66** liefern folgendes Ergebnis: Während die Emission des Duplexes **66** monoexponentiell mit einer Zeitkomponente von etwa 16.2 ns zerfällt, wurde bei Duplex **46** eine Zeitkomponente von etwa 10.2 ns beobachtet. Bei den Duplexe **70** bzw. **50** wurden Zeitkomponenten von 14.6 ns bzw. 12.1 ns gemessen (Abbildung **101**). Der Unterschied kann darauf zurückgeführt werden, dass in den Duplexen **50** bzw. **70** kein GG-Duplett vorliegt, das das Reduktionspotential erniedrigt und die Triebkraft für einen oxidativen Ladungstransfer erhöht.^[204]

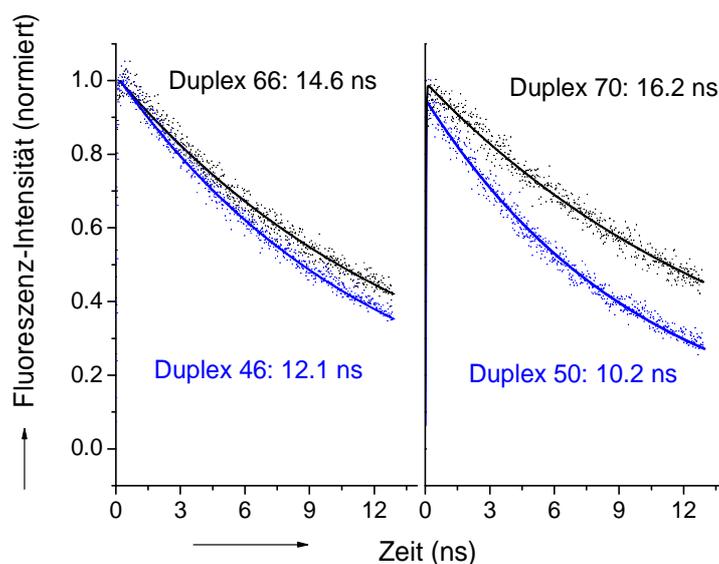


Abb. 101: Zeitaufgelöste Messungen zur Bestimmung der Reaktionsrate an Duplex **46** und **66**. Anregung bei 530 nm. Die Lösungen enthalten 625 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Experimente zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer von in DNA interkaliertem Ethidium im Vergleich zu „freiem“ Ethidium in Wasser zeigen eine verlängerte Lebensdauer τ von etwa 24 ns gegenüber 2 ns.^[199] Kallenbach *et al.* konnten zeigen, dass eine Zeitkomponente im Bereich von 12 ns bis 16 ns typisch für Ethidium ist, wenn es neben Basenfehlpaarungen oder *abasic sites* interkaliert.^[278] Die Werte von 16.2 ns (Duplex **66**) und 14.6 ns (Duplex **70**) liegen in diesem Bereich.

Die Messungen belegen den Ladungstransfer zwischen E und Z durch die kürzere Lebensdauer der Fluoreszenz von photoangeregtem Ethidium in den Duplexen **46** und **50** (Duplex 46: 10.2 ns, Duplex 50: 12.1 ns). Eine Berechnung der Reaktionsraten kann mit Hilfe von Gleichung **14** und Gleichung **15** erfolgen (Kapitel **2**). Dabei ergibt sich ein Wert von $3.63 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ für den Lochtransfer in Duplex **46**. Das entspricht einer Lebensdauer von etwa 28 ns. Für den Duplex **50** ergibt sich eine Reaktionsrate von $1.39 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, das entspricht einer Lebensdauer von 72 ns.

Verglichen mit den von *Barton/Zewail et al.*^[30,134] ermittelten Zeitkonstanten von 5 ps und 75 ps lassen sich folgende Aussagen treffen: Die Lebensdauern im hier vorgestellten DNA-Assay sind also wesentlich langsamer als bei *Barton/Zewail* (siehe Kapitel 4.2.1). Es wird nur eine Zeitkonstante ermittelt. Das deutet darauf hin, dass die artifizielle Base sich nicht vor dem Ladungstransfer umorientiert.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die in Kapitel 4.2.2 beschriebene Entwicklung und Optimierung der Synthese des Ethidium-haltigen Phosphoramidits **S-36** und mit Hilfe einer modifizierten Kupplungsvorschrift (Kapitel 6) wurde der reproduzierbare und selektive Einbau von Ethidium in Oligonukleotide ermöglicht.

Aus den spektroskopischen Experimenten ergibt sich folgendes Bild der Eigenschaften der Ethidium-haltigen DNA:

- Ethidium ist in den Basenstapel interkaliert.
- Die Art der Nachbarbasen sowie die Art der Gegenbase hat keinen signifikanten Einfluss auf die optischen Eigenschaften des Chromophors. Das deutet darauf hin, dass die Gegenbase zu E aus dem Basenstapel herausgedreht vorliegt.
- Die neue artifizielle Base ist als Donor zur Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers im System Ethidium-Methylviologen geeignet. Außerdem ist die Ethidium-haltige Base als Akzeptor zur Untersuchung des oxidativen Ladungstransfers im System Ethidium-Deazaguanin geeignet.
- Die geringe Effizienz des oxidativen Ladungstransfers kann auf eine sehr geringe konformationelle Flexibilität des aromatischen Systems nach dem kovalenten Einbau in die DNA zurückgeführt werden.
- Bei Basenfehlpaarungen oder einer *abasic site* wird es für den Heterozyklus wieder möglich, die für einen effizienten Ladungstransfer optimale Konformation einzunehmen. Die Effizienz des Ladungstransfers steigt entgegen der Erwartungen. Dieses Ergebnis könnte die Grundlage für die Entwicklung von DNA-Assays bilden, die auf der Basis von Ladungstransfer in der DNA funktionieren und mit gewöhnlichen Fluoreszenzgeräten ausgelesen werden.
- Zeitaufgelöste Messungen konnten zeigen, dass der Ladungstransfer zwischen E und Z mit einer Geschwindigkeit von $1.39 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ bzw. $3.63 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ stattfindet.

4.3 Pyren-modifizierte Nucleoside und Oligonucleotide zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransportes in DNA

4.3.1 DNA-Assays mit Pyren als fluoreszenter DNA-Sonde

Pyrene und Pyrenderivate eignen sich als photochemische Sonden zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen, da Pyren und eine Vielzahl von Derivaten spektroskopisch sehr gut charakterisiert sind. Nach einer Anregung bei 340 nm wird eine Emission bei 387 nm beobachtet (Abbildung 102).

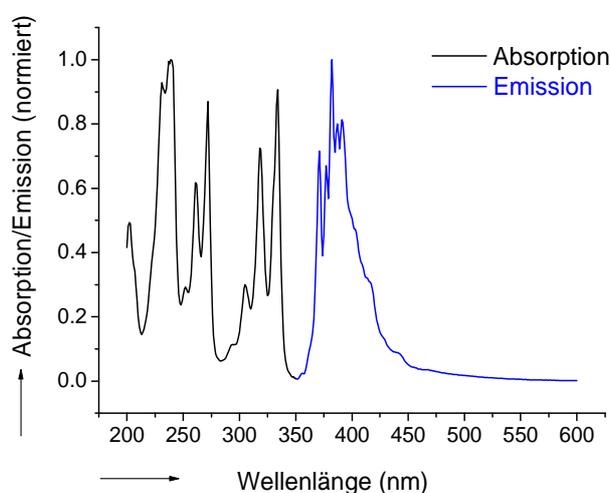


Abb. 102: Optische Eigenschaften von Pyren. Absorption und Fluoreszenz-Emission (Anregung bei 340 nm) von Pyren in Hexan.

Netzel *et al.* führten Experimente durch, um die Löschung der Fluoreszenz des lokal angeregten Zustandes des Pyrens (Py^*) in Abhängigkeit der Art der benachbarten Basen zu untersuchen.^[34]

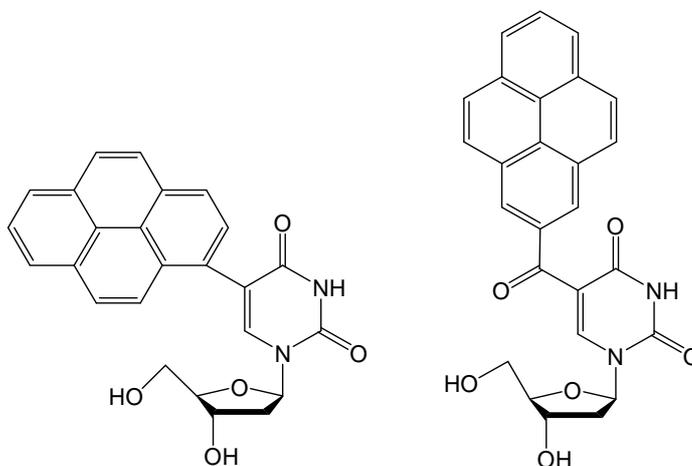


Abb. 103: Von Netzel *et al.* synthetisierte Pyren-haltige Uridine.^[34,214]

Dabei wurde die folgende Reihenfolge für die Fluoreszenzlöschung etabliert: $A < G < T < C$. Es fällt auf, dass diese Reihenfolge weder mit dem Trend für die Reduzierbarkeit der DNA-Basen, $T, U \approx C > A > G$,^[144,145] noch mit dem Trend der Oxidierbarkeit, $G > A > C \approx T$ ^[122,144] korreliert. Das bedeutet, dass je nach benachbarter DNA-Base ein Ladungstransfer vom photoangeregten Pyren (Py^*) als oxidativer Lochtransfer oder als reduktiver Elektronentransfer erfolgen kann.

Für 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU) kann aufgrund der Reduktionspotentiale von $\text{Py}^{+/0}/\text{Py}$ (1.28 V)^[120] und $T/T^{\bullet-}$ (-1.4 V)^[279] mit Hilfe der *Rehm-Weller*-Gleichung ein reduktiver Ladungstransfer prognostiziert werden. Durch zeitaufgelöste Transienten-Absorptionsspektroskopie im ns-Bereich konnte der reduktive Ladungstransfer von *Netzel et al.* (1995) an Py-dU und an 5-(1-Pyrenoyl)-2'-desoxyuridin (Abbildung 103), nachgewiesen werden.^[214] Unter Berücksichtigung des Potentials für $\text{Py}^{+/0}/\text{Py}$ von 1.52 V (vs. NWE)^[215] und $E_{00} = 3.25 \text{ V}$ ^[214] ergibt sich eine Triebkraft für diesen Elektronentransferprozess von max. 500 mV, wenn man das Potential von -1.2 V für das $T/T^{\bullet-}$ -Paar^[145] einbezieht. Die entsprechenden Absolutwerte der Triebkraft erscheinen allerdings zu hoch im Hinblick auf eine kürzlich erschienene Femtosekunden-zeitaufgelöste Studie über die Reduktion von T durch photoangeregtes 2-Aminopurin.^[196] Dort wird ein Potential von -1.9 V für das $T/T^{\bullet-}$ -Paar angegeben.

Für 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (Py-dG) kann mit Hilfe der Redoxpotentiale von sowohl $\text{Py}/\text{Py}^{\bullet-}$ (-2.1 V)^[120] als auch $\text{dG}^{+/0}/\text{dG}$ (1.3 V)^[122] und mit der *Rehm-Weller*-Gleichung ein oxidativer Lochtransfer vorausgesagt werden, was in ps-zeitaufgelösten Experimenten an dem strukturell ähnlichen Benzo{a}pyrenyl-2'-deoxyguanosin-Derivaten auch experimentell gezeigt werden konnte.^[280] Hierfür ergibt sich eine Triebkraft von 100 mV (Abbildung 104 und Abbildung 105).

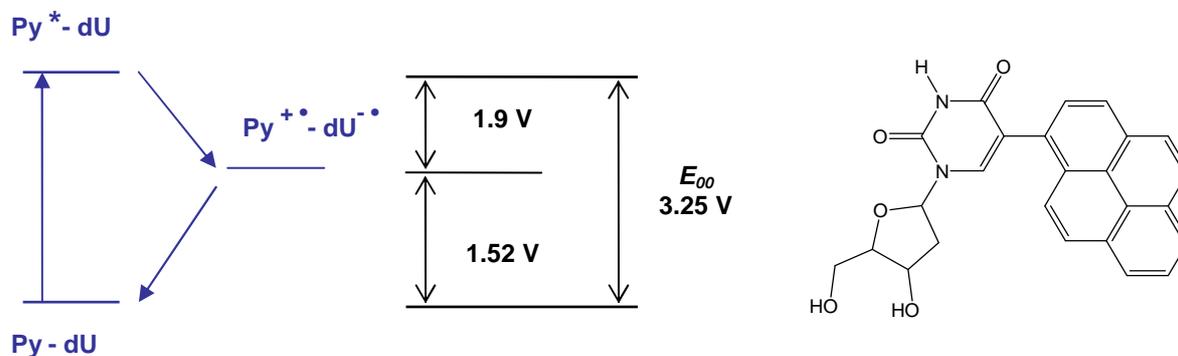


Abb. 104: Reduktiver Elektronentransfer in Py-dU ausgehend von photoangeregtem Pyren Py^* .

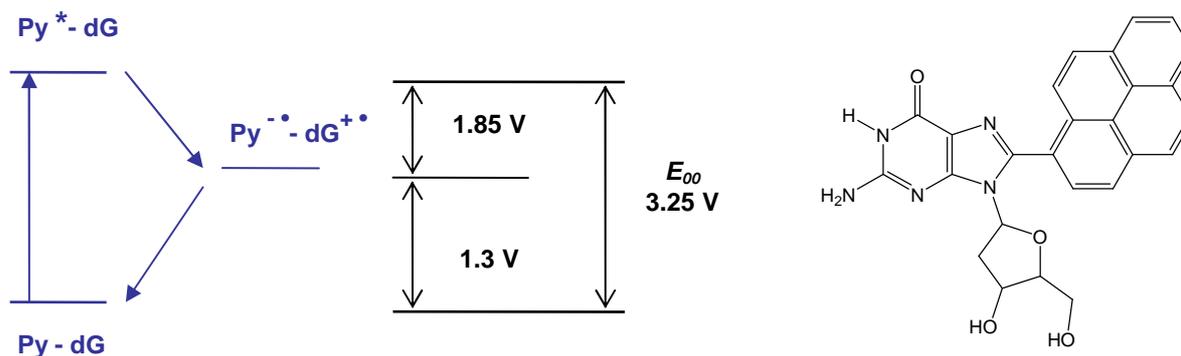


Abb. 105: Oxidativer Lochtransfer in Py-dG ausgehend von photoangeregtem Pyren Py^* .

Für Py-dU lässt sich also ein reduktiver Elektronentransfer vorhersagen, während für Py-dG ein oxidativer Lochtransfer erwartet wird. Aufgrund der Irreversibilität entstehen bei der Angabe der Reduktions- bzw. Oxidationspotentiale große Ungenauigkeiten. Die hier angegebenen Werte können daher nur als grobe Abschätzung der Thermodynamik herangezogen werden.

In den letzten 10 Jahren wurden eine Reihe von Pyren-haltigen Nucleotiden hergestellt, u. a. die C-Nucleotide von *Kool et al.*,^[220] *Woski et al.*,^[219] *Berlin et al.*^[218] und *Pedersen et al.*^[217] Zusätzlich synthetisierten *Netzel et al.*^[34,214] (vgl. Abbildung 106) und auch *Pedersen et al.*^[216,217] Pyren-modifizierte Uracilderivate, bei denen die Pyren-Einheit nicht in den Basenstapel interkaliert, sondern sich in der großen Furche der DNA befindet.

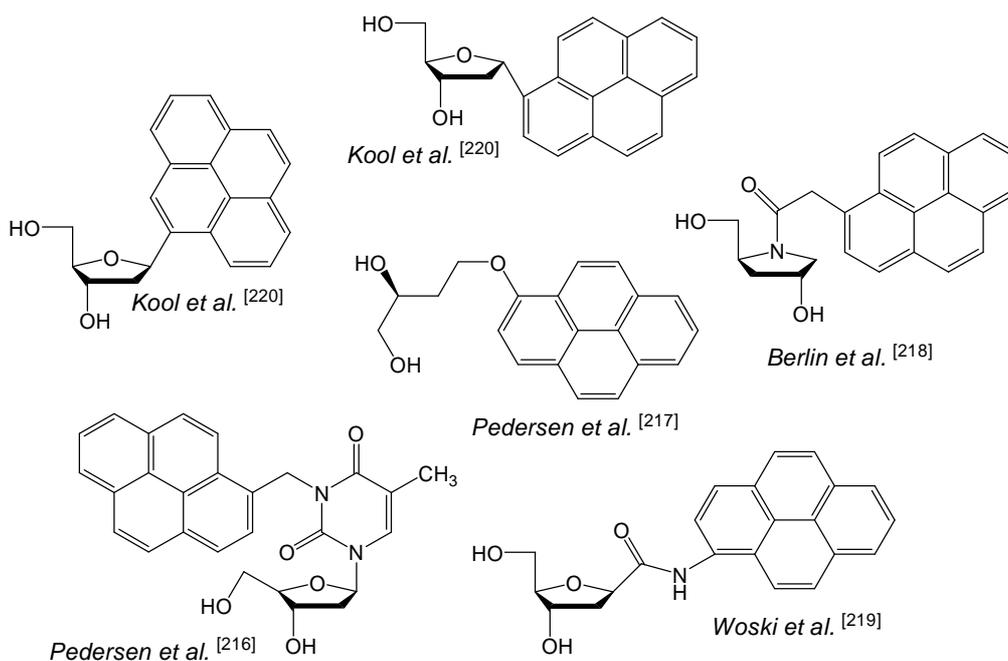


Abb. 106: Verschiedene Pyren-haltige Nucleoside.

Im Rahmen dieses Projektes sollen Pyren-modifizierte Nukleoside und Oligonukleotide hergestellt werden, mit denen verschiedene Ladungstransportprozesse durch die DNA untersucht werden können. Die Besonderheit des vorgeschlagenen DNA-Systems liegt darin, dass durch die kovalente Verknüpfung des Pyrens mit unterschiedlichen DNA-Basen selektiv entweder ein reduktiver Elektronentransfer, zum Beispiel in 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU), oder ein oxidativer Lochtransfer, z. B. in 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (Py-dG) erzeugt werden kann.

Damit erlaubt das Design dieses DNA-Systems die spektroskopische Untersuchung des noch unverstandenen reduktiven Elektronentransportes durch die DNA. Da im Gegensatz zu anderen Modellsystemen das Pyren außerhalb des Basenstapels in der großen Furche angeknüpft ist, wird die DNA-Struktur nur geringfügig gestört (Abbildung 107). Das System erlaubt außerdem die Untersuchung der Frage, inwieweit der Ladungstransfer an Protonierung gekoppelt ist, da die Pyren-Einheit in der großen Furche nicht vom umgebenden Medium abgeschirmt ist.

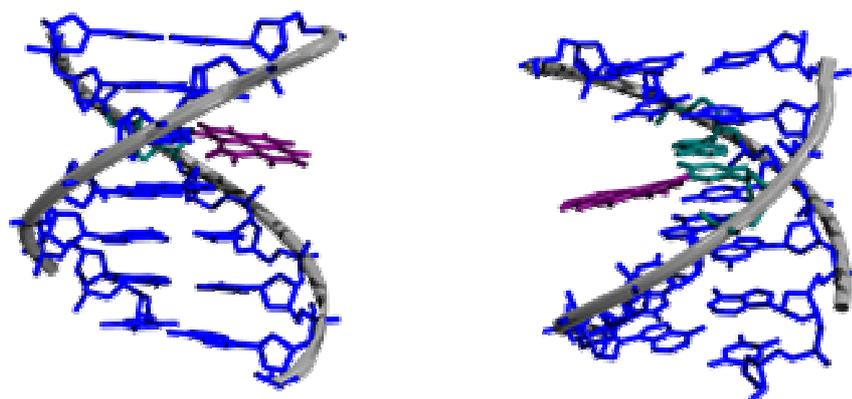


Abb. 107: Zwei verschiedene Ansichten der Struktur eines Pyren-modifizierten DNA-Duplexes für die spektroskopische Beobachtung der Elektroneninjektion in die DNA.^[281]

4.3.2 Synthese und Charakterisierung der Pyren-modifizierten Nukleoside

Als Modellverbindungen für den Lochtransport und den Elektronentransport in DNA sollen die Pyren-modifizierten Nukleoside 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU) und 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (Py-dG) hergestellt werden. Für die Synthese von Py-dU existiert eine Vorschrift von *Netzel et al.*, bei der 1-Pyrenyl-tributylstannan über eine Palladium-katalysierte *Stille*-Kupplung mit einem vollständig geschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin-Derivat verknüpft wurde.^[214] Bei dieser Synthese muss wasserfrei und unter Ausschluss von Luft gearbeitet werden, weswegen von den Autoren empfohlen wird, eine *Glovebox* zu verwenden.

Die *Suzuki-Miyaura*-Kupplung gehört zu einer Reihe Palladium-katalysierter Kreuzkupplungen, zu denen auch die *Stille*,^[282] *Negishi*-^[283] und *Sonogashira*-^[284] Kupplung zählen. Während die *Stille*-Kupplung von Organozinn-Verbindungen als Nucleophilen ausgeht,^[285] werden bei der *Suzuki-Miyaura*-Kupplung in der Regel Boronsäurederivate mit Aryl-, Alkenyl- oder Alkynylhalogeniden gekuppelt. Die *Negishi*-Kupplung wird mit Zinkreagenzien ausgeführt. Bei der *Sonogashira*-Kupplung agiert als aktive Verbindung eine Kupfer-Alkin-Spezies. Diese Kreuzkupplungsreaktionen folgen dem für Palladium-katalysierte Reaktionen typischen Zyklus, der im Wesentlichen aus drei Schritten besteht (Abbildung 108):

- Oxidative Addition: Ein Kohlenstoffelektrophil reagiert mit einem Pd(0)-Komplex zu einer Pd(II)-Spezies.
- Transmetallierung: Es bildet sich eine Pd(II)-Verbindung, die bereits beide zu verknüpfenden organischen Reste enthält.
- Reduktive Eliminierung: Der Katalysator regeneriert sich wieder zur Pd(0)-Spezies und setzt das Kupplungsprodukt frei.

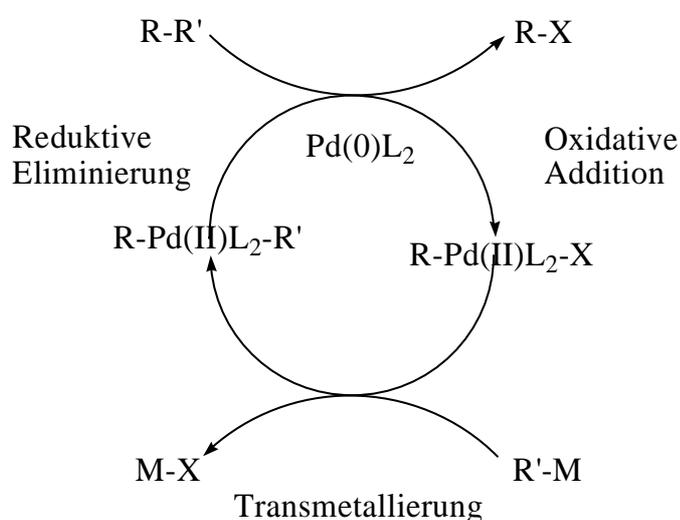


Abb. 108: Zyklus Palladium-katalysierter Kreuzkupplungsreaktionen.^[286]

Als Katalysator wird oft Tetrakis-triphenylphosphin-palladium $\text{Pd}[(\text{PPh}_3)_4]$ eingesetzt. Im Gegensatz zur *Stille*-Kupplung sind bei der *Suzuki-Miyaura*-Kupplung keine wasserfreien Bedingungen erforderlich. Auch eignet sich die *Suzuki-Miyaura*-Kupplung besser für wenig reaktive Elektrophile, da die Borverbindungen gegen Hydrolyse und thermisch sehr stabil sind, was das Erhitzen über längere Zeiträume (mehrere Tage) möglich macht.

Viele ungeschützte funktionelle Gruppen wie Hydroxy- und Aminofunktionen werden toleriert. Bei der *Suzuki-Miyaura*-Kupplung ist häufig die oxidative Addition der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Reaktivität der Halogenide nimmt von I nach Cl stark ab. So werden in erster Linie Iodide oder Bromide eingesetzt.

Da während der Kupplung eine Verknüpfung von zwei sp^2 -Zentren erfolgt, ist eine β -Hydrid-Eliminierung als Nebenreaktion nicht zu erwarten. Die Transmetallierung kann nur stattfinden, wenn durch eine Base eine tetravalente anionische Borspezies gebildet wird, die eine stark erhöhte Nukleophilie aufweist. Unter neutralen Reaktionsbedingungen findet keine Reaktion statt. In wasserhaltigen Lösungsmittelmischungen wird meist Natriumhydroxid und unter wasserfreien Bedingungen oftmals DIPEA als Base verwendet.

Die *Suzuki-Miyaura*-Kupplungen wurden bereits für die Synthese von arylierten und alkenylierten Purinen erfolgreich verwendet.^[287,288] Für die kovalente Anknüpfung des Pyrens an die Basen der Nucleoside Desoxyguanosin und Uracil bietet sich diese Kupplungsmethode aus mehreren Gründen an: Da der organische Rest der Boronsäure-Komponente nur ein schwaches Nucleophil darstellt, ist es nicht nötig, das Nucleosid geschützt einzusetzen, die Reaktion verläuft regiospezifisch. Die Edukte der Kupplungsreaktion sind leicht zugänglich, wie im Fall von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (**51**) oder 1-Pyrenylboronsäure, oder kommerziell erhältlich, wie 5-Iod-2'-desoxyuridin (**48**), und außerdem thermisch und gegen Hydrolyse stabil.

1-Pyrenylboronsäure (**47**) dient als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Pyren-modifizierten Nucleoside und kann in zwei Stufen aus Pyren (**45**) hergestellt werden (Abbildung 109). Dabei wird zunächst Pyren zum 1-Brompyren umgesetzt.^[289] 1-Brompyren (**46**) ist zwar kommerziell erhältlich, Qualitätsprobleme und die hohen Kosten der Substanz machen allerdings eine Synthese im Labormaßstab erforderlich. Pyren (**45**) wird dabei mit Kupfer(II)bromid in Chlorbenzol umgesetzt und 1-Brompyren (**46**) kann anschließend durch Säulenchromatographie (basisches Aluminiumoxid, Benzol) und Umkristallisation in guter Ausbeute (70 %) erhalten werden. **46** kann durch Lithiierung mit *n*BuLi, Umsetzung mit B(OMe)₃ und anschließender Aufarbeitung im wässrig sauren Milieu in die 1-Pyrenylboronsäure (**47**) umgewandelt werden.

Für die Synthese von **47** wurden die Reaktionsbedingungen gegenüber denen der Literaturvorschriften variiert: es stellte sich heraus, dass bei der Metallierung eine Reaktionszeit von 30 min bei -78 °C nach der Zugabe von *n*BuLi optimal ist. Eine Erwärmung der Reaktionslösung während der Lithiierung muss vermieden werden, da sich das instabile Zwischenprodukt dabei fast quantitativ zersetzt.

Als Nebenprodukt entsteht ein stark fluoreszierendes uncharakterisiertes Kupplungsprodukt aus mehreren Pyren-Einheiten. Die Trennung ist durch Säulenchromatographie möglich.^[289-291]

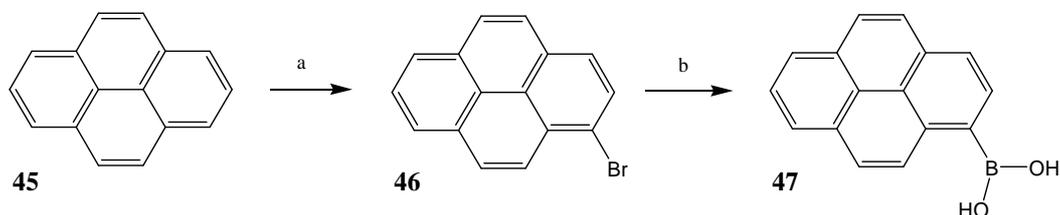


Abb. 109: Synthese der 1-Pyrenylboronsäure (47): **a:** CuBr_2 (2.0 equiv.), Chlorbenzol, $80\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 70 %, **b:** $n\text{BuLi}$ (1.2 equiv.), THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$ (5 equiv.), THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, dann ohne Isolierung der Zwischenstufe bei RT, 20 h, aq. 2 M HCl, RT, 3 h, 73 %.

Für die Synthese von Py-dU (49) wird vom kommerziell erhältlichen 5-Iod-2'-desoxyuridin (48) ausgegangen (Abbildung 110). Die *Suzuki-Miyaura*-Kupplung wird mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ als Katalysator (0.1 equiv.) und mit NaOH (10 equiv.) als Base in $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1/2$ durchgeführt. Das Lösungsmittelgemisch aus THF/ H_2O gewährleistet, dass alle Edukte in Lösung vorliegen; die Zugabe von MeOH ist notwendig, um die Bildung einer Phasengrenze zu verhindern. Die Reaktionsmischung wird 20 h unter Rückfluss erhitzt. Als Nebenprodukt entsteht eine stark fluoreszierende Substanz durch die Übertragung einer Pyren-Einheit auf den Katalysator. Py-dU kann aus der Produktmischung reproduzierbar mit guten Ausbeuten (75-79 %) erhalten werden.

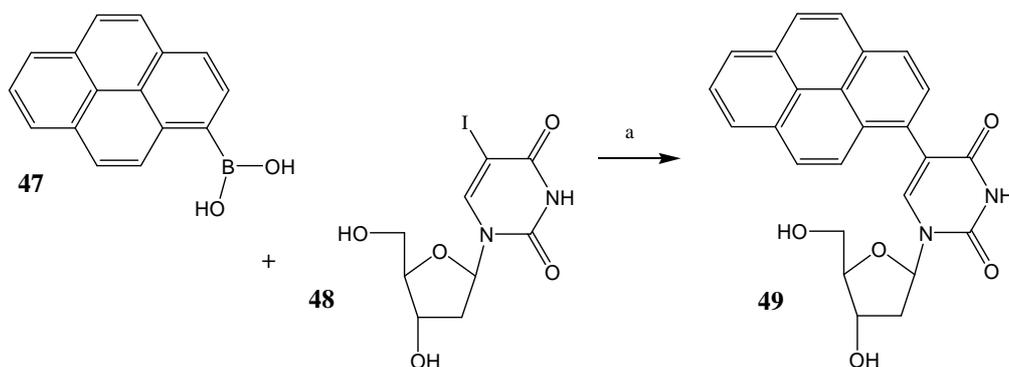


Abb. 110: Synthese von 5-Iod-2'-desoxyuridin (48): **a:** 48 (0.8 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.1 equiv.), NaOH (10 equiv.), $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1/2$, $60\text{ }^\circ\text{C}$, 20 h, 79 %.

Die Synthese von Py-dG (52) wird analog zu Py-dU (49) durchgeführt (Abbildung 111). Das Ausgangsprodukt 8-Brom-2'-desoxyguanosin (51) ist nicht kommerziell erhältlich.

Die Bromierung von 2'-Desoxyguanosin (**50**) gelingt am besten mit NBS in H₂O und ist in der Literatur beschrieben.^[292] Das Produkt kristallisiert und kann durch Filtration abgetrennt werden. Eine weitere Reinigung ist nicht erforderlich.^[292] Während der Reaktion muss allerdings der pH-Wert der Lösung beachtet werden, denn bei *pH*-Werten unter 6.0 wird keine Reaktion beobachtet. Optimal ist ein *pH*-Wert von 7.0, diese Tatsache ist in der Originalvorschrift nicht erwähnt.

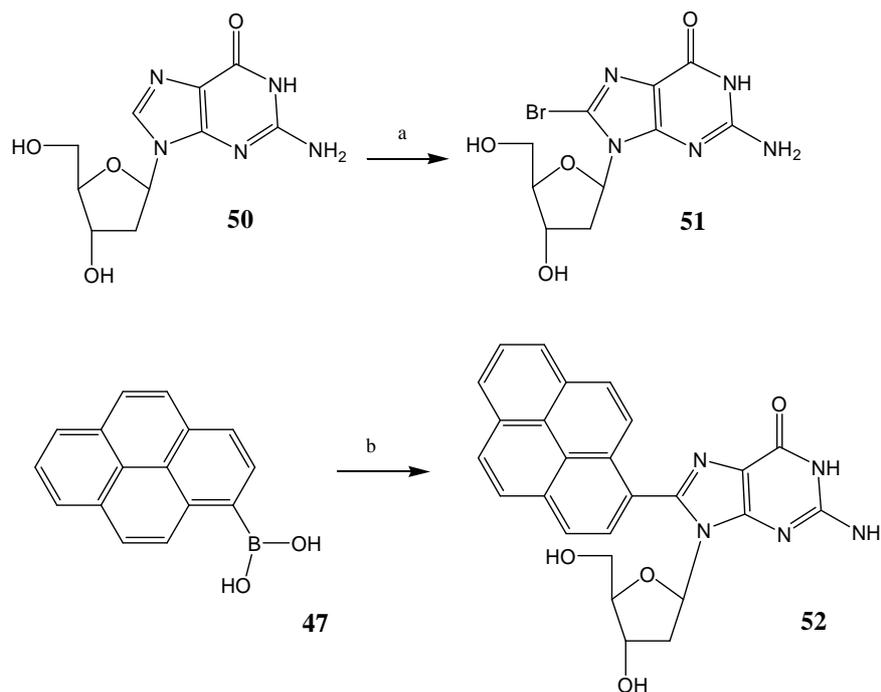


Abb. 111: Synthese von 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (**52**): **a**: NBS (1.1 equiv.), H₂O, RT, 2 h, 85 %, **b**: **51** (0.8 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (0.1 equiv.), NaOH (10 equiv.), THF/MeOH/H₂O = 2/1/2, Rf, 20 h, 65 %.

Bei der anschließenden *Suzuki-Miyaura*-Kupplung wird – wie bei der Synthese von Py-dU – in einer Lösungsmittelmischung und unter den gleichen Bedingungen gearbeitet. Py-dG (**52**) kann nach der säulenchromatographischen Reinigung (Kieselgel, Elution des Nebenprodukts: DCM/Aceton = 4/1, Elution von Py-dG: EE/MeOH/H₂O = 10/1/0.5) in reproduzierbar guten Ausbeuten (60-65 %) erhalten werden.

Die Reinheit der Syntheseprodukte Py-dU (**49**) und Py-dG (**52**) wurde durch HPLC und HPLC-ESI-MS überprüft (> 99.5 %). Anschließend wurden die Pyren-modifizierten Nucleoside durch 2D-NMR Spektroskopie (*COSY* und *HSQC*) strukturell charakterisiert. Zur Untersuchung der Konformation wurden zusätzlich *NOESY*-Messungen durchgeführt.

Diese Konformationsanalyse ist wichtig für den späteren Einbau in Oligonukleotide und DNA-Duplexe. Liegt das Pyren-modifizierte Nucleosid in der *anti*-Konformation vor, so liegt die Pyren-Einheit in der großen Furche des DNA-Duplexes, was die ideale Voraussetzung für die Kontrolle der Ladungsinjektion in die DNA darstellt. Im Falle der *syn*-Konformation würde die Pyren-Einheit die Gegenbase im DNA-Duplex verdrängen und dadurch zumindest partiell interkalieren. Als Folge könnte die Ladungsinjektion in mehrere Basen und auf unterschiedliche Weise erfolgen. Auf der Basis dieser Konformationsanalyse eignet sich nur Py-dU für den späteren Einbau in Oligonukleotide.

Die beiden möglichen Konformationen, die *syn*- und die *anti*-Konformation von Py-dU, sind in der folgenden Abbildung **112** dargestellt. Das Proton H-8 des Uracils ist den Protonen der 2'-Desoxyribose am C-2 in der *anti*-Konformation so nah, dass im *NOESY* ein Kreuzpeak erscheinen sollte. Günstig wirkt sich hier aus, dass H-8 im NMR-Spektrum tieffeldiger als die Protonen der Pyren-Einheit erscheint und leicht identifiziert werden kann. Im Fall der *syn*-Konformation stehen H-8 und die Protonen am C-2 der 2'-Desoxyribose hier in unterschiedliche Richtungen und sind relativ weit voneinander entfernt. Hier sollte ein *NOE* zwischen dem Proton H-1 des anomeren C-Atoms und H-8 auftreten (Abbildung **112**).

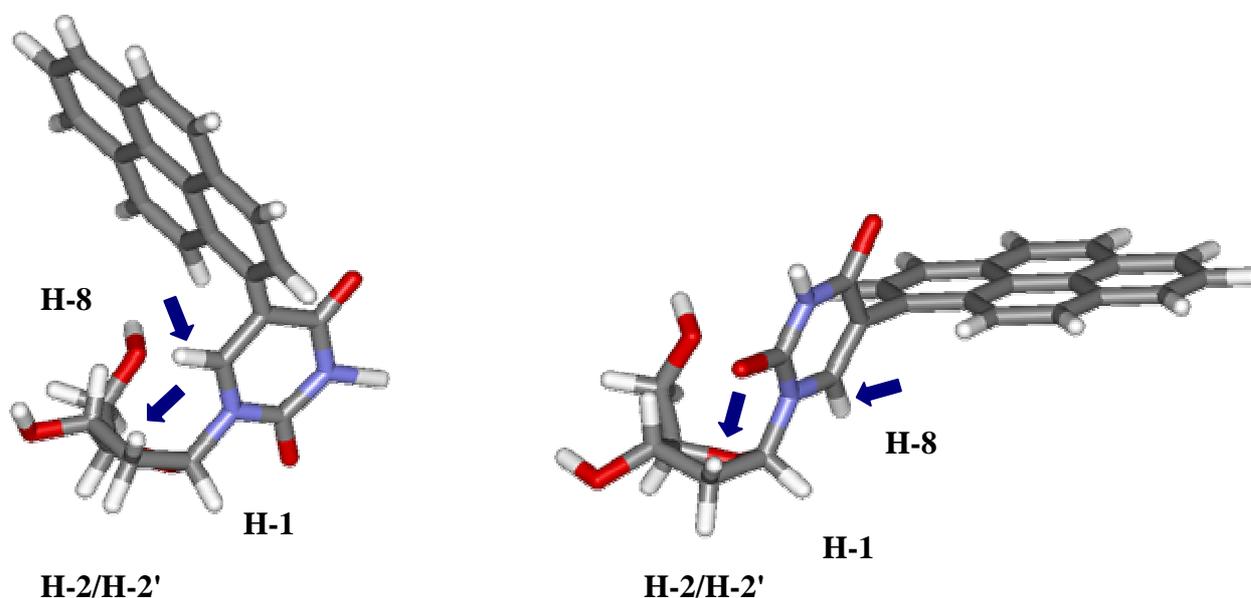


Abb. 112: *anti*-Konformation (links) und *syn*-Konformation (rechts) von Py-dU (49).

Die Analyse des *NOESY* in Abbildung 113 von Py-dU zeigt, dass das Molekül in der *anti*-Konformation vorliegt, da deutlich die Wechselwirkung zwischen H-8 und H-2/H-2' sichtbar ist und keinerlei Wechselwirkung zwischen H-8 und H-1.

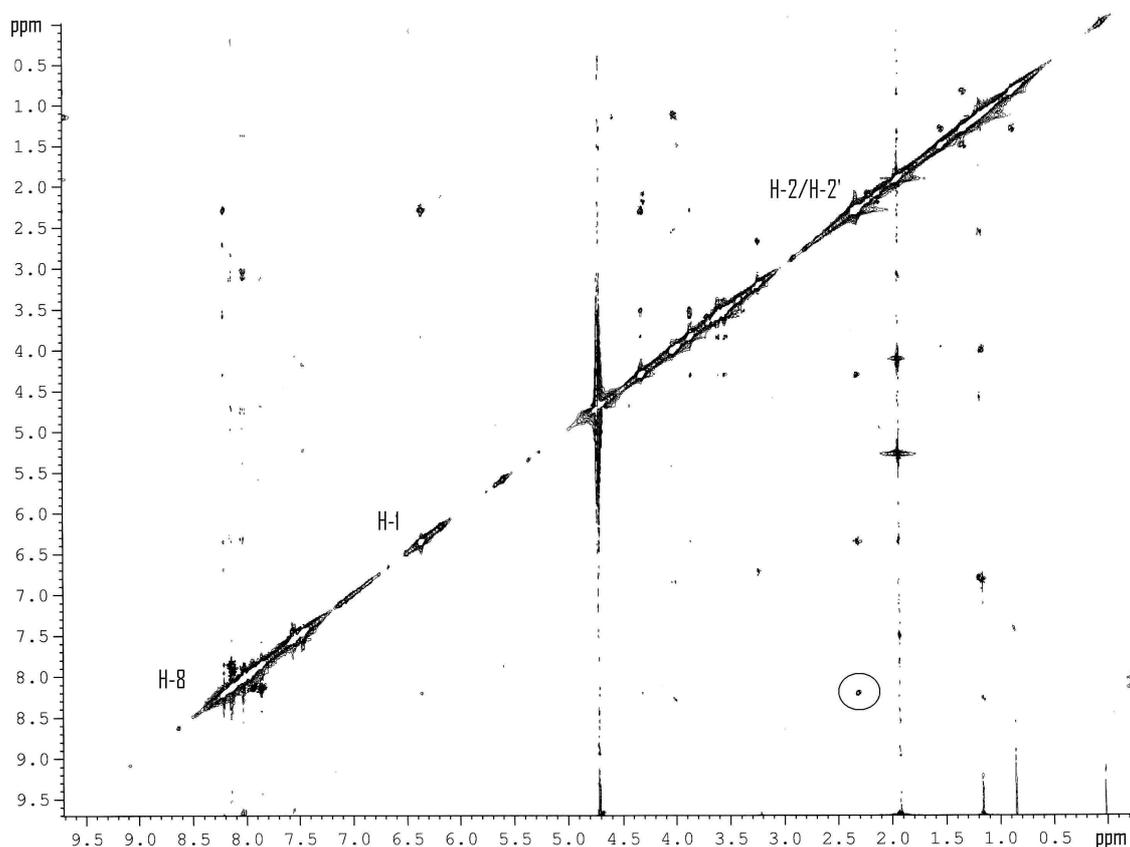


Abb. 113: *NOESY* von Py-dU (49).

Die beiden möglichen Konformationen, die *syn*- und die *anti*-Konformation von Py-dG sind in der folgenden Abbildung 114 dargestellt. Im Fall der *anti*-Konformation sind ein Proton der Pyren-Einheit und die Protonen am C-2 der 2'-Desoxyribose eng benachbart, so dass im *NOESY* ein Kreuzpeak erscheinen sollte. Im Fall der *syn*-Konformation sind das Pyren-H und die Protonen an C-2 der 2'-Desoxyribose relativ weit voneinander entfernt. Hier sollte ein *NOE* zwischen dem Proton am anomeren C-Atom und dem Pyren-H auftreten (Abbildung 114).

Die Analyse des *NOESY* in Abbildung 115 von Py-dG zeigt, dass das Molekül in der *syn*-Konformation vorliegt, da deutlich die Wechselwirkung zwischen H-1 und dem Pyren-H sichtbar ist und keinerlei Wechselwirkung zwischen H-2/H-2' und dem Pyren-H.

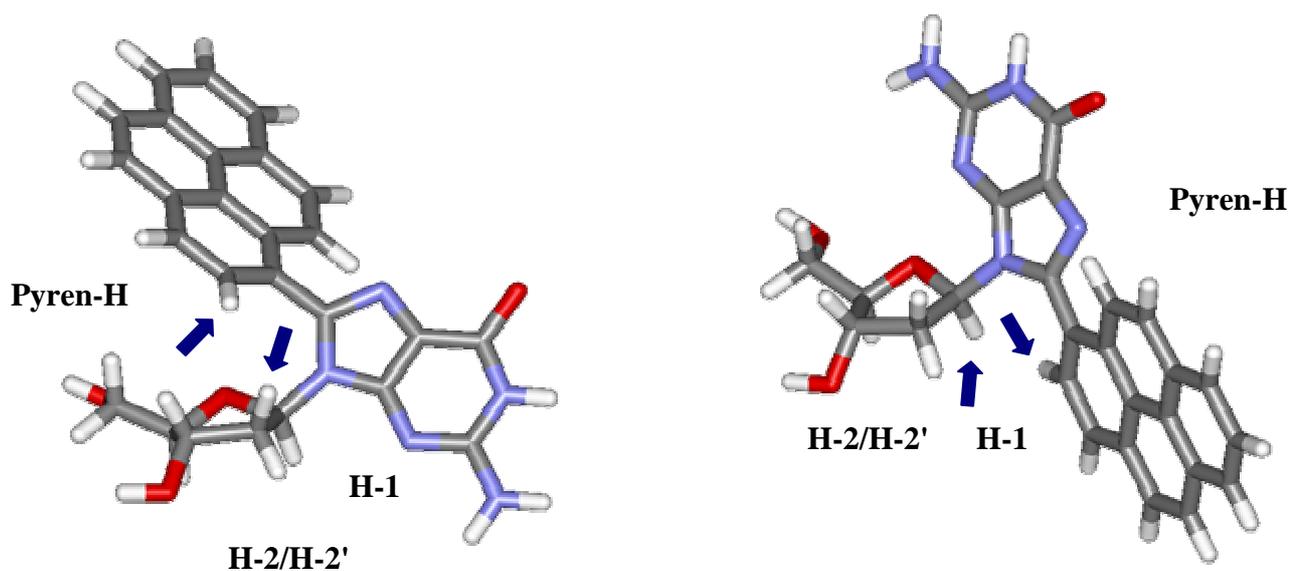


Abb. 114: *anti*-Konformation (links) und *syn*-Konformation (rechts) von Py-dG (52).

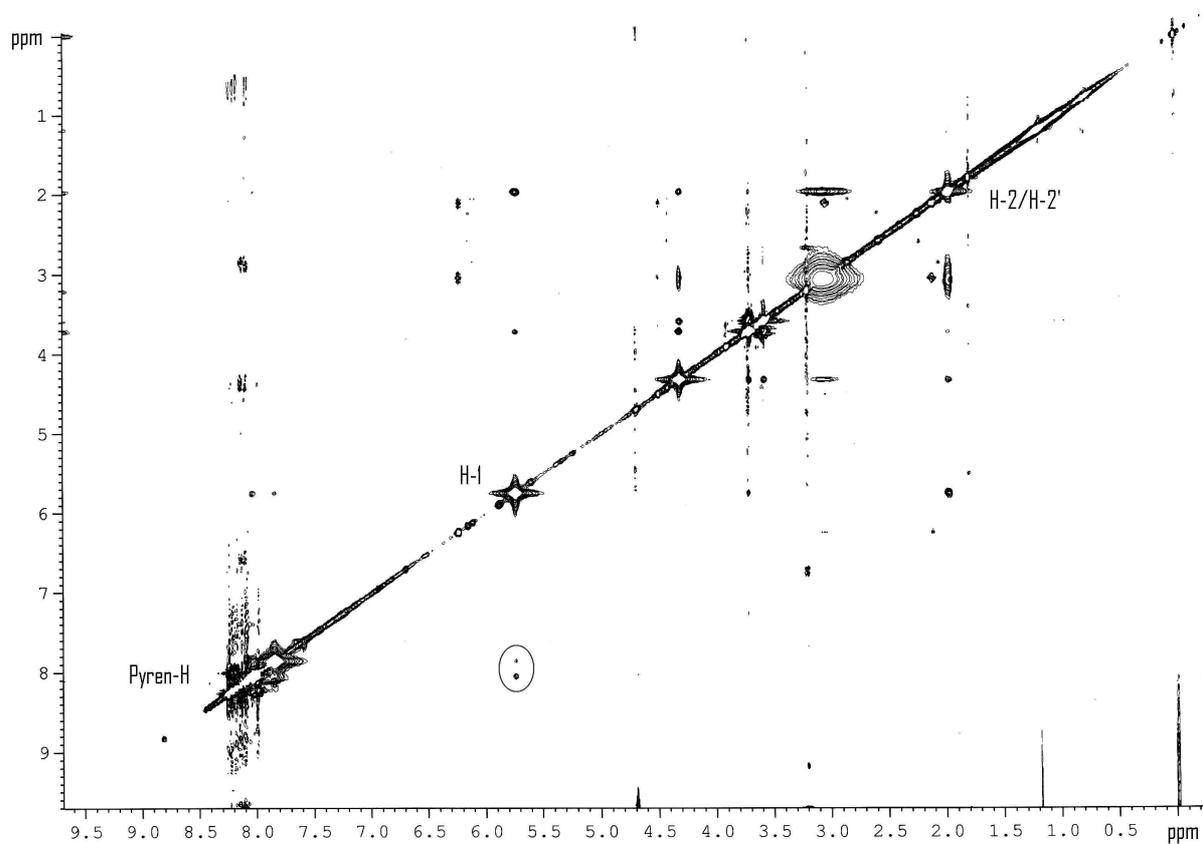


Abb. 115: NOESY von Py-dG (52).

4.3.3 Experimente zum Ladungstransfer in Py-dU und Py-dG

Zur Charakterisierung der Ladungstransfereigenschaften wurden zunächst die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Pyren-modifizierten Nucleoside **49** und **52** untersucht. Die Messungen wurden in Acetonitril (ACN) und MeOH als typische organische Lösungsmittel durchgeführt, wobei nur in MeOH Wasserstoffbrücken mit den Nucleosiden ausgebildet werden können. Wie erwartet, zeigen die UV/Vis-Spektren der Nucleoside **49** und **52** sowohl im Vergleich untereinander als auch im Vergleich zwischen MeOH und ACN ein ähnliches Absorptionsverhalten mit Pyren-typischen Banden, wie in Abbildung 116 und in Abbildung 117 dargestellt.

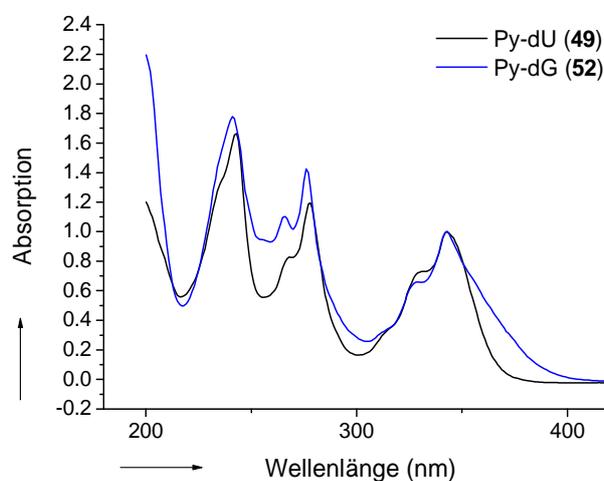


Abb. 116: UV/Vis-Spektren der Pyren-modifizierten Nucleoside **49** und **52** in ACN bei RT.

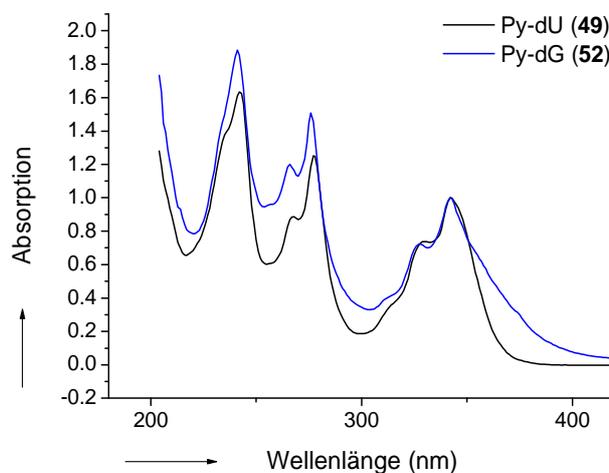


Abb. 117: UV/Vis-Spektren der Pyren-modifizierten Nucleoside **49** und **52** in MeOH bei RT.

In den Nucleosiden **49** und **52** sind die zwei Chromophore jeweils über eine C-C-Einfachbindung kovalent miteinander verknüpft, was eine starke Wechselwirkung zur Folge haben kann. Stark gekoppelte Systeme zeigen im Allgemeinen intensive, strukturlose Fluoreszenzbanden, deren Maxima lösungsmittelabhängig sind.^[293] Als Folge dieser speziellen Art der Wechselwirkung zwischen Pyren und dem angefügten Chromophor (dU bzw. dG) wird die Bildung intramolekularer Ladungstransfer-Zustände erwartet, die eine starke Fluoreszenz aufweisen und daher als intramolekulare Exciplexe betrachtet werden. Diese Exciplexe enthalten sowohl Beiträge des lokal angeregten Zustandes ($\text{Py}^*\text{-dX}$, $\text{X} = \text{U}$ bzw. G) als auch des ladungstrennten Zustandes ($\text{Py}^-\text{-dX}^{++}$ bzw. $\text{Py}^{+}\text{-dX}^*$).

Basierend auf den Absorptionsspektren wurde eine Anregungswellenlänge von 340 nm für die *steady-state* Fluoreszenz-Messungen beider Nucleoside gewählt. Die Emissionen der Pyren-modifizierten Nucleoside, die aus der Anregung bei 340 nm in ACN resultieren, haben unterschiedliche Maxima: Py-dU bei 424 nm und Py-dG bei 482 nm, wie in Abbildung 118 dargestellt. Die Emissionsspektren unterscheiden sich deutlich von der *steady-state* Fluoreszenz von Pyren (vgl. Kapitel 3). Das deutet auf eine starke elektronische Wechselwirkung der Nucleosideinheit und dem kovalent angeknüpften Pyren und der daraus resultierenden unterschiedlichen Exciplexeigenschaften der Nucleoside **49** und **52** hin. Die Fluoreszenz resultiert nicht ausschließlich aus dem lokal angeregten Zustand (Py^*) – dessen Emission wäre im Bereich von etwa 380 nm bis zu 390 nm zu beobachten – sondern ist durch die elektronische Kopplung deutlich rotverschoben.

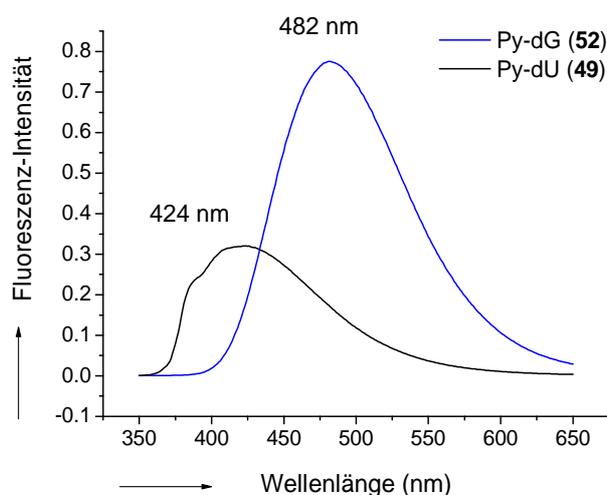


Abb. 118: Fluoreszenzspektren der Pyren-modifizierten Nucleoside **49** und **52** in ACN, Anregung bei 340 nm.

Bestimmt man die relative Quantenausbeuten der Nucleoside durch Integration der Emission, so wird folgende Reihenfolge gefunden: $G > T$, die mit der von *Netzel et al.* bestimmten Reihenfolge der Löscheffizienz übereinstimmt.^[34]

Die Fluoreszenzspektren der Nucleoside **49** und **52** zeigen in MeOH (Abbildung **119**) Unterschiede zu denen in ACN (Abbildung **118**). Während bei Py-dG nur kleine Unterschiede der Maxima (482 nm in ACN und 475 nm in MeOH) zu beobachten sind, tritt bei Py-dU eine deutliche bathochrome Verschiebung von 424 nm in ACN hin zu 463 nm in MeOH auf. Eine Erklärung dafür ist die Stabilisierung des ladungstrennten Zustands durch die Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken in MeOH. Femtosekunden-zeitaufgelöste Experimente mit Py-dU (**49**) in MeOH bestätigen diese Interpretation. Die Erklärung von *Netzel et al.*^[34] der Verschiebung durch die Protonierung des Uracil-Radikalanions $U^{\cdot-}$ im ladungstrennten Zustand steht im Widerspruch mit dem von *Steenken et al.* bestimmten pK_s -Wert von 6.9 für das protonierte Uracil-Radikalanion $dU(H)^{\cdot}$, denn damit wäre es eine stärkere Säure als MeOH und könnte mit Sicherheit nicht protoniert werden.

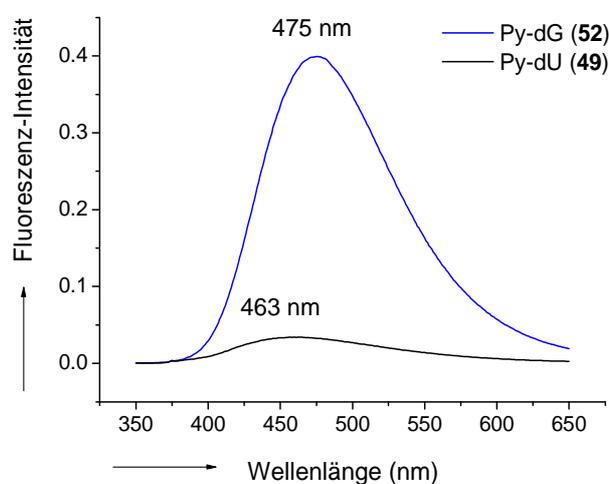


Abb. 119: Fluoreszenzspektren der Pyren-modifizierten Nucleoside **49** und **52** in MeOH, Anregung bei 340 nm.

Das synthetisierte Nucleosid Py-dU (**49**) wurde als spektroskopische Modellverbindungen für den reduktiven Elektronentransport durch die DNA untersucht. Die oben dargestellten Absorptions- und Emissionsmessungen wurden in ACN und in MeOH durchgeführt. Im Gegensatz dazu finden spektroskopische Experimente an Oligonucleotiden – nach dem Einbau von Py-dU in DNA – normalerweise in gepufferten wässrigen Lösungen (oftmals Phosphatpuffer, pH 7.0) statt. Es ist deshalb wichtig, die spektroskopischen Eigenschaften des Nucleosids **49** auch in wässriger Lösung zu messen.

Auf diese Weise wird es ermöglicht, die Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften von Py-dU vom pH -Wert zu messen. Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen von Py-dU vor und/oder nach der photochemischen Anregung sowie Protonenübergänge von Folgeprodukten können einen deutlichen Einfluss auf die Eignung von Py-dU als spektroskopische Modellverbindung haben, weil dadurch die Elektroneninjektion beeinflusst werden kann. Entscheidend ist die Frage, welcher der Prozesse – die Protonierung oder der Elektronentransfer – schneller abläuft und ob der Protonentransfer eine Voraussetzung für die Elektroneninjektion (*proton coupled electron transfer, PCET*) darstellt.

Zunächst wurde die stationäre Fluoreszenz von **49** in H_2O bei pH 5 und 11 aufgenommen. Wie in Abbildung **120** dargestellt, ist die Fluoreszenz von Py-dU bei einem pH -Wert von 5 im Gegensatz zu pH 11 vollständig gelöscht. Das deutet auf das Verschwinden der fluoreszierenden Spezies Py^* , das mit der nicht-fluoreszierenden ladungstrennten Spezies Py^{*+} im Gleichgewicht steht und damit auf einen Elektronentransfer von der Uracil- auf die Pyreneinheit in Py-dU.

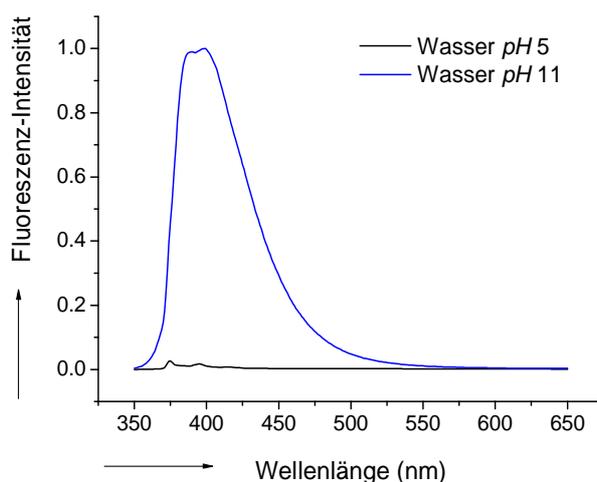


Abb. 120: Fluoreszenzspektren von Py-dU (**49**) und in H_2O bei pH 5 und 11, Anregung bei 340 nm.^[294,295]

Wird die Emissionsintensität von Py-dU (**49**) in Abhängigkeit des pH -wertes im Bereich von 2 bis 12 aufgenommen (Abbildung **121**), so ergibt die Auswertung der charakteristischen sigmoidalen Kurve einen pK_s -Wert von etwa 5.5 für das protonierte Biradikal Py^{*+} -dU(H)^{*}. Dieser Wert ist kleiner als der pK_s -Wert von 6.9, der von *Steenken* für dU(H)^{*} bestimmt wurde. Hier zeigt sich der Einfluss des kovalent angeknüpften Pyrens.^[149] Die leichte Abnahme der Fluoreszenz-Emission bei pH -Werten über 10 ist wahrscheinlich das Ergebnis einer Deprotonierung des Grundzustands von Uracil.

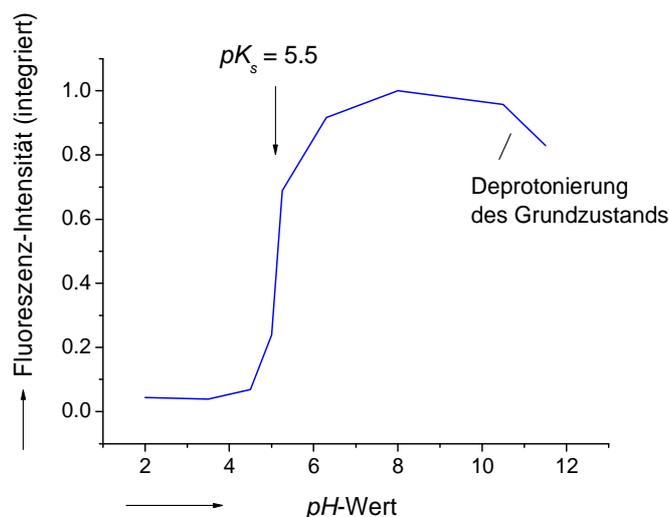


Abb. 121: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Py-dU vom pH-Wert, Anregung bei 340 nm.^[294]

Zur weiteren Untersuchung wurden *pump-probe*-laserspektroskopische Experimente durchgeführt. Exemplarisch sind die transienten Absorptionsspektren 0.5 ps und 20 ps nach der Anregung bei 340 nm in Wasser bei einem pH-Wert von 5.0 dargestellt (Abbildung 122). Es ist bekannt, dass der lokal angeregte Zustand des Pyrens (Py*) bei 375 nm absorbiert^[296] und das Pyrenylradikalkation Py^{•+} und auch Py* im Bereich zwischen 450 nm und 500 nm absorbieren.^[297] In Abbildung 122 lässt sich zunächst die Bildung von Py* und dann die Gleichgewichtseinstellung mit dem ladungstrennten Py^{•+} als Folge des Elektronentransfers beobachten.

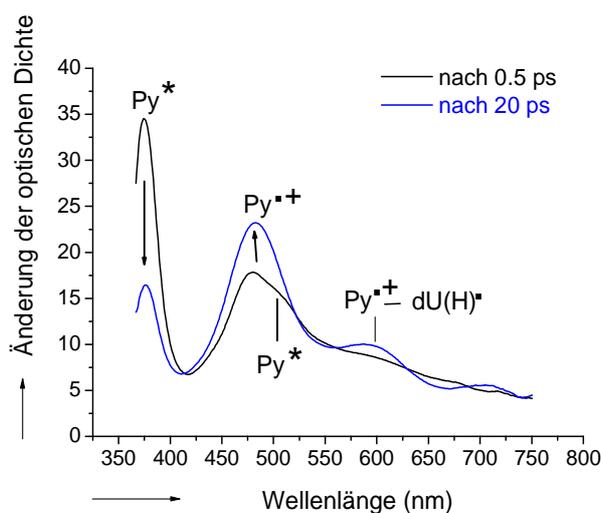


Abb. 122: Zeitlicher Verlauf der Änderung der transienten Absorption von Py-dU (49) in H₂O bei pH 5, Anregung bei 340 nm.

Ermittelt man die Geschwindigkeit der Intensitätsänderungen der beiden Absorptionsmaxima bei 375 und 480 nm, erhält man die Dynamik der in Py-dU ablaufenden Prozesse. In ACN und in H₂O bei *pH* 11 ist kein Zerfall von Py*-dU im Zeitfenster von 10 ns detektierbar. Bei *pH* 5 erfolgt der Zerfall von Py* und die Bildung von Py^{•+} in 4.7 ps. Beide Spezies, Py* und Py^{•+}, zerfallen danach auf der gleichen Zeitskala von 110 ps (Abbildung 123).

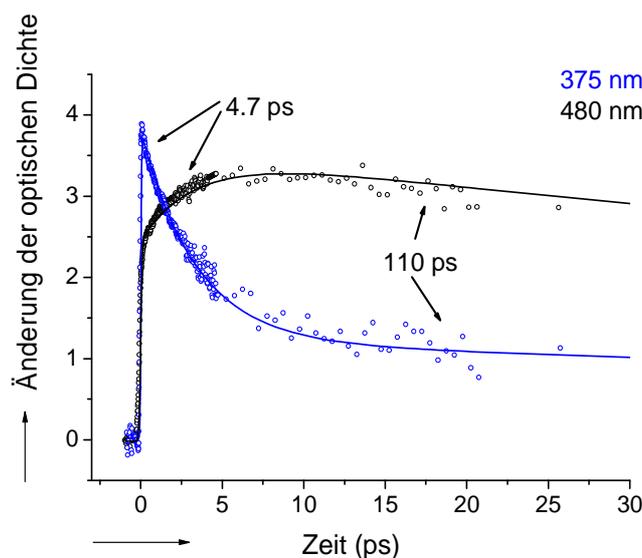


Abb. 123: Zeitlicher Verlauf der transienten Absorption von Py-dU nach Anregung mit fs-Puls, Detektion bei 375 nm und 480 nm.

Zusätzlich werden zeitaufgelöste Untersuchungen bei verschiedenen *pH*-Werten durchgeführt.

Die Daten aus den stationären Fluoreszenzmessungen zusammen mit denen der transienten Absorption ergeben das folgende Bild für den intramolekularen Elektronentransfer in Py-dU (49): Es besteht ein Gleichgewicht zwischen dem lokal angeregten Zustand Py*-dU und dem ladungstrennten Zustand Py^{•+}-dU^{•-}. Die beobachtete Löschung der Emission, die bei Py-dU (49) nur bei *pH* 5 zu beobachten ist, ist die Folge eines Protonentransfers, der dem Elektronentransfer folgt (Abbildung 124).

Die DNA-Base C und T sind am leichtesten reduzierbar.^[144,145] Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in jedem Basenpaar in der DNA entweder C oder T vorkommt, wurde vorgeschlagen, dass der reduktive Elektronentransport durch die DNA einem *Hopping*-Mechanismus folgt, der alle Basenpaare und die Radikalanionen C^{•-} und T^{•-} als intermediäre Elektronenträger involviert.^[72] Allerdings wurde von *Steenken* eine stark unterschiedliche Basizität der beiden Radikalanionen T^{•-} und C^{•-} vorgeschlagen. Das bedeutet, dass der Elektronentransport durch Protonentransfer-Reaktionen beeinflusst werden kann.^[149]

Wenn Py-dU dazu geeignet ist, Elektronen in die DNA zu injizieren, dann muss die Protonierung dieser Ladungsträger – also der Basenradikale C^{\bullet} und T^{\bullet} – in Abhängigkeit vom pH -Wert betrachtet werden. Eine Protonierung des dU-Radikals (als Modell für das T-Radikal in der DNA) würde die *Hopping*-Geschwindigkeit reduzieren. Diese Ergebnisse haben fundamentale Bedeutung für den Elektronentransport durch die DNA. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich feststellen, dass T^{\bullet} als intermediärer Ladungsträger beim DNA-übertragenen Elektronen-*Hopping* auftreten kann.

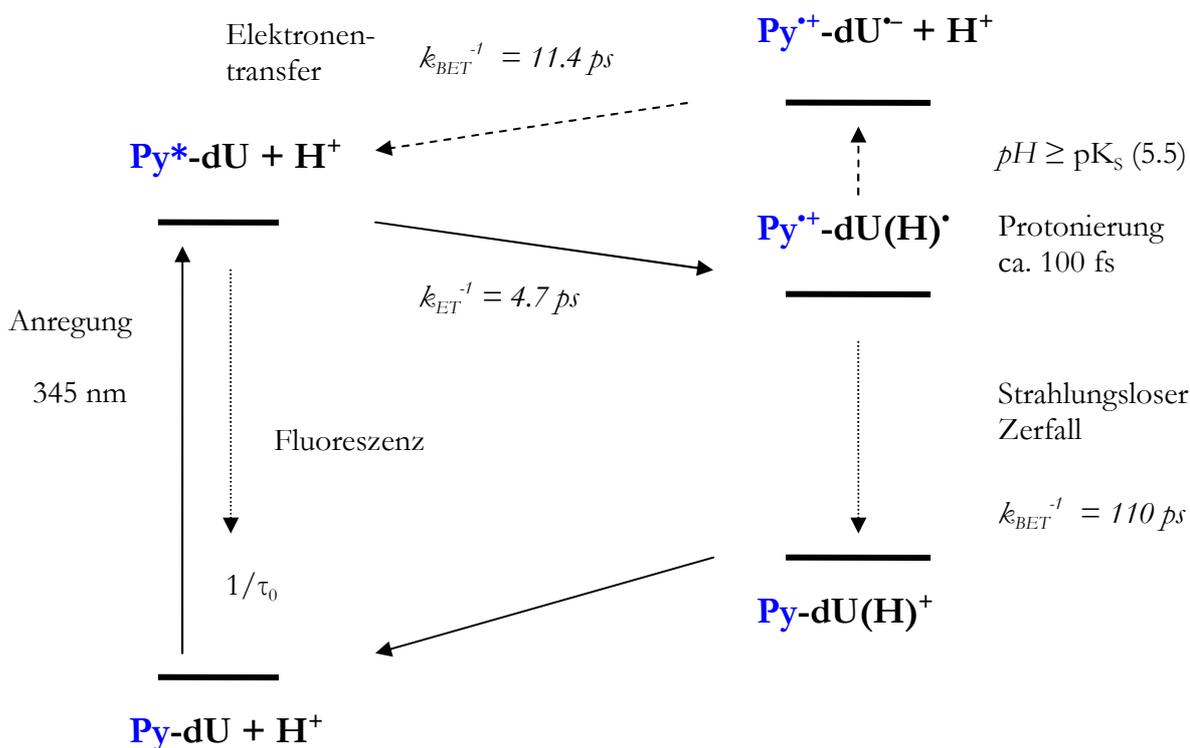


Abb. 124: Intramolekularer Elektronentransfer und Protonentransfer in Py-dU (49). Die angegebenen Raten gelten für einen pH -Wert von 5.^[294,295]

Im Gegensatz zu Py-dU (49), durch das photochemisch ein intramolekularer Elektronentransfer ausgelöst wird, ist in Py-dG (52) ein oxidativer Lochtransfer zu erwarten (siehe Kapitel 3). Wird die Emissionsintensität von Py-dG (52) in Abhängigkeit des pH -Wertes aufgenommen, so ergibt sich im Vergleich zur pH -Abhängigkeit in Py-dU eine gegenläufige Kurve (Abbildung 125). Das lässt sich dadurch interpretieren, dass in Py-dG (52) wie erwartet die ladungstrennte Spezies $Py^{\bullet}-dG^{++}$ entsteht, die bei pH -Werten über 5-6 zu $Py^{\bullet}-G(-H)^{\bullet}$ deprotoniert wird. Der pK_a -Wert des G-Radikalkations (G^{++}), der sich aus diesen Messungen bestimmen lässt, liegt bei ca. 4 und stimmt gut überein mit dem Wert 3.9, der von *Steenken* angegeben wird (Abbildung 126).^[149]

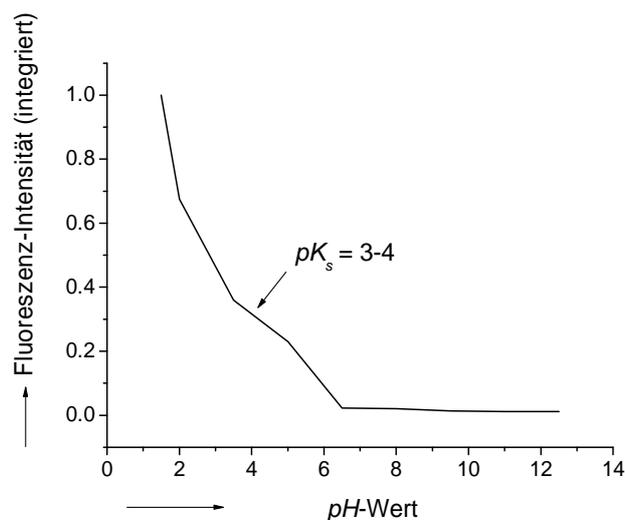


Abb. 125: *pH-Abhängigkeit der Emission von Py-dG in H₂O, Anregung bei 340 nm.*

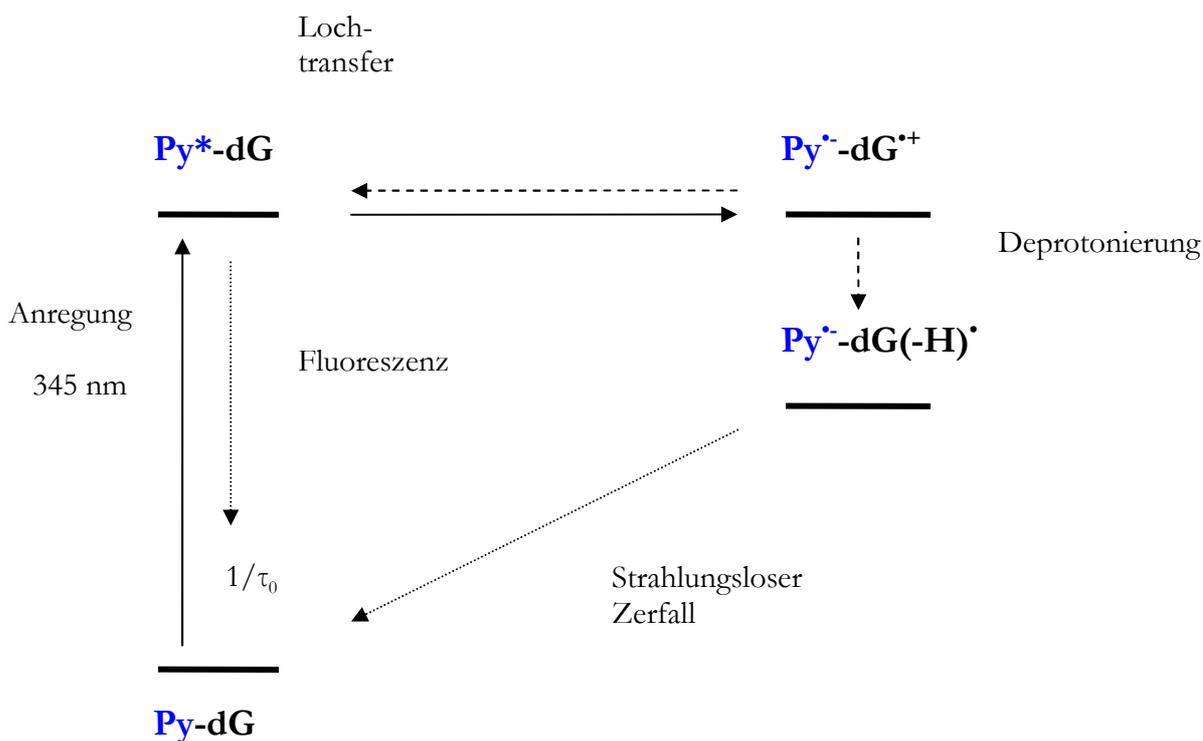


Abb. 126: *Intramolekularer Lochtransfer und Protonentransfer in Py-dG (52).*

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Py-dG sind zeitaufgelöste Messungen nicht möglich. Py-dG ist damit prinzipiell für Untersuchungen zum photoinduzierten Lochtransfer in DNA geeignet. Da in dieser Arbeit vorwiegend Experimente zur Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers geplant sind, wird auf den Einbau des Bausteins in DNA verzichtet.

4.3.4 Synthese und Charakterisierung der Pyren-modifizierten Oligonukleotide

Pyrene sind geeignete Elektronendonoren, wenn sie kovalent an Pyrimidine geknüpft sind, wie das in Py-dU (**49**) der Fall ist. Durch den Einbau der Py-dU-Gruppe in DNA-Duplexe wird aus dem photochemisch induzierbaren intramolekularen Elektronentransfer eine Elektroneninjektion in die DNA. Durch die Anknüpfung des Pyrens außerhalb des Basenstapels kommt es zu keiner Interkalation des Ladungsdonors. Dies hat den Vorteil, dass die DNA-Struktur nur geringfügig gestört wird. Für die Synthese entsprechender Py-dU-modifizierter Oligonukleotide wird Py-dU (**49**) in zwei Stufen zum Phosphoramidit **54** umgesetzt (Abbildung 127). Die Tritylierungsreaktion und die Synthese des Phosphoramidits sind in der Literatur vielfach beschrieben und können für die Synthese von **53** und **54** eingesetzt werden.

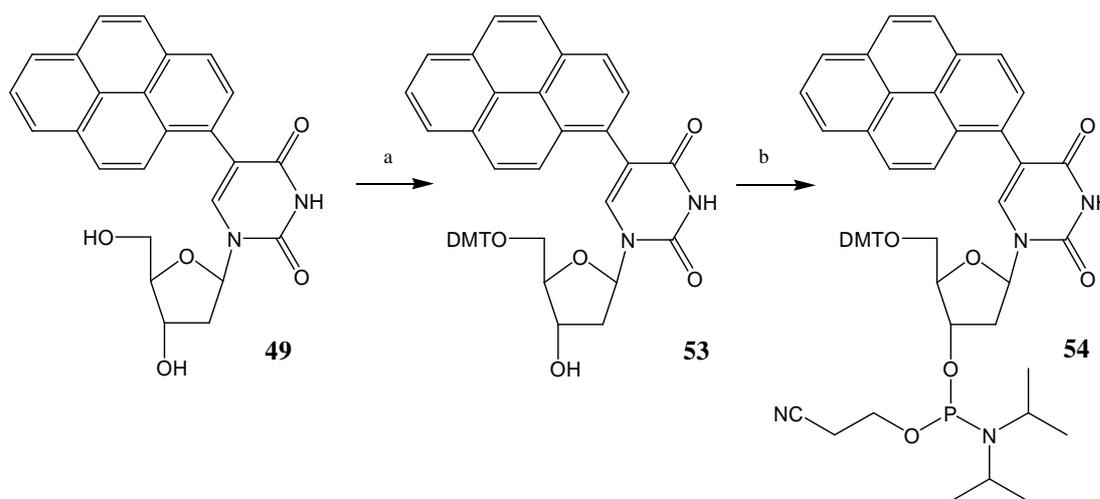


Abb. 127: Synthese des Phosphoramidits **54**.^[281] **a:** DMTCl (2.0 equiv.), Pyridin, RT, 20 h, 65 %, **b:** $(iPr)_2N)P(O)(CH_2CH_2CN)Cl$ (1.1 equiv.), DCM, RT, 12 h, quant.

Das Phosphoramidit **54** kann unter den Standard-Kupplungsbedingungen (1.6 min) problemlos in Oligonukleotide eingebaut werden. Die Effizienz der Kupplung beträgt etwa 95 %. Die Trityliden der Synthese einer Sequenz sind nachfolgend exemplarisch abgebildet (Abbildung 128).

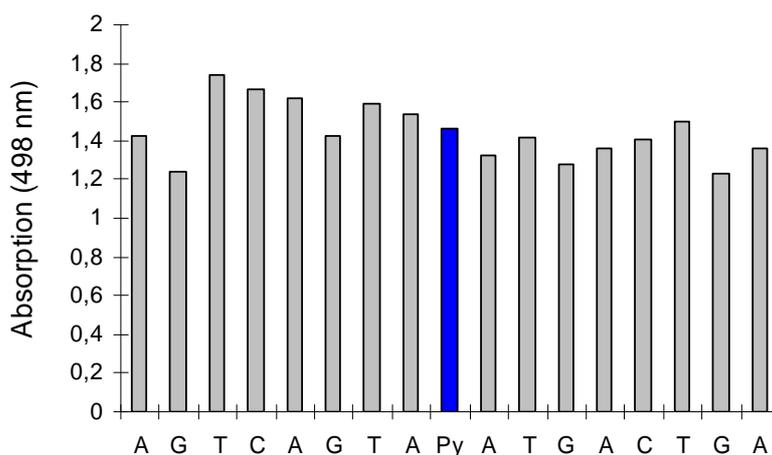


Abb. 128: *Trityl*-daten der Synthese eines Pyren-modifizierten Oligonukleotids, Kupplungszeit 1.6 min, Sequenz: 3'-AGT-CAG-TAU(Py)-ATG-ACT-GA-5'.

Im Anschluss an die DNA-Synthese können die Pyren-modifizierten Oligonukleotide unter den üblichen Bedingungen von der festen Phase abgespalten werden. Die Analytik der Roh-DNA durch HPLC bei 260 nm und 340 nm, dem Absorptionsbereich der Pyren-Einheit, zeigt deutlich die selektive Reaktion zum Hauptprodukt (Abbildung 129).

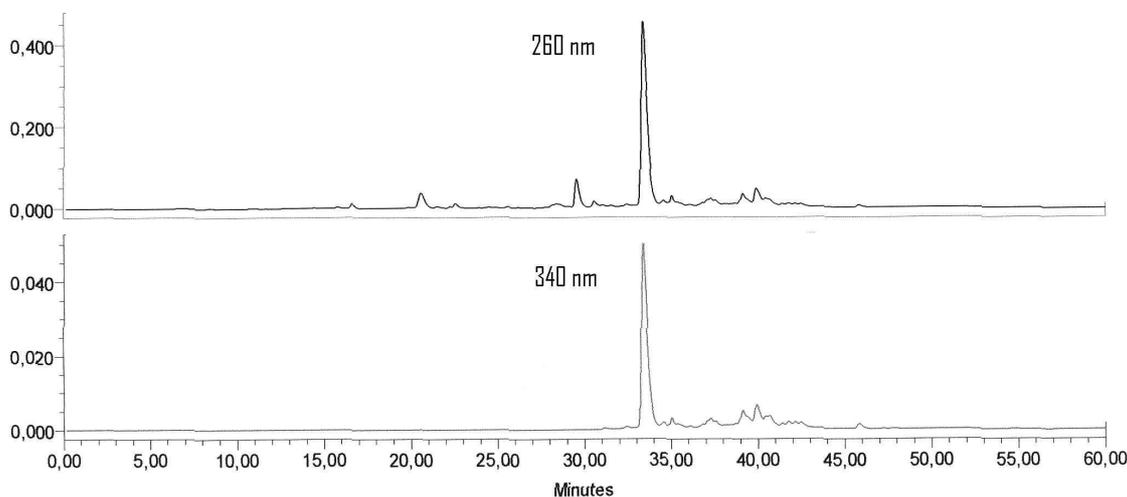


Abb. 129: *HPLC*-Analytik des Rohproduktes Pyren-haltiger DNA, Gradient 0-30 % in 45 min, Sequenz: 3'-AGT-CAG-TGU(Py)-GTG-ACT-GA-5' bei 260 nm (oben) und 340 nm (unten).

Der erfolgreiche Einbau von **54** in Oligonukleotide wird bei allen Synthesen nach der chromatographischen Reinigung durch MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Auf die oben beschriebene Weise wurden die DNA-Duplexe **1-12** hergestellt (Sequenzen siehe Abbildung **130**).

Die Duplexe **1-6** tragen jeweils eine Py-dU-Gruppe. Die Duplexe **7-12** sind die Pyren-freien Vergleichsduplexe, in denen anstelle des Phosphoramidits **54** die Base Thymidin eingebaut wurde.

Der entscheidende Unterschied der verschiedenen DNA-Stränge besteht im Wesentlichen in der Base, die sich in direkter Nachbarschaft zu der Py-dU-Gruppe befindet. Zu erwarten ist im Hinblick auf den Trend für die Reduzierbarkeit der DNA-Basen ($T, U \approx C > A > G$), dass nach der Elektroneninjektion, die zu $Py^{*+}-dU^{-}$ führt, nur ein Elektronentransport auf ein benachbartes C oder T erfolgen kann.

In den Duplexen **1** und **2** sind die Pyren-haltigen Basen von zwei Adenin- bzw. zwei Guaninmolekülen umgeben. Hier wird aufgrund der relativen Reduktionspotentiale kein Elektronentransfer auf die der Py-dU-Gruppe benachbarten Purine erwartet. Ladungstransferprozesse auf weiter entfernte Basen sind im Prinzip möglich, wenn auch wahrscheinlich ineffizient.

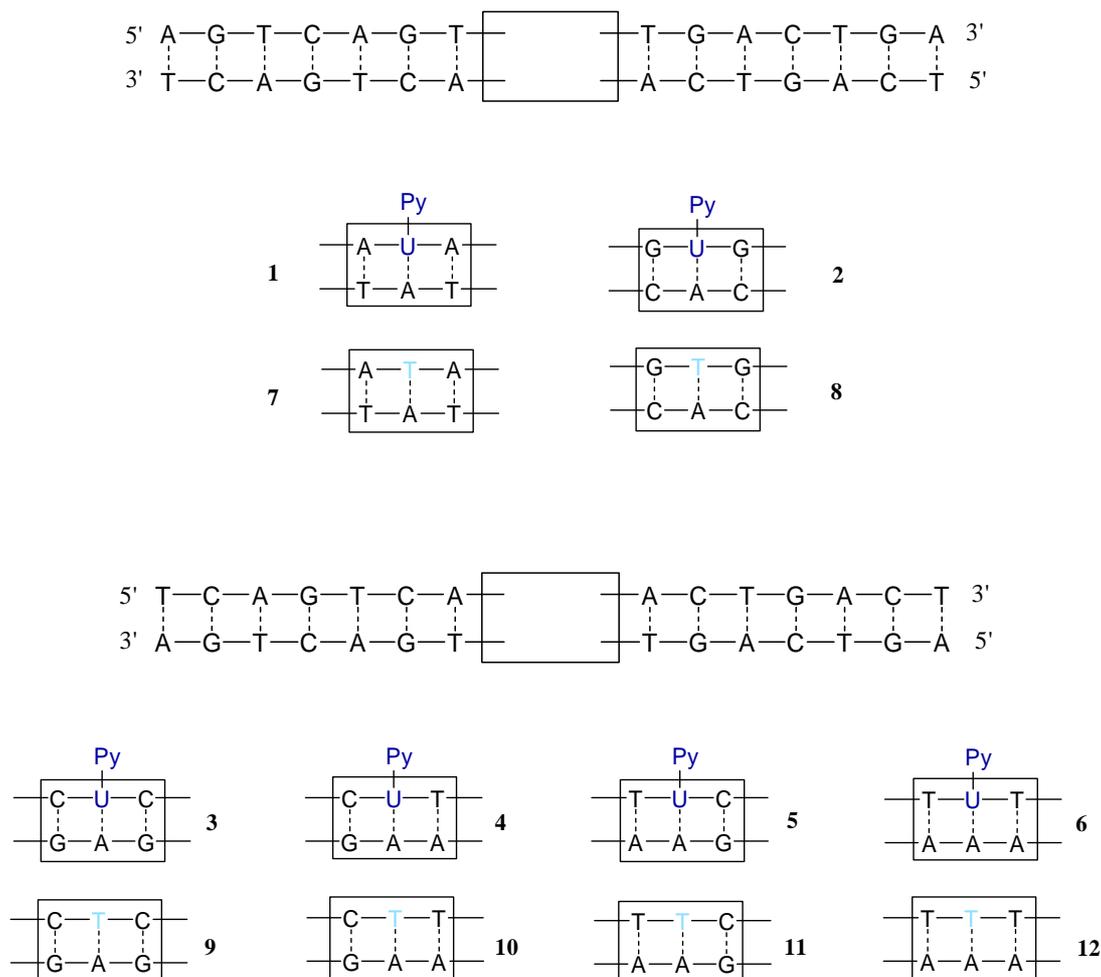


Abb. 130: DNA-Duplexe **1-6** mit Py-dU-Gruppe und DNA-Duplexe **7-12** ohne Py-dU-Gruppe.

In den Duplexen **3** und **6** sind Pyrimidinbasen, d. h. zwei Cytosin- bzw. Thymidinmoleküle benachbart. Hier kann prinzipiell ein Elektronentransfer auf die der Py-dU-Gruppe benachbarte Base stattfinden. Zusätzlich sind in den Duplexen **4** und **5** die Basen C und T in unterschiedlicher Richtung ($5' \rightarrow 3'$ vs. $3' \rightarrow 5'$) angeordnet. Hiermit soll ein möglicher Einfluss der Position des Pyrens als Ladungsdonor auf die Richtung des Ladungstransfers untersucht werden.

Durch CD-Spektroskopie wird die Sekundärstruktur der Duplexe **1-6** überprüft. Die CD-Spektren der DNA-Duplexe bestätigen die B-DNA-Konformation, was im Vergleich mit den Referenz-Duplexen **7-12** deutlich wird (Abbildung **131**).

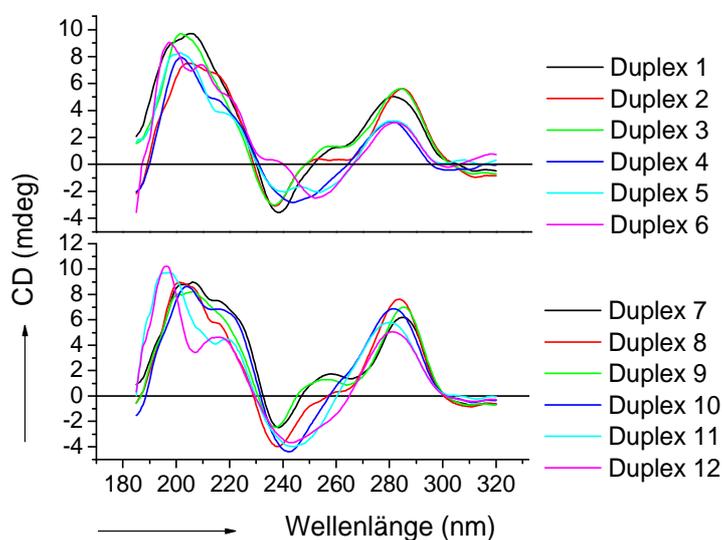


Abb. 131: CD-Spektren der Pyren-haltigen Duplexe **1-6** sowie der Referenz-Duplexe **7-12**, $1,25 \mu\text{M}$ Duplex, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Die Schmelzpunkte der Py-dU-modifizierten Duplexe **1-6** und der unmodifizierten Duplexe **7-12** wurden gemessen und verglichen (Tabelle **11**). Bei den meisten Duplexen wurde eine Abnahme der Schmelztemperatur von $7-9 \text{ }^\circ\text{C}$ festgestellt, was auf die strukturelle Störung durch die Pyrenylgruppe, die sich in der großen Furche befindet, hinweist. Wie bereits beschrieben, wurde durch NOESY-Messungen festgestellt, dass Py-dU (**49**) als Nukleosid in der *anti*-Konformation vorliegt, welche die bevorzugte Konformation darstellt, um *Watson-Crick*-Basenpaare mit dem Gegenstrang auszubilden. Bei einer Interkalation der Pyren-Einheit in die DNA wäre ein Anstieg der Schmelztemperatur zu erwarten.^[220]

Tab. 11: Schmelztemperaturen (T_m) der Py-dU-modifizierten DNA-Duplexe **1-6** und der unmodifizierten DNA-Duplexe **7-12**. Die Proben enthalten 2.5 μM Duplex, 10 mM Phosphatpuffer, 250 mM NaCl, pH 7, Absorption bei 260 nm, Intervall 1 $^\circ\text{C}$.

Duplex	T_m	Duplex	T_m
1	57 $^\circ\text{C}$	7	64 $^\circ\text{C}$
2	61 $^\circ\text{C}$	8	70 $^\circ\text{C}$
3	64 $^\circ\text{C}$	9	71 $^\circ\text{C}$
4	64 $^\circ\text{C}$	10	66 $^\circ\text{C}$
5	65 $^\circ\text{C}$	11	64 $^\circ\text{C}$
6	64 $^\circ\text{C}$	12	71 $^\circ\text{C}$

Es sind damit die strukturellen Anforderungen erfüllt, die für dieses spektroskopische Elektroneninjektions-Assay erforderlich sind.

4.3.5 Spektroskopische Untersuchungen des reduktiven Elektronentransports in Pyren-modifizierter DNA

Das UV/Vis-Spektrum zeigt die Anwesenheit der Py-dU-Gruppe in den DNA-Duplexen **1-6** durch die zusätzliche Absorption bei 350 nm (Abbildung 132).

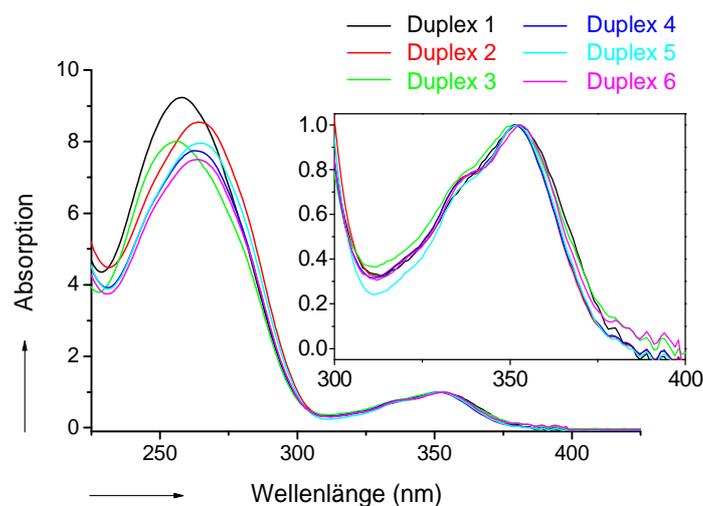


Abb. 132: UV/Vis-Absorptionsspektren der Py-dU-modifizierten DNA-Duplexe **1-6**. Die Proben enthalten 2.5 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7. Der Bereich zwischen 300 nm und 400 nm ist zusätzlich vergrößert abgebildet.

Die stationäre Fluoreszenz der Py-dU-modifizierten DNA-Duplexe **1-6** wurde gemessen, wobei die Anregung bei 340 nm und bei gleicher optischer Dichte bei 350 nm der verschiedenen Proben erfolgte. Die Emissionsmaxima liegen alle zwischen 490 nm und 500 nm. Damit sind die Fluoreszenzspektren der DNA-Duplexe **1-6** denen von Py-dU (**49**) in MeOH ähnlich, erstaunlicherweise aber nicht denen von Py-dU (**49**) in H₂O.

Die Fluoreszenzlöschung sollte dem Trend der Reduzierbarkeit der Basen, T, C, A und G folgen, da die Nachbarbasen von Py-dU aufgrund ihrer Potentiale unterschiedlich leicht reduziert werden. Diese Annahme wurde durch die im Folgenden beschriebenen Experimente bestätigt. Die höchste Quantenausbeute der Emission wird mit DNA **1** beobachtet. Hier wird die Reduktion des benachbarten Adenin, wie bereits beschrieben, nicht erwartet.

Im Gegensatz dazu wird in den anderen Duplexen **2-6** eine zum Teil erhebliche Löschung der Fluoreszenz beobachtet (Abbildung **133**). Die niedrigste Quantenausbeute wird mit DNA **6** beobachtet, in der sich Thymin in direkter Nachbarschaft zur Py-dU-Gruppe befindet: 3'-TU(Py)T-5'. Die Basenfolge 3'-TU(Py)C-5' zeigt eine geringere Abnahme der Fluoreszenz-Intensität als die Basenfolge 3'-CU(Py)T-5'. Diese Beobachtung kann durch die nicht-symmetrische Umgebung erklärt werden, in der vorzugsweise ein Elektronentransfer in nur eine Richtung hin auftritt.

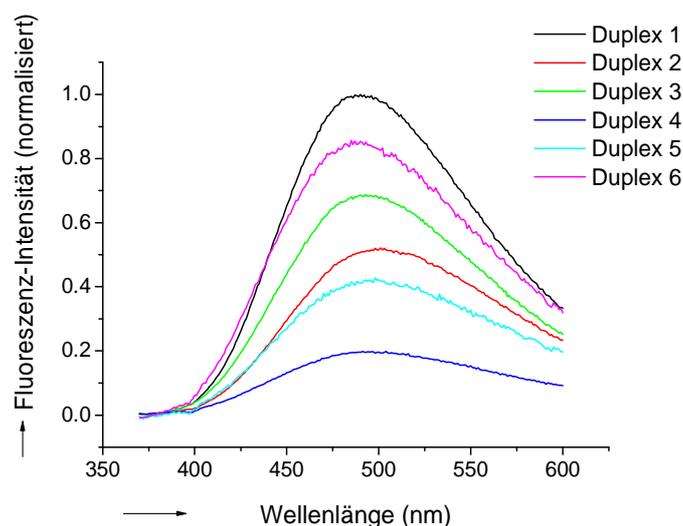


Abb. 133: Stationäre Fluoreszenzspektren der Py-dU-modifizierten DNA-Duplexe **1-6**. Die Proben enthalten 2,5 μ M Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7, Anregung bei 340 nm.

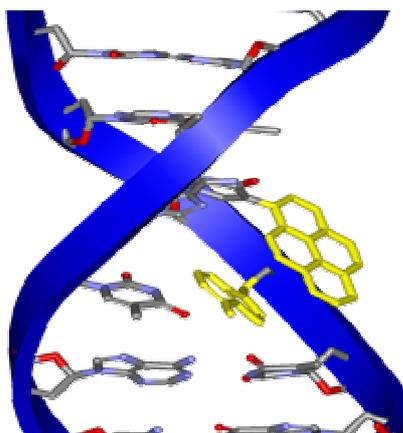


Abb. 134: Möglichkeit einer zusätzlichen Stapelungs-Wechselwirkung zwischen 3'-G und der Pyren-Einheit durch *stacking*.

In den Duplexen **2** und **3**, die G als Nachbarbase enthalten, ist unklar, wieso überhaupt eine Löschung auftritt. Eventuell könnte dies als die Konkurrenz durch einen oxidativen Lochtransfer erklärt werden, möglich durch eine unerwünschte Wechselwirkung der Pyren-Einheit mit einem benachbarten G im Basenstapel (Abbildung **134**).

Die oben dargestellten Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass ein Elektronentransport von U auf das benachbarte C oder T erfolgt. Um diese Interpretation zu unterstützen, wurden zeitaufgelöste Messungen der transienten Absorption mit den Duplexen **1-6** durchgeführt. Die Ergebnisse für Duplex **1** und **6** sind exemplarisch in Abbildung **135** dargestellt.

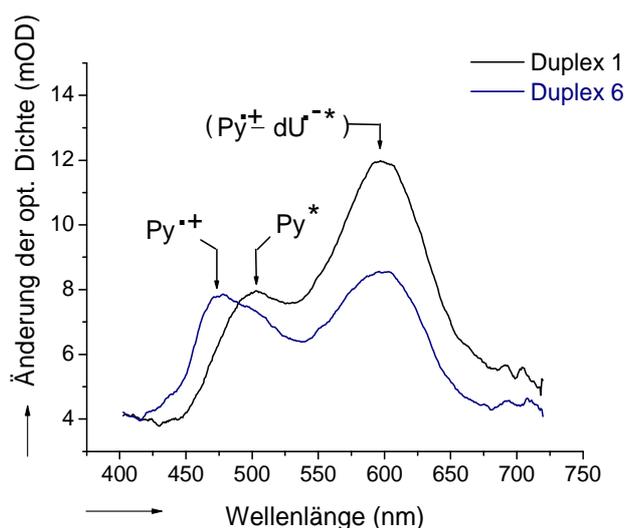


Abb. 135: Transiente Absorption der DNA **1** und **6**, jeweils 10 ps nach der Anregung bei 340 nm. Die Proben enthalten 350 μM Duplex in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.^[281]

Die transienten Absorptionsspektren zeigen beide eine deutliche Bande bei 600 nm, die dem Exciplex der Py-dU-Gruppe zugeordnet werden kann. Solche Exciplexe werden in ähnlicher Weise auch mit dem Nukleosid Py-dU (**49**) in organischen Lösungsmitteln, wie MeOH oder ACN, beobachtet.^[298] Der auffallende Unterschied der beiden Spektren, die mit der DNA **1** bzw. **6** erhalten wurden, liegt im Bereich zwischen 450 nm und 500 nm. Im Falle der DNA **1** ist in diesem Bereich nur die Absorption des lokal angeregten Zustandes Py* zu beobachten. Das steht im Einklang mit der Erwartung, dass in DNA **1** kein Elektronentransport von der Py-dU-Gruppe auf das benachbarte A stattfindet. Im Gegensatz dazu wird im Falle der DNA **6** die Absorption von Py^{•+} beobachtet, was auf eine erfolgreiche Ladungsseparation hinweist. Diese Beobachtung zusammen mit der niedrigen Quantenausbeute der Emission von DNA **6** im Vergleich zu den DNA-Duplexen **1-5** zeigt deutlich, dass ein effizienter Elektronentransport von U[•], das nach der photochemischen Elektroneninjektion entstanden ist, auf die benachbarte Base nur dann stattfindet, wenn es sich dabei um ein C oder besser ein T handelt.

4.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch eine *Suzuki-Miyaura*-Kupplung konnten ausgehend von 1-Pyrenylboronsäure und 5-Iod-2'-desoxyuridin bzw. 8-Brom-2'-desoxyguanosin die Pyren-modifizierten Nukleoside 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU) und 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (Py-dG) synthetisiert werden.

Py-dU wurde in Oligonukleotide eingebaut.

Aus den Experimenten mit den Pyren-modifizierten Nukleosiden und Oligonukleotiden können die folgenden Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Pyren-modifizierte Nukleoside stellen geeignete spektroskopische Modelle für den Ladungstransport in der DNA dar: Py-dU für den reduktiven Elektronentransfer, Py-dG für den oxidativen Lochtransfer.
- Die pK_s -Werte des protonierten Basen-Radikals U(H)[•] sowie des Radikalkations G^{•+} konnten durch stationäre Fluoreszenzspektroskopie bestimmt werden.
- Die Ergebnisse der Ladungstransferexperimente mit Py-dU zeigen, dass ein Protonentransfer mit dem Elektronen-*Hopping* interferieren kann. T eignet sich dabei als Ladungsträger, da Protonierung erst bei pH 5 erfolgt.
- Die Py-dU-Gruppe eignet sich zur Injektion von Elektronen in die DNA.
- Ein effizienter Elektronentransport in der DNA ausgehend von der Py-dU-Gruppe findet nur auf ein benachbartes C oder T statt (Abbildung **136**).

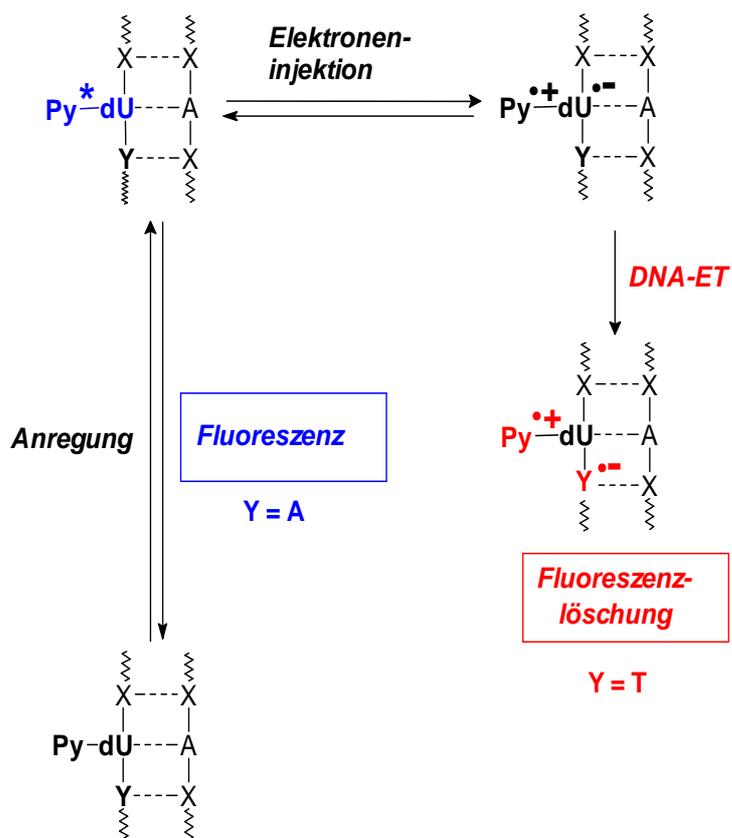


Abb. 136: Elektroneninjektion und -transport in den Py-dU-modifizierten DNA-Duplexen, $Y = C$ oder T .^[281]

5 Zusammenfassung

Elektronentransfer-Prozesse spielen in allen Bereichen der Naturwissenschaften eine wichtige Rolle. In den letzten 15 Jahren ist speziell der Ladungstransfer in DNA in einer Vielzahl von Experimenten untersucht worden und wurde anfänglich sehr kontrovers diskutiert.^[310] Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Projekte beschäftigen sich mit der Synthese und Charakterisierung von Modellsystemen zur Untersuchung sowohl des oxidativen als auch des reduktiven Ladungstransfers in der DNA.

Teil I

Die meisten Experimente mit photoangeregtem Ethidium zeigen einen exponentiellen Abfall der Ladungstransferrate mit zunehmender Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Experimente mit Ethidium als Photooxidationsmittel bilden dabei eine bemerkenswerte und bedeutende Ausnahme, da hier keine exponentielle Distanzabhängigkeit der Rate festgestellt werden konnte.^[30,134] Normalerweise wird eine geringe Distanzabhängigkeit der Ladungstransferrate über das *Hopping*-Modell, bei dem Guanidin-Radikalkationen als intermediäre Ladungsträger auftreten, erklärt.^[30,134] Auf Grund seines niedrigen Oxidationspotentials ist aber photoangeregtes Ethidium nicht in der Lage, Guanin zu oxidieren. Das *Hopping*-Modell kann in diesem Fall die geringe Distanzabhängigkeit also nicht erklären.

In früheren Untersuchungen wurde entweder nicht kovalent gebundenes, interkaliertes Ethidium oder über einen Alkyllinker an das 5'-Ende des DNA-Stranges angeknüpft Ethidium als Ladungsdonor eingesetzt.^[30,134] Um die sich daraus ergebenden strukturellen Schwachstellen zu umgehen, wurde ein neuartiges Ethidium-DNA-Assay entworfen, bei dem Phenanthridinium als artifizielle Base an definierter Position in das Oligonukleotid eingebaut wurde. Das dazu benötigte Phosphoramidit **S-36** wurde ausgehend von 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin in sechs optimierten Schritten synthetisiert (Abbildung **137**).

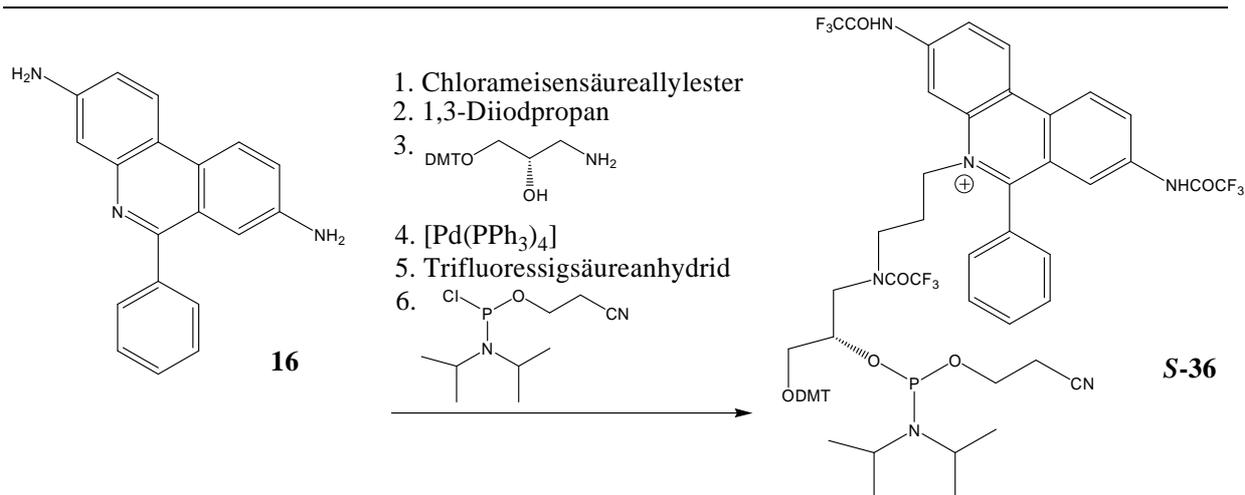


Abb. 137: Synthese des Ethidium-haltigen Phosphoramidits **S-36**.

S-36 wurde mit Hilfe der automatisierten Phosphoramidit-Festphasen-Chemie in Oligonukleotide eingebaut. Dazu war eine Optimierung des Standard-Kupplungsprotokolls notwendig. Die Ethidium-modifizierten DNA-Duplexe (Abbildung 138) wurde charakterisiert und anschließend für spektroskopische Experimente zum oxidativen Ladungstransfer im System Ethidium-7-Deazaguanin genutzt.

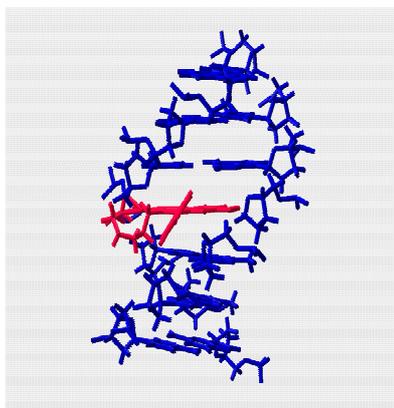


Abb. 138: Ethidium-haltiger DNA-Duplex.

Ethidium ist in den Basenstapel interkaliert. Die Art der Nachbarbasen sowie die Art der Gegenbase hat keinen signifikanten Einfluss auf die optischen Eigenschaften des Chromophors. Das deutet darauf hin, dass die Gegenbase zu E aus dem Basenstapel herausgedreht vorliegt. Ethidium als artifizielle Base ist zur Untersuchung des oxidativen Ladungstrfers im System Ethidium-Deazaguanin geeignet. Der Ladungstrfer kann in zeitaufgelösten Experimenten nachgewiesen werden und die Reaktionsgeschwindigkeit zu etwa $3.6 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. (Abbildung 139). Diese geringe Effizienz und die relativ kleine Rate des oxidativen Ladungstrfers kann wahrscheinlich auf eine sehr geringe Flexibilität des aromatischen Systems nach dem kovalenten Einbau in die DNA zurückgeführt werden.

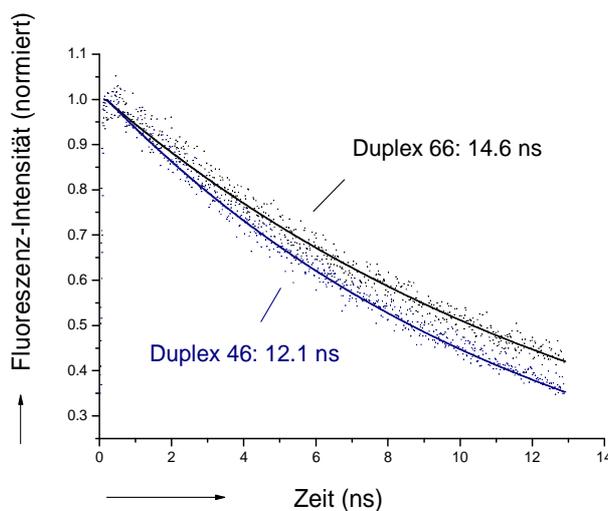


Abb. 139: Nachweis des oxidativen Ladungstransfers in DNA durch zeitaufgelöste Fluoreszenz-Spektroskopie.

Bei Basenfehlpaarungen oder einer *abasic site* wird es durch die damit einhergehende konformationelle Flexibilität für den Heterozyklus wieder möglich, die für einen effizienten Ladungstransfer optimale Konformation einzunehmen. Die Effizienz des Ladungstransfers steigt dann entgegen den Erwartungen. Dieses Ergebnis könnte die Grundlage für die Entwicklung von DNA-Assays bilden, die auf der Basis von Ladungstransfer in der DNA funktionieren und mit gewöhnlichen Fluoreszenzgeräten ausgelesen werden können.

Die neue artifizielle Base ist darüber hinaus zur Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers im System Ethidium-Methylviologen geeignet. Damit ist neben weiteren Untersuchungen zum oxidativen Ladungstransfer auch eine Grundlage für zeitaufgelöste Spektroskopie zum reduktiven Ladungstransfer ausgehend von photoangeregtem Ethidium möglich.

Teil II

Pyren-markierte Oligonukleotide wurden bereits im Hinblick auf ihren Einsatz als Fluoreszenz-Sonde und bei Untersuchungen zum Ladungstransfer in DNA synthetisiert.^[34] Um für den bislang noch wenig untersuchten reduktiven Elektronentransfer ein Modellsystem zugänglich zu machen, wurden zwei Pyren-modifizierte Nucleoside hergestellt.

Durch eine *Suzuki-Miyaura*-Kupplung konnten ausgehend von 1-Pyrenylboronsäure und 5-Iod-2'-desoxyuridin bzw. 8-Brom-2'-desoxyguanosin die Pyren-modifizierten Nucleoside 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-dU, **49**) und 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (Py-dG, **52**) synthetisiert und charakterisiert werden (Abbildung **140**).

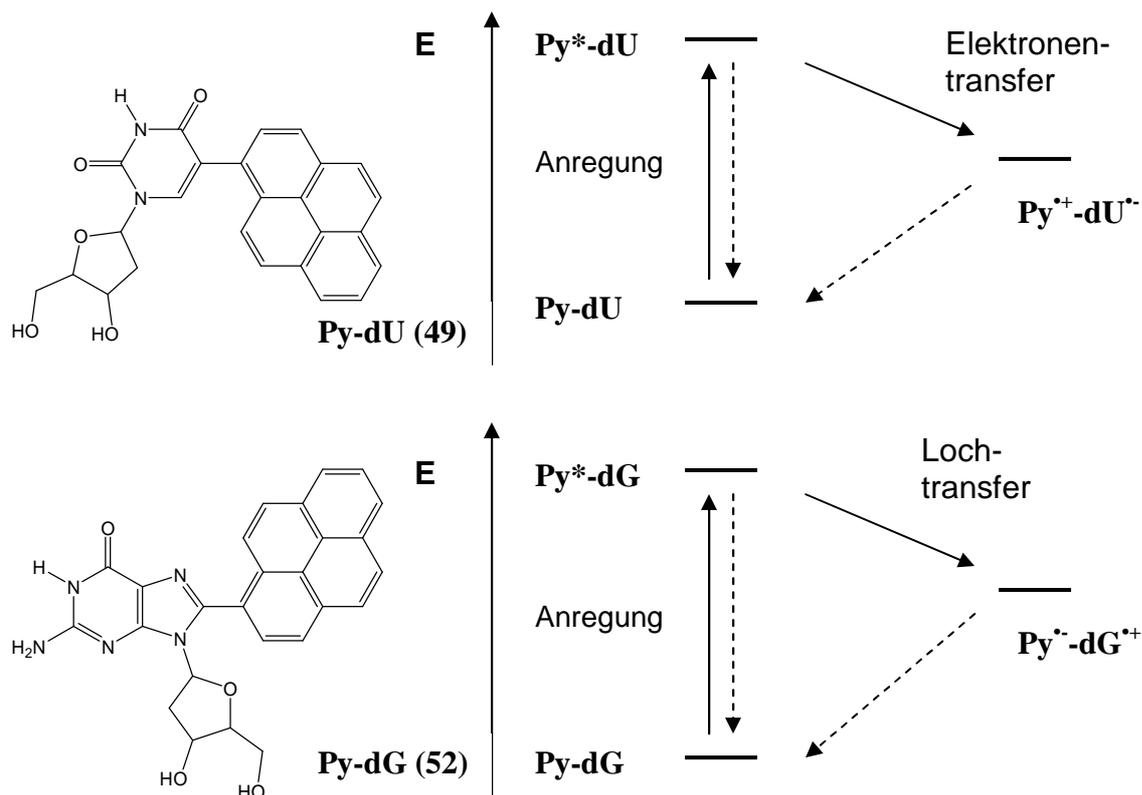


Abb. 140: Die Pyren-modifizierten Nucleoside Py-dU (49) und Py-dG (52) als Modelle für den reduktiven Elektronentransport bzw. den oxidativen Lochtransport in DNA.

Pyren-modifizierte Nucleoside stellen geeignete spektroskopische Modelle für den Ladungstransport in der DNA dar. Der pK_s -Wert des protonierten Basen-Radikals U(H)^{\bullet} sowie des Radikalkations $\text{G}^{\bullet+}$ konnten durch stationäre Fluoreszenzspektroskopie bestimmt werden. Die Ergebnisse der Ladungstransferexperimente mit Py-dU zeigen, dass ein Protonentransfer mit dem Elektronen-Hopping interferieren kann. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich feststellen, dass das Radikalanion $\text{T}^{\bullet-}$ als intermediärer Elektronenträger auftreten kann.

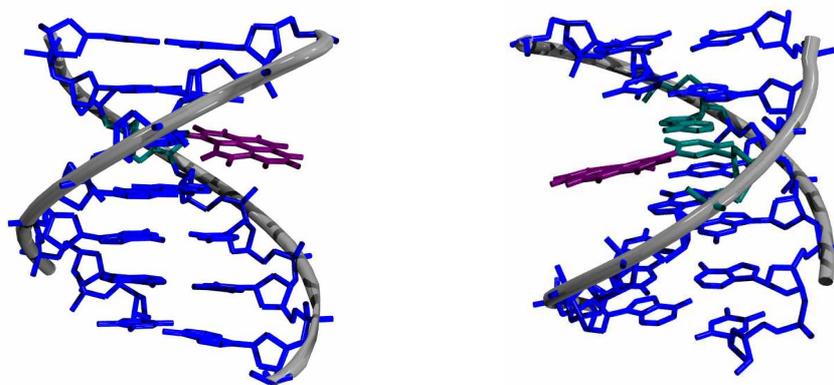


Abb. 141: Zwei verschiedene Ansichten eines Pyren-modifizierten DNA-Duplexes für die spektroskopische Beobachtung der Elektroninjektion in die DNA.

Durch den Einbau der Py-dU-Gruppe in DNA-Duplexe wird aus dem photochemisch induzierbaren, intramolekularen Elektronentransfer eine Elektroneninjektion in die DNA erreicht. Durch die Anknüpfung der Pyrene außerhalb des Basenstapels kann auf die sonst übliche Interkalation des Ladungsdonors verzichtet werden. Auf diese Weise wird die DNA-Struktur nur geringfügig gestört, da sich die Pyren-Einheit in der großen Furche befindet (Abbildung 141). Das System erlaubte damit auch die Untersuchung der Frage, in wieweit der Elektronentransport an eine Protonierung gekoppelt ist. Ein effizienter Elektronentransport von der Py-dU-Gruppe findet nur auf ein benachbartes C oder T statt (Abbildung 142). Durch zeitaufgelöste Messungen an Pyren-modifizierter DNA konnten außerdem die Raten der Elektroneninjektion, der Protonierung und der Ladungsrekombination ermittelt werden.

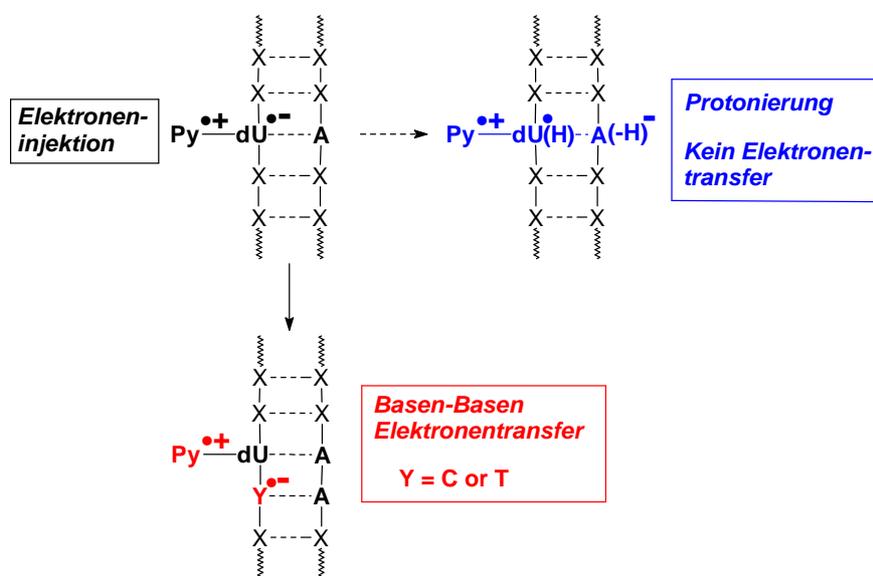


Abb. 142: Elektroneninjektion und Elektronentransport in Py-dU-modifizierten DNA-Duplexen.

Auf dieser Arbeit aufbauend konnten nicht nur die Pyren-Modifikationen aller natürlich vorkommenden DNA-Basen synthetisiert und charakterisiert werden, sondern auch weitere Ethinylpyren-haltige Nucleoside dargestellt und auf ihre Eignung für Untersuchungen zum reduktiven Ladungstransfer geprüft werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

1. *Chromatographie*

Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Fertigplatten der Firma *Merck* (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm) durchgeführt. Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm bzw. 366 nm und durch Eintauchen in folgende Lösungen:

- 10.5 g Cer(IV)sulfat, 21.0 g Phosphormolybdänsäure und 60 mL konz. Schwefelsäure in 900 mL Wasser
- 1%ige Lösung von Schwefelsäure in Methanol
- 10%ige Lösung von Vanillin in 900 mL Ethanol und 100 mL konz. Schwefelsäure
- 5%ige Lösung von Ninhydrin in Ethanol

und anschließend Erhitzen mit dem Heißluftfön. Angegeben sind jeweils Laufmittel und die zugehörigen R_f -Werte.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Die Reinigung der Verbindungen erfolgte nach den bekannten Verfahren^[299] mit 50-100 fachem Überschuss an Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 μm , 230-400 mesh ASTM) der Firma *Merck*. Als Laufmittel dienten Gemische aus Essigester/Methanol, Essigester/Methanol/Wasser, Methylchlorid/Aceton und Hexan/Essigester, in denen die zu trennenden Substanzen R_f -Werte von ungefähr 0.2-0.3 hatten. Die Rohsubstanz wurde entweder als Lösung in einem kleinen Volumen möglichst unpolaren Lösungsmittels oder aufgezogen auf Kieselgel und getrocknet auf die äquilibrierte Säule aufgegeben. Kieselgelmenge und Laufmittelgemisch sind im Text vermerkt. Die Produkte wurden nach der Verwendung methanol- und/oder wasserhaltiger Laufmittel lyophilisiert, in CH_3CN gelöst und durch einen Minisart RC 4 *syringe filter* der Firma *Sartorius* (Porengröße 0.45 μm) filtriert, um von gelöstem Kieselgel abzutrennen.

HPLC

RP-HPLC-Analytik und Präparationen wurden an Geräten der Firmen *Beckmann* (System Gold, Hochdruckpumpenmodul 110B, Controller 420), bzw. *Amersham Pharmacia* (Pharmacia Biotech, Hochdruckpumpenmodul 900, UV-Detektor 900) durchgeführt. Die Proben wurden in H₂O, MeOH oder Acetonitril (*LiChrosolv*® der Firma *Merck*) gelöst und durch einen 0.45 µm HPLC-Filter (Firma *Sartorius*) von ungelösten Substanzen abgetrennt.

Die analytischen und präparativen Trennungen wurden mit folgenden *Reversed Phase*-Säulen durchgeführt: *Sephasil Peptide* (250 x 4.6 mm, 5 µm, C-18) und *YMC-Pack* ODS-A (250 x 4.6 mm, 10 µm, C-18; 250 x 20 mm, 10 µm, C-18; 250 x 30 mm, 10 µm, C-18). Die analytischen Proben wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min eluiert, die semipräparativen Proben mit 25 mL/min. Die Gradienten der Laufmittel Wasser und Acetonitril, mit jeweiligem Zusatz von 0.1% TFA, sind angegeben. Die Detektion der Verbindungen erfolgte bei Wellenlängen von 220 nm und 254 nm. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-15 % B oder 0-30 % B über 30 min.

2. Lösungsmittel

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach den gängigen Verfahren absolutiert.^[300]

3. Lyophilisieren

Die Produkte der Umsetzungen wurden als wässrige Lösungen in sterilen Kunststoffröhrchen (*Falcon-Tubes*®, 15 mL) mit flüssigem Stickstoff gefroren und in geeigneten Gefäßen an einer *Speed-Vac* Christ Alpha LDC-1 der Firma *Christ* bei -80 °C im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet.

4. Massenspektren

ESI-MS und ESI-HPLC-MS

Die ESI-Massenspektren wurden an einem *Finnigan* LQC-ESI-Spektrometer (HPLC-System der Firma *Hewlett Packard* HP 1100, Säulenmaterial: *Nucleosil* 100 5C₁₈) gemessen. Die Proben wurden in H₂O, MeOH oder Acetonitril (*LiChrosolv*® der Firma *Merck*) gelöst und durch einen 0.45 µm HPLC-Filter (Firma *Sartorius*) von ungelösten Substanzen abgetrennt.

Die Angaben erfolgen in m/z mit in Klammern angegebenen Intensitäten in % des Basispeaks.

ESI-HRMS

Die ESI-hochaufgelösten Massen wurden von *Dr. Roderich Süßmuth*, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, gemessen.

5. NMR-Spektroskopie

¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Routinespektren

Die 1D-NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer DMX 500 der Firma *Bruker* bei einer Temperatur von 300 K und einer Feldstärke von 500.13 MHz (¹H) bzw. 125.78 MHz (¹³C) aufgenommen. Die Daten wurden im Falle des DMX 500 an einer externen *SGI-Workstation* mit *XWINNMR* prozessiert. Die verwendeten Pulsprogramme stammen aus der *Bruker* Bibliothek oder wurden von Mitgliedern des Arbeitskreises geschrieben. Die NMR-Untersuchungen wurden in Probenröhrchen mit 0.5 cm Durchmesser durchgeführt, wobei in der Regel 5 mg bis 20 mg Substanz in 0.5 mL CDCl₃ bzw. [d₄]-Methanol, [d₃]-Methanol oder [d₆]-DMSO gelöst wurde. Die chemische Verschiebung der Signale der NMR-Spektren wurde auf das restliche Lösungsmittelsignal kalibriert und auf Tetramethylsilan (TMS) als Standard bezogen. Die chemischen Verschiebungen sind in *ppm* und die skalaren Kopplungskonstanten *J* in Hz angegeben.

³¹P-NMR-Spektren

Die Identität und Reinheit der Phosphoramidite wurde durch die Aufnahme von ³¹P-NMR-Spektren an einem AC 250- Spektrometer der Firma *Bruker* bei einer Feldstärke von 101.3 MHz belegt. Die Signale wurden auf Phosphorsäure als externen Standard kalibriert. Dazu wurde eine mit konz. H₃PO₄ gefüllte kapillare in ein NMR-Röhrchen mit CD₂Cl₂ platziert und der *offset* des Phosphorsäuresignals von der Sendefrequenz bestimmt.

2D-NMR-Spektren

Als 2D-Spektren zur Aufklärung des Substitutionsmusters wurden *HSQC*, *ROESY*, *NOESY*, *TOCSY* und *DQF-COSY* verwendet. Die Spektren wurden an einem Spektrometer DMX 500 der Firma *Bruker* bei einer Temperatur von 300 K und einer Feldstärke von 500.13 MHz (¹H) bzw. 125.78 MHz (¹³C) aufgenommen. Die Daten wurden an einer externen *SGI-Workstation* mit *XWINNMR* prozessiert. Die verwendeten Pulsprogramme stammen aus der *Bruker* Bibliothek oder wurden von Mitgliedern des Arbeitskreises geschrieben.

6. *Reagenzien*

Alle eingesetzten Reagenzien stammen von den Firmen *Merck*, *Fluka*, *Lancaster* und *Sigma Aldrich* und entsprechen der Qualität ‚zur Synthese‘.

7. *Reaktionen*

Für Reaktionen unter Feuchtigkeitsausschluss diente Argon (99.996%) als Inertgas. Die für diese Umsetzung benötigten Glasgeräte wurden zuvor im Trockenschrank bei 85 °C ausgeheizt, im Hochvakuum abgekühlt und anschließend mit Argon beschickt.

8. *Ultraviolett-Spektroskopie (UV)*

Extinktionskoeffizienten wurden von im Hochvakuum getrockneten Substanzen unter Benutzung des UV/Vis-Spektrometers Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer der Firma *Varian* bestimmt. Es sind jeweils das Lösungsmittel und die Wellenlänge maximaler Absorption angegeben.

9. *Elementaranalysen*

Die Elementaranalysen wurden im Labor für Mikroanalytik des Anorganisch-chemischen Instituts der Technischen Universität München durchgeführt.

6.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

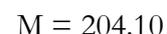
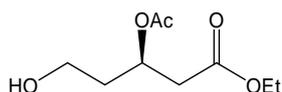
Name der Verbindung	Nr
(3R)-Acetoxy-5-hydroxy-pentansäureethylester	3
(3 R),5-Dihydroxy-pentansäuremethylester	4
(3 R)-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäuremethylester	5
(3 R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäuremethylester	8
(3 R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure	9
(3 R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure-1-(<i>is</i> obutylcarbonyl)ester	10
N ⁸ -[(3'R)-2'-Phenyl-1',3'-dioxan-4'-yl-acetamido]-3-amino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium Acetat	11
N ⁸ -[(3'R)-2'-Phenyl-1',3'-dioxan-4'-yl-acetamido]-N ³ - <i>is</i> obutyramido-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium Acetat	12
(3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäureallylester	14
N-(8-Acetylamino-6-phenyl-phenanthridin-3-yl)-acetamid	18
2,2,2-Trifluor-N-[6-phenyl-8-(2,2,2-trifluoro-acetylamino)-phenanthridin-3-yl]-acetamid	19
N-(8- <i>Is</i> obutyrylamino-6-phenyl-phenanthridin-3-yl)- <i>is</i> obutyramid	20
5-(3-Iodo-propyl)-3,8-bis- <i>is</i> obutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	21
5-[3-(2,3-Dihydroxy-propylamino)-propyl]-3,8-bis- <i>is</i> obutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	22
5-(3-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-3,8-bis- <i>is</i> obutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	24
5-(3-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-di <i>is</i> opropylaminophosphanyloxy]-hydroxy-propylamino}-propyl)-3,8-bis- <i>is</i> obutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	25
3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin	26
3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodopropyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	27
3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-[3-(2,3-dihydroxy-propylamino)-propyl]-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	28
3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-di <i>is</i> opropylamino-phosphanyloxy]-propylamino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	30

Name der Verbindung	Nr
<i>N</i> -(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid	32
<i>N</i> -{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoracetamid	33
1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol	34
<i>(S)</i> - <i>N</i> -(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid	S-32
<i>(S)</i> - <i>N</i> -{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoracetamid	S-33
<i>(S)</i> -1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol	S-34
3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	30
<i>(S)</i> -3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	S-30
3,8-Bis-amino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	29
<i>(S)</i> -3,8-Bis-amino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	S-29
3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl- <i>N</i> -(trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	35
<i>(S)</i> -3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl- <i>N</i> -(trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	S-35
3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-[(2-cyano-ethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropylamino-phosphanyloxy]-propyl}-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	36
<i>(S)</i> -3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-[(2-cyano-ethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropylamino-phosphanyloxy]-propyl}-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid	S-36
1-Brompyren	46
Pyren-1-yl-boronsäure	47
5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin	49

Name der Verbindung	Nr
5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin	53
5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin-	54
3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit]	
8-Brom-2'-desoxyguanosin	51
8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin	52

6.3 Synthese der markierten Nucleosidbausteine zur Festphasensynthese von Oligodesoxynucleotiden

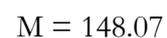
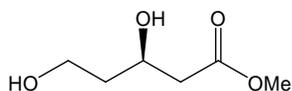
6.3.1 (3R)-Acetoxy-5-hydroxy-pentansäureethylester (3)



1.19 g (5.46 mmol) (3R)-Acetoxy-glutarsäuremonoethylester werden unter Feuchtigkeits- und Luftausschluss in 5.5 mL THF abs. gelöst. 0.57 mL (6.00 mmol) $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ werden über 10 min zugegeben und die Mischung 20 h bei RT gerührt. Es wird mit 3.0 mL MeOH versetzt, 1 h gerührt und einrotiert. Der Rückstand wird in EE (10 mL) gelöst; es wird mit Wasser, ges. NaHCO_3 -Lsg. und ges. NaCl -Lsg. gewaschen; über K_2CO_3 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Es entstehen 1.0 g eines gelblichen Öls (90 % d. Th.).^[246]

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.35$ (m, 1H, H3), 4.05 (q, 2H, CH_2CH_3), 3.55 (m, 2H, H5), 2.70-2.50 (2 dd, $^3J = 15.0$ Hz, 7.5 Hz, 2H, H2), 2.45 (dd, $^3J = 15.0$ Hz, 7.5 Hz, 1H, OH), 2.05 (s, 1H, Ac), 1.85-1.65 (m, 2H, H4), 1.15 (t, 3H, CH_2CH_3).

6.3.2 (3R),5-Dihydroxy-pentansäuremethylester (4)

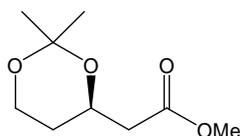


1.0 g (4.9 mmol) (3R)-Acetoxy-5-hydroxy-pentansäureethylester werden in 15 mL MeOH gelöst, mit 1.7 mL TFA versetzt und 60 h bei 50 °C gerührt. Nach der Zugabe von 30 mL MeOH wird die Hälfte des Lösungsmittels im Vakuum abdestilliert, mit 30 mL Benzol versetzt und das Lösungsmittel erneut im Vakuum abdestilliert. Nach FC (Kieselgel, EE) entstehen 0.6 g eines gelblichen Öls (60 % d. Th.).^[246,247]

R_f [MTBE/MeOH = 5/1] = 0.55

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 4.30 (m, 1H, H3), 3.87 (m, 2H, H5), 3.74 (s, 3H, OMe), 2.57 (2 dd, 3J = 15.5 Hz, 7.0 Hz, 2H, H2), 1.74 (2 m, 3J = 14.0 Hz, 2H, H4).

6.3.3 (3R)-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäuremethylester (5)



$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$

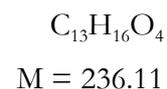
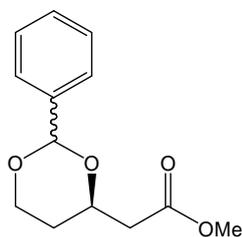
$M = 188.11$

0.1 g (0.67 mmol) (3R),5-Dihydroxy-pentansäuremethylester wird in 10 mL Dimethoxypropan gelöst und mit einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Die Mischung wird 1 h bei 50 °C gerührt, mit 1 mL ges. NaHCO_3 -Lsg. versetzt und einrotiert. Der Rückstand wird in EE (10 mL) gelöst, mit ges. NaHCO_3 -Lsg. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Es werden 0.11 g eines gelblichen Öls (90 % d. Th.) erhalten.^[247]

R_f [PE/MTBE = 4/1] = 0.17

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 4.33 (dddd, 3J = 11.0 Hz, 7.0 Hz, 6.5 Hz, 3.5 Hz, 1H, H3), 3.99 (ddd, 3J = 12.0 Hz, 12.0 Hz, 3.0 Hz, 1H, H4_{ax}), 3.86 (ddd, 3J = 12.0 Hz, 5.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, H4_{eq}), 3.70 (s, 3H, OMe), 2.55 (dd, 3J = 16.0 Hz, 7.0 Hz, 1H, H2), 2.39 (dd, 3J = 16.0 Hz, 7.0 Hz, 1H, H2), 1.63 (dddd, 3J = 13.0 Hz, 12.0 Hz, 11.0 Hz, 5.0 Hz, 1H, H5_{ax}), 1.53 (dddd, 3J = 13.0 Hz, 5.5 Hz, 3.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, H5_{eq}), 1.48 (s, 3H, CH_3), 1.37 (s, 3H, CH_3).

6.3.4 (3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäuremethylester (8)

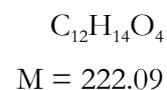
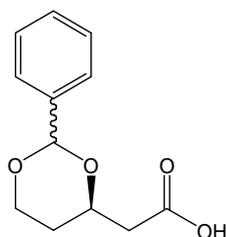


1.20 g (8.1 mmol) (3R),5-Dihydroxy-pentansäuremethylester werden in 20 mL DCM gelöst, mit 0.83 mL (8.1 mmol) Benzaldehyddimethylacetal sowie mit einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Die Mischung bei 40 °C gerührt bis der vollständige Umsatz festgestellt wird (DC, Kieselgel, Laufmittel MeOH). Es werden einige Tropfen TEA zugegeben und weitere 20 min. gerührt. Anschließend wird mit ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Es werden 1.2 g eines gelblichen Öls (63 % d. Th.) erhalten.^[248]

R_f [MeOH] = 0.95

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.58-7.27 (m, 5H, arom.), 5.49 (s, 1H, H6), 4.29-4.17 (m, 1H, H3), 3.98-3.93 (m, 2H, H4), 3.65 (s, 3H, OMe), 2.69-2.45 (m, 2H, H2), 1.90-1.76, 1.61-1.55 (m, 2H, H5).

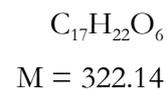
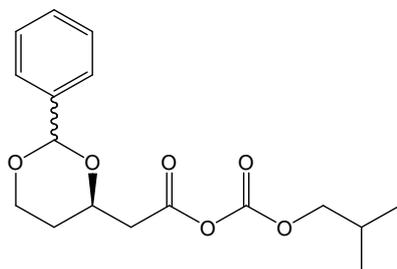
6.3.5 (3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure (9)



1.20 g (5.1 mmol) (3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäuremethylester werden in 40 mL THF/H₂O (1/1) gelöst und mit 4.0 g LiOH H₂O versetzt. Die Mischung wird 12 h bei RT gerührt und anschließend mit 2N HCl neutralisiert. THF wird am Rotationsverdampfer abgezogen und die Reaktionsmischung auf *pH* 2 angesäuert. Die Mischung wird mit DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Es werden 0.67 g (64 %) eines weißen Feststoffs erhalten.^[248]

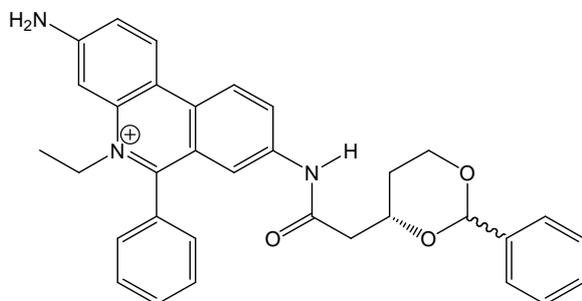
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.56-7.27 (m, 5H, arom.), 5.50 (s, 1H, H-6), 4.30-4.20 (m, 1H, H-3), 3.99-3.95 (m, 1H, H-4), 3.94-3.90 (m, 1H, H-4), 2.77-2.50 (m, 2H, H-2), 1.81-1.79 und 1.63-1.58 (2m, 2H, H-5).

6.3.6 (3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure-1-(iso-butylcarbonyl)-ester (10)



52 mg (0.25 mmol) (3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure werden in 1 mL THF abs. unter Argon gelöst, mit 0.04 mL (0.28 mmol, 1.1 equiv.) N-Ethylmorpholin versetzt und auf -16 °C gekühlt. Über 10 min werden 0.04 mL (0.28 mmol, 1.1 equiv.) Chlorameisensäure-*iso*-butylester zugegeben. Nach 10 min werden 2 mL Eis zugegeben und dreimal mit EE (je 4 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Es entsteht ein gelblicher Feststoff, der ohne weitere Charakterisierung umgesetzt wurde.^[251]

6.3.7 *N*⁸-[(3'R)-2'-Phenyl-1',3'-dioxan-4'-yl-acetamido]-3-amino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium Acetat (11)



$$\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_3^+ \quad \text{M} = 518.24$$

$$\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_5 \quad \text{M} = 577.26$$

Synthese A:

70 mg (0.25 mmol) (3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure-1-(*isobutyl*carbonyl)ester und 0.1 g (0.25 mmol) Ethidiumbromid werden in 30 mL DMF abs. gelöst und 48 h bei 70 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird im HV abgezogen und der orangefarbene Feststoff in 5 mL Pyridin gelöst. Nach der Zugabe von 2 mL *Isobuttersäure*anhydrid wird zwei Stunden bei RT gerührt, im HV getrocknet und das gelbe, ölige Produkt durch FC (Kieselgel, Laufmittel EE/MeOH/H₂O = 6/2/1) gereinigt.^[240,251]

Synthese B:

(3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure (0.5 g, 2.4 mmol) wird zu einer Lösung von Ethidiumbromid (0.55 g, 1.4 mmol), DCC (0.5 g, 2.4 mmol) und DMAP (0.15 g, 1.2 mmol) in DMF abs. (100 mL) gegeben. Die Lösung wird 48 h bei 70 °C gerührt. Einengen im Vakuum ergibt ein oranges Produkt (60 %). Das Rohprodukt wird durch FC gereinigt (Kieselgel, EE/MeOH/H₂O = 6/2/1).^[303]

Synthese C:

Die Reaktion von (3R)-(2-Phenyl-1,3-dioxan-4-yl)-essigsäure (1.0 equiv.) mit Ethidiumbromid (0.9 equiv.) in DMF abs. mit HATU (1.0 equiv.), HOAt (1.0 equiv.) und Collidin (10 equiv.) als Kupplungsreagenzien ergibt das Produkt in 80 % Ausbeute nach 12 h bei RT. Das Rohprodukt wird wie in Synthese B beschrieben gereinigt.^[303]

$$\mathbf{R}_f[\text{EE/MeOH/H}_2\text{O} = 6/2/1] = 0.60$$

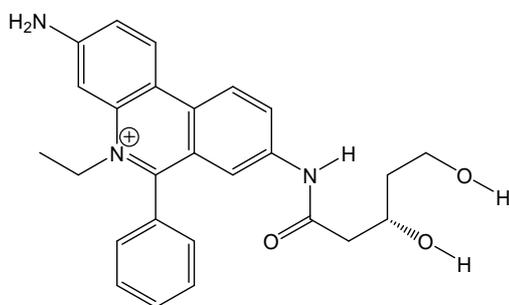
UV/Vis [MeOH]: $\lambda_{\max} = 213 \text{ nm}$ (73 %), 291 nm (100 %), 472 nm (8 %)

ESI-MS: m/z (%) 340.3 (10), 412.3 (15), 518.4 (100) $[M]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{d}_4]\text{-MeOH}$): $\delta = 8.83$ (d, 1H, H1), 8.81 (d, 1H, H10), 8.30 (d, 1H, H9), 7.94 (s, 1H, H7), 7.73-7.70, 7.89-7.85 (m, 5H, arom.), 7.38-7.36, 7.47-7.45, 7.50 (m, 5H, Acetal), 7.37 (s, 1H, H2), 5.57 (s, 1H, Acetal), 4.71 (q, 2H, CH_2), 4.30 (m, 1H, H3'), 4.21, 4.01 (m, 2H, H5'), 2.76, 2.57 (m, 2H, H2'), 1.81, 1.64 (m, 2H, H4'), 1.53 (t, 3H, CH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $[\text{d}_4]\text{-MeOH}$): $\delta = 203.8$ (C-1'), 131.7, 131.0, 129.9, 129.4, 129.3, 129.2, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.6, 127.5, 127.4, 125.8, 125.7, 125.4, 124.1, 123.3, 122.2, 120.0, 119.2, 110.2, 108.1, 101.0 und 101.1 (Acetal), 98.5, 74.1 (C-3'), 66.6 (C-5'), 49.7 (CH_2), 43.3 (C-2'), 30.8 (C-4'), 13.2 (CH_3).

6.3.8 *N⁸-[(3'R)-2'-Phenyl-1',3'-dioxan-4'-yl-acetamido]-N³-isobutyramido-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium Acetat (12)*



$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $M = 430.21$

$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$ $M = 489.23$

Die Ausgangsverbindung *N⁸-[(3'R)-2'-Phenyl-1',3'-dioxan-4'-yl-acetamido]-3-amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium Acetat* (120 mg, 0.23 mmol) und eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure in MeOH abs. wurden 30 min bei RT gerührt. DC zeigt die vollständige Umsetzung. Das Rohprodukt wird durch FC gereinigt (Kieselgel, EE/MeOH = 10/1, anschließend EE/MeOH/H₂O = 6/2/1, dann ACN/H₂O = 1/1) und ergibt 90 mg (89 %) des roten Produkts.^[240]

R_f [EE/MeOH/ H₂O = 6/2/1] = 0.20

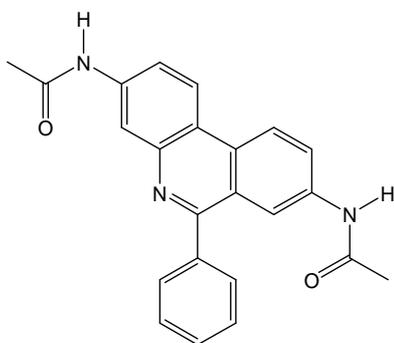
UV/Vis [MeOH]: λ_{\max} = 215 nm (81 %), 295 nm (100 %), 488 nm (12 %)

ESI-MS: m/z (%) 356.4 (23), 430.4 (100) [M]⁺

¹H-NMR (500 MHz, [d₄]-MeOH): δ = 8.79 (d, 1H, H1), 8.77 (d, 1H, H10), 8.31 (d, 1H, H9), 7.95 (s, 1H, H7), 7.85-7.81, 7.69-7.66 (m, 5H, arom.), 7.49 (s, 1H, H4), 7.47 (s, 1H, H2), 4.77 (q, 2H, CH₂), 4.39, 4.21 (m, 1H, H3'), 3.77, 3.71 (m, 2H, H5'), 2.71, 2.51 (m, 2H, H2'), 1.83, 1.72 (m, 2H, H4'), 1.56 (t, 3H, CH₃);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₄]-MeOH): δ = 198.4 (C-1'), 131.7, 131.0, 130.9, 130.0, 129.3, 129.2, 128.1, 128.0, 127.4, 125.4, 123.9, 123.3, 122.5, 122.1, 119.9, 119.0, 110.0, 108.2, 98.5, 65.8 (C-3'), 58.1 (C-5'), 49.7 (CH₂), 44.8 (C-2'), 39.1 (C-4'), 13.2 (CH₃).

6.3.9 N-(8-Acetylamino-6-phenyl-phenanthridin-3-yl)-acetamid (18)



$C_{23}H_{19}N_3O_2$

M = 369.15

1.0 g (3.5 mmol) 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin wird in 40 mL abs. DCM suspendiert und unter Kühlung mit 20 mL Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 24 h bei RT wird die Reaktionsmischung eingengt und mit 200 mL konz. Ammoniaklösung versetzt. Der feine braune Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser bis zur Neutralreaktion gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 1.28 g (99 % d. Th.) des hellbraunen Produkts.^[242,243,304]

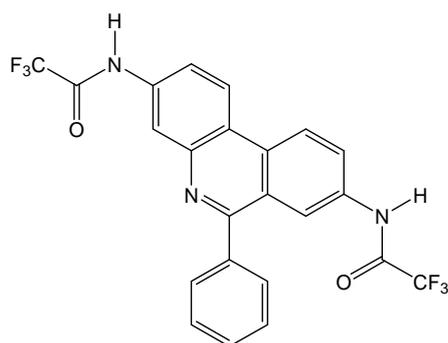
R_f [EE/MeOH/ H₂O = 6/2/1] = 0.90

ESI-MS: m/z (%) 370.4 (100) $[M + H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): δ = 10.26 (*sb*, 2H, NH), 8.73 (d, 1H, H1), 8.64 (d, 1H, H10), 8.51 (s, 1H, H4), 8.40 (s, 1H, H7), 8.17 (d, 1H, H9), 7.83 (d, 1H, H2), 7.68 (m, 2H, Ph), 7.57 (m, 3H, Ph), 2.13 (s, 3H, CH_3CO), 2.04 (s, 3H, CH_3CO);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): δ = 169.94, 161.71, 144.56, 144.53, 140.81, 140.76, 140.63, 139.38, 139.33, 130.82, 129.91, 129.54, 125.72, 125.63, 124.66, 124.38, 123.95, 120.88, 120.18, 118.83, 117.39, 25.45, 25.27.

6.3.10 2,2,2-Trifluor-N-[6-phenyl-8-(2,2,2-trifluoro-acetylamino)-phenanthridin-3-yl]-acetamid (19)



$\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_2$

$M = 477.09$

1.0 g (3.5 mmol) 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin wird in 40 mL Pyridin abs. gelöst und unter Kühlung mit 1.0 mL (10 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Nachdem die heftige Reaktion nach etwa 10 min beendet ist (DC-Kontrolle), wird die Reaktionslösung in 200 mL konz. Ammoniaklösung gegossen. Der dunkelbraune Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser bis zur Neutralreaktion gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 1.37 g (86 % d. Th.) des Produkts.

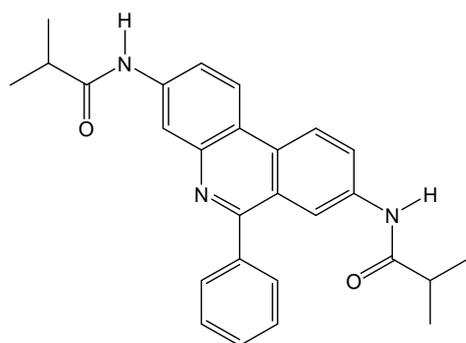
R_f [EE/MeOH/ $\text{H}_2\text{O} = 6/2/1$] = 0.90

ESI-MS: m/z (%) 478.3 (100) $[M + H]^+$

¹H-NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 11.63 (sb, 2H, NH), 8.93 (d, 1H, H1), 8.83 (d, 1H, H10), 8.49 (d, 2H, H4 und H7), 8.31 (d, 1H, H9), 8.02 (d, 1H, H2), 7.72-7.60 (2s, 2H, Ph), 7.33-6.92 (3s, 3H, Ph);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 162.28, 156.16, 155.89, 144.56, 140.21, 138.16, 136.93, 131.27, 130.89, 130.60, 130.22, 129.64, 129.59, 129.52, 125.84, 125.73, 125.19, 124.82, 122.10, 121.73, 121.49, 120.22.

6.3.11 *N*-(8-Isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridin-3-yl)- Isobutyramid (20)



C₂₇H₂₇N₃O₂

M = 425.21

2.0 g (7.0 mmol) 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin wird in 40 mL abs. DCM suspendiert und unter Kühlung mit 10 mL Isobuttersäureanhydrid versetzt. Nach 24 h bei RT wird die Reaktionsmischung eingengt und mit 200 mL konz. Ammoniaklösung versetzt. Der feine braune Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser bis zur Neutralreaktion gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 2.46 g (89 % d. Th.) des braunen Produkts.

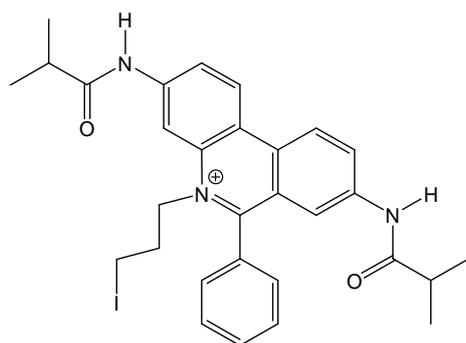
R_f[EE/MeOH/ H₂O = 6/2/1] = 0.81

ESI-MS: m/z (%) 426.2 (100) [M + H]⁺

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): δ = 10.15 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, NH), 8.75 (d, 1H, H1), 8.65 (d, 1H, H10), 8.41 (s, 1H, H4), 8.38 (s, 1H, H7), 8.19 (d, 1H, H9), 7.90 (d, 1H, H2), 7.68 (m, 2H, Ph), 7.59 (m, 3H, Ph), 2.73-2.57 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.16 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.09 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): δ = 176.83, 161.71, 144.51, 140.91, 140.83, 140.73, 139.45, 130.80, 129.89, 129.83, 129.56, 125.66, 124.74, 124.35, 123.90, 121.05, 120.17, 118.98, 117.39, 36.37, 36.25, 20.79, 20.70.

6.3.12 5-(3-Iodo-propyl)-3,8-bis-isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (21)



$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{IN}_3\text{O}_2^+$ $M = 594.16$

$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{I}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $M = 721.07$

2.0 g (4.7 mmol) des Edukts *N*-(8-Isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridin-3-yl)-isobutyramid werden in 15 mL 1,3-Diiodpropan suspendiert. Die Mischung wird nach 40 min im Ultraschallbad 16 h bei 120 °C gerührt. Das überschüssige Alkylierungsmittel wird im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet und durch RP-HPLC gereinigt (A: Wasser + 0.1 % TFA, B: ACN + 0.1 % TFA, Gradient. 35 % B → 60 % B über 30 min, Produkt wird bei 13.7 min eluiert). Man erhält 2.6 g (77 % d. Th.) eines rotbraunen Pulvers.

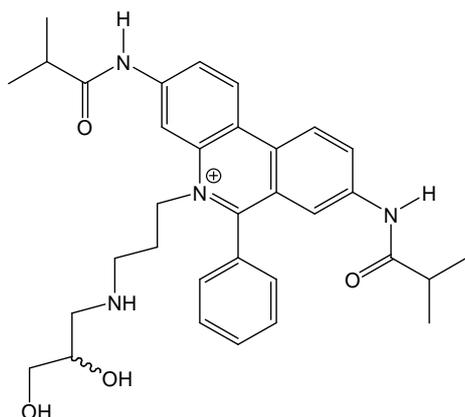
R_f [EE/MeOH/ $\text{H}_2\text{O} = 6/2/1$] = 0.54

ESI-MS: m/z (%) 446.7 (10), 594.2 (100) $[\text{M}]^+$

¹H-NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 10.74 (s, 1H, NH), 10.43 (s, 1H, NH), 9.09 (d, 1H, H1), 9.00 (d, 1H, H10), 8.52 (d, 1H, H4), 8.45 (d, 1H, H7), 8.21 (d, 1H, H9), 8.14 (d, 1H, H2), 8.00-7.67 (m, 5H, Ph), 4.67 (t, 2H, CH₂CH₂CH₂I), 3.42 (t, 2H, CH₂CH₂CH₂I), 2.76 (septett, 1H, CH(CH₃)₂), 2.57 (septett, 1H, CH(CH₃)₂), 2.06 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂I), 1.19 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1.06 (d, 6H, CH(CH₃)₂);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 177.89, 177.32, 150.62, 145.95, 143.38, 141.20, 137.73, 135.31, 132.61, 132.50, 130.68, 130.55, 129.66, 129.53, 129.23, 126.43, 125.30, 124.72, 123.55, 120.00, 119.97, 108.89, 59.42, 54.38, 49.85, 36.61, 36.31, 32.60, 20.63, 20.52.

6.3.13 5-[3-(2,3-Dihydroxy-propylamino)-propyl]-3,8-bis-isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (22)



2.0 g (2.77 mmol) 5-(3-Iodo-propyl)-3,8-bis-isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid werden in einer Mischung aus 25 mL DMF abs. und 1.0 mL TEA gelöst. Nach der Zugabe von 0.25 g (2.77 mmol, 1.0 equiv.) 1-Aminopropan-2,3-diol wird 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch FC (Kieselgel, EE/MeOH = 10/1, anschließend EE/MeOH/H₂O = 6/2/1, dann ACN/H₂O = 1/1) gereinigt. Man erhält 1.0 g (54 % d. Th.) des gelben, pulverförmigen Produkts.

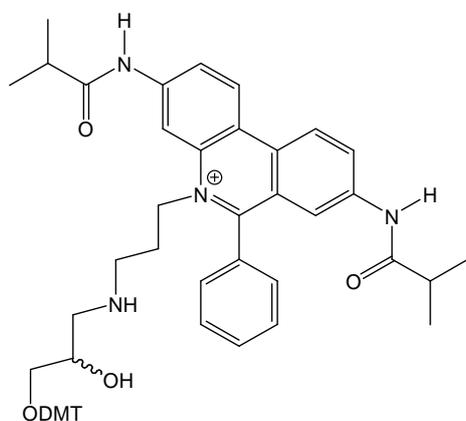
R_f [EE/MeOH/ H₂O = 6/2/1] = 0.08

ESI-MS: m/z (%) 279.5 (36), 426.5 (28), 440.4 (27), 557.4 (100) [M]⁺

¹H-NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 11.39 (s, 1H, NH), 10.72 (s, 1H, NH), 9.12 (s, 1H, H1), 9.07 (d, 1H, H10), 9.01 (d, 1H, H4), 8.63 (d, 1H, H7), 8.49 (d, 1H, H9), 8.06 (d, 1H, H2), 7.82-7.69 (m, 5H, Ph), 4.64 (t, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.02 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.87 (m, 4H, H2, H1, H3), 2.64 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 2.27 (m, 1H, H3), 1.19 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1.04 (d, 6H, CH(CH₃)₂);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 177.87, 177.39, 168.22, 164.85, 143.87, 141.24, 134.93, 132.97, 132.59, 132.44, 131.70, 130.80, 130.68, 129.50, 126.92, 126.46, 124.63, 123.38, 122.57, 120.04, 109.01, 69.30, 68.42, 66.98, 64.63, 51.28, 45.39, 42.45, 36.52, 36.19, 34.49, 26.00, 25.20.

6.3.14 5-(3-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-3,8-bis-isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (24)



$C_{54}H_{59}N_4O_6^+$ M = 859.44

$C_{54}H_{59}IN_4O_6$ M = 986.35

350 mg (0.52 mmol) des Edukts 5-[3-(2,3-Dihydroxy-propylamino)-propyl]-3,8-bis-isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid werden in 5 mL Pyridin abs. gelöst und mit 200 mg (0.56 mmol, 1.1 equiv.) DMTCl versetzt. Nach 10 h bei RT ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle). Der Überschuss DMTCl wird durch die Zugabe von 0.5 mL MeOH zerstört.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch FC (Kieselgel, DCM/Aceton = 4/1, anschließend EE/MeOH/H₂O = 6/2/1) gereinigt. Man erhält 345 mg (67 % d. Th.) eines intensiv gelb gefärbten Pulvers.

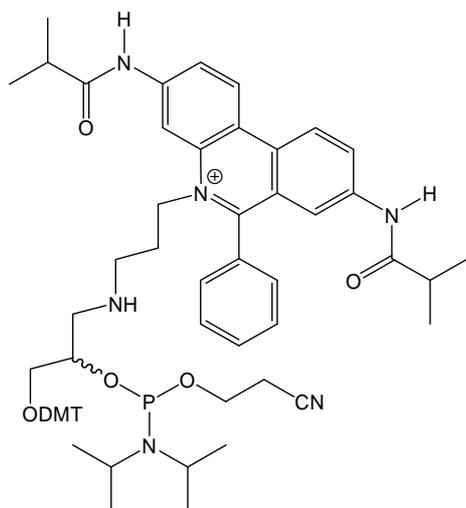
R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/1] = 0.39

ESI-MS: m/z (%) 303.3 (26) [DMT]⁺, 440.5 (10), 557.4 (13) [M-DMT]⁺, 859.4 (100) [M]⁺

¹H-NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 10.69 (s, 1H, NH), 10.38 (s, 1H, NH), 9.14-9.02 (m, 3H, H1, H10, H4), 8.43 (d, 1H, H7), 8.15 (d, 1H, H9), 7.93 (d, 1H, H2), 7.84-7.81 (m, 5H, Ph), 7.60, 7.36-7.21, 6.89-6.85 (3m, 13H, DMT), 4.65 (t, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.92 (s, 3.38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.09 (m, 1H, H2), 2.94 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.87 (s, 6H, OMe), 2.78 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 2.57 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 2.32 (m, 1H, H1), 2.13 (m, 1H, H1), 2.08 (m, 2H, H3), 1.19 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1.06 (d, 6H, CH(CH₃)₂);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 178.00, 177.34, 164.89, 159.39, 143.27, 141.21, 135.07, 132.70, 132.64, 132.52, 132.47, 131.75, 131.71, 131.67, 130.99, 130.84, 130.74, 130.57, 129.59, 129.37, 129.11, 128.96, 127.04, 126.93, 126.64, 124.80, 123.53, 122.84, 120.11, 114.46, 108.77, 108.67, 70.45, 68.58, 64.71, 56.37, 53.10, 52.34, 51.12, 47.08, 45.71; 36.66, 36.33, 25.89, 20.66, 20.55.

6.3.15 5-(3-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-[(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylaminophosphanyloxy]hydroxypropylamino}-propyl)-3,8-bis-isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (31)

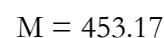
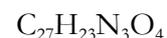
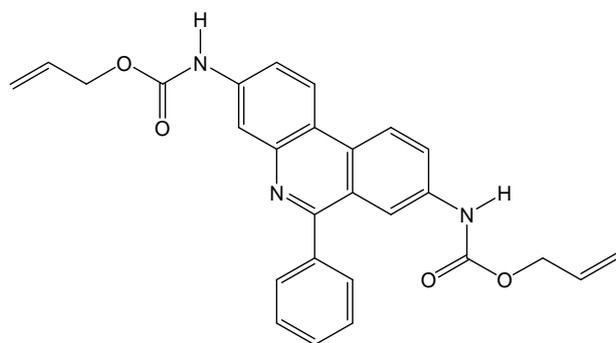


345 mg (0.35 mmol) des Edukts 5-(3-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxypropylamino}-propyl)-3,8-bis-isobutyrylamino-6-phenyl-phenanthridinium Iodid werden unter Schutzgas in 10 mL ACN abs. gelöst, mit 0.2 mL DIPEA (1.20 mmol, 3.3 equiv.) sowie 0.1 mL 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (0.40 mmol, 1.1 equiv.) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Der Überschuss des Chlorphosphoramidits wird durch die Zugabe von 0.1 mL EtOH abs. zerstört. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in 10 mL DCM abs. gelöst. Die organische Phase wird mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Man erhält 410 mg (quantitative Reaktion) eines intensiv gelben Pulvers.^[305]

R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/1] = 0.60

ESI-MS: m/z (%) 303.3 (65) [DMT]⁺, 1004.4 (100), 1061.4 (10) [M]⁺

6.3.16 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (26)



Unter Argonatmosphäre wird 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 equiv.) zugetropft. Nach 24 h Rühren bei RT wird die Reaktion mit wässriger NH_3 -Lösung (6 N, 100 mL) abgebrochen. Der braune Niederschlag wird abfiltriert, mit H_2O gewaschen und im HV getrocknet. Man erhält 7.76 g (98 % d. Th.) eines braunen Feststoffes.^[264]

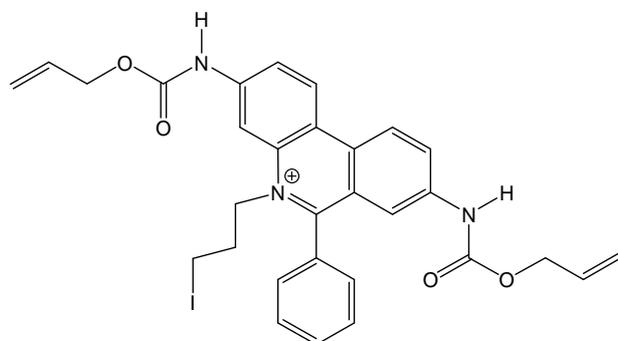
R_f [EE/MeOH/ H_2O = 6/2/1] = 0.96

ESI-MS: m/z (%) 338.4 (12) $[\text{M} + \text{H} - 2 \times \text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$, 396.3 (24) $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$, 454.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): 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, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.37 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.24 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.67 (d, 3J = 5.7 Hz, 2H, CH_2O), 4.60 (d, 3J = 5.7 Hz, 2H, CH_2O);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): δ = 161.7, 154.6, 154.5, 144.6, 140.8, 140.5, 139.1, 134.5 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 134.4 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 130.8, 129.9, 129.6, 129.5, 125.7, 124.5, 124.1, 120.2, 119.8 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 119.1 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 118.9, 117.8, 116.4, 66.2 (OCH_2), 66.1 (OCH_2).

6.3.17 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodopropyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (27)



Synthese A:

1.23 g (2.7 mmol) 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodopropyl)-6-phenyl-phenanthridin wird in 10 mL 1,3-Diiodpropan suspendiert. Nach 2 h im Ultraschallbad wird die Reaktionsmischung 8 h bei 120 °C gerührt. Das überschüssige Alkylierungsmittel wird im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in MeOH gelöst und das Produkt durch die Zugabe von Diethylether ausgefällt und durch RP-HPLC gereinigt (A: Wasser + 0.1 % TFA, B: ACN + 0.1 % TFA, Gradient. 35 % B → 60 % B über 30 min, Produkt wird bei 14.2 min eluiert). Man erhält 1.0 g (54 % d. Th.) eines orange-braunen Pulvers.

Synthese B:

3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (5.0 g, 11.0 mmol) wird in 40 mL absolutem THF gelöst. Nach Zugabe von 13 mL 1,3-Diiodpropan erhitzt man 9 Tage unter Rückfluss. Danach wird das ausgefallene Produkt abfiltriert, mit sehr wenig THF gewaschen und im HV getrocknet. Man erhält 6.75 g (82 % d. Th.) eines orangen Pulvers.^[264]

R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/1] = 0.96

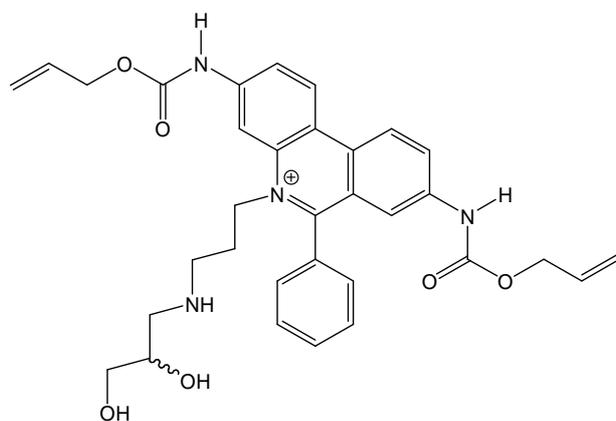
ESI-MS: m/z (%) 622.1 (100) [M]⁺, 564.2 (10) [M - C₃H₆O]⁺, 466.5 (15)

HRMS (ESI-FTICR): [M]⁺ C₃₀H₂₉IN₃O₄⁺ berechnet 622.11973, gefunden 622.11918

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{d}_6]\text{-DMSO}$): δ = 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, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$, 3-Alloc), 5.91 (m, 1H, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$, 8-Alloc), 5.43 (dd, 2J = 1.7 Hz, 3J = 17.4 Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, trans, 3-Alloc), 5.32 (dd, 2J = 1.7 Hz, 3J = 17.8 Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, trans, 8-Alloc), 5.29 (dd, 2J = 1.1 Hz, 3J = 10.5 Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, cis, 3-Alloc), 5.22 (dd, 2J = 1.3 Hz, 3J = 10.4 Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, 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');

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $[\text{d}_6]\text{-DMSO}$): δ = 163.4, 153.3, 153.0, 142.1, 139.8, 134.2, 132.9 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$, 3-Alloc), 132.8 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$, 8-Alloc), 131.5, 131.2, 130.2, 129.6, 128.8, 128.4, 125.7, 125.5, 123.7, 121.4, 121.2, 118.3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}$, 3-Alloc), 118.0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}$, 8-Alloc), 117.7, 106.7, 65.5 (OCH_2 , 3-Alloc), 65.2 (OCH_2 , 8-Alloc), 55.7 (C1'), 31.2 (C2'), 2.1 (C3').

6.3.18 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-[3-(2,3-dihydroxy-propylamino)-propyl]-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (28)



113 mg (0.15 mmol) 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodopropyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid werden in 5 mL DMF abs. und 0.1 mL TEA gelöst. Nach der Zugabe von 13.7 mg (0.15 mmol, 1.0 equiv.) 1-Aminopropan-2,3-diol wird 12 h bei RT gerührt.

Nachdem die Vollständigkeit der Reaktion durch DC-Kontrolle überprüft wurde, wird das Lösungsmittel unter Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch FC (Kieselgel, EE/MeOH = 10/1, anschließend EE/MeOH/H₂O = 6/2/1, dann ACN/H₂O = 1/1) gereinigt. Man erhält 107 mg (quantitative Reaktion) eines intensiv gelben Pulvers.

R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/1] = 0.19

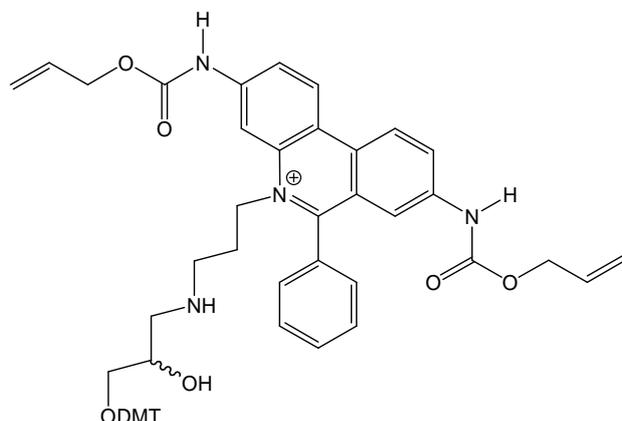
ESI-MS: m/z (%) 454.3 (10), 468.3 (34), 585.3 (100) [M]⁺

HRMS (ESI-FTICR): [M]⁺ C₃₃H₃₇N₄O₆⁺ berechnet 585.27076, gefunden 585.25619

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 10.64 (s, 1H, NH, 3-Alloc), 10.36 (s, 1H, NH, 8-Alloc), 9.09 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, H1), 9.03 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, H10), 8.63 (s, 1H, H4), 8.28 (dd, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H9), 8.10 (dd, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, H2), 7.82-7.79 (m, 6H, H7 und Ph), 6.12-5.97 (2m, 2H, CH₂=CH, Alloc), 5.45-5.20 (2dd, 4H, CH₂=CH, Alloc), 4.73 (d, 2H, OCH₂, Alloc), 4.63 (d, 2H, OCH₂, Alloc), 4.53 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.66 (m, 1H, H2), 3.38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.30 (m, 1H, H1), 3.08 (m, 1H, H1), 2.92-2.87 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.25 (m, 2H, H3);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 177.88, 177.40, 168.22, 164.86, 143.88, 141.24, 134.94, 132.97, 132.83, 132.59, 132.45, 132.38, 131.71, 130.86, 130.68, 129.90, 129.51, 126.93, 126.47, 124.64, 122.57, 120.06, 109.02, 68.42, 64.64, 53.33, 51.29, 45.43, 42.46, 36.52, 36.20, 26.02, 25.20.

6.3.19 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-[3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propylamino]-propyl]-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (30)



$$\text{C}_{54}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_8^+ \quad \text{M} = 887.40$$

$$\text{C}_{54}\text{H}_{55}\text{IN}_4\text{O}_8 \quad \text{M} = 1014.31$$

125 mg (0.18 mmol) 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-[3-(2,3-dihydroxy-propylamino)-propyl]-6-phenyl-phenanthridinium Iodid werden in 5 mL Pyridin abs. gelöst und anschließend mit 60 mg (0.2 mmol, 1.1 equiv.) DMTCl versetzt. Nach 12 h bei RT wird der Überschuss an DMTCl mit 0.5 mL MeOH zerstört und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird durch FC (Kieselgel, DCM/Aceton = 4/1, anschließend EE/MeOH/H₂O = 6/2/1) gereinigt und man erhält 71 mg (44 % d. Th.) des gelben Feststoffs.^[264]

R_f [DCM/MeOH = 10/3] = 0.82

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

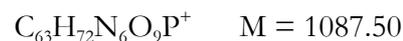
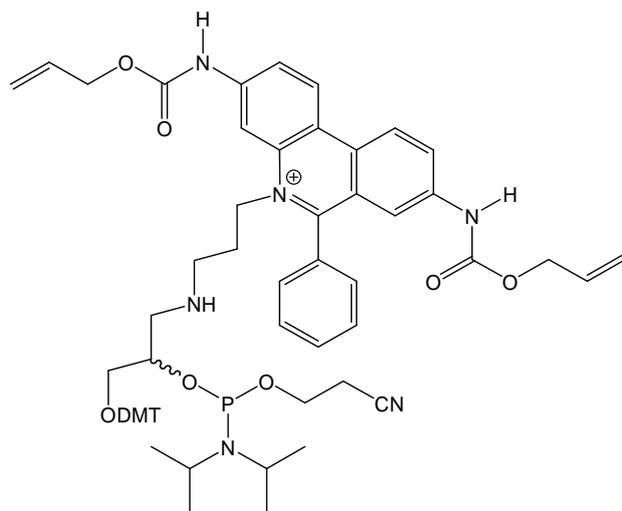
HRMS (ESI-FTICR):

[M]⁺ C₅₄H₅₅N₄O₈⁺ berechnet, 887.40144, gefunden 887.40129

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 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), 4.63 (m, 2H, H1'), 4.57 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂, 8-Alloc), 3.89 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.01 (m, 1H, CH₂ODMT), 3.00 (m, 2H, H3'), 2.95 (m, 1H, NHCH₂CHOH), 2.84 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.73 (m, 1H, NHCH₂CHOH), 2.26 (m, 2H, H2');

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 163.5, 158.2 (arom., DMT), 153.5, 153.1, 144.9 (arom., DMT), 142.1, 139.9, 136.2 (arom., DMT), 134.0, 132.9 (CH₂=CH, 3-Alloc), 132.8 (CH₂=CH, 8-Alloc), 131.4, 131.2, 130.3, 129.9 (arom., DMT), 129.5, 128.9, 128.5, 128.0 (arom., DMT), 126.8 (arom., DMT), 125.9, 125.7, 123.8, 121.6, 121.4, 118.4 (CH₂=CH, 3-Alloc), 118.0 (CH₂=CH, 8-Alloc), 117.8, 113.3 (arom., DMT), 106.6, 85.6 (OCPh₃), 66.1 (CHOH), 65.8 (CH₂ODMT), 65.6 (OCH₂, 3-Alloc), 65.3 (OCH₂, 8-Alloc), 55.3 (OCH₃), 52.2 (C1'), 50.3 (NHCH₂CHOH), 44.8 (C3'), 25.3 (C2').

6.3.20 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-propylamino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (31)



Synthese A:

Das Edukt 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl-amino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (220 mg, 0.217 mmol) wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss in absolutem DCM (10 mL) gelöst und mit über Molsieb getrocknetem DIPEA (113 μL , 0.65 mmol, 3 equiv.) versetzt. Nach der Zugabe von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (51.4 mg, 48.4 μL , 0.217 mmol, 1.0 equiv.) wird 30 Minuten bei RT gerührt. Man gibt erneut 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (20.6 mg, 19.4 μL , 0.087 mmol, 0.4 equiv.) zu und rührt weitere 90 min bei RT. Die organische Phase wird einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach dreimaligem Koevaprieren mit Et_2O wird das Phosphoramidit im HV getrocknet.

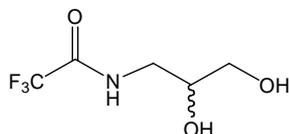
Synthese B:

Das Edukt 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (220 mg, 0.217 mmol) wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss in absolutem DCM (10 mL) gelöst und mit im HV getrocknetem DIPAT (44.6 mg, 0.260 mmol, 1.2 equiv.) versetzt. Man gibt 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraäthylphosphoramidit (91.6 mg, 96.5 μ L, 0.304 mmol, 1.4 equiv.) zu und rührt 8 h bei RT. Die Aufarbeitung erfolgt analog Synthese I.

R_f [DCM/MeOH = 10/3] = 0.90

ESI-MS: 303.3 (100) [DMT]⁺, 1087.2 (23), 1103.3 (62) [M]⁺

³¹P-NMR (101 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 166.2

6.3.21 *N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid (32)

C₅H₈F₃NO₃

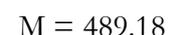
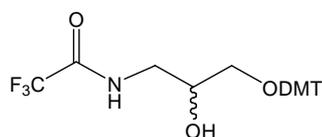
M = 187.04

1-Amino-propan-2,3-diol (5.46 g, 0.06 mol) wird in 25 mL Trifluoressigsäure-methylester suspendiert und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingeeengt und dreimal mit Toluol (100 mL) ko-evaporiert. Man erhält 11.10 g (99 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit.^[265]

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 9.26 (s, 1H, NH), 4.72 (bs, 2H, OH), 3.59 (m, 1H, CHOH), 3.28 (m, 1H, CH₂NH), 3.26 (m, 2H, CH₂OH), 3.09 (m, 1H, CH₂NH);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 156.6 (q, ²J_{CF} = 36 Hz, CO), 116.7 (q, ¹J_{CF} = 290 Hz, CF₃), 69.9 (CHOH), 64.0 (CH₂OH), 43.1 (CH₂NH).

6.3.22 *N*-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoracetamid (**33**)



4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (3.39 g, 10 mmol) wird zu einer Lösung von *N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid (1.87 g, 10 mmol) in abs. Pyridin (30 mL) gegeben und unter Argonatmosphäre 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird mit MeOH (1 mL) abgebrochen, 1 h gerührt und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in 100 mL Essigsäureethylester gelöst und dreimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (50 mL) sowie zweimal mit H₂O (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über FC gereinigt: Beginnend mit DCM wird in Gegenwart von 0.1 % Pyridin der MeOH-Gehalt schrittweise auf 2 % erhöht. Das gereinigte Produkt wird im HV getrocknet. Man erhält 4.01 g (82 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit. ^[265]

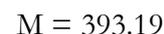
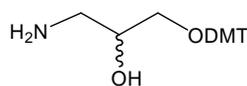
R_f [DCM/MeOH = 100/2] = 0.33

ESI-MS: *m/z* (%) 512.0 (10) [M+Na]⁺, 303.3 (100) [DMT]⁺

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 9.27 (s, 1H, NH), 7.39 (m, 2H, arom), 7.31-7.18 (m, 7H, arom.), 6.86 (m, 4H, arom.), 5.11 (s, 1H, OH), 3.82 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.37 (m, 1H, CH₂NH), 3.15 (m, 1H, CH₂NH), 2.96 (m, 1H, CH₂O), 2.87 (m, 1H, CH₂O);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 158.2 (arom.), 156.5 (q, ²J_{CF} = 36 Hz, CO), 145.2, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8 (arom.), 116.1 (q, ¹J_{CF} = 290 Hz, CF₃), 113.3 (arom.), 85.5 (OCPh₃), 68.9 (CHOH), 65.8 (CH₂O), 55.2 (OCH₃), 43.4 (CH₂NH).

6.3.23 1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (34)



N-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoracetamid (3.92 g, 8.0 mmol) wird in einer Mischung aus MeOH (50 mL), konz. wässriger NH₃-Lösung (50 mL) und THF (20 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Nachdem THF und MeOH im Vakuum entfernt worden sind, wird dreimal mit DCM (100 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält (3.14 g, quant.) als stark viskose, farblose Flüssigkeit.^[264]

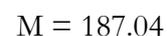
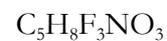
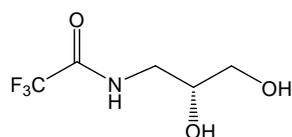
R_f [DCM/MeOH = 100/2] = 0.33

ESI-MS: *m/z* (%) 416.1 (20) [M+Na]⁺, 303.3 (100) [DMT]⁺

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 7.39 (m, 2H, arom.), 7.31-7.17 (m, 7H, arom.), 6.87 (m, 4H, arom.), 4.67 (bs, 1H, OH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.56 (m, 1H, CHOH), 3.30 (bs, 2H, NH₂), 2.93 (m, 1H, CH₂O), 2.83 (m, 1H, CH₂O), 2.66 (m, 1H, CH₂NH), 2.45 (m, 1H, CH₂NH);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 158.2, 145.4, 136.1, 129.9, 129.1, 128.0, 126.8, 113.3 (arom.), 85.3 (OCPh₃), 71.5 (CHOH), 65.9 (CH₂O), 55.2 (OCH₃), 45.6 (CH₂NH).

6.3.24 (*S*)-*N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid (34)

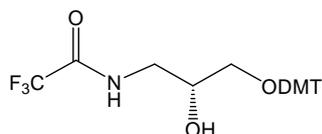


(*S*)-1-Amino-propan-2,3-diol (1.0 g, 11.0 mmol) wird in 25 mL Trifluoressigsäure-methylester suspendiert und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und dreimal mit Toluol (100 mL) koevaporiert. Man erhält 2.0 g (99 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit.^[264]

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 3.60-3.55 (m, 1H, CHOH), 3.33-3.23 (m, 3H, CH₂OH und CH₂NH₂), 3.14-3.07 (m, 1H, CH₂NH₂);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 157.05 (²J = 37 Hz), 116.15 (¹J = 288 Hz), 69.56, 63.79, 42.90.

6.3.25 (*S*)-*N*-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoracetamid (*S*-32)



$$M = 489.18$$

4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (4.0 g, 12 mmol) wird zu einer Lösung von (*S*)-*N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid (2.0 g, 11.0 mmol) in abs. Pyridin (30 mL) gegeben und unter Argonatmosphäre 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird mit MeOH (1 mL) abgebrochen, 1 h gerührt und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in 100 mL Essigsäureethylester gelöst und dreimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (50 mL) sowie zweimal mit H₂O (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über FC gereinigt: Beginnend mit DCM wird in Gegenwart von 0.1 % Pyridin der MeOH-Gehalt schrittweise auf 2 % erhöht. Das gereinigte Produkt wird im HV getrocknet. Man erhält 4.7 g (82 % d. Th.) einer leicht gelblichen, stark viskosen Flüssigkeit.^[264]

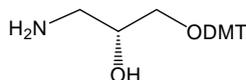
$$R_f[\text{DCM}/\text{MeOH} = 100/2] = 0.33$$

ESI-MS: m/z (%) 512.0 (10) [M+Na]⁺, 303.3 (100) [DMT]⁺

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 7.34-7.16, 6.84-6.80 (m, 13H, DMT), 3.79-3.71 (m, 1H, CHOH), 3.67 (s, 6H, OMe), 3.34-3.29 (m, 1H, CH₂NH₂), 3.15-3.08 (m, 1H, CH₂NH₂), 2.91-2.87 (dd, ³J = 9.5 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, CH₂ODMT), 2.84-2.80 (dd, ³J = 9.5 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, CH₂ODMT);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 158.23, 156.91 (²J = 36 Hz), 145.05, 135.92, 129.95, 129.13, 128.10, 127.87, 116.07 (¹J = 288 Hz), 113.32, 113.05, 85.55, 67.97, 66.54, 55.26, 43.12.

6.3.26 (S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (S-33)



C₂₄H₂₇NO₄

M = 393.19

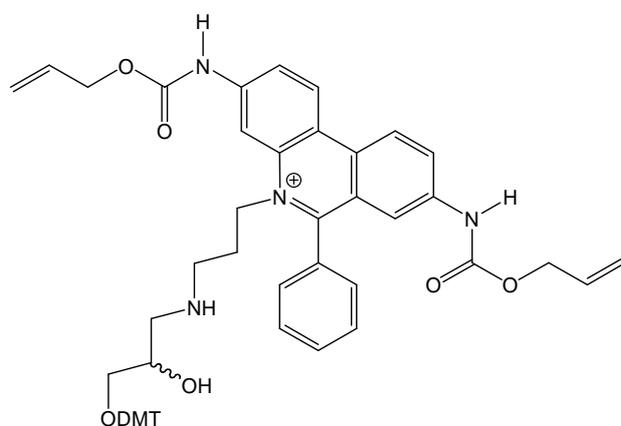
(S)-N-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoracetamid (4.7 g, 8.2 mmol) wird in einer Mischung aus MeOH (50 mL), konz. wässriger NH₃-Lösung (50 mL) und THF (20 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Nachdem THF und MeOH im Vakuum entfernt worden sind, wird dreimal mit DCM (100 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält das Produkt (2.3 g, 96 % d. Th.) als stark viskose, farblose Flüssigkeit.^[264]

ESI-MS: m/z (%) 416.1 (20) [M+Na]⁺, 303.3 (100) [DMT]⁺

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 7.34-7.16, 6.86-6.80 (m, 13H, DMT), 3.67 (s, 6H, OMe), 3.58-3.52 (m, 1H, CHOH), 2.91-2.87 (dd, ³J = 13.0 Hz, ³J = 5.5 Hz, 1H, CH₂ODMT), 2.78-2.74 (dd, ³J = 13.0 Hz, ³J = 5.5 Hz, 1H, CH₂ODMT), 2.65-2.61 (dd, ³J = 12.9 Hz, ³J = 3.7 Hz, 1H, CH₂NH₂), 2.43-2.38 (dd, ³J = 12.9 Hz, ³J = 3.7 Hz, 1H, CH₂NH₂);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): $\delta = 158.20, 145.16, 136.03, 129.95, 129.13, 128.13, 127.91, 127.03, 113.37, 113.06, 71.07, 66.54, 65.85, 55.28, 45.04$.

6.3.27 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (30)



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 equiv.) in 60 mL DMF gibt man die Verbindung 1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (649 mg, 1.65 mmol, 1.1 equiv.) und rührt 40 h bei RT. Man gibt erneut 1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (236 mg, 0.60 mmol, 0.4 equiv.) und nochmals DIPEA (0.22 mL, 1.5 mmol, 1.0 equiv.) zu und rührt weitere 15 h bei RT. Dann wird die Reaktionslösung im Vakuum eingedunstet 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 erhält man einen gelbbraunen Feststoff (1.38 g, 91 % d. Th.).

R_f [DCM/MeOH = 10/3] = 0.82

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

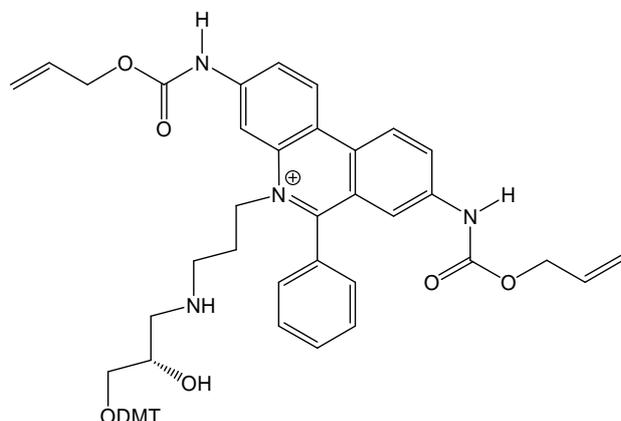
HRMS (ESI-FTICR):

$[M]^+$ $C_{54}H_{55}N_4O_8^+$ berechnet 887.40144, gefunden 887.40129

1H -NMR (500 MHz, $[d_6]$ -DMSO): δ = 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, $CH_2=CH$, 3-Alloc), 5.92 (m, 1H, $CH_2=CH$, 8-Alloc), 5.38 (dd, 2J = 1.7 Hz, 3J = 17.1 Hz, 1H, $CH_2=CH$, trans, 3-Alloc), 5.32 (dd, 2J = 1.7 Hz, 3J = 17.0 Hz, 1H, $CH_2=CH$, trans, 8-Alloc), 5.27 (dd, 2J = 1.3 Hz, 3J = 10.4 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), 4.68 (d, 3J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2 , 3-Alloc), 4.63 (m, 2H, H1'), 4.57 (d, 3J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2 , 8-Alloc), 3.89 (m, 1H, $CHOH$), 3.72 (s, 6H, OCH_3), 3.01 (m, 1H, CH_2ODMT), 3.00 (m, 2H, H3'), 2.95 (m, 1H, $NHCH_2CHOH$), 2.84 (m, 1H, CH_2ODMT), 2.73 (m, 1H, $NHCH_2CHOH$), 2.26 (m, 2H, H2');

^{13}C -NMR (125.8 MHz, $[d_6]$ -DMSO): δ = 163.5, 158.2 (arom., DMT), 153.5, 153.1, 144.9 (arom., DMT), 142.1, 139.9, 136.2 (arom., DMT), 134.0, 132.9 ($CH_2=CH$, 3-Alloc), 132.8 ($CH_2=CH$, 8-Alloc), 131.4, 131.2, 130.3, 129.9 (arom., DMT), 129.5, 128.9, 128.5, 128.0 (arom., DMT), 126.8 (arom., DMT), 125.9, 125.7, 123.8, 121.6, 121.4, 118.4 ($CH_2=CH$, 3-Alloc), 118.0 ($CH_2=CH$, 8-Alloc), 117.8, 113.3 (arom., DMT), 106.6, 85.6 (OCH_3), 66.1 ($CHOH$), 65.8 (CH_2ODMT), 65.6 (OCH_2 , 3-Alloc), 65.3 (OCH_2 , 8-Alloc), 55.3 (OCH_3), 52.2 (C1'), 50.3 ($NHCH_2CHOH$), 44.8 (C3'), 25.3 (C2').

6.3.28 (S)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (S-30)

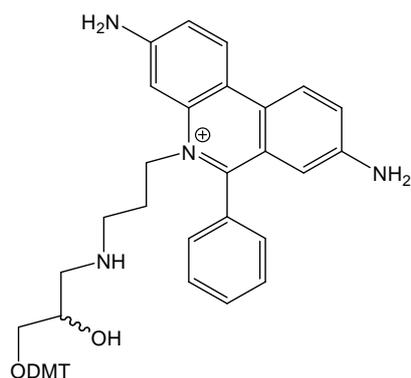


Die Synthese von (S)-30 erfolgt analog zur Synthese von Verbindung 30. Im Falle des (S)-Amins ergeben sich z. T. leicht abweichende NMR-Daten, alle weiteren analytischen Daten entsprechen denen der racemischen Verbindung. Die Ausbeute betrug 87 % d. Th. ^[264]

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 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);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 163.5, 158.2 (arom., DMT), 153.5, 153.1, 144.9 (arom., DMT), 142.1, 139.9, 136.2 (arom., DMT), 134.0, 132.9 (CH₂=CH, 3-Alloc), 132.8 (CH₂=CH, 8-Alloc), 131.4, 131.2, 130.3, 129.9 (arom., DMT), 129.5, 128.9, 128.5, 128.0 (arom., DMT), 126.8 (arom., DMT), 125.9, 125.7, 123.8, 121.6, 121.4, 118.4 (CH₂=CH, 3-Alloc), 118.0 (CH₂=CH, 8-Alloc), 117.8, 113.3 (arom., DMT), 106.6, 85.6 (OCPh₃), 69.1 (CHOH), 67.0 (CH₂ODMT), 65.6 (OCH₂, 3-Alloc), 65.3 (OCH₂, 8-Alloc), 56.4 (OCH₃), 52.5 (C1), 51.9 (NHCH₂CHOH), 46.1 (C3), 26.9 (C2).

6.3.29 3,8-Bis-amino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (29)



Pd(PPh₃)₄ (20 mg, 0.02 mmol), PPh₃ (52 mg, 0.2 mmol) und Bu₃SnH (0.87 g, 3.0 mmol) wurden zu einer Lösung des Edukts 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl-amino}-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (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 eingedampft. 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 erhält 0.77 g (97 % d. Th.) eines violetten Feststoffs.^[264,306]

R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/2] = 0.84

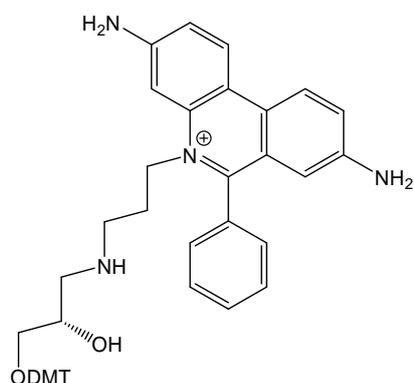
UV/Vis [DCM]: λ_{\max} = 237 nm (100 %), 295 nm (97 %), 522 nm (11 %)

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

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): 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');

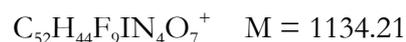
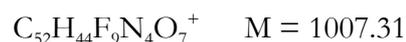
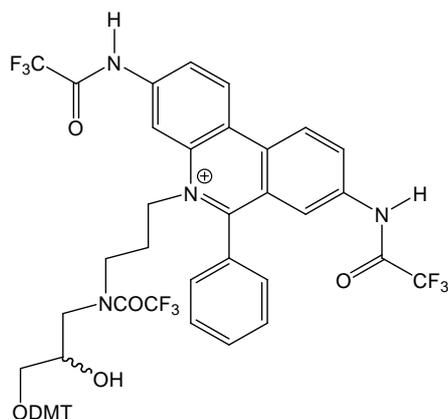
¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 159.0, 158.2 (arom., DMT), 151.2, 148.1, 144.9 (arom., DMT), 135.7, 135.6, 135.1 (arom., DMT), 134.4, 132.1, 130.9, 129.9 (arom., DMT), 129.5, 128.6, 128.1, 128.0 (arom., DMT), 127.9, 127.7, 126.8 (arom., DMT), 125.2, 124.8, 122.8, 120.1, 117.7, 113.3 (arom., DMT), 108.2, 98.6, 85.6 (OCPh₃), 66.3 (CHOH), 65.8 (CH₂ODMT), 55.3 (OCH₃), 51.2 (C1'), 50.5 (NCH₂CHOH), 45.8 (C3'), 25.2 (C2').

6.3.30 (S)-3,8-Bis-amino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (S-29)



Die Synthese von (S)-29 erfolgt analog zur Synthese von Verbindung 29. In Falle der (S)-Verbindung stimmen die analytischen Daten mit denen der racemischen Verbindung überein. Die Ausbeute betrug 90 % d. Th.

6.3.31 3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-N-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (35)



Unter einer Argonatmosphäre und bei 0 °C wurden Pyridin (0.9 mL, 11 mmol) und Trifluoressigsäureanhydrid (0.76 mL, 5.4 mmol) zu einer Lösung der Ausgangsverbindung 3,8-Bis-amino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (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 gerührt, zweimal mit ges. wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum getrocknet. Man erhält 0.60 g (59 % d. Th.) eines gelb-braunen Feststoffs.^[246]

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

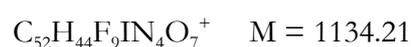
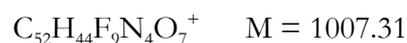
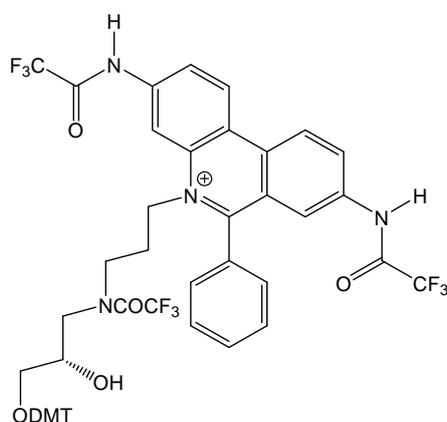
HRMS (ESI-FTICR):

[M]⁺ C₅₂H₄₄F₉N₄O₇⁺ berechnet 1007.30608, gefunden 1007.30553

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): $\delta = 9.14$ (d, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, H1 and H10), 9.02, 8.93 (2 s, 1H, H4), 8.56 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, H9), 8.31, 8.21 (2 d, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, H2), 8.00, 7.98 (2 s, 1H, H7), 7.80-7.65, 7.44-7.36 (m, 5H, 6-Ph), 7.35-7.14 (m, 6H, arom., DMT), 6.93-6.83 (m, 7H, arom, DMT), 4.59 (m, 2H, H1'), 3.94, 3.86 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.59, 3.51 (m, 2H, H3'), 3.55, 3.43 (m, 1H, CH₂ODMT), 3.14, 3.06 (m, 1H, NCH₂CHOH), 3.02, 2.97 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.83 (m, 1H, NCH₂CHOH), 2.34, 2.31 (m, 2H, H2');

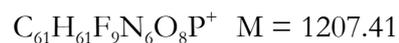
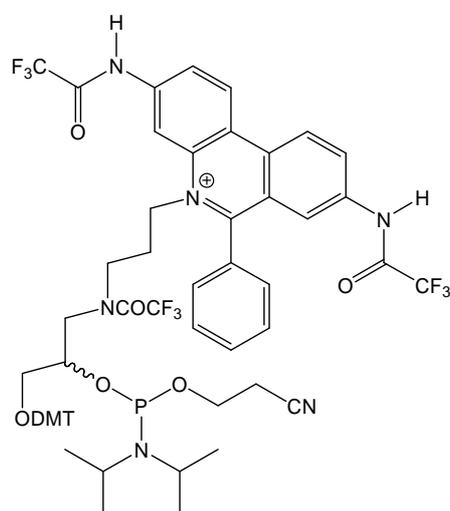
$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO): $\delta = 163.5$ (q, $^1J_{\text{CF}} = 34$ Hz, COCF₃), 158.5 (q, $^2J_{\text{CF}} = 33$ Hz, COCF₃), 158.4 (q, $^2J_{\text{CF}} = 35$ Hz, COCF₃), 146.8, 146.7, 145.2, 145.1, 136.0, 135.9, 135.8, 135.7, 135.4, 132.8, 132.4 (C9), 131.2 (arom., DMT), 131.1 (arom., DMT), 131.0, 130.7, 129.7, 129.4 (arom., DMT), 129.3 (arom., DMT), 129.2, 128.9, 128.2 (arom., DMT), 128.0, 127.9, 127.7 (C2), 127.2, 127.1 (C2), 126.9, 126.5, 126.2, 126.1, 126.0, 125.9, 125.8, 125.7, 125.6, 125.4, 125.3 (C1), 125.2 (C10), 123.5, 123.1 (C7), 122.0, 121.7, 117.7 (q, $^1J_{\text{CF}} = 292$ Hz, COCF₃), 117.6, 116.6 (q, $^1J_{\text{CF}} = 291$ Hz, COCF₃), 116.1 (q, $^1J_{\text{CF}} = 289$ Hz, COCF₃), 114.7, 114.6 (arom., DMT), 112.7 (C4), 112.8 (C4), 111.2 (arom., DMT), 110.9 (arom., DMT), 105.4 (OCPh₃), 69.7 (CHOH), 68.4 (CHOH), 67.4 (CH₂ODMT), 67.2 (NCH₂CHOH), 67.2 (CH₂ODMT), 56.6 (OCH₃), 54.0 (C1'), 53.2 (C1'), 51.7 (NCH₂CHOH), 51.7 (CH₂ODMT), 51.6 (NCH₂CHOH), 51.5 (CH₂ODMT), 46.8 (C3'), 46.5 (C3'), 28.6 (C2'), 27.5 (C2').

6.3.32 (S)-3,8-Bis-trifluoroacetyl-amino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-N-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (S-35)



Die Synthese von (*S*)-35 erfolgt analog zur Synthese von Verbindung 35. Im Falle der (*S*)-Verbindung stimmen die analytischen Daten mit denen der racemischen Verbindung überein. Die Ausbeute betrug 67 % d. Th.

6.3.33 3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{3-[{3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-[(2-cyano-ethoxy)-*N,N*-diisopropylamino-phosphanyloxy]-propyl}-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (36)



Synthese A :

Das Edukt 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-{3-[{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-*N*-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (241 mg, 0.217 mmol) wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss in absolutem DCM (10 mL) gelöst und mit über Molsieb getrocknetem DIPEA (113 μL , 0.65 mmol, 3 equiv.) versetzt. Nach Zugabe von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (51.4 mg, 48.4 μL , 0.217 mmol, 1.0 equiv.) wird 30 min bei RT gerührt. Man gibt erneut 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (20.6 mg, 19.4 μL , 0.087 mmol, 0.4 equiv.) zu und rührt weiter 90 min bei RT. Die organische Phase wird einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Nach dreimaligem Koevaprieren mit Et₂O wird das Phosphoramidit im HV getrocknet. Ausbeute (aus ESI-MS bestimmt) : ca. 50 % d. Th.

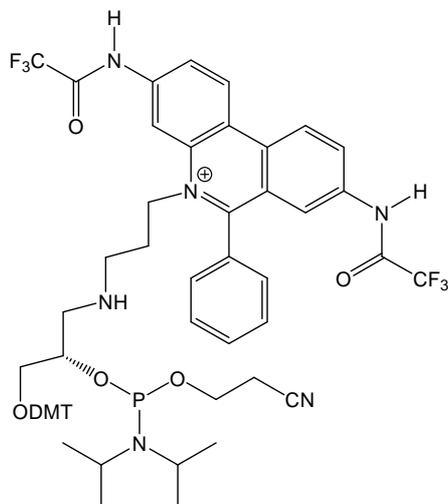
Synthese B:

Das Edukt 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-{{3-[[3-bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl]}-N-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (220 mg, 0.217 mmol) wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss in absolutem DCM (10 mL) gelöst und mit im HV getrocknetem DIPAT (18.5 mg, 0.108 mmol, 0.5 equiv.) versetzt. Man gibt danach 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropyl-phosphoramidit (91.6 mg, 96.5 µL, 0.304 mmol, 1.4 equiv.) zu und rührt 8 h bei RT. Die Aufarbeitung erfolgt analog Synthese I
Ausbeute (aus ESI-MS bestimmt) : ca. 85 % d. Th.^[246]

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

³¹P-NMR (101 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 161.10, 161.45.

6.3.34 (S)-3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-{{3-[[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-propyl]}-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino]-propyl}-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (S-36)

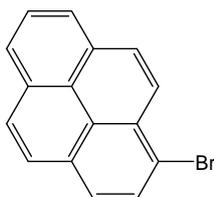


C₆₁H₆₁F₉N₆O₈P⁺ M = 1207.41

C₆₁H₆₁F₉IN₆O₈P M = 1334.32

Die Synthese von (*S*)-36 erfolgt analog zur Synthese von Verbindung 36. Im Falle der (*S*)-Verbindung stimmen die analytischen Daten mit denen der racemischen Verbindung überein. Die Ausbeute betrug 90 % d. Th.

6.3.35 1-Brompyren (46)



$$M = 279.99$$

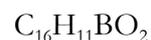
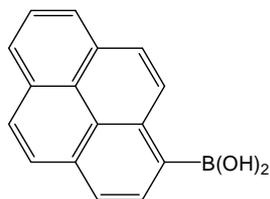
50 g (0.25 mol) Pyren werden in 750 ml Chlorbenzol unter Argonatmosphäre gelöst und unter Rückfluß erhitzt. 110.5 g (0.50 mol, 2 eq) CuBr_2 werden vorsichtig zugegeben. Nach 2 h wird die Reaktionslösung durch Kieselgur filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird auf eine kurze Aluminiumoxid-Säule (2 cm \times 10 cm) gegeben und mit Benzol eluiert. Das erhaltene Rohprodukt wird dreimal aus Benzol/Hexan (1/1) umkristallisiert. Man erhält 45.8 g des gewünschten Produkts (75 %) als leicht gelben Feststoff.^[289]

$$R_f[\text{Benzol}] = 0.86$$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.35, 8.16, 8.14, 8.08, 8.00, 7.98, 7.93, 7.91$;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CDCl_3): $\delta = 131.05, 130.85, 130.48, 129.91, 129.51, 128.86, 127.59, 126.98, 126.39, 125.89, 125.73, 125.62, 125.44, 125.39, 123.9, 119.82$.

6.3.36 Pyren-1-yl-boronsäure (47)



$$M = 246.09$$

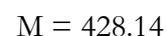
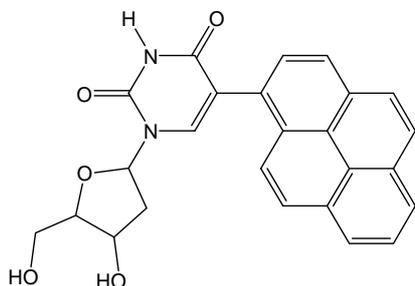
1.0 g (3.56 mmol) 1-Bromopyren wird unter Schutzgas in einen ausgeheizten Kolben eingewogen und in 50 mL Ether abs. gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und mit 2.6 mL (4.16 mmol, 1.2 equiv.) *n*BuLi (1.6 M Lösung in Hexan) versetzt. Es wird 30 min bei RT gerührt. In einem ausgeheizten Kolben werden unter Schutzgas 1.98 mL (17.8 mmol, 5.0 equiv.) Borsäuretrimethylester in 5 mL Ether abs. gelöst und auf -78 °C gekühlt. Über etwa 30 min wird die Lösung des metallierten Pyrens zugetropft, die Mischung 3 h bei -78 °C und über Nacht bei RT gerührt. Nachdem DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung anzeigt, werden 20 mL 2N HCl zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Es wird mehrmals mit Ether extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird durch FC (Kieselgel, Laufmittel Hexan/EE = 20/1, Elution mit EtOH) gereinigt und im HV getrocknet. Es entstehen 422 mg (48 % d. Th.) des gelben Produkts.^[290,291307,308]

$$R_f[\text{H}/\text{Et}_2\text{O} = 3/1] = 0.32$$

¹H-NMR (500 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 8.79 (d, 1H, H10), 8.66 (s, 2H, B(OH)₂), 8.35 (d, 1H, H2), 8.30-8.14 (m, 6H, aromatische H), 8.04 (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 1H, H7);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): 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.

6.3.37 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (49)



287 mg (0.8 mmol, 1.0 equiv.) 5-Iod-2'-desoxyuridin, 200 mg (0.8 mmol, 1.0 equiv.) Pyren-1-ylboronsäure, 92 mg (0.08 mmol, 0.1 equiv.) Pd(PPh₃)₄ und 640 mg (16 mmol, 20 equiv.) NaOH werden in einer Mischung aus 60 mL THF und 30 mL Wasser gelöst. Es wird MeOH zugegeben, bis die Phasentrennung aufgehoben ist (30 mL). Die Lösung wird 30 min mit Stickstoff entgast und 48 h bei 60 °C gerührt. Nachdem DC-Kontrolle den vollständigen Umsatz anzeigt, wird mit festem NH₄Cl neutralisiert und mehrmals mit EE extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Die Reinigung durch FC (Kieselgel, Laufmittel DCM/Aceton = 4/1 und EE/MeOH = 10/1) liefert 200 mg des hellbraunen Produkts (60 % d. Th.).^[214,281,294,309]

R_f [EE/MeOH/H₂O = 10/1/0.5] = 0.65

ESI-MS: m/z % 279.2 (100), 341.6 (49) [M - Desoxyribose + H]⁺, 451.0 (8) [M + Na]⁺, 857.0 (24) [2M + H]⁺, 879.2 (11) [2M + Na]⁺, 1307.0 (6) [3M + Na]⁺

HRMS (ESI-FTICR):

[M]⁺ C₂₅H₂₀N₂O₅ berechnet 428.13722, gefunden 428.16056

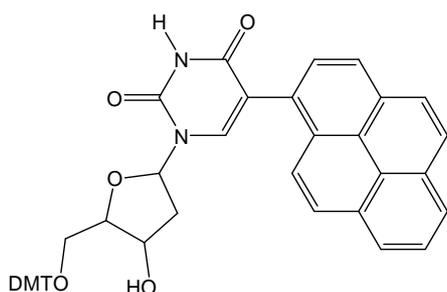
¹H-NMR (500 MHz, [d₄]-MeOH): δ = 8.21 (s, 1H, dU), 8.14-7.84 (m, 9H, Pyren), 6.35 (t, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1H, H1'), 4.31 (m, ³J_{HH} = 4.3 Hz, 1H, H4'), 3.84 (m, ³J_{HH} = 3.2 Hz, 1H, H3'), 3.60-3.50 (ddd, ³J_{HH} = 12.0 Hz/3.3 Hz, 2H, H5'), 2.29 (m, ³J_{HH} = 6.4 Hz, 2H, H2');

Zusätzliche Signale in DMSO:

¹H NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 11.64 (s, br, 1H, NH), 5.24 (d, 1H, 3'-OH), 4.79 (t, 1H, 5'-OH);

¹³C-NMR (125.8 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 174.87, 174.13, 167.41, 163.91, 153.37, 153.15, 144.63, 144.07, 134.89, 134.29, 134.13, 133.93, 131.21, 131.01, 130.45, 129.49, 127.94, 126.83, 103.76, 104.41, 90.16 (C4'), 87.76 (C1'), 73.42 (C3'), 62.67 (C5'), 42.52 (C2').

6.3.38 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin (53)



C₄₆H₃₈N₂O₇

M = 730.27

58 mg (0.14 mmol) 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin werden in 5 mL Pyridin abs. gelöst und zweimal im Abstand von 4 h mit je 50 mg (0.14 mmol, 1.0 equiv.) DMTCl versetzt. Die Mischung wird nun 12 h bei RT gerührt; die DC-Kontrolle zeigt den vollständigen Umsatz. Es wird 5 mL MeOH zugegeben, 2 h bei RT gerührt, eingedampft und durch FC (Kieselgel, Laufmittel DCM/Aceton = 4/1 und EE/MeOH = 10/1) gereinigt. Es entstehen 88 mg (86 % d. Th.) eines gelblichen Öls. Die Reinheit der Verbindung wurde durch HPLC-MS überprüft.^[264,294,295,309]

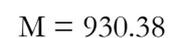
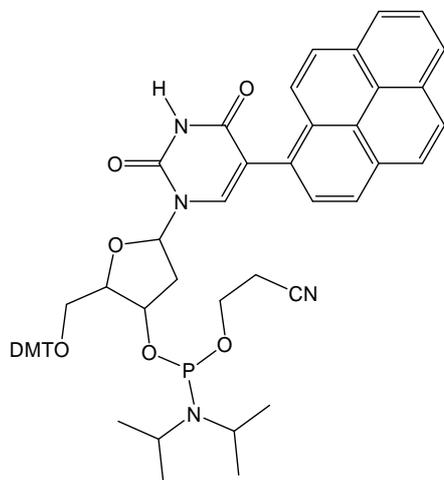
R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/1] = 0.85

ESI-MS: m/z % 303.3 (100) [DMT]⁺, 753.1 (15) [M + Na]⁺, 1483.0 (8) [2M + H]⁺

¹H-NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 11.70 (s, 1H, NH), 8.29-7.88 (m, 10H, Pyren), 6.81-7.40 (m, 13H, DMT), 6.32 (t, 1H, H1'), 4.04 (m, 1H, H4'), 3.70-3.68 (s, 6H, Me), 3.51-3.43 (m, 1H, H3'), 2.93-2.77 (m, 2H, H5'), 1.97-1.80, 2.23-2.06 (m, 2H, H2');

¹³C-NMR (62.9 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 181.0, 163.76, 159.66, 159.60, 151.65, 146.42, 137.14, 137.08, 132.09, 131.71, 131.25, 131.14, 130.87, 130.57, 129.35, 129.13, 128.85, 128.57, 128.28, 127.64, 126.64, 125.76, 125.15, 125.08, 115.79, 114.37, 114.02, 88.14 (C1'), 87.12 (C4'), 63.79 (C5'), 56.38 (OMe), 55.92 (C3'), 39.68 (C2').

6.3.39 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (54)

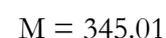
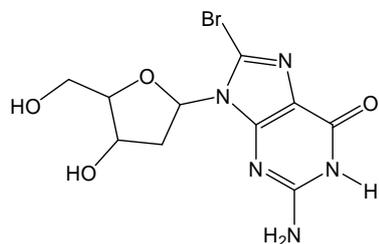


29 mg (0.04 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-(1-pyrenyl)-2'-desoxyuridin werden in 1 mL DCM abs. gelöst und mit 0.02 mL (0.12 mmol, 3.0 equiv.) DIPEA sowie 0.01 mL (0.04 mmol, 1.0 equiv.) Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-di-*is*opropylamid-chlorid versetzt. Es wird bei RT 8 h gerührt und 1 mL EtOH zugegeben. Die Lösung wird mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, einrotiert und durch FC (Kieselgel, Laufmittel EE/MeOH = 10/1 + 4 % TEA) gereinigt. Es wird am HV getrocknet und lyophilisiert.

R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/1] = 0.96

ESI-MS: m/z % 303.3 (100) [DMT]⁺, 969.3 (7) [M + K]⁺

³¹P-NMR (101 MHz, [d₃]-CH₃CN): δ = 159.0.

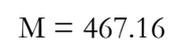
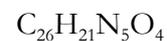
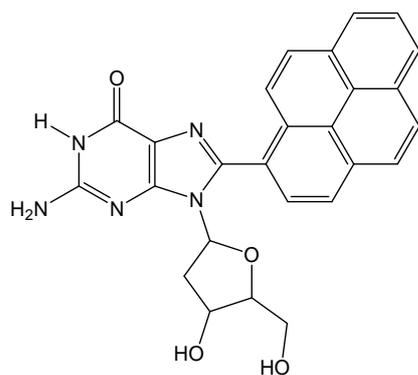
6.3.40 8-Brom-2'-desoxyguanosin (51)

0.50 g (1.75 mmol) 2'-Desoxyguanosin-Monohydrat werden in 10 mL Wasser ($pH = 7$) suspendiert und mit 343 mg (1.92 mmol, 1.1 equiv.) NBS versetzt. DC-Kontrolle zeigt nach 1 h die vollständige Umsetzung. Das Produkt wird durch Filtration abgetrennt und im HV getrocknet. Es entstehen 516 mg (85 % d. Th.) des rosafarbenen Produkts.^[292]

R_f [EE/MeOH/H₂O = 6/2/1] = 0.56

ESI-MS: m/z % 368.0 (23) [M + Na]⁺, 712.9 (63) [2M + H]⁺, 758.0 (50)

¹H-NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 10.78 (s, 1H, NH), 6.47 (s, 2H, NH₂), 6.14 (t, 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, 2.13-2.04 (m, 2H, H2').

6.3.41 8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin (52)

280 mg (0.8 mmol, 1.0 equiv.) 8-Brom-2'-desoxyguanosin, 200 mg (0.8 mmol, 1.0 equiv.) Pyren-1-yl-boronsäure, 92 mg (0.08 mmol, 0.1 equiv.) Pd(PPh₃)₄ und 640 mg (16 mmol, 20 equiv.) NaOH werden in einer Mischung aus 60 mL THF und 30 mL Wasser gelöst. Es wird MeOH zugegeben, bis die Phasentrennung aufgehoben ist (30 mL). Die Lösung wird 30 min mit Stickstoff entgast und 48 h bei 60 °C gerührt. Nachdem DC-Kontrolle den vollständigen Umsatz anzeigt, wird mit festem NH₄Cl neutralisiert und mehrmals mit EE extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Die Reinigung durch FC (Kieselgel, Laufmittel EE/MeOH = 10/1) liefert 120 mg des gelblichen Produkts (32 % d. Th.).^[264,294,295,309]

R_f [EE/MeOH/H₂O = 10/1/0.5] = 0.36

ESI-MS: m/z % 279.2 (33), 352.3 (100) [M – Desoxyribose + H]⁺, 468.0 (12) [M + Na]⁺, 490.2 (7) [M + Na]⁺, 935.2 (10) [2M + H]⁺, 957.3 (12) [2M + Na]⁺

HRMS (ESI-FTICR):

[M]⁺ C₂₆H₂₁N₅O₄ berechnet 468.16663, gefunden 468.16681

¹H-NMR (500 MHz, [d₄]-MeOH): δ = 7.99-8.27 (m, 9H, Pyren), 5.75 (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 1H, H1'), 4.32 (m, 1H, H3'), 3.58-3.72 (m, ³J_{HH} = 9.9 Hz/8.9 Hz/4.2 Hz, 3H, H5'/H4'), 3.05 (m, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1H, H2'), 1.98 (m, ³J_{HH} = 13.4 Hz/5.8 Hz, 1H, H2')

Zusätzliche Signale:

¹H-NMR (250 MHz, [d₆]-DMSO): δ = 10.87 (s, br, 1H, NH), 6.47 (s, br, 2H, NH₂), 4.93 (m, 2H, 5'-OH/3'-OH)

¹³C-NMR (62.9 MHz, [d₆]-DMSO): 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').

6.4 Allgemeine Bemerkungen zur DNA-Synthese und -Analytik

1. DNA-Synthese

Oligodesoxynukleotide wurden nach der Phosphoramiditmethode^[231,301] an einem *AB Applied Biosystems Expedite*® Nucleic Acid Synthesis System Model 8909 durchgeführt. Die verwendete Software war Version 2.5 Perseptive Biosystems. Es wurden *CPGs* der Firma *Applied Biosystems* (1 μ mol mit einer Porengröße von 1000 Å) und DNA-Synthese-Chemikalien von *Glen Research* und *Applied Biosystems* bezogen (wasserfreies Acetonitril, 2 % Dichloressigsäure in DCM, 4 % Tetrazol in Acetonitril, Acetanhydrid in 2,6-Lutidin/THF (1/1/8), 16 % 1-Methylimidazol in THF, Iod in Wasser/Pyridin/THF (3/2/20/75)). Die Phosphoramidite A, C, G und T wurden laut den Angaben des Herstellers mit abs. Acetonitril verdünnt (0.067 mol/L), die Phosphoramidite des *dSpacer* und des 7-Deazaguanin (*Z*) wurden bei *Glen Research* gekauft und analog den Angaben des Herstellers eingesetzt (0.067 mol/L).

Die in dieser Arbeit synthetisierten Phosphoramidite wurden teils in der gleichen Konzentration (Pyren-Baustein) wie die kommerziell erhältlichen Bausteine verwendet, teils in deutlich höheren Konzentrationen (Ethidium-Bausteine), um eine ausreichend gute Kupplungsausbeute zu erhalten (vier- bis 20-fache Konzentration). Bei allen Synthesen mit Ausnahme der Kupplung Ethidium-modifizierter Bausteine konnten Standardprotokolle genutzt werden. Die von *Robert Huber* geschriebenen Protokolle sind in Kapitel 6.4 dieser Arbeit abgedruckt. Die Qualität der Kupplungen wurde überwacht, indem die Lösungen nach jeder Tritylabspaltung UV-photometrisch durch Messung der Absorption bei 498 nm ($\epsilon_{498} = 70.000$) analysiert wurde. Die mittlere Kupplungsausbeute ergibt sich aus dem Verhältnis der Tritylkonzentration in der zweiten und der letzten Fraktion. Die erste Fraktion wird außer Acht gelassen, da das erste Nukleotid am polymeren Träger meistens nicht vollständig trityliert vorliegt.

Der Synthesizer wurde bei allen Synthesen so programmiert, dass die terminale DMT-Gruppe „trityl-off“ abgespalten wurde

2. DNA-Aufarbeitung

Das CPG-Material wurde nach der Synthese im Hochvakuum 30 min getrocknet und in 1.7 mL Eppendorf-Caps überführt. Es wurden 700 μL konz. NH_4OH zugegeben und 10 h bei 60 °C bzw. im Falle der Ethidium-haltigen DNA 5 h bei 50-55 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde durch einen Zentrifugenfilter (*Millipore amicon bioseparations*, Ultrafree®-MC, Porengröße 0.45 μm) filtriert und der Ammoniak in einer *Speed-vac* Christ Alpha RVC mit einer Christ Alpha 1-2 Kühlfalle entfernt. Die Probe wurde mit flüssigem Stickstoff gefroren und an einer *Speed-Vac* RC 10.22. der Firma *Joan* bei -80 °C im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet. Nach Lösen des Rückstands in 300 μL Wasser wurde erneut filtriert und die Roh-DNA chromatographisch analysiert und gereinigt.

3. DNA-Reinigung

Die analytischen Trennungen und die präparative Reinigung der Oligonukleotide erfolgte auf einer HPLC-Anlage der Firma *Waters* (Waters 1525 Binary HPLC Pump) mit UV/Vis-Detektion (Waters 2487, Dual λ Absorbance Detector) und auf einer HPLC-Anlage der Firma *Shimadzu* mit Autosampler SIL-10ADvp, Pumpeneinheit LC-10ATvp, Fluoreszenzdetektor RF-10AXI, Dioden-Array-Detektor SPD-M10Avp, Steuereinheit SCL-10Avp und der Software Shimadzu CLASS-VP durchgeführt.

Die folgenden Säulen wurden verwendet:

Supelco Supelcosil®LC-318: Analytischer Lauf 25 cm, 4.6 mm, 5 μm , Semipräparativer Lauf 25 cm, 10 mm, 5 μm ; Fließgeschwindigkeit 1.0 mL/min, Laufmittel A: 50 mM NH_4OAc , *pH* 6.5, Laufmittel B: CH_3CN

Supelco Discovery®BIO Wide Pore C5: Analytischer Lauf 25 cm, 4.6 mm, 5 μm , Semipräparativer Lauf 25 cm, 4.1 mm, 5 μm ; Fließgeschwindigkeit 2.5 mL/min, Laufmittel A: 50 mM NH_4OAc , *pH* 6.5, Laufmittel B: CH_3CN . Die Laufmittel wurden vor Gebrauch frisch hergestellt, filtriert und entgast. Für alle wässrigen Lösungen wurde Wasser aus der MilliQ gradient Wasseraufbereitungsanlage der Firma *Millipore* verwendet (18.2 $\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$, Filter Millipak®40, 0.22 μm). Vor Analytik und Trennung wurde die jeweilige Säule mit 100 % B (50 mM NH_4OAc , *pH* 6.5) äquilibriert.

Die DNA eines 1 μmol -Ansatz wurde dazu in 300 μL HPLC-Wasser gelöst und mit 0-15 % B oder 0-30 % B über 45 min eluiert. Die Detektion erfolgte bei unmarkierter DNA bei 260 nm und 290 nm, bei Pyren-markierter DNA bei 260 nm und 380 nm und bei Ethidium-markierter DNA bei 260 nm, 530 nm und zusätzlich durch Fluoreszenzdetektion (Anregung bei 530 nm, Messung bei 580 nm). Die Produkte der Umsetzungen wurden als wässrige Lösungen in sterilen Kunststoffröhrchen (*Falcon-Tubes*®, 15 mL) mit flüssigem Stickstoff gefroren und in geeigneten Gefäßen an einer *Speed-Vac* RC 10.22. der Firma *Joan* bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet.

4. MALDI-TOF-MS

Die Massen der Einzelstrang-Oligonukleotide wurden wie folgt bestimmt: aus einer DNA-Stammlösung und einer Matrix – aus 9 Teilen einer Lösung von 50 mg 3-Hydroxypicolinsäure in 500 μL ACN und 500 μL HPLC-Wasser und 1 Teil einer Lösung von 50 mg Diammoniumcitrat in 500 μL ACN und 500 μL HPLC-Wasser – wird eine Lösung der Konzentration von 50 μM hergestellt. Die Messungen erfolgten an einem *Bruker* BIFLEX® III Massenspektrometer im Institut für Organische Chemie und Biochemie 3 der Technischen Universität München.

5. Konzentrationsbestimmung

Der UV-Extinktionskoeffizient von Oligonukleotiden aus natürlichen DNA-Bausteinen wurde aus den Standardwerten der einzelnen Nukleotide bei 260 nm berechnet:^[302]

$$\text{dA: } \epsilon_{260} = 15.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \text{ dC: } \epsilon_{260} = 7.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1},$$

$$\text{dG: } \epsilon_{260} = 11.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \text{ T: } \epsilon_{260} = 8.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}.$$

Für die verwendeten artifiziellen DNA-Basen wurden folgende Werte bestimmt bzw. verwendet:

Für Py-dU wurden die Extinktionskoeffizienten in Wasser bestimmt: $\epsilon_{260} = 14.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{340} = 21.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{343} = 23.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für Ethidium-haltige Nukleosid-Analoga wurden die folgenden Werte der Literatur entnommen: $\epsilon_{260} = 45.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{480} = 2.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{530} = 4.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.^[270]

Bei kommerziell erhältlichen nicht-natürlichen Phosphoramiditen wurden die Angaben des Herstellers verwendet: *dSpacer*: $\epsilon_{260} = 0.0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 7-Deazaguanin: $\epsilon_{260} = 13.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Die Messungen wurden in Quarzglas-Küvetten (Typ 29 Q) der Firma *Starna*®*GmbH* mit einem Lichtweg von 1 cm durchgeführt.

6. *Doppelhelikale DNA-Hybride*

DNA-Duplexe wurden durch 10 minütiges Erhitzen einer Mischung der beiden Einzelstränge im Verhältnis 1/1 auf 90 °C und anschließendes Abkühlen auf RT über 3 h hergestellt. Anschließend wurde die Stammlösung durch Zugabe von 10 mM Phosphat-Puffer *pH* 7.0 auf die gewünschte Konzentration verdünnt und für die spektroskopische Charakterisierung (evtl. nach Zugabe von NaCl verwendet).

7. *Ultraviolett-Spektroskopie (UV)*

Extinktionskoeffizienten wurden von im Hochvakuum getrockneten Substanzen unter Benutzung eines UV/Vis-Spektrometers Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer der Firma *Varian* in Quarzglas-Küvetten (Typ 29 Q) der Firma *Starna®GmbH* (Lichtweg 1 cm) bestimmt. Es sind jeweils das Lösungsmittel und die Wellenlänge maximaler Absorption angegeben. Dabei wurde das Referenzspektrum elektronisch abgezogen. Die mikromolare Konzentration des Oligonukleotids in der Zelle wurde so gewählt, dass der Extinktionswert im empfindlichen Bereich zwischen ungefähr 0.1 und 1.0 lag.

Die optische Dichte der Oligonukleotid-Lösungen vor Fluoreszenzmessungen und Transienten-Absorptionsspektroskopie wurde mit einem Einstrahl-Spektrophotometer Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer der Firma *Varian* bestimmt.

8. *Fluoreszenz-Spektroskopie*

Fluoreszenz-Spektren wurden an einem Fluoromax-3 Fluoreszenz-Spektrometer der Firma *Jobin Yvon* gemessen. Messparameter: Bandbreite 2 nm, *Integration time* 0.2, Korrektur um die Raman-Signale des Puffers. Temperaturabhängige Fluoreszenz-Messungen wurden mit Hilfe des Temperaturbads der Firma *Jobin Yvon* am Fluoromax-3 Fluoreszenz-Spektrometer gemessen. Alle Messungen wurden in Quarzglas-Küvetten (Typ 29-F Q) der Firma *Starna®GmbH* mit einem Lichtweg von 1 cm durchgeführt. Die Proben hatten eine Konzentration von 12.5 µmol DNA für Einzelstränge und Duplexe in 10 mM Phosphat-Puffer *pH* 7.0.

Bei Pyren-haltigen Nukleotiden: Anregung bei 350 nm, Emission von 370 nm bis 600 nm.

Bei Ethidium-haltigen Nukleotiden: Anregung bei 530 nm, Emission von 540 nm bis 800 nm.

9. *CD-Spektren*

Die CD-Messungen wurden an einem *JASCO J-715 Spectropolarimeter* mit einer *PCT-150J* Temperatureinheit durchgeführt. Messparameter: *Data mode: CD, band width: 2.0 nm, slit width: auto, sensitivity: 5 mdeg, time constant: 4.0 s, step resolution: 0.1 nm, scan speed: 500 nm/min*, Küvettenlänge: 1 cm, 10 Akkumulationen. Die DNA-Konzentrationen sind jeweils 2.5 $\mu\text{mol/L}$ in 10 mM Phosphatpuffer *pH 7.0* mit oder ohne NaCl (250 mM). Die Daten wurden um den Nullwert des Puffers korrigiert. Gemessen wurde in Quarzglas-Küvetten (Typ 29 Q) mit einem Lichtweg von 1 cm der Firma *Starna®GmbH*.

10. *Schmelzkurven*

Die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden unter Benutzung des UV/Vis-Spektrometers *Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer* und der *Cary Temperature Control Unit* der Firma *Varian* bestimmt. Die Messungen wurden an Lösungen mit einer Probenkonzentration von 2.5 $\mu\text{mol/L}$ in 10 mM Phosphatpuffer *pH 7.0* mit NaCl (250 mM) in Quarzglas-Küvetten (Typ 29 Q) der Firma *Starna®GmbH* mit einem Lichtweg von 1 cm bestimmt. Die Temperatur des Heizblocks wurde von der *Cary Temperature Control Unit* gemessen. Die Küvette wurde auf 10 °C temperiert (15 min) und anschließend mit einer Heizrate von 0.5 - 1 °C pro min auf 90 °C erhitzt. Um die Bildung von Kondenswasser zu verhindern, wurde der Probenraum bei Temperaturen unterhalb der RT mit Stickstoff gespült. Die Schmelztemperatur wurde an der Stelle der größten Steigung der Kurve (Maximum der ersten Ableitung) abgelesen.

11. *Transienten-Absorptionsspektroskopie*

Die Transienten-Absorptionsspektroskopie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Dr. Fiebig*, Lehrstuhl für Physikalische Chemie der Technischen Universität München, durchgeführt. Probenvorbereitung: Bei Pyren-haltigen Nukleotiden: 70 nmol des jeweiligen DNA-Duplexes wurde in 200 μL 10 mM Phosphatpuffer, *pH 7.0* gelöst und ergibt eine 250 μM Lösung; bei Ethidium-haltigen Nukleotiden: 30 nmol des jeweiligen DNA-Duplex wurde in 100 μL 10 mM Phosphatpuffer, *pH 7.0* gelöst und ergibt eine 100 μM Lösung. Die Ethidium-haltigen Duplexe wurden durch Zugabe von NaCl (250 mM) stabilisiert.

12. Optimierung des DNA-Festphasen-Kupplungsprotokolls für Ethidium-haltige Phosphoramidite

Das Standard-Kupplungsprotokoll des *AB Applied Biosystems Expedite*® Nucleic Acid Synthesis System Model 8909 ist für einen Kupplungsschritt eines beliebigen Phosphoramidits in Abbildung 143 wiedergegeben. Vor dem Kupplungsschritt findet die Entschützung statt, danach das *Capping* und die Oxidation zum Phosphat.

Die Kupplungssequenz ist wie folgt aufgebaut: Nach dem Waschen des *CPG* mit ACN (Wsh) wird Aktivator (Act) sowie eine Monomer-Aktivator-Mischung (*5 + Act) für 40 Sekunden im *CPG* belassen, anschließend wird nochmals Aktivator zugegeben und weitere 56 Sekunden reagieren gelassen. Es folgt ein Waschschrift. Ein Puls befördert ein Flüssigkeitsvolumen von etwa 16 μL .

```

/*-----
/* Function          Mode   Amount  Time(sec)   Description
/*                  /Arg1  /Arg2
/*-----
(...)
$ Coupling
1 /*Wsh             */ PULSE   5       0           "Flush system with Wsh"
2 /*Act             */ PULSE   5       0           "Flush system with Act"
22 /*5 + Act       */ PULSE   5       0           "Monomer + Act to column"
22 /*5 + Act       */ PULSE   2       16          "Couple monomer "
2 /*Act             */ PULSE   3       24          "Couple monomer "
1 /*Wsh             */ PULSE   7       56          "Couple monomer "
1 /*Wsh             */ PULSE   8       0           "Flush system with Wsh"
(...)
-----

```

Abb. 143: Standard-Kupplungsprotokoll.

1. Optimierungsschritt: Verlängerung der Kupplungsdauer

Ausgehend von einer Kupplungsdauer des Standardprotokolls von etwa 1.5 Minuten wird die Kupplungsdauer für die artifiziellen Ethidium-Basen auf bis zu 4 h verlängert. Als Optimum hat sich hierbei eine Kupplungsdauer von etwa 0.5 bis 1 h herausgestellt. Ein Protokoll mit einem verlängerten Kupplungszyklus ist im Folgenden (Abbildung 144) dargestellt:

```

/*-----
/* Function          Mode   Amount  Time(sec)      Description
/*                  /Arg1  /Arg2
/*-----
(...)
$ Coupling
1 /*Wsh             */ PULSE   5      0      "Flush system with Wsh"
2 /*Act             */ PULSE   6      0      "Flush system with Act"
22 /*5 + Act        */ PULSE   6      0      "Monomer + Act to column"
22 /*5 + Act        */ PULSE   2     1000   "Couple monomer mod. 1"
22 /*5 + Act        */ PULSE   2     1000   "Couple monomer mod. 2"
22 /*5 + Act        */ PULSE   5      50     "Couple monomer mod. 3"
2 /*Act             */ PULSE   1     1000   "Couple monomer mod. 4"
2 /*Act             */ PULSE   3      300    "Couple monomer mod. 5"
1 /*Wsh             */ PULSE   7      200    "Couple monomer mod. 6"
1 /*Wsh             */ PULSE  15      0      "Flush system with Wsh"
(...)
-----

```

Abb. 144: *Protokoll mit verlängerter Kupplungszeit (3550 Sekunden)*

2. Optimierungsschritt: Erhöhung der Phosphoramiditkonzentration

Eine Erhöhung der Phosphoramiditkonzentration von 0.067 N, wie sie bei kommerziellen Standardphosphoramiditen üblich ist, auf etwa 0.15 bis 0.2 N führte zu einer signifikanten Steigerung der Kupplungseffizienz.

3. Optimierungsschritt: Erhöhung der Zahl der Kupplungszyklen

Diese Maßnahme basiert auf der Annahme, dass ein Ethidium-haltiges Phosphoramidit in das bis dahin synthetisierte Oligonukleotid interkaliert, das freie 5'-Ende abschirmt und somit die Kupplungseffizienz verschlechtert. Aus diesem Grund wird der CPG-Träger nach jedem Kupplungsschritt mit ACN gespült und im nachfolgenden Kupplungsschritt wieder mit frischem Phosphoramidit und Aktivator (Tetrazol) gefüllt. Alternativ wäre hier auch denkbar, den CPG-Träger mit DMSO zu spülen, da durch dieses Solvens die bei der Interkalation wirkenden π - π -Wechselwirkungen verringert werden. Nachfolgend ist das modifizierte Kupplungsprotokoll für einen Kupplungsschritt mit etwa 45 min Kupplungszeit wiedergegeben (Abbildung 145).

```

/*-----
/* Function          Mode   Amount  Time(sec)      Description
/*                  /Arg1  /Arg2
/*-----
(...)
$ Coupling
1 /*Wsh             */ PULSE   5       0       "Flush system with Wsh"
2 /*Act             */ PULSE   7       0       "Flush system with Act"
22 /*5 + Act       */ PULSE   6       0       "Monomer + Act to column"
22 /*5 + Act       */ PULSE   2       1000    "Couple monomer mod. 1"
2 /*Act             */ PULSE   3       600     "Couple monomer mod. 2"
22 /*5 + Act       */ PULSE   5       10      "Couple monomer mod. 3"
22 /*5 + Act       */ PULSE   2       1000    "Couple monomer mod. 4"
2 /*Act             */ PULSE   3       600     "Couple monomer mod. 5"
1 /*Wsh             */ PULSE   7       400     "Couple monomer mod. 6"
1 /*Wsh             */ PULSE   30      0       "Flush system with Wsh"
2 /*Act             */ PULSE   7       0       "Flush system with Act"
22 /*5 + Act       */ PULSE   6       0       "Monomer + Act to column"
22 /*5 + Act       */ PULSE   2       1000    "Couple monomer mod. 1"
2 /*Act             */ PULSE   3       600     "Couple monomer mod. 2"
22 /*5 + Act       */ PULSE   5       10      "Couple monomer mod. 3"
22 /*5 + Act       */ PULSE   2       1000    "Couple monomer mod. 4"
2 /*Act             */ PULSE   3       600     "Couple monomer mod. 5"
1 /*Wsh             */ PULSE   7       400     "Couple monomer mod. 6"
1 /*Wsh             */ PULSE   30      0       "Flush system with Wsh"
2 /*Act             */ PULSE   7       0       "Flush system with Act"
22 /*5 + Act       */ PULSE   6       0       "Monomer + Act to column"
22 /*5 + Act       */ PULSE   2       1000    "Couple monomer mod. 1"
2 /*Act             */ PULSE   3       600     "Couple monomer mod. 2"
22 /*5 + Act       */ PULSE   5       10      "Couple monomer mod. 3"
22 /*5 + Act       */ PULSE   2       1000    "Couple monomer mod. 4"
2 /*Act             */ PULSE   3       600     "Couple monomer mod. 5"
1 /*Wsh             */ PULSE   7       400     "Couple monomer mod. 6"
1 /*Wsh             */ PULSE   30      0       "Flush system with Wsh"
(...)
-----

```

Abb. 145: *Optimiertes Kupplungsprotokoll*

-
- Der *CPG*-Träger wird mit 7 Pulsen des Aktivators Tetrazol gefüllt (1 Puls = 16 μ L, 6 bis 7 Pulse (ca. 0.1 mL) sind nötig um die verwendeten *CPG*-Träger vollständig zu befüllen).
 - 6 Pulse eines Gemisches aus Phosphoramidit und Aktivator werden zugegeben.
 - Es werden 2 Pulse des Gemisches aus Phosphoramidit und Aktivator zugegeben. Die Wartezeit von 1000 Sekunden dient zur Kupplung. Der erste Puls erfolgt direkt auf die 6 Pulse aus der Zeile davor und stellt sicher, dass der *CPG*-Träger mit 7 Pulsen vollständig befüllt wird. Der zweite Puls erfolgt nach der Hälfte der Wartezeit und ist gerätebedingt. Wegen eines Fehlers in der Steuerungssoftware werden Befehlszeilen mit nur einem Puls ignoriert.
 - Mit 3 Pulsen Aktivator wird in den Leitungen verbliebenes Phosphoramidit ins *CPG* gespült und die Aktivatorkonzentration erhöht. Die Wartezeit dient auch hier zur Kupplung.
 - Es wird ein frisches Gemisch aus Phosphoramidit und Aktivator zugegeben. Eine Trennung des Füllvorganges (10 s) und der Kupplung (1000 s) ist sinnvoll, da bei einer langsamen Zugabe der 5 Pulse das Aktivator/Phosphoramidit-Gemisch sonst zu lange in der Leitung stehen und nicht als frisches Gemisch in den *CPG*-Träger gelangen würde. Spülen des *CPG*-Trägers mit ACN.

Der hier abgebildete optimierte Kupplungszyklus wurde mit einem, zwei, drei und fünf Wiederholungen angewendet. Zum Vergleich wurde die Synthese zusätzlich unter den Standard-Bedingungen ausgeführt. Es zeigte sich, dass das unten dargestellt Kupplungs-Protokoll mit zwei Zyklen und dem Waschen des *CPGs* vor der Zugabe von frischem Phosphoramidit ein optimales Ergebnis liefert. Kupplungsversuche mit drei und fünf Zyklen ergaben keine merkliche Steigerung der Kupplungseffizienz. Die sich dadurch ergebenden langen Reaktionszeiten sind in Anbetracht der Instabilität des Phosphoramidits eher als ungünstig einzustufen.

Als Beispiel für die Optimierung der Bedingungen der DNA-Festphasensynthese sind die Trityldaten der Synthese der Sequenz 3'-TGC-ATG-CAT-GCA-TEA-TG-5' unter Standardbedingungen und unter optimalen Bedingungen im Folgenden abgebildet (Abbildungen 146 und 147). Die Ausbeute des fluoreszenzmarkierten Phosphoramidits steigt um etwa 400 %. Dadurch wird auch die nachfolgende Reinigung der Roh-DNA vereinfacht.

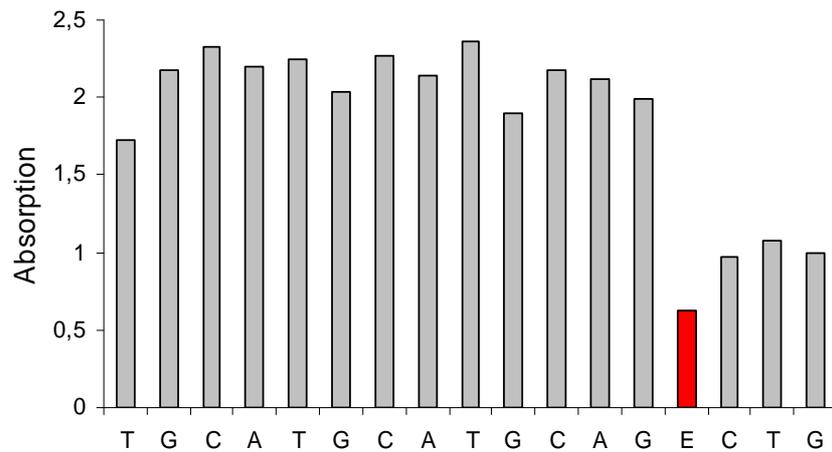


Abb. 146: *Trityl*-daten der DNA-Festphasensynthese von 3'-TGC-ATG-CAT-GCA-TEA-TG-5' mit dem Ethidium-haltigen Phosphoramidit **31**, Standard-Protokoll.

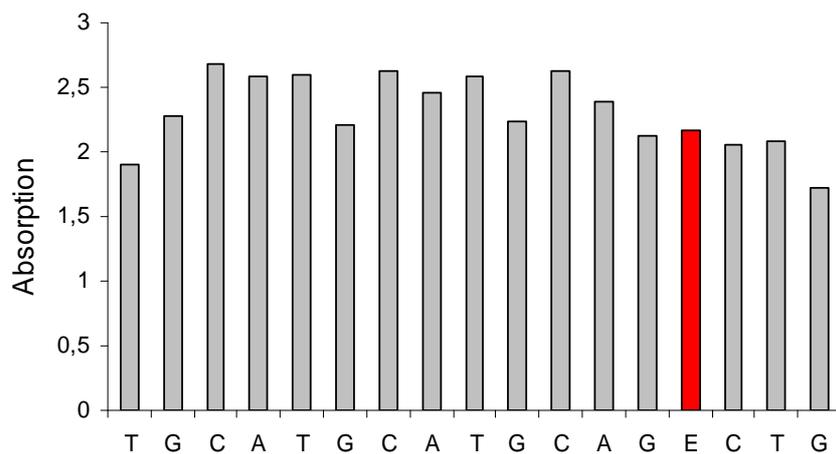


Abb. 147: *Trityl*-daten der DNA-Festphasensynthese von 3'-TGC-ATG-CAT-GCA-TEA-TG-5' mit dem Ethidium-haltigen Phosphoramidit **31**, optimierte Synthese.

Alle in Kapitel 4.2 zu spektroskopischen Messungen verwendeten, Ethidium-haltigen DNA-Einzelstränge wurden mit der hier vorgestellten optimierten Kupplungssequenz synthetisiert.

6.5 Synthese der Oligonukleotide und DNA-Duplexe

6.5.1 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide und DNA-Duplexe: Einfluss der Gegenbase

6.5.1.1 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	ϵ_{260} [cm ² /mol]
3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-G- E -C-T-G-5'	197.4
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C- Y -G-A-C-3'	154.2
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C- T -G-A-C-3'	162.1
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C- G -G-A-C-3'	164.7
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C- C -G-A-C-3'	160.7
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C- A -G-A-C-3'	168.0
3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T- E -A-T-G-5'	202.1
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A- Y -T-A-C-3'	158.9
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A- T -T-A-C-3'	166.8
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A- G -T-A-C-3'	169.4
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A- C -T-A-C-3'	165.4
5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A- A -T-A-C-3'	172.7

6.5.1.2 MALDI-TOF-MS der Ethidium-haltigen Einzelstränge

Einzelstrang	m/z berechnet	m/z gemessen
3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-G- E -C-T-G-5'	5375	5377
3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T- E -A-T-G-5'	5374	5374

6.5.1.3 Ethidium-haltige Duplexe

Duplex 13

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-G-**E**-C-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C-**Y**-G-A-C-3'

Duplex 14

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-G-**E**-C-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C-**T**-G-A-C-3'

Duplex 15

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-G-**E**-C-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C-**G**-G-A-C-3'

Duplex 16

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-G-**E**-C-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C-**C**-G-A-C-3'

Duplex 17

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-G-**E**-C-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-C-**A**-G-A-C-3'

Duplex 18

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T-**E**-A-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A-**Y**-T-A-C-3'

Duplex 19

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T-**E**-A-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A-**T**-T-A-C-3'

Duplex 20

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T-**E**-A-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A-**G**-T-A-C-3'

Duplex 21

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T-**E**-A-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-T-A-C-3'

Duplex 22

3'-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T-**E**-A-T-G-5'

5'-A-C-G-T-A-C-G-T-A-C-G-T-A-**A**-T-A-C-3'

6.5.2 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide und DNA-Duplexe: Fluoreszenzlöschung durch 7-Deazaguanin in racemischer DNA

6.5.2.1 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	ϵ_{260} [cm ² /mol]
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-G-G-T- Y -A-G-3'	139.1
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T- Z -G-T- Y -A-G-3'	139.0
3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A- E -T-C-5'	172.4
5'-A-C-G-A-T-G-C-T-G-G-A-T- Y -A-G-3'	145.0
5'-A-C-G-A-T-G-C-T- Z -G-A-T- Y -A-G-3'	145.0
3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A- E -T-C-5'	172.4
5'-A-C-G-A-G-C-T-G-G-A-T-T- Y -A-G-3'	145.0
5'-A-C-G-A-G-C-T- Z -G-A-T-T- Y -A-G-3'	145.0

6.5.2.2 MALDI-TOF-MS der Ethidium-haltigen Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	m/z berechnet	m/z gemessen
3'-T-G-C-T-A-C-A-G-A-C-C-A-E-T-C-5'	4686	4683
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-G-G-T-Y-A-G-3'	4498	4499
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-Z-G-T-Y-A-G-3'	4496	4521
3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A-E-T-C-5'	4677	4674
5'-A-C-G-A-T-G-C-T-G-G-A-T-Y-A-G-3'	4507	4507
5'-A-C-G-A-T-G-C-T-Z-G-A-T-Y-A-G-3'	4505	4517
3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A-A-E-T-C-5'	4677	4676
5'-A-C-G-A-G-C-T-G-G-A-T-T-Y-A-G-3'	4507	4505
5'-A-C-G-A-G-C-T-Z-G-A-T-T-Y-A-G-3'	4505	4524

6.5.2.3 Ethidium-haltige Duplexe

Duplex 23

3'-T-G-C-T-A-C-A-G-A-C-C-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-G-G-T-Y-A-G-3'

Duplex 24

3'-T-G-C-T-A-C-A-G-A-C-C-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-Z-G-T-Y-A-G-3'

Duplex 25

3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-C-T-G-G-A-T-Y-A-G-3'

Duplex 26

3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-C-T-Z-G-A-T-Y-A-G-3'

Duplex 27

3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A-A-**E**-T-C-5'

5'-A-C-G-A-G-C-T-G-G-A-T-T-**Y**-A-G-3'

Duplex 28

3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A-A-**E**-T-C-5'

5'-A-C-G-A-G-C-T-**Z**-G-A-T-T-**Y**-A-G-3'

6.5.2.4 Schmelzverhalten Ethidium-haltiger Duplexe

Duplex	T _m	Duplex	T _m
23	59 °C	26	60 °C
24	60 °C	27	61 °C
25	60 °C	28	61 °C

6.5.3 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide und DNA-Duplexe: Fluoreszenzlöschung durch 7-Deazaguanin in enantiomerenreiner DNA

6.5.3.1 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	ε ₂₆₀ [cm ² /mol]
3'-T-G-C-T-A-C-A-G-A-C-C-A- E -T-C-5'	178.3
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-G-G-T- Y -A-G-3'	139.1
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T- Z -G-T- Y -A-G-3'	139.0
3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A- E -T-C-5'	172.4
5'-A-C-G-A-T-G-C-T-G-G-A-T- Y -A-G-3'	145.0
5'-A-C-G-A-T-G-C-T- Z -G-A-T- Y -A-G-3'	145.0
3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A-A- E -T-C-5'	172.4
5'-A-C-G-A-G-C-T-G-G-A-T-T- Y -A-G-3'	145.0
5'-A-C-G-A-G-C-T- Z -G-A-T-T- Y -A-G-3'	145.0

6.5.3.2 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	m/z berechnet	m/z gemessen
3'-T-G-C-T-A-C-A-G-A-C-C-A-E-T-C-5'	4686	4695
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-G-G-T-Y-A-G-3'	4498	4499
5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-Z-G-T-Y-A-G-3'	4496	4521
3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A-E-T-C-5'	4677	4691
5'-A-C-G-A-T-G-C-T-G-G-A-T-Y-A-G-3'	4507	4507
5'-A-C-G-A-T-G-C-T-Z-G-A-T-Y-A-G-3'	4505	4517
3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A-A-E-T-C-5'	4677	4671
5'-A-C-G-A-G-C-T-G-G-A-T-T-Y-A-G-3'	4507	4505
5'-A-C-G-A-G-C-T-Z-G-A-T-T-Y-A-G-3'	4505	4524

6.5.3.3 Ethidium-haltige Duplexe

Duplex 29

3'-T-G-C-T-A-C-A-G-A-C-C-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-G-G-T-Y-A-G-3'

Duplex 30

3'-T-G-C-T-A-C-A-G-A-C-C-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-T-C-T-Z-G-T-Y-A-G-3'

Duplex 31

3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-C-T-G-G-A-T-Y-A-G-3'

Duplex 32

3'-T-G-C-T-A-C-G-A-C-C-T-A-E-T-C-5'

5'-A-C-G-A-T-G-C-T-Z-G-A-T-Y-A-G-3'

Duplex 33

3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A-A-**E**-T-C-5'

5'-A-C-G-A-G-C-T-G-G-A-T-T-**Y**-A-G-3'

Duplex 34

3'-T-G-C-T-C-G-A-C-C-T-A-A-**E**-T-C-5'

5'-A-C-G-A-G-C-T-**Z**-G-A-T-T-**Y**-A-G-3'

6.5.4 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide und DNA-Duplexe: mismatch-Detektion

6.5.4.1 Ethidium-haltige Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	ϵ_{260} [cm ² /mol]
5'-C-A-G-C-A-T- Z -A-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	194.1
5'-C-A-G-C-A-T- Z -C-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	186.8
5'-C-A-G-C-A-T- Z -G-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	190.8
5'-C-A-G-C-A-T- Z -T-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	188.2
5'-C-A-G-C-A-T-G-A-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	194.1
5'-C-A-G-C-A-T-G-C-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	186.8
5'-C-A-G-C-A-T-G-G-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	190.8
5'-C-A-G-C-A-T-G-T-T- E -A-T-G-C-T-G-3'	188.2
3'-G-T-C-G-T-A-C- A -A-C-T-A-C-G-A-C-5'	157.5
3'-G-T-C-G-T-A-C-C-A-C-T-A-C-G-A-C-5'	150.2
3'-G-T-C-G-T-A-C- G -A-C-T-A-C-G-A-C-5'	154.2
3'-G-T-C-G-T-A-C-T-A-C-T-A-C-G-A-C-5'	151.6
3'-G-T-C-G-T-A-C- Y -A-C-T-A-C-G-A-C-5'	143.6

6.5.4.2 MALDI-TOF-MS Ethidium-haltiger Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	m/z berechnet	m/z gemessen
5'-C-A-G-C-A-T-Z-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5068	5091
5'-C-A-G-C-A-T-Z-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5044	5050
5'-C-A-G-C-A-T-Z-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5084	5078
5'-C-A-G-C-A-T-Z-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5029	5053
5'-C-A-G-C-A-T-G-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5067	5078
5'-C-A-G-C-A-T-G-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5043	5069
5'-C-A-G-C-A-T-G-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5083	5104
5'-C-A-G-C-A-T-G-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'	5028	5066
5'-C-A-G-C-A-T-C-A-Y-C-A-T-G-C-T-G-3'	4716	4702

6.5.4.3 Ethidium-haltige Duplexe

Duplex 35

3'-G-T-C-G-T-A-C-A-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 36

3'-G-T-C-G-T-A-C-C-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 37

3'-G-T-C-G-T-A-C-G-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 38

3'-G-T-C-G-T-A-C-T-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 39

3'-G-T-C-G-T-A-C-Y-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 40

3'-G-T-C-G-T-A-C-A-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 41

3'-G-T-C-G-T-A-C-C-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 42

3'-G-T-C-G-T-A-C-G-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 43

3'-G-T-C-G-T-A-C-T-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 44

3'-G-T-C-G-T-A-C-Y-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 45

3'-G-T-C-G-T-A-C-A-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 46

3'-G-T-C-G-T-A-C-C-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 47

3'-G-T-C-G-T-A-C-G-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 48

3'-G-T-C-G-T-A-C-T-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 49

3'-G-T-C-G-T-A-C-Y-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 50

3'-G-T-C-G-T-A-C-A-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 51

3'-G-T-C-G-T-A-C-C-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 52

3'-G-T-C-G-T-A-C-G-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 53

3'-G-T-C-G-T-A-C-T-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 54

3'-G-T-C-G-T-A-C-Y-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-Z-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 55

3'-G-T-C-G-T-A-C-A-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 56

3'-G-T-C-G-T-A-C-C-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 57

3'-G-T-C-G-T-A-C-G-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 58

3'-G-T-C-G-T-A-C-T-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 59

3'-G-T-C-G-T-A-C-Y-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-A-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 60

3'-G-T-C-G-T-A-C-A-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 61

3'-G-T-C-G-T-A-C-C-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 62

3'-G-T-C-G-T-A-C-G-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 63

3'-G-T-C-G-T-A-C-T-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 64

3'-G-T-C-G-T-A-C-Y-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-C-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 65

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 66

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 67

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 68

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 69

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-G-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 70

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 71

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 72

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 73

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

Duplex 74

3'-G-T-C-G-T-A-C-X-A-C-T-A-C-G-A-C-5'

5'-C-A-G-C-A-T-G-T-T-E-A-T-G-C-T-G-3'

6.5.4.4 Fraction quenched : Zahlenwerte

Fq	Y = A	Y = C	Y = G	Y = T	Y = <i>dSpacer</i>
X = A	0.69	0.52	0.59	0	0.74
X = C	0.54	0.82	0	0.85	0.90
X = G	-0.05	0	0.55	-0.01	0.34
X = T	0	0.75	0.67	-0.01	0.43

6.5.5 Pyren-haltige DNA

6.5.5.1 Pyren-haltige Oligodesoxynukleotide

Einzelstrang	ϵ_{260} [cm ² /mol]
5'-A-G-T-C-A-G-T-A-U-A-T-G-A-C-T-G-A-3'	192.6
5'-A-G-T-C-A-G-T-A-T-A-T-G-A-C-T-G-A-3'	178.0
3'-T-C-A-G-T-C-A-T-A-T-A-C-T-G-A-C-T-5'	164.2
5'-T-C-A-G-T-C-A-C-U-C-A-C-T-G-A-C-T-3'	170.1
5'-T-C-A-G-T-C-A-C-T-C-A-C-T-G-A-C-T-3'	155.5
3'-A-G-T-C-A-G-T-G-A-G-T-G-A-C-T-G-A-5'	177.3
5'-A-G-T-C-A-G-T-G-U-G-T-G-A-C-T-G-A-3'	172.8
5'-A-G-T-C-A-G-T-G-T-G-T-G-A-C-T-G-A-3'	158.2
3'-T-C-A-G-T-C-A-C-A-C-A-C-T-G-A-C-T-5'	161.5
5'-T-C-A-G-T-C-A-T-U-T-A-C-T-G-A-C-T-3'	186.0
5'-T-C-A-G-T-C-A-T-T-T-A-C-T-G-A-C-T-3'	171.4
3'-A-G-T-C-A-G-T-A-A-A-T-G-A-C-T-G-A-5'	184.0
5'-T-C-A-G-T-C-A-T-U-C-A-C-T-G-A-C-T-3'	171.5
5'-T-C-A-G-T-C-A-T-T-C-A-C-T-G-A-C-T-3'	156.9
3'-A-G-T-C-A-G-T-A-A-G-T-G-A-C-T-G-A-5'	180.6
5'-T-C-A-G-T-C-A-C-U-T-A-C-T-G-A-C-T-3'	171.5
5'-T-C-A-G-T-C-A-C-T-T-A-C-T-G-A-C-T-3'	156.9
3'-A-G-T-C-A-G-T-G-A-A-T-G-A-C-T-G-A-5'	180.6

6.5.5.2 MALDI-TOF-MS der Pyren-haltigen Einzelstränge

Einzelstrang	m/z berechnet	m/z gemessen
5'-A-G-T-C-A-G-T-A-U-A-T-G-A-C-T-G-A-3'	5419	5417
5'-T-C-A-G-T-C-A-C-U-C-A-C-T-G-A-C-T-3'	5291	5280
5'-A-G-T-C-A-G-T-G-U-G-T-G-A-C-T-G-A-3'	5451	5448
5'-T-C-A-G-T-C-A-T-U-T-A-C-T-G-A-C-T-3'	5321	5320
5'-T-C-A-G-T-C-A-T-U-C-A-C-T-G-A-C-T-3'	5306	5296
5'-T-C-A-G-T-C-A-C-U-T-A-C-T-G-A-C-T-3'	5306	5306

6.5.5.3 Pyren-haltige Duplexe

Duplex 1

5'-A-G-T-C-A-G-T-A-U-A-T-G-A-C-T-G-A-3'

3'-T-C-A-G-T-C-A-T-A-T-A-C-T-G-A-C-T-5'

Duplex 2

5'-A-G-T-C-A-G-T-A-T-A-T-G-A-C-T-G-A-3'

3'-T-C-A-G-T-C-A-T-A-T-A-C-T-G-A-C-T-5'

Duplex 3

5'-T-C-A-G-T-C-A-C-U-C-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-G-A-G-T-G-A-C-T-G-A-5'

Duplex 4

5'-T-C-A-G-T-C-A-C-T-C-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-G-A-G-T-G-A-C-T-G-A-5'

Duplex 5

5'-A-G-T-C-A-G-T-G-U-G-T-G-A-C-T-G-A-3'

3'-T-C-A-G-T-C-A-C-A-C-A-C-T-G-A-C-T-5'

Duplex 6

5'-A-G-T-C-A-G-T-G-T-G-T-G-A-C-T-G-A-3'

3'-T-C-A-G-T-C-A-C-A-C-A-C-T-G-A-C-T-5'

Duplex 7

5'-T-C-A-G-T-C-A-T-U-T-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-A-A-A-T-G-A-C-T-G-A-5'

Duplex 8

5'-T-C-A-G-T-C-A-T-T-T-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-A-A-A-T-G-A-C-T-G-A-5'

Duplex 9

5'-T-C-A-G-T-C-A-T-U-C-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-A-A-G-T-G-A-C-T-G-A-5'

Duplex 10

5'-T-C-A-G-T-C-A-T-T-C-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-A-A-G-T-G-A-C-T-G-A-5'

Duplex 11

5'-T-C-A-G-T-C-A-C-U-T-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-G-A-A-T-G-A-C-T-G-A-5'

Duplex 12

5'-T-C-A-G-T-C-A-C-T-T-A-C-T-G-A-C-T-3'

3'-A-G-T-C-A-G-T-G-A-A-T-G-A-C-T-G-A-5'

7 Literatur

- [1] A. M. Kuznetsov, J. Ulstrup, *Electron Transfer in Chemistry and Biology*, John Wiley & Sons, New York **1999**
- [2] H. B. Gray, J. R. Winkler, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 537-561
- [3] T. S. Skotheim, R. L. Elsenbaumer, J. R. Reynolds, *Handbook of Conducting Polymers*, Marcel Dekker, New York, **1998**
- [4] J. H. Burroughes, D. D. C. Bradley, A. R. Brown, R. N. Marks, K. Mackay, R. H. Friend, P. L. Burn, A. B. Holmes, *Nature* **1990**, *347*, 539-541
- [5] a) R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 966-978
b) R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322
- [6] R. A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1111-1121
- [7] G. McLendon, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 160-167
- [8] G. McLendon, R. Hake, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 481-490
- [9] J. R. Winkler, H. B. Gray, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 369-379
- [10] J. J. Hopefield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3640-3644
- [11] H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1961**, *35*, 508-515
- [12] R. Weinkauff, P. Schanen, A. Metsala, E. W. Schlag, M. Bürgle, H. Kessler, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18567-18585
- [13] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738
- [14] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411-415
- [15] *Top. Curr. Chem.* **2004**, *Vol. 236 und 237*, „Long-Range Charge Transfer in DNA I“ und „Long-Range Charge Transfer in DNA II“, Springer-Verlag Heidelberg **2004**
- [16] H.-A. Wagenknecht, *Chemie in unserer Zeit* **2002**, *5*, 318-330; H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2454-2460
- [17] H.-A. Wagenknecht, in C. Schmuck, H. Wennemers, “*Bioorganic Chemistry Highlights II: From Chemistry to Biology*”, 369-384, Wiley-VCH, Weinheim **2004**
- [18] M. W. Grinstaff, P. M. Gross, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3629-3635
- [19] F. D. Lewis, in V. Balzani, „*Electron Transfer in Chemistry*“, Vol. 3, 105-175, Wiley-VCH, Weinheim **2001**
- [20] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Seide, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington **1995**

-
- [21] a) C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2865-2869
b) D. H. Blohm, A. Guiseppi-Elie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 41-47
c) M. C. Pirrung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276-1289
d) A. Jung, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 41-42
- [22] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635-638
- [23] a) K. Tanaka, M. Shionoya, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5002-5003
b) K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8802-8803
c) K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, *299*, 1212-1213
- [24] a) J. Richter, *Physica E* **2003**, *16*, 157-173
b) J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277-280
- [25] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144-146
- [26] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407-410
- [27] L. M. Adleman, *Science* **1994**, *266*, 1021-1024
- [28] D. Boneh, C. Dunworth, R. Lipton, and Jir'i Sgall, *Discrete Applied Mathematics* **1996**, *71*, 79-94
- [29] a) A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 547-569
b) A. R. Morgan, D. H. Evans, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 571-594
- [30] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. R. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014-6019
- [31] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5361-5362
- [32] D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11620-11625
- [33] S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 12025-12029
- [34] M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461-17472
- [35] V. May, O. Kühn, *Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems*, Wiley-VCH, Berlin, **2000**
- [36] C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, P. L. Dutton, *Nature* **1992**, *355*, 796-802
- [37] A. Weller, *Z. Physik. Chem. NF* **1982**, *133*, 93-98
- [38] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5529-5541

-
- [39] F. Vögtle, J. F. Stoddart, M. Shibasaki, „*Stimulating Concepts in Chemistry*“, Wiley-VCH, Weinheim **2000**
- [40] J. Jortner, *J. Phys. Chem.* **1976**, *64*, 4860-4867
- [41] J. Jortner, M. Bixon, Eds., *Electron Transfer: From Isolated Molecules to Biomolecules*, Wiley, New York, **1999**
- [42] P. F. Barbara, T. J. Meyer, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13148-13168
- [43] W. Schmidt, „*Optische Spektroskopie, Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker*“, Wiley-VCH, Weinheim **1994**
- [44] R. I. Cukier, D. G. Nocera, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1998**, *49*, 337-369
- [45] P. O'Neill, E. M. Fielden, *Adv. Radiat. Biol.* **1993**, *17*, 53-120
- [46] a) L. S. Cox, D. P. Lane, *Bioessays* **1995**, *17*, 501-508
b) M. Oren, V. Rotter, *Cell. Mol. Life. Sci.* **1999**, *55*, 9-11
c) S. Bates, K. H. Vousden, *Cell. Mol. Life. Sci.* **1999**, *55*, 28-37
- [47] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, *411*, 366-374
- [48] B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171-1200
- [49] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51-53
- [50] J. R. Milligan, J. A; Aguilera, O. Hoang, A. Ly, N. Q. Tran, J. F. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6,1682-1687
- [51] a) D. Wang, D. A. Kreuzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, *400*, 99-115
b) S. Kawanashi, Y. Hiraku, S. Oikawa, *Mutation Res.* **2001**, *488*, 65-76
- [52] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520
- [53] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151
- [54] a) A. Heller, *Faraday Discuss.* **2000**, *116*, 1-13
b) K. A. Friedman, A. Heller, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11859-11865
- [55] M. Ober, U. Linne, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4947-4951
- [56] C. J. Wiederholt, M. O. Delaney, M. A. Pope, S. S. David, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9755-9760
- [57] M. M. Greenberg, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 46-50
- [58] I. Saito, T. Nakamura, K. Nakatani, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12686-12687
- [59] T. Melvin, S. W. Botchway, A. W. Parker, P. O'Neill, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10031-10036

-
- [60] T. Douki, J.-L. Ravanat, D. Angelov, J. R. Wagner, J. Cadet, *Top. Curr. Chem.* **2004**, Vol. 236, 1-26 „Long-Range Charge Transfer in DNA I“, Springer-Verlag Heidelberg **2004**
- [61] D. Baltimore, *Nature* **2001**, 409, 814-816
- [62] S. Wolf, D. Frenkel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter, A. Minsky, *Nature* **1999**, 400, 83-85
- [63] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. de Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10803-10812
- [64] G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle, *Nature* **2002**, 417, 876-880
- [65] S. R. Rajski, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutation Res.* **2000**, 447, 49-72
- [66] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, 33, 2-9
- [67] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 491-498
- [68] E. M. Boon, A. L. Livingston, N. H. Chmiel, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 12543-12547
- [69] a) S. L. Porello, S. D. Williams, H. Kuhn, M. L. Michaels, S. S. David, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10684-10692
b) N. V. Bulychev, C. V. Varaprasad, G. Dorman, J. H. Miller, M. Eisenberg, A. P. Grollmann, F. Johnson, *Biochemistry* **1996**, 35, 13147-13156
c) S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1221-1261
- [70] P. Gaudu, B. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 10094-10098
- [71] a) N. Khoroshilova, C. Popescu, E. Munk, H. Beinert, P. J. Kiley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 6087-6092
b) P. Kiley, H. Beinert, *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, 22, 341-352
c) N. Khoroshilova, H. Beinert, P. J. Kiley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2499-2503
- [72] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 51-70
- [73] 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
- [74] Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 1460-1467
- [75] S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, 40, 5556-5564
- [76] M. O’Gara, J. R. Horton, R. J. Roberts, X. Cheng, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 872-877
- [77] D. B. Nicolov, H. Chen, E. D. Halay, A. Hoffmann, R. G. Roeders, S. K. Burley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4862-4867
- [78] P.-Y. Kwok, X. Chen, *Curr. Iss. Mol. Biol.* **2003**, 5, 43-60

-
- [79] M. Sanchez-Carbayo, W. Bornman, C. Cordon-Cardo, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 945-971
- [80] J. R. Epstein, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 3-36
- [81] C. Wojtyzewski, K. Stolze, J. W. Engels, *Synlett* **1999**, 1667-1678
- [82] D. H. Hurley, S. E. Seaman, J. C. Mazura, Y. Tor, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2305-2308
- [83] U. B. Christiansen, E. B. Pedersen, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2090-2097
- [84] A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4972-4973
- [85] K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8982-8983
- [86] K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, N. Teramae, *Chem. Comm.* **2003**, 2960-2961
- [87] O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Comm.* **2003**, 2938-2939
- [88] S. M. Gasper, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12762-12771
- [89] B. Giese, S. Wessely, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3490-3491
- [90] B. Giese, S. Wessely, *Chem. Commun.* **2001**, 2108-2109
- [91] P. K. Bhattacharya, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8649-8656
- [92] S. O. Kelley, N. M. Jackson, M. G. Hill, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 941-945
- [93] N. M. Jackson, M. G. Hill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 209-215
- [94] E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 1096-1100
- [95] E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2002**, *20*, 282-286
- [96] G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192-1199
- [97] A. R. Pike, L. H. Lie, R. A. Eagling, L. Ryder, S. N. Patole, B. A. Connolly, B. R. Horrocks, A. Houlton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 615-617
- [98] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128-4158
- [99] N. C. Seeman, in "DNA Nanostructures for Mechanics and Computing: Nonlinear Thinking With Life's Central Molecule", 308-318; C. Mirkin, C. Niemeyer (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim **2004**
- [100] T. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F. Liu, E. Winfree, J. H. Reif and N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1848-1860
- [101] C. Mao, T. LaBean, J. H. Reif and N. C. Seeman, *Nature* **2000**, *407*, 493-496
- [102] N. C. Seeman, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7259-7269
- [103] a) H. Weizman, Y. Tor, *Chem. Commun.* **2001**, 453-454
b) H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375-3376

-
- [104] a) M. Tasaka, K. Tanaka, M. Shiro, M. Shionoya, *Supramol. Chem.* **2001**, *13*, 671-675
b) K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, M. Shionoya, *Supramol. Chem.* **2002**, *14*, 255-261
c) K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8802-8803
- [105] a) E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714-10715
b) S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364-12367
c) N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13684-13685
- [106] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775-778
- [107] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635-638
- [108] D. Beaver, *J. Comp. Biol.* **1995**, *2*, 1-7
- [109] N. Pisanti, *EATCS Bulletin* **1998**, *64*, 188-216
- [110] S. Kurtz, S. Mahaney, J. Royer, J. Simon, "Biological computing" in Complexity Theory and Retrospective 179-196, L. Hemaspaandra, A. Selman (Hrsg.) Springer **1997**
- [111] D. Dee, M. E. Baur, *J. Chem. Phys.* **1974**, *60*, 541-560
- [112] a) E. K. Wilson, *Chem. Eng. News* **1997**, *75*, 33-39
b) J. M. Warman, M. P. de Haas, A. Rupprecht, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *249*, 319-322
- [113] a) S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17678-17682
b) D. N. Beratan, S. Priyadarshy, S. M. Risser, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 3-8
c) D. D. Dunlap, R. Garcia, E. Schabtach, C. Bustamente, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7652-7655
- [114] A. Y. Kasumov, M. Kociak, S. Gueron, B. Reulet, V. T. Volkov, D. V. Klinov, H. Bouchiat, *Science* **2001**, *291*, 280-282
- [115] M. E. Nunez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85-97
- [116] M. Ratner, *Nature* **1999**, *397*, 480-481
- [117] M. W. Grinstaff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3845-3851
- [118] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759-12765
- [119] M. E. Nunez, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 199-206
- [120] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 158-161
- [121] 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
- [122] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618

-
- [123] B. Giese, M. Spichty, *Chem Phys. Chem.* **2000**, *1*, 195-198
- [124] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6842-6843
- [125] M. Bixon, B. Giese, S. Wesseley, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11713-11716
- [126] E. M. Conwell, S. V. Rakhmanova, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4556-4560
- [127] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253-260
- [128] M. Bixon, J. Jortner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12556-12567
- [129] G. B. Schuster, U. Landman, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *Vol. 236*, 139-161 „Long-Range Charge Transfer in DNA I“, Springer-Verlag Heidelberg **2004**
- [130] E. Conwell, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *Vol. 236*, 73-101 „Long-Range Charge Transfer in DNA I“, Springer-Verlag Heidelberg **2004**
- [131] J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025-1029
- [132] J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 352-354
- [133] F. D. Lewis, R. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673-676
- [134] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861-9870
- [135] F. D. Lewis, Y. Zhang, X. Liu, N. Xu, R. L. Letsinger, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2570-2578
- [136] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, *283*, 375-381
- [137] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4399-4408
- [138] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14052-14055
- [139] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M. E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10046-10055
- [140] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9083-9092
- [141] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. Coates Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 389-400
- [142] D. B. Hall, S. O. Kelley, J. K. Barton, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15933-15940
- [143] a) H. Ikeda, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10836-10837
b) K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *121*, 5893-5894

-
- [144] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553
- [145] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701-4709
- [146] S. S. Wesolowski, M. L. Leininger, P. N. Pentchev, H. F. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4023-4028
- [147] X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 1596-1603
- [148] A. A. Voityuk, M. E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 231-238
- [149] S. Steenken, *Free Rad. Res. Comms.* **1992**, *16*, 349-379
- [150] Z. Cai, M. D. Sevilla, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *Vol. 236*, 103-127 „Long-Range Charge Transfer in DNA I“, Springer-Verlag Heidelberg **2004**
- [151] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Seide, DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, **1995**
- [152] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem.* **1999**, *1*, 4827-4831
- [153] A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3918-3920
- [154] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1763-1766
- [155] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281-3289
- [156] A. Mees, C. Behrens, A. Schwögler, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2670-2677
- [157] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Comm.* **2003**, 1632-1633
- [158] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1842-1844
- [159] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280-11281
- [160] a) 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
- [161] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839-1842
- [162] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480-11481
- [163] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848-1851
- [164] P. Vigny, *P. C. R. Acad. Sci., Ser. D* **1971**, *272*, 3206-3209
- [165] a) D. Voet, W. B. Gratzler, R. A. Cox, P. Doty, *Biopolymers* **1963**, *1*, 193-208
b) C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4, 1977-2019

-
- [166] D. N. Nikogosyan, D. Angelov, B. Soep, L. Lindqvist, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *252*, 322-326
- [167] T. Haupl, C. Windolph, T. Jochum, O. Brede, R. Hermann, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *280*, 520-524
- [168] M. A. O'Neill, J. K. Barton in *Top. Curr. Chem.* **2004**, *Vol. 236*, „Long-Range Charge Transfer in DNA I“, 67-115, Springer-Verlag Heidelberg **2004**
- [169] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum, New York, **1999**
- [170] L. Alaverdian, S. Alaverdian, O. Bilenko, I. Bogdanov, E. Filippova, D. Gavrilov, B. Gorbovitski, M. Gouzman, G. Gudkov, S. Domratchev, O. Kosobokova, N. Lifshitz, S. Luryi, V. Ruskovoloshin, A. Stepoukhovitch, M. Tcherevishnick, G. Tyshko, V. Gorfinkel, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2804-2817
- [171] G. Xue, E. S. Yeung, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1490-1498
- [172] C. Lee, E. Lemyre, P. M. Miron, C. C. Morton, *Curr. Opin. Ped.* **2001**, *13*, 550-555
- [173] C. Fauth, M. R. Speicher, *Cytogenetics and Cell Genetics* **2001**, *93*, 11-15
- [174] R. Amann, B. M. Fuchs, S. Behrens, *Curr. Opin. Biotech.* **2001**, *12*, 231-234
- [175] J. Pernthaler, F. O. Glockner, W. Schonhuber, R. Amann, *Meth. Microbiol.* **2001**, *30*, 207-226
- [176] E. A. Mothershed, P. K. Cassidy, K. Pierson, L. W. Mayer, T. Popovic, *Journal of Clinical Microbiology* **2002**, *40*, 4713-4719
- [177] N. Li, W. G. Tan, R. Y. Tsang, D. L. J. Tyrrell, N. J. Dovichi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 269-273
- [178] C. Wojczewski, K. Stolze, J. W. Engels, *Synlett* **1999**, *10*, 1667-1678
- [179] A. E. Remmers, R. R. Neubig, *Journal of Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4791-4797
- [180] Y. P. Jia, S. S. Patel, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30147-30153
- [181] M. R. Otto, L. B. Bloom, M. F. Goodman, J. M. Beechem, *Biochemistry* **1998**, *37*, 10156-10163
- [182] R. P. Bandwar, S. S. Patel, *Journal of Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14075-14082
- [183] J. T. Stivers, K. W. Pankiewicz, K. A. Watanabe, *Biochemistry* **1999**, *38*, 952-963
- [184] B. W. Allan, J. M. Beechem, W. M. Lindstrom, N. O. Reich, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2368-2373
- [185] B. W. Allan, N. O. Reich, J. M. Beechem, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5308-5314
- [186] J. J. Sullivan, K. P. Bjornson, L. C. Sowers, P. L. de Haseth, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8005-8012
- [187] Y. P. Jia, A. Kumar, S. S. Patel, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30451-30458

-
- [188] K. P. Bjornson, K. J. M. Moore, T. M. Lohman, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2268-2282
- [189] D. Klostermeier, D. P. Millar, *Methods* **2001**, *23*, 240-251
- [190] S. R. Kirk, N. W. Luedtke, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2295-2301
- [191] F. Walter, A. I. H. Murchie, J. B. Thomson, D. M. J. Lilley, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14195-14203
- [192] P. Z. F. Qin, A. M. Pyle, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4718-1430
- [193] G. S. Bassi, N. E. Mollegaard, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3345-3354
- [194] D. G. Xu, T. M. Nordlund, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1042-1058
- [195] M. Kawai, M. J. Lee, K. O. Evans, T. M. Nordlund, *J. Fluorescence* **2001**, *11*, 23-32
- [196] T. Fiebig, C. Z. Wan, A. H. Zewail, *Chemphyschem* **2002**, *3*, 781-788
- [197] a) J. N. A. Tettey, G. G. Skellern, M. H. Grant, J. M. Midgley, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 1-7
b) J. N. A. Tettey, G. G. Skellern, J. M. Midgley, M. H. Grant A. R. Pitt, *Chem.-Biol. Interact.* **1999**, *123*, 105-115
- [198] P. T. Henderson, E. Boone, G. B. Schuster, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 135-151
- [199] J. Olmsted, D. R. Kearns, *Biochemistry* **1977**, *16*, 3647-3654
- [200] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 413-425
- [201] S. V. Kochetkova, E. I. Tishchenko, E. N. Timofeev, I. L. Shehaveleva, V. L. Florentiev, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1495-1496
- [202] E. N. Timofeev, I. P. Smirnov, L. A. Haff, E. I. Tishchenko, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8467-8470
- [203] P. B. Dervan, R. P. Hertzberg, *United States Patent*, Patent Number 4.665.184, **1987**
- [204] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063-7068
- [205] D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259-271
- [206] L. J. P. Latimer, J. S. Lee, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21, 13849-13851
- [207] E. W. Schlag, D.-Y. Yang, S.-Y. Sheu, H. L. Selzle, S. H. Lin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9849-9854
- [208] R. Bruinsma, G. Grüner, M. R. D'Orsogna, J. Rudnick, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 4393-4396
- [209] T. Fiebig, C. Wan, S. O. Kelley, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1187-1192
- [210] L. Kittler, G. Löber, F. A. Gollmich, H. Berg, *J. Elektroanal. Chem.* **1980**, *116*, 503-504

-
- [211] W. M. Clark, *Oxidation Reduction Potentials of Organic Systems*, R. E. Krieder (Hrsg.), Huntington New York **1972**
- [212] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656-3660
- [213] A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 945-949
- [214] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119-9128
- [215] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865-3877
- [216] S. A. El-Kafrawy, M. A. Zahran, E. B. Pedersen, *Heterocycl. Comm.* **1999**, *5*, 539-542
- [217] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4918-4925
- [218] I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, A. A. Petrov, S. V. Gontarev, Y. A. Berlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2081-2084
- [219] J. D. Frazer, S. M. Horner, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1279-1282
- [220] a) E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990-1009
b) J. Gao, C. Strässler, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590-11591
c) 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
d) E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 936-943
- [221] L. Michaelis, E. S. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 1481-1494
- [222] H. A. Schwarz, R. W. Dodson, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 409-414
- [223] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154
- [224] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045-3046
- [225] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527
- [226] N. Sinha, V. Großbruchhaus, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 877-880
- [227] S. Ghosh, G. F. Musso, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 5353-5372
- [228] H. Schaller, G. Weimann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821-3827
- [229] B. S. Sproat, A. M. Iribarren, R. Guimil, B. Beijer, *Nuc. Acids Res.* **1991**, *19*, 733-738
- [230] P. Theisen, C. McCollum, A. Andrus, *Nucleosides Nucleotides* **1993**, *12*, 1033-1046
- [231] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Y. Tang, *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313
- [232] A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632-2638
- [233] R.L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5319-5324
- [234] J. C. Catlin, F. Cramer, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 245-250
- [235] K. Itakura, N. Katagiri, S. A. Narang, *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 3689-3996

-
- [236] R. H. Hall, A. Todd, R. F. Webb, *J. Chem. Soc.* **1957**, 3291-3296
- [237] B. C. Froehler, M. D. Matteucci, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 469-472
- [238] S. Berner, L. Muehlegger, H. Seliger, *Nucleic Acids Research* **1989**, 17, 853-864
- [239] J. N. A. Tetley, G. G. Skellern, J. M. Midgley, M. H. Grant, R. W. Wilkinson, A. R. Pitts, *Xenobiotica* **1999**, 29, 349-360
- [240] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1685-1690
- [241] a) G. Morgan, L. P. Walls, *J. Chem. Soc.* **1938**, 389-397
b) L. P. Walls, *J. Chem. Soc.* **1945**, 294-300
- [242] T. I. Watkins, *J. Chem. Soc.* **1952**, 3, 3059-3064
- [243] S. S. Berg, *J. Chem. Soc.* **1963**, 14, 3635-3640
- [244] W. J. Firth, C. L. Watkins, D. E. Graves, L. W. Yielding, *J. Heterocyclic Chem.* **1983**, 20, 759-765
- [245] a) J. Loccafier, E. Schacht, *Tetrahedron* **1989**, 45, 3385-3396
b) J. Loccafier, E. Schacht, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1989**, 98, 145-152
- [246] B. Loubinoux, J.-L. Sinnes, A. C. O'Sullivan, T. Winkler, *Tetrahedron* **1995**, 51, 3549-3558
- [247] S. Blechert, H. Dollt, *Liebigs Ann.* **1996**, 2135-2140
- [248] R. W. Tester, F. G. West, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4631-4634
- [249] Y. Sit, R. A. Parker, I. Motoc, W. Han, N. Balasubramanian, J. D. Catt, P. J. Brown, W. E. Harte, M. D. Thompson, J. J. Wright, *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 2982-2999
- [250] X. Liang, A. Lohse, M. Bols, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7432-7437
- [251] U. Diederichsen, D. Weicherding, *Synlett* **1999**, S1, 917-920
- [252] F. Alberico, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem. Soc.* **1998**, 63, 9678-9683
- [253] N. Amann, unveröffentlichte Ergebnisse, **2002**
- [254] H. Kunz, H. Waldmann, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 618-622
- [255] Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1691-1696
- [256] Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajino, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2400-2402
- [257] I. R. Marsh, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6199-6203
- [258] K. F. Kuhlmann, C. W. Mosher, *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 1333-1337
- [259] C. Lion, J. P. Boukou-Poba, C. Charvy, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1990**, 99, 171-181
- [260] S. A. Ross, M. Pitić, B. Meunier, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 571-574
- [261] P. I. Radhakrishnan, S. L. Beaucage, *Compr. Nat. Prod. Chem.* **2002**, 7, 105-152
- [262] M. P. Reddy, F. Farooqui, N. B. Hanna, *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 8691-8694

-
- [263] N. N. Polushin, A. M. Morocho, B. Chen, J. S. Cohen, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 939-645
- [264] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751
- [265] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4977-4986
- [266] a) T. J. Curphey, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2805-2807
b) T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York **1999**
- [267] a) M. Gueron, R. G. Shulman, J. Eisinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *56*, 814-818
b) J. Eisinger, M. Gueron, R. G. Shulman, T. Yamane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *56*, 1015-1020
- [268] B. M. Trost, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 385-393
- [269] J. Tsuji, *Organic Synthesis with Palladium Compounds*, Springer Verlag, Berlin **1980**, 125-132
- [270] J. Pauluhn, A. Naujok, H. W. Zimmermann, *Z. Naturforsch.* **1980**, *35*, 585-598
- [271] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269-282
- [272] J.-B. LePecq, C. Paleotti, *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87-106
- [273] J. Olmstedt, D. R. Kearns, *Biochemistry* **1977**, *16*, 3647-3654
- [274] R. L. Letsinger, M. E. Schott, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7394-7396
- [275] K. S. Dahl, A. Pradi, I. Tinoco, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2730-2737
- [276] M. L. Lamos, D. H. Turner, *Biochemistry* **1985**, *24*, 2819-2822
- [277] G. Cosa, K.-S. Foscaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 585-599
- [278] L. I. Hernandez, M. Zhong, S. H. Courtney, L. A. Marky, N. R. Kallenbach, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13140-13146
- [279] A. Hissung, C. Sonntag, *Int. J. Radiat. Biol.* **1979**, *35*, 449-458
- [280] a) D. O'Connor, V. Y. Shafirovich, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9831-9839
b) V. Y. Shafirovich, S. H. Courtney, N. Ya, N. E. Geacintov, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4920-4929
- [281] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877-4883
- [282] a) D. Millstein, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4992-4998
b) W. J. Scott, G. T. Crisp, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4630-4632
c) W. J. Scott, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3033-3040
d) A. M. Echavarren, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5478-5486
- [283] E. Negishi, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 340-348

-
- [284] a) K. Sonogashira, Y. Toda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467-4470
b) H. A. Dieck, R. F. Heck, *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 259-263
c) S. Takahashi, Y. Kuroyama, K. Sonogashira, N. Hagihara, *Synthesis*. **1980**, 627-630
d) P. Magnus, H. Annoura, T. Harling, *J. Org. Chem.* **1999**, *55*, 1709-1711
e) T. R. Hoye, P. R. Hanson, A. C. Kovalesky, T. D. Ocain, Z. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9369-9371
- [285] a) J. K. Stille, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 508-524
b) T. N. Mitchell, *Synthesis* **1992**, 803-815
- [286] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483
- [287] a) M. Hocek, A. Holý, I. Votruba, H. Dvoráková, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1817-1825
b) M. Hocek, A. Holý, I. Votruba, H. Dvoráková, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2001**, *66*, 483-499
c) M. Havelková, D. Dvoračák, M. Hocek, *Synthesis* **2001**, 1704-1710
d) M. Hocek, A. Holý, H. Dvoráková, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2002**, *67*, 325-335
- [288] a) M. K. Lakshman, J. H. Hilmer, J. Q. Martin, J. C. Keeler, Y. Q. V. Dinh, F. N. Ngassa, L. M. Russon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7779-7787
b) M. K. Lakshman, P. F. Thomson, M. A. Nuquí, J. H. Hilmer, N. Sevova, B. Boggess, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1479-1482
- [289] D. J. McCaustland, A. B. Susàn, J. C. Wiley, *J. Lab. Comp. Rad. Pharm.* **1981**, *18*, 1465-1470
- [290] H. Suenaga, K. Nakashima, T. Mizuno, M. Takeuchi, I. Hamachi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1263-1267
- [291] M. Beinhoff, W. Weigel, M. Jurczok, W. Rettig, C. Modrakowski, I. Brüdgam, H. Hartl, A. D. Schlüter, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3819-3829
- [292] T.-S. Lin, J.-C. Cheng, K. Ishiguro, A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1194-1198
- [293] T. Fiebig, K. Stock, S. Lochbrunner, E. Riedle, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *345*, 81-88
- [294] a) N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2978-2980
b) N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3084-3087
- [295] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1-8
- [296] T. Shida, *Electronic Absorption Spectra of Radical Ions*, Elsevier New York **1988**
- [297] P. Foggi, L. Pettini, I. Sànta, R. Righini, S. Califano, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 7439-7445
- [298] E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, unveröffentlichte Ergebnisse

-
- [299] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925
- [300] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, R. Mayer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, *Organikum*, 20. bearbeitete und erweiterte Auflage, Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig **1996**
- [301] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862
- [302] J. D. Puglisi, I. Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325
- [303] M. Wolff, TU München, persönliche Mitteilung, **2003**
- [304] B. Gaugain, J. Barbet, R. Oberlin, B. P. Roques, J.-B. Le Pecq, *Biochemistry* **1978**, *17*, 24, 5071-5078
- [305] M. Sekine, O. Kurasawa, K. Shohda, K. Seio, T. Wada, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1989-1999
- [306] O. Dangles, F. Guibé, G. Balavoine, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 22, 4984-4993
- [307] C. Modrakowski, S. C. Flores, M. Beinhoff, A. D. Schlüter, *Synthesis* **2001**, *14*, 2143-2155
- [308] M. Baumgarten, L. Gherghel, J. Friedrich, M. Jurczok, W. Rettig, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6, 1130-1140
- [309] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691
- [310] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2-9

