

Sequenzspezifischer DNA-Nachweis basierend auf  
Cu(II)-, Cu(I)- & Cu(0)-vermittelten Reaktionen

&

Entwicklung Ferrocen-basierter, zellspezifischer  
Cytostatika

**Inaugural-Dissertation**

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von  
Elmar Jentzsch  
aus  
Speyer am Rhein

**2009**

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“

*Albert Einstein*



## Kurzzusammenfassung auf Deutsch

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit behandelt sequenzspezifische DNA-Nachweismöglichkeiten, basierend auf Reaktionen, welche durch Kupfer in drei unterschiedlichen Oxidationsstufen (0, I und II) hervorgerufen werden.

Die Esterspaltungsreaktion eines an PNA gekoppelten N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure-Derivates wurde untersucht. Die Spaltung erfolgte durch ein zweites PNA-Konjugat, welches mit einem Cu(II)-Komplex modifiziert worden war. Beide PNA-Fragmente binden an direkt benachbarte Stellen doppelsträngiger DNA, wodurch die reaktiven Gruppen in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden und somit die Esterspaltungsreaktion beschleunigt wird. Nach der Hydrolyse trat N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure aus, was mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie verfolgt werden konnte.

Ein fluoreszenzspektroskopischer DNA-Nachweis gelang mit Hilfe der Cu(I)-katalysierten (2+3)-Huisgen-Cycloaddition, auch Click-Reaktion genannt. Hierzu wurden zwei kurze DNA-Stränge modifiziert. Der eine wurde am 5'-Ende mit einem nichtfluoreszenten, Acetylid-substituierten 1,8-Naphthalimidfarbstoff markiert. Der andere Strang wurde am 3'-Ende mit einem organischen Azid versehen. Beide DNA-Fragmente binden an direkt benachbarten Stellen an einzelsträngige DNA. Durch Zugabe von Cu(I) wurde das elektronenziehende Acetylid in ein elektronenschiebendes Triazol umgewandelt, was zu einer Zunahme der Fluoreszenz führte. Mit dieser Methode konnte DNA sequenzspezifisch bis zu einer Konzentration von 200 nM nachgewiesen werden.

Bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  und 1 mM NaAsc konnte das Auftreten eines Peaks im Fluoreszenzspektrum bei  $\lambda = 580$  nm beobachtet werden. Diese zusätzliche Emission beruht auf der Bildung von Cu-Nanoteilchen, welche nur in Gegenwart doppelsträngiger DNA entstehen. Die Detektionsgrenze dieser Methode lag bei 1 nM dsDNA.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Synthese, Charakterisierung und Anwendung auf Ferrocen basierender, zellspezifischer Cytostatika beschrieben. In Krebszellen, welche eine deutlich höhere Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies besitzen als gesunde Zellen, wird die synthetisierte Substanz in zwei Cytostatika-Typen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen umgewandelt: einerseits entsteht ein

Chinonmethid-Derivat, welches den antioxidativen Schutzmechanismus der Zelle beeinflusst. Andererseits werden Fe(II)-Ionen freigesetzt, was die Generierung zusätzlicher reaktiver Sauerstoffspezies katalysiert. Dieser duale Wirkmechanismus erzeugt sehr schnell einen Zustand hohen oxidativen Stresses, was zum Tod der Krebszelle führt. Der IC<sub>50</sub>-Wert der Substanz liegt bei ~100 µM. Eine ebenfalls auf Ferrocen basierende Kontrollsubstanz zeigt bei dieser Konzentration keine Toxizität.

## Short Summary in English

The first part of this work deals with the sequence-specific detection of DNA. The described methods are based on reactions, which are triggered by Cu(II), Cu(I) or Cu(0), respectively.

The ester-cleavage of an N-Methyl-2-imidazolyl-carbonicacid-derivative, which is attached to a PNA was examined. The cleavage was catalyzed by a second PNA-conjugate, which was modified with a Cu(II)-complex. Both PNA-strands are binding to double stranded DNA in direct neighbourhood to each other, which brings the reactive groups into close proximity. As a consequence, the hydrolysis is accelerated and N-Methyl-2-imidazolyl-carbonic acid is cleaved off. This event can be followed by MALDI-TOF MS.

The fluorogenic detection of DNA was achieved using Click-Chemistry, which is dependent on the use of Cu(I). For this purpose, two short DNA-strands were modified. The first one was labelled with a nonfluorescent Acetylide-substituted 1,8-Naphtylimide-dye, whereas the latter was substituted with an organic azide. Again both DNA-strands are designed in such a way that they bind to single stranded DNA in direct neighbourhood to each other. Upon addition of Cu(I) the electron-withdrawing Acetylide was transformed into an electrone-donating Triazole, which led to increasing of fluorescence. Using this method, DNA could have been detected sequence-specifically down to 200 nM.

When 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> and 1 mM NaAsc were added, a peak in the fluorescence spectra was observed at  $\lambda = 580$  nm. This was due to the fact of appearance of Cu-nanodots, which were built only in the presence of double stranded DNA. The detection limit of this method was 1 nM of dsDNA.

The second part of the work describes the synthesis, characterization and the application of cell-specific cytostatic drugs, based on Ferrocene. Cancer cells contain a much higher amount of reactive oxygen species (ROS) than the normal ones. Within cancer cells, the described compound is cleaved into two different types of cytotoxic drugs. On the one hand a Quinone-methide derivative is produced, which depletes the antioxidant pool in the cell. On the other hand Fe(II)-cations are released, which induce the Fenton-reaction and thus produce even more ROS. The ROS generated in such a way will kill cancer cells. The IC<sub>50</sub>-value of the described

compound is about 100  $\mu\text{M}$ . The control-substance used, which also contains a ferrocene fragment, shows no toxicity at this concentration.

Sequenzspezifischer DNA-Nachweis basierend auf  
Cu(II)-, Cu(I)- & Cu(0)-vermittelten Reaktionen

&

Entwicklung Ferrocen-basierter, zellspezifischer  
Cytostatika

Gutachter:

Prof. Dr. R. Krämer

Priv. Doz. Dr. D.-P. Herten

Tag der mündlichen Prüfung:

06.11.2009



Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Januar 2006 bis März 2009 am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung im Jahre 2006.

Der Konrad Adenauer-Stiftung danke ich für die Gewährung eines Graduierten-Stipendiums in der Zeit von Januar 2007 bis Dezember 2008.

Dem Graduiertenkolleg des Landes Baden-Württemberg danke ich für die Gewährung eines Abschlußstipendiums im Jahre 2009.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Prof. Dr. Roland Krämer, der mir die Möglichkeit gab, die Logistik in seinem Arbeitskreis zu nutzen, sowie Dr. Andriy Mokhir, der durch seine Anregungen, Diskussionen und Ideen das Entstehen dieser Arbeit erst ermöglichte.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der **Arbeitskreise Krämer und Mokhir** danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Frau **Claudia Dienemann** danke ich für die Synthese der Oligonukleotide und für die Aufnahme der ESI-MS-Spektren.

Frau **Ute Wildenberg** danke ich für ihre Mithilfe, die im DKFZ erlernten Methoden in unserem Arbeitskreis zu etablieren.

Herrn **Volker Seifried** danke ich dafür, dass er als Ansprechpartner in all den Dingen, die nichts mit Chemie zu tun haben, für die notwendige Zerstreuung sorgte.

Bei meinen Forschungspraktikanten **Ronny Schmidt, Hanna Vaupel, Katja Deselars, Dominic Riedel, Marc Brüssel, Michel Neumann, Helen Hagen, Georg Rudolf, Christoph Sämann und Ulrike Gerhard** bedanke ich mich für die über weite Strecken hervorragend durchgeführten experimentellen Arbeiten.

In diesem Zusammenhang geht mein ganz besonderer Dank an meinen Auszubildenden **Jörg Brenneisen**, ohne dessen wirklich aufopferungsbereites und sehr präzises Arbeiten die vorliegende Arbeit in dieser Form sicherlich nicht existieren würde.

**Herrn Dr. Marlon Veldwijk** vom DKFZ danke ich für die hervorragende Kooperation und für die Geduld, die er in all den Stunden gemeinsam durchgeführter Experimente mit mir hatte.

Meinen Freunden **Arnd, Eddy, Falk, Frank, Indy, Markus, Mo, Oli, Robert, Schelles, Schilling und Ulf** möchte ich sagen: Durch Euch wird das Leben erst facettenreich und lebenswert. Vielen Dank!

Den Eltern meiner Freundin, **Dr. Walter Boll & Valeria Boll** möchte ich dafür danken, dass ich mich immer und in jeder Lebenslage auf die beiden verlassen kann. Der größte Dank gebührt meiner Freundin **Dr. Iris Boll**, die mir selbst in schwierigsten Situationen stets ein Fels in der Brandung ist, der mir Halt und Sicherheit bietet.

# Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>19</b>
1.1	<b>DNA und PNA</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)	1
1.1.2	Die Peptidnukleinsäure (PNA)	2
1.2	<b>Festphasensynthesen</b>	<b>4</b>
1.2.1	Merrifield-Synthese	4
1.2.2	DNA-Synthese	6
1.3	<b>Kupplungsreagenzien und Mechanismen in der Peptidsynthese</b>	<b>8</b>
1.3.1	DCC/HOBt-Kupplung	8
1.3.2	HBTU/HOBt/DIEA-Kupplung	10
1.4	<b>Reaktionen am DNA-Templat</b>	<b>11</b>
1.5	<b>Krebs und seine Behandlungsmöglichkeiten</b>	<b>14</b>
1.6	<b>ROS erzeugende Cytostatika</b>	<b>16</b>
1.7	<b>Mittels ROS aktivierbare Medikamente</b>	<b>17</b>
1.8	<b>Ferrocen in der Medizin</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>CU(II)-VERMITTELTEN DNA-NACHWEIS</b>	<b>20</b>
3.1	<b>Stand der Forschung</b>	<b>20</b>
3.2.	<b>Synthese</b>	<b>21</b>
3.2.1	Synthese von PNA 1	21
3.2.2	Synthese von PNA 2	22
3.3	<b>Nachweis von dsDNA</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>CU(I)-VERMITTELTEN DNA-NACHWEIS</b>	<b>26</b>

<b>4.1</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>26</b>
4.1.1	Fluorophore des 1,8-Naphtalimid-Typs	26
4.1.2	Kupfer(I)-katalysierte (2+3)-Huisgen-Cycloaddition	29
4.1.3	Projektansatz	30
<b>4.2</b>	<b>Synthese</b>	<b>31</b>
4.2.1	Synthese der 4-(Azidomethyl)benzoesäure	31
4.2.2	Synthese des 2-(2-aminoethyl)-4-acetyldo-naphtalimids	31
4.2.3	Synthese von Disuccinimidyladipat	32
4.2.4	Synthese von THPTA	33
4.2.5	Synthese der Azid-gelabelten DNA 1	35
4.2.6	Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2	36
<b>4.3</b>	<b>Vorversuche zur Untersuchung des Fluoreszenz-Verhaltens</b>	<b>37</b>
4.3.1	Einfluss von Natriumchlorid auf die Cycloaddition	37
4.3.2	Einfluss von THPTA auf die Cycloaddition	39
<b>4.4</b>	<b>Sequenzspezifische DNA-Detektion durch Click-Reaktion vermittelte Fluoreszenzzunahme</b>	<b>42</b>
4.4.1	Verwendete DNA-Sequenzen	42
4.4.2	Experimente ohne THPTA	44
4.4.3	Experimente mit THPTA	45
<b>5</b>	<b>CU(0)-VERMITTELTEN DNA-NACHWEIS</b>	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>Nachweis von dsDNA</b>	<b>50</b>
5.2.1	Verwendete DNA-Sequenzen	50
5.2.2	Bestimmung der optimalen Cu-Konzentration	51
5.2.3	DNA-Nachweis mit dem 10mer Probe / 22mer Target-System	52
5.2.4	DNA Nachweis an längeren DNA-Systemen	54
<b>6</b>	<b>FERROCENBASIERTE CYTOSTATIKA</b>	<b>57</b>
<b>6.1</b>	<b>Ansatz</b>	<b>57</b>

<b>6.2</b>	<b>Synthese</b>	<b>59</b>
<b>6.3</b>	<b>Vorversuche</b>	<b>60</b>
6.3.1	Zersetzung von Aminoferrocen in Gegenwart von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60
6.3.2	Untersuchung der ROS-Produktion in Gegenwart von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	63
<b>6.4</b>	<b>Zellversuche</b>	<b>65</b>
6.4.1	Untersuchung der Eisenfreisetzung in Zellen	65
6.4.2	Untersuchung der Zellkillaktivität	66
6.4.3	Untersuchung der Zellkillaktivität bei transduzierten Zelllinien	68
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>73</b>
<b>8.1</b>	<b>Chemikalien &amp; Geräte</b>	<b>73</b>
<b>8.2</b>	<b>Synthesen</b>	<b>75</b>
8.2.1	4-(Azidomethyl)benzoesäure V 1	75
8.2.2	(2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-tert-butylester V 2	76
8.2.3	Tert-butyl 2-(6-bromo-1,3-dioxo-1H-benzo[de] isoquinolin-2(3H)-yl)ethyl-carbamat V 3	77
8.2.4	Tert-butyl 2-(1,3-dioxo-6-((trimethylsilyl)ethynyl)-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)ethylcarbamat V 4	79
8.2.5	2-(1,3-dioxo-6-((trimethylsilyl)ethynyl)-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)ethan-ammoniumchlorid V5	81
8.2.6	2-(2-aminoethyl)-7-ethynyl-3a,6-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dion V 6	82
8.2.7	Disuccinimidyladipat V 7	84
8.2.8	3-Azido-1-propanol V 8	85
8.2.9	Tris((1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin V 9	86
8.2.10	4-(Hydroxymethyl)-phenylboronsäure-pinacolester V 10	88
8.2.11	Iodferrocen V 11	89
8.2.12	2-Ferrocenylisoindole-1,3-dione V 12	90
8.2.13	Aminoferrocen V 13	91
8.2.14	4-Ferrocenylcarbamatmethyl-Phenylboronsäure-Pinacolester V 14	92



<b>8.3</b>	<b>Nukleinsäuresynthesen</b>	<b>94</b>
8.3.1	Synthese von PNA 1	94
8.3.2	Synthese von PNA 2	96
8.3.3	Synthese der Azid-gelabelten DNA 1	99
8.3.4	Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2	102
<b>8.4</b>	<b>Experimentelle Vorschriften</b>	<b>104</b>
8.4.1	Cu(II)-vermittelte Spaltkinetiken	104
8.4.2	Untersuchung des Einflusses von NaCl auf die Click-Reaktion	104
8.4.3	Untersuchung des Einfluss von THPTA auf die Click Reaktion	104
8.4.4	Click-Reaktion am DNA-Templat ohne THPTA	105
8.4.5	Click-Reaktion am DNA-Templat mit THPTA	105
8.4.6	Optimierung der Cu-Konzentration für das Cu(0)-Assay	106
8.4.7	Untersuchung des 10mer Probe / 22mer Target Systems	107
8.4.8	Untersuchung längerer DNA-Sequenzen	107
8.4.9	Bipyridin-Assay zur Quantifizierung der Fe-Freisetzung	107
8.4.10	Quantifizierung der Radikalproduktion mittels DCFH-DA	108
8.4.11	Untersuchung der Fe-Freisetzung in Zellen	108
8.4.12	MTT-Assays	109
<b>8.5</b>	<b>Übersicht der synthetisierten Verbindungen</b>	<b>110</b>
8.5.1	Organische Moleküle	110
8.5.2	Nukleinsäuren	111
<b>9</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>112</b>

# Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1:** DNA-Doppelhelix.
- Abb. 1.2:** PNA-DNA-Duplex.
- Abb. 1.3:** Hoogsteen-Basenpaarungen.
- Abb. 1.4:** Festphase und Spacer.
- Abb. 1.5:** Verschiedene Kupplungsreagenzien.
- Abb. 3.1:** Sequenzen der eingesetzten ssDNAs.
- Abb. 3.2:** Cu(II)-Komplex katalysierte Hydrolyse von Ester-PNA 1 an einem dsDNA-Templat.
- Abb. 3.3:** MALDI-TOF Massenspektren von Edukt und Produkt der Esterspaltung am dsDNA-Templat (20 fmol, 2 x 118mer). Aufgenommen nach  $t = 0$  min (graue Linie) und  $t = 180$  min (schwarze Linie).
- Abb. 3.4:** Sequenzen der ssDNAs für die Sequenzspezifitätsexperimente.
- Abb. 4.1:** Fluorophor des 1,8-Naphthalimid-Typs.
- Abb. 4.2:** Erzeugung des ICT-Zustandes.
- Abb. 4.3:** Fluoreszenzverhalten von 1,8-Naphthalimiden in Abhängigkeit des Substituenten in Position 4 (links: keine bis geringfügige Fluoreszenz; rechts: starke Fluoreszenz).
- Abb. 4.4:** Tris((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin (**TBTA**).
- Abb. 4.5:** Einfluss von Natriumchlorid auf die Huisgen-Cycloaddition.
- Abb. 4.6:** Beschleunigung der Fluorophorbildung durch THPTA.
- Abb. 4.7:** Kinetikmessung mit THPTA bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen.
- Abb. 4.8:** Verlauf der Geschwindigkeit in Abhängigkeit vom Cu- & THPTA-Überschuss.
- Abb. 4.9:** Click-Reaktion mit 2  $\mu$ M DNAs ohne THPTA.
- Abb. 4.10:** MALDI-TOF MS-Spektrum des Ligationsprodukts  $C_{224}H_{285}N_{72}O_{125}P_{18}$
- Abb. 4.11:** Reaktion mit THPTA;  $c(\text{DNA}) = 2 \mu\text{M}$ .
- Abb. 4.12:** Reaktion mit THPTA;  $c(\text{DNA}) = 200 \text{ nM}$ .
- Abb. 4.13:** Fluoreszenzspektren bei  $T = 85^\circ \text{ C}$  und 200 nM DNA.
- Abb. 5.1:** Erzeugung metallierter DNA in Lösung nach Dickson [92].

- Abb. 5.2:** Zusätzlicher Peak bei 580 nm bei der Reduktion von Cu(II) zu Cu(0) in Gegenwart von DNA.
- Abb. 5.3:** Emission in Abhängigkeit von der Cu-Konzentration.  $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ .
- Abb. 5.4:** Scan des 10mer Probe / 22mer Target-Systems.  $c(\text{DNA}) = 100 \text{ nM}$ .
- Abb. 5.5:** Kinetik der Fluoreszenzzunahme des 10mer Probe / 22mer Target-Systems.
- Abb. 5.6:** Kinetik der Fluoreszenzzunahme des 22mer Probe / 32mer Target-Systems.
- Abb. 5.7:** Mismatchmessung des 22mer Probe / 32mer Target-Systems.
- Abb. 5.8:** Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der DNA-Länge.
- Abb. 6.1:** Postulierter Wirkmechanismus des zu entwickelnden Cytostatikums.
- Abb. 6.2:** Ergebnisse des 2,2'-Bipyridin-Assays.
- Abb. 6.3:** ROS-Produktion in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und einer Eisenquelle.
- Abb. 6.4:** Relative Konzentration an chelatisiertem Eisen in Zellen.
- Abb. 6.5:** Ergebnisse des MTT-Assays für SKOV3-Zelllinien.
- Abb. 6.6:** Ergebnisse des MTT-Assays für Katalase-tranduzierte SKOV3-Zelllinien.
- Abb. 6.7:** Ergebnisse des MTT-Assays für MnSODi-tranduzierte SKOV3-Zelllinien.
- Abb. 8.1:** Kristallstruktur von **V 14**.
- Abb. 8.2:** Übersicht über die synthetisierten organischen Moleküle.
- Abb. 8.3:** Übersicht über die synthetisierten Nukleinsäuren.
- Schema 1.1:** Verlauf der Merrifield-Synthese.
- Schema 1.2:** Festphasensynthese eines DNA-Stranges.
- Schema 1.3:** Darstellung der Phosphitkomponente.
- Schema 1.4:** DCC/HOBt-Kupplung.
- Schema 1.5:** HBTU/HOBt/DIEA-Kupplung.
- Schema 1.6:** DNA-Templat-vermittelte Übergangsmetallkatalyse.
- Schema 1.7:** DNA-Templat vermittelte Ligation via Metallkomplex-Templatsynthese.
- Schema 1.8:** Templat-vermittelte Photoligation von ODNs.
- Schema 1.9:** DNA-Templat vermittelte Azid-Alkin-Cycloadditionsligation.
- Schema 1.10:** Wirkmechanismus von NO-ASA.

- Schema 1.11:** Wirkmechanismus von Ferrocifenen.
- Schema 3.1:** Synthese von PNA 1.
- Schema 3.2:** Synthese von PNA 2.
- Schema 4.1:** Entstehung des TICT Zustands bei Anregung eines Triazol-substituierten 1,8-Naphthalimids.
- Schema 4.2:** Postulierter Mechanismus der Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition.
- Schema 4.3:** Ansatz für den Cu(I)-vermittelten DNA-Nachweis.
- Schema 4.4:** Synthese von 4-(Azidomethyl)benzoesäure.
- Schema 4.5:** Synthese des 2-(2-aminoethyl)-4-acetylido-naphthalimids.
- Schema 4.6:** Synthese von Disuccinimidyladipat.
- Schema 4.7:** Synthese von THPTA.
- Schema 4.8:** Unterschiedliche Methoden zur Synthese der Azid-gelabelten DNA 1.
- Schema 4.9:** Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2.
- Schema 4.10:** Generierung der fluoreszierenden Komponente via Click-Reaktion.
- Schema 6.1:** Fe-katalysierte Generierung von ROS.
- Schema 6.2:** Mechanismus der FcBoron-Zersetzung.
- Schema 6.3:** Synthese von FcBoron V 14.
- Schema 6.4:** Postulierter Mechanismus der Fe(II)-Freisetzung.
- Schema 6.5:** Colorimetrisches 2,2'-Bipyridin-Assay zur Bestimmung der Fe(II)-Freisetzung.
- Schema 6.6:** Bildung des Fluoreszenzfarbstoffs DCFH durch ROS.
- Schema 6.7:** *in vivo*-Reduktion von MTT zu blau-violetten Formazan.
- Schema 8.1:** Synthese von PNA 1.
- Schema 8.2:** Synthese von PNA 2.
- Schema 8.3:** Synthese der Azid-gelabelten DNA 1.
- Schema 8.4:** Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2.
- Tabelle 5.1:** Verwendete DNA-Sequenzen.

# Abkürzungsverzeichnis

Alloc	Allyloxycarbonyl
Äq.	Äquivalent
Bipy	2,2'-Bipyridin
DCM	Dichlormethan (Methylenchlorid)
DFCH	Dichlorofluorescein
DCFH-DA	Diacetyl-Dichlorofluorescein
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Disuccinimidyladipat
EDAC	Ethyl-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDG	Elektronenschiebende Gruppe
EWG	Elektronenziehende Gruppe
FcAc	Acetyliertes Aminoferrocen
FMoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmol	Femtomol
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Dimer
HBTU	O-Benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium- hexafluorophosphat
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICT	Internal Charge Transfer

M	Molar
M <sup>+</sup>	Molekülionenpeak
MALDI-TOF-LRMS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight – Low Resolution Mass Spectrometry
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMT	Monomethoxytrityl
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbomid
MOPS	3-(Morpholin-4-yl)-propan-1-sulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NaAsc.	Natriumascorbat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
Ph	Phenyl
PNA	Peptidnukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
TCA	Trichloressigsäure
TICT	Twisted Internal Charge Transfer

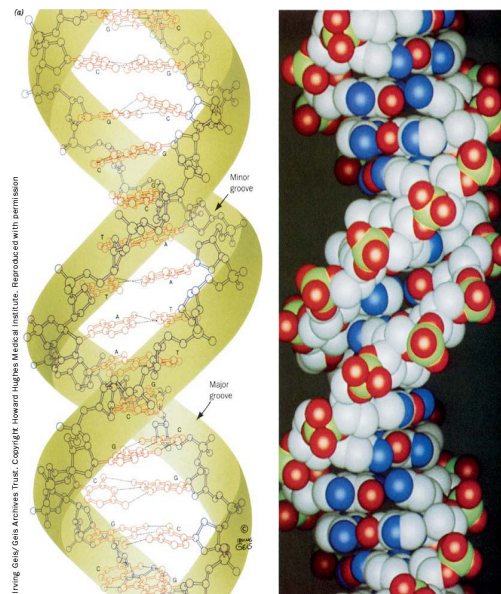
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar

# 1 Einleitung

## 1.1 DNA und PNA

### 1.1.1 Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)

In der DNA ist die genetische Information aller Lebewesen gespeichert. Sie kodiert den Aufbau von Proteinen. Die Aufklärung der Struktur der DNA durch Watson und Crick im Jahre 1953 wird oft als Geburt der modernen Biochemie bezeichnet.<sup>[1]</sup> DNA besteht aus zwei antiparallelen Strängen, die eine Doppelhelix bilden (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** DNA-Doppelhelix.

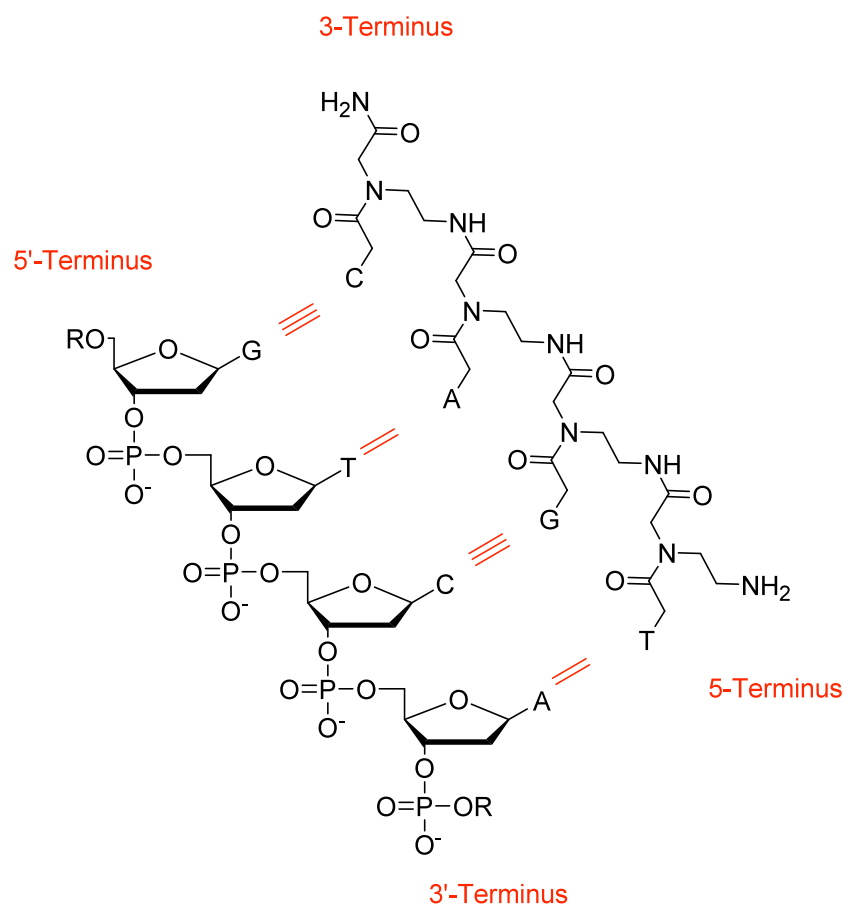
Ein Einzelstrang ist aus Nukleotid-Bausteinen aufgebaut. Ein Nukleotid besteht aus einer 2'-Desoxyribose, einer Purinbase, Adenin (A) oder Guanin (G), bzw. einer Pyrimidinbase, Thymin (T) oder Cytosin (C), und einer Phosphatgruppe. Die Nukleotide sind über Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Hydroxy- und 3'-Hydroxygruppen der 2'-Desoxyriboseeinheit miteinander verbunden. Die Zuckerphosphate bilden das Rückgrat der DNA. Die Basen zeigen in das Innere der Helix. Die Basensequenz des einen Strangs bestimmt die Sequenz des anderen. Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen der beiden Stränge entsteht die Doppelhelix. Dabei ist Adenin immer an Thymin und



Guanin immer an Cytosin gebunden (Watson-Crick-Basenpaarung<sup>[2]</sup>). Die Abfolge der Basen codiert die einzelnen Gene.

### 1.1.2 Die Peptidnukleinsäure (PNA)

PNA ist ein DNA-Analogon und wurde 1991 von Nielsen et al.<sup>[3]</sup> erstmals beschrieben. PNA besitzt im Gegensatz zum Desoxyribose-Phosphodiester-Rückgrat der DNA ein Pseudopeptidrückgrat, mit dem die Basen über Methylene-Carbonyl-Bindungen verbunden sind (Abb. 1.2).



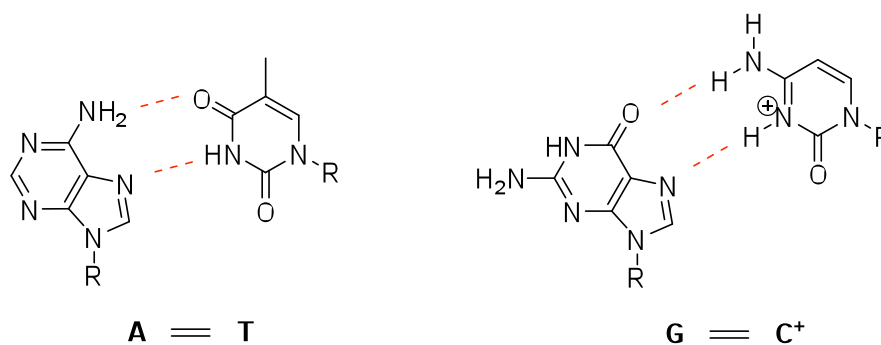
**Abb. 1.2:** PNA-DNA-Duplex.

Ein Vorteil der PNA gegenüber DNA ist ihre Säurestabilität. Dies ermöglicht die Synthese von PNA mit Hilfe gewöhnlicher Schutzgruppen aus der Peptidchemie, die eine Abspaltung mit Trifluoressigsäure erfordern. Außerdem sind PNA/DNA-Duplices bei niedrigen Salzkonzentrationen stabiler als die entsprechenden DNA/DNA-Duplices. Ein besonderer Vorteil von PNA gegenüber DNA ist ihre stärkere Affinität

zu DNA in Kombination mit einer höheren Sequenzspezifität, sowie die schnelle Assoziation / Dissoziation der PNA/DNA-Doppelhelix.

PNA kann sowohl PNA/DNA-Duplices als auch (PNA)<sub>2</sub>/DNA-Triplices bilden. [4],[5]

(PNA)<sub>2</sub>/DNA-Triplices kommen dadurch zustande, dass ein PNA-Strang mittels Watson-Crick Basenpaarung an die DNA bindet, wohingegen der andere PNA-Strang mittels Hoogsteen-Basenpaarung an denselben DNA-Strang bindet. Hoogsteen-Basenpaarung kann zwischen Adenin und Thymin, sowie zwischen Guanin und protoniertem Cytosin auftreten (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3:** Hoogsteen-Basenpaarungen.

Ein Nachteil ist die im Vergleich zur DNA schlechtere Wasserlöslichkeit der PNA. Durch Modifikation der PNA mit geladenen Gruppen, wie beispielsweise Lysin, lässt sich dieses Problem jedoch elegant lösen. [6]

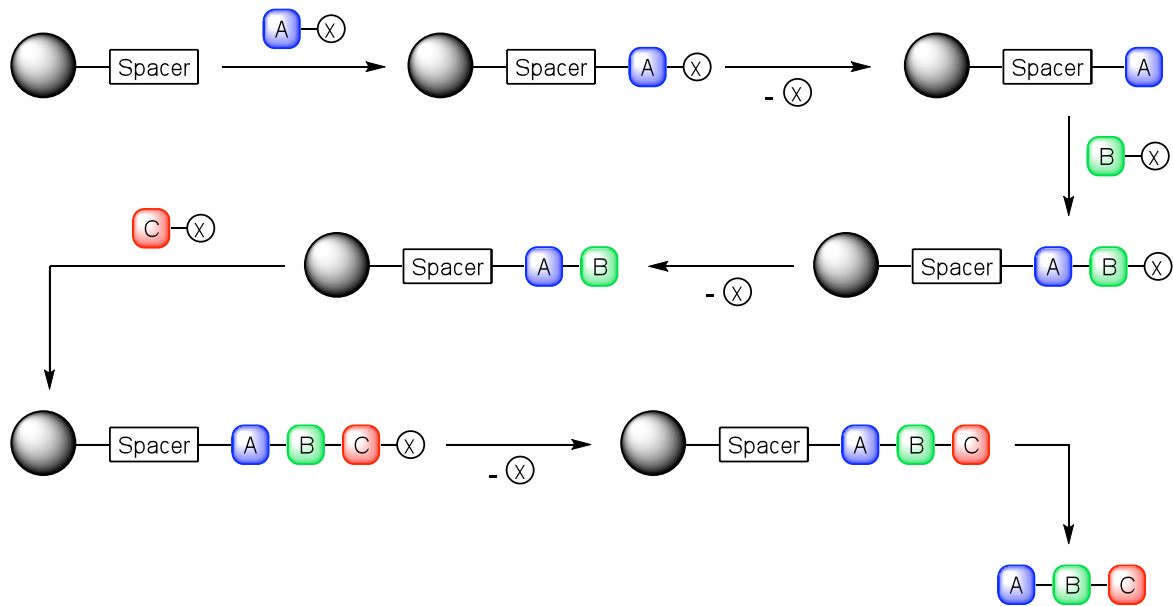
## 1.2 Festphasensynthesen

### 1.2.1 Merrifield-Synthese

Um die Jahrhundertwende gelang es Emil Fischer als erstem Chemiker ein Peptid aus zwei Aminosäuren zu synthetisieren.<sup>[7]</sup> Bei Verwendung zweier unterschiedlicher Aminosäuren bestand jedoch das Problem, dass oft schwer trennbare Gemische entstanden. Erst Fischers Schüler Max Bergmann entwickelte nach dessen Tod eine Methode, mit der man die Aminofunktion der Aminosäuren reversibel blockieren konnte.<sup>[8]</sup> Mit der Entdeckung, dass der Benzyloxycarbonylrest als hervorragende Schutzgruppe für die Aminofunktion genutzt werden kann, leitete er eine neue Ära auf dem Gebiet der Peptidsynthese ein. Von nun an konnten Peptide schrittweise durch alternierende Schützungs- und Entschützungsreaktionen in Lösung dargestellt werden. Diese Strategie war zwar sehr erfolgreich, die arbeitsaufwendigen Reinigungsschritte kosteten jedoch viel Zeit und führten zu großen Verlusten und damit schlechten Ausbeuten.

Im Jahre 1963 revolutionierte schließlich R. B. Merrifield mit seiner Festphasensynthese (Solid Phase Peptide Synthesis) die Peptidchemie.<sup>[9]</sup> Seiner Methode lag die Idee zugrunde, ein Ende des Peptids kovalent an einem unlöslichen Träger zu verankern und dieses dann schrittweise aufzubauen. Durch diese Verankerung ist die wachsende Kette unlöslich und erlaubt dadurch deutlich schnelleres Filtrieren und Waschen. So werden nach jedem Syntheseschritt die überschüssigen Reagenzien und Nebenprodukte entfernt, ohne daß auf die sonst übliche, oft langwierige Kristallisation zur Reinigung zurückgegriffen werden muss.<sup>[10]</sup>

Das Prinzip der Merrifield'schen Festphasensynthese ist in Schema 1.1 dargestellt. Das erste Monomer A, welches an einer der beiden reaktiven Enden geschützt ist, wird über eine kovalente Bindung am Silikat-Träger verankert. Nach Entfernung der Schutzgruppe wird das zweite, ebenfalls einfach geschützte Monomer B, durch eine geeignete Reaktion an das Monomer A angekoppelt. So ist es möglich, Schritt für Schritt die gewünschte Peptidsequenz aufzubauen. Ist die gewünschte Kettenlänge erreicht, wird die Bindung zwischen Polymer und Träger selektiv gespalten.<sup>[10]</sup>



**Schema 1.1:** Verlauf der Merrifield-Synthese.

Bereits wenige Jahre nach Veröffentlichung seiner Methode gelang Merrifield die Automatisierung, und er konnte das Enzym Ribonuklease A, welches aus 124 Aminosäuren aufgebaut ist, synthetisieren.<sup>[11]</sup>

Die Vorteile der Merrifield-Synthese sind vielfältig; zum einen wird eine vielstufige Reaktion vereinfacht und beschleunigt, da alle Reaktionen in einem einzigen Reaktionsgefäß ablaufen können. Damit werden auch Verluste durch wiederholtes Transferieren der Reagenzien oder durch umständliche Isolierung und Reinigung von Zwischenstufen vermieden. Zum anderen können hohe Ausbeuten erzielt werden, da alle Reagenzien im Überschuss eingesetzt werden und so die Reaktionen nahezu quantitativ ablaufen. Ein weiterer Vorteil bietet der Einsatz von Trägern mit geringer Beladung; so können Nebenreaktionen zwischen immobilisierten Produkten, wie z.B. Vernetzung und Mehrfachkupplung, unterdrückt werden.<sup>[10], [12]</sup>

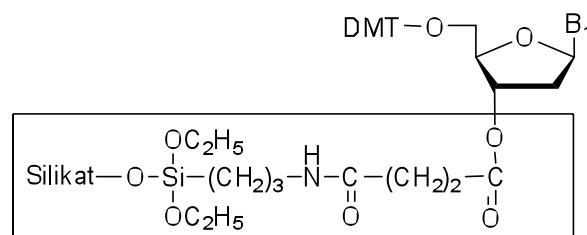
## 1.2.2 DNA-Synthese

Obwohl die von Merrifield entwickelte Festphasensynthese für Polypeptide entwickelt wurde, kann die Synthese auch mit anderen Monomereinheiten durchgeführt werden, u.a. mit Nukleotiden für die DNA-Synthese.

Für die DNA-Synthese gibt es im Allgemeinen zwei Verfahren: zum einen das Phosphorsäuretriester- und zum anderen das Phosphitriesterverfahren, wobei sich letzteres durchgesetzt hat.

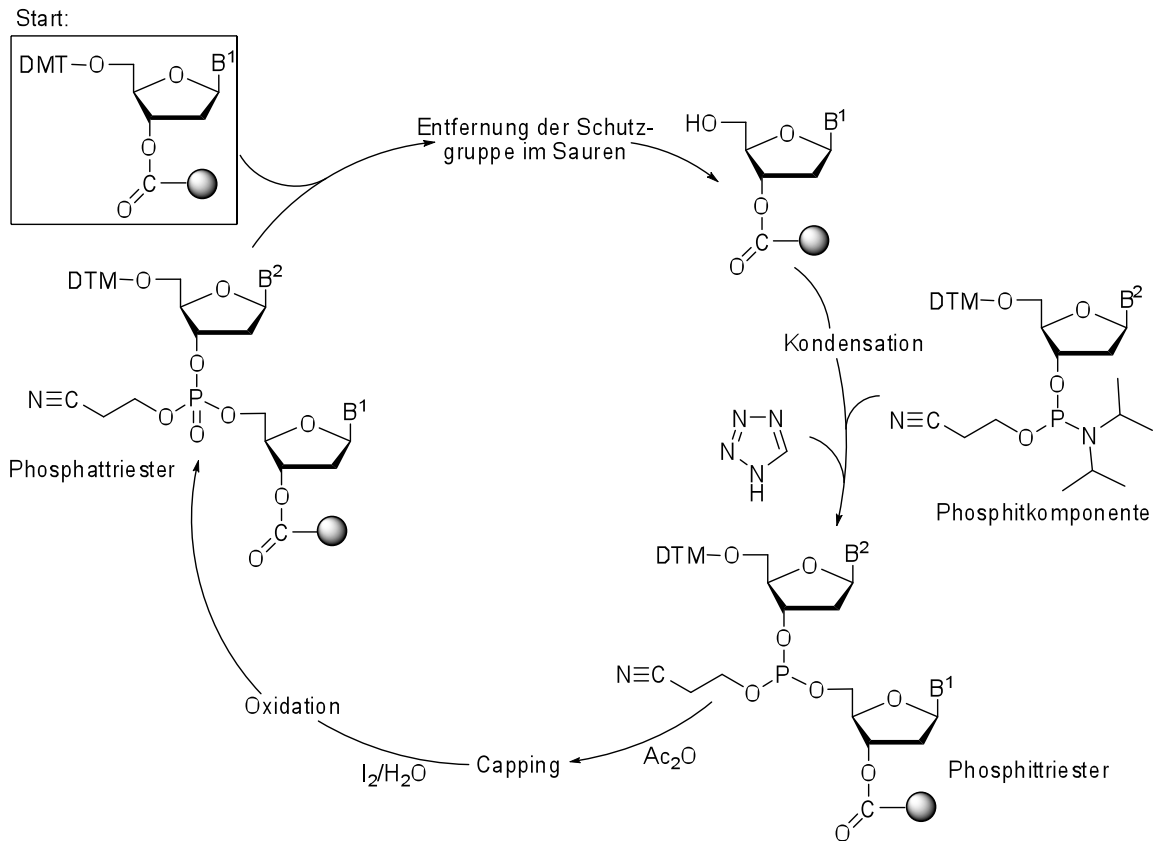
Das Phosphitriesterverfahren wurde 1976 von Letsinger eingeführt.<sup>[13]</sup> Er nutze dabei die Reaktivität von Phosphiten aus, um die Kondensationszeit merklich zu reduzieren und so längere Ketten in kürzerer Zeit aufbauen zu können. Die Kupplung erfordert nur Minuten, wohingegen dies beim Phosphorsäuretriesterverfahren mehrere Stunden in Anspruch nahm.<sup>[14]</sup>

Der Synthesecyclus beginnt mit der Entschützung des ersten Desoxynukleosids, das an der Festphase über einen Spacer kovalent verankert ist (Abb. 1.4).



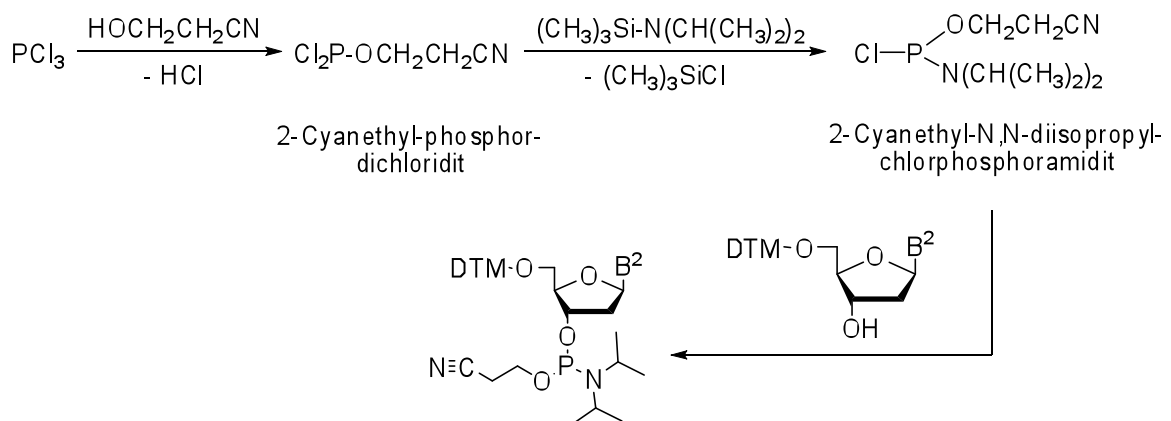
**Abb. 1.4:** Festphase und Spacer (eingerahmt).

Wie Schema 1.2 zeigt, kondensiert an das nun ungeschützte 5'-Ende des Nukleotids die Phosphitkomponente und die DNA-Sequenz verlängert sich um eine Base. Die Phosphitkomponente wird durch ein Tetrazol als Protonendonator aktiviert, so daß die Reaktion mit einer Ausbeute von über 98% verlaufen kann. Um nicht umgesetztes Edukt an der Weiterreaktion zu hindern, wird es mit Hilfe von Acetanhydrid acetyliert. Diese Prozedur wird als Capping bezeichnet und jedem Kondensationsschritt nachgeschaltet. So kann die Bildung von ungewünschten Nebenprodukten minimiert werden. Als letzter Schritt folgt nun die milde Oxidation des bei der Kondensation entstandenen Phosphittriesters mit einem Iod-Wasser-Gemisch zum entsprechenden Phosphattriester. Mit der Entfernung dessen Schutzgruppe beginnt der Cyclus erneut.



**Schema 1.2:** Festphasensynthese eines DNA-Stranges.

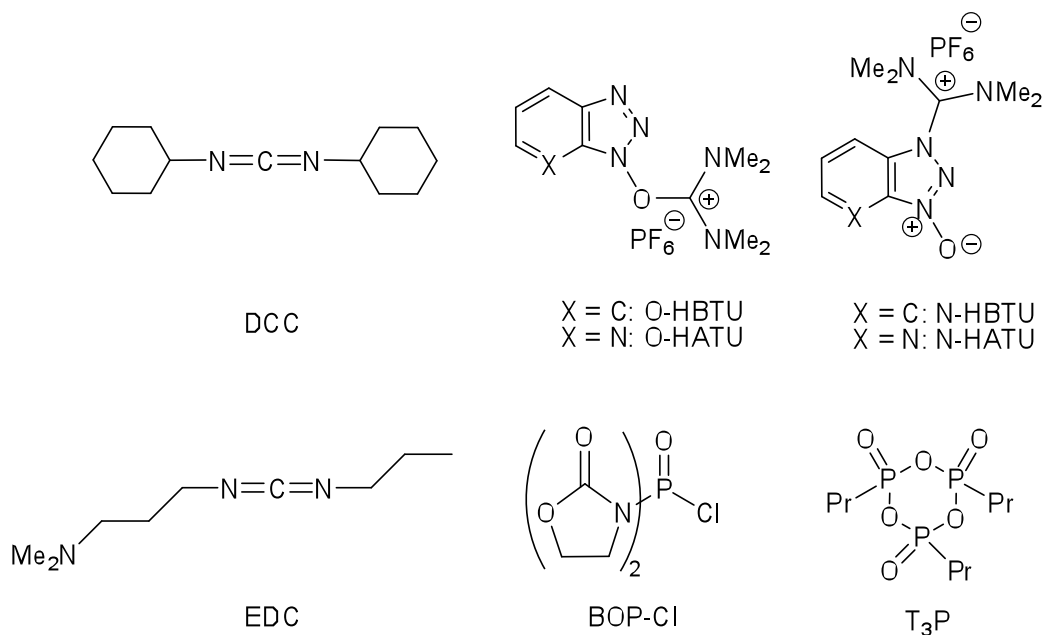
Die Phosphitkomponente, die zur Kondensation genutzt wird, generiert man aus dem jeweiligen DMT- oder MMT-geschützten Desoxynucleosid durch Umsetzung mit Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (Schema 1.3).<sup>[14], [15]</sup>



**Schema 1.3:** Darstellung der Phosphitkomponente.

## 1.3 Kupplungsreagenzien und Mechanismen in der Peptidsynthese

In der Peptidchemie wird nur selten ein stabiles aktiviertes Carbonsäurederivat eingesetzt. Meist wird die an der Aminogruppe geschützte Aminosäure direkt *in situ* vor der Kupplung aktiviert. Dafür werden u.a. die in Abbildung 1.5 aufgeführten Reagenzien verwendet.

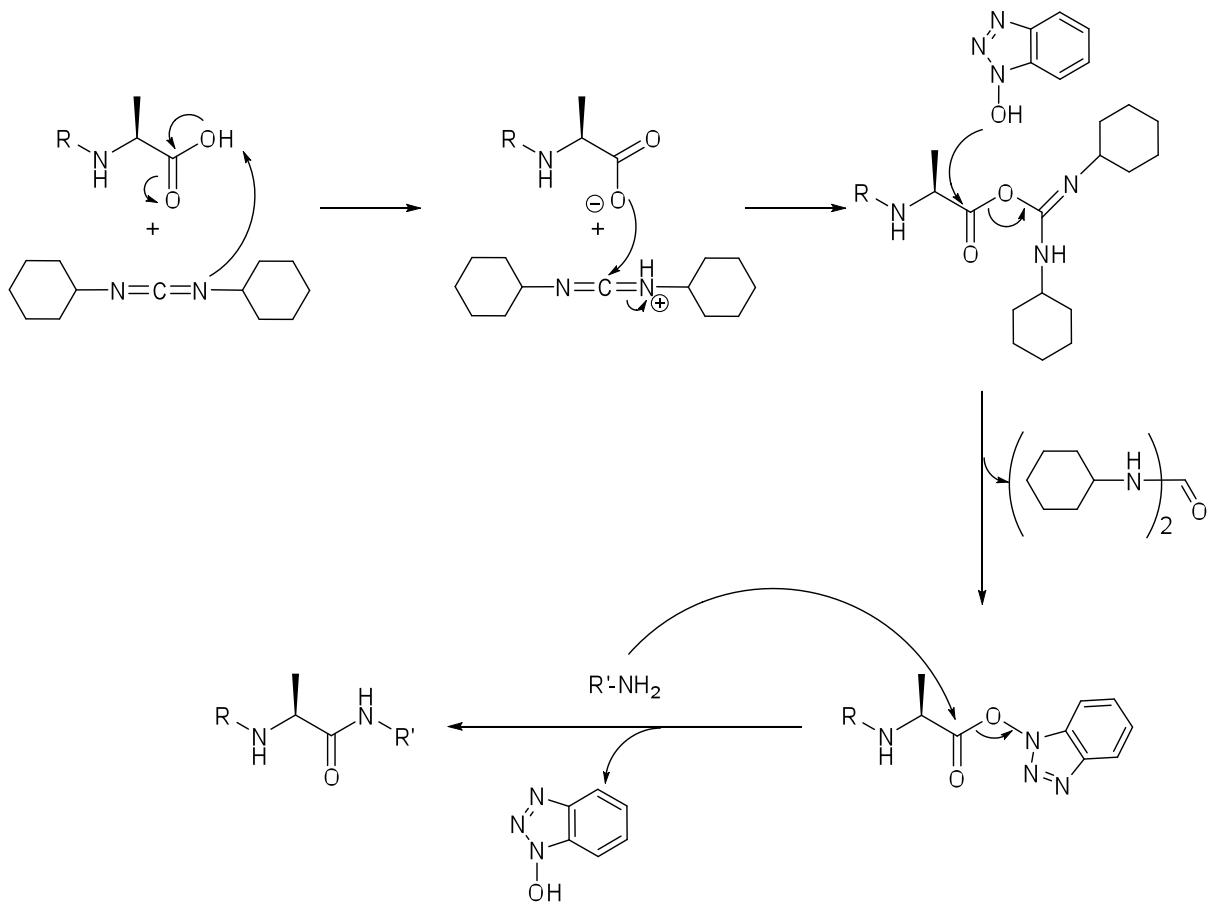


**Abb. 1.5:** Verschiedene Kupplungsreagenzien.

### 1.3.1 DCC/HOBt-Kupplung

Eine der ältesten Kupplungsreaktionen greift auf ein Gemisch aus *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zurück. Die Reaktion besteht aus der Aktivierung und der eigentlichen Kupplung. Wie der Mechanismus in Schema 1.4 zeigt, aktiviert das DCC die Carbonsäure unter Bildung eines sehr reaktiven Acylisoharnstoffs. Dieser reagiert mit dem HOBt zu einem Ester, der ebenfalls eine beachtliche Reaktivität aufweist. Der Ester bildet anschließend mit einer zweiten Aminosäure, deren Aminogruppe ungeschützt ist, ein Dipeptid. Eine

direkte Umsetzung des Acylisoharnstoffs würde aufgrund der hohen Reaktivität zur Racemisierung führen.

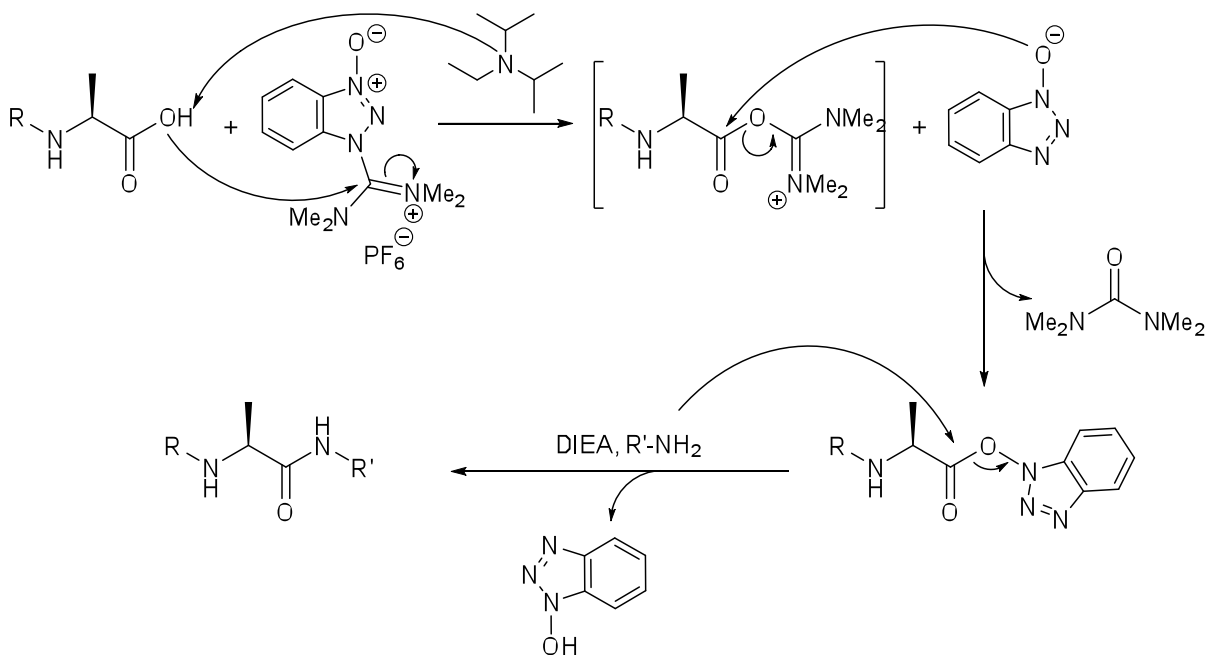


**Schema 1.4:** DCC/HOBt-Kupplung.



### 1.3.2 HBTU/HOBt/DIEA-Kupplung

Die HBTU/HOBt/DIEA-Kupplung funktioniert ähnlich wie die DCC/HOBt-Kupplung. Wie Schema 1.5 zeigt, deprotoniert das *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA) die am Stickstoffatom geschützte Aminosäure. Diese greift dann das (Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) unter Bildung von deprotoniertem HOBt an. Das DIEA generiert somit immer wieder frisches HOBt aus HBTU. Gleichzeitig entsteht, wie bei der DCC/HOBt-Kupplung, ein sehr reaktives Isoharnstoffderivat. Durch den Angriff des HOBts spaltet sich Tetramethylharnstoff ab, und es bildet sich wiederum ein reaktiver Ester. Mit einer zweiten Aminosäure, die durch das vorhandene DIEA deprotoniert wird, kommt es anschließend zur Kopplung zum entsprechenden Dipeptid.<sup>[16]</sup>

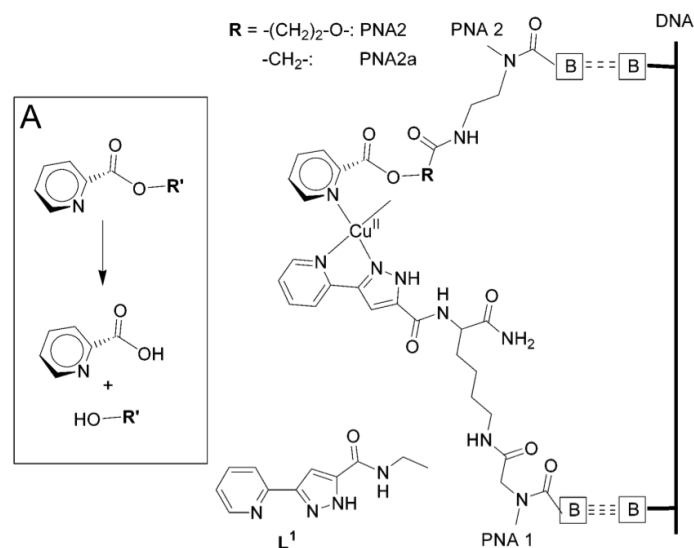


**Schema 1.5:** HBTU/HOBt/DIEA-Kupplung.

## 1.4 Reaktionen am DNA-Templat

DNA-Templates können durch Präorganisation von Reaktionspartnern deren Umsetzung beschleunigen, indem die Reaktanten in räumliche Nähe zueinander gebracht werden.

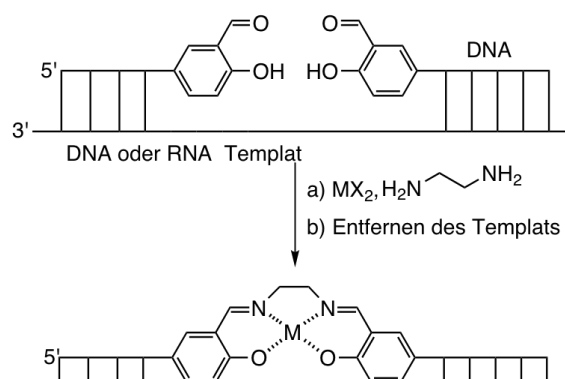
Ein Beispiel ist die erste, literaturbekannte, durch ein DNA-Templat vermittelte, Übergangsmetallkatalyse.<sup>[17]</sup>



**Schema 1.6:** DNA-Templat-vermittelte Übergangsmetallkatalyse.

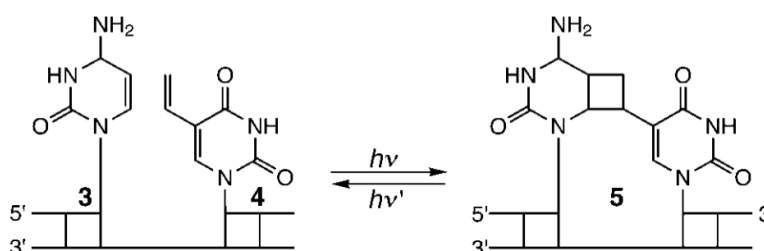
Wie aus Schema 1.6 ersichtlich, wurde hierbei das katalytische Metallzentrum mit Hilfe eines Liganden an einen PNA-Strang gebunden. Das Substrat wurde für die Umsetzung an einen weiteren PNA-Strang gekoppelt. Durch Hybridisierung an das komplementäre DNA-Templat konnte die Cu(II)-katalysierte Esterspaltung stattfinden. Dabei kann es zu keiner Produktinhibierung, wodurch das DNA-Templat katalytisch agieren konnte. Weitere Untersuchungen hatten zudem gezeigt, dass bereits eine einzige Basenvariation der Templat-Sequenz zu einem deutlichen Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit der Esterspaltung führte.<sup>[18]</sup>

Die Ligation von DNA-Nukleotiden ist bisher das am häufigsten anzutreffende Beispiel für DNA-Templat-vermittelte Transformationen in der jüngeren Literatur.<sup>[19]</sup> Dabei kann die kovalente Verknüpfung der Oligonukleotide über verschiedene Reaktionsarten hergestellt werden. Schema 1.7 zeigt die Ligation zweier DNA-Sequenzen mit einer klassischen Übergangsmetallkomplex-Templatsynthese.



**Schema 1.7:** DNA-Templat vermittelte Ligation via Metallkomplex-Templatsynthese.

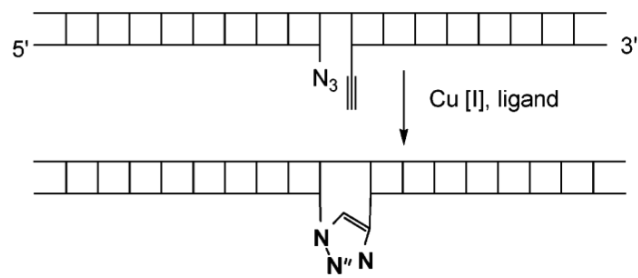
Die beiden Oligodesoxyribonukleotide sind hierbei durch koordinationsfähige Einheiten modifiziert, welche durch das DNA-Templat in direkter Nachbarschaft präorganisiert werden. So kann die Kondensationsreaktion wesentlich schneller stattfinden. Eine weitere Ligationmöglichkeit umfasst die photoinduzierte reversible [2+2]-Cycloaddition zweier mit Olefingruppen modifizierter Pyrimidin-Nukleinbasen aus Schema 1.8. Auch hierbei veranlasst ein DNA-Templat die Präorganisation der komplementären DNA-Sequenzen und UV-Strahlung initiiert anschließend die Photocyclisierung. Das selektive Lösen der Ligation mittels energetisch größerer UV-Strahlung ist hier ebenfalls möglich.



**Schema 1.8:** Templat-vermittelte Photoligation von ODNs.

Ein weiteres Beispiel ist die DNA-Templat vermittelte Ligation mittels einer Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition.<sup>[20]</sup> Hierbei werden die endständigen Nucleoside am Phosphatrest mit jeweils einer Azid- bzw. Alkin-Gruppe modifiziert

und anschließend mit Hilfe einer Cu(I)-Quelle zu einem Triazol verknüpft (Schema 1.9).



**Schema 1.9:** DNA-Templat vermittelte Azid-Alkin-Cycloadditionsligation.

## 1.5 Krebs und seine Behandlungsmöglichkeiten

Krebs ist eine Krankheit, die anhand genetischer Abnormalitäten innerhalb der Zelle auftreten kann. Laut der WHO starben in Deutschland im Jahre 2005 224.000 Menschen an Krebs; 94.000 dieser Menschen waren zu diesem Zeitpunkt jünger als 70 Jahre. Nur ein geringer Anteil aller Krebsarten ist heilbar. Beispielsweise liegt die 1- bzw. 5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Prostatakrebs bei 24 bzw. 5 %.<sup>[21]</sup> Eine der erfolgreichsten Methoden zur Bekämpfung von Krebsleiden ist die Chemotherapie, welche häufig in Kombination mit Operation und Bestrahlung angewandt wird. Cytotoxische Chemikalien greifen vor allem sich schnell teilende Zellen an. Die Zellspezifität ist hierbei jedoch gering. Aus diesem Grunde werden vor allem gesunde Gewebearten mit einer hohen Regenerierungsrate (z.B. Darmgewebe) oder aber Zellen mit einer hohen Zellteilungsrate (z.B. Immunsystemzellen) durch den Einsatz von Cytostatika besonders stark in Mitleidenschaft gezogen. Einige führende Beispiele wichtiger Cytostatika sind Pt(II)-Komplexe (z.B. Cisplatin, Oxaliplatin<sup>[22]</sup>) und deren Nukleosid-Analoga (z.B. 5-Fluorouracil<sup>[23]</sup>).

Die Erhöhung der Selektivität der Cytostatika ist daher eine wichtige Herausforderung der Antikrebs-Forschung. Idealerweise sollte das eingesetzte Medikament toxisch gegenüber Krebszellen, jedoch vollkommen untoxisch gegenüber gesunden Zellen sein. Momentan existieren drei verschiedene therapeutische Ansätze.

Der erste Ansatz behandelt die Identifikation und gezielte Therapie krebszellspezifischer Zielmoleküle. Ein Beispiel eines krebszellspezifischen Cytostatikums ist Gleevec, welches Anwendung in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) findet. Die Ursache der CML liegt darin begründet, dass eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 stattgefunden hat. Die jeweiligen Bruchstellen liegen in den Bereichen von Genen (ABL bzw. BCR), was zur Bildung eines Fusions-Onkogens BCR-ABL führt. Das ABL-Gen kodiert für eine Tyrosinkinase und ist damit für die Kontrolle des Wachstums zuständig. Die Bildung des Fusionsgens bewirkt letztlich, dass die Tyrosinaseaktivität dauerhaft erhöht ist, was zu unkontrolliertem Zellwachstum führt. Gleevec inhibiert spezifisch dieses Enzym.<sup>[24]</sup>

Jedoch liegen in Krebszellen meist mehrere genetische Veränderungen vor, so dass die Inhibierung eines einzigen Proteins meist nicht ausreicht, die Zelle zu töten.<sup>[25], [26]</sup> Außerdem sind Krebszellen in der Lage, zu mutieren oder das Zielmolekül überzuexprimieren. Dies führt letztlich zur Resistenz der Tumorzelle gegenüber dem Cytostatikum.

Der zweite Ansatz sieht eine spezifische Anreicherung des Cytostatikums im Tumorgewebe vor. Um dies zu ermöglichen, können Cytostatika entweder an Polymere gebunden werden, welche anhand des erhöhten Permeabilitäts- und Retentions-Effekts (EPR)<sup>[27], [28]</sup> in Tumorzellen angereichert werden, oder sie werden an Rezeptormoleküle gekoppelt, welche an krebszellspezifische Proteine ankoppeln können. Hier sind vor allem monoklonale Antikörper und Östrogen-Mimetika zu erwähnen.<sup>[29], [30]</sup> Jedoch hat jedes dieser Transportmoleküle Nebenwirkungen: Polymere und Antikörper wirken immunogen und verfügen über eine ihnen innewohnende Toxizität. Einige sind innerhalb von Zellen instabil und können die Zellwand nur schlecht passieren. Östrogen-Mimetika sind nicht in der Lage, Hormon-unabhängige Tumortypen zu erkennen. Außerdem können Tumoren leicht Resistenzen gegenüber diesen Reagenzien entwickeln.<sup>[31], [32]</sup>

Der dritte Ansatz zielt darauf ab, Pro-Pharmakons zu verwenden, welche an sich völlig untoxisch sind, jedoch unter den speziellen chemischen Bedingungen, welche nur in einer Tumorzelle herrschen, aktiviert werden. So ist beispielsweise der pH-Wert innerhalb der Tumorzelle niedriger als in einer normalen Zelle. Auch kann die Konzentration bestimmter Proteasen in Tumorzellen erhöht sein. Auf dieser Basis wurden bereits Photosensitizer entwickelt, welche nur bei geringem pH-Wert<sup>[33]</sup> oder erhöhter Caspase-3 Konzentration<sup>[34]</sup> aktiv sind.

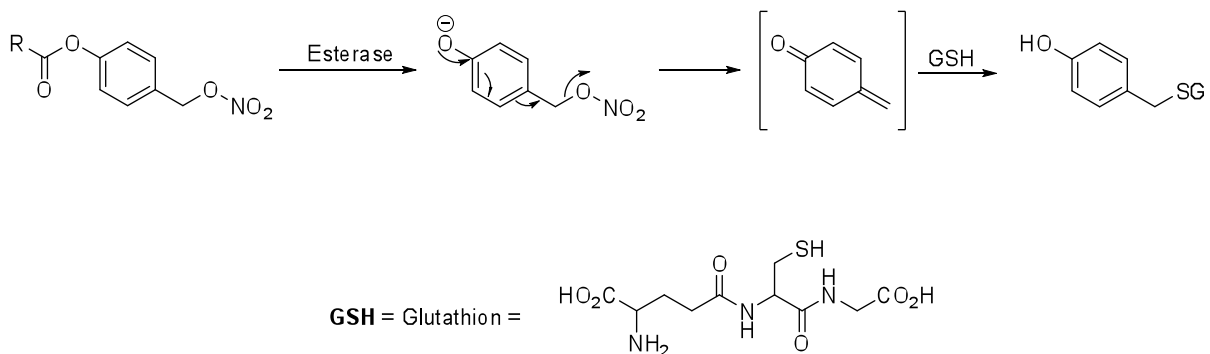
Manssour et al. haben ein krebspezifisches Doxorubicinderivat entwickelt, welches durch MMP-2 aktiviert wird. Dieses Enzym wird speziell in Melanomen überexprimiert.<sup>[35]</sup>

Die meisten Krebsarten zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie erhöhte Level an Reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygene spezies* ROS) aufweisen. Unter ROS versteht man Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$ , Superoxid-anionradikale  $\text{O}_2^-$ , Hydroxylradikale  $\text{HO}^\cdot$  und Wasserstoffperoxid  $\text{H}_2\text{O}_2$ . ROS

unterstützt die Krebszelle dahingehend, dass verstärktes Wachstum und Proliferation gefördert werden und zudem die genetische Stabilität der Zelle drastisch reduziert wird.<sup>[36], [37], [38]</sup> Da diese biochemischen Veränderungen allen Krebszellen gemein ist, hätte ein Cytostatikum, welches bei diesen Konditionen aktiviert wird, eine große therapeutische Bandbreite.<sup>[39]</sup>

## 1.6 ROS erzeugende Cytostatika

ROS sind hochtoxisch und können zu Apoptose und Zellnekrose führen. Da Krebszellen bereits über einen erhöhten ROS-Level verfügen, sind sie anfälliger gegenüber oxidativem Stress. Werden beispielsweise eine Krebszelle und eine gesunde Zelle mit einer exogenen Komponente behandelt, welche ROS generiert, so stirbt die Tumorzelle zuerst. Beispiele für solche Komponenten sind Arsentrioxid<sup>[40]</sup>, Buthionin-Sulfoximin<sup>[41], [42]</sup>, Procarbazin<sup>[42]</sup>,  $\beta$ -Phenylethylisothiocyanat<sup>[43]</sup>, NO-ASA<sup>[44]</sup> und Motexafin-Gadolinium<sup>[42], [45]</sup>. Der Wirkmechanismus eines Vertreters der aufgeführten Cytostatika, NO-ASA, ist in Schema 1.10 gezeigt.



**Schema 1.10:** Wirkmechanismus von NO-ASA.

NO-ASA wird innerhalb der Zelle von einer Esterase aktiviert, wobei in Folge einer Umlagerungsreaktion ein Chinonmethid-Molekül entsteht. Dies ist ein sehr starkes Nukleophil und kann mit Elektrophilen, wie beispielsweise Glutathion, irreversibel reagieren. Somit wird der intrazelluläre Glutathion-Pool reduziert. Da das Glutathion jedoch für den Schutz der Zelle gegenüber ROS zuständig ist, steigt in Folge der NO-ASA Gabe die ROS-Konzentration innerhalb der Zelle immer weiter an, was letztlich den Tod der Zelle zur Folge hat.

Die unspezifische Erhöhung der ROS-Konzentration kann jedoch zu ernststen Nebenwirkungen führen. Trotz der Tatsache, dass sie zum Tod der Krebszellen führen kann, wird parallel die ROS-Konzentration innerhalb gesunder Zellen erhöht. Dies kann wiederum zur Transformation der gesunden Zellen führen und somit die Bildung von Sekundärtumoren in Folge der Chemotherapie ermöglichen.<sup>[46], [47]</sup>

## 1.7 Mittels ROS aktivierbare Medikamente

2006 berichtete die Arbeitsgruppe um K.J. Franz, dass es möglich ist, ein Pro-Pharmakon mittels ROS in die eigentlich wirksame Komponente umzuwandeln.<sup>[48]</sup> In der beschriebenen Publikation wird ein Prochelator durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einen Fe(II)-bindenden Liganden umgewandelt, was vor allem der Behandlung neurodegenerativer Krankheiten dienlich sein soll. Ein vergleichbarer Prochelator wurde 2007 von Y. Wei und M. Guo beschrieben.<sup>[49]</sup>

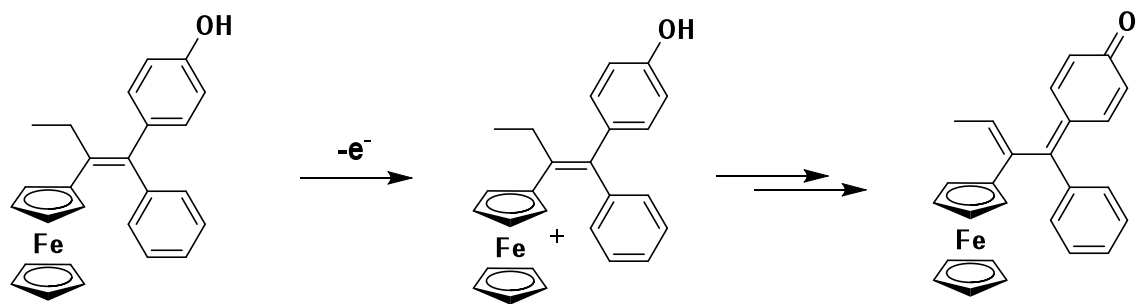
Artemisin wird in vielen Ländern zur Bekämpfung der Malaria angewandt. Das Artemisin wird durch freie Fe(II)-Ionen innerhalb des Malariaparasiten aktiviert, was zur Produktion freier Radikalintermediate führt.<sup>[50]</sup> Diese erhöhte ROS-Konzentration tötet den Parasiten. Da der Gehalt freier Fe(II)-Ionen innerhalb normaler Zellen vernachlässigbar ist, ist dieses Medikament Malaria-spezifisch.

## 1.8 Ferrocen in der Medizin

Ferrocen ist ein kleines, lipophiles Molekül ( $\text{LogP}_{\text{Octanol/Wasser}} = 3.28$ ). Es kann die Zellwand gut passieren und ist innerhalb der Zelle sehr stabil. Die Toxizität ist gering. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden Ferrocenderivate als Tracer von Biomolekülen<sup>[51], [52], [53]</sup> sowie zur Modifikation bereits bekannter Medikamente verwendet.<sup>[54]</sup> So haben beispielsweise Edwards und seine Mitarbeiter Ferrocen an Penicillin und an Cephalosporin gekoppelt.<sup>[55], [56], [57]</sup> Diese neuen Medikamente konnten als Antibiotika gegen Penicillin-resistente Bakterienstämme eingesetzt werden. Die Gruppe um Brocard griff diesen Ansatz auf und synthetisierte ein Ferrocen-Derivat des Antimalariamittels Chloroquine, welches sie Ferroquine nannten.<sup>[58]</sup> Dieses Ferroquine wirkt gegen Chloroquine-resistente Malariaerreger und befindet sich momentan in der klinischen Testphase bei Sanofi-Aventis.



Ferrocen wurde auch an Antiöstrogene gekoppelt (z.B. Hydroxytamoxifen). Die resultierenden Verbindungen werden Ferrocifene genannt und können bei der Behandlung von Östrogenrezeptor-positiven (ER+) als auch bei Östrogenrezeptor-negativen (ER-) Brusttumoren eingesetzt werden.<sup>[59], [60], [61], [62]</sup> Die ursprünglichen Medikamente wirken nur gegenüber ER+ Tumoren. Der zytotoxische Effekt von Ferrocifenen wird dadurch erklärt, dass sie zum einen Hydroxylradikale produzieren können und zum anderen Chinonmethidderivate erzeugen (Schema 1.11).



**Schema 1.11:** Wirkmechanismus von Ferrocifenen.

Da Ferrocen an sich keinen zytotoxischen Effekt aufweist, ist der letztere Mechanismus der plausiblere.

## 2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Den Kupfer-vermittelten DNA-Nachweis und die Entwicklung neuartiger, hochspezifischer Cytostatika.

Bezogen auf den ersten Teil – die Kupfer-vermittelten DNA-Nachweisreaktionen – bestand das Ziel darin, DNA mit Reaktionen nachzuweisen, welche durch drei Modifikationen des Kupfers, Cu (II), Cu (I) & Cu (0) vermittelt werden. Hierzu war es unter anderem notwendig, Nukleinsäuren chemisch derart zu modifizieren, dass die neu eingeführten funktionellen Gruppen mit Kupfer in Reaktion treten können. Durch Beobachtung dieser Reaktionen, welche nur in Gegenwart der entsprechenden DNA auftreten können, sollte diese DNA nachgewiesen werden. Gleichzeitig sollten diese zu entwickelnden Nachweismethoden günstig, einfach zu handhaben und sowohl hoch-selektiv als auch –sensitiv sein.

Das Ziel des zweiten Teilprojektes war es, eine neuartige Klasse von Cytostatika zu entwickeln, die hochselektiv Krebszellen angreift. Dieses Projekt sollte die Synthese und Charakterisierung der Substanz, erste Vorversuche zum Verhalten der Substanz in einem simulierten Krebszell-Milieu, sowie die abschließende Anwendung an lebenden Krebszellen selbst beinhalten.

## 3 Cu(II)-vermittelter DNA-Nachweis

### 3.1 Stand der Forschung

Viele chemische Reaktionen an DNA-Einzelstrang- oder RNA-Templaten sind bereits in der Literatur beschrieben. Dabei handelt es sich um die Bildung von Phosphodiestern, Pyrophosphaten, Amiden und Disulfiden. Weiterhin konnten photochemische [2+2]-Cycloadditionen und Metall- bzw. Imidazol-katalysierte Esterspaltungsreaktionen beobachtet werden.<sup>[19], [63]</sup> Diese Reaktionen wurden zum Nachweis von ssDNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet.<sup>[64]</sup>

Im Gegensatz zur ssDNA findet doppelsträngige DNA als Templat für chemische Reaktionen bisher nur bedingt Anwendung. So wurden lediglich Ligationsreaktionen an dsDNA beschrieben, welche jedoch lange Reaktionszeiten erfordern, geringe Ausbeuten liefern und darüber hinaus nur mit hochreaktiven Spezies funktionieren.<sup>[65], [66]</sup> Einzelstrang-DNA existiert lediglich in einigen Viren, wohingegen alle anderen Lebewesen über dsDNA verfügen.<sup>[67]</sup> Aus diesem Grunde ist die Anwendung von Reaktionen am dsDNA-Templat zur spezifischen Sequenzanalyse von hohem Interesse. Im Rahmen dieser Aufgabenstellung wurden Esterspaltungsreaktionen am dsDNA-Templat untersucht.

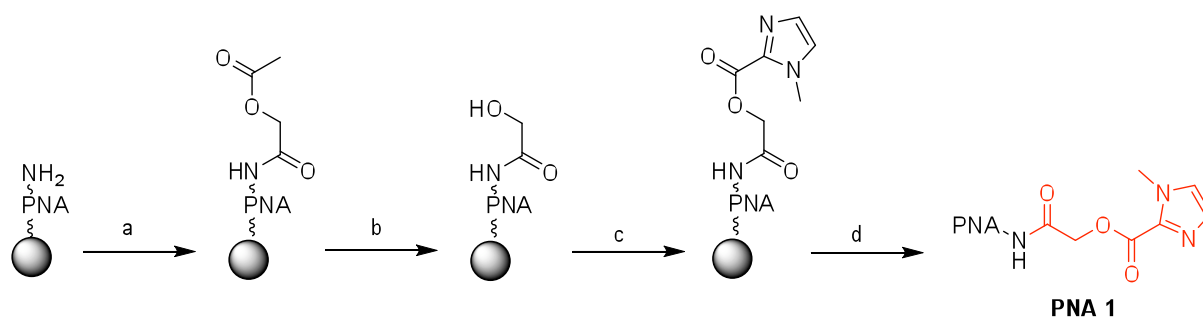
Zu diesem Zwecke wurden zwei verschieden modifizierte PNA-Oligonukleotide synthetisiert, und deren Tauglichkeit zum dsDNA-Nachweis untersucht.

## 3.2. Synthese

Untersucht wurde die Esterspaltungsreaktion eines an PNA gekoppelten N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure-Derivates (PNA 1) an einem dsDNA-Templat. Die Spaltung erfolgte durch ein zweites PNA-Konjugat, welches mit einem Cu(II)-Komplex modifiziert wurde (PNA 2). Beide PNAs wurden in Anlehnung an bereits publizierte Ergebnisse synthetisiert. <sup>[18]</sup>

### 3.2.1 Synthese von PNA 1

Wie aus Schema 3.1 ersichtlich, gelang die Synthese der PNA 1 in 4 Schritten. Ausgehend von einer an der Festphase verankerten PNA wurde zunächst mittels einer HOBt / HBTU-Kopplung ein Acetoxyessigsäuremolekül über eine Amidbindung eingeführt. Nach der Hydrolyse der Acetyl-Schutzgruppe konnte die N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure über eine DIC / HOBt-Kopplung eingeführt werden. Im letzten Schritt wurde die PNA schließlich mit einer TFA / m-Cresol Mischung von der Festphase abgespalten und mittels HPLC aufgereinigt.



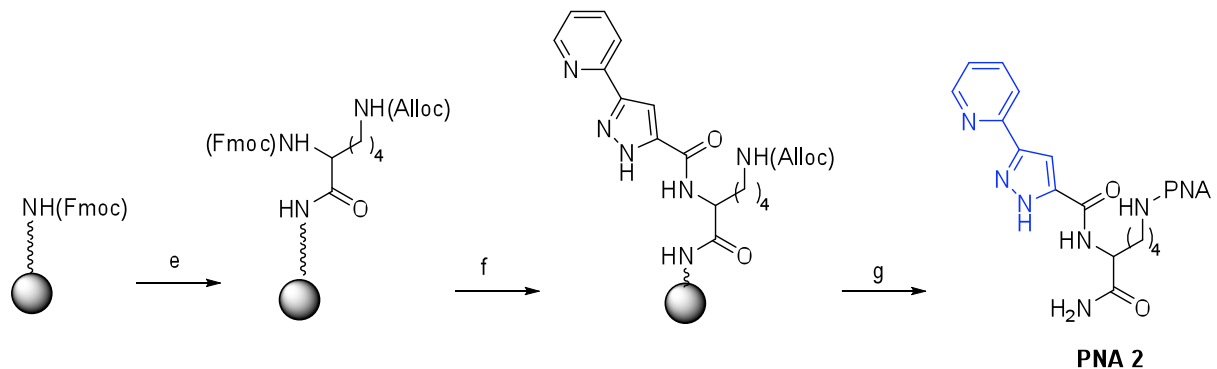
PNA = TCT CTC TCT TCT TCLys

- |   |
|---|
| <p><b>a</b> = Acetoxyessigsäure, HBTU / HOBt</p> <p><b>b</b> = <math>\text{NH}_3</math> (25%)</p> <p><b>c</b> = 1-Methyl-1H-imidazol-2-carbonsäure, DIC / HOBt</p> <p><b>d</b> = TFA / m-Cresol</p> |
|---|

**Schema 3.1:** Synthese von PNA 1.

### 3.2.2 Synthese von PNA 2

Die Synthese von PNA 2 ist Schema 3.2 zu entnehmen. Zunächst wurde eine Fmoc-geschützte Festphase mit einem Pyridin / DMF-Gemisch (1:4 „Deblock-Solution“) entschützt. An die freie Aminogruppe wurde im nächsten Schritt mittels HOBt / HBTU-Kopplung ein FMoc- & Alloc-geschütztes, verzweigtes Linkermolekül gekoppelt. Nach Entfernen der FMoc-Gruppe wurde an den einen Zweig ein Pyridin-Pyrazolyl-Ligand gekoppelt. Im nächsten Schritt wurde die Alloc-Gruppe entfernt. An der frei gewordenen Aminogruppe wurde nun die PNA-Sequenz an einem Syntheseautomaten synthetisiert. Zum Schluß wurde die PNA von der Festphase entfernt und mittels HPLC gereinigt.



**PNA = Lys TTT TTT TCC TCC TC**

**e** = 1. Deblock-Solution  
2. Fmoc-Lys(Alloc)-OH, HBTU / HOBt

**f** = 1. Deblock-Solution  
2. 5-Pyridin-2-yl-3,4-dihydro-2H-pyrazol-3-carbonsäure

**g** = 1. Pd<sup>0</sup>  
2. PNA-Synthese  
3. TFA / m-Cresol

**Schema 3.2:** Synthese von PNA 2.

### 3.3 Nachweis von dsDNA

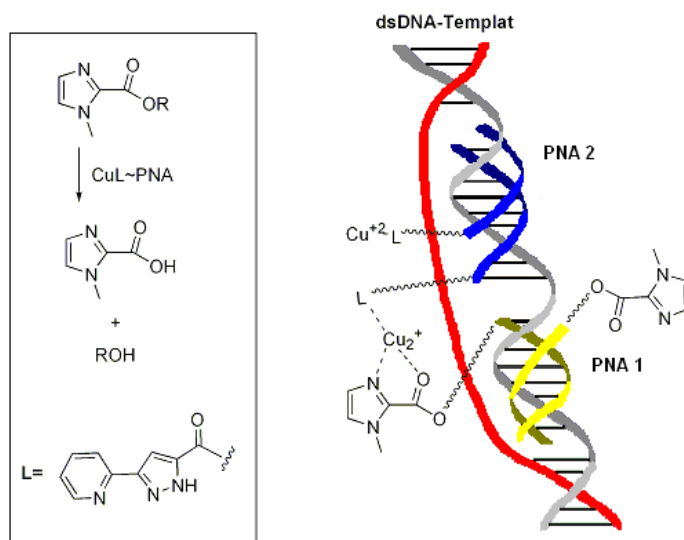
Bei der nachzuweisenden dsDNA handelte es sich um ein 118mer, welches für jeden Versuch frisch aus zwei ssDNA-Strängen hergestellt wurde (Abb. 3.1).

**DNA1:** GAG GCT CAC ACA GTA GTT GTT GTC GTT CAA CTT AAC TGC TTC CAA TGA TGT TTT TTT CCT CCT  
CTC TCT CTC TTC TTC ATT GTA TGC AAT GAT GAG TTG TTG ATG CAC CAC CAG CAC T

**DNA2:** AGT GCT GGT GGT GCA TCA ACA ACT CAT CAT TGC ATA CAA TGA AGA AGA GAG AGA GAG GAG GAA  
AAA AAC ATC ATT GGA AGC AGT TAA GTT GAA CGA CAA CAA CTA CTG TGT GAG CCT C

**Abb. 3.1:** Sequenzen der eingesetzten ssDNAs.

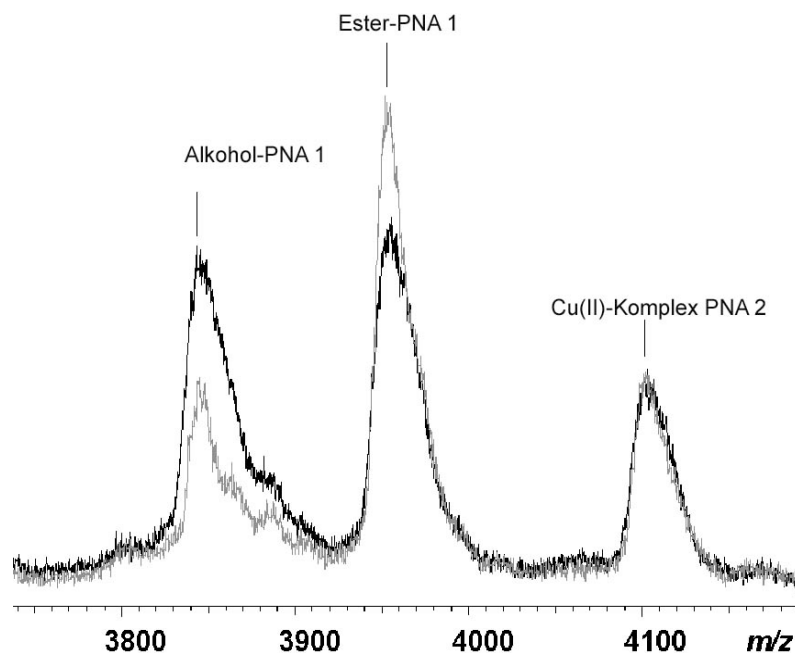
An die dsDNA können die beiden PNA-Sonden sowohl über Watson-Crick- als auch über Hoogsten-Basenpaarung binden. PNA 1 und PNA 2 binden an benachbarte Stellen innerhalb der DNA. Dadurch werden die reaktiven Gruppen in unmittelbare Nähe zueinander gebracht, so dass die Esterspaltungsreaktion beschleunigt wird (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Cu(II)-Komplex katalysierte Hydrolyse von Ester-PNA 1 an einem dsDNA-Templat; **R** stellt den PNA-Rest der Ester-PNA 1 dar.

Die Reaktionslösung wurde in 10 mM MOPS Puffer (pH = 7) mit 50 mM NaCl angesetzt. Diese enthielt 0,2  $\mu\text{M}$  dsDNA, 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 2  $\mu\text{M}$  PNA 1 & PNA 2 und 1 mM Triton X 100. Bei einer Temperatur von  $T = 40^\circ \text{C}$  wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben genommen. Der Fortgang der Esterspaltung erfolgte mittels MALDI-TOF MS. Quantitative MALDI-TOF MS <sup>[68]</sup> ist im Vergleich zur HPLC eine sehr schnelle Nachweismethode und kommt außerdem mit sehr geringen Probemengen aus. Der Umsatz der Spaltung wurde prozentual über das Verhältnis der Signalintensitäten von Edukt zu Produkt bestimmt.

Nach der Hydrolyse tritt N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure aus. Deren Masse beträgt 126 Da. Die Masse der PNA 1 beträgt 3946 Da. Der Messfehler bei MALDI-TOF MS beträgt 0,1%, was bei der PNA 1 einen Messfehler von ungefähr 4 Da bedeutet. Der Austritt der 126 Da wiegenden N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure konnte daher ohne weiteres verfolgt werden. Anhand von Abb. 3.3 lässt sich sehr gut erkennen, dass der Anteil an Ester-PNA 1 abnimmt, während der Anteil an Alkohol-PNA 1 zunimmt. Bereits 20 fmol dsDNA-Templat genügen, um diese Esterhydrolyse beobachten zu können.



**Abb. 3.3:** MALDI-TOF Massenspektren von Edukt und Produkt der Esterspaltung am dsDNA-Templat (20 fmol, 2 x 118mer). Aufgenommen nach  $t = 0$  min (graue Linie) und  $t = 180$  min (schwarze Linie).

Die beschriebene Reaktion ist demnach sehr sensitiv. Die Ergebnisse des hier beschriebenen Experimentes geben jedoch keinerlei Aufschluss darüber, ob die vorgestellte Reaktion auch sequenzspezifisch ist. Um dies zu untersuchen, wurde ein vergleichbares Experiment mit kürzeren Sequenzen durchgeführt. Die verwendeten Sequenzen sind Abbildung 3.4 zu entnehmen.

<b>DNA 3:</b> CGA CGA AGA GAG AGA GGG GAG GAA AGT AGG
<b>DNA 4:</b> CGA CGA AGA GA $\bar{T}$ AGA GGG GAG GAA AGT AGG
<b>DNA 5:</b> CGA CGA AGA GAG AGA GGG $\bar{T}$ AG GAA AGT AGG
<b>DNA 6:</b> CCT ACT TTC CTC CCC TCT CTC TCT TCG TCG
<b>DNA 7:</b> CCT ACT TTC CT $\bar{A}$ CCC TCT CTC TCT TCG TCG
<b>DNA 8:</b> CCT ACT TTC CTC CCC TCT $\bar{A}$ TC TCT TCG TCG

**Abb. 3.4:** Sequenzen der ssDNAs für die Sequenzspezifitätsexperimente.

In Gegenwart komplementärer dsDNA (30-mer DNA **3**: DNA **6**,  $T_m = 65.0 \pm 0.2$  °C) wird die Esterspaltungsreaktion deutlich beschleunigt. So wurden 155 % (bezogen auf die eingesetzte Menge an dsDNA) des Esters nach 180 min Reaktionszeit gespalten. Die Esterspaltung findet in Gegenwart des dsDNA-Templats also 7-mal schneller statt als in Abwesenheit dieses Templats. Um die Sequenzspezifität der Reaktion zu untersuchen, wurde dieses Experiment nochmals in Gegenwart zweier Mismatch-dsDNAs getestet. Die DNA **4**: DNA **8**-Duplex enthielt hierbei eine Fehlbase an der Bindungsseite der Ester-PNA 1, die DNA **5**: DNA **7**-Duplex enthielt eine Fehlbase an der Bindungsseite der PNA 2-LCu. Keines dieser beiden dsDNA-Templates konnte hierbei die Esterspaltung signifikant beschleunigen. Die Esterspaltungsreaktion am dsDNA-Templat ist demnach nicht nur sehr sensitiv, sondern auch sequenzspezifisch.

Bei den Ligationsreaktionen am dsDNA-Templat, welche von Shabarova <sup>[65]</sup> und Dervan <sup>[66]</sup> beschrieben wurden, konnte eine maximale Ausbeute von 90 % nach 48h Reaktionszeit erhalten werden. Im Gegensatz zu diesen Reaktionen ist die hier beschriebene Esterspaltungsreaktion bei weitem effizienter: Bereits nach 3h konnten 155 % Produkt (bezogen auf die eingesetzte Menge an dsDNA) erhalten werden. Somit ist dies die erste Reaktion, die von doppelsträngiger DNA sequenzspezifisch katalysiert wird.

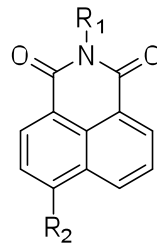


## 4 Cu(I)-vermittelter DNA-Nachweis

### 4.1 Stand der Forschung

#### 4.1.1 Fluorophore des 1,8-Naphthalimid-Typs

In Abbildung 4.1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff des 1,8-Naphthalimid-Typs dargestellt. Diese sind aus verschiedenen Gründen gut zur Verwendung in der DNA-Analytik geeignet.

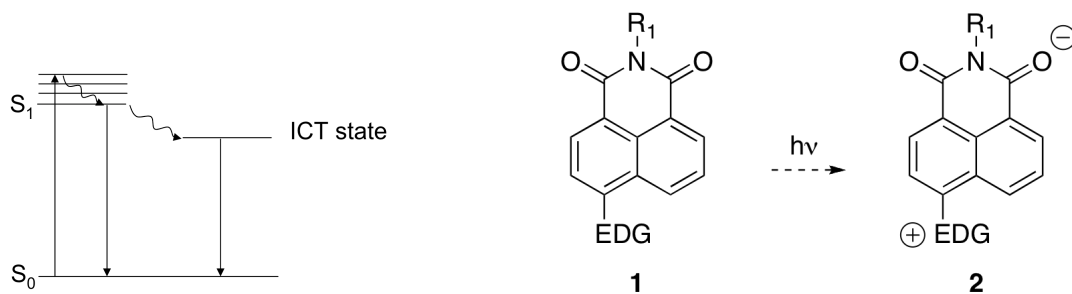


**Abb. 4.1:** Fluorophor des 1,8-Naphthalimid-Typs.

Fluorophore dieses Typs zeigen sowohl eine hohe Quantenausbeute als auch einen bedeutenden Stokes-shift, was die experimentelle Beobachtung des fluoreszierenden Moleküls stark erleichtert. <sup>[69]</sup> Bereits erfolgte Applikationen im Bereich des DNA-Nachweises haben weiterhin gezeigt, dass die hohe Quantenausbeute durch die unmittelbare Nähe zu der DNA nicht eingeschränkt wird. <sup>[70]</sup> Zusätzlich wurde hierbei festgestellt, dass das Fluorophor weder bei räumlicher Nachbarschaft <sup>[70]</sup> noch bei Interkalation <sup>[71]</sup> die Duplex-Stabilität des DNA-Doppelstranges signifikant reduziert. Aufgrund der hohen Photostabilität <sup>[69]</sup> und der guten Membrangängigkeit <sup>[69]</sup> der 1,8-Naphthalimid-Grundstruktur handelt es sich hierbei um eine zweckmäßige Ausgangssubstanz zur Entwicklung eines neuartigen DNA-Fluoreszenz-Systems.

Den größten Vorteil gegenüber anderen Fluorophoren besitzen 1,8-Naphthalimid-Farbstoffe allerdings hinsichtlich ihres elektronischen Verhaltens bei UV-Absorption. Zunächst kommt es erwartungsgemäß zu einer Anregung in den  $S_1$ -Zustand (Abb. 4.2). Besitzt der 1,8-Naphthalimid-Farbstoff allerdings einen Donor-Substituenten in

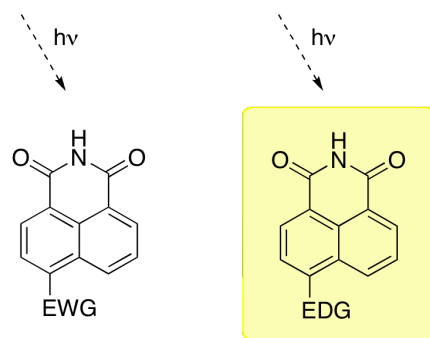
Position 4, so erfolgt aufgrund der Imid-Akzeptoreinheit eine große Änderung des Dipolmomentes des Fluorophors. Befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff dabei in einem fluiden polaren Lösungsmittel, kann sich dieses bei ausreichender Lebensdauer des angeregten Zustands zu einer neustrukturierten Solvationshülle ausrichten. Hierdurch wird die angeregte Struktur mit größerem Dipolmoment stabilisiert und der *Intramolecular charge transfer (ICT)* Zustand wird erreicht.



**Abb. 4.2:** Erzeugung des ICT-Zustandes.

Die Rotverschiebung der Emissionsbande im Fluoreszenzspektrum, die aufgrund des energetisch tiefer liegenden ICT Zustands zustande kommt, vergrößert den Stokes-shift dabei noch.

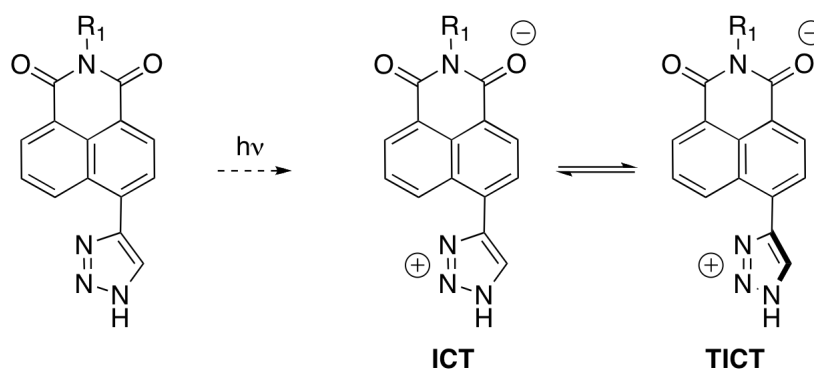
Der Austausch des Donorsubstituenten gegen eine Akzeptorgruppe in Position 4 bewirkt eine starke Schwächung bis Auslöschung der Fluoreszenz, da der ICT-Zustand nicht mehr gebildet werden kann. Somit kann ein derartiges Fluorophor durch Umwandlung eines elektronenziehenden Substituenten in eine elektronenschiebende Gruppe zur Fluoreszenz aktiviert werden (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3:** Fluoreszenzverhalten von 1,8-Naphthalimiden in Abhängigkeit des Substituenten in Position 4 (links: keine bis geringfügige Fluoreszenz; rechts: starke Fluoreszenz).

Diese Strategie des gezielten An- bzw. Abschaltens der Fluoreszenz wurde bereits für zahlreiche Anwendungen genutzt, allen voran Indikatoren zur Bestimmung von Anionen, <sup>[72], [73]</sup> Metallionen, <sup>[74]</sup> Kohlenhydraten <sup>[75]</sup> und Wasserstoffperoxid. <sup>[76]</sup>

Für diese Farbstoffklasse ist letztlich das Phänomen des *Twisted ICT (TICT)* Zustands <sup>[77]</sup> zu erwähnen. In der Regel besitzt der Donorsubstituent konjugierende  $\pi$ -Orbitale, welche eine parallele Ausrichtung zum  $\pi$ -System des 1,8-Naphthalimids besitzen. Sobald die Relaxation des angeregten Zustands  $S_1$  zu dem ICT Zustand eintritt, kann es bei der Rotation des Substituenten um die Bindungsachse zu einer Stabilisierung der orthogonal ausgerichteten Konformation kommen (Schema 4.1), was zu einer vollständiger Ladungstrennung des TICT und einer starken Emissionsbandenverschiebung führt. Die orthogonale Ausrichtung der Gruppen stabilisiert hierbei den ICT-Zustand. Anderenfalls wäre dieser Zustand derart kurzlebig, dass er nicht beobachtet werden könnte.

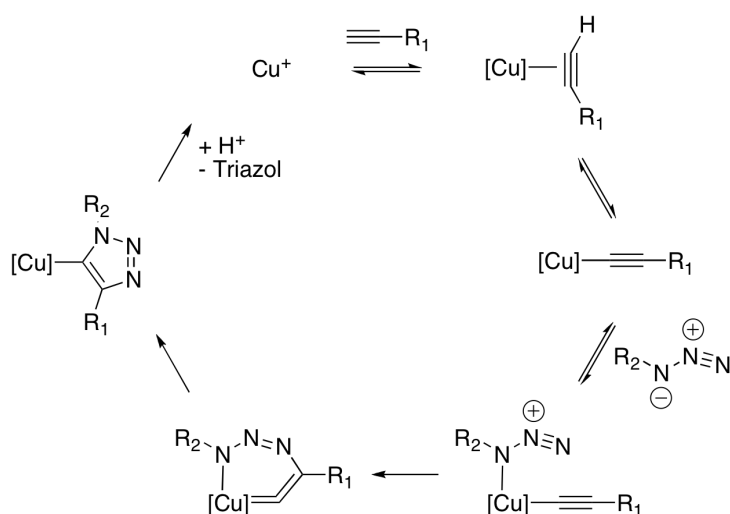


**Schema 4.1:** Entstehung des TICT Zustands bei Anregung eines Triazol-substituierten 1,8-Naphthalimids.

### 4.1.2 Kupfer(I)-katalysierte (2+3)-Huisgen-Cycloaddition

Bei der Suche nach geeigneten Reaktionen für die Transformation eines Fluorophors zur Aktivierung unter physiologischen Bedingungen stößt man auf den von K. B. Sharpless geprägten Begriff der *Click-chemistry*.<sup>[78]</sup> Bei dieser Kohlenstoff-Heteroatom-Verknüpfung handelt es sich um die Kupfer(I)-katalysierte (2+3)-Huisgen-Cycloaddition eines Alkins mit einem Organoazid zu einem 5-gliedrigen Triazol-Derivat. Einer der Vorteile der Reaktion ist die Stabilität der beiden Cyclisierungskomponenten und auch des entstehenden Triazolderivats unter physiologischen Bedingungen.<sup>[79]</sup> Des Weiteren verläuft die Reaktion hochchemoselektiv mit hohen Ausbeuten. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die Click-Reaktion in der Vergangenheit vielfach zur DNA-Funktionalisierung angewandt.<sup>[80], [81], [82], [83]</sup>

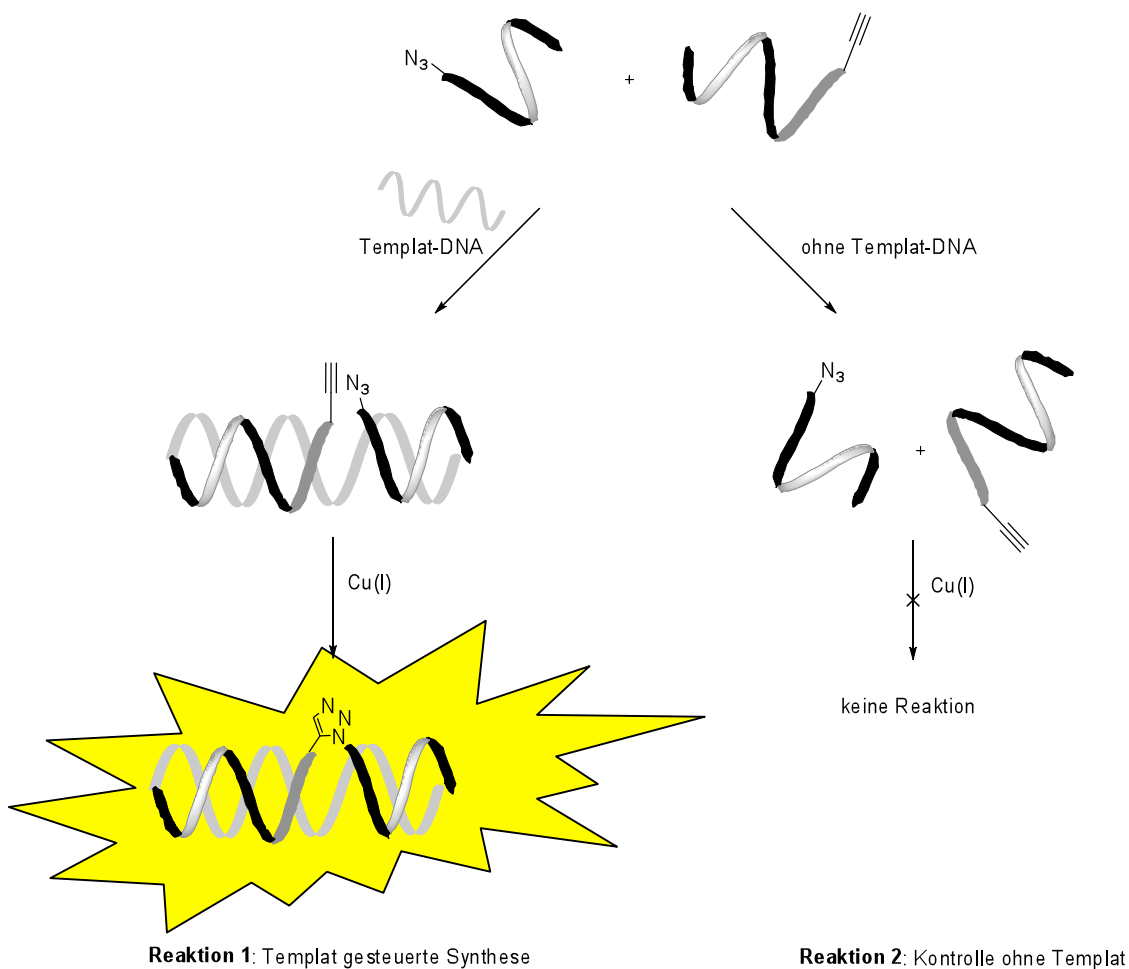
Der Mechanismus dieser Umsetzung ist immer noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Dennoch zeichnet sich mittlerweile folgendes Bild über den Verlauf ab (Schema 4.2).<sup>[84], [85]</sup> Die Koordination des Cu(I)-Ions bewirkt eine Aciditätssteigerung des Alkin-Protons, wodurch eine oxidative Addition an dieser Stelle folgt. Nach Koordination des Azids über das sekundäre Stickstoffatom erfolgt eine Cyclisierung zu einem 6-gliedrigen Intermediat, wobei das Kupfercarben anschließend rasch mit Hilfe einer reduktiven Eliminierung aus dem Ring entfernt wird und ein mehrfach substituiertes Triazol entsteht. Abspaltung durch Protonierung liefert das gewünschte Produkt und der katalytische Zyklus wird geschlossen.



**Schema 4.2:** Postulierter Mechanismus der Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition.

### 4.1.3 Projektansatz

Um DNA mittels der Click-Reaktion nachweisen zu können, sollten zunächst die beiden benötigten Reaktanden mit Hilfe von Linkermolekülen an kurze DNA-Fragmente gebunden werden, welche wiederum komplementär zu der zu detektierenden DNA sind. Hybridisierung der modifizierten DNA-Stränge am Templat führt zu räumlicher Nähe der Reaktanden zueinander. Nach Umsetzung mit Cu(I) sollte das elektronenziehende Acetylid in ein elektronenschiebendes Triazol umgewandelt worden sein, was fluoreszenzspektroskopisch verfolgbar sein sollte. Bei genügend geringer Konzentration der modifizierten DNAs sollte die Reaktion in Folge der Präorganisation in Gegenwart eines komplementären DNA-Templats deutlich schneller ablaufen als in dessen Abwesenheit (Schema 4.3).

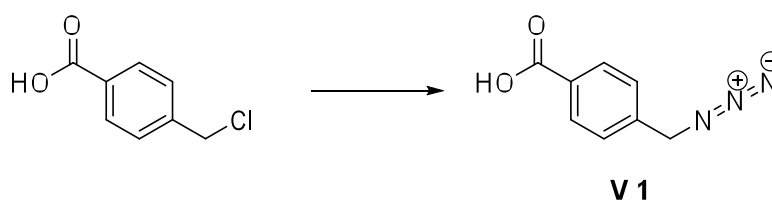


**Schema 4.3:** Ansatz für den Cu(I)-vermittelten DNA-Nachweis.

## 4.2 Synthese

### 4.2.1 Synthese der 4-(Azidomethyl)-benzoesäure <sup>[86]</sup>

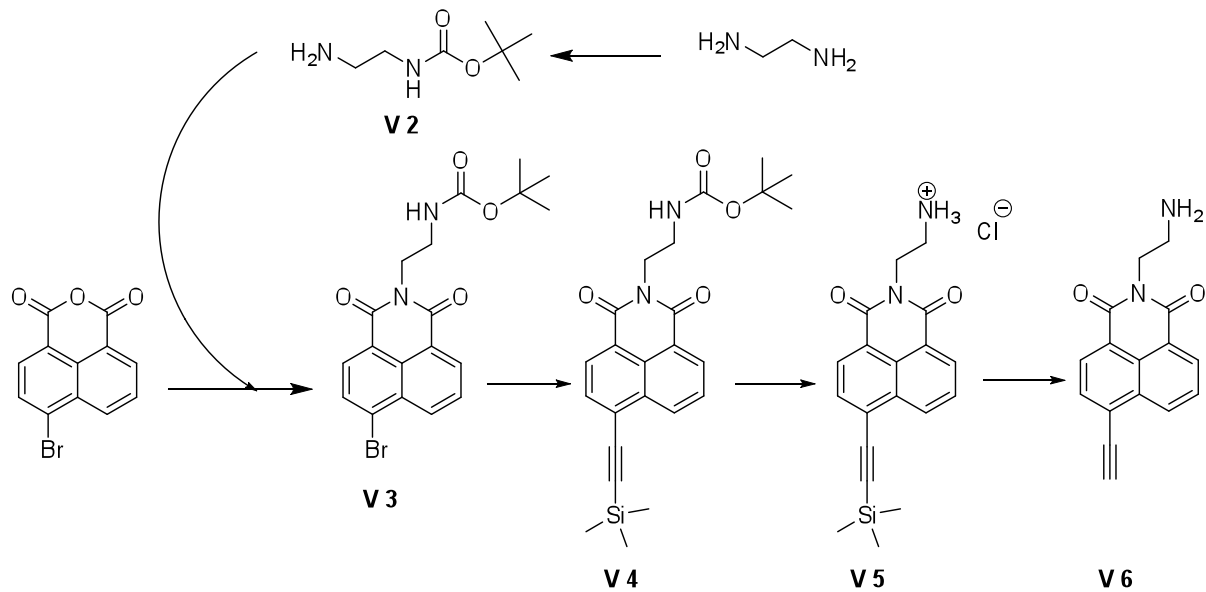
Die 4-(Azidomethyl)-benzoesäure **V 1** wurde in einer einstufigen Synthese nach Liu <sup>[86]</sup> erhalten. Hierzu wurde 4-(Chloromethyl)-benzoesäure mit 18-Krone-6 und  $\text{NaN}_3$  in DMSO für 24 h bei RT umgesetzt (Schema 4.4).



**Schema 4.4:** Synthese von 4-(Azidomethyl)benzoesäure.

### 4.2.2 Synthese des 2-(2-Aminoethyl)-4-acetyldo-naphthalimids

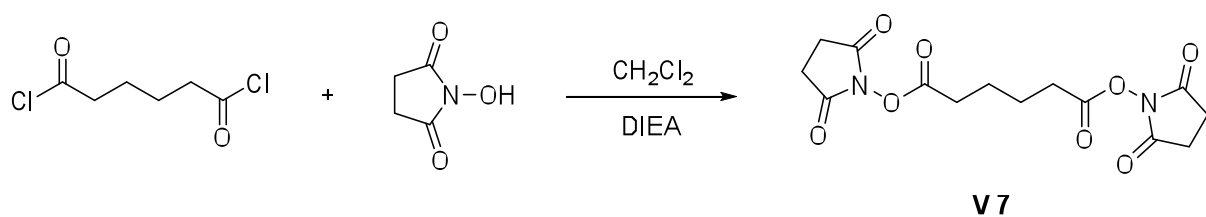
Die Reaktionsfolge zur Synthese des 2-(2-Aminoethyl)-4-acetyldo-naphthalimids **V 6** ist in Schema 4.5 aufgeführt. Startsubstanz der Synthese war 4-Bromo-1,8-naphthalsäure-anhydrid, welches mit Mono-Boc geschütztem Ethylendiamin<sup>[87]</sup> zum Imin umgesetzt wurde. Im nächsten Schritt wurde mittels einer Sonogashira-Reaktion das TMS-geschützte Acetylid eingeführt. Die Boc-Schutzgruppe wurde mit HCl entfernt. Das resultierende Hydrochlorid wurde mit  $\text{NEt}_3$  zum entsprechenden Amin umgesetzt, wobei gleichzeitig die TMS-Gruppe entfernt werden konnte.



**Schema 4.5:** Synthese des 2-(2-Aminoethyl)-4-acetyldo-naphthalimids.

#### 4.2.3 Synthese von Disuccinimidyladipat

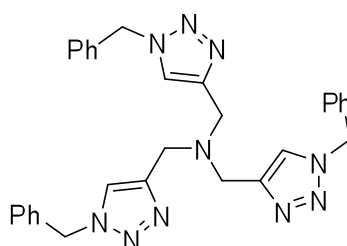
Um den Naphthalimifarbstoff an DNA koppeln zu können, bedarf es eines Linkermoleküls. Die Wahl fiel hierbei auf Disuccinimidyladipat, welches nach einer Vorschrift von D'Albis <sup>[88]</sup> synthetisiert wurde. Adipinsäuredichlorid wurde mit DIEA und 2 äq. N-Hydroxysuccinimid (NHS) umgesetzt und schließlich aus Aceton umkristallisiert (Schema 4.6).



**Schema 4.6:** Synthese von Disuccinimidyladipat.

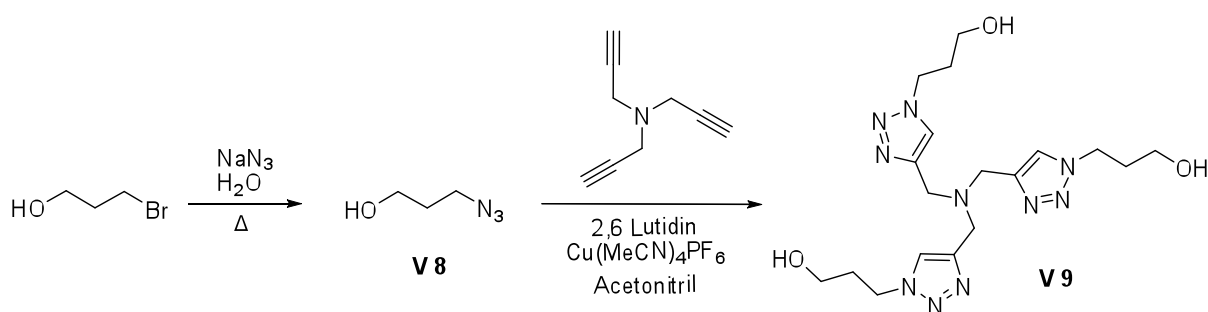
#### 4.2.4 Synthese von THPTA

Für die Click-Reaktion wird Cu(I) benötigt. Dieses wird aus CuSO<sub>4</sub> und Natriumascorbat *in situ* erzeugt. Cu(I) ist in wässrigen Medien jedoch nicht stabil und disproportioniert zu Cu(0) und Cu(II). Außerdem wird Cu(I) durch Luftsauerstoff oxidiert. In dieser Reaktion wird das Superoxidanionradikal gebildet, welches die DNA zersetzen kann. Um dies während der Versuche zu verhindern, muss das Cu(I) stabilisiert werden. Besonders bewährt hat sich hier das Tris-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-amin (TBTA), das zur Stabilisierung und Effektivitätssteigerung des Kupfer(I)-Katalysators erstmals von Sharpless und Fokin beschrieben wurde (Abb. 4.4).<sup>[89]</sup>



**Abb. 4.4:** Tris-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-amin (TBTA).

TBTA ist jedoch nicht wasserlöslich, daher musste ein artverwandtes Derivat synthetisiert werden. Das Tris-((1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-amin (THPTA) **V 9**, bei dem die Benzylgruppen des TBTAs durch Hydroxypropylgruppen substituiert sind, ist wasserlöslich. Die Synthese erfolgte analog zur bereits erwähnten Synthese des TBTA (Schema 4.7).



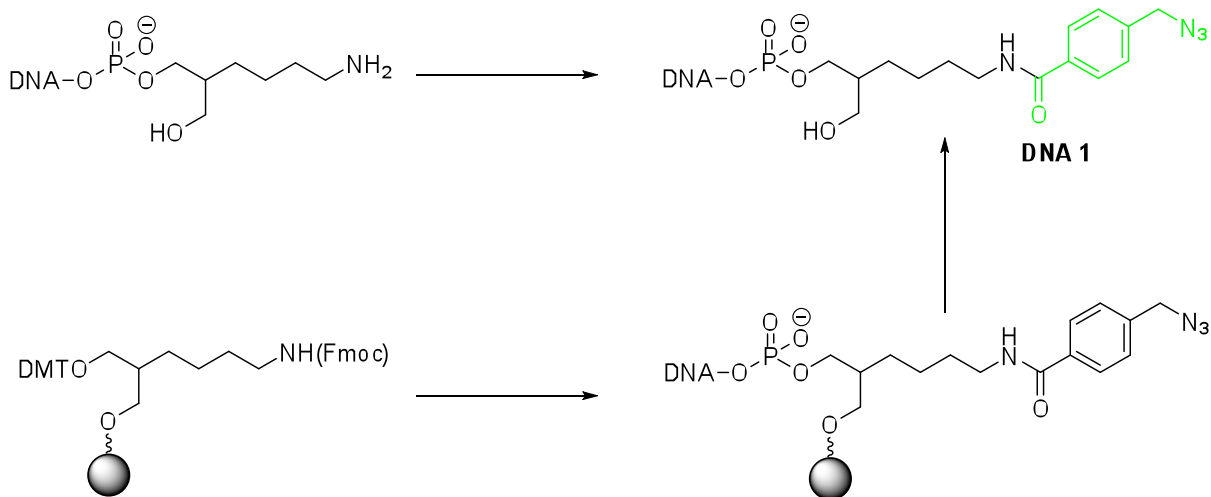
**Schema 4.7:** Synthese von THPTA.<sup>[89]</sup>



3-Bromopropanol wurde zusammen mit  $\text{NaN}_3$  in der Hitze umgesetzt. Das so erhaltene 3-Azidopropanol wurde danach zusammen mit Tripropargylamin zusammen mit  $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$  als Cu(I)-Quelle und 2,6-Lutidin als Liganden in Acetonitril für bei RT umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion und Aufreinigung konnte das THPTA erhalten werden.

### 4.2.5 Synthese der Azid-gelabelten DNA 1

Die Azid-gelabelte DNA 1 wurde auf zwei verschiedenen Arten synthetisiert (Schema 4.8).



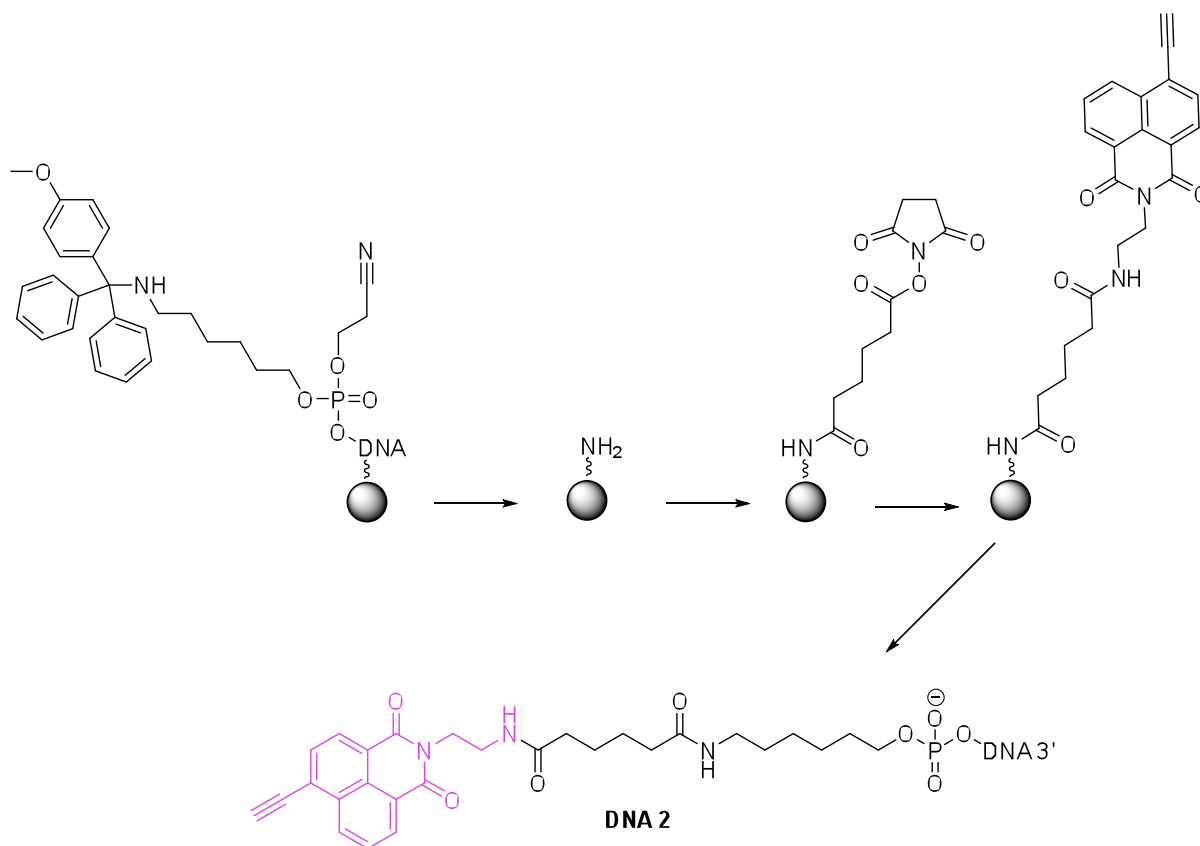
**Schema 4.8:** Unterschiedliche Methoden zur Synthese der Azid-gelabelten DNA 1.

Die Flüssigphasensynthese erwies sich als ineffizient, da sowohl die kommerziell erhältliche Amino-DNA als auch das Produkt mittels HPLC gereinigt werden mussten, was zu hohen Ausbeuteverlusten führte.

Die Ausbeute konnte durch die Umstellung auf eine Festphasensynthese erheblich verbessert werden. Hier wurde zunächst die Fmoc-Gruppe des kommerziell erhältlichen 3' *Aminomodifier C7* mit einer DBU / DMF-Mischung entfernt. Danach wurde die Azidomethylbenzoesäure über eine HOBT / HBTU-Kopplung eingeführt. Im nächsten Schritt wurde die DNA-Sequenz an einem Syntheseroboter aufgebaut. Nach Abspalten von der Festphase mit  $\text{NH}_3$  (25%) und Aufreinigung mittels HPLC konnte die Azid-gelabelte DNA in reiner Form mit guten Ausbeuten erhalten werden.

## 4.2.6 Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2

In Schema 4.9 ist die Reaktionsfolge zum Aufbau der Acetylid-gelabelten DNA 2 dargestellt.

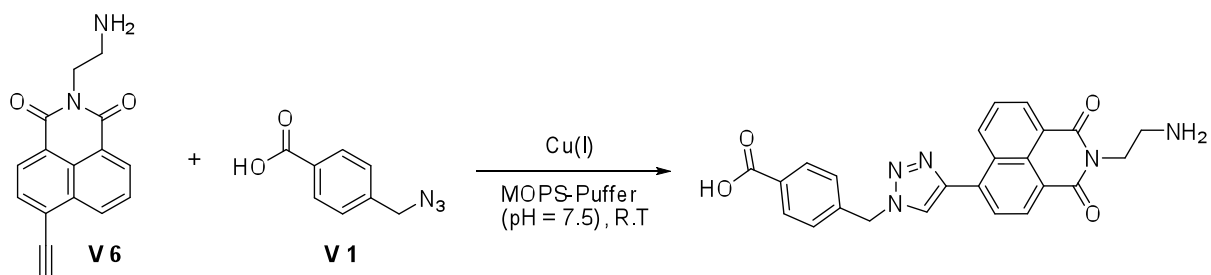


**Schema 4.9:** Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2.

Zuerst wurde die MMT-geschützte DNA an der Festphase aufgebaut. Nach dem Entfernen der MMT-Schutzgruppe mit einem TFA / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Gemisch konnte die nun frei gewordene Aminogruppe mit dem DSA-Linker **V 7** gekoppelt werden, so dass ein aktiviertes Carbonsäurefragment entstand. Dieses wurde daraufhin mit 2-(2-Aminoethyl)-4-acetylide-naphthalimid **V 6** und DIEA umgesetzt. Nach Abspalten von der Festphase mit NH<sub>3</sub> (25%) und Aufreinigung mittels HPLC konnte die Acetylid-gelabelte DNA in reiner Form mit guten Ausbeuten erhalten werden.

## 4.3 Vorversuche zur Untersuchung des Fluoreszenz-Verhaltens

Um die Click-Reaktion optimieren zu können, wurden die in Schema 4.10 gezeigte Reaktion unter systematischer Veränderung der Reaktionsbedingungen optimiert.

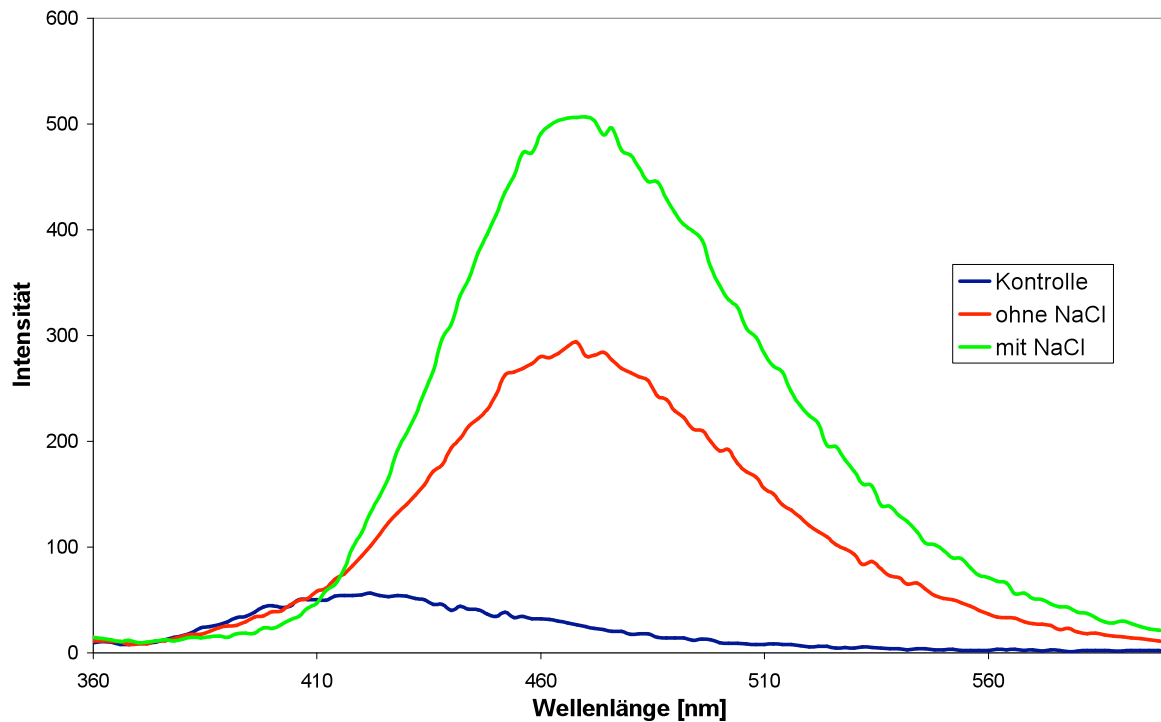


**Schema 4.10:** Generierung der fluoreszierenden Komponente via Click-Reaktion.

Neben verschiedenen Lösungsmitteln und Konzentrationen der Farbstoffkomponenten wurden auch unterschiedliche Zusätze wie Natriumchlorid und Kupfer(I)-stabilisierende Liganden getestet. Die Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

### 4.3.1 Einfluss von Natriumchlorid auf die Cycloaddition

In einem ersten Versuch wurde das Verhalten des Farbstoffs unter physiologischen Salzbedingungen getestet, unter denen später die sequenzspezifische Sonde für DNA getestet werden sollte. Es wurden insgesamt drei Lösungen vorbereitet. Die Kontrolllösung enthielt weder NaCl noch das Acetylid **V 6**. Die nächste Lösung enthielt kein NaCl aber das Acetylid **V 6**. Die letzte Lösung enthielt alle aufgeführten Komponenten.

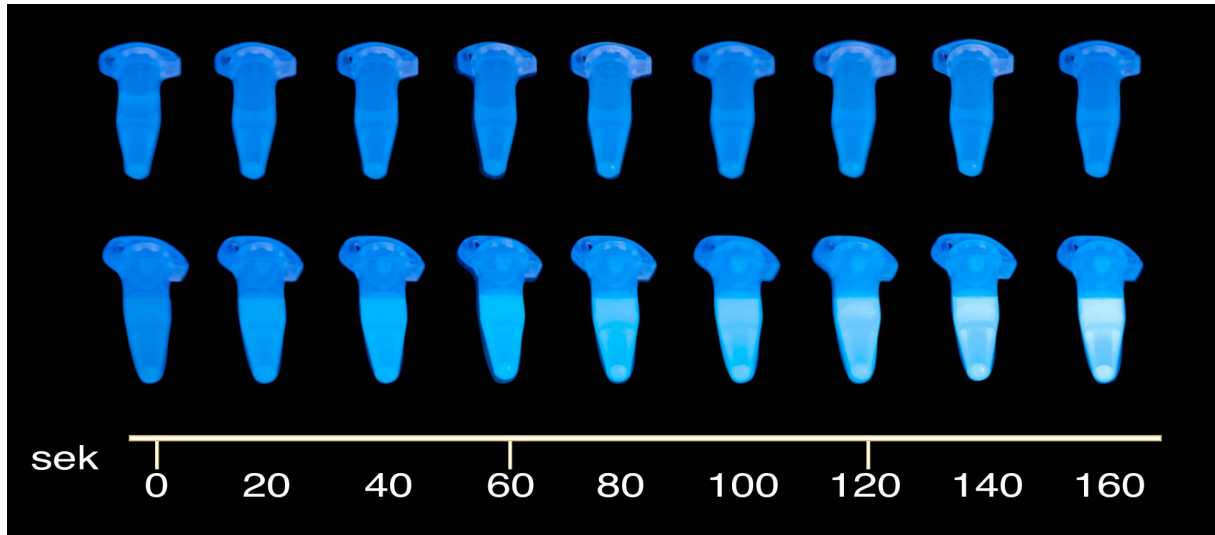


**Abb. 4.5:** Einfluss von Natriumchlorid auf die Huisgen-Cycloaddition; Einstellungen des Fluorimeters:  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 650 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{Slits}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ .

Abbildung 4.5 ist zu entnehmen, dass bei der ersten Probe (blaue Kurve) wie erwartet keine Reaktion beobachtet werden konnte. Die beiden anderen Proben zeigen hingegen deutliche Maxima bei  $\lambda = 460 \text{ nm}$ , welches von dem entstehenden Ligationsprodukt herrührt. Zudem lässt sich erkennen, dass die Probe mit Natriumchlorid eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit aufweist, da deren Maximum eine höhere Intensität besitzt. Aus diesem Grund wurde bei allen weiteren Tests 150 mM Natriumchlorid zugesetzt, während die MOPS-Konzentration konstant gehalten wurde.

### 4.3.2 Einfluss von THPTA auf die Cycloaddition

In ersten Vorversuchen konnte bereits mit dem bloßen Auge erkannt werden, dass das THPTA die Huisgen-Cycloaddition um ein Vielfaches beschleunigt (Abb. 4.6).

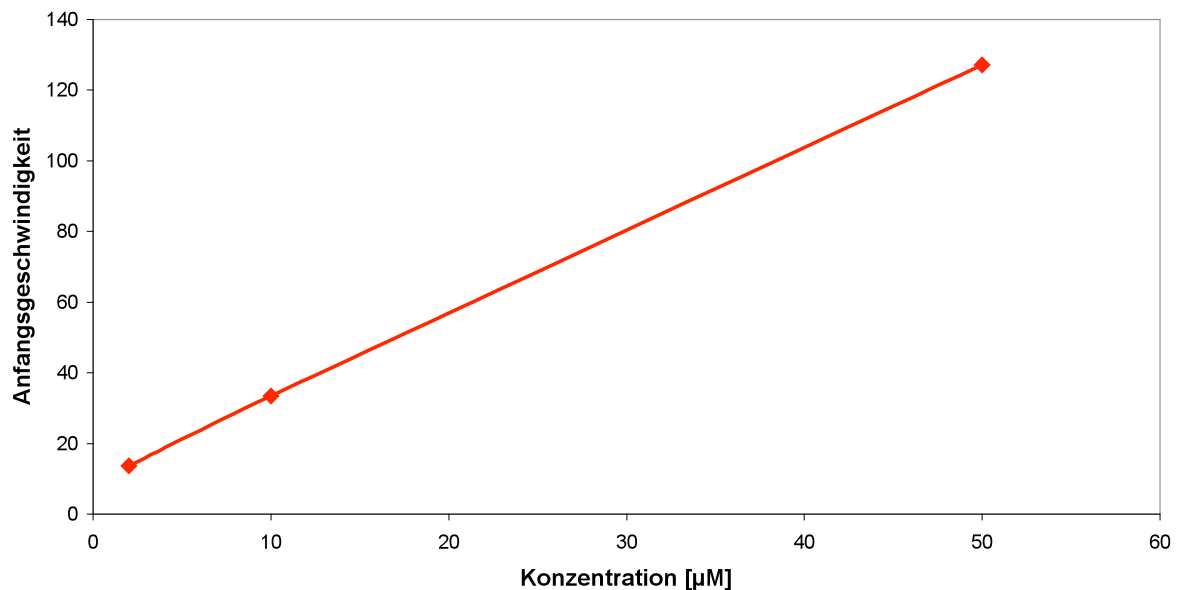


**Abb. 4.6:** Beschleunigung der Fluorophorbildung durch THPTA; oben: Reaktion ohne THPTA; unten: Reaktion mit THPTA.  
 $c(\text{Acetylid}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $c(\text{Azid}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $c(\text{NaAsc}) = 1 \text{mM}$ ;  $c(\text{THPTA}) = 600 \mu\text{M}$ ;  
 $c(\text{CuSO}_4) = 200 \mu\text{M}$ .

Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurde eine Reihe an Versuchen durchgeführt. Zunächst wurde eine Kinetikmessung mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

Es wurden vier Proben vorbereitet; die erste Probe enthielt eine  $50 \mu\text{M}$  Farbstofflösung, die zweite eine  $10 \mu\text{M}$ , die dritte und die vierte Probe eine  $2 \mu\text{M}$  bzw.  $200 \text{nM}$  Lösung. Allen Proben wurde jeweils ein 10-facher Überschuss an  $\text{CuSO}_4$  und THPTA sowie ein 100-facher Überschuss an NaAsc zugesetzt.

### Anfangsgeschwindigkeit der Fluorophorbildung in Abhängigkeit der Reaktanden-Konzentration



**Abb. 4.7:** Kinetikmessung mit THPTA bei unterschiedlichen Farbstoff-Konzentrationen (200 nM, 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ); Einstellungen Fluorimeter:  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ,  $U = 550 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{Slits}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ .

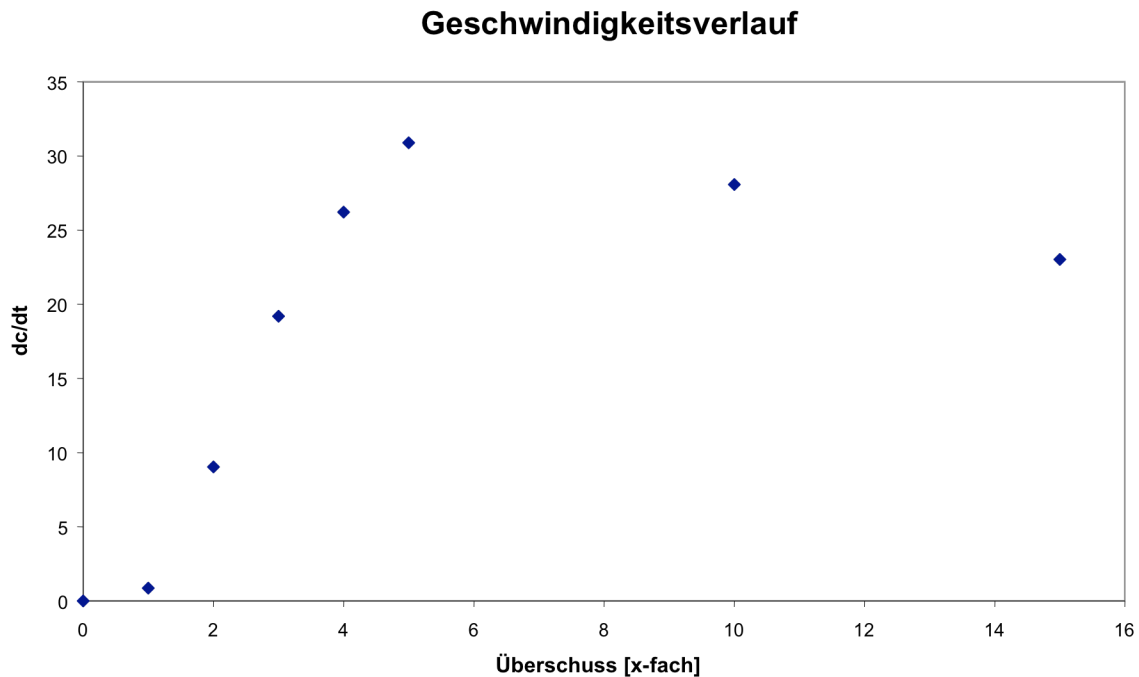
Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Reaktandenkonzentration ist aus Abb. 4.7 ersichtlich. Je höher die Konzentration der Reaktanden, desto höher ist die Geschwindigkeit der Fluorophorbildung.

Um die katalytischen Eigenschaften und die Wirkungsweise des THPTA-Liganden besser verstehen zu können und das optimale Verhältnis der Reagenzien zueinander herauszufinden, wurde eine weitere Kinetikmessung durchgeführt.

In diesem Experiment enthielten alle Proben eine 10  $\mu\text{M}$  Farbstofflösung. Zur Untersuchung des Einflusses der THPTA- und der Kupfer(I)-Konzentration auf die Geschwindigkeit, wurden beide in verschiedenen Überschüssen im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

Die Reaktion verlief ohne den Zusatz von THPTA wie erwartet nicht bzw. nur sehr langsam. Je mehr THPTA –und demnach auch Cu(I)- zugesetzt worden war, desto stärker war der Anstieg der Geschwindigkeit. Auffällig ist allerdings, dass die Geschwindigkeiten bei 10- bzw. 15-fachem Überschuss kleiner sind als bei fünf-fachem Überschuss. Um die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von dem Überschuss an Kupfer(I) und THPTA quantifizieren zu können, wurden die

Steigungen der acht Graphen, die sich beim Auftragen der Konzentration gegen die Zeit ergeben, bestimmt und gegen den Überschuss aufgetragen:



**Abb. 4.8:** Verlauf der Geschwindigkeit in Abhängigkeit vom Cu- & THPTA-Überschuss gegenüber den Farbstoffmolekülen ( $c = 10 \mu\text{M}$ ).

Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen ist, steigt die Geschwindigkeit mit steigendem Überschuss an Kupfer(I) und THPTA steil an. Bei fünffachem Überschuss ist das Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Bei noch größeren Überschüssen kommt es dann wieder zu einem leichten Rückgang der Geschwindigkeit. Dieses Phänomen konnte nicht abschließend geklärt werden.



## 4.4 Sequenzspezifische DNA-Detektion durch Click-Reaktion vermittelte Fluoreszenzzunahme

### 4.4.1 Verwendete DNA-Sequenzen

Für die Experimente am DNA-Templat wurden zwei unterschiedliche DNA-Systeme untersucht. Beim ersten System wurden die Experimente an einem 19-mer Templat durchgeführt. Beim zweiten wurde ein 22-mer-Templat verwendet. Passend Zusätzlich wurde ein weiteres 22-mer-Templat untersucht, welches sich vom ersten 22-mer-Templat durch den Austausch einer Nukleobase unterscheidet. Dieses Mismatch-Templat wurde untersucht, um zu bestimmen, ob das vorliegende System sequenzspezifisch ist. Die genauen Sequenzen und die ihnen zugrunde liegenden Schmelzpunktdaten sind nachfolgend aufgeführt.

#### 19-mer-Templat mit Acetylid-DNA und Azid-DNA

5'  $\equiv$ —GTT.CAT.CAC.G

5' CGC.TCC.CAC—N<sub>3</sub>

5' CGT.GAT.GAA.CGT.GGG.AGC.G 3'

#### Schmelzpunktdaten:

Azid mit Templat: (44,8 ± 1,3)° C bei 150 mM NaCl  
(51,8 ± 1,3)° C bei 1M NaCl

Acetylid mit Templat (44,8 ± 1,0)° C bei 150 mM NaCl  
(54,0 ± 0,6)° C bei 1M NaCl

**22-mer-Templat mit Acetylid-DNA und Azid-DNA**5' GTT.CAT.CAC.G5' ATA.CGC.TCA.TAC-N<sub>3</sub>

5' CGT.GAT.GAA.CGT.ATG.AGC.GTA.T 3' Templat

5' CGT.GAC.GAA.CGT.ATG.AGC.GTA.T 3' Mismatch-Templat

**Schmelzpunktdaten:**

Azid mit Templat: (45,8 ± 1,0)° C bei 150 mM NaCl

(52,6 ± 1,2)° C bei 1mM NaCl

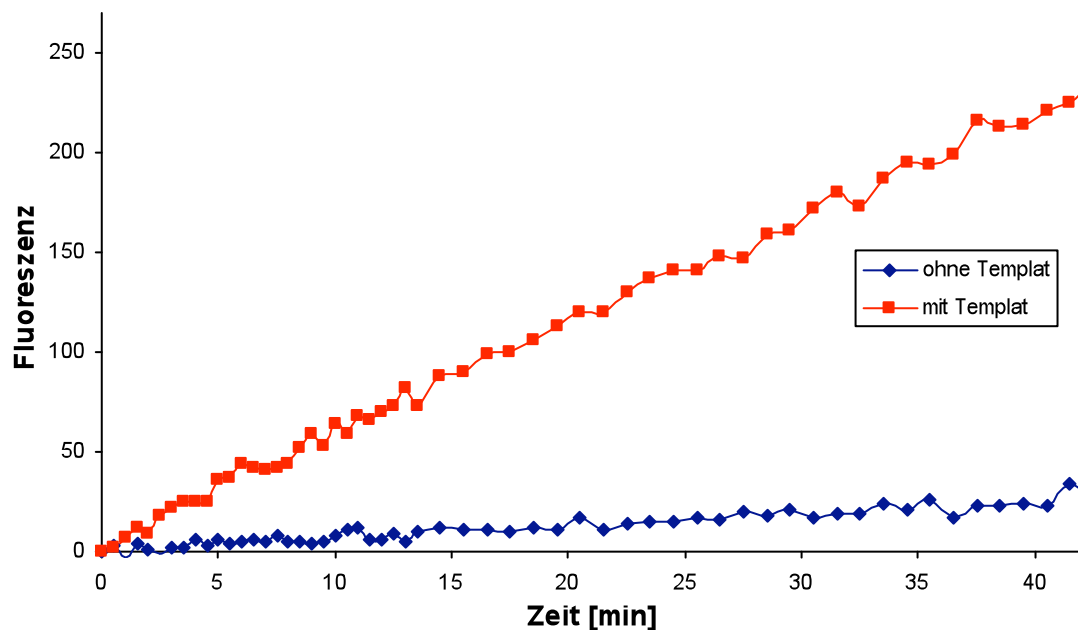
Acetylid mit Templat (46,7 ± 1,9)° C bei 150 mM NaCl

(51,6 ± 1,8)° C bei 1mM NaCl

Die Schmelzpunkte wurden in 10 mM MOPS-Puffer (pH = 7,5) bestimmt. Sie liegen allesamt weit über 22° C, was bedeutet, dass die Duplices unter den später angewandten, experimentellen Bedingungen (10 mM MOPS pH = 7,5; 150 mM NaCl) stabil sind.

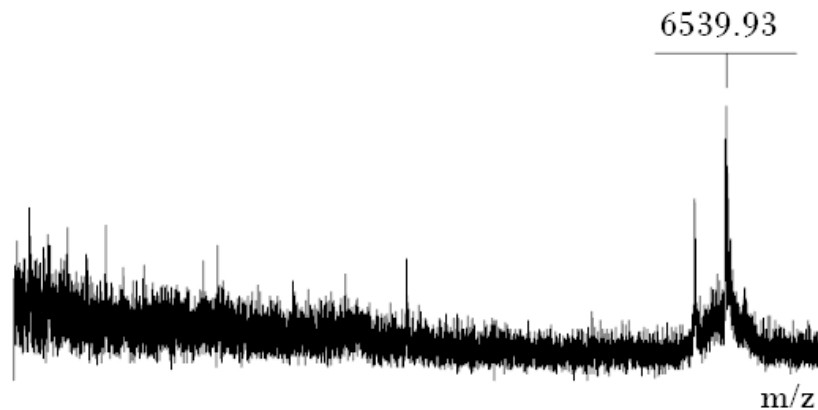
#### 4.4.2 Experimente ohne THPTA

Die Reaktion zwischen der Azid-DNA und der Acetylid-DNA (je 2  $\mu\text{M}$ ) am 19-mer-Templat (2  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart eines 50-fachen Cu(I)-Überschusses wird vom Templat beschleunigt. Der  $(dF_{460\text{ nm}}/dt)_0$  – Parameter der Templat-gesteuerten Reaktion ist 9,3-mal größer als der der Hintergrundreaktion ohne Templat (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Click-Reaktion mit 2  $\mu\text{M}$  DNAs ohne THPTA.

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Zunahme der Fluoreszenz tatsächlich von der Bildung des aktiven Fluorophors herrührt, wurde ein zusätzliches Experiment mit sehr hohen Konzentrationen durchgeführt (DNA je 50  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$  500  $\mu\text{M}$ ; NaAsc 5 mM;  $V = 100\ \mu\text{l}$ ). Die Reaktion wurde fluoreszenzspektroskopisch verfolgt, bis keine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei  $\lambda = 460\text{ nm}$  mehr zu beobachten war. Im Anschluß wurde die Probe auf  $V = 200\ \mu\text{l}$  verdünnt und in die HPLC injiziert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF MS untersucht, wobei das Ligationsprodukt eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.10).

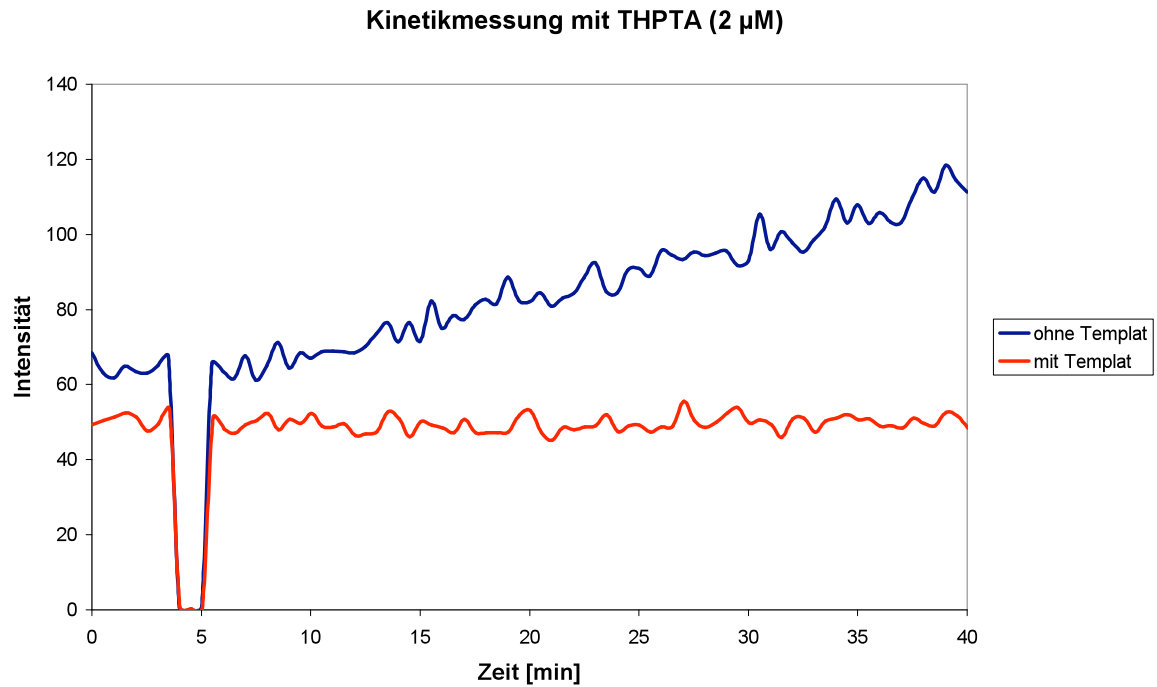


**Abb. 4.10:** MALDI-TOF MS-Spektrum des Ligationsprodukts  $C_{224}H_{285}N_{72}O_{125}P_{18}$   
m/z theor: 6543,59      m/z exp: 6539,93

Beim Versuch das Experiment mit DNA-Konzentrationen von je 200 nM durchzuführen, war die Reaktionsgeschwindigkeit derart verringert, dass die Bildung des Produktes nicht mehr zu beobachten war. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die ebenfalls verringerte Cu(I)-Konzentration zu gering war, als dass eine Reaktion hätte vermittelt werden können. Die Erhöhung der Cu(I)-Konzentration führte in diesem Fall nicht zu einer Verbesserung der Reaktion. Stattdessen kam es zu oxidativer Schädigung der DNA bzw. einer Destabilisierung der Duplex. Um dies zu verhindern, wurde bei den folgenden Experimenten der Cu(I)-stabilisierende THPTA-Ligand eingesetzt.

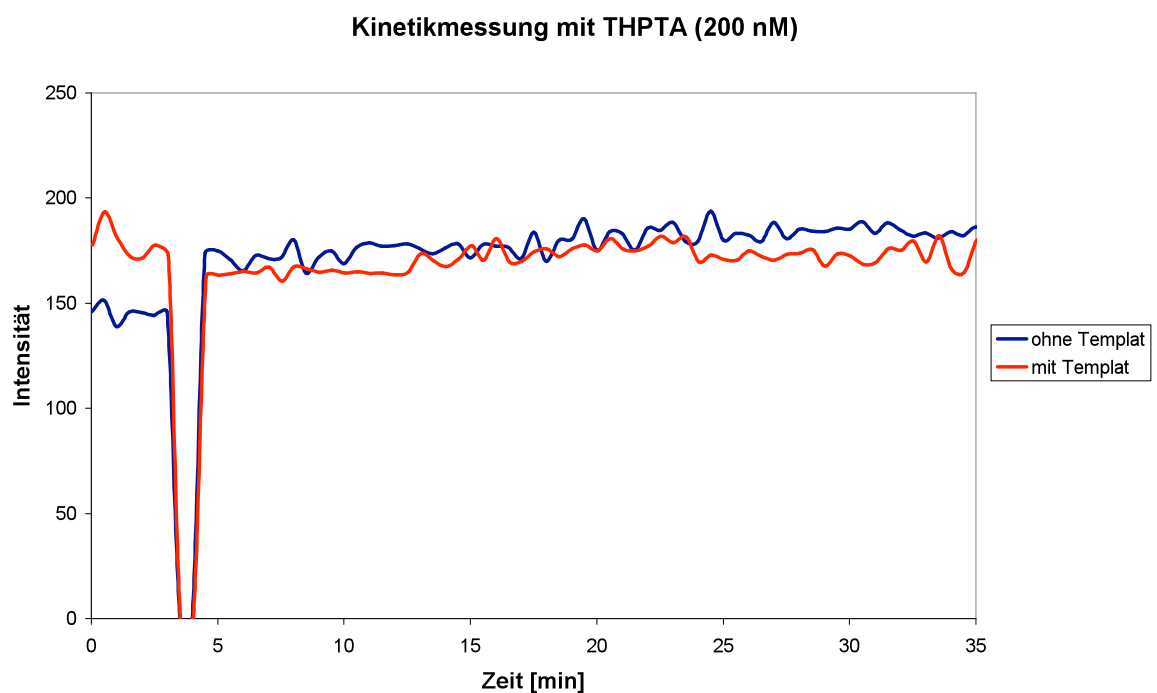
#### 4.4.3 Experimente mit THPTA

Wie in Kapitel 4.3.2 besprochen, wird die Click-Reaktion durch Zugabe von THPTA deutlich beschleunigt. Umso verwunderlicher ist es, dass die Templat-vermittelte Reaktion in Gegenwart von THPTA gar nicht ablief:  $(dF_{460\text{ nm}}/dt)_{0\sim} \sim 0$ . Es konnte sogar beobachtet werden, dass die Reaktion in Abwesenheit des Templats ein wenig schneller ablief:  $(dF_{460\text{ nm}}/dt)_{0\sim} \sim 1,5$  (Abb. 4.11).



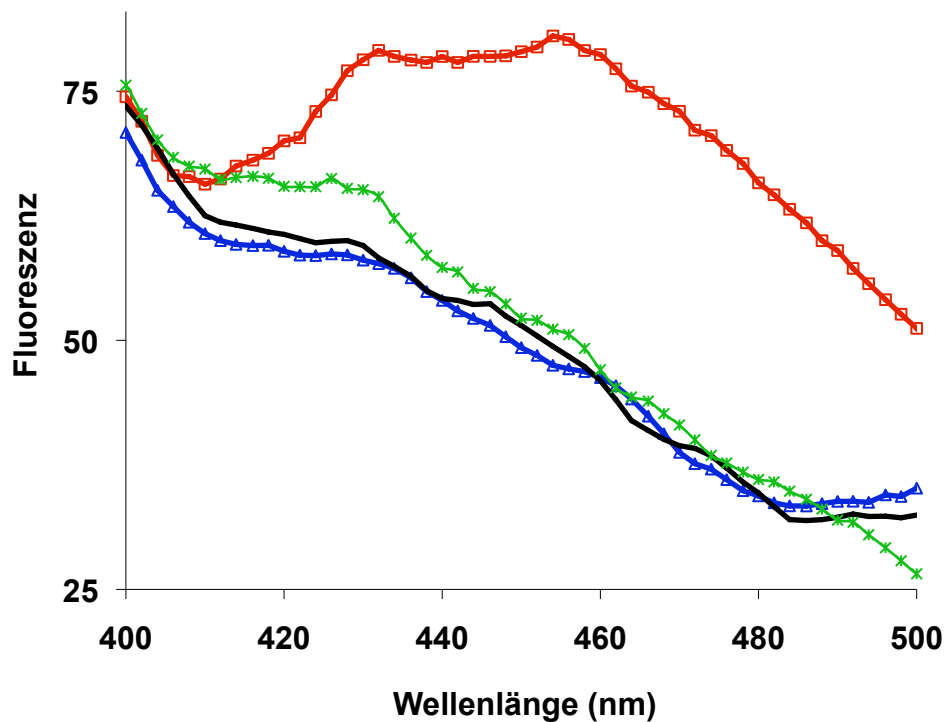
**Abb. 4.11:** Reaktion mit THPTA;  $c(\text{DNA}) = 2 \mu\text{M}$ .

Der gleiche Effekt konnte bei einer geringeren DNA-Konzentration (200 nM) beobachtet werden:  $(dF_{460 \text{ nm}}/dt)_0 = 0,3$  in Anwesenheit des Templats;  $(dF_{460 \text{ nm}}/dt)_0 = 0,5$  ohne Templat (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12:** Reaktion mit THPTA;  $c(\text{DNA}) = 200 \text{ nM}$ .

Die Untersuchung des 22-mer-Templat Systems bestätigte diese Ergebnisse. Das Phänomen kann so erklärt werden, dass das Ligationsprodukt zwar gebildet wird, aber nicht verfolgt werden kann. Eine mögliche Erklärung ist, dass während der Reaktion ein stabiles dsDNA / Cu(I)-THPTA-Assoziat gebildet wird, in welchem der angeregte Zustand des Farbstoffs durch den Cu(I)-THPTA Komplex effektiv gequencht wird. Diese Hypothese wird dadurch erhärtet, dass durch Erhitzen der Probe auf  $T = 85^\circ \text{C}$  ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten ist, was mit der Dissoziation des dsDNA / Cu(I)-THPTA-Assoziats zu erklären ist. Kein Anstieg hingegen konnte beobachtet werden, wenn entweder gar kein Templat oder aber das Mismatch-Templat vorhanden waren (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13:** Fluoreszenzspektren bei  $T = 85^\circ \text{C}$  und 200 nM DNA; 10 mM MOPS ( $\text{pH} = 7,5$ ); NaCl 150 mM;  $\text{CuSO}_4$  20  $\mu\text{M}$ ; NaAsc 100  $\mu\text{M}$ ; THPTA 60  $\mu\text{M}$ ; Triton X 0,003 %;  $\lambda_{\text{EX}} = 340 \text{ nm}$ .

**Rote Linie:** Reaktion mit Templat (200 nM) nach  $t = 17 \text{ min}$ .

**Blaue Linie:** Reaktion mit Templat (200 nM) nach  $t = 0 \text{ min}$ .

**Schwarze Linie:** Reaktion ohne Templat (200 nM) nach  $t = 17 \text{ min}$ .

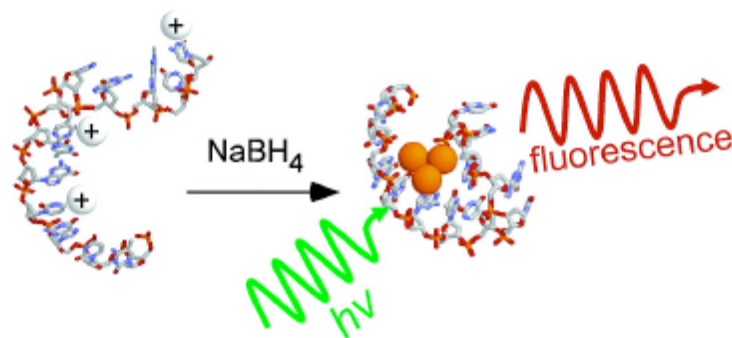
**Grüne Linie:** Reaktion mit Mismatch-Templat (200 nM) nach  $t = 17 \text{ min}$ .

## 5 Cu(0)-vermittelter DNA-Nachweis

### 5.1 Stand der Forschung

In der jüngeren Literatur wurden viele Beispiele von Anlagerungen elementarer Metalle an DNA beschrieben. Diese ist in sofern von Interesse, als dass DNA aufgrund ihrer Selbstorganisationsfähigkeit einen idealen Baustein auf dem Weg hin zu molekularen Drähten darstellt. Beschrieben wurden unter anderem die Metallierungen mit Platin <sup>[90]</sup>, Gold, Nickel oder Cobalt <sup>[91]</sup>. All diese Reaktionen beruhen im Prinzip darauf, dass das Metall-Kation zunächst elektrostatisch mit einer an einer Oberfläche gekoppelten DNA in Kontakt tritt. Im Anschluss wird ein Reduktionsmittel zugegeben und die Kationen entlang der DNA zum elementaren Metall reduziert. Die nunmehr metallierte DNA wird dann mittels Atomic Force Microscopy oder einer anderen geeigneten Methode zur Oberflächenanalytik analysiert.

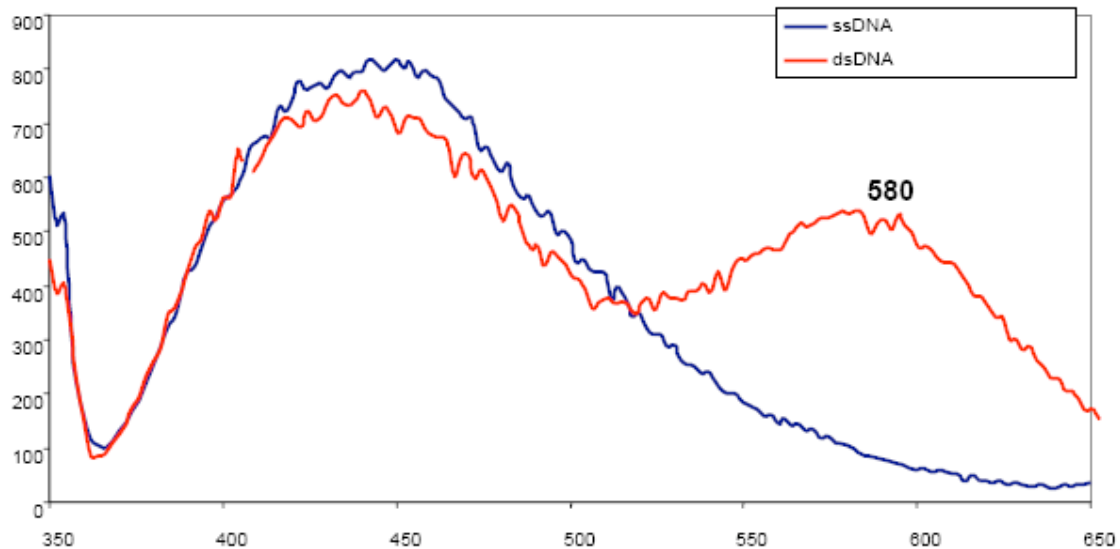
Die Möglichkeit die Metallierung von DNA in Lösung zu beobachten, wurde unter anderem von Robert M. Dickson beschrieben. <sup>[92], [93], [94], [95]</sup> Er benutzte ssDNA als Templat, an dem sich Ag<sup>+</sup>-Ionen anlagern konnten. Nach Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> entstanden kleine, in DNA eingeschlossene Ag-Nanocluster in der Größenordnung von 1-4 Ag-Atomen. Diese wasserlöslichen DNA-Metallcluster haben sehr große Absorptions- und Emissionsbanden, sind extrem photostabil und stellen somit ideale Fluorophore für die Einzelmolekülspektroskopie dar (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1:** Erzeugung metallierter DNA in Lösung nach Dickson [92].

Die Metallierung mit Kupfer wurde bereits 2003 von Adam Woolley beschrieben.<sup>[96]</sup> Diese Metallierung mittels  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  und NaAsc wurde allerdings lediglich an einer immobilisierten DNA beschrieben.

Bei den in Kapitel 4 beschriebenen Experimenten wurde beobachtet, dass bei hinreichend hoher  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) in Gegenwart von dsDNA ein zusätzlicher Peak bei 580 nm im Fluoreszenzspektrum gebildet wird (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2:** Zusätzlicher Peak bei 580 nm bei der Reduktion von Cu(II) zu Cu(0) in Gegenwart von DNA.

$\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ .  $c(\text{DNA}) = 5 \mu\text{M}$ ,  $c(\text{CuSO}_4) = 500 \mu\text{M}$ ,  $c(\text{NaAsc}) = 5 \text{ mM}$ .

Dieser Peak verschwand beim Erhitzen auf  $85^\circ \text{C}$ . Bei abermaligem Abkühlen auf  $25^\circ \text{C}$  erschien er wieder im Spektrum. Diese Beobachtungen führten zu der These, dass es sich um die Fluoreszenz von Cu-Nanoteilchen handelte. Um diese zu erzeugen, bedurfte es einer hinreichend hohen Cu-Konzentration sowie der Gegenwart von dsDNA. Da die hier untersuchte dsDNA jedoch das Fluorophor aus Kap. 4 enthielt, sollte untersucht werden, ob die Reaktion auch mit unmodifizierter DNA funktioniert. Dies wäre interessant, da dann für den Assay zur DNA-Analytik die DNA nicht erst modifiziert werden müsste, und dieser daher schnell, einfach und kosteneffizient wäre.



## 5.2 Nachweis von dsDNA

### 5.2.1 Verwendete DNA-Sequenzen

In den nachfolgenden Experimenten sollte der Einfluss der Länge der zu analysierenden DNA auf die Ausbildung der Cu-Nanoteilchen untersucht werden. Hierzu wurde eine Vielzahl verschiedener DNA-Sequenzen getestet. Um einen Test an natürlicher DNA zu imitieren, wurde jeweils eine kurze Sequenz (Probe), welche komplementär zu einem Teil einer längeren Sequenz (Target) war, getestet.

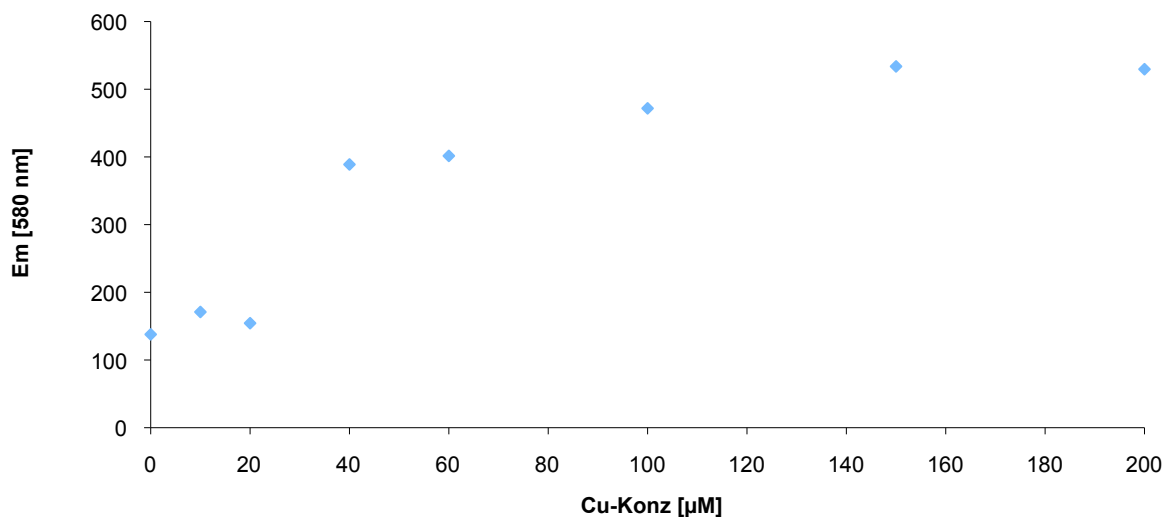
DNA	Sequenz
<b>9mer Probe</b>	5' GAA CGT ATG 3'
<b>19mer Target</b>	5' TAC TCC ATA CGT TCT GTA C 3'
<b>10mer Probe</b>	5' GTTCATCACG 3'
<b>22mer Target</b>	5' CGT GAT GAA CGT ATG AGC GTA T 3'
<b>14mer Probe</b>	5' ATG AAC GTA TGA GC 3'
<b>24mer Target</b>	5' TAC TCG CTC ATA CGT TCA TTG TAC 3'
<b>22mer Probe match</b>	5' CGT GAT GAA CGT ATG AGC GTA T 3'
<b>22mer Probe mismatch</b>	5' CGT GAT GAA CGT ATG AGC GTA T 3'
<b>32mer Target</b>	5' TAC TCA TAC GCT CAT ACG TTC ATC ACG ACT AC 3'
<b>50mer Probe</b>	5' GAG GCT CAC ACA GTA GCT GTT GTC GTT CAA CTT AAC TGC TTC CAA TGA TG 3'
<b>64mer Target</b>	5' GAG GAG GAA AAA AAC ATC ATT GGA AGC AGT TAA GTT GAA CGA CAA CAG CTA CTG TGT GAG CCT C 3'

**Tabelle 5.1:** Verwendete DNA-Sequenzen.

Tabelle 5.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Sequenzen. Die Sequenzen gleicher Farbe gehören jeweils zum selben verwendeten System.

## 5.2.2 Bestimmung der optimalen Cu-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Cu-Konzentration für die anstehenden Experimente wurde die 22-mer Probe mit dem 32mer Target in 10 mM MOPS (pH = 7,5) und 150 mM NaCl sowie 1 mM NaAsc mit unterschiedlichen Cu-Konzentrationen versetzt und die Emission bei 580 nm gemessen. In Abb. 5.3 ist das Ergebnis einer Messung zu sehen, bei der Probe und Target jeweils in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt wurden. Es zeigt sich, dass bei einer Cu-Konzentration von 150 mM eine Sättigung eintritt. In weiteren Versuchen mit geringerer DNA-Konzentration zeigte sich diese Sättigung jedoch schon bei einer Cu-Konzentration von 100 mM. Daher wurde für alle anschließenden Experimente stets eine Cu-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet.



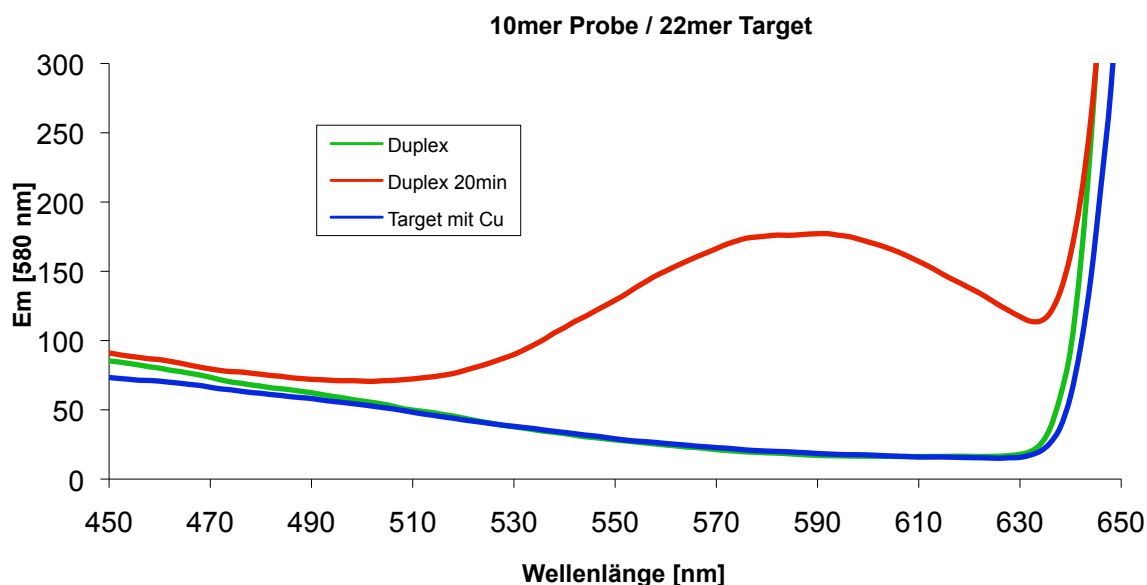
**Abb. 5.3:** Emission in Abhängigkeit von der Cu-Konzentration.  $\lambda_{\text{Ex}} = 340$  nm.

Die Anregungswellenlänge betrug bei allen anschließenden Experimenten  $\lambda_{\text{Ex}} = 340$  nm und die Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{Em}} = 580$  nm.

### 5.2.3 DNA-Nachweis mit dem 10mer Probe / 22mer Target-System

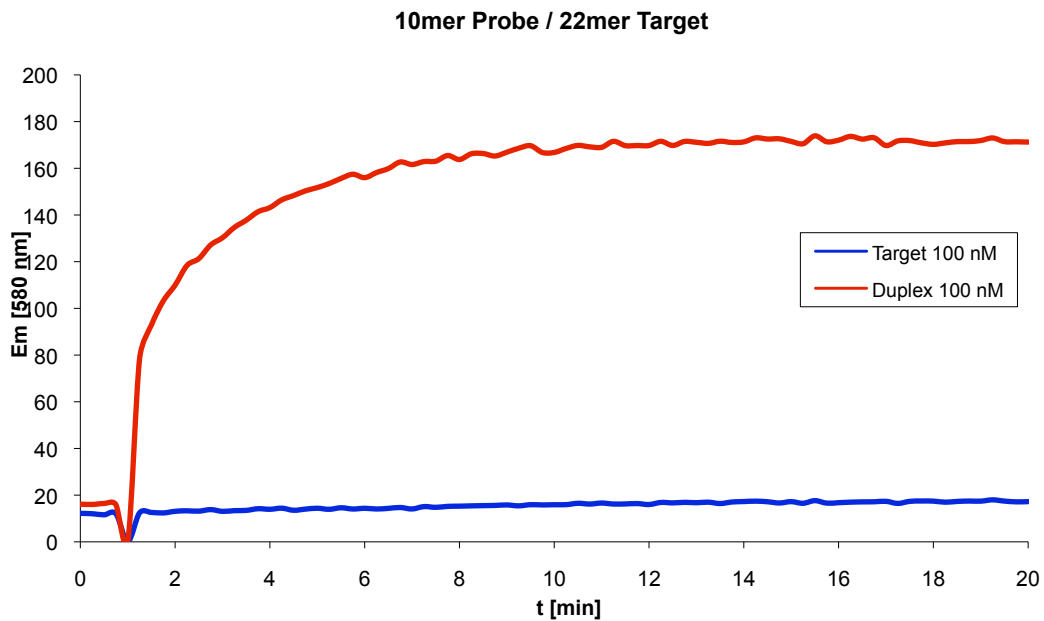
Beim anschließenden Testen der verschiedenen DNA-Sequenzen für den Cu-Assay erwies sich die in Tabelle 5.1 aufgeführte 9-mer Probe / 19-mer Target Kombination als nicht nutzbar. Zwar konnte eine Reaktion beobachtet werden, jedoch war diese derart ineffizient, dass sehr hohe Mengen an DNA benötigt wurden, um ein zufriedenstellendes Signal- zu Hintergrunds-Verhältnis zu erhalten. Deshalb werden diese Ergebnisse nicht weiter aufgeführt.

Die etwas längere 10-mer Probe / 22-mer Target Kombination zeigte bereits vielversprechende Ergebnisse. Abb. 5.4. zeigt das Fluoreszenzverhalten bei einer 100 nM DNA-Konzentration. Wird lediglich die 22-mer Target-DNA mit Kupfer und NaAsc inkubiert, ist keine Reaktion zu erkennen. Versetzt man jedoch die 10-mer Probe / 22-mer Target Duplex mit Kupfer und NaAsc, so ist bei Messung nach 21 Minuten ein deutliches Maximum bei 580 nm zu erkennen.



**Abb. 5.4:** Scan des 10-mer Probe / 22-mer Target-Systems.  $c(\text{DNA}) = 100 \text{ nM}$ .

Es ist deutlich zu sehen, daß die Fluoreszenz bei 580 nm nur auftritt, wenn eine DNA-Duplex zugegen ist. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine Kinetik der Fluoreszenzzunahme aufgenommen. Diese ist in Abb. 5.5 dargestellt.



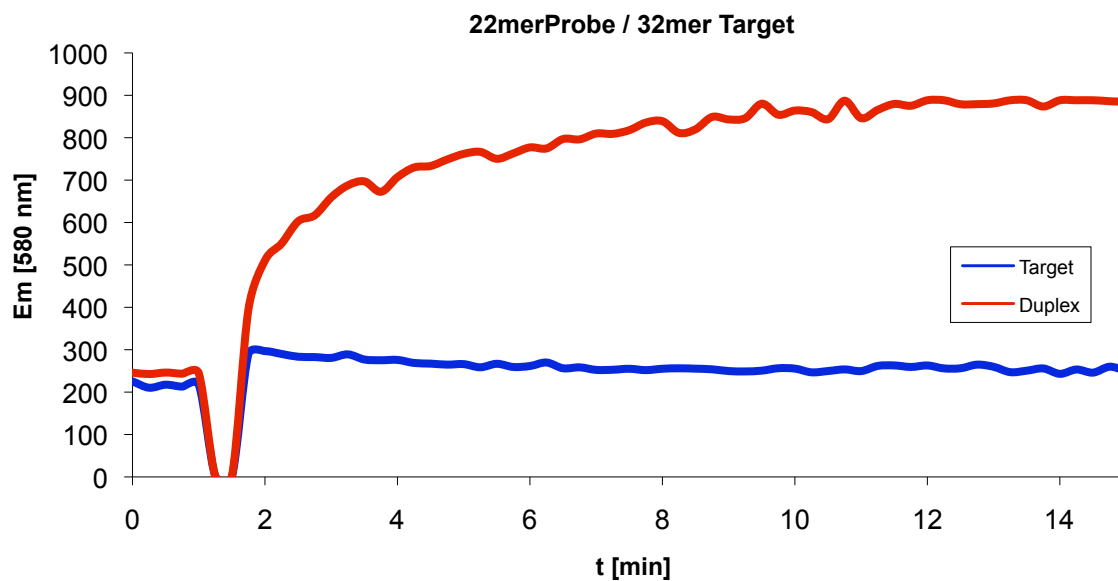
**Abb. 5.5:** Kinetik der Fluoreszenzzunahme des 10-mer Probe / 22-mer Target-Systems.  $c(\text{DNA}) = 100 \text{ nM}$ .

Es ist gut zu erkennen, dass die Reaktion rasch abläuft. Bereits nach 8 Minuten ist eine Sättigung erreicht. Um die Detektionsgrenze des 10-mer Probe / 22-mer Target-Systems zu bestimmen, wurde eine zusätzliche Messung mit 10 nM DNA durchgeführt. Jedoch konnte hier keine nennenswerte Steigung festgestellt werden. Ausgehend von der Annahme, dass die Fluoreszenz umso stärker ist, je mehr Kupfer in die DNA eingelagert werden kann, ist zu erwarten, dass die Detektionsgrenze bei längeren Probe / Target-Systemen bedeutend niedriger liegt.

## 5.2.4 DNA Nachweis an längeren DNA-Systemen

An längeren Systemen wurden das 14-mer Probe / 24-mer Target-System, das 22-mer Probe / 32-mer Target-System, das 3-2mer Probe / 32-mer Target-System sowie das 50-mer Probe / 64-mer Target-System untersucht.

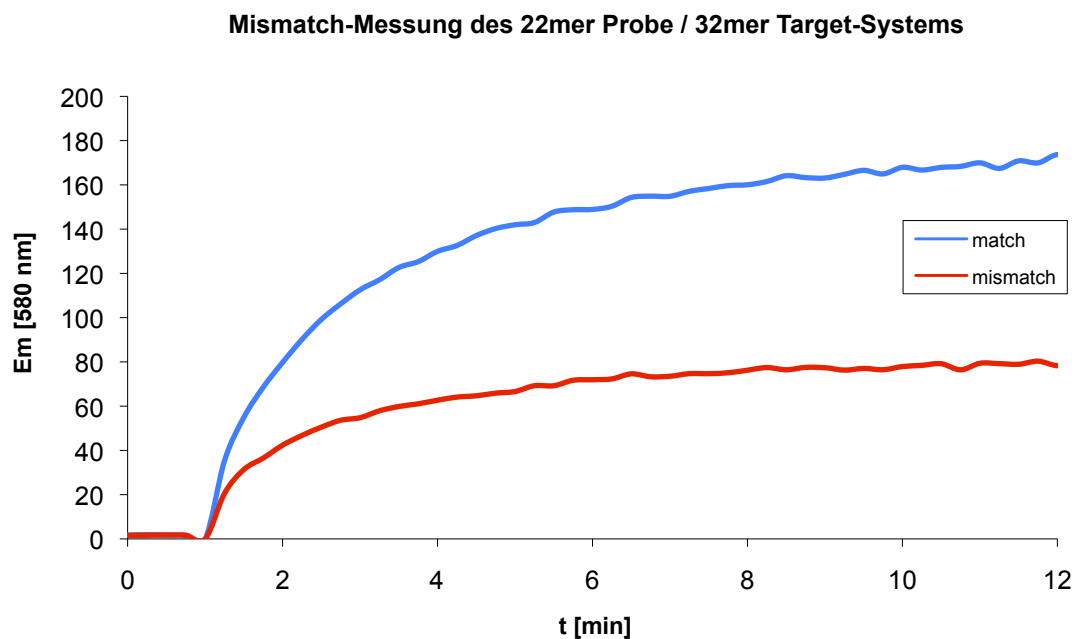
Wie erwartet, konnte die Detektionsgrenze entschieden gesenkt werden. Dies ist beispielhaft anhand von Abbildung 5.6 illustriert.



**Abb. 5.6:** Kinetik der Fluoreszenzzunahme des 22mer Probe / 32mer Target-Systems.  
 $c(\text{DNA}) = 10 \text{ nM}$ .

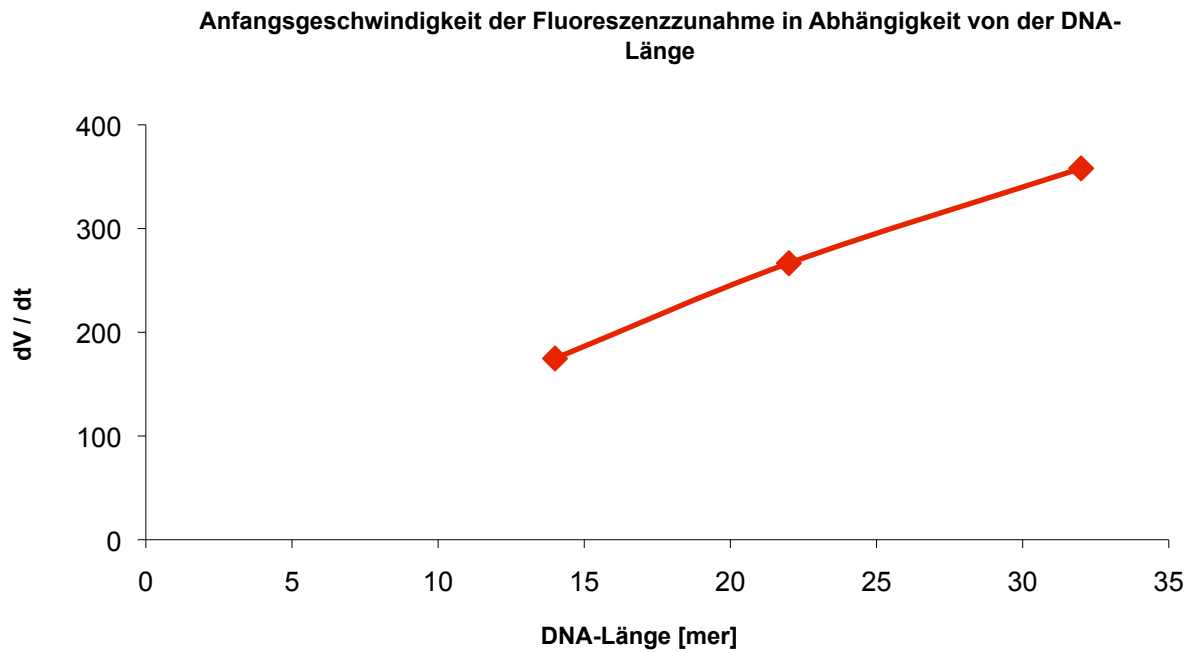
Es ist deutlich zu erkennen, dass 10 nM DNA problemlos nachweisbar sind. In der Folge wurden weitere Kinetiken mit immer geringeren DNA-Konzentrationen gemessen. So konnte das 14-mer Probe / 24-mer Target-System bis zu 3,5 nM und das 22-mer Probe / 32-mer Target-System gar bis 1 nM nachgewiesen werden. Es war zu erwarten, dass die Nachweisgrenze des 50-mer Probe / 64-mer Target-Systems noch niedriger liegen würde. Jedoch ist in diesem System die Hintergrundreaktion (nur 64-mer Target) bereits relativ hoch. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich bei dieser Länge unspezifische DNA-Strukturen ausbilden, welche ebenfalls in der Lage sind, Kupfer einzulagern. Es stellte sich heraus, dass dieses System schlechter für den Cu-Assay geeignet war als beispielsweise das 22-mer Probe / 32-mer Target-System.

Da sich das 22-mer Probe / 32-mer Target-System als das beste von uns getestete System herausgestellt hatte, wurde anhand dieses Systems noch eine Mismatch-Messung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass trotz einer relativ hohen Hintergrundreaktion des Mismatch-Paares eine deutliche Mismatch-Diskriminierung vorhanden war (Abb. 5.7).



**Abb. 5.7:** Mismatchmessung des 22-mer Probe / 32-mer Target-Systems.  
 $c(\text{DNA}) = 200 \text{ nM}$ .

Um den Einfluss der DNA-Längen darzustellen, wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der jeweiligen Reaktionen bei einer Konzentration von 10 nM DNA gegen die Länge des verwendeten DNA-Targets aufgetragen (Abb. 5.8). Die Werte für das 9-mer und das 50-mer sind nicht abgebildet, da das 9-mer bei dieser Konzentration nicht messbar war und das 50-mer keine vernünftigen Ergebnisse mehr lieferte. Die Zunahme der Anfangsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der DNA-Länge ist deutlich erkennbar.



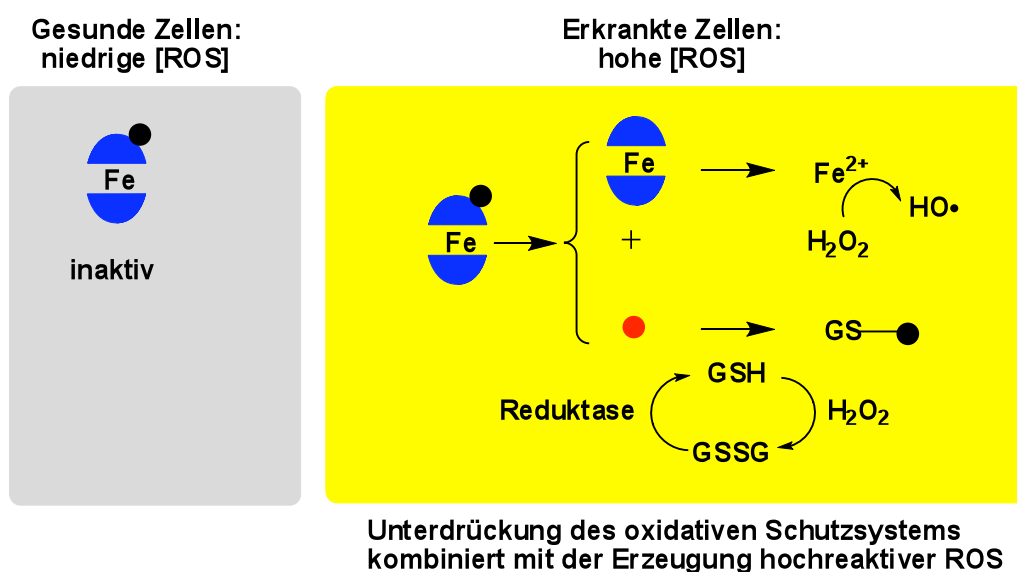
**Abb. 5.8:** Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der DNA-Länge.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorgestellte Reaktion einen einfachen, schnellen und zuverlässigen Nachweis für DNA-Doppelstränge einer Länge von 14-32 Basenpaaren ermöglicht.

## 6 Ferrocenbasierte Cytostatika

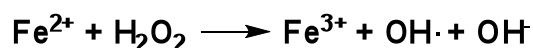
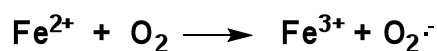
### 6.1 Ansatz

In Abbildung 6.1 ist das Konzept dieses Teils der Arbeit schematisch dargestellt. Ein auf Ferrocen basierender Redoxregulator soll erkrankte Zellen hochselektiv töten. Eine gesunde Zelle besitzt eine niedrige ROS-Konzentration. Unter diesen Bedingungen ist der Redoxregulator stabil und untoxisch (graue Box). Eine erkrankte Zelle zeigt eine hohe ROS-Konzentration. Unter diesen Bedingungen zersetzt sich der Redoxregulator und setzt dabei toxische Komponenten frei (gelbe Box). So wird ein Fe(II) freigesetzt, welches in der Lage ist, hochreaktive ROS zu erzeugen (Schema 6.1),<sup>[97]</sup> zum anderen wird eine ROS-empfindliche Schutzgruppe (schwarzer Punkt) in ein Chinonmethid-Derivat umgewandelt (roter Punkt). Dieses starke Nukleophil kann mit freiem Glutathion (GSH) in der Zelle reagieren und es irreversibel deaktivieren. Als Folge steigt die ROS-Konzentration innerhalb der Zelle immer weiter an. Aufgrund dieses dualen Wirkmechanismus – Erzeugung neuer hochreaktiver ROS kombiniert mit der Unterdrückung des oxidativen Schutzsystems – sollte es möglich sein, erkrankte Zellen hochselektiv und sehr effektiv zu töten.



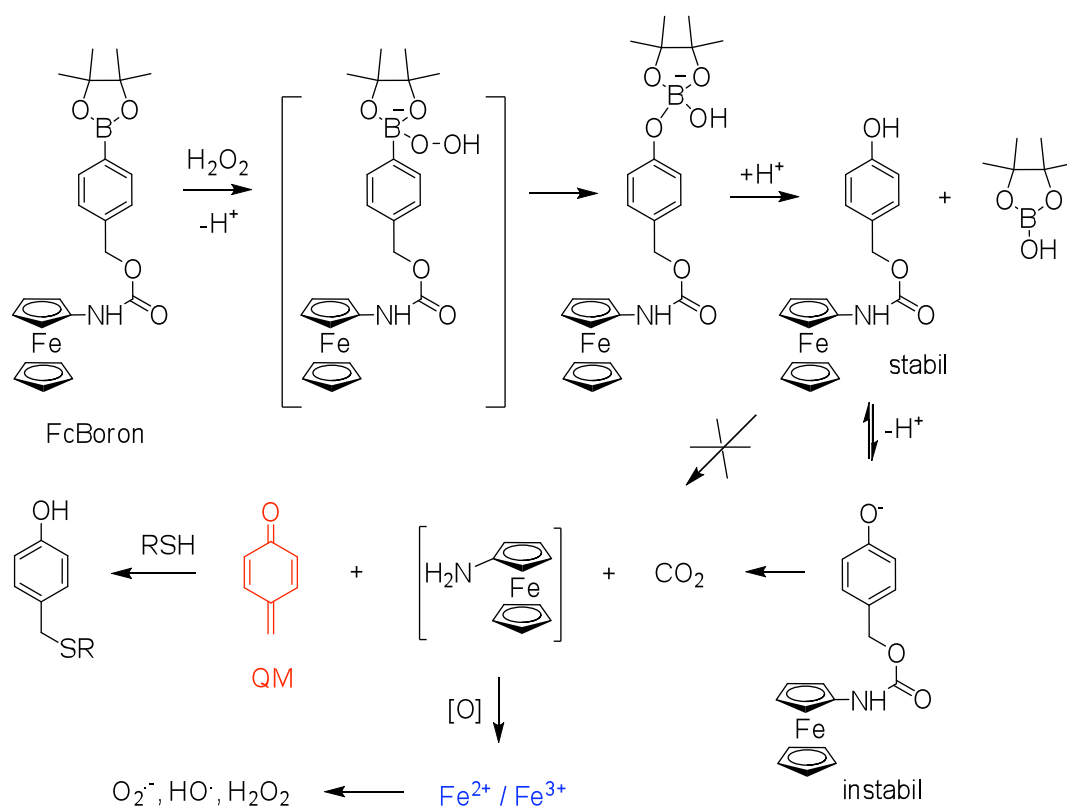
**Abb. 6.1:** Postulierter Wirkmechanismus des zu entwickelnden Cytostatikums.





**Schema 6.1:** Fe-katalysierte Generierung von ROS.

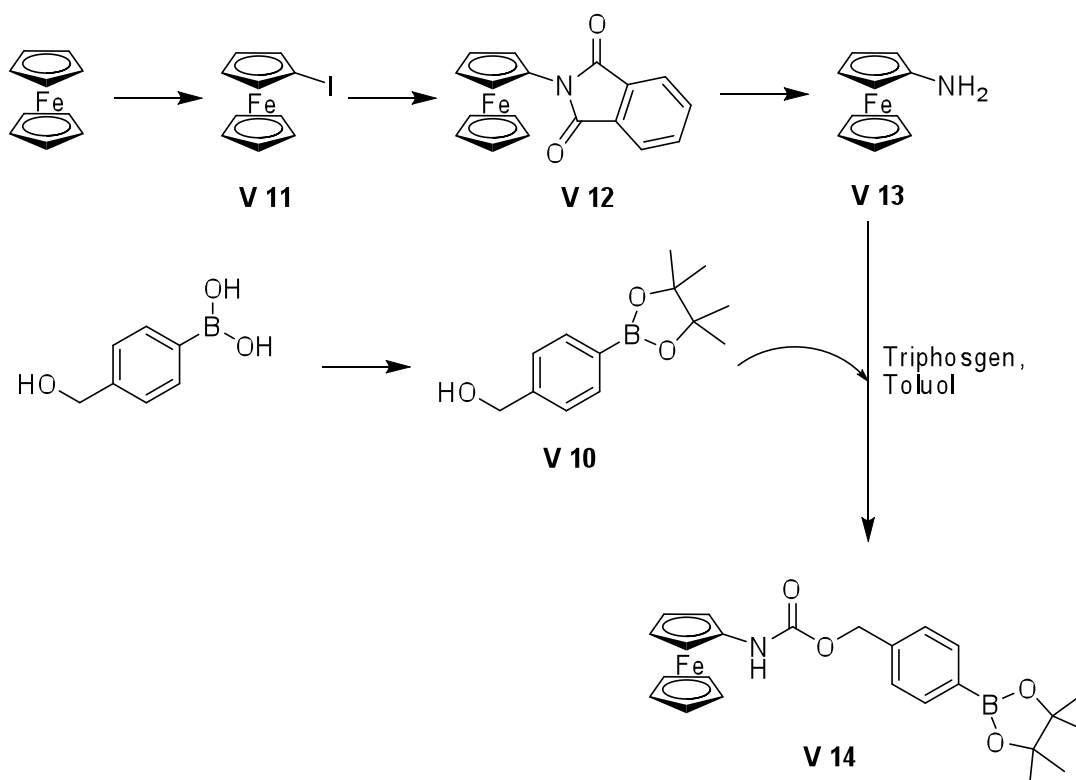
Eine konkretere Beschreibung ist Schema 6.2 zu entnehmen. Die Substanz FcBoron **V 14** ist stabil bei einem pH-Wert von 7,5. In Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird die Substanz jedoch schnell zersetzt. Der erste Schritt der Reaktion besteht in der Anbindung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an das Bor-Atom unter Ausbildung eines Bor-analogen Hydroperoxids. In Folge einer Umlagerung kommt es zur Spaltung der B-C-Bindung unter Ausbildung eines stabilen Phenolfragments. Dieses steht im Gleichgewicht mit dem instabilen Phenolat, welches in einer 1,6-Eliminierungsreaktion zu Chinonmethid (QM) und Aminoferrocen zerfällt. Die Bildung des Chinonmethids konnte mittels DC-Chromatographie und ESI-MS nachgewiesen werden. Das Aminoferrocen ist an Luft bei  $\text{pH} > 7$  instabil und setzt Fe-Ionen frei.



**Schema 6.2:** Mechanismus der FcBoron-Zersetzung.

## 6.2 Synthese

Die Synthese des FcBoron **V 14** ist in Schema 6.3 dargestellt. Zunächst wurde Aminoferrrocen **V 13** in einer dreistufigen Synthese synthetisiert. <sup>[98]</sup> Der Hydroxymethyl-boronsäurepinakolester **V 10** wurde in einem Schritt aus der entsprechenden Borsäure erhalten. Die beiden Moleküle wurden schließlich mittels Triphosgen in Toluol gekoppelt.



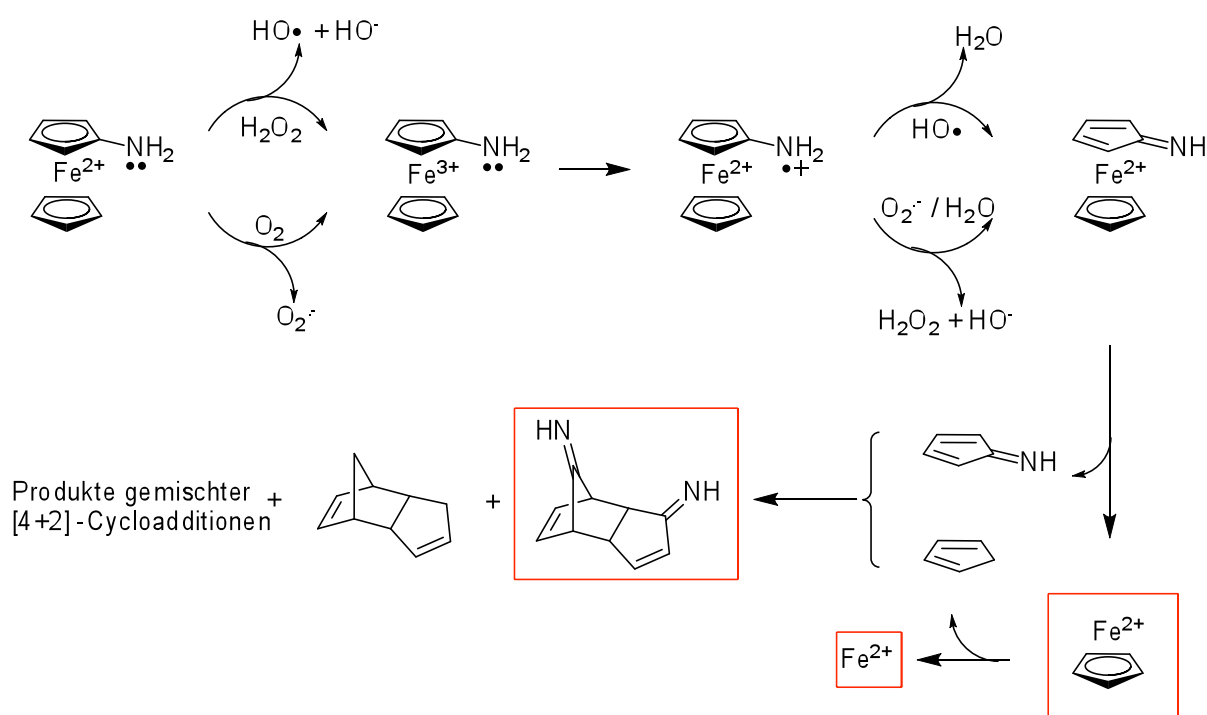
**Schema 6.3:** Synthese von FcBoron **V 14**.

## 6.3 Vorversuche

### 6.3.1 Zersetzung von Aminoferrocen in Gegenwart von $\text{H}_2\text{O}_2$

Die Oxidation von Aminoferrocen **V 13** ( $40 \mu\text{M}$ ) an Luft bei  $\text{pH}=7,5$  startet nach einer Verzögerungsphase von  $\sim 5$  min, nach der sie innerhalb von 30 Sekunden komplett abläuft. Dies ist charakteristisch für einen autokatalytischen Prozess. Offensichtlich dient Sauerstoff als Initiator dieser Reaktion, da Aminoferrocen unter anaeroben Bedingung sogar bei stark basischen pH-Werten von  $\text{pH}>12$  stabil ist.

In Gegenwart von 0,1 Äquivalenten  $\text{H}_2\text{O}_2$  hingegen, wird die Verzögerungsphase auf 30 Sekunden herabgesetzt. Der postulierte Mechanismus dieser Reaktion ist Schema 6.4 zu entnehmen.



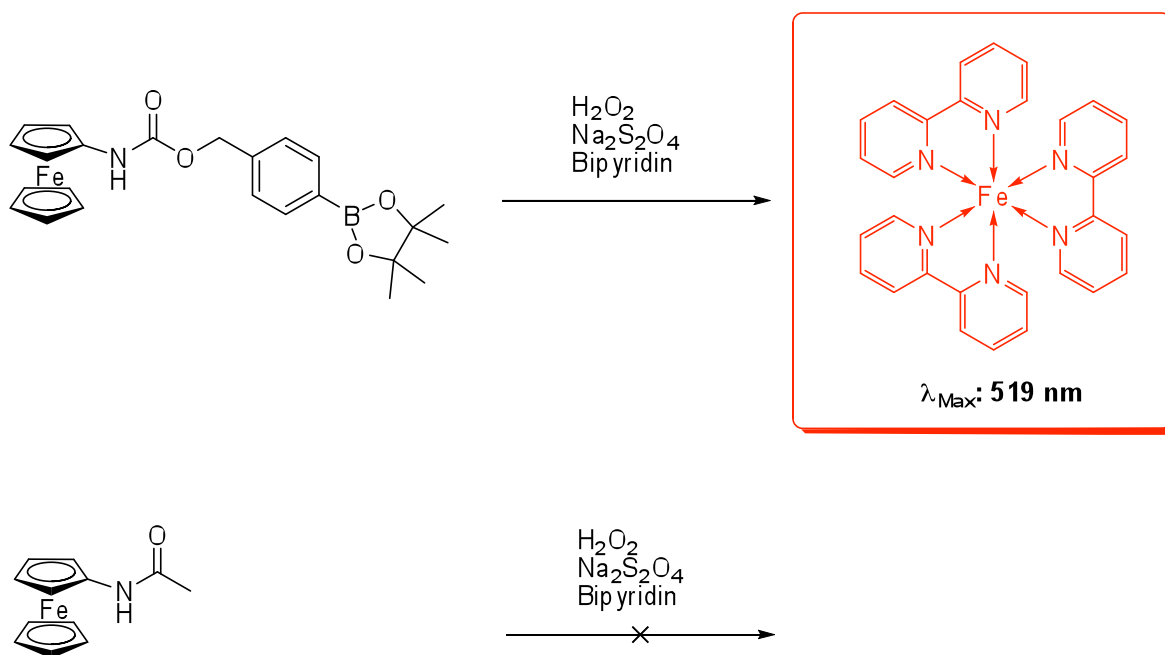
**Schema 6.4:** Postulierter Mechanismus der Fe(II)-Freisetzung; nachgewiesene Spezies sind rot eingrahmt.

Zunächst reagiert Aminoferrocen ( $\text{FcNH}_2$ ) sehr langsam mit molekularem  $\text{O}_2$ , wobei das Superoxidanionradikal  $\text{O}_2^-$ , sowie  $\text{FcNH}_2^+$  entstehen. Das  $\text{FcNH}_2^+$  wird weiter oxidiert, wobei letztlich  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Fe(II), Cyclopentadien und Iminocyclopentadien

entstehen. Die freiwerdenden Fe(II)-Ionen katalysieren die Produktion weiterer ROS. Da freies Fe(II) die Produktion von ROS wesentlich stärker katalysiert als FcNH<sub>2</sub>, verläuft die Zersetzung des Aminoferrocen letztlich autokatalytisch.

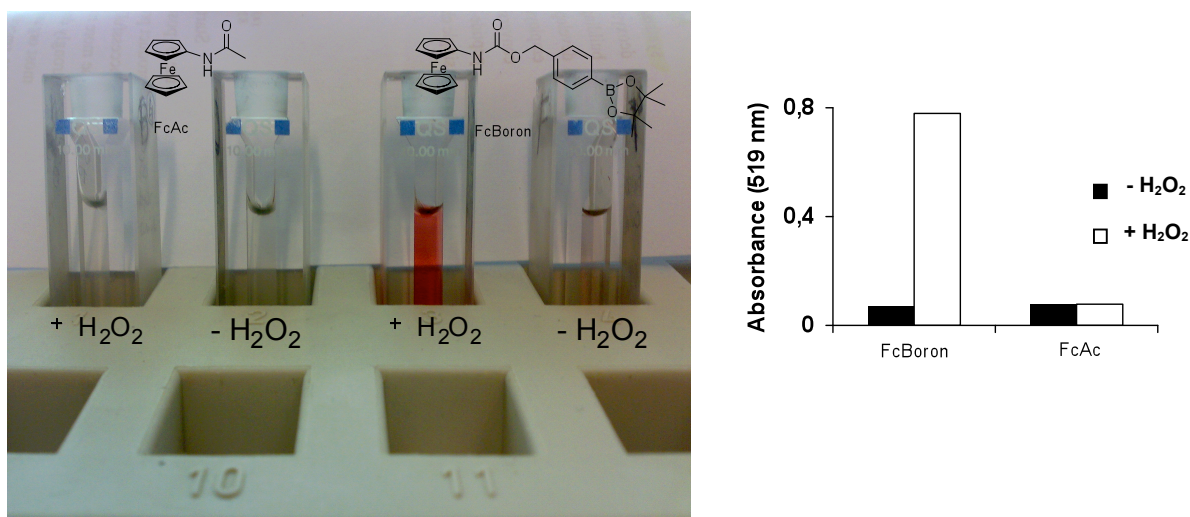
Einige Spezies, welche nach dem postulierten Mechanismus entstehen sollten, konnten experimentell nachgewiesen werden. So wurden FcNH<sub>2</sub>-Lösungen in CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O (9:1) für 100 Minuten der Luft ausgesetzt und anschließend mittels ESI-MS analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass der FcNH<sub>2</sub>-Peak (*m/z* 201,01) mit fortlaufender Reaktionszeit verschwand und gleichzeitig zwei neue, dominante Peaks (*m/z* 132,10 und 162,11), sowie ein weniger intensiver Peak (*m/z* 159,10) erschienen. Die beiden dominanten Peaks wiesen ein Isotopenmuster auf, welches charakteristisch für eisenhaltige Substanzen ist. Der weniger intensive Peak deutete seinem Isotopenmuster nach auf eine organische Verbindung hin. Anhand der erhaltenen Massen sowie deren Isotopenmuster wurden die Peaks schließlich den Spezies [Fe(CH<sub>3</sub>CN)(H<sub>2</sub>O)(OH)]<sup>+</sup>, [FeCp(CH<sub>3</sub>CN)]<sup>+</sup> sowie dem Iminocyclopentadien-Dimer ([M+H]<sup>+</sup>) zugeordnet.

Die Freisetzung von Fe(II) wurde mittels eines 2,2'-Bipyridin-Assays nachgewiesen (Schema 6.5).



**Schema 6.5:** Colorimetrisches 2,2'-Bipyridin-Assay zur Bestimmung der Fe(II)-Freisetzung.

Hierzu wurden in 100 mM MOPS-Puffer (pH=7,5) jeweils 100  $\mu\text{M}$  FcBoron **V 14**, bzw. 100  $\mu\text{M}$  einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -unempfindlichen Kontrollsubstanz FcAc (acetyliertes Aminoferrocen) für 100 min bei RT in An- bzw. Abwesenheit von 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert. Danach wurde jeweils  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (20 mM) zugegeben, um sicherzustellen, daß evtl. vorhandenes Fe(III) zu Fe(II) zurückreduziert wurde. Nach Zugabe von 2,2'-Bipyridin (300  $\mu\text{M}$ ) wurde die Absorption bei 519 nm gemessen, um zu überprüfen, ob sich der tiefrote  $[\text{Fe}(\text{bipy})_3]^{2+}$ -Komplex gebildet hatte. Wie aus Abbildung 6.2 ersichtlich, reagierten die beiden Substanzen wie erwartet. Die Kontrollsubstanz FcAc setzte überhaupt keine Eisen frei. FcBoron **V 14** setzte nur in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  Eisen frei, wohingegen das Molekül in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  stabil war.

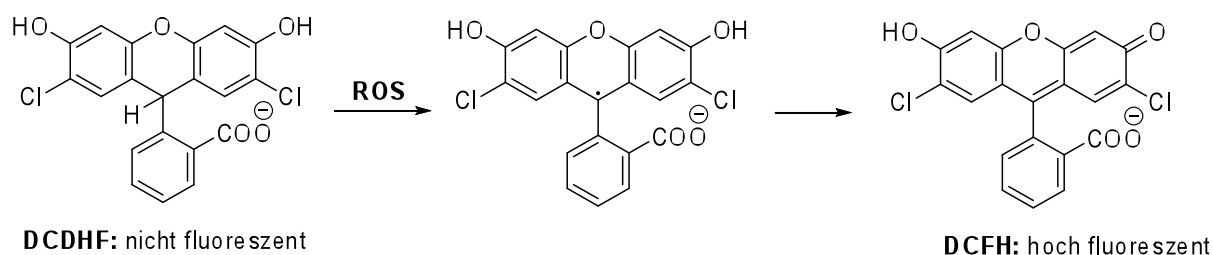


**Abb. 6.2:** Ergebnisse des 2,2'-Bipyridin-Assays.

Es lässt sich festhalten, dass FcBoron **V 14** in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wie erwartet nicht stabil war. Einige der zu erwartenden Abbauprodukte konnten zweifelsfrei nachgewiesen werden. Eine wichtige, zu klärende Frage war jedoch die Frage nach dem Maß der ROS-Produktion der beiden Substanzen FcBoron **V 14** und FcAc.

### 6.3.2 Untersuchung der ROS-Produktion in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Um die Produktion von ROS zu untersuchen, wurde der nichtfluoreszente Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (**DCDHF**) verwendet, welcher aus dem kommerziell erhältlichen, acetylierten Farbstoff **DCFH-DA** erhalten wurde. 2',7'-Dichlorofluorescein (**DCFH**) wird von Hydroxylradikalen OH<sup>•</sup> zum fluoreszenten Farbstoff 2',7'-Dichlorofluorescein (**DCFH**) oxidiert (Schema 6.6).

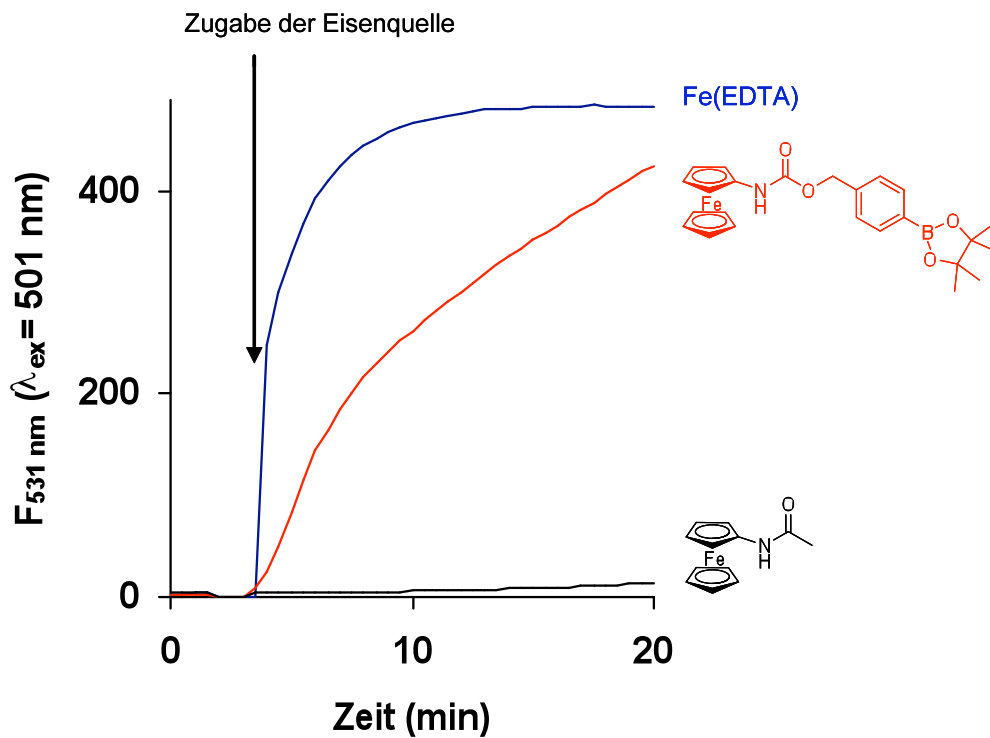


**Schema 6.6:** Bildung des Fluoreszenzfarbstoffs DCFH durch ROS.

Der Gehalt an DCFH stellt somit ein Maß für den Gehalt an ROS in einer Lösung dar. Die ROS-Produktion kann demnach mittels einer Fluoreszenz-Kinetik verfolgt werden.

Drei Verbindungen wurden für diesen Versuch verwendet: Fe(EDTA) als Positivkontrolle, FcBoron **V 14** als die zu untersuchende Substanz und FcAc als Negativkontrolle.

In 100 mM MOPS-Puffer (pH=7,5) wurden zunächst 5 mM Glutathion, 10 µM DCDHF und 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorgelegt. Danach wurde eine Fluoreszenzkinetik gestartet ( $\lambda_{\text{EX}} = 501 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{EM}} = 531 \text{ nm}$ ). Nachdem das erhaltene Fluoreszenzsignal stabil war, wurden 100 µM der jeweiligen Eisenquelle zugegeben. Wie erwartet, stieg das Signal im Falle der Positivkontrolle Fe(EDTA) schlagartig an. Auch die Zunahme der Fluoreszenz nach Zugabe des FcBoron **V 14** war deutlich. Die Zunahme der Fluoreszenz bei Zugabe der Negativkontrolle ist zu vernachlässigen (Abb. 6.3).



**Abb. 6.3:** ROS-Produktion in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und einer Eisenquelle.

Dieses Experiment beweist, dass FcBoron **V 14** in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht nur Fe(II) freisetzt, sondern auch – wie erwartet – ROS produziert. Die Kontrollsubstanz FcAc tat dies nicht.

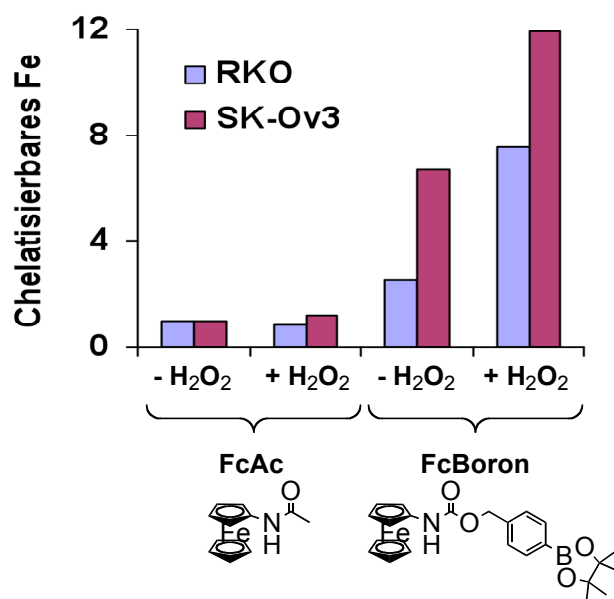
Als nächster Schritt stand somit die Untersuchung der Zelltoxizität dieser Substanzen an.

## 6.4 Zellversuche

Sämtliche beschriebenen Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe Prof. Dr. Zeller vom DKFZ durchgeführt. Als Versuchsobjekte dienten RKO- und SKOV3-Zelllinien. Vor allem SKOV3-Zelllinien sind bekannt dafür, sowohl hohe Mengen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu produzieren, als auch dem hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt widerstehen zu können. <sup>[99]</sup>

### 6.4.1 Untersuchung der Eisenfreisetzung in Zellen

Sowohl RKO- als auch SKOV3-Zelllinien wurden entweder mit FcBoron **V 14** oder FcAc (je 100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  / Medium (10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in RPMI-Medium) oder nur mit Medium versetzt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden die Zellen dann lysiert und mit dem bereits beschriebenen 2,2'-Bipyridin-Assay untersucht. Es stellte sich heraus, dass FcBoron **V 14** in beiden Zelllinien Eisen freisetzt. Die Freisetzung wurde durch die Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  noch verstärkt. Die Kontrollsubstanz FcAc setzte kein Eisen frei (Abb. 6.4). Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen der in Abb. 6.2 gezeigten in vitro-Experimente.

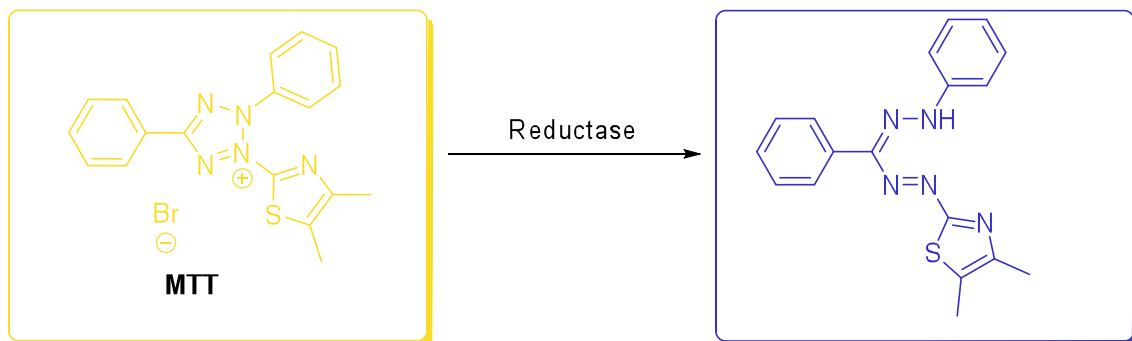


**Abb. 6.4:** Relative Konzentration an chelatisiertem Eisen in Zellen.



### 6.4.2 Untersuchung der Zellkillaktivität

Um die Zytotoxizität der jeweiligen Substanzen zu untersuchen, wurden MTT-Assays durchgeführt. MTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), welches in lebenden Zellen zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird (Schema 6.7).



**Schema 6.7:** *in vivo*-Reduktion von MTT zu blau-violetten Formazan.

Das Maß der Blaufärbung lässt demnach einen direkten Rückschluss über die Anzahl lebender Zellen zu.

Als Positivkontrolle wurde der zellgängige Eisen-8-Hydroxychinolinkomplex  $[\text{Fe}(\text{8HQ})_2]^+$  <sup>[100]</sup> gewählt. Unter unseren Bedingungen ist der freie 8-Hydroxychinolinligand untoxisch, wohingegen der Eisenkomplex eine hohe Toxizität aufweist ( $\text{IC}_{50} < 5 \mu\text{M}$ ). Im Gegensatz dazu zeigt die Negativkontrolle FcAc keinerlei Toxizität selbst bei Konzentrationen bis zu 250  $\mu\text{M}$ . FcBoron **V 14** jedoch weist eine deutliche Toxizität auf, wenn auch nicht so stark wie die des  $[\text{Fe}(\text{8HQ})_2]^+$ . So lagen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für FcBoron bei  $\sim 125 \mu\text{M}$  für SKOV3-Zelllinien und bei  $\sim 80 \mu\text{M}$  für RKO-Zelllinien. Die Daten für die SKOV3-Zelllinien sind Abb. 6.5 zu entnehmen.

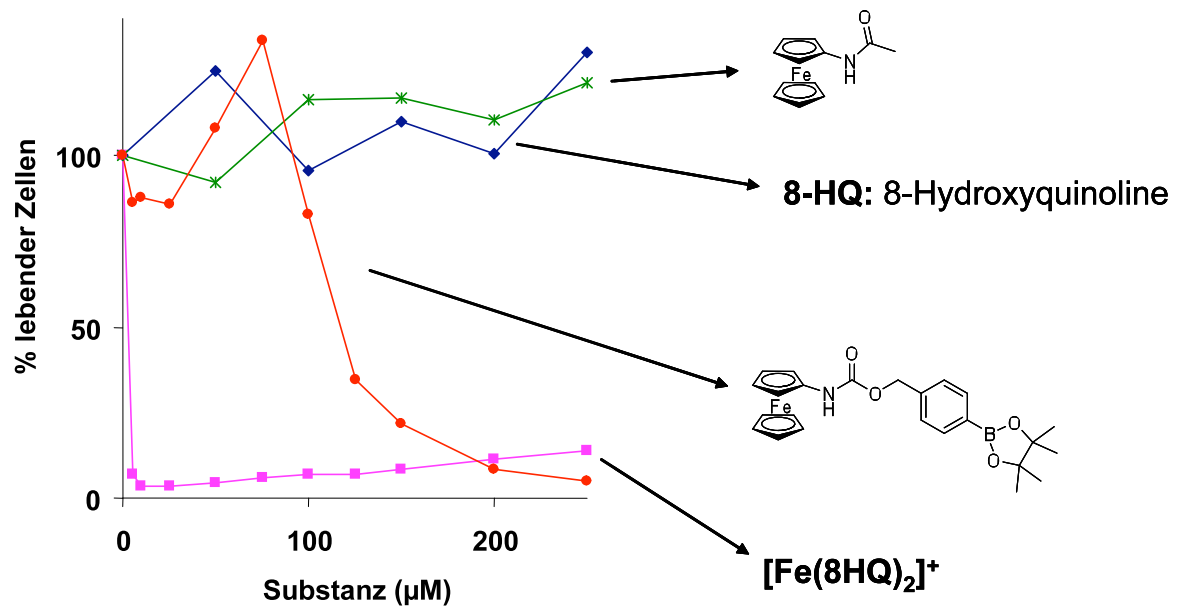


Abb. 6.5: Ergebnisse des MTT-Assays für SKOV3-Zelllinien.

Mit diesem Experiment konnte klar gezeigt werden, dass FcBoron **V 14** eine höhere Toxizität besitzt als FcAc. Jedoch gibt dieses Experiment keinen Aufschluss darüber, wieso FcBoron **V 14** toxisch wirkt. Die Toxizität könnte sowohl auf dem in Kapitel 6.1 postulierten Mechanismus beruhen oder als auch auf die Eigentoxizität der Substanz. Um dies zu klären, wurden weitere Experimente an gentechnisch veränderten Zelllinien durchgeführt.

### 6.4.3 Untersuchung der Zellkillaktivität bei transduzierten Zelllinien

Um zu überprüfen, ob die Toxizität des FcBoron **V 14** auf dem postulierten Mechanismus aus Kapitel 6.1 oder auf Eigentoxizität beruht, wurden Experimente an transduzierten Zelllinien durchgeführt.

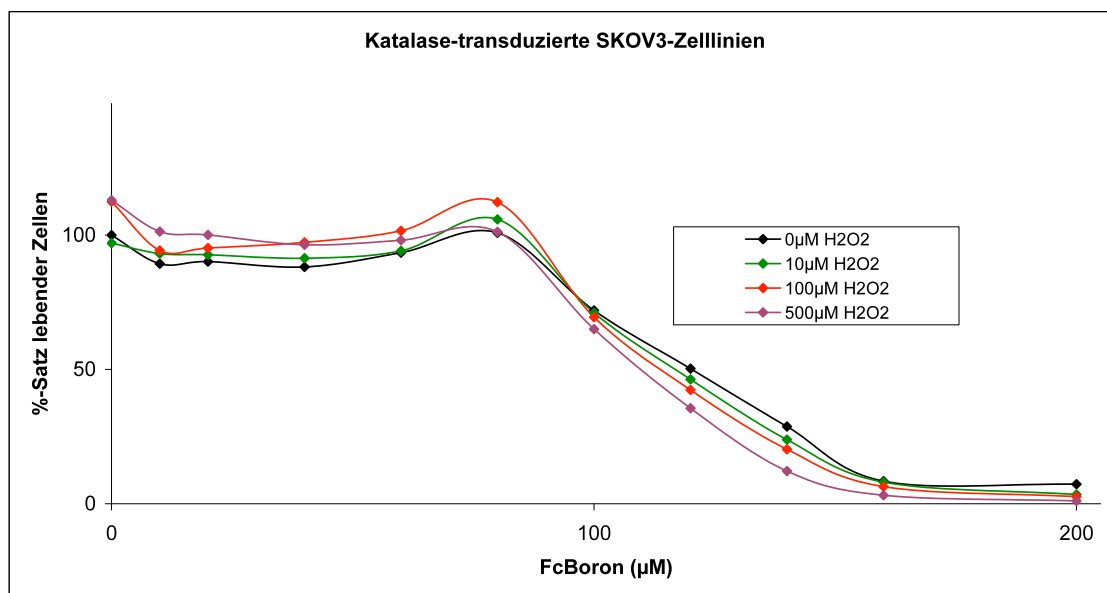
Hierbei handelt es sich um Zellen, die mit einem lentiviralen Vektor transduziert wurden, welcher ein Gen für ein bestimmtes Protein enthält. Durch diese Prozedur wird das entsprechende Protein in der Zelle überexprimiert.

Unter anderem wurden die Zellen mit einem Vektor transduziert, welcher für die Überexpression des Enzyms Katalase verantwortlich ist. Dieses Enzym katalysiert die Disproportionierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$ .

Zusätzlich wurde eine Kontrollzelllinie geschaffen, die integrierte Kopien eines irrelevanten Kontrollgens enthielt. Dieses Gen war in umgekehrter Richtung (invers) eingebaut. Ursprünglich kodierte dieser Abschnitt das Enzym Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD). Durch den inversen Einbau (MnSODi) konnte jedoch bei der Translation kein funktionelles Protein gebildet werden. Dadurch wird für die Experimente sichergestellt, dass der beobachtete Effekt nicht auf einem durch die gentechnische Veränderung hervorgerufenen Artefakt beruht.

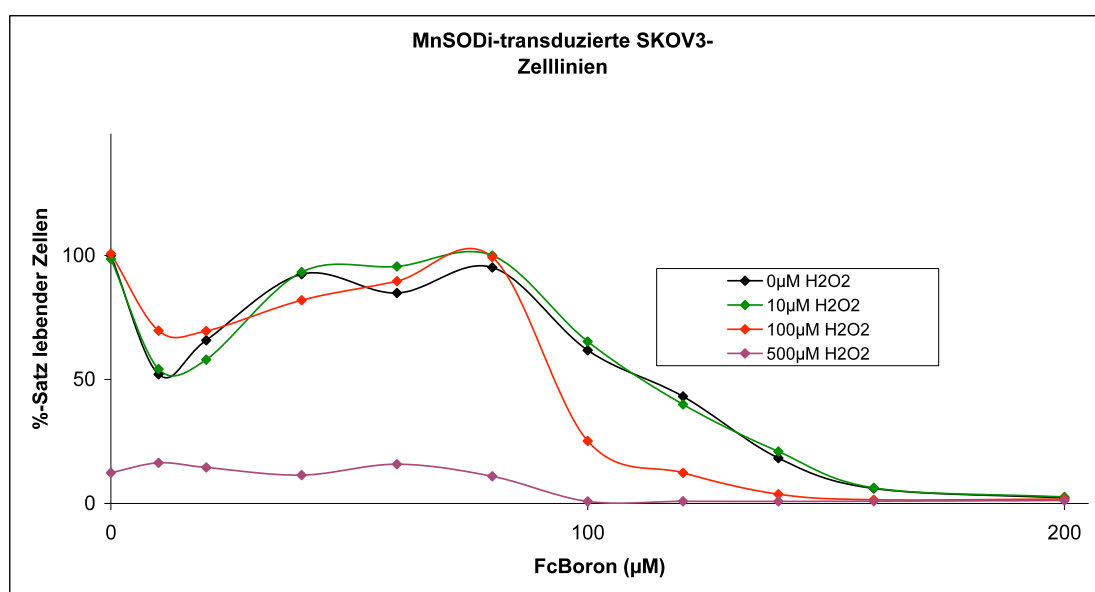
Beide Zelllinien wurden mit FcBoron und unterschiedlichen Mengen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Da das FcBoron **V 14** von  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktiviert wird, sollte man erwarten, dass das FcBoron **V 14** bei den MnSODi-transduzierten Zellen unterschiedliche Zellkillaktivitäten für unterschiedliche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen aufweist. Für die Katalase-transduzierten Zellen hingegen sollte eine solche Abhängigkeit nicht auftreten, da hier das Peroxid von der Katalase effektiv disproportioniert wird und für eine Aktivierung des FcBoron **V 14** nicht mehr zur Verfügung steht.

Diese Annahmen konnten im Experiment bestätigt werden. In Abb. 6.6 ist die Zellkillkurve von FcBoron an Katalase-transduzierten SKOV3-Zellen bei unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen zu sehen. Es zeigt sich, dass selbst bei hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen kein erhöhter Zellkill ohne Zugabe von FcBoron **V 14** zu erkennen ist, was auf die erhöhte Katalase-Aktivität schließen lässt. Das FcBoron ist selbst mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nur sehr schwach aktivierbar.



**Abb. 6.6:** Ergebnisse des MTT-Assays für Katalase-tranduzierte SKOV3-Zelllinien.

Die Experimente mit den MnSODi-transduzierten Zellen zeigen, dass bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  auch ohne Zugabe von FcBoron **V 14** bereits 85 % der Zellen gestorben sind. Dies liegt daran, dass ohne den erhöhten Katalase-Spiegel eine wirksame Entgiftung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht mehr möglich ist. Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  sind für die Zellen unschädlich: ohne Zugabe von FcBoron sind alle Zellen am Leben. Im Gegensatz zu den Katalase-transduzierten Zellen jedoch zeigt sich bei dieser Konzentration eine deutliche Aktivierbarkeit des FcBoron (Abb. 6.7).



**Abb. 6.7:** Ergebnisse des MTT-Assays für MnSODi-transduzierte SKOV3-Zelllinien.

Somit konnte bewiesen werden, dass die Substanz FcBoron **V 14** Gegensatz zur Negativkontrolle FcAc für Krebszellen zum Tode führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Toxizität der Substanz wesentlich erhöht ist, wenn eine erhöhte ROS-Konzentrationen (hier  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) vorliegt. So konnte der  $\text{IC}_{50}$ -Wert des FcBoron durch Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  von  $\sim 125 \mu\text{M}$  auf  $\sim 80 \mu\text{M}$  gesenkt werden. Auch wenn diese Werte noch nicht optimal sind, konnte die Funktionalität des zugrunde liegenden Konzeptes der ROS-aktivierbaren Cytostatika gezeigt werden.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, DNA-Nachweismethoden zu etablieren, welche sowohl auf Reaktionen mit Cu(II), Cu(I) als auch Cu(0) basieren.

Die Cu(II)-vermittelte Esterspaltung am dsDNA-Templat war bis vor wenigen Jahren anderen Reaktionen am dsDNA-Templat deutlich überlegen und zudem die erste Reaktion, welche sequenzspezifisch von doppelsträngiger DNA katalysiert wurde. Bereits 20 fmol an dsDNA-Templat reichten aus, die Esterspaltungsreaktion mittels MALDI-TOF MS beobachtbar zu machen.

Die Cu(I)-vermittelte, templatgesteuerte Ligationsreaktion ermöglichte es, ssDNA direkt mittels Fluoreszenzspektroskopie zu detektieren, was deutlich weniger zeit- und arbeitsaufwendig ist als MALDI-TOF Massenspektrometrie. Jedoch lag die Detektionsgrenze nur bei 200 nM DNA, was aufgrund der Möglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie eine relativ hohe Konzentration ist. Des Weiteren wurde die Fluoreszenz durch den eingesetzten Katalysator gequencht, weshalb es nicht möglich war, die Ligationsreaktion kinetisch zu verfolgen. Durch Erhitzen auf 85° C gelang es eindeutig nachzuweisen, dass die vorliegende Reaktion hoch sequenzspezifisch verläuft und bereits in Anwesenheit eines einzigen Fehlbaasenpaares im Templat nicht mehr stattfindet.

Die Cu(0)-vermittelte Reaktion, welche auf der Reduktion von Cu(II) in Anwesenheit von dsDNA basiert, konnte ebenfalls fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden. Im Vergleich mit der Cu(I)-vermittelten Ligationsreaktion konnte die Reaktion noch bei einer Konzentration von 1 nM DNA mittels Fluoreszenzspektroskopie kinetisch verfolgt werden. Der Hauptvorteil dieser Reaktion ist jedoch, dass keinerlei chemische Modifikation der DNA notwendig ist, was enorm zeit- und kostensparend ist. Auch für dieses System konnte eine Mismatch-Diskriminierung beobachtet werden, wenn auch weniger ausgeprägt als bei den oben genannten Systemen. Ob es sich bei dem beobachteten Effekt um die postulierte Fluoreszenz von elementaren Cu-Nanoteilchen handelt, ist bisher ungeklärt. Gestärkt wird die These durch die Arbeit von P. Sen. <sup>[101]</sup> Er beschreibt die Synthese und die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften von Cu-Nanopartikeln und bestätigt die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass Cu-Nanopartikel eine Absorptionsbande bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  besitzen. Da in dieser Arbeit jedoch keine Untersuchung des

Fluoreszenzverhaltens nach einer Anregung bei dieser Wellenlänge beschrieben ist, müssen noch Experimente durchgeführt werden, um die Theorie abschließend zu bestätigen. Fest steht die Tatsache, dass es mittels der vorliegenden Reaktion möglich ist, dsDNA-Fragmente in der Größenordnung von 14-32 Basenpaaren sicher, einfach und schnell nachzuweisen.

Im zweiten Teil der Arbeit gelang es, ein Cytostatikum in hoher Reinheit zu synthetisieren und zu charakterisieren. In einer Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) wurde zunächst die Toxizität an RKO- & SKOV3-Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass der  $IC_{50}$ -Wert mit  $\sim 100 \mu M$  im Vergleich zu anderen Cytostatika zwar vergleichsweise hoch liegt, diese jedoch hauptsächlich auf der Anwesenheit von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beruhen. Da der ROS-Gehalt in Krebszellen drastisch erhöht ist, sollte es möglich sein, Krebszellen mit dieser Substanzklasse hochspezifisch zu eliminieren. Zurzeit läuft ein Toxizitäts-Screening mit anderen Krebszell-Linien, um einen Überblick über die potentielle Bandbreite der Substanz zu erhalten. Gleichzeitig wurden Synthesen neuartiger Substanzen initiiert, die Weiterentwicklungen der beschriebenen Substanz darstellen, aber auf dem gleichen Prinzip beruhen.

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Chemikalien & Geräte

Die für die Synthesen verwendeten Chemikalien wurden von Acros (Geel, Belgien), Sigma/Aldrich/Fluka (Deisenhofen, Deutschland), AlfaAesar (Karlsruhe, Deutschland) und CombiBlocks (San Diego, USA) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Reagenzien für die Nukleinsäure-Synthesen wurden von Metabion (Martinsried, Deutschland) und IBA-Technology (Göttingen, Deutschland) erhalten und die Nukleinsäure-Biokonjugate mit einem Expetide™ 8909 System synthetisiert. Für sämtliche Versuche wurde Wasser mit HPLC-Reinheit verwendet.

Die MALDI-TOF-MS-Untersuchungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg an einem Bruker BIFLEX III Spektrometer durchgeführt. Für die MALDI-TOF-MS-Analysen der PNA-Konjugate wurde als Matrix eine Lösung von 27 mM Sinapinsäure in Acetonitril : Wasser : Methanol = 1:1:1 mit 0.1% TFA verwendet. Für Wasser- und Wasser / Acetonitril-Lösungen wurde ein Probe / Matrix-Verhältnis von 1:2 verwendet. Für TFA / m-Kresol-Lösungen (4:1) wurden Probe und Matrix in einem Verhältnis von 1:20 verwendet. Für die Analyse der DNA-Konjugate wurde ATT-Matrix (2:1 Verhältnis von 0,14 M Azathiothymin-Lösung in Acetonitril zu 0,1 M Diammoniumcitrat-Lösung in H<sub>2</sub>O) oder THAP-Matrix (2:1 Verhältnis von 0,3 M Trihydroxyacetophenon-Monohydrat-Lösung in Acetonitril zu 0,1 M Diammoniumcitrat-Lösung in H<sub>2</sub>O) verwendet. Der Fehler in der Genauigkeit des m/z-Verhältnisses mit externer Kalibrierung betrug 0.1 % der Molekülionengröße.

Die RP-HPLC Aufreinigungen wurden auf einem *Shimadzu liquid chromatograph (SLC-10A VP)* mit UV/Vis-Detektor und Säulenofen durchgeführt. Bei der Säule handelte es sich um eine *Macherey-Nagel Nucleosil C4 250 x 4,6 mm* und der Gradient beschreibt das Verhältnis Acetonitril (entgast) zu Wasser (gepuffert mit 16 mM Tetraethylammoniumacetat).

Die UV/Vis-Experimente wurden auf einem Varian Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer durchgeführt, wobei für die Absorptionmessungen (T = 22 °C) eine Quarz-Küvette (V = 1 ml) der Firma Hellma benutzt wurde.

Für die Fluoreszenzmessungen wurde ein *Variant Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer* mit Schwarzglas-Küvette verwendet.



Für Zelleexperimente wurden RKO- bzw. SKOV3-Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten kultiviert. Als Medium wurde Phenolrotfreies RPMI-Medium verwendet, welches mit 1 % FCS versetzt war. Zum Waschen der Zellen wurde PBS-Puffer verwendet.

## 8.2 Synthesen

### 8.2.1 4-(Azidomethyl)-benzoesäure **V 1**



#### Synthesebeschreibung <sup>[86]</sup>:

4-(Chloromethyl)-benzoesäure (1,188 g; 7,0 mmol), Natriumazid (0,9 g; 13,9 mmol) und 18 Krone[6]ether (0,183 g; 0,63 mmol) werden in 5,5 ml DMSO gelöst. Die Reaktionslösung wird für 24 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend in 100 ml EE aufgenommen und dann zweimal mit 50 ml 0,1 N HCl ausgeschüttelt. Danach wird die organische Phase über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 1,145 g (6,5 mmol) (93 %)

**Habitus:** weißer Feststoff

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,4 (DCM / EE 9:1)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 199,92 MHz):

$\delta = 4,45$  (s, 2H, a);  $7,41$  (d,  $^3J = 8,34$  Hz, 2H, b);  $8,10$  (d,  $^3J = 8,47$  Hz, 2H, c).

8.2.2 (2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-tert-butylester **V 2****Synthesebeschreibung** <sup>[87]</sup>:

In einem Kolben werden 3,26 g (54,04 mmol) Ethylendiamin in 25 ml THF vorgelegt und mit Argon begast. Anschließend werden über ein Septum 1,52 g (6,83 mmol) (BOC)<sub>2</sub>O in ebenfalls 25 ml THF gelöst und innerhalb von einer Stunde unter Eiskühlung hinzugegeben.

Die Reaktionsmischung wird nach der Zugabe langsam durch Entfernen des Eisbades aufgetaut und über Nacht gerührt. Die Gesamtreaktionszeit beträgt 20 Stunden.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel abrotiert und der erhaltene Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wird mit 50 ml DCM dreimal extrahiert und im Vakuum (1 mbar) getrocknet.

**Ausbeute:** 1087,8 mg (6,79 mmol) (99,4 %)

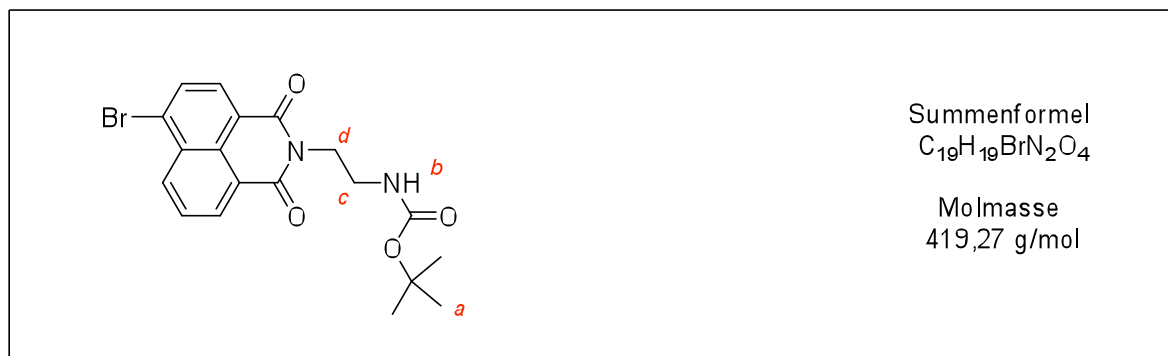
**Habitus:** gelbes Öl

**Rf-Wert:** 0,3 (EE)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 199,92 MHz):

δ = 1,19 (s, 2H, a); 1,44 (s, 9H, d); 2,80 (t, <sup>3</sup>J = 5,88 Hz, 2H, b); 3,20 (t, <sup>3</sup>J = 5,88 Hz, 2H, c).

### 8.2.3 Tert-butyl-2-(6-bromo-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2-(3H)-yl)-ethyl-carbammat **V 3**



#### Synthesebeschreibung:

**V 2** (0,7850 g; 4,9 mmol) und 4-Bromo-1,8-naphthalanhydrid (1,13 g; 4,08 mmol) werden unter einer Argonatmosphäre in 5 ml DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wird anschließend für 12 h bei 110 °C gerührt. Beim Abkühlen der Lösung fällt ein gelber Feststoff aus. Die Reaktionsmischung wird in 50 ml DCM und 50 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und dreimal mit 50 ml DCM extrahiert.

Das Extrakt wird zweimal mit 5 N NaCl-Lösung gewaschen, danach mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend das DCM mit dem Rotationsverdampfer entfernt. Nach anschließender säulenchromatographischer Trennung mit einem DCM / EE 2:1 Gemisch erhält man das Produkt als hellgelbes Pulver.

<b>Ausbeute:</b>	1,17 g (2,8 mmol)	(69 %)
<b>Habitus:</b>	hellgelber Feststoff	
<b>R<sub>f</sub>-Wert:</b>	0,7 (DCM / EE 2:1)	
<b>ESI:</b>	TOF-MS ESI <sup>+</sup> m/z berechnet: 441,04	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na [M+Na] <sup>+</sup> gefunden: 440,99

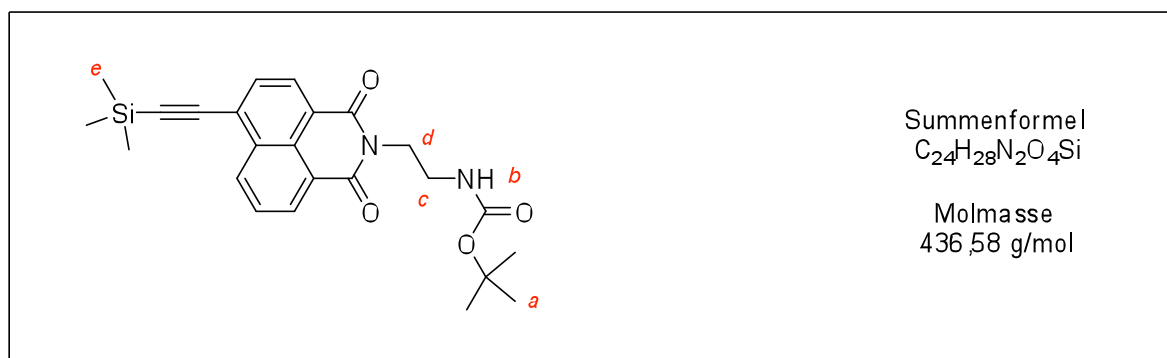
**$^1\text{H-NMR}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 199,92 MHz):

$\delta = 1,27$  (s, 9H); 3,53 (m, 2H); 4,35 (t,  $^3J = 5,88$  Hz, 2H); 4,94 (s, 1H); 7,83 (dd,  $^3J = 7,33$  Hz,  $^3J = 8,53$  Hz, 1H); 8,02 (d,  $^3J = 7,85$  Hz, 1H); 8,40 (d,  $^3J = 7,85$  Hz, 1H); 8,56 (dd,  $^3J = 8,48$  Hz,  $^4J = 1,11$  Hz, 1H); 8,65 (dd,  $^3J = 7,33$  Hz,  $^4J = 1,11$  Hz, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 50,27 MHz):

$\delta = 28,17$ ; 39,48; 39,51; 39,99; 122,01; 122,86; 128,05; 129,03; 130,38; 130,57; 131,08; 131,37; 132,19; 133,36; 156,01; 163,91; 163,94.

### 8.2.4 Tert-butyl 2-(1,3-dioxo-6-((trimethylsilyl)-ethynyl)-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)-ethylcarbammat **V 4**



#### Synthesebeschreibung:

**V 3** (1,17 g; 2,8 mmol), Bis-(triphenylphosphin)-palladium-(II)-dichlorid (0,04 g; 0,056 mmol), Kupfer(I)iodid (0,03 g; 0,151 mmol), Triethylamin (4 ml; 28,08 mmol) und Ethynyltrimethylsilan (0,4 ml; 2,8 mmol) werden in einer Argonatmosphäre in 16,4 ml THF gelöst. Die Lösung verfärbt sich schwarz und wird anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein leichter Niederschlag bildet. Die Fällung wird durch Zugabe von H<sub>2</sub>O vervollständigt und der Niederschlag dreimal mit 50 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Danach wird das DCM abrotiert. Durch säulenchromatographische Trennung mit einem DCM / EE 9:1 Gemisch als Laufmittel erhält man das Produkt als gelbes Pulver.

<b>Ausbeute:</b>	0,7805 g (1,8 mmol)	(65 %)
<b>Habitus:</b>	hellgelber Feststoff	
<b>R<sub>f</sub>-Wert:</b>	0,7 (DCM / EE 9:1)	
<b>ESI:</b>	TOF-MS ESI <sup>+</sup> m/z berechnet: 437,58	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> gefunden: 437,13

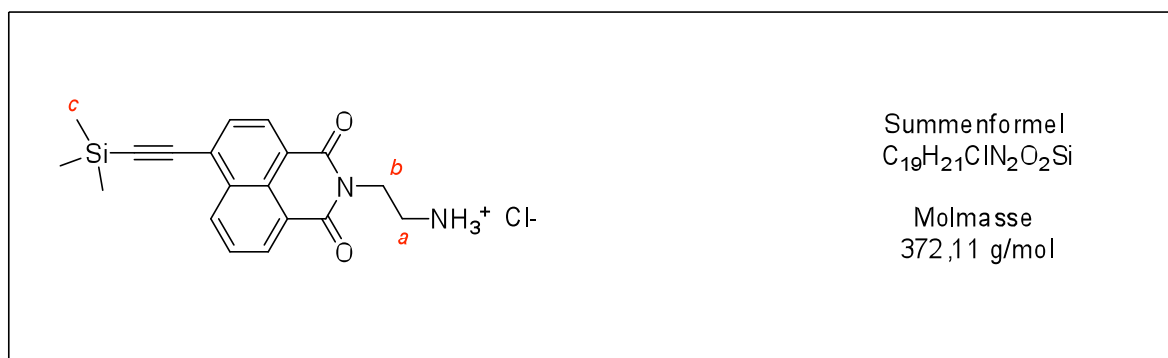
**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 600,13 MHz):

δ = 0,36 (s, 9H); 1,27 (s, 9H); 3,54 (m, 2H); 4,35 (t, <sup>3</sup>J = 5,88 Hz, 2H); 4,96 (s, 1H); 7,80 (t, <sup>3</sup>J = 7,86 Hz, 1H); 7,82 (d, <sup>3</sup>J = 7,64 Hz, 1H); 8,51 (d, <sup>3</sup>J = 7,64 Hz, 1H); 8,62 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 150,91 MHz):

δ = -0,38; 27,97; 39,37; 39,71; 100,97; 105,18; 121,85; 122,44; 127,18; 127,27; 127,76; 130,21; 130,94; 131,51; 131,56; 131,61; 132,34; 155,81; 163,84; 164,13.

### 8.2.5 2-(1,3-Dioxo-6-((trimethylsilyl)-ethynyl)-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)-ethan-ammoniumchlorid **V 5**



#### Synthesebeschreibung:

**V 4** (0,68 g; 1,55 mmol) wird in 50 ml THF gelöst und die Lösung mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Im nächsten Schritt werden nun langsam 117 ml 5 N Salzsäure hinzuge tropft. Ein gelber Feststoff fällt aus, dieser wird mit 120 ml THF wieder in Lösung gebracht. Die Reaktionsmischung wird anschließend für 3 h bei 80° C unter Rückfluss gerührt. Die Lösung wird einrotiert und danach zweimal mit 200 ml Toluol evaporiert. Das Produkt wird als hellbrauner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 0,51 g (1,38 mmol) (90 %)

**Habitus:** hellbrauner Feststoff

**ESI:** TOF-MS ESI<sup>+</sup> m/z C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Si [M-Cl]<sup>+</sup>  
 berechnet: 337,14 gefunden: 337,08

**<sup>1</sup>H-NMR:** (MeOD-d<sub>4</sub>, 199,92 MHz):

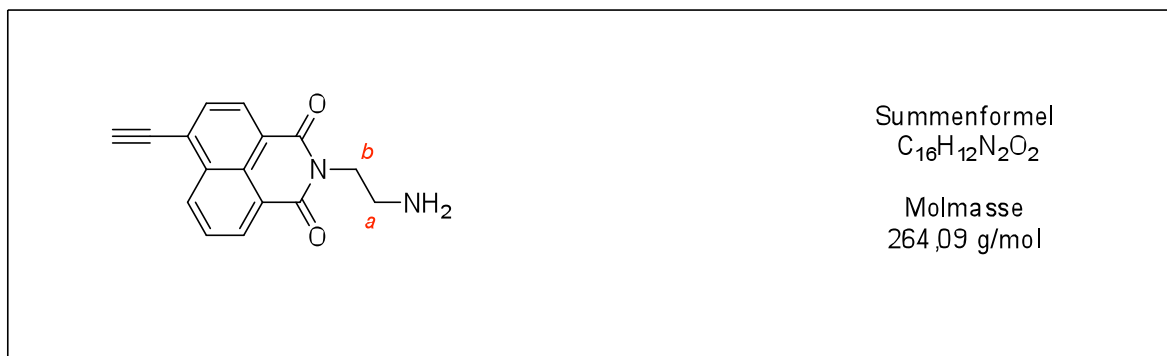
δ = 0,38 (s, 9H, c); 4,50 (t, <sup>3</sup>J = 5,88 Hz, 2H, b); 7,95 (m, 2H, Ar); 8,55 (m, 3H, Ar).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (MeOH-d<sub>4</sub>, 50,27 MHz):

δ = -0,20; 39,98; 40,04; 102,14; 106,38; 123,42; 124,02; 128,78; 129,02; 129,29; 131,52; 132,36; 132,82; 133,04; 133,63; 165,58; 165,89.



### 8.2.6 2-(2-Aminoethyl)-7-ethynyl-3a,6-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dion **V 6**



#### Synthesebeschreibung:

**V 5** (518,3 mg, 1,39 mmol) wird in H<sub>2</sub>O (425 ml) gelöst. Bei Zugabe von 2,2 äq. Et<sub>3</sub>N (311 mg, 430 µl, 3,06 mmol) ist sofort eine rötliche Färbung zu erkennen. Es wird über Nacht bei RT weitergerührt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert, mit etwas Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Das Filtrat wird in Methanol aufgenommen und filtriert. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 331,1 mg (1,25 mmol) (90 %)

**Habitus:** roter Feststoff

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,7 (MeOH)

**ESI:** TOF-MS ESI<sup>+</sup> m/z C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>  
berechnet: 265,09 gefunden: 265,03

**<sup>1</sup>H-NMR:** (MeOH-d<sub>4</sub>, 199,92 MHz):

δ = 2,99 (t, <sup>3</sup>J = 6,41 Hz, 2H), 4,26 (t, <sup>3</sup>J = 6,41 Hz, 2H), 7,87 – 8,00 (m, 2 H), 8,50-8,74 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO-d<sub>6</sub>, 150,91 MHz)

δ = 30,90; 43,39; 80,60; 90,81; 123,06; 123,35; 125,78; 127,79; 128,82; 130,23;  
131,61; 131,63; 131,89; 132,09; 163,58; 163,87.

**Elementaranalyse:**

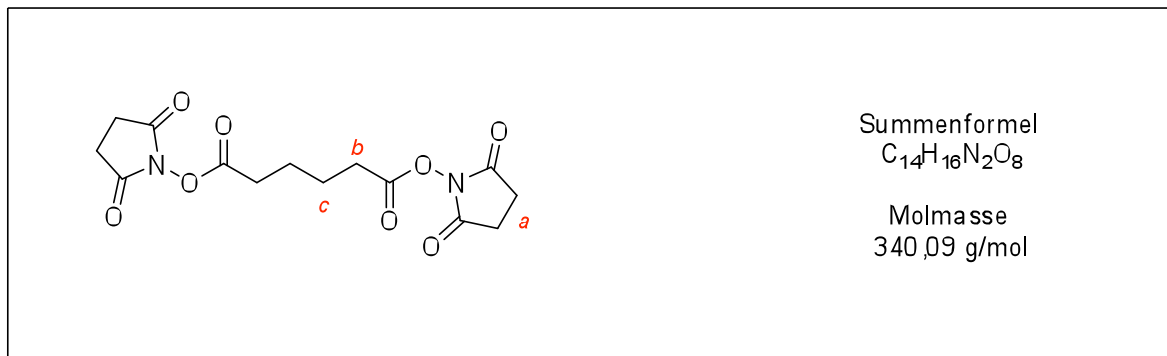
C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

berechnet:

C: 72,72; H: 4,58; N: 10,60

gefunden:

C: 72,31; H: 4,71; N: 10,37

8.2.7 Disuccinimidyladipat **V 7****Synthesebeschreibung** <sup>[88]</sup>:

In einem 250 ml Einhalskolben werden 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf 0° C abgekühlt. Nun werden 5 g N-Hydroxysuccinimid (42,0 mmol) hinzugegeben, welches sich erst bei Zugabe von 10,0 ml DIEA (58,4 mmol) löst.

Zu dieser farblosen Lösung werden bei 0° C tropfenweise 3,2 ml Adipinsäuredichlorid (21 mmol) hinzugegeben. Dabei beobachtet man unter Rauchentwicklung einen Farbumschlag nach Gelb, wobei sehr rasch das Produkt als gelblich-weißer Feststoff ausfällt. Nach beendeter Zugabe lässt man noch 30 min bei 0° Citerrühren. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 ml) gewaschen. Das so erhaltene Rohprodukt wird mit Aceton (180 ml) umkristalliert.

**Ausbeute:** 4,6 g (13,5 mmol) (66 %)

**Habitus:** pulvrig-kristalliner, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO-d<sub>6</sub>, 199,92 MHz)

δ = 1,70 (quin, <sup>3</sup>J = 6,40 Hz, 4 H, c), 2,7 (t, <sup>3</sup>J = 6,69 Hz, 4 H, b), 2,81 (s, 8 H, a).

8.2.8 3-Azido-1-propanol **V 8****Synthesebeschreibung** <sup>[102]</sup>:

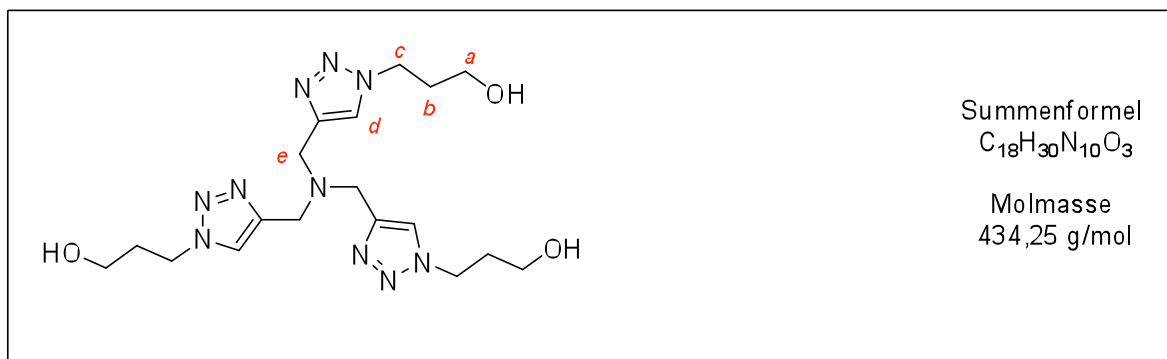
4 g (28,8 mmol) 3-Brom-1-propanol werden vorgelegt und eine gesättigte wässrige Lösung hergestellt. Nach Zugabe von 3,74 g (57,6 mmol, 2 äq) Natriumazid wird die klare Lösung unter starkem Rühren für 18 Stunden auf 80° C erhitzt. Die nun leicht gelbliche Lösung wird vier Mal mit je 60 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend mit ca. 100 ml Natriumchloridlösung (5 M) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende, farblose Öl im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 2,55 g (25,3 mmol) (88 %)

**Habitus:** Klares, farbloses Öl

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 399,89 MHz):

δ = 1,67 (m, 1 H, OH), 1,84 (quin, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, 2 H, b), 3,46 (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 2 H, c), 3,77 (t, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, 2 H, a).

8.2.9 Tris-((1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-amin **V 9****Synthesebeschreibung** <sup>[89]</sup>:

500 mg (4,95 mmol) **V 8** werden in 1,7 ml Acetonitril gelöst. Anschließend werden 144 mg (1,10 mmol) Tripropargylamin und 127 µl (1,10 mmol) 2,6-Lutidin zugegeben. Die schwachgelbe Reaktionslösung wird auf 0° C heruntergekühlt und 15,9 mg (42,9 µmol) Cu(MeCN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> darin gelöst. Nun wird die Reaktionsmischung für sieben Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die jetzt dunkelgelbe, klare Lösung wird am Rotationsverdampfer eingedunstet und säulenchromatographisch aufgereinigt. Bis alle Verunreinigungen eluiert sind, wird Dichlormethan mit 5 % Ethanol als Laufmittel verwendet, dann wird auf reines Methanol umgestellt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein gelbliches, hochviskoses Öl erhalten. In der Kälte erstarrt dieses zu einem Feststoff.

**Ausbeute:** 468 mg (1,08 mmol) (98 %)

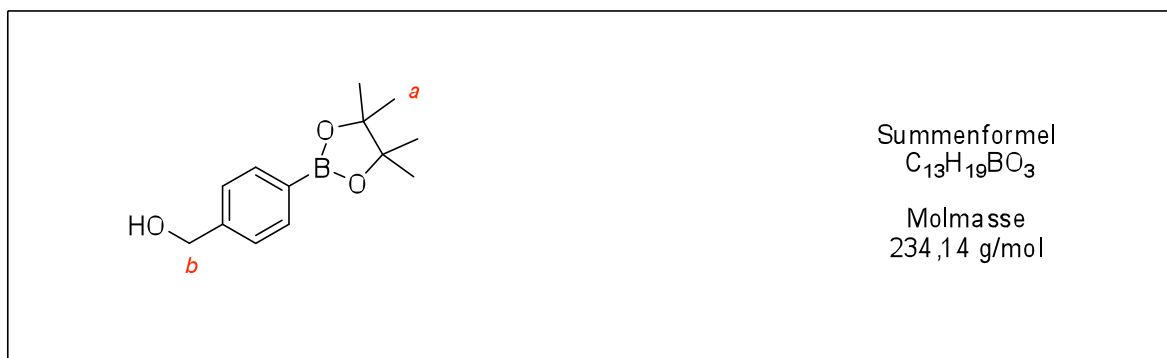
**Habitus:** Schwachgelber Feststoff

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,3 (DCM / EtOH 95:5)

<b>ESI:</b>	TOF-MS ESI <sup>+</sup> m/z	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup>
	berechnet: 435,25	gefunden: 435,17

**<sup>1</sup>H-NMR:** (MeOH-d<sub>4</sub>, 199,92 MHz):

δ = 2,11 (quin, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, 6 H, *b*), 3,57 (t, <sup>3</sup>J = 6,1 Hz, 6 H, *a*), 3,75 (s, 6 H, *e*), 4,51 (t, <sup>3</sup>J = 7,0 Hz, 6 H, *c*), 7,99 (s, 3 H, *d*).

8.2.10 4-(Hydroxymethyl)-phenylboronsäure-pinacolester **V 10****Synthesebeschreibung:**

649 mg (4,26 mmol) 4-(Hydroxymethyl)-phenylboronsäure werden zusammen mit 509 mg (4,31 mmol) Pinakol in 26 ml THF vorgelegt und zum Rückfluß erhitzt. Das Ende der Reaktion ist daran zu erkennen, daß der zunächst unlösliche, weiße Feststoff in Lösung gegangen ist. Das Lösungsmittel wird am Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 1 g (4,27 mmol) (100%)

**Habitus:** gelbes Öl

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,3 (DCM / EE 9:1)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 199,92 MHz):

δ = 1,35 (s, 12H, a); 4,72 (s, 2H, b); 7,81 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 2H, Ar); 7,37 (d, <sup>3</sup>J = 8,1 Hz, 2H, Ar).

8.2.11 Iodferrocen **V 11****Synthesebeschreibung** <sup>[98]</sup>:

5 g (26,9 mmol) Ferrocen und 377 mg (3,36 mmol) KO<sup>t</sup>Bu werden unter Argon-Schutzatmosphäre in 219 ml absolutem THF gelöst und die Lösung mittels einer Aceton / Trockeneis - Mischung auf -70° C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden über einen Zeitraum von 40 min 31,6 ml (53,8 mmol) <sup>t</sup>BuLi (1,7 M in Pentan) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h gerührt. Danach werden 14,3 g (56,3 mmol) Iod auf einmal zugegeben und die Lösung über Nacht unter Rühren aufgetaut. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Danach wird die organische Phase 3 Mal mit wässriger Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lsg und einmal mit 5M NaCl-Lsg gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und schließlich am Vakuum eingedampft. Das erhaltene Öl wird mit PE 30-75 über einer Alox-Neutral Säule filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Vakuum erhält man **V 11** als rot-braunes Öl.

**Ausbeute:** 4,2 g (13,6 mmol) (50 %)

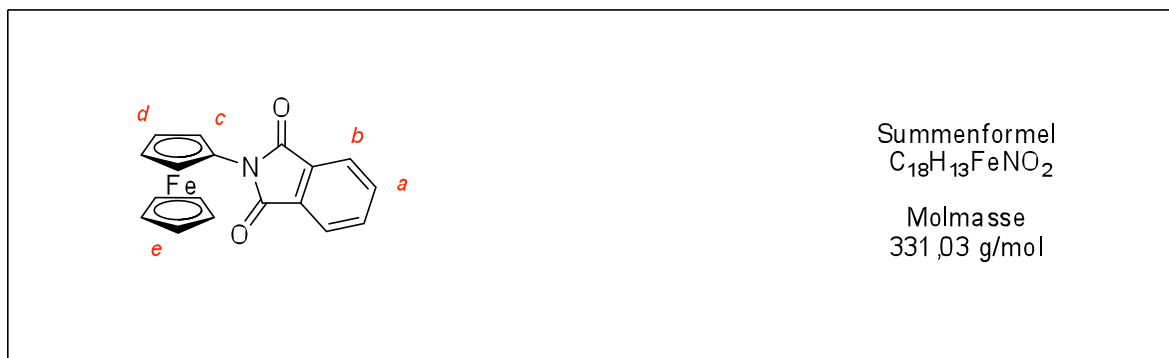
**Habitus:** rot-braunes Öl

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,4 (PE 30/75))

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 199,92 MHz):

δ = 4,41 (s, 2H, a), 4,19-4,15 (m, 7H, b+c).



8.2.12 2-Ferrocenylisoindole-1,3-dione **V 12****Synthesebeschreibung** <sup>[98]</sup>:

4 g (12,9 mmol) **V 11** werden zusammen mit 11,5 g (32,3 mmol) Cu-Phthalimid vermischt und sehr fein vermörsert. Das Pulvergemisch wird ca. 4 Stunden bei 140° C im Vakuum gehalten. Dabei kommt es zu einem Farbwechsel von grün nach hellbraun. Der Feststoff wird nach Beendigung der Reaktion zunächst mit PE 40/60 und schließlich mit Diethylether gewaschen. Die Diethyletherphase wird aufgefangen, am Vakuum eingeeengt und schließlich über  $SiO_2$  gereinigt (DCM).

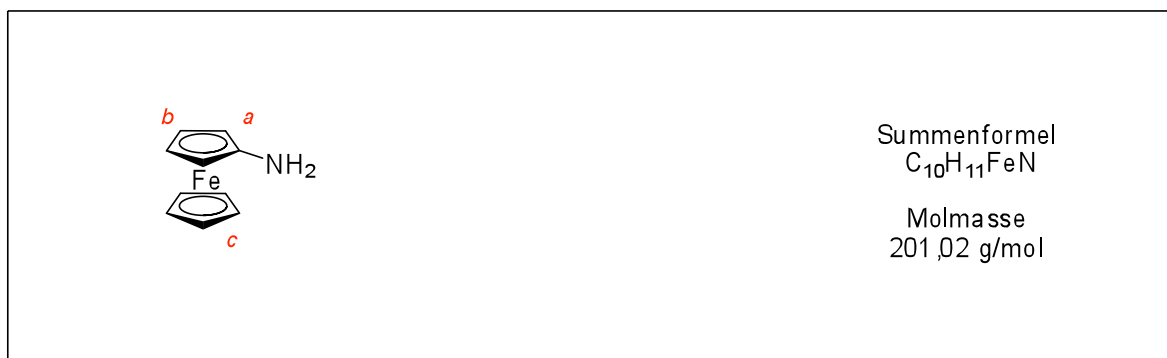
**Ausbeute:** 1,4 g (4,4 mmol) (34 %)

**Habitus:** roter Feststoff

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,7 (DCM)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 199,92 MHz):

$\delta = 7,86$  (m, 2H, *a*),  $7,75$  (m, 2H, *b*),  $5,09$  (bs, 2H, *c*),  $4,30$  (bs, 7H, *d+e*).

8.2.13 Aminoferrocen **V 13****Synthesebeschreibung** <sup>[98]</sup>:

1,4 g (4,4 mmol) **V 12** werden in 20,3 ml absolutem Ethanol vorgelegt, mit 8,1 ml Hydrazinmonohydrat versetzt und für 2 h auf 90° C erhitzt. Nach 1 h ist bereits eine Trübung der Lösung zu beobachten. Danach läßt man die Reaktionslösung auf RT abkühlen, versetzt sie mit H<sub>2</sub>O und extrahiert die wäßrige Phase dreimal mit Diethylether. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Vakuum eingengt.

**Ausbeute:** 802 mg (4,0 mmol) (91 %)

**Habitus:** rötlich-goldener Feststoff

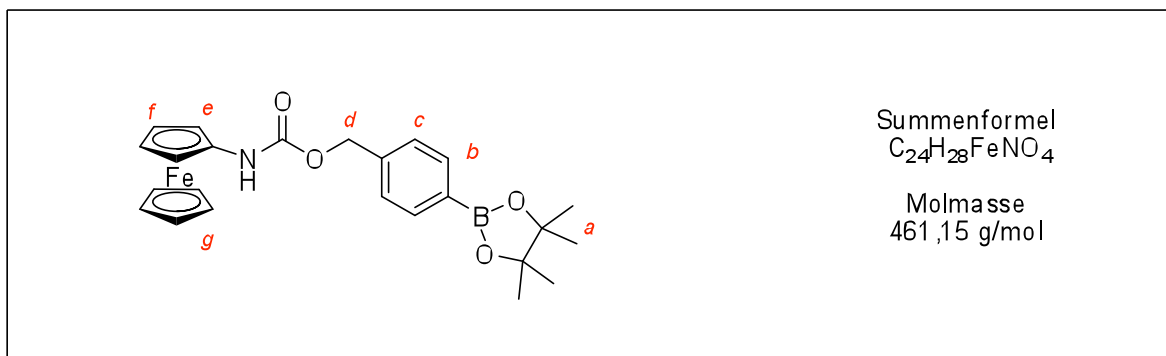
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,3 (DCM / EE 9:1)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (MeOH-d<sub>4</sub>, 199,92 MHz):

δ = 4,09 (m, 5H, c), 3,99 (m, 2H, a), 3,81 (m, 2H, b).

**ESI:** TOF-MS ESI<sup>+</sup> m/z C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>FeN [M+H]<sup>+</sup>  
berechnet: 202,02 gefunden: 202,11

### 8.2.14 4-Ferrocenylcarbamatmethyl-phenylboronsäure-pinacolester V 14



#### Synthesebeschreibung:

200 mg (100 mmol) **V 13** und 304 mg (100 mmol) Triphosgen werden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 18 ml absolutem Toluol vorgelegt. Die Suspension wird auf 120° C erhitzt, wobei der Feststoff in Lösung geht. Das Reaktionsgemisch wird auf RT abgekühlt. 246 mg (100 mmol) 4-(Hydroxymethyl)-phenylboronsäure-pinacolester **V 10** werden in 30 ml absolutem DCM gelöst, und langsam zu der Reaktionslösung zugetropft, welche über Nacht bei RT gerührt wird. Am nächsten Tag wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Feststoff über SiO<sub>2</sub> gereinigt (DCM).

**Ausbeute:** 242,2 mg (53 mmol) (53 %)

**Habitus:** brauner Feststoff

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0,3 (DCM)

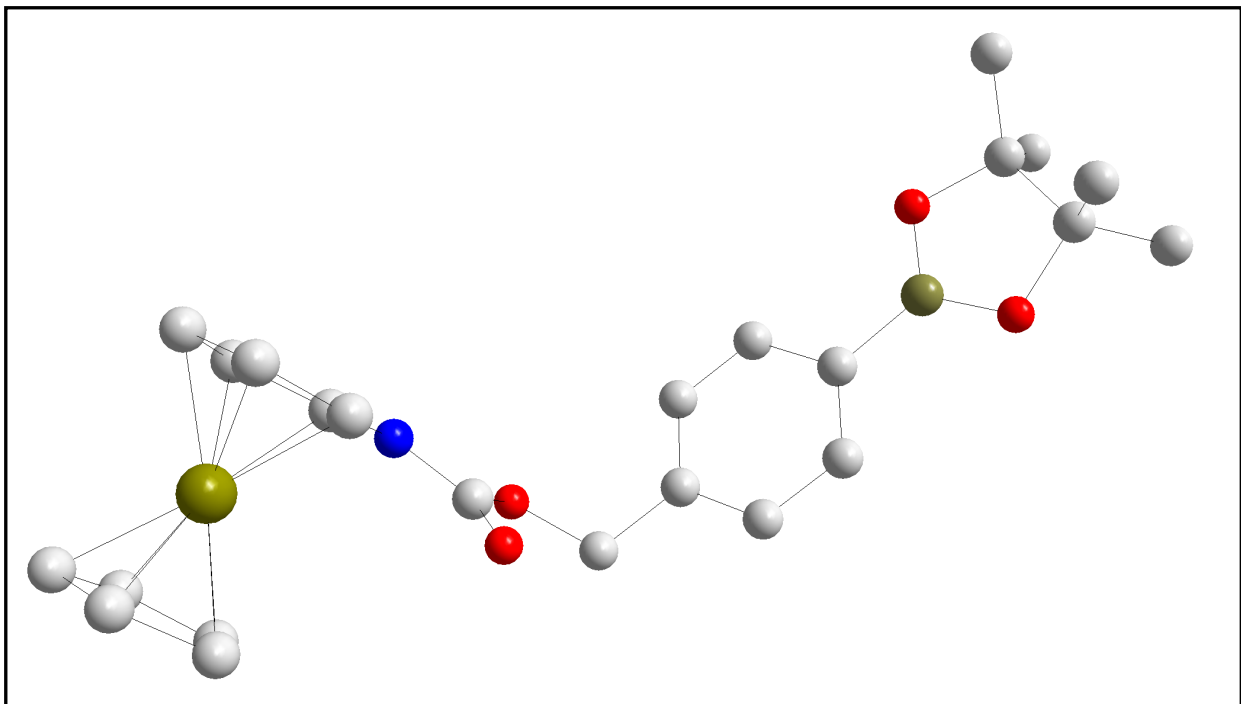
**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO-d<sub>6</sub>, 199,92 MHz):

δ = 7,69 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 7,97 Hz, b), 7,40 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 7,97 Hz, c), 5,14 (s, 2H, d), 4,46 (bs, 2H, e), 4,09 (s, 5 H, g), 3,93 (t, 2H, <sup>4</sup>J = 1,92 Hz, f), 1,29 (s, 12 H, a).

**ESI:** TOF-MS ESI<sup>-</sup> m/z C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>BFeNO<sub>4</sub> [M-Pinacolalkohol-H]<sup>-</sup>  
berechnet: 378,07 gefunden: 378,04

**Elementaranalyse:** C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>BFeNO<sub>4</sub> \* 0.5 H<sub>2</sub>O  
berechnet:  
C: 61,31; H: 6,22; N: 2,98  
gemessen:  
C: 61,30; H: 5,93; N: 3,14

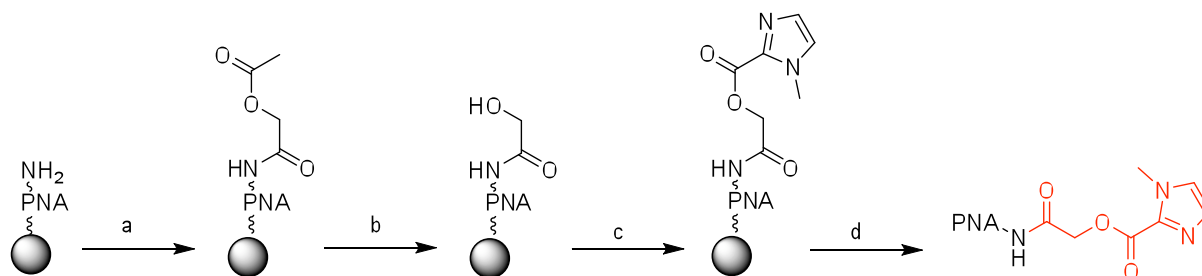
**Kristallstrukturanalyse:**



**Abb. 8.1:** Kristallstruktur von **V 14**.

## 8.3 Nukleinsäuresynthesen

### 8.3.1 Synthese von PNA 1



PNA = TCT CTC TCT TCT TCLys

**Schema 8.1:** Synthese von PNA 1.

#### (a) Addition von Acetoxyessigsäure

Acetoxyessigsäure (11,8 mg; 100  $\mu$ mol), HBTU (34 mg; 90  $\mu$ mol) und HOBT (14 mg; 100  $\mu$ mol) werden 0.5 h im Vakuum bei 0.01 mbar getrocknet und anschließend in 1 ml DMF gelöst. Danach wird DIEA (38  $\mu$ l; 200  $\mu$ mol) zu der Reaktionslösung hinzugefügt. Diese wird zur Festphase gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Die entstehende Suspension wird verworfen, das Festphasenpolymer viermal mit DMF (1.5 ml) und viermal mit Acetonitril (1.5 ml) gewaschen und danach 1 h im Vakuum bei 0.01 mbar getrocknet.

#### (b) Hydrolyse der Acetylschutzgruppe

Zur Abspaltung der Acetylgruppe wird das Festphasenpolymer mit 1 ml Ammoniak (25 %) versetzt und für 18 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wird verworfen und das Festphasenpolymer jeweils fünfmal mit 1,5 ml H<sub>2</sub>O, DMF und CH<sub>3</sub>CN gewaschen und im Anschluß über Nacht im Vakuum bei 0.01 mbar getrocknet.

**(c)** Addition von N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure

N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure (25,2 mg; 200  $\mu\text{mol}$ ) und HOBT (28 mg; 200  $\mu\text{mol}$ ) werden 0.5 h im Vakuum bei 0.01 mbar getrocknet. Anschließend werden beide Substanzen in DMF (1 ml) gelöst, DMAP (4,0 mg, 32,8  $\mu\text{mol}$ ) und DIC (31,4  $\mu\text{l}$ ; 200  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben und die Lösung mit der Festphase vereinigt. Es wird 18 h bei RT geschüttelt. Danach wird die Lösung verworfen, viermal mit DMF (1.5 ml) und Acetonitril (1.5 ml) gewaschen und 1 h im Vakuum bei 0.01 mbar getrocknet.

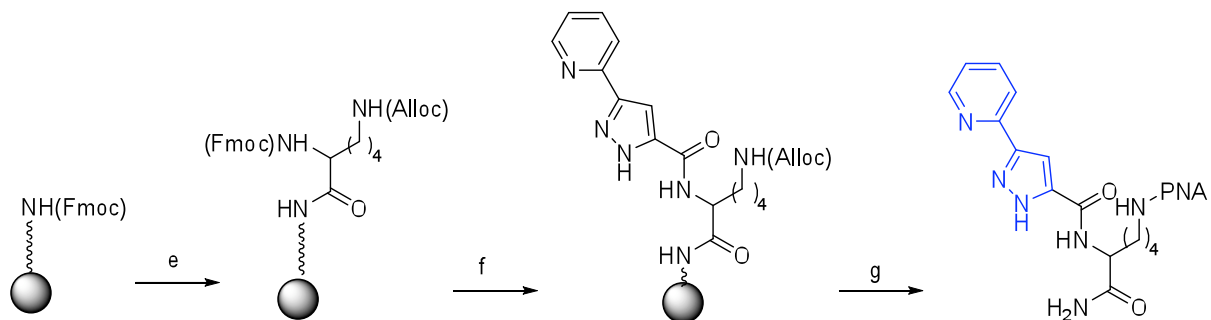
**(d)** Abspaltung und Reinigung der PNA

Die Festphase wird für 1.5 h mit PNA-Capping-Solution (TFA / m-Kresol (1:4)) umgesetzt, die Lösung vom Rückstand abgetrennt und anschließend 90 Minuten in Diethylether ausgefällt. Die Suspension wird zentrifugiert, der Diethylether vom Rückstand getrennt und verworfen. Der gesamte Vorgang wird dreimal wiederholt. Man lässt den Diethylether über Nacht abdampfen und löst die PNA anschließend in 200  $\mu\text{l}$  Wasser. Die Reinigung erfolgt mittels HPLC. Die Konzentration wird am UV/VIS-Spektrometer bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  bestimmt:

**Konzentration PNA 1:**  $c = 348 \mu\text{M}$

<b>m/z:</b>	theoretisch:	3946,60
	gefunden:	3947,70

## 8.3.2 Synthese von PNA 2



PNA = Lys TTT TTT TCC TCC TC

**Schema 8.2:** Synthese von PNA 2.

**(e.1)** Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

1 ml eines Pyridin / DMF-Gemisches (1:4 „Deblock-Solution“) werden zur Festphase gegeben und für 40 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird jeweils viermal mit 1.5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und für 1 h im Vakuum getrocknet.

**(e.2)** Addition von Fmoc-Lys-Alloc-OH

Fmoc- und Alloc-geschütztes Lysin (45,2 mg; 100  $\mu$ mol), HBTU (34 mg; 90  $\mu$ mol) und HOBT (14 mg; 100  $\mu$ mol) werden für 0.5 h im Hochvakuum getrocknet. Danach wird in 1 ml DMF gelöst und mit 36  $\mu$ l DIEA (220  $\mu$ mol) versetzt. Die Reaktionslösung wird anschließend für 40 Minuten bei Raumtemperatur mit der Festphase umgesetzt und die Lösung danach verworfen. Die Festphase wird jeweils viermal mit 1.5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und letztlich für 1 h im Vakuum getrocknet.

**(e.2.1)** Deaktivierung nicht umgesetzter Aminogruppen mit PNA-Capping-Solution

1 ml Essigsäureanhydrid / 2,6-Dimethylpyridin-Gemisch (1:1 „PNA-Capping-Solution“) wird zur Festphase gegeben und bei Raumtemperatur für 0.5 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wird verworfen und das Festphasenpolymer jeweils

viermal mit 1.5 ml DMF und Acetonitril gewaschen. Anschließend wird für 1 h im Vakuum getrocknet.

#### **(f.1)** Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Abspaltung erfolgt analog der unter **(e.1)** beschriebenen Vorschrift.

#### **(f.2)** Addition von 5-Pyridin-2-yl-3,4-dihydro-2H-pyrazol-3-carbonsäure

5-Pyridin-2-yl-3,4-dihydro-2H-pyrazol-3-carbonsäure (9.5 mg; 50  $\mu$ mol), HBTU (17 mg; 45  $\mu$ mol) und HOBT (7 mg; 50  $\mu$ mol) werden für 1 h im Vakuum getrocknet, in 1 ml DMF gelöst und mit 19  $\mu$ l DIEA versetzt. Die Festphase wird nun für 1 h mit der Reaktionsmischung umgesetzt, anschließend je viermal mit je 1.5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und 1 h im Vakuum getrocknet.

#### **(f.2.1)** Deaktivierung nicht umgesetzter Aminogruppen mit PNA-Capping-Solution

Die Umsetzung erfolgt analog der unter **(e.2.1)** beschriebenen Vorschrift.

#### **(g.1)** Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe

Triphenylphosphin (0.001 g; 0.004 mmol) und Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium (0.005 g; 0.004 mmol) werden in trockenem Dichlormethan (500  $\mu$ l) gelöst. Diethylammoniumhydrogencarbonat (0.005 g; 0.037 mmol) wird separat ebenfalls in 500  $\mu$ l trockenem Dichlormethan gelöst. Beide Lösungen werden mit Argon begast, vereint und zur Festphase gegeben. Es wird 18 h geschüttelt, wobei die Reaktionslösung vor direkter Lichteinstrahlung geschützt wird. Anschließend wird die Reaktionslösung verworfen und das Festphasenpolymer jeweils viermal mit 1.5 ml Dichlormethan, DMF, Ethylendithiocarbamat (0.5 %ige Lösung in DMF), DMF und letztlich mit Acetonitril gewaschen. Danach wird für 2 h im Vakuum getrocknet.



**(g.2) PNA-Synthese**

Die Synthese der PNA wird an einem Expedite 8909 PNA / DNA-Syntheseautomaten durchgeführt, der für 2  $\mu\text{M}$  Ansätze ausgelegt ist.

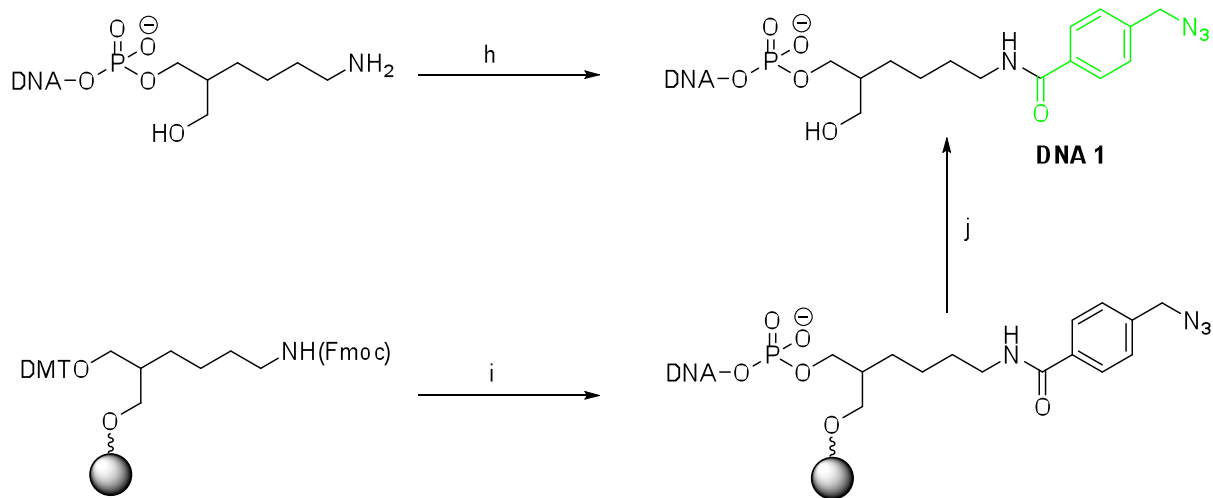
**(g.3) Abspaltung und Reinigung der PNA**

Die Abspaltung und Reinigung erfolgen nach der unter **(d)** beschriebenen Vorschrift.

**Konzentration PNA 2:**  $c = 63 \mu\text{M}$

<b>m/z:</b>	theoretisch:	4097,70
	gefunden:	4093,51

## 8.3.3 Synthese der Azid-gelabelten DNA 1



DNA = 5' CGC.TCC.CAC 3' (Route h)

5' ATA.CGC.TCA.TAC 3' (Route i, j)

**Schema 8.3:** Synthese der Azid-gelabelten DNA 1.

### (h.1) Aktivierung der Azid – Komponente

4,6 mg Vakuum-getrocknetes *N*-Hydroxysuccinimid (40  $\mu\text{mol}$ ) werden mit 7,7 mg Vakuum-getrocknetem EDAC (40  $\mu\text{mol}$ ) in 143  $\mu\text{l}$  absolutem DMSO gelöst und anschließend mit 6,95  $\mu\text{l}$  DIEA (40  $\mu\text{mol}$ ) versetzt (Stammlösung 1). In weiteren 900  $\mu\text{l}$  absolutem DMSO werden 7,1 mg getrocknete 4-(Azidomethyl)-benzoesäure **V 1** (40  $\mu\text{mol}$ ) mit Hilfe von Ultraschall gelöst (Stammlösung 2). Anschließend werden 15  $\mu\text{l}$  der Stammlösung 1 mit 90  $\mu\text{l}$  der Stammlösung 2 vereinigt und unter Schutzgasatmosphäre für 2 h bei RT geschüttelt (*Aktiviertes-Azid* – Lösung).

### (h.2) Kopplung des aktivierten Azids an DNA

Die *Aktivierte-Azid* – Lösung aus (h.1) wird mit 200  $\mu\text{l}$  Natriumtetraborat-Puffer versetzt. Anschließend werden 30  $\mu\text{l}$  einer entsprechenden 2mM DNA-Lösung addiert. Anschließend wird die Reaktionslösung für 18 h bei RT geschüttelt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 2 ml Gesamtvolumen verdünnt, um die Lyophilisierung trotz DMSO zu ermöglichen. Das resultierende

Lyophilisat wird mit Hilfe von HPLC aufgereinigt und die Reinheit des Produktes mit MALDI-TOF-MS bestätigt.

**Konzentration Azid-DNA 1:** 28  $\mu\text{M}$

**m/z:** theoretisch: 2988,06  
gefunden: 2989.04  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
2961.33  $[\text{M}+\text{H}-\text{N}_2]^+$

**(i)** Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

1 ml einer 2% Lösung von DBU in DMF wird zur getrockneten Festphase (3' Aminomodifier C7 CPG -1000; 30 mg; 1  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und für 40 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird jeweils viermal mit 1,5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und für 1 h im Vakuum getrocknet.

**(j.1)** Addition von 4-(Azidomethyl)-benzoesäure

4-(Azidomethyl)-benzoesäure **V 1** (18 mg; 100  $\mu\text{mol}$ ), HBTU (34 mg; 100  $\mu\text{mol}$ ) und HOBT (14 mg; 90  $\mu\text{mol}$ ) werden für 1 h im Vakuum getrocknet, in 1 ml DMF gelöst und mit 36  $\mu\text{l}$  DIEA (220  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Festphase wird nun für 40 Minuten mit der Reaktionsmischung umgesetzt. Die Reaktionslösung wird verworfen und das Festphasenpolymer anschließend je viermal mit je 1,5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und 1 h im Vakuum getrocknet.

**(j.2)** Deaktivierung nicht umgesetzter Aminogruppen mit Capping-Solution

1 ml einer 1:1 Mischung bestehend aus Cap A- & Cap B-Solution<sup>®</sup> wird zur Festphase gegeben und bei Raumtemperatur für 20 min geschüttelt. Die Reaktionslösung wird verworfen und das Festphasenpolymer jeweils viermal mit 1,5 ml THF, DMF und Acetonitril gewaschen. Anschließend wird für 1 h im Vakuum getrocknet.

**(j.3) Abspaltung der DNA von der Festphase**

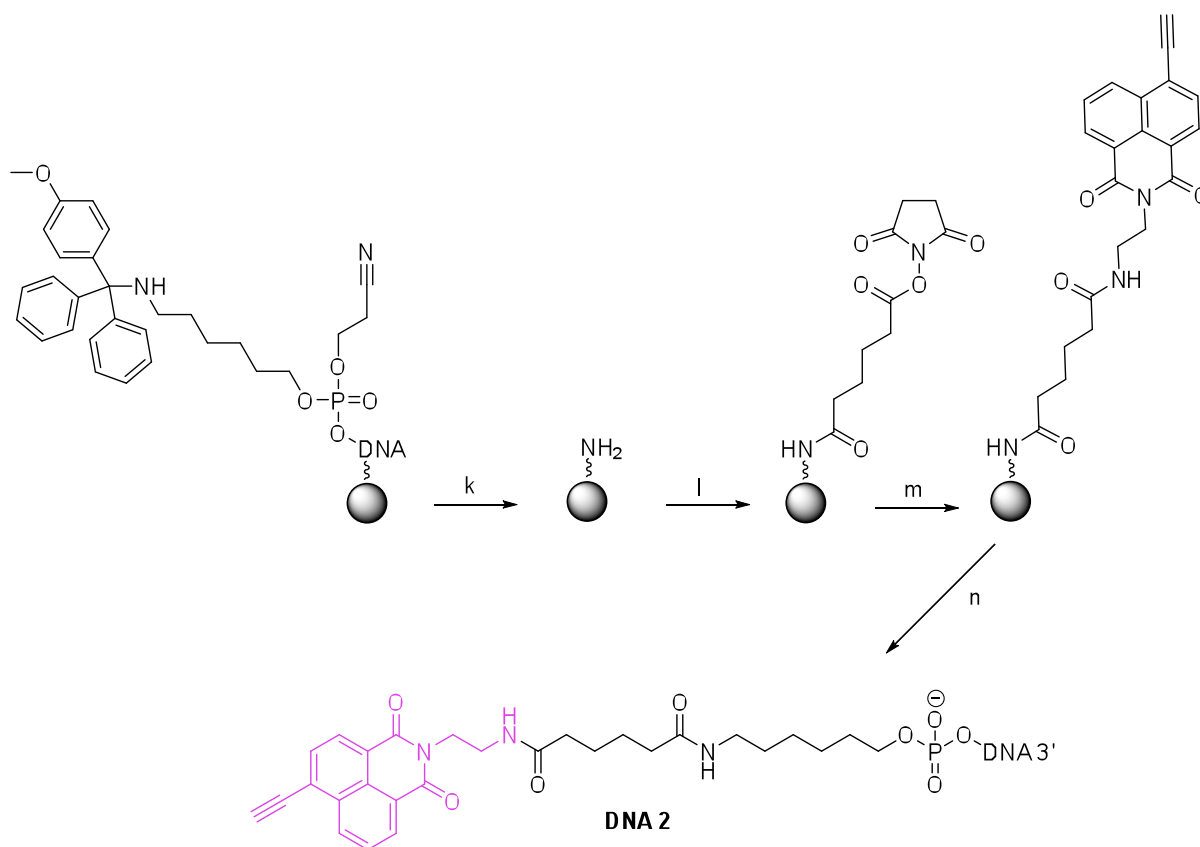
Zur Abspaltung der DNA wird das Festphasenpolymer mit 1 ml Ammoniak (25 %) versetzt und für 2 h bei 55° C geschüttelt. Der überschüssige Ammoniak wird mittels eines sanften N<sub>2</sub>-Stroms aus der Abspalllösung entfernt, welche im Anschluß lyophilisiert wird. Der Feststoff wird in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mittels HPLC gereinigt. Die Reinheit des Produktes wird mit MALDI-TOF-MS bestätigt.

**Konzentration Azid-DNA 1:** 1,1 mM

**m/z:** theoretisch: 3956,80

gefunden: 3954,60

## 8.3.4 Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2



**Schema 8.4:** Synthese der Acetylid-gelabelten DNA 2.

**(k)** Entschützung des MMT-Aminolinks

Das an die Festphase gebundene Oligonukleotid wird mit Hilfe von 6 x 2 ml MMT-Debloc<sup>®</sup> (1%ige Trichloressigsäure) entschützt, bis das Filtrat farblos ist und anschließend mit 4 x 2 ml DCM gespült. Danach wird die Festphase 1 h am Vakuum getrocknet.

**(l)** Ankopplung des Disuccinimidyladipat-Linkers

Die entschützte Festphase wird mit einer Lösung aus 102 mg Vakuum-getrocknetem Disuccinimidyladipat **V 7** (300  $\mu\text{mol}$ ) und 36  $\mu\text{l}$  DIEA (220  $\mu\text{mol}$ ) in 1 ml absolutem DMF versetzt und bei Raumtemperatur für 1,5 h geschüttelt. Zur weiteren

Aufarbeitung wird die Festphase je viermal mit 1,5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und anschließend über Nacht am Vakuum getrocknet.

**(m)** Ankopplung der Acetylidkomponente

Eine Suspension des Fluorophors **V 6** (26,4 mg, 100  $\mu$ mol) in 1 ml absolutem DMSO wird durch mehrmaliges Vortexen und Ultraschallbehandlung hergestellt. Anschließend werden 36  $\mu$ l DIEA (220  $\mu$ mol) zugegeben. Die aktivierte Festphase wird mit der tiefroten Fluorophor-Lösung versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur weiteren Aufarbeitung wird die Festphase je viermal mit 1,5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und anschließend über Nacht am Vakuum getrocknet.

**(n)** Abspaltung der DNA von der Festphase

Die Totalabspaltung wird analog zu der in **(j.3)** beschriebenen Vorschrift durchgeführt.

**Konzentration Acetylid-DNA 2:** 1,13 mM

**m/z:** theoretisch: 3553,60

gefunden: 3556,10

## 8.4 Experimentelle Vorschriften

### 8.4.1 Cu(II)-vermittelte Spaltkinetiken

Um eine vollständige Hybridisierung der für die in Kapitel 3.3 beschriebenen Experimente benötigten dsDNA zu gewährleisten, werden die beiden ssDNAs zunächst gemischt und für 5 min auf 90° C erhitzt. Danach wird die Lösung in 5° C - Schritten auf RT abgekühlt, wobei jede Temperatur wiederum für 5 min gehalten wird. Danach wird die Reaktionslösung in einem 10 mM MOPS Puffer (pH = 7) mit 50 mM NaCl angesetzt. Diese enthält 0,2 µM dsDNA, 1 µM CuSO<sub>4</sub>, 2 µM PNA 1 & PNA 2 und 1 mM Triton X 100, um unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen. Das Reaktionsgemisch wird auf T = 40° C erwärmt. Zu den Zeitpunkten t = 0, 60, 120, 180 & 1030 min werden Proben genommen. Die Verfolgung der Esterspaltung erfolgt mittels MALDI-TOF MS.

### 8.4.2 Untersuchung des Einflusses von NaCl auf die Click-Reaktion

Für die in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Messungen werden 10 mM MOPS-Puffer (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 1 µM Azid, 2 µM Acetylid, 200 µM CuSO<sub>4</sub>, 1 mM NaAsc und 5 % DMSO benötigt. Die Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ , U = 650 V, Slits<sub>ex</sub> = 5 nm, Slits<sub>em</sub> = 5 nm.

### 8.4.3 Untersuchung des Einfluss von THPTA auf die Click Reaktion

In Kapitel 4.3.2 werden zwei Experimente beschrieben:

#### a) Einfluss der Reaktandenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Hierzu werden in einem 10 mM MOPS-Puffer (pH = 7,5) mit 150 mM NaCl jeweils eine 50 µM, eine 10 µM, 2 µM sowie 200 nM Farbstofflösung (**V 1** & **V 6**) vorbereitet. Jede dieser Proben enthält den THPTA-Ligand jeweils in 10-fachen-, das Kupfer(I) in

100-fachen und das Natriumascorbat in 1000-fachen Überschuss. Die Detektor-Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 550 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{Slits}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ .

#### **b) Bestimmung der optimalen Cu-THPTA-Konzentration**

In einem 10 mM MOPS-Puffer ( $\text{pH} = 7,5$ ) mit 150 mM NaCl und 1,5 mM NaAsc werden je acht Proben vorbereitet, welche alle eine 10  $\mu\text{M}$  Farbstoff-Lösung enthalten (**V 1 & V 6**). Das  $\text{CuSO}_4$  und das THPTA werden jeweils in der gleichen Konzentration von (0, 10, 20, 30, 40, 50, 100 bzw. 150)  $\mu\text{M}$  zugegeben. Die Detektoreinstellungen des vorab beschriebenen Experimentes werden beibehalten.

#### **8.4.4 Click-Reaktion am DNA-Templat ohne THPTA**

Die in Kapitel 4.4.2 beschriebene Reaktion zwischen der Azid-DNA 1 und der Acetylid-DNA 2 (je 2  $\mu\text{M}$ ) am 19mer-Templat (2  $\mu\text{M}$ ) wird in einem 10 mM MOPS-Puffer ( $\text{pH} = 7,5$ ) mit 150 mM NaCl durchgeführt. Die Konzentration des  $\text{CuSO}_4$  beträgt 100  $\mu\text{M}$ , die des NaAsc 1 mM. Die Detektor-Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 730 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = \text{Slits}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ .

Für den Versuch werden zwei Proben hergestellt; eine enthält die Templat-DNA, die andere enthielt diese nicht.

#### **8.4.5 Click-Reaktion am DNA-Templat mit THPTA**

In Kapitel 4.4.3 werden zunächst zwei Experimente mit einer 2  $\mu\text{M}$  bzw. einer 200 nM Oligonukleotid-Konzentration beschrieben. Wieder werden die Experimente jeweils in 10 mM MOPS-Puffer ( $\text{pH} = 7,5$ ) mit 150 mM NaCl durchgeführt.

##### **a) Kinetik mit 2 $\mu\text{M}$ DNA**

Die Konzentration aller eingesetzten Nucleinsäuren liegt bei 2  $\mu\text{M}$ . Die Konzentration des  $\text{CuSO}_4$  beträgt 2  $\mu\text{M}$ , die des NaAsc 100  $\mu\text{M}$  und die des THPTA 6  $\mu\text{M}$ . Die



Detektor-Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 730 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = \text{Slits}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ .

**b)** Kinetik mit 200 nM DNA

Bei diesem Experiment liegt die Konzentration der eingesetzten Nukleinsäuren bei 200 nM. Die Konzentration des  $\text{CuSO}_4$  beträgt 200  $\mu\text{M}$ , die des NaAsc 2 mM und die des THPTA 200  $\mu\text{M}$ . Die Detektor-Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 730 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = \text{Slits}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ .

**c)** Click-Reaktion mit Heizen auf 85° C

Es werden drei Proben vorbereitet, die die Azid-DNA 1, die Acetylid-DNA 2 sowie 0,003 % Triton X-100 enthalten. Zusätzlich enthält die erste Probe das Templat, die zweite enthält ein Mismatch-Templat und die dritte enthält gar kein Templat. Die Konzentration sämtlicher DNAs liegt bei 200 nM. Nach der Zugabe von 20  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 60  $\mu\text{M}$  THPTA und 100  $\mu\text{M}$  NaAsc wird sofort ein Emissions-Spektrum bei  $T = 85^\circ \text{ C}$  gemessen ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ). Nach Abkühlen auf  $T = 25^\circ \text{ C}$  wird diese Temperatur für 17 min gehalten und im Anschluss nochmals ein Spektrum bei  $T = 85^\circ \text{ C}$  gemessen. Die Einstellungen des Detektors sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 700 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = \text{Slits}_{\text{em}} = 20 \text{ nm}$ .

#### 8.4.6 Optimierung der Cu-Konzentration für das Cu(0)-Assay

Für das in Kapitel 5.2.2 beschriebene Experiment wird die 22-mer Probe zusammen mit dem 32-mer Target (je 500 nM) in 10 mM MOPS (pH = 7,5) und 150 mM NaCl sowie 1 mM NaAsc mit unterschiedlichen Cu-Konzentrationen (0, 10, 20, 40, 60, 100, 150, 200)  $\mu\text{M}$  versetzt und nach 10 Minuten die Emission bei 580 nm gemessen. Die Einstellungen des Detektors sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 700 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = \text{Slits}_{\text{em}} = 20 \text{ nm}$ .

#### 8.4.7 Untersuchung des 10-mer Probe / 22-mer Target Systems

Bei den in Kapitel 5.2.3 beschriebenen Experimenten werden die 10-mer Probe und das 22-mer Target jeweils in einer Konzentration von 100 nM in 10 mM MOPS (pH = 7,5) mit 150 mM NaCl eingesetzt. Die Konzentration des  $\text{CuSO}_4$  beträgt 100 nM, die des NaAsc beträgt 1 mM. Die Einstellungen des Detektors sind  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $U = 700 \text{ V}$ ,  $\text{Slits}_{\text{ex}} = \text{Slits}_{\text{em}} = 20 \text{ nm}$ . Der beschriebene Scan wird nach 0 Minuten und nach 21 Minuten aufgenommen. Die gezeigte Kinetik wird mit der Zugabe des  $\text{CuSO}_4$  gestartet.

#### 8.4.8 Untersuchung längerer DNA-Sequenzen

Sämtliche in Kapitel 5.2.4 beschriebenen Experimente werden in 10 mM MOPS (pH = 7,5) mit 150 mM NaCl durchgeführt. Die Konzentration des NaAsc ist 1 mM, die Konzentration an  $\text{CuSO}_4$ , womit die Kinetiken jeweils gestartet werden, beträgt 100  $\mu\text{M}$ . Die Konzentration der jeweils beteiligten DNAs variiert von 1 nM bis 200 nM und ist in Kapitel 5.2.4 im Einzelnen beschrieben. Die Detektoreinstellungen variieren jeweils in Abhängigkeit von der zu detektierenden Nukleinsäurekonzentration.

#### 8.4.9 Bipyridin-Assay zur Quantifizierung der Fe-Freisetzung

Um die Freisetzung des Fe(II) aufgrund der Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  quantifizieren zu können, wird die Ferrocenkomponente (100  $\mu\text{M}$ ; Stammlösung 10 mM in DMF mit 2%  $\text{H}_2\text{O}$  und 1 mM NaAsc) zunächst mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) in 100 mM MOPS-Puffer (pH = 7,5) für 100 min inkubiert. Im Anschluß wird Natriumdithionit im Überschuss (20 mM) zugegeben, um evtl. entstandenes Fe(III) zurück zu reduzieren. Zuletzt werden 300  $\mu\text{M}$  2,2'-Bipyridin zugegeben, woraufhin sich der rote  $\text{Fe}(\text{Bipy})_3$ -Komplex bildet, welcher eine starke Absorption bei 519 nm zeigt. Anhand der Intensität der Rotfärbung lassen sich Rückschlüsse auf den Gehalt an freigesetztem Fe(II) ziehen.

#### 8.4.10 Quantifizierung der Radikalproduktion mittels DCFH-DA

Der nichtfluoreszente Farbstoff DCFH, welcher durch Einwirkung von NaOH aus DCFH-DA erhalten wird, wird durch die Einwirkung von ROS in das stark fluoreszierende Fluorescein umgewandelt.

##### **Erzeugung von DCFH aus DCFH-DA**

4,9 mg DCFH-DA werden in 100  $\mu$ l DMF gelöst und mit 900  $\mu$ l NaOH (0,1 M) versetzt. Die Mischung wird vor Lichteinfluss geschützt für 30 min bei RT inkubiert, woraufhin eine 10 mM DCFH-Lösung erhalten wird.

Zur Durchführung des Experimentes werden in einer Fluoreszenzküvette ( $V = 1$  ml) zunächst 100 mM MOPS-Puffer ( $\text{pH} = 7,5$ ), 5 mM Glutathion, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10  $\mu$ M DCFH und 10 mM EDTA vorgelegt. Die Messung wird gestartet ( $U = 400$  V;  $\lambda_{\text{Ex}}$ : 501 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$ : 531 nm). Sobald das erhaltene Fluoreszenzsignal stabil ist, wird die entsprechende Eisen-Komponente in einer 100  $\mu$ M Konzentration zugegeben.

#### 8.4.11 Untersuchung der Fe-Freisetzung in Zellen

Sowohl RKO- als auch SKOV3-Zelllinien (Zellzahl pro Ansatz:  $5 \times 10^6$  RKO;  $2 \times 10^6$  SKOV3;  $V = 1$  ml) werden mit FcBoron bzw. FcAc (je 100  $\mu$ M) für 1 Stunde inkubiert. Im Anschluß werden die Zellen pelletiert und mit frischem PBS versetzt. Anschließend werden die Zellen entweder mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  / Medium (10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder nur mit Medium versetzt und für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Pelletierungsschritt, gefolgt vom Austausch des Mediums durch frisches PBS, werden die Zellen lysiert. Dies geschieht durch das dreimalige Wiederholen von Einfrieren auf  $-80^\circ \text{C}$  und Auftauen auf RT. Der Eisengehalt des Zelllysats wird schließlich mit dem in Kapitel 8.4.9 beschriebenen 2,2'-Bipyridin-Assay bestimmt.

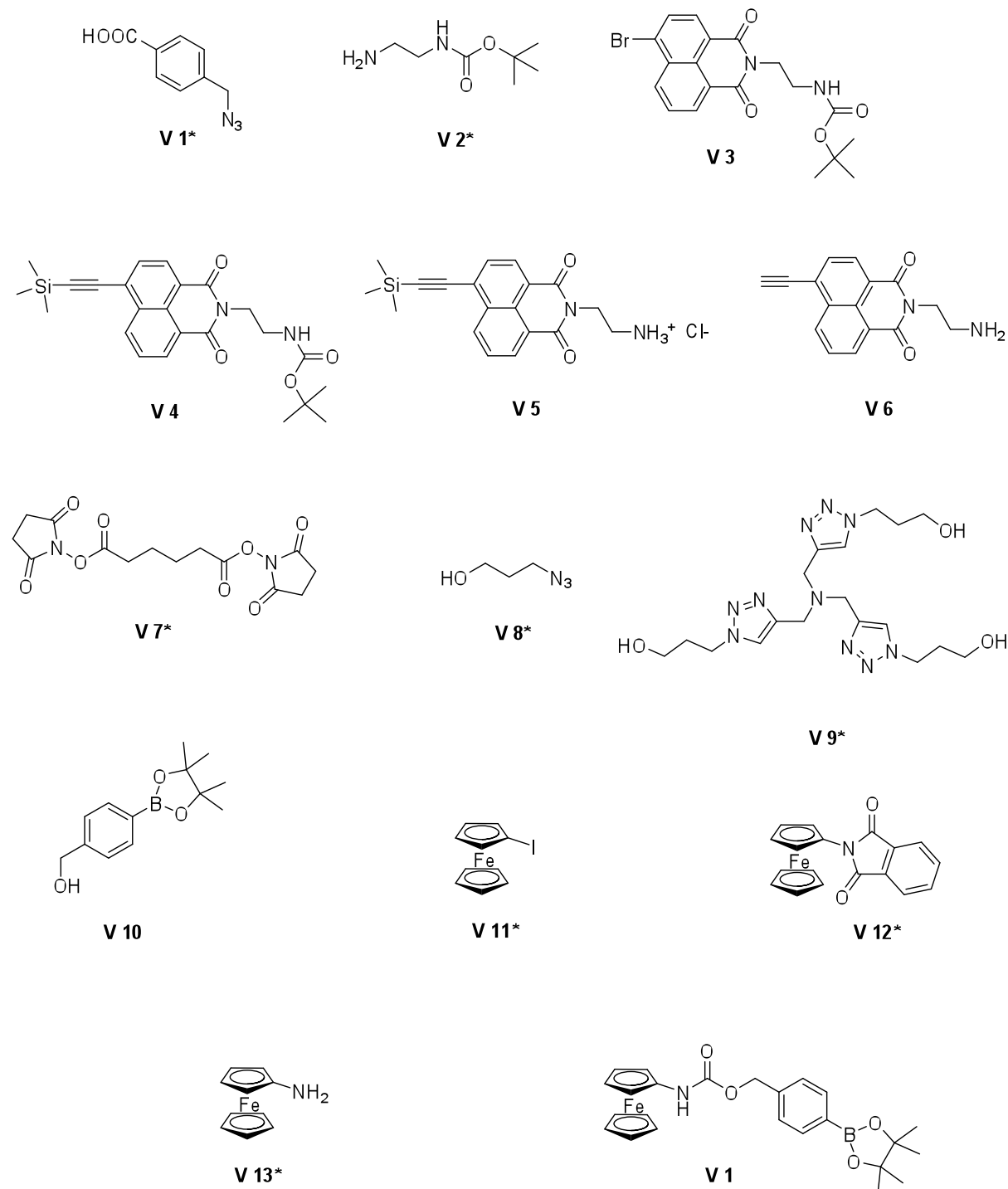
### 8.4.12 MTT-Assays

Die MTT-Assays werden in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Zellzahl pro Well sollte optimalerweise zwischen 20.000 und 50.000 liegen. Das Volumen pro Well beträgt  $V = 100 \mu\text{l}$ . Bei dem Medium handelt es sich um Phenolrotfreies RPMI-Medium mit 1 % FCS. Nach dem Aussähen sollten die Zellen 5 h ruhen, um optimal anhaften zu können. Im Anschluß wird die jeweilige Substanz in der entsprechenden Konzentration zugegeben, wobei darauf zu achten ist, dass die Konzentration in jeder Spalte konstant gehalten wird. Die ersten beiden Spalten werden nicht mit Substanz versetzt. Sie dienen als Blindwert, auf den die Zellzahlen normalisiert werden können. Nach 18 h werden zu jedem Well je  $20 \mu\text{l}$  einer MTT-Stammlösung (5 mg/ml PBS) zugegeben. Das MTT wird nun von den noch lebenden Zellen umgesetzt, woraufhin sich blaue Kristalle bilden. Diese werden nach 3 h durch Zugabe von  $90 \mu\text{l}$  SDS-Lösung (10 % in 0,01 M HCl) aufgelöst. Am nächsten Tag können die Platten im UV/Vis-Photospektrometer ausgemessen werden.

Soll bei einem Experiment  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugegeben werden, so wird dies in der Regel vor der Gabe der Substanz getan. Nach einer gewissen Inkubationszeit (abhängig vom Experiment) wird das Medium abgezogen und durch neues Medium ersetzt. Im Anschluss wird die entsprechende Substanz zugegeben und wie oben beschrieben verfahren.

## 8.5 Übersicht der synthetisierten Verbindungen

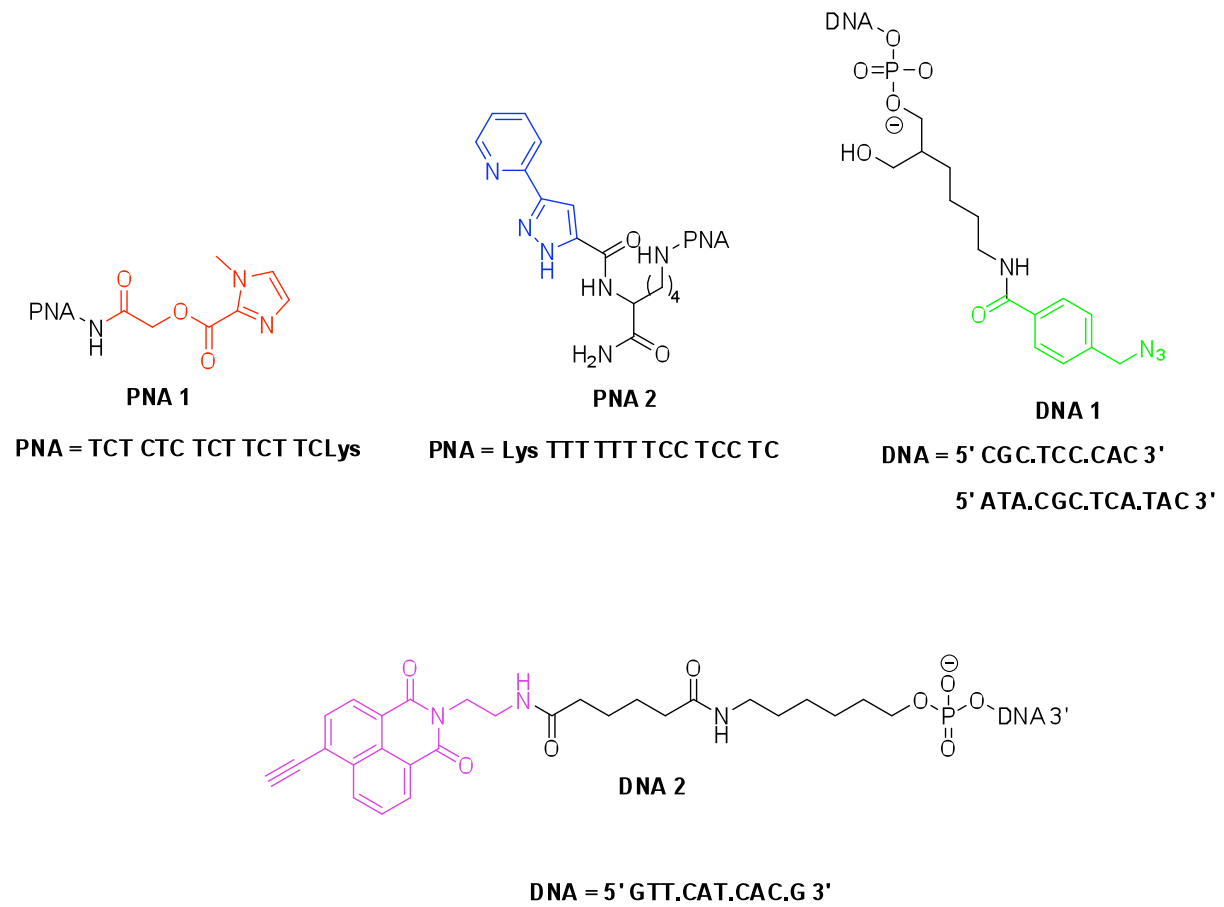
### 8.5.1 Organische Moleküle



\* Literaturbeschriebene Synthesen

**Abb. 8.2:** Übersicht über die synthetisierten organischen Moleküle.

## 8.5.2 Nukleinsäuren



**Abb. 8.3:** Übersicht über die synthetisierten Nukleinsäuren.

## 9 Literatur

- [1] J.D. Watson, F.H.C. Crick *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [2] a) D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, Lehrbuch der Biochemie. Weinheim. **2002**;  
b) L.Stryer, Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg. **1996**. c) P. Christen, Biochemie. Heidelberg. **2005**.
- [3] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt *Science* **1991**, 154, 1497-1500.
- [4] M. Eriksson, P. E. Nielsen *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 410-413.
- [5] L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan *Science* **1995**, 270, 1838-1841.
- [6] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1895-1897.
- [7] E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dfsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 2868.
- [8] M. Bergmann, L. Zervas, *Ber. Df.wh. Chem. Ges.* **1932**, 65, 1192.
- [9] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- [10] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 801.
- [11] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 501.
- [12] J. D. Bueno Toro, *Dissertation* **2005**, Universität Heidelberg.
- [13] R. L. Letsinger, W. B. Lursford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3655.
- [14] S. A. Narang, *Tetrahedron*, **1984**, 39, 323.

- [15] Beyer, Walter, *Lehrbuch der Org. Chemie*, 23. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart, **1998**.
- [16] P. Li, J.-C. Xu, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 4437.
- [17] J. Brunner, A. Mokhir, R. Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12410-12411.
- [18] I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7849-7856.
- [19] D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, 114(1), 93-95.
- [20] R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpene, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6859-6864.
- [21] American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2009*. California: American Cancer Society; **2009**.
- [22] Y. Jung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.*, **2007**, 107(5), 1387-1407.
- [23] C.M. Galmarini, J.R. Mackey, G. Dumontet, *Lancet Oncol.*, **2002**, 3, 415-424.
- [24] J.V. Melo, D.J. Barnes, *Nature Rev. Cancer*, **2007**, 7, 441-453.
- [25] J. Couzin, *Science*, **2002**, 298, 522-525.
- [26] S. Frantz, *Nature*, **2005**, 437, 942-943.
- [27] T.M. Allen, *Nature Rev. Cancer*, **2002**, 5, 750-765.
- [28] R. Duncan, *Nature Rev. Cancer*, **2006**, 6, 688-701.



- [29] R. Paschke, C. Paetz, T. Mueller, H.-J. Schmoll, H. Mueller, E. Sorkau, E. Sinn, *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10(19)*, 2033-2044.
- [30] K. Temming, R.M. Schiffelers, G. Molema, R.J. Kok, *Drug Resist. Update*, **2005**, *8*, 381–402.
- [31] V. C. Jordan, J. M. G. Schafer, A. S. Levenson, H. Liu, K. M. Pease, L. A. Simons, J. W. Zapf, *Adv. Cancer Res.*, **2001**, *61*, 6619.
- [32] M.P. Coleman, *Breast Cancer Res.*, **1999**, *1*, 22–26.
- [33] S.O. McDonnell, M.J. Hall, L.T. Allen, A. Byrne, W.M. Gallagher, D.F. O’Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 16360-16361.
- [34] J. Chen, K. Stefflova, M.J. Niedre, B.C. Wilson, B. Chance, J.D. Glickson, G. Zheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 11450-11451.
- [35] A.M. Mansour, J. Dreves, N. Esser, F.M. Hamada, O.A. Badary, C. Unger, I. Fichtner, F. Kratz, *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 4062-4066.
- [36] B. Halliwell, *Biochem. J.*, **2007**, *401*, 1-11.
- [37] R.H. Engel, A.M. Evens, *Frontiers Biosci.*, **2006**, *11*, 300-312.
- [38] T. Finkel, *Curr. Opinion Cell Biol.*, **2003**, *15*, 247-254.
- [39] P.T. Schumacker, *Cancer Cell*, **2006**, *10*, 175-176.
- [40] K. Davison, K.K. Mann, W.H. Miller, *Semin. Hematol.*, **2002**, *39(2)*, *Suppl. I*, 3-7.
- [41] R.T. Dorr, J.D. Liddil, M.J. Soble, *Investigational New Drugs*, **1986**, *4*, 305-313.

- [42] M.F. Renschler, *Eur. J. Cancer*, **2004**, *40*, 1934-1940.
- [43] D. Trachootham, Y. Zhou, H. Zhang, Y. Demizu, Z. Chen, H. Pelicano, P.J. Chiao, G. Achanta, R.B. Arlinghaus, J. Liu, P. Huang, *Cancer Cell*, **2006**, *10*, 241-252.
- [44] N. Hulsman, *et al*, *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2424-2431.
- [45] D. Magda *et al*, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **2001**, *51(4)*, 1025-1036.
- [46] J.R. Totter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1980**, *77*, 1763–1767.
- [47] K.B. Beckman, B.N. Ames, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 19633–19636.
- [48] L.K. Charkoudian, D.M. Pham, K.J. Franz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 12424-12425.
- [49] Y. Wei, M. Guo, *Angew. Chem.*, **2007**, *119*, 1-5.
- [50] N.S. Postma, E.C. Mommers, W.M.C. Eling, J. Zuidema, *Pharm. World & Science*, **1996**, *18(4)*, 121-129.
- [51] D. R. Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 5931-5985.
- [52] G. Jaouen, *Bioorganometallics: Biomolecules, labeling, Medicine*, **2006**, VCH: Weinheim.
- [53] N. Metzler-Nolte, *Chimia.*, **2007**, *61*, 736-741.
- [54] M.F.R. Fouda, M.M. Abd-Elzaher, R.A. Abdelsamaia, A.A. Labib, *Appl. Organomet. Chem.*, **2007**, *21*, 613-625.
- [55] E. I. Edwards, R. Epton, G. Marr, *J. Organomet. Chem.*, **1975**, *85*, C23–C25.

- [56] E. I. Edwards, R. Epton, G. Marr, *Ibid*, **1976**, 122, C49–C53.
- [57] E. I. Edwards, R. Epton, G. Marr, *Ibid.*, **1979**, 168, 259–272.
- [58] C. Biot *et al*, *J. Med. Chem.*, **1997**, 40(23), 3715–3718.
- [59] A. Nguyen, A. Vessieres, E.A. Hillard, S. Top, P. Pigeon, G. Jaouen, *Chimia*, **2007**, 61, 716-724.
- [60] W.A. Wlassoff, C.D. Albright, M.S. Sivashinski, A. Ivanova, J.G. Appelbaum, R.I. Salganik, *J. Pharmacy & Pharmacology*, **2007**, 59, 1549-1553.
- [61] S. Top, A. Vessieres, C. Cabestaing, I. Laios, G. Leclercq, C. Provot, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 637-639, 500-506.
- [62] A. Vessieres, S. Top, P. Pigeon, E. Hillard, L. Boubeker, D. Spera, G. Jaouen, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48(12), 3937-3940.
- [63] Reviews: a) Y. Gat, D. G. Lynn *Templated Org. Synthesis* **2000**, 133-157, b) Y. Gat, D. G. Lynn *Biopolymers* **1998**, 48(1), 19-28.
- [64] S. Sando, H. Abe, E. T. Kool *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1081.
- [65] N.G. Dolinnaya, O.V. Pyatrauskene, Z.A. Shabarova, *FEBS*, 1991, **284(2)**, 232-234.
- [66] K.J. Luebke, P.B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8733-8735.
- [67] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson *Molecular Biology of the Cell – 3rd ed.* Garland Publishing / Taylor & Francis Group, New York. **1994**, 1294.
- [68] D. Sarracino and C. Richert. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1996**, 6(24), 3057.

- [69] I. Grabtchev, Tz. Philipova, P. Méallier, S. Guittonneau, *Dyes and Pigments* **1996**, 31(1), 31-34.
- [70] K. Kawai, K. Kawabata, S. Tojo, T. Majima, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2363–2366.
- [71] M. C. Wamberg, K. Walczak, L. Andersen, A. A. Hassan, E. B. Pedersen, *Helv. Chim. Acta* **2006**, 89, 1826-1840.
- [72] D. Esteban-Gomez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, D. Sacchi, *J.Mater.Chem.* **2005**, 15, 2670–2675.
- [73] D. Esteban-Gomez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 5717-5720.
- [74] B. Liu, H. Tian, *Chem. Commun.* **2005**, 3156-3158.
- [75] J. Wang, S. Jin, S. Akay, B. Wang, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2091- 2099.
- [76] D. Srikun, E. W. Miller, D. W. Domaille, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4596-4597.
- [77] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, **2002**, 1. Auflage, Wiley-VCH Weinheim.
- [78] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2056 – 2075.
- [79] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192-3193.

- [80] Ju et al., *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609-612.
- [81] Carell et al., *Org. Lett.* **2006**, *8(17)*, 3639-3642.
- [82] Sirivolu et al., *Chem. Biodiv.* **2006**, *3*, 509-514.
- [83] Mitchison et al., *PNAS* **2008**, *105(7)*, 2415-2420.
- [84] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
- [85] C. Nolte, P. Mayer, B. F. Straub, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2147 –2149.
- [86] K. Sakurai, T. M. Snyder, and D. R. Liu *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (6), 1660–661.
- [87] R. Csuk et al., *Z. Naturforsch.*, **2004**, *60b*, 89-98.
- [88] Hill, M.; Bechet, J.-J.; D’Albis, A. *FEBS Lett.* **1979**, *102*, 282-286.
- [89] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. Fokin, *Org.Lett.*, *6*, **2004**, 2853.
- [90] I. Kuniharu et al., *Chem. Commun*, **2008**, 4270-4272.
- [91] C. M. Drain et al., *ACSNano*, **2009**, *3* (2), 339-334.
- [92] R. M. Dickson et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5207-5212.
- [93] R. M. Dickson et al., *PNAS*, **2007**, *104* (31), 12616-12621.

- [94] R. M. Dickson et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5038-5039.
- [95] R. M. Dickson et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 318-320.
- [96] A. T. Woolley et al., *Nano Letters*, 2003, *3* (3), 359-363.
- [97] S. Goldstein, D. Meyerstein, G. Czapski, *Free Rad. Biol. Med.*, **1993**, *15*, 435-445.
- [98] K. Heinze, M. Schlenker, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 2974-2988.
- [99] T.P. Szatrowski, C.F. Nathan, *Cancer Res.*, **1991**, *51*, 794-798.
- [100] Y. Ma, Z. Liu, R.C. Hider, F. Petrat, *Anal. Chem. Insights*, **2007**, *2*, 61-67.
- [101] P. Sen et al., *J Nanopart Res*, **2008**, *10*, 107-114.
- [102] Haddleton et al., *Chem. Commun.*, **2005**, 2089.

Erklärung gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung

a) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

b) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsvorhaben beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fäkultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 22.09.2009

---

Elmar Jentsch