

**Synthese und Anwendung
Metallkomplex-modifizierter Oligonucleotide**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Arnd Sprödefeld
aus Holzminden

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese Bisterpyridin-funktionalisierter Oligonucleotide und die Anwendung ihrer Zn^{II} - und Cu^{II} -Komplexe als Sonden für den amplifizierten sequenzspezifischen DNA-Nachweis. Durch Hybridisierung mit Target-DNA kommt es zur Destabilisierung des Metallkomplexes, so dass durch Zugabe geeigneter Präkatalysatoren katalytisch aktive Spezies gebildet werden. Der Einsatz chromogener oder fluorogener Substrate erzeugt nachfolgend ein Farb- oder Fluoreszenzsignal.

Bisterpyridin-Metallkomplex-funktionalisierte Oligonucleotide unterschiedlicher Länge und Sequenz wurden zur Optimierung des Systems hinsichtlich ihrer thermodynamischen und kinetischen Stabilität charakterisiert. Die Signal-amplifikation gelang erstmals durch eine zweistufige Kaskade, wobei zunächst ein chemischer Cu^{II} -Katalysator gebildet wird, der dann einen enzymatischen Cofaktor aktiviert und so eine Enzymkatalyse in Gang setzt.

Weiterhin befasst sich die Arbeit mit der Synthese und Charakterisierung katalytisch aktiver Kupferkomplex-DNA-Konjugate. Diese sollen als immobilisierbare Redoxkatalysatoren die erstmalige Beobachtung einer Metallkomplex-Katalyse auf Einzelmolekülebene ermöglichen. Durch Hybridisierung mit einem Farbstoff-DNA-Konjugat können z. B. Änderungen der Oxidationsstufe des Kupfers direkt über Fluoreszenzfluktuationen des Farbstoffs beobachtet werden.

Dazu wurde der Bisphenanthrolin-Ligand 3-Clip-phen kovalent an Oligonucleotide gekoppelt. Ein Hybrid mit Fluorophor-markierter DNA zeigt die Bindung eines Cu^{II} -Ions durch 3-Clip-phen anhand von Fluoreszenzlöschung an, was auch auf Einzelmolekülebene bestätigt werden konnte. Die Komplexe sind Redoxkatalysatoren z. B. für die Oxidationen von Thiolen durch Luftsauerstoff oder von Hydrochinon durch Wasserstoffperoxid.

Abstract

This thesis covers the synthesis of bisterpyridine-modified oligonucleotides and application of their Zn^{II} - and Cu^{II} -complexes for amplified sequence-specific DNA detection. Hybridization with target-DNA leads to destabilization of DNA-metal complexes and enables coligands to form catalytically active species. By use of suitable substrates a colorimetric or fluorimetric signal can be generated.

Bisterpyridine-metal-complex-modified oligonucleotides of different sequences and length were characterized to optimize the system. Signal amplification was firstly realized by a two-step signal cascade. After formation of a chemical Cu^{II} -catalyst, an enzymatic cofactor is activated, which initiates an enzyme catalysis.

Furthermore, this thesis deals with the synthesis and characterization of catalytically active copper-complex-modified oligonucleotides, which are supposed to serve as immobilizable redox catalysts for monitoring of metal complex catalyzed processes on a single-molecule level. Hybridization with dye-modified oligonucleotides allows to observe, for example, changes in the oxidative state of copper by fluctuations of fluorescence intensity of the dye.

To this end, the bisphenanthroline ligand 3-clip-phen was covalently coupled to oligonucleotides. Hybridized to dye-modified DNA, binding of Cu^{II} can be monitored by fluorescence quenching, which could also be proved in single-molecule experiments. These complexes are redox catalysts for e. g. the oxidation of thiols by oxygen or hydroquinone by hydrogen peroxide.

Synthese und Anwendung Metallkomplex-modifizierter Oligonucleotide

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer
PD Dr. Dirk-Peter Hertel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2010

Die experimentellen Arbeiten wurden im Zeitraum von Januar 2007 bis Februar 2010 unter der wissenschaftlichen Anleitung und Betreuung von Prof. Dr. Roland Krämer am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Roland Krämer für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, viele wertvolle Anregungen und Diskussionen sowie für die persönliche Betreuung.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau von DNA	1
1.2	Sequenzspezifischer Nachweis von Nucleinsäuren	3
1.3	2,2':6',2''-Terpyridin-Metall-Komplexe	6
1.4	Einzelmolekülspektroskopie an DNA-immobilisierten Chelator-Farbstoff-Systemen	9
1.5	Cu-Komplexe als Katalysatoren für Redoxreaktionen	12
2	Zielsetzung	15
3	Ergebnisse und Diskussion	17
3.1	Stabilität von [(TPY) ₂ DNA]M ^{II} -Komplexen	17
3.1.1	Kinetische Stabilität	17
3.1.2	Thermodynamische Stabilität	20
3.2	Mechanistische Untersuchungen zum DNA-Nachweis mit [(TPY) ₂ DNA]M ^{II} -Komplexen	23
3.3	Integration alternativer katalytischer Module in das DNA-Nachweissystem	27
3.3.1	Click-Reaktion	28
3.3.2	Cu ^{II} -katalysierte Hydrazidspaltung mit anschließender HRP-Aktivierung	32
3.4	Synthese von CP und CPCOOH	41
3.5	Modifizierung von DNA mit CP und CPCOOH	44
3.6	Experimente mit CP	47
3.6.1	Stabilität von CPCu ^{II} -Komplexen	47
3.6.2	Vorexperimente zum Redoxverhalten von CPCu ^{II}	47
3.6.3	Cu ^{II} -katalysierte Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon	48

3.7	Experimente mit CPCOOH	53
3.7.1	Stabilität von CPCOOHCu ^{II} -Komplexen	53
3.7.2	CPCOOHCu ^{II} -katalysierte Oxidation von MBA	54
3.8	Experimente mit CP-TMR-dsDNA	56
4	Experimenteller Teil	62
4.1	Geräte und Chemikalien	62
4.2	Synthesen	64
4.2.1	Hämin-di(N,N'-acetylhydrazid)	65
4.2.2	3-Bromphenanthrolin	66
4.2.3	1,3-Bis(1,10-phenanthrolin-3-yloxy)propan-2-amin (CP)	68
4.2.4	4-(1,3-Bis(1,10-phenanthrolin-3-yloxy)propan-2-ylamino)- 4-oxobutansäure (CPCOOH)	70
4.3	DNA-Synthesen	71
4.3.1	Synthese der Bisterpyridin-DNA-Konjugate	71
4.3.2	Synthese der CP-DNA-Konjugate	74
4.4	Experimente zum DNA-Nachweis mit bisterpyridinmodifizierten Oligonucleotiden	77
4.4.1	Untersuchungen zur Stabilität von [(TPY) ₂ DNA]M ^{II}	77
4.4.2	DNA-Nachweis mit Zinpyr	78
4.4.3	DNA-Nachweis durch Click-Reaktion	78
4.4.4	DNA-Nachweis unter Nutzung des HRP-Assays	79
4.5	Experimente mit CP und CP-DNA-Konjugaten	81
4.5.1	Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon	81
4.5.2	Bildung und Zerfall des CPCOOHCu ^I -Komplex	82
4.5.3	Oxidation von MBA	83
4.5.4	Fluoreszenzlöschung und Regeneration von CP-TMR-dsDNA	83
5	Zusammenfassung	84

6	Anhang	88
6.1	Übersicht der modifizierten Oliginucleotide	88
6.2	UV/VIS-Spektren zur Stabilitätsbestimmung von CP und CPCOOH	89
6.3	CP-katalysierte Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon	90
6.4	Danksagung	92
7	Literatur	94

Abkürzungen

A	Adenosin
BPY	2,2'-Bipyridin
C	Cytosin
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CP	1,3-Bis(1,10-phenanthrolin-3-yloxy)propan-2-amin
CPCOOH	4-(1,3-Bis(1,10-phenanthrolin-3-yloxy)propan-2-ylamino)-4-oxobutansäure
d	Duplett
DCBPY	2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure
DCM	Dichlormethan
DHP	Dihydrogenphosphat
DIEA	N,N'-Diisopropylethylamin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
eq	Äquivalent
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Guanin
h	Stunde
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxy-1H-benzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
m	Multipllett
M	Metall
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption / ionisation – time of flight</i>

MBA	4-Mercaptobenzoessäure
Me	Methyl
MMT	Monomethoxytrityl
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernmagnetresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTA	Nitrilotriacetat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
phen	1,10-Phenanthrolin
PNA	Peptidnucleinsäure
q	Quartett
qi	Quintett
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SMFS	Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie (<i>single molecule fluorescence spectroscopy</i>)
T	Thymin
t	Triplett
tr	Retentionszeit
TFA	Trifluoressigsäure
THPTA	Tris((1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMR	Tetramethylrhodamin
TOF	Umsatzrate (<i>turnover frequency</i>)
TON	Umsatzzahl (<i>turnover number</i>)
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis-(2-methylpyridyl)ethylendiamin
TPY	2,2':6',2''-Terpyridin
TPYCOOH	6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)-hexansäure
UV/VIS	Ultraviolett/sichtbares Licht
Zinpyr	9-(<i>o</i> -Carboxyphenyl)-2,7-dichloro-4,5-bis[bis(2-pyridylmethyl)-aminomethyl]-6-hydroxy-3-xanthanon

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Aufbau von DNA
- Abb. 2:** DNA-Konformationen
- Abb. 3:** Vereinfachtes Schema der Genexpression
- Abb. 4:** Allosterische Kontrolle der Hybridisierung von $(\text{TPY})_2\text{DNA}$ durch Zn^{II} -Ionen
- Abb. 5:** Nachweis von DNA durch eine chemische Signalkaskade mit Amplifikation
- Abb. 6:** Struktur von 2,2':6',2''-Terpyridin
- Abb. 7:** Schematischer Aufbau eines konfokalen und eines TIRF-Mikroskops
- Abb. 8:** Prinzip der Fluoreszenzlöschung einer BPY-TMR-modifizierten dsDNA durch Cu^{II} -Koordination
- Abb. 9:** Rasterbilder von TMR-Bipyridin-Konjugaten mit zeitaufgelöster Messung der Fluoreszenzintensität
- Abb. 10:** Berechnete Strukturen für Cu^{II} -Bisphenanthrolinkomplexe
- Abb. 11:** Bestimmung der kinetischen Dissoziationskonstanten der Komplexe $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]M^{\text{II}}$ mit Hilfe des Chelators TPEN
- Abb. 12:** Änderung der UV-Absorption von $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit der Zeit in Gegenwart von TPEN
- Abb. 13:** Logarithmische graphische Darstellung der Werte der Absorption bei 323 nm von $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit der Zeit in Gegenwart von TPEN
- Abb. 14:** Änderung der UV-Absorption von $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Cu}^{\text{II}}$ mit der Zeit in Gegenwart von TPEN I
- Abb. 15:** Änderung der UV-Absorption von $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Cu}^{\text{II}}$ mit der Zeit in Gegenwart von TPEN II
- Abb. 16:** Struktur und Metallkoordination von Zinpyr
- Abb. 17:** Änderung der Fluoreszenz von Zinpyr mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ durch Zugabe von Target-DNA bzw. Zn^{II}
- Abb. 18:** Änderung der Fluoreszenz von Zinpyr mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ durch Zugabe von Target und Cu^{II}
- Abb. 19:** Änderung der Fluoreszenz von Zinpyr mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ bei 529 nm mit der Zeit durch Zugabe von Target-DNA

- Abb. 20:** Komplexierung von Cu^{II} durch Präkatalysator und anschließende Amplifikation nach Hybridisierung von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ mit komplementärer DNA
- Abb. 21:** Schema der Click-Reaktion. Die benötigte Cu^{I} -Verbindung kann *in-situ* durch Zugabe von Cu^{II} und Ascorbat generiert werden
- Abb. 22:** Templat-vermittelte Click-Reaktion unter Bildung eines Triazol-funktionalisierten 1,8-Naphtalimids
- Abb. 23:** Angestrebtes Nachweissystem für Nucleinsäuren mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ und einer Click-Reaktion als Amplifikationsmodul
- Abb. 24:** Fluoreszenz nach Click-Reaktion bei verschiedenen Cu^{II} -Konzentrationen
- Abb. 25:** Fluoreszenz nach Nucleinsäuredetektion mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ und anschließender Click-Reaktion
- Abb. 26:** Nachweis von DNA durch eine chemische Signalkaskade mit Amplifikation unter Verwendung von Carboanhydrase
- Abb. 27:** Reaktionsgleichung der katalytischen Umsetzung von Substrat S und H_2O_2 mit HRP
- Abb. 28:** Oxidationsprodukte von TMB
- Abb. 29:** H_2O_2 -Nachweis über oxidative Rekonstitution von HRP mit anschließender Signalamplifikation durch HRP-katalysierte Oxidation von TMB
- Abb. 30:** Cu^{II} -Nachweis durch hydrolytische Spaltung eines Fluorescein-Hydrazids
- Abb. 31:** Angestrebtes Nachweissystem für Nucleinsäuren mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ mit anschließender Amplifikation durch Hydrazidspaltung, oxidativer Rekonstitution von HRP und HRP-katalysierter Oxidation von TMB
- Abb. 32:** Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch H_2O_2 und Rekonstitution
- Abb. 33:** Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch Cu^{II} und Rekonstitution
- Abb. 34:** Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch $(\text{TPY})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ und Rekonstitution
- Abb. 35:** Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch DNA-Nachweis mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ und Rekonstitution
- Abb. 36:** Synthese von CP
- Abb. 37:** Synthese von CPCOOH

-
- Abb. 38:** Im Arbeitskreis *Krämer* verwendete Strategien zur DNA-Modifizierung
- Abb. 39:** Angestrebte CP-DNA Konjugate
- Abb. 40:** Reaktionsgleichung der Cu^{II}-katalysierten Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon
- Abb. 41:** Änderung der Absorption während der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon mit der Zeit
- Abb. 42:** Änderung der Absorption bei 242 nm bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 5-fachem Substratüberschuss
- Abb. 43:** Änderung der Absorption bei 242 nm bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 1000-fachem Substratüberschuss
- Abb. 44:** Änderung der Absorption von CPCOOH Cu^I mit der Zeit
- Abb. 45:** Reaktionsgleichung der Cu^{II}-katalysierten Oxidation von MBA
- Abb. 46:** Änderung der Absorption bei 303 nm bei der kupferkatalysierten Oxidation von MBA
- Abb. 47:** Prinzip der Fluoreszenzlöschung und -regeneration von CP-TMR-dsDNA durch Cu^{II}- und EDTA-Zugabe
- Abb. 48:** Änderung der Fluoreszenzintensität von CP-TMR-dsDNA bei 588 nm durch Cu^{II}- und EDTA-Zugabe mit der Zeit
- Abb. 49:** Einzelmolekül-Rasterbilder, Vergleich von TMR-BPY- und Atto620-CP-Konjugaten mit Messung der Fluoreszenzintensität
- Abb. 50:** Prinzip der Fluoreszenzlöschung und -regeneration von CP-TMR-dsDNA durch Wechsel der Oxidationsstufe des koordinierten Kupfers
- Abb. 51:** Änderung der Fluoreszenzintensität von CP-TMR-dsDNA bei 588 nm durch Zugabe von Cu^{II}, Dithionit und H₂O₂ mit der Zeit
- Abb. 52:** Änderung der Fluoreszenzintensität von CPCu^{II}-TMR-dsDNA bei 588 nm nach Zugabe verschiedener Reduktionsmittel mit der Zeit
- Abb. 53:** Änderung der Fluoreszenzintensität von CP-TMR-dsDNA bei 588 nm durch Zugabe von Cu^{II}, MBA und EDTA mit der Zeit
- Abb. 54:** 3',5'-Festphasensynthese bisterpyridin-modifizierter DNAs
- Abb. 55:** 3',5'-Festphasensynthese CP-modifizierter DNAs
- Abb. 56:** Nachweis von DNA durch eine chemische Signalkaskade mit Amplifikation
- Abb. 57:** Prinzip der Fluoreszenzfluktuation einer CPCu^{II}-TMR-modifizierten dsDNA durch Redoxprozesse

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Bildungs- und Dissoziationsraten sowie Bildungskonstanten der Monoterpyridin-Komplexe von Fe^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , Zn^{II} und Cu^{II} bei 25°C
- Tab. 2:** Bildungs- und Dissoziationsraten sowie Bildungskonstanten der Bisterpyridin-Komplexe von Fe^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , Zn^{II} und Cu^{II}
- Tab. 3:** Halbwertszeiten und Dissoziationsraten von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit DNA1-5 ermittelt aus der Absorptionsabnahme bei 323 nm
- Tab. 4:** Stabilitätskonstanten $\log K$ von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit DNA1-5
- Tab. 5:** Aktivität der eingesetzten Cu^{II} -Katalysatoren bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 5-fachem Substratüberschuss
- Tab. 6:** Aktivität der eingesetzten Cu^{II} -Katalysatoren bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 1000-fachem Substratüberschuss
- Tab. 7:** Aktivität der eingesetzten Cu^{II} -Katalysatoren (20 mol%) bei der Oxidation von MBA

1 Einleitung

1.1 Aufbau von DNA

Nucleinsäuren treten als Informationsträger in allen Zellen des Tier- und Pflanzenreiches auf. Desoxyribonucleinsäuren (DNAs) gehören zu dieser fundamentalen Verbindungsklasse und haben zudem noch eine einzigartige Eigenschaft: DNA ist das einzige Molekül, das Anweisungen für seine eigene Replikation enthält.¹

DNA ist ein Biopolymer aus Nucleotiden. Als Nucleotid bezeichnet man eine Einheit aus 2'-Desoxyribose, einer heterocyclischen Pyrimidin- oder Purin-Base und einem Phosphatrest. Die 3'-Hydroxygruppe einer 2'-Desoxyriboseeinheit ist über eine Phosphodiesterbindung mit der 5'-Hydroxygruppe des nächsten Zuckerrestes verknüpft und bildet so das Rückgrat des DNA-Stranges. Die vier verschiedenen Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) sind N-glykosidisch mit dem C1-Atom der 2'-Desoxyribose verknüpft. DNA liegt nicht als Einzelstrang vor, sondern besteht in der Regel aus zwei antiparallel verlaufenden Nucleotidketten, die sich um eine imaginäre Achse winden und so eine Doppelhelix bilden. Die hydrophoben Basen zeigen dabei nach innen und stabilisieren die Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen untereinander, das negativ geladene Rückgrat zeigt nach außen (s. **Abb. 1**) Diese räumliche Struktur wurde 1953 von *Watson* und *Crick* mithilfe der Röntgenstrukturanalyse belegt.²

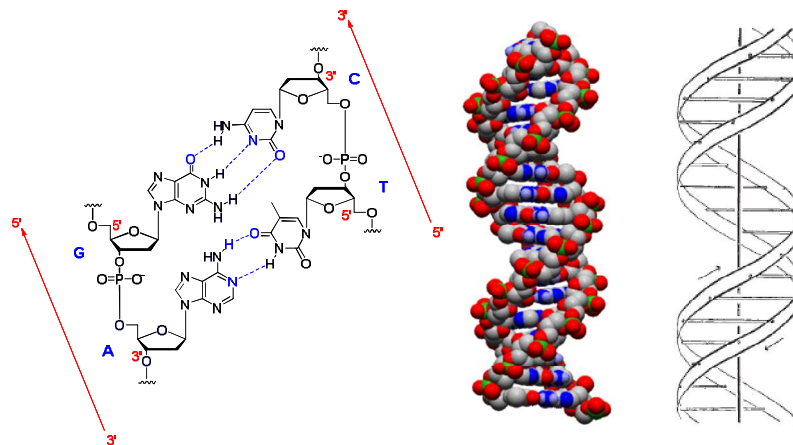


Abb. 1: Aufbau von DNA: Bindungsverhältnisse (*links*), Kalottenmodell (*Mitte*),³ schematischer Aufbau nach *Watson* und *Crick* (*rechts*).

In Abhängigkeit ihrer Länge, Basensequenz oder äußeren Bedingungen wie Salzgehalt des umgebenden Mediums kann Doppelstrang-DNA (dsDNA) verschiedene Konformationen einnehmen. Am häufigsten liegt sie als B-DNA vor, was der von *Watson* und *Crick* beobachteten Form entspricht. Die Helix ist dabei rechtgänglich, die Basen stehen nahezu senkrecht zur Mittelsachse. Der Basenabstand beträgt 0,34 nm, eine Windung besteht aus 10 Basenpaaren. Zwischen den Windungen kann man die große und die kleine Furche erkennen (s. **Abb. 2 Mitte**).

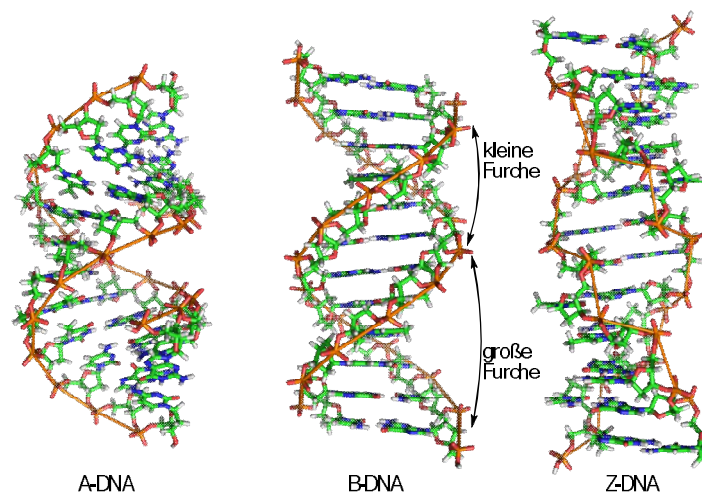


Abb. 2: DNA-Konformationen. A-DNA (*links*), B-DNA (*Mitte*), Z-DNA (*rechts*).

Sinkt der Wassergehalt im Medium, so nimmt DNA bevorzugt die A-Form an. Mit 11 Basenpaaren pro Windung ist sie kompakter als B-DNA, die Basenpaare sind etwas geneigt (s. **Abb. 2 links**). Bei sehr hohen Salzkonzentrationen kann DNA in der Z-Form vorliegen, bei der das Rückgrat eine Z-förmige Struktur aufweist (s. **Abb. 2 rechts**). Vorzugsweise wird diese Konformation von relativ kurzen Oligonucleotiden eingenommen, bei denen Purin- und Pyrimidinbasen alternierend vorliegen.

Die Aufgabe von DNA besteht darin, die komplette Information über den Aufbau der Zelle zu speichern. „Baupläne“ für Proteine und andere für den Zellstoffwechsel wichtiger Moleküle befinden sich in Genen in Form von doppelsträngiger DNA. Die genetische Information liegt dabei codiert durch die Basensequenz vor und wird bei der Transkription in die entsprechende komplementäre RNA übersetzt. An den Ribosomen entsteht daraus durch Translation eine entsprechende

Aminosäuresequenz, aus der ein Protein aufgebaut wird (s. **Abb. 3**). Diesen Vorgang nennt man Proteinbiosynthese oder Genexpression.⁴

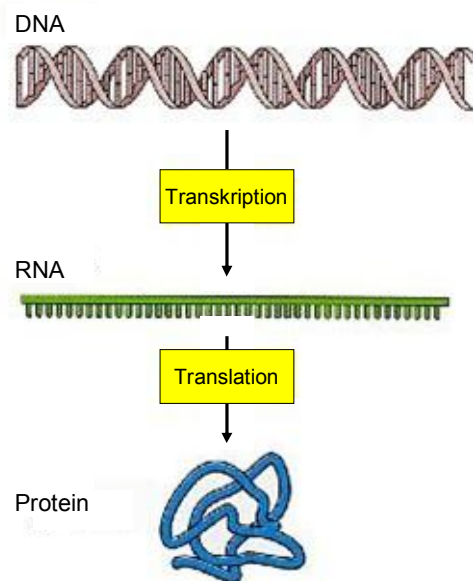


Abb. 3: Vereinfachtes Schema der Genexpression.

1.2 Sequenzspezifischer Nachweis von Nucleinsäuren

Sequenzspezifische Methoden zur hochsensitiven und –selektiven Echtzeit-Detektion von Nucleinsäuren sind von großer wissenschaftlicher und gesellschaftlicher Bedeutung. Vor allem durch die voranschreitende Komplettierung genomischer Datenbanken steigt der Bedarf weiter an. Allein 2009 wurden über 8500 Artikel publiziert und über 1500 Patente eingereicht, die sich direkt mit Möglichkeiten zur DNA-Detektion befassen.⁵ Bestimmte Krebsarten werden auf Mutationen einer vorgegebenen Basensequenz zurückgeführt,⁴ Anlagen für vererbare Krankheiten liegen dort verschlüsselt verborgen und auch für die Entwicklung bestimmter Medikamente sind detaillierte Information über die Beschaffenheit der DNA unerlässlich.⁶

In bioanalytischen Anwendungen liegt das Zielmolekül häufig in sehr geringen Konzentrationen vor, weshalb Methoden zur Verstärkung des Detektionssignals eine wichtige Rolle spielen. Dabei gibt es zwei Strategien. Häufig wird das Zielmolekül vervielfacht und so im anschließenden Nachweis ein verstärktes Signal erhalten

(„*target amplification*“). Hierzu zählen alle PCR-unterstützten Nachweisverfahren. Der Vorteil dieser Strategie liegt in der hohen Sensitivität.⁷ Nachteilig wirken sich jedoch der hohe Arbeitsaufwand, die Kosten und die Temperaturempfindlichkeit aus.⁸ Daher wächst das Interesse an einfachen, PCR-unabhängigen *in-vitro*-Detektionsverfahren, die ein schnelles Probenscreening ermöglichen.

In biologischen Systemen werden chemische oder physikalische Signale durch mehrere aufeinander folgende Transduktions- und katalytische Amplifizierungsschritte, so genannte Signalkaskaden, effizient verstärkt und schnell in biochemische Antworten umgesetzt. In der Bio- und Chemosensorik wird die katalytische Signalverstärkung für die Entwicklung hochsensitiver Nachweisverfahren für Biomoleküle genutzt („*signal amplification*“). Ideal sind homogene Verfahren mit colorimetrischem oder Fluoreszenzsignal, da das Zielmolekül nicht abgetrennt oder immobilisiert werden muss und keine teure Laborausstattung notwendig ist.⁹ Derartige Verfahren beruhen z.B. auf chemischen Ligationsreaktionen,¹⁰ Interkalation von Farbstoffen¹¹ oder der Aktivierung gelöschter Fluoreszenzsonden („*molecular beacons*“).¹² Häufig konnten diese Ansätze den hohen Sensitivitätsansprüchen der bioanalytischen Anwendungsgebiete nicht genügen. In den letzten Jahren wurden jedoch katalytische Reaktionen zur DNA-Detektion vorgestellt, die äußerst hohe Sensitivitäten erreichen. Beispielsweise konnten Zielmolekül-katalysierte Ligationen^{13,14} oder die Bildung katalytisch aktiver dsDNAs¹⁵ realisiert werden. Auch die Verwendung von *molecular beacons* wurde optimiert. *Plaxco et al.* stellten 2010 ein System vor, bei dem der verwendete *molecular beacon* nach Hybridisierung mit Target-DNA durch eine Exonuclease selektiv zersetzt wird.¹⁶ Das Zielmolekül wird dabei unversehrt freigesetzt und steht weiterhin zur Verfügung, während die fluoreszierenden Spaltprodukte des *molecular beacons* detektiert werden. Auf diese Weise konnten durch einfache Prozeduren 10 pM DNA in 30 min und 20 aM DNA in 24 h nachgewiesen werden.

Eine neue Perspektive bietet der Einsatz von Nanopartikeln. Bei einfacher Handhabung ermöglichen sie eine „lokale Konzentrationserhöhung“ ähnlich heterogener Systeme. Ein 2009 von *Zhu et al.* vorgestelltes System nutzt beispielsweise mit zum Zielmolekül komplementärer DNA modifizierte Nanopartikel zum DNA-Nachweis.¹⁷ Durch Hybridisierung kommt es zur Aggregation verschiedener Nanopartikel an einer Phasengrenze, was zu einem

Farbumschlag führt. Aufgrund der hohen Kosten sind derartige Verfahren jedoch noch nicht ökonomisch sinnvoll.

Im Arbeitskreis *Krämer* wurde 2006 ein System zur Nucleinsäuredetektion vorgestellt, welches die Integration allosterischer Bindungsstellen in Nucleinsäuren nutzt, um die Wechselwirkung mit Metallen durch Nucleinsäure-Effektoren zu kontrollieren.¹⁸ Als Effektoren dienen hier Metallionen, als allosterische Bindungsstelle Terpyridin. Die Funktionalisierung von DNA-Oligonucleotiden mit Chelatliganden wie Terpyridin oder Bipyridin wurde zuvor schon von anderen Arbeitsgruppen zur Stabilisierung von Hybriden durch Metallionen¹⁹⁻²³ oder Konstruktion von DNA-Nanostrukturen²⁴⁻²⁶ genutzt, bisher jedoch nicht zur allosterischen Kontrolle der Hybridisierung (s. **Abb. 4**)

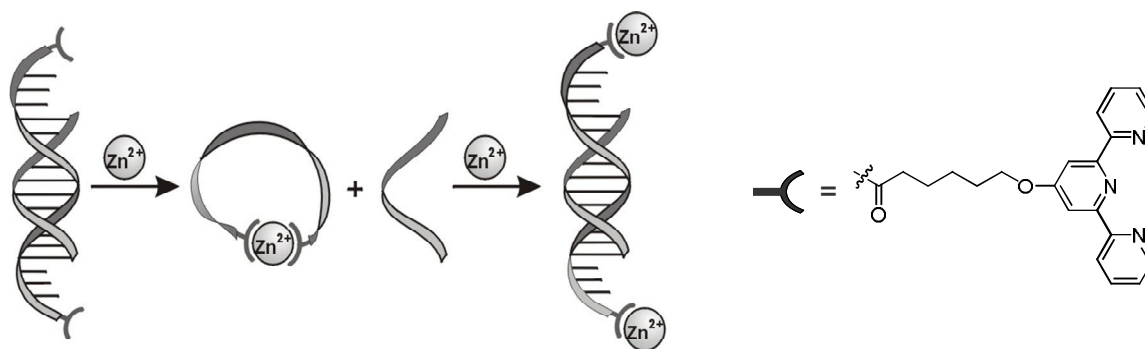


Abb. 4: Allosterische Kontrolle der Hybridisierung von (TPY)₂DNA durch Zn^{II}-Ionen.

Dabei ist (TPY)₂DNA ein allosterischer Rezeptor (DNA-Sonde) mit räumlich getrennten Bindungsdomänen für eine komplementäre Nucleinsäure und ein Metallion. Die Bindung einer komplementären Nucleinsäure (Target-DNA) schwächt die Wechselwirkung mit dem Metallion und umgekehrt, was als negative Allosterie bezeichnet wird. Abhängig vom Metallion bildet (TPY)₂DNA kinetisch stabile (Fe^{II}, Ni^{II}) oder labile (Zn^{II}, Cu^{II}) cyclische Komplexe.²⁷ Die Destabilisierung des Cu^{II}-Komplexes wurde in ein Detektionsverfahren umgesetzt, bei dem das Metallion durch Hybridisierung freigesetzt wird (s. **Abb. 5**). Es aktiviert dann als Cofaktor den Präkatalysator 1,10-Phenanthrolin, welcher in Gegenwart von Sauerstoff die nichtfluoreszierende Verbindung Dichlordihydrofluorescein in das fluoreszierende Dichlorfluorescein überführt.

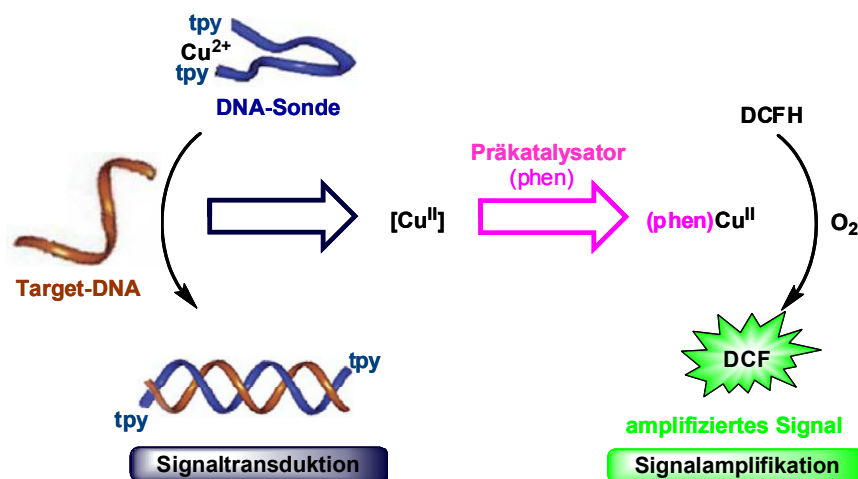


Abb. 5: Nachweis von DNA durch eine chemische Signalkaskade mit Amplifikation.

Dieses Verfahren wurde modifiziert, indem statt des chemischen Präkatalysators 1,10-Phenanthrolin Apoenzyme eingesetzt wurden, die durch Zink aktiviert werden.²⁸ Der Vorteil liegt dabei in den höheren Umsatzraten von Enzymen, woraus eine erhöhte Signalamplifikation resultiert. Unter Verwendung von Carboanhydrase gelangt man zu Nachweisgrenzen von bis zu $0,1 \mu\text{M}$ für die Target-DNA.

1.3 2,2':6',2''-Terpyridin-Metall-Komplexe

2,2':6',2''-Terpyridin (TPY) wurde erstmals 1932 von *Morgan* und *Burstall* synthetisiert und charakterisiert.²⁹ Seine einfache Zugänglichkeit und die ausführlich literaturbekannten Metall-Komplexierungseigenschaften machen es zu einem heutzutage oft verwendeten Chelatliganden.

Berechnungen zeigen, dass für den ungebundenen, nicht protonierten Liganden in der Gasphase die trans/trans-Konformation (s. **Abb. 6**) die energetisch günstigste ist.³⁰ Dies ist durch die sterische Abstoßung der *ortho*-Wasserstoffatome (3/3' und 5'/3'') und die elektrostatische Abstoßung der freien Elektronenpaare der Stickstoffatome erklärbar.

In Lösung hängt die Konformation von Terpyridin von der Möglichkeit der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen ab. So kommt es in sauren Medien durch Protonierung einer Pyridineinheit zu einer Stabilisierung der cis/cis-Form, wobei sich

Wasserstoffbrücken zwischen dem Proton und den beiden verbleibenden Stickstoffatomen ausbilden. Am energetisch günstigsten ist die Protonierung der zentralen Pyridineinheit, da so die beiden äußeren Einheiten über das Proton verbrückt werden können.³¹

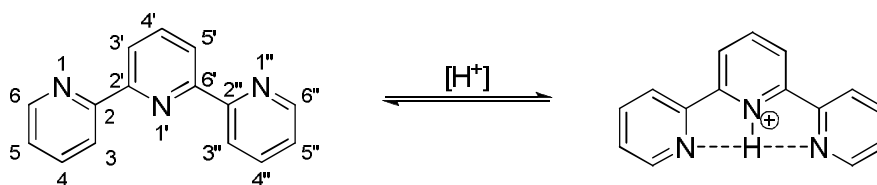


Abb. 6: Struktur von 2,2':6',2''-Terpyridin.

Terpyridin lässt sich zweifach zum Dikation protonieren. Es ist jedoch eine recht schwache Base, wie die pK_s -Werte von H_2TPY^{2+} ($pK_{S1} = 3,3$ und $pK_{S2} = 4,7$) belegen.³² Eine Protonierung des dritten Ringes wird erst durch Zugabe von 95%-iger Schwefelsäure erreicht. Die Protonierungskonstante konnte nicht bestimmt werden.³³ Terpyridin bildet mit vielen Übergangsmetallen in niedrigen Oxidationsstufen verzerrt oktaedrische Bisterpyridin-Metallkomplexe, die außerordentliche Stabilitäten aufweisen. Die Erklärung hierzu liegt zum einen im starken Chelateffekt, zum anderen in der starken Metall-Ligand $d-(\pi)$ Rückbindung.³⁴

Vor allem in 4'-Position modifizierte Terpyridinderivate sind den letzten Jahren als Bausteine für supramolekulare Komplexe und Polymere immer mehr in den Vordergrund gerückt. Sie erlauben eine colineare Anordnung zweier Struktureinheiten. Durch ihre C_{2v} -Symmetrie erhält man bei der Komplexbildung keine Isomergemische.³⁵ Wählt man als Substituent in 4'-Position Aryl- oder Alkynylsubstituenten, so bildet sich ein ausgedehntes konjugiertes π -System, was zu interessanten optischen Eigenschaften wie z.B. Lumineszenz entsprechender Komplexe mit Ruthenium, Osmium, Iridium oder Platin bei Raumtemperatur führen kann.³⁶

Terpyridin-Metall-Komplexe sind aufgrund ihrer hohen Stabilität für biochemische Anwendungen überaus interessant. In verschiedenen Arbeiten wurde die Anwendung von Bisterpyridin-Metallkomplexen als DNA- und RNA-Bindungsreagenzien beschrieben.^{37,38} Auch im Arbeitskreis *Krämer* wurden bereits diverse Arbeiten mit Terpyridinderivaten durchgeführt.²⁷

Die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften von Terpyridin-Komplexen der Übergangsmetalle wurden u. a. von *Wilkins et al.* untersucht.^{39,40} Er stellte fest, dass die Bildungsrate k_f der Monoterpyridin-Komplexe (TPY) M^{II} von 3d-Übergangsmetallen in der Reihenfolge Ni^{II} , Co^{II} , Fe^{II} , Zn^{II} , Cu^{II} zunehmen. Die Komplexbildungskonstanten K werden mittels Division von k_f durch die Dissoziationsrate k_d berechnet. Ein Anstieg der Stabilität der Monoterpyridin-Komplexe von Zn^{II} über Fe^{II} und Co^{II} zu Ni^{II} ist erkennbar (s. **Tab. 1**).

Metallion	$\log k_f$	$\log k_d$	$\log K = \log(k_f/k_d)$
Fe^{II}	4,9	-2,2	7,1
Co^{II}	4,4	-4,0	8,4
Ni^{II}	3,1	-7,6	10,7
Zn^{II}	6,1	0,1	6,0
Cu^{II}	ca. 7,3 ^d	-	-

Tab. 1: Bildungs- und Dissoziationsraten sowie Bildungskonstanten der Monoterpyridin-Komplexe von Fe^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , Zn^{II} und Cu^{II} bei 25°C. (^d bei 5°C)

Für Fe^{II} , Co^{II} und Ni^{II} wurden auch Bildungs- und Dissoziationsraten für die Bisterpyridin-Komplexe (TPY) $_2M^{II}$ bestimmt. Sie sind interessanterweise etwa um den Faktor 200 größer als die der Monoterpyridinkomplexe (s.

Tab. 2), was eine hohe kinetische Stabilität aufzeigt. Die Bisterpyridin-Komplexe von Cu^{II} und Zn^{II} sind deutlich labiler, was ihre hohen Ligand-Austauschgeschwindigkeiten belegen.⁴⁰

Metallion	$\log k_f$	$\log k_d$	$\log K = \log(k_f/k_d)$
Fe^{II}	ca. 7,3 ^d	-6,8	14,1
Co^{II}	ca. 6,7 ^d	-3,2	9,9
Ni^{II}	5,3	-5,8	11,1

Tab. 2: Bildungs- und Dissoziationsraten sowie Bildungskonstanten der Bisterpyridin-Komplexe von Fe^{II} , Co^{II} und Ni^{II} aus den entsprechenden Monoterpyridin-Komplexen bei 25°C.

1.4 Einzelmolekülspektroskopie an DNA-immobilisierten Chelator-Farbstoff-Systemen

Unsere Vorstellungen von Mechanismen chemischer Reaktionen beruhen auf einzelnen Atomen und Molekülen. Viele Messmethoden aber liefern Informationen über Ensembles, also gemittelte Werte durchschnittlicher Eigenschaften. Eine Möglichkeit, einzelne Moleküle zu detektieren bietet die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie („*single molecule fluorescence spectroscopy*“, SMFS). Mit ihrer Hilfe können unterschiedliche Eigenschaften einzelner Moleküle (statistische Heterogenität) oder zeitliche Änderungen ihrer Eigenschaften (dynamische Heterogenität) verfolgt werden. So ist es möglich, Unterschiede zwischen verschiedenen aktiven Spezies z.B. bei enzymkatalysierten Reaktionen zu erfassen und so wichtige Details zur mechanistischen Aufklärung zu erhalten.^{41,42}

Um einzelne Moleküle zu separieren, muss in Lösungen mit hoher Verdünnung gearbeitet werden. Im Einzelmolekülexperiment ist die Größe des Beobachtungsvolumens entscheidend, da das Signal/Rausch-Verhältnis durch kleinere Volumina verbessert wird. Zwei Techniken, die ein kleines Beobachtungsvolumen ermöglichen sind die Verwendung eines konfokalen Mikroskops oder eines TIRF-Mikroskops („*total internal reflection fluorescence*“).

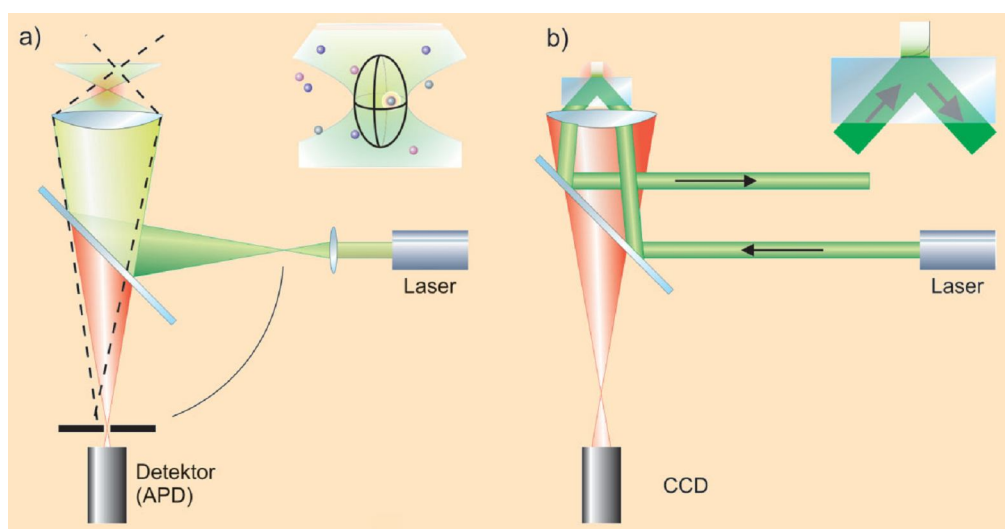


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines a) konfokalen Mikroskops und b) TIRF-Mikroskops.

Beim konfokalen Mikroskop werden der anregende Laser und der Detektor auf das gleiche Volumen fokussiert, wodurch ein Messbereich von einem Femtoliter erreicht werden kann (s. **Abb. 7a**). Das TIRF-Mikroskop erreicht durch eine vollständige Reflektion des Laserstrahls an einer Phasengrenzschicht zwischen Glas und Flüssigkeit oberflächengebundene Fluorophore mit einem Abstand von bis zu 100 nm vom Reflektionspunkt. Durch den Tunneleffekt gelangt das Licht in das optisch dünnere Medium (Flüssigkeit) und verliert dort exponentiell an Intensität (s. **Abb. 7b**).

Der bisherige Anwendungsbereich der SMFS erstreckte sich hauptsächlich auf die Biochemie und auf die Untersuchung von Polymeren. Weitere Anwendungen dienen der Charakterisierung photochemischer Eigenschaften von Chromophoren und der Diffusion organischer Substrate in mesoporösen Materialien.⁴²

Eine neue Möglichkeit zur Beobachtung von Metallkomplexen durch SMFS wurde in den Arbeitskreisen *Krämer* und *Herten* entwickelt.⁴³ Dabei wird die Fluoreszenzlöschung von Tetramethylrhodamin (TMR) durch Cu^{II} genutzt. Ein DNA-Strang wird am 3'-Ende mit TMR modifiziert und am 5'-Ende über einen Biotin-Streptavidin-Komplex an einer Glasoberfläche immobilisiert. Durch Hybridisierung mit einem komplementären, am 5'-Ende mit einem Bipyridin-Liganden (DCBPY) modifizierten DNA-Strang wird ein immobilisiertes System aus TMR und dem Bipyridin-Liganden in unmittelbarer räumlicher Nähe erzeugt. Nach Cu^{II} -Zugabe können Assoziations- und Dissoziationsvorgänge des Kupferions an DCBPY anhand der induzierten Fluoreszenzfluktuationen beobachtet werden (s. **Abb. 8**).

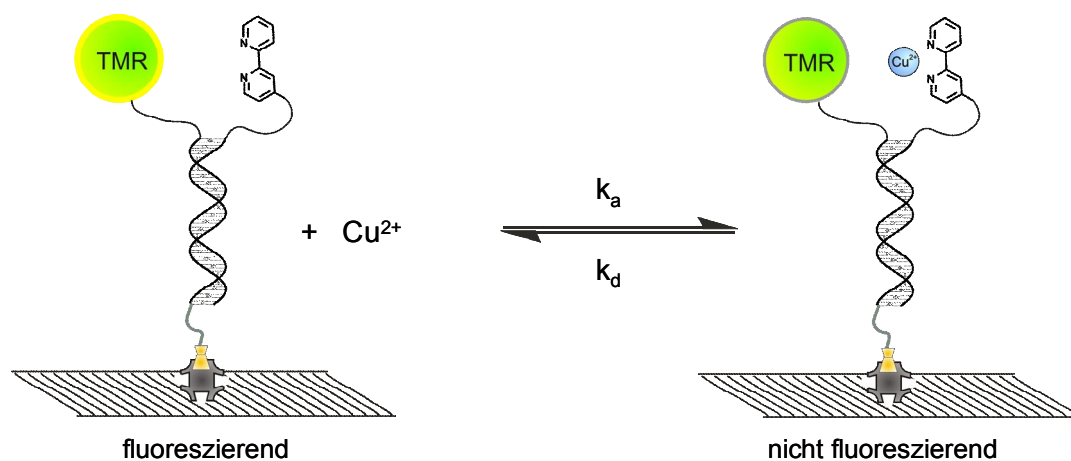


Abb. 8: Prinzip der Fluoreszenzlöschung einer BPY-TMR-modifizierten dsDNA durch Cu^{II} -Koordination.

Die Verwendung von DNA als Linker zwischen Glasoberfläche und dem Reaktionszentrum hat sich dabei bewährt, durch die starre Konformation der dsDNA wird eine Assoziation mit der Glasoberfläche verhindert. Durch Polarisationsmodulation konnte bewiesen werden, dass am Reaktionszentrum gleichzeitig eine hohe Beweglichkeit erhalten bleibt und so Bedingungen geschaffen werden, die nahezu als homogen bezeichnet werden können.

Auf diese Weise konnte erstmals die reversible Komplexbildung eines DNA-Bipyridin-Konjugats mit Cu^{II} im thermodynamischen Gleichgewicht untersucht werden. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzemission einzelner Sonden wurde mit einem konfokalen Mikroskop aufgezeichnet (s. **Abb. 9**). Die zufällig aufeinander folgenden Assoziations- und Dissoziationsereignisse sind als Sprünge zwischen zwei Fluoreszenzintensitätsstufen erkennbar, d.h. das TMR-DCBPY-Konjugat wechselte durch Bindung von Cu^{II} von einem stark fluoreszierenden An-Zustand in einen schwach fluoreszierenden Aus-Zustand. Anhand der Verweilzeiten, die über einen Schwellenwert bestimmt wurden, konnte die Kinetik der zugehörigen Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion mithilfe einer statistischen Auswertung berechnet werden.⁴³ Beim Vergleich mit den für freies BPY literaturbekannten Assoziations-, Dissoziations- und Stabilitätskonstanten^{44,45} zeigte sich, dass an DNA gebundenes DCBPY langsamer Cu^{II} assoziiert und der gebildete Cu^{II} -DCBPY-Komplex schneller wieder zerfällt.

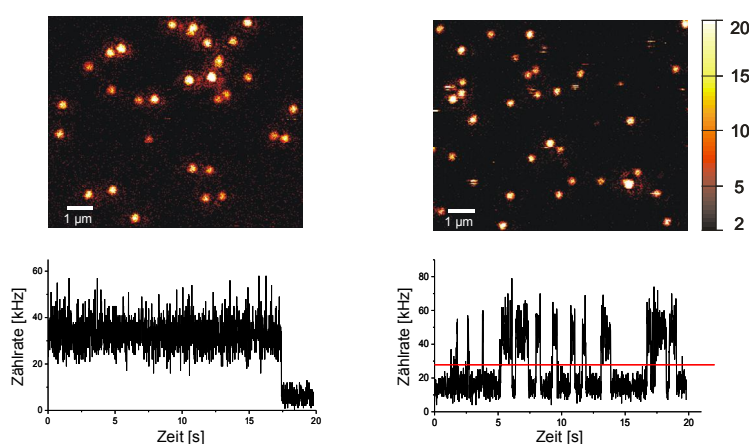


Abb. 9: Rasterbilder von TMR-Bipyridin-Konjugaten mit zeitaufgelöster Messung der Fluoreszenzintensität. *links:* ohne Cu^{II} , *rechts:* $2 \mu\text{M Cu}^{\text{II}}$.

1.5 Cu-Komplexe als Katalysatoren für Redoxreaktionen

Der reversible Wechsel der Oxidationsstufe (+I / +II) von Kupferkomplexen ist von großer Bedeutung für katalytische Reaktionen und den biologischen Elektronentransfer. Dabei können die einzelnen Oxidationszustände durch die geeignete Liganden stabilisiert werden: Cu^{II}-Komplexe (d⁹) sind oktaedrisch gebaut, meist mit deutlicher Jahn-Teller-Verzerrung, die bis zur quadratisch-planaren Koordination ausgeprägt sein kann. Cu^I-Komplexe (d¹⁰) erfahren dagegen keine Kristallfeld-Stabilisierung durch die Liganden. Sie sind wegen des im Vergleich zu Cu^{II} größeren Kations überwiegend tetraedrisch koordiniert.⁴⁶

In der Natur sind kupferhaltige Proteine hauptsächlich an Elektronentransferprozessen beteiligt, aber auch am Metabolismus des Sauerstoffs. In den Elektronentransferproteinen Plastocyanin und Azurin („blaue“ Kupferproteine) ist das Cu^{I/II}-Ion durch zwei Histidin-, einen Cysteinat- und einen schwächer gebundenen Methioninliganden koordiniert. Die Histidin-Reste und der Cysteinat-Rest liegen nahezu trigonal planar vor, während das Methionin axial gebunden ist. Diese Struktur liegt zwischen den bevorzugten Koordinationsgeometrien von Cu^I und Cu^{II}. Die weichen Schwefeldonoratome des Cysteinats und des Methionins begünstigen Cu^I, die härteren Stickstoffdonoratome der Histidin-Reste Cu^{II}. So wird ein leichter Wechsel der Oxidationsstufe des Kupfers ermöglicht, wobei die räumliche Anordnung der Liganden praktisch unverändert bleibt. Dieser so genannte entatische Zustand ermöglicht eine reversible Elektronenübertragung vom und zum Kupfer.⁴⁷

Die Synthese von Kupferkomplexen mit ähnlichen Geometrien wie bei „blauen“ Kupferproteine ist ein wichtiger Teil der Forschung.⁴⁸ Auch in der Industrie gibt es wichtige kupferkatalysierte Prozesse. Bereits seit Ende der 1950er-Jahren bekannt ist die Polymerisation von 2,6-Dimethylphenol zu Poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylenoxid) mit Cu^{II}-Amin-Komplexen.⁴⁹

Pence et al. untersuchten die elektrochemischen Eigenschaften von Kupferkomplexen mit unterschiedlich substituierten Phenanthrolinliganden. Cu^I-Komplexe mit 18 Valenzelektronen sind tetraedrisch koordiniert. Bei der Oxidation zu Cu^{II} ändert sich die Koordination zu trigonal-bipyramidal, wobei die fünfte Koordinationsstelle von einem Molekül Solvens besetzt wird. Das Redoxpotential wird im Vergleich zu

$\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$ in Acetonitril in Richtung negativer Werte verschoben, was einer Stabilisierung des oxidierten Zustandes entspricht. Elektronenziehende Substituenten bewirken, verglichen mit dem unsubstituierten PHEN, eine Verschiebung des Redoxpotentials in Richtung positiver Werte. Eine Reduktion des Cu^{II} wird also durch die formal positive Ladung des Liganden begünstigt.⁵⁰

Aufgrund ihrer beweglichen Koordinationsgeometrie sind $\text{Cu}^{\text{I/II}}$ -PHEN-Komplexe geeignete Katalysatoren für Redoxprozesse. So wurde bereits 1979 ihre Fähigkeit beobachtet, in Gegenwart von hohen Konzentrationen an Thiolen und Wasserstoffperoxid sowohl DNA-Einzelstränge als auch dsDNA oxidativ zu spalten.⁵¹ Dabei sind Cu^{I} -Komplexe aktiver als Cu^{II} -Komplexe und Bisphenanthrolinkomplexe zeigen eine höhere Aktivität als Monophenanthrolinkomplexe. Allerdings ist die Assoziationskonstante des zweiten PHENs sowohl für Cu^{I} ($\log K_2 = 5,5$)⁵² als auch für Cu^{II} ($\log K_2 = 6,6$)⁵³ zu gering für die Bildung des Komplexes im submikromolekularen Konzentrationsbereich. Stabile 2:1-Komplexe werden mit Bisphenanthrolinliganden gebildet (s. **Abb. 10**), welche vor allem im Fall des 3-Clip-phen eine hohe Nucleaseaktivität zeigen.⁵⁴ Die Geschwindigkeit der oxidativen Spaltung von DNA bleibt jedoch gering.

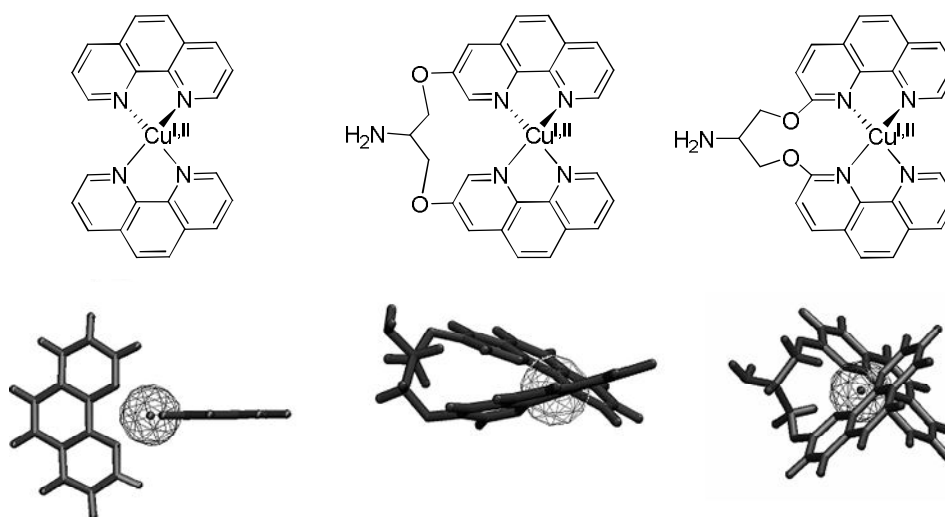


Abb. 10: Berechnete Strukturen für $\text{Cu}^{\text{I/II}}$ -Bisphenanthrolinkomplexe. Links: $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+/+}$, Mitte: $\text{Cu}(\text{3-Clip-phen})^{2+/+}$, rechts: $\text{Cu}(\text{2-Clip-phen})^{2+/+}$.⁵⁵

Durch den Linker zwischen den Phenanthrolinliganden kann die Struktur des resultierenden Kupferkomplexes beeinflusst werden, was die Berechnungen von

Reedijk et al. zeigen.⁵⁵ 3-Clip-phen zeigt hier eine deutliche Abweichung vom Tetraeder des nicht verbrückten Phenanthrolinkomplexes und liegt so zwischen den bevorzugten Koordinationsgeometrien von Cu^I und Cu^{II}. 2-Clip-phen weist dagegen wie [Cu(phen)₂]^{2+/+} eine tetraedrische Koordinationssphäre auf.

2 Zielsetzung

Bei einem 2006 vom Arbeitskreis *Krämer* veröffentlichten Nucleinsäure-Detektionsverfahren kommen Metallkomplexe von 3',5'-terminal mit TPY modifizierten DNA-Oligonucleotiden zum Einsatz. Zur Optimierung des Verfahrens und zur Bestätigung des postulierten Mechanismus ist es notwendig, grundlegende kinetische und thermodynamische Parameter wie Dissoziationsraten k_d oder Stabilitätskonstanten K der $[(TPY)_2DNA]M^{II}$ -Komplexe zu ermitteln.

In der Diplomarbeit des Verfassers wurde bereits nachgewiesen, dass die kinetische Stabilität der DNA-Sonde nicht von ihrer Bindungsdomäne für Target-DNA beeinflusst wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fe^{II} aufgrund der zu hohen Stabilität der resultierenden Komplexe nicht als Metallzentrum in $[(TPY)_2DNA]M^{II}$ -Komplexen geeignet ist, Zn^{II} hingegen das Anforderungsprofil erfüllt.

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Stabilitätskonstanten K der $[(TPY)_2DNA]M^{II}$ -Komplexe durch Konkurrenzexperimente mit dem 6-zähligen Liganden N,N,N',N' -Tetrakis-(2-methylpyridyl)ethyldiamin (TPEN). Dabei sollten sowohl Zn^{II} als auch Cu^{II} als Metallzentrum charakterisiert werden.

Im bestehenden Detektionsverfahren ist als Amplifikationsschritt eine Cu^{II} -katalysierte Reaktion enthalten. Zur Optimierung des Verfahrens und Belegung des postulierten Mechanismus sollten alternative Cu^{II} -katalysierte Reaktionen oder Cu^{II} -Nachweise in das bestehende System integriert werden. Im Vordergrund sollten der Cu^{II} -Sensor Zinpyr, eine Click-Reaktion sowie eine Hydrazidspaltung mit anschließendem enzymatischen Assay stehen.

Ein weiteres im Arbeitskreis *Krämer* verfolgtes Anwendungsgebiet für modifizierte Oligonucleotide ist der Einsatz in der Einzelmolekülspektroskopie. 2006 konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Herten* mit Hilfe eines mit BPY modifizierten Oligonucleotids die Fluoreszenzlöschung eines an komplementäre DNA gekoppelten Farbstoffes durch Cu^{II} erstmals auf Einzelmolekülebene beobachtet werden.⁴³

Die einzelmolekülspektroskopische Untersuchung katalytischer Prozesse hat im Bereich der enzymatischen und heterogenen Katalyse an Oberflächen bemerkenswerte Fortschritte gemacht.⁵⁶ Bisher ist es jedoch nicht gelungen, die

Katalyse an immobilisierten niedermolekularen Verbindungen einzelmolekülspektroskopisch zu verfolgen.

Bisphenanthrolinkomplexe katalysieren als „künstliche Oxidasen“ die Oxidation elektronenreicher Phenole wie Hydrochinon und Catechol in wässrigen Medien. Die Mechanismen wurden untersucht,⁵⁷ werden aber bis heute kontrovers diskutiert.⁴¹ Weiterhin ist die von Pyridin-Cu^{II}-Komplexen katalysierte oxidative Polymerisation von 2,6-Dimethylphenol zu Poly(1,4-phenylenether) ein großtechnischer Prozess. Das daraus gewonnene Mischpolymer Noryl ist einer der wichtigsten Thermoplaste mit Milliardenumsätzen. Auch der Mechanismus dieser Reaktion, die ebenfalls in wässriger Lösung durchgeführt werden kann, ist nicht vollständig geklärt.⁵⁸

Ziel dieser Arbeit war die Synthese des Bisphenanthrolin-Liganden 3-Clip-phen (CP), der nach Komplexierung eines Cu^{II}-Ions einen funktionierenden Redoxkatalysator darstellt. Im weiteren sollte ein mit CP modifiziertes Oligonucleotid synthetisiert werden, das eine Immobilisierung des Katalysators ermöglicht. Ensemblemessungen zur Stabilität der Cu^{II}-Komplexe und ihrer Redoxaktivität sollten erste Erkenntnisse bezüglich der Eignung des Systems für Einzelmolekülexperimente liefern.

Das Ziel des gesamten Teilprojektes ist es, eine kupferkatalysierte Redoxreaktion im Einzelmolekülexperiment mit Hilfe eines Chelator-TMR-DNA-Konjugates zu verfolgen. Katalytische Zyklen sollten sich in einem Wechsel zwischen hellen und dunklen Zuständen manifestieren, da die Fluoreszenz in Gegenwart von Cu^{II}, nicht aber Cu^I gelöscht wird. Der CP-Ligand wurde dafür gezielt ausgewählt, da seine Fähigkeit, mit Cu^{II} redoxaktive Komplexe zu bilden, literaturbekannt ist (vgl. **Kap. 1.5**). Die oxidative Spaltung von DNA durch Bisphenanthrolinkomplexe spielt dabei höchstens eine untergeordnete Rolle, da diese Reaktion bezogen auf die für die Einzelmolekülstudien relevante Zeitskala relativ langsam und außerdem stark von den Reaktionsbedingungen abhängig ist. Im Arbeitskreis *Krämer* konnte bereits durch HPLC-Analyse gezeigt werden, dass [(PHEN)₂Cu]²⁺ in Gegenwart eines Überschusses an reduzierenden Agentien weder Einzel- noch Doppelstrang-DNA spaltet.¹⁸

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Stabilität von [(TPY)₂DNA]M^{II}-Komplexen

3.1.1 Kinetische Stabilität

In der Diplomarbeit des Verfassers wurden die Dissoziationsraten fünf synthetisierter (TPY)₂DNAs (**DNA1-5**, s. **Tab. 3**) mit Zn^{II} als Metallion in Gegenwart des Liganden TPEN untersucht (s. **Abb. 11**). Die dabei eingesetzte Konzentration an TPEN war so hoch, dass das thermodynamische Gleichgewicht weit auf der Seite des TPEN-Zink-Komplexes liegt.⁵⁹

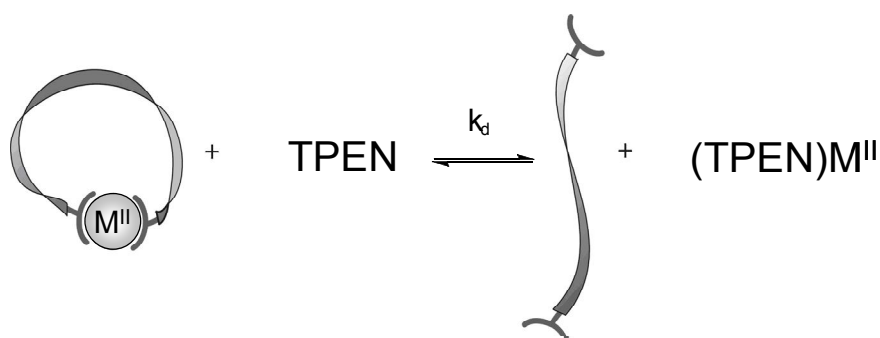


Abb. 11: Bestimmung der kinetischen Dissoziationskonstanten der Komplexe [(TPY)₂DNA]M^{II} mit Hilfe des Chelators TPEN.

Zur Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeiten wurde der 1:1-Komplex aus (TPY)₂DNA und Zn^{II} *in-situ* erzeugt, mit TPEN versetzt und über einen Zeitraum von bis zu 20 Stunden UV/VIS-spektrophotometrisch im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 340 nm untersucht. **Abb. 12 links** zeigt exemplarisch ein solches Spektrum von **DNA1**. Die Abnahme der für [(TPY)₂DNA]Zn^{II} typischen Doppelbande der Absorption zwischen 305 nm und 330 nm ist deutlich zu erkennen. Diese Bande ist der (TPY)₂Zn^{II}-Einheit zuzuordnen, während freies TPY bei kürzeren Wellenlängen (290 nm, 228 nm) absorbiert.⁴⁰ Aus diesen Spektren wurde die Absorption bei 323 nm entnommen und gegen die Zeit aufgetragen (s. **Abb. 12 rechts**).

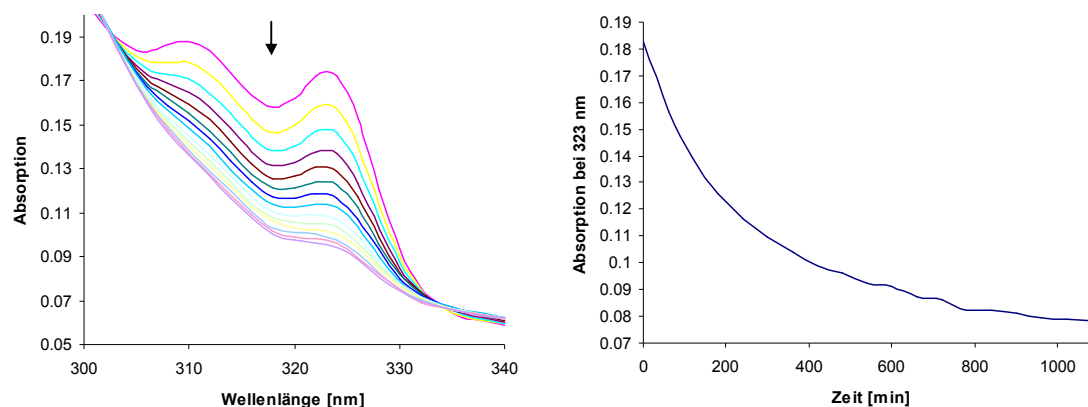


Abb. 12: Änderung der UV-Absorption von $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit der Zeit in Gegenwart von TPEN. Die Konzentrationen in der Küvette betragen $5 \mu\text{M}$ $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]$, $5 \mu\text{M}$ ZnSO_4 , $100 \mu\text{M}$ TPEN, $0,1 \text{ M}$ NaCl bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Links: Wellenlängenbereich von 300 nm - 340 nm, rechts: Bei 323 nm.

Durch Extrapolation wurde die Asymptote des exponentiellen Abfalls bestimmt und so die Halbwertszeit graphisch ermittelt. Die Dissoziationsraten berechnen sich daraus zu $k_d = \ln 2 / t_{1/2}$ (s. **Tab. 3**). Die Fehlergrenzen der Halbwertszeit liegen bei $\pm 10 \text{ min}$, was einer Abweichung der Dissoziationsraten von $\pm 0,07 \text{ h}^{-1}$ entspricht.

	Länge der DNA-Sequenz	$t_{1/2}$ [min]	k_d [h^{-1}]
DNA1	20mer	230	0,18
DNA2	15mer	253	0,16
DNA3	25mer	135	0,31
DNA4	28mer (Hairpin)	155	0,27
DNA5	20mer	240	0,17

Tab. 3: Halbwertszeiten und Dissoziationsraten von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit DNA1-5 ermittelt aus der Absorptionsabnahme bei 323 nm. Die Basensequenzen sind in Kap. 6.1 aufgeführt.

Die ermittelte Dissoziationsrate für $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Zn}^{\text{II}}$ liegt mit $k_d \approx 0,18 \text{ h}^{-1}$ in der Größenordnung des bereits von *Nora Graf* ermittelten Wertes von $k_d \approx 0,10 \text{ h}^{-1}$.⁵⁹

k_d ist unabhängig von der TPEN-Konzentration, d. h. es handelt sich um eine Reaktion erster Ordnung, deren Geschwindigkeit allein durch die „Ringöffnungsrate“ des $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ -Komplexes bestimmt wird. Dies wird

durch die in guter Näherung lineare Abhängigkeit von $\ln[\text{Abs}(t)/\text{Abs}(0)]$ von der Zeit bestätigt (s. **Abb. 13**).

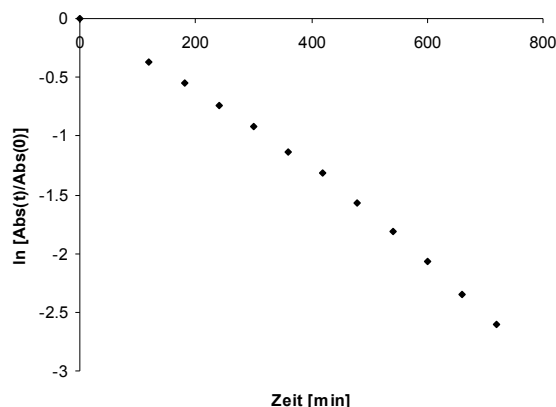


Abb. 13: Logarithmische graphische Darstellung der Werte der Absorption bei 323 nm (s. **Abb. 12**) von $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit der Zeit in Gegenwart von TPEN.

Aus den ermittelten Dissoziationsraten geht hervor, dass die Präorganisation der beiden TPY-Einheiten, welche durch die Länge der DNA-Sequenz (**DNA1-3**, **DNA5**) bzw. intramolekulare Hybridisierung (**DNA4**, Hairpin-Struktur) bestimmt wird, kaum einen Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ -Komplexes hat. Auch die Basensequenz der DNA (**DNA1**, **DNA5**) scheint die kinetische Stabilität von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ nicht zu beeinflussen.

Analog zu den $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ -Komplexen wurde auch die Dissoziationsrate eines $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexes ermittelt. Aufbauend auf den vorangegangenen Ergebnissen wurde nur **DNA1** eingesetzt. Ähnlich zu $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ (s. **Abb. 12**) zeigt auch $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ eine typische Doppelbande der Absorption zwischen 305 nm und 330 nm. Auch wenn die Bande weniger ausgeprägt ist, lässt sich die Abnahme der Absorption deutlich verfolgen, die Absorption bei 313 nm entnehmen und gegen die Zeit auftragen (s. **Abb. 14**).

Offensichtlich sind $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexe deutlich labiler als ihre Zn^{II} -Analoge, wie das rasche Erreichen eines konstanten Endniveaus zeigt. Die Reaktion ist bereits nach etwa 20 min vollständig abgelaufen, die Halbwertszeit liegt bei 2,5 min. Daraus errechnet sich eine Dissoziationsrate von $k_d \approx 22,0 \text{ h}^{-1}$. Die Fehlergrenzen der Halbwertszeit liegen bei $\pm 0,25 \text{ min}$, was einer Abweichung der Dissoziationsraten von $\pm 2,0 \text{ h}^{-1}$ entspricht.

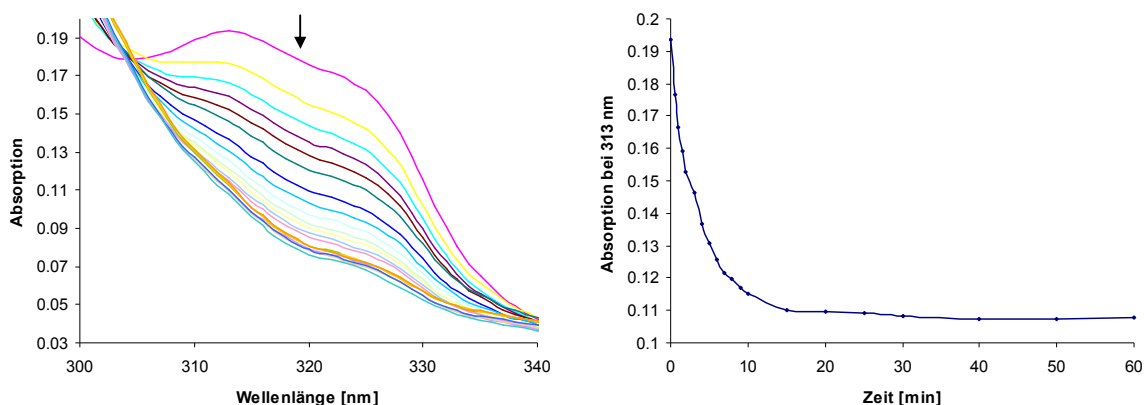


Abb. 14: Änderung der UV-Absorption von [(TPY)₂DNA1]Cu^{II} mit der Zeit in Gegenwart von TPEN I. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 5 μM [(TPY)₂DNA1], 5 μM CuSO₄, 100 μM TPEN, 0,1 M NaCl bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. Links: Wellenlängenbereich von 300 nm - 340 nm, rechts: Bei 313 nm.

3.1.2 Thermodynamische Stabilität

Ähnlich der in Kap. 3.1.1 vorgestellten Methodik zur Bestimmung der Dissoziationsraten k_d wurden auch Stabilitätskonstanten K für sowohl Zn^{II}- als auch Cu^{II}-Komplexe von (TPY)₂DNA experimentell ermittelt. Hierbei wird der Konkurrenzligand TPEN jedoch nicht im großen Überschuss, sondern in einer Konzentration ähnlich der des [(TPY)₂DNA]M^{II}-Komplexes eingesetzt. Das ermöglicht die Einstellung eines Gleichgewichts, in dem [(TPY)₂DNA]M^{II} und (TPEN)M^{II} nebeneinander vorliegen. Die Gleichgewichtseinstellung wird über die Änderungen der charakteristischen Absorptionsbanden der (TPY)₂M^{II}-Einheiten bis hin zu einem konstanten Endniveau spektrophotometrisch verfolgt (s. Abb. 15). Das unterste Spektrum zeigt eine unmetallierte (TPY)₂DNA und stellt den Referenzwert für eine vollständige Demetallierung von [(TPY)₂DNA]M^{II} dar.

Die Lage des Endniveaus gibt Aufschluss über die Konzentrationen an verbliebenem [(TPY)₂DNA]M^{II} und gebildetem (TPEN)M^{II}, die dann in Relation gesetzt werden können. Die Stabilitätskonstanten für (TPEN)Zn^{II} ($\log K = 15,0$)⁶⁰ und (TPEN)Cu^{II} ($\log K = 20,6$)⁶¹ sind literaturbekannt, so dass über das Massenwirkungsgesetz die Stabilitätskonstante für [(TPY)₂DNA]M^{II} errechnet werden kann.

$$K_{[(TPY)_2DNA]M^{II}} = \frac{[(TPY)_2DNA]M^{II}}{[(TPEN)M^{II}]} \times \frac{[TPEN]}{[(TPY)_2DNA]} \times K_{(TPEN)M^{II}}$$

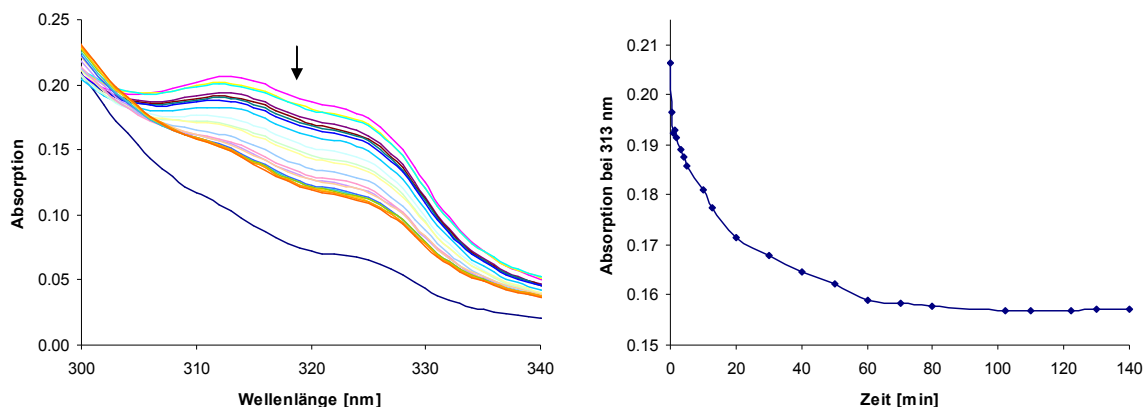


Abb. 15: Änderung der UV-Absorption von $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Cu}^{\text{II}}$ mit der Zeit in Gegenwart von TPEN II. Die Konzentrationen in der Küvette betragen $5 \mu\text{M}$ $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]$, $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $5 \mu\text{M}$ TPEN, $0,1 \text{ M}$ NaCl bei $\text{pH } 7,0$ (10 mM MOPS-Puffer) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$.
Links: Wellenlängenbereich von 300 nm - 340 nm , rechts: Bei 313 nm .

In **Tab. 4** sind die Stabilitätskonstanten der fünf synthetisierten $(\text{TPY})_2\text{DNAs}$ (DNA1-5) mit Zink als Metallion aufgeführt. Es bestätigt sich, dass die Stabilität des $(\text{TPY})_2\text{DNA-Zn}^{\text{II}}$ -Komplexes weitgehend unabhängig von Basensequenz und Sekundärstruktur der DNA-Sequenz ist. Die Stabilitätskonstante beträgt ungefähr $\log K = 15$.

Die Stabilitätskonstante für $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ wurde mit $\log = 20,4$ ermittelt und liegt damit 5 Größenordnungen höher als die Werte für Zn^{II} . Die Fehlergrenzen der Stabilitätskonstanten liegen bei $\pm 0,3$

	Länge der DNA-Sequenz	log K
DNA1	20mer	14,8
DNA2	15mer	14,9
DNA3	25mer	15,1
DNA4	28mer (Hairpin)	15,7
DNA5	20mer	15,8

Tab. 4: Stabilitätskonstanten $\log K$ von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ mit DNA1-5. Die Basensequenzen sind in Kap. 6.1 aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass (TPY)₂DNA-Komplexe von Zn^{II} eine sehr hohe thermodynamische und kinetische Stabilität aufweisen. Während [(TPY)₂DNA]Cu^{II}-Komplexe thermodynamisch deutlich stabiler sind, besitzen sie dabei jedoch eine hohe kinetische Labilität.

Bezogen auf das in **Kap. 1.2** vorgestellte Konzept zur Anwendung von [(TPY)₂DNA]M^{II} als allosterische Sonde zur Nucleinsäuredetektion lässt sich feststellen, dass sowohl die kinetische als auch die thermodynamische Stabilität der [(TPY)₂DNA]Zn^{II}-Komplexe unabhängig von der Bindungsdomäne für das DNA-Target ist. Dies erhöht zum einen die Anwendbarkeit des Systems, da es so zu keinen Einschränkungen des Targets im Bezug auf DNA-Sequenz oder Sekundärstruktur kommt. Darüber hinaus scheint jedoch wenig Spielraum für eine weitere Optimierung der Sondenstruktur zu bleiben.

Die (TPY)₂DNA-Komplexe von Cu^{II} sind durch ihre hohe thermodynamische Stabilität bei gleichzeitiger Labilität optimale SONDENSYSTEME im allosterischen Detektionssystem. [(TPY)₂DNA]Cu^{II} liefert aufgrund seiner Stabilität nur einen sehr geringen Hintergrund „falsch positiver“ Signale. Das Gleichgewicht mit anderen in der Reaktionsmischung anwesenden Liganden liegt stets weit auf der Seite des Bisterpyridinkomplexes. Erst bei Anwesenheit komplementärer DNA führt die resultierende Destabilisierung des [(TPY)₂DNA]Cu^{II}-Komplexes zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes, wobei durch die geringe kinetische Stabilität eine sofortige und effiziente Detektion oder Komplexbildung mit Präkatalysatoren stattfinden kann.

3.2 Mechanistische Untersuchungen zum DNA-Nachweis mit [(TPY)₂DNA]M^{II}-Komplexen

Für das Nucleinsäuredetektionssystem (s. **Abb. 5**) wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem der stabile Bisterpyridin-M^{II}-Komplex der DNA-Sonde durch Hybridisierung mit Target-DNA destabilisiert wird. Auf diese Weise wird zugesetzten Liganden ermöglicht, M^{II} in einer Gleichgewichtsreaktion aus dem Komplex zu extrahieren und selbst einen katalytisch aktiven Komplex zu bilden. Die Einstellung des Gleichgewichts wird dabei von den Stabilitätskonstanten des Bisterpyridin-M^{II}-Komplexes und des Ligand-M^{II}-Komplexes sowie den Mengenverhältnissen der eingesetzten Liganden bestimmt.

Bei der Bildung eines katalytisch aktiven Cu^{II}-PHEN-Komplexes im Detektionssystem wurde ein 10-facher Überschuss PHEN eingesetzt. Dennoch ist unklar, ob sich ein Komplex mit einem oder zwei PHEN-Liganden bildet. Auch die Möglichkeit eines ternären Komplexes mit einem PHEN- und einem TPY-Liganden muss in Betracht gezogen werden.

Durch Untersuchungen mit Zinpyr sollten sowohl Informationen über die Lage des Gleichgewichtes nach der Destabilisierung des Bisterpyridin-M^{II}-Komplex der DNA-Sonde sowie die gebildeten Folgekomplexe erhalten werden.

Zinpyr stellt sowohl für Cu^{II} als auch für Zn^{II} einen hochsensitiven Fluoreszenzsensor dar und wurde im Jahr 2000 von *Lippard et al.* erstmals beschrieben.⁶² Zwei Bispicolylamin-Einheiten dienen als Chelator für Metallionen und sind an die Reportereinheit Fluorescein gebunden. Die Koordination eines Metallions durch die drei Stickstoffatome eines Bispicolylamin-Restes und das phenolische Sauerstoffatom am Fluorescein (s. **Abb. 16**) führt zu deutlichen Änderungen der Fluoreszenzintensität. Die Koordination eines zweiten Metallions hat nahezu keinen weiteren Effekt.

Komplexation einer subnanomolaren Konzentration an Zn^{II} führt bei pH 7 zu einer mehr als 3-fachen Intensitätserhöhung, Cu^{II} zu einer Löschung der Fluoreszenz auf ca. 10 %.⁶³ Dabei wurden spezielle Metallpuffer angewendet, um durch Metallkontaminationen hervorgerufene Effekte zu unterdrücken. Diese sind jedoch

für Experimente im Rahmen des Nucleinsäuredetektionssystems nicht verwendbar, wodurch die Sensitivität des Nachweises deutlich sinkt.

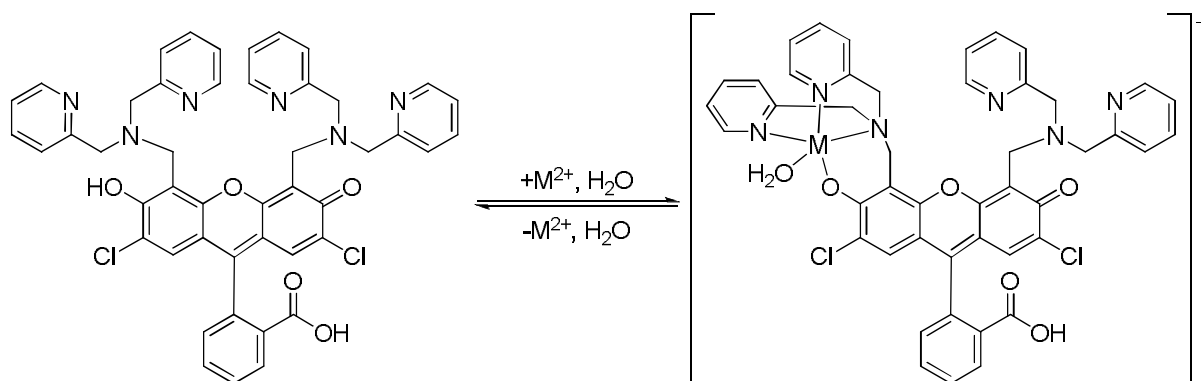


Abb. 16: Struktur und Metallkoordination von Zinpyr.

Experimente mit $[(TPY)_2DNA]Zn^{II}$ zeigen erneut die große thermodynamische Stabilität der eingesetzten DNA-Sonde auf, selbst nach 120 min gemeinsamer Inkubation mit Zinpyr ist keine Intensitätserhöhung detektierbar (s. **Abb. 17**). In einem zuvor durchgeführten Kalibrierungsexperiment wurde Zinpyr mit einem Äquivalent freiem Zn^{II} versetzt und so eine 2,6-fache Verstärkung des Fluoreszenzsignals erzielt.

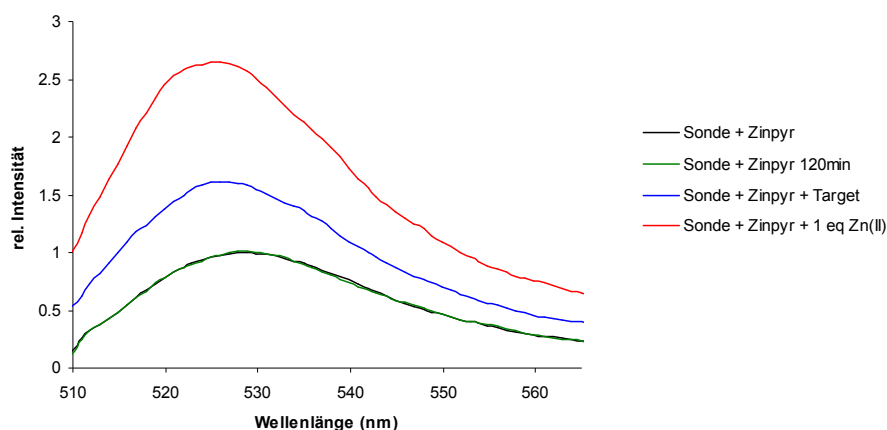


Abb. 17: Änderung der Fluoreszenz von Zinpyr mit $[(TPY)_2DNA]Zn^{II}$ durch Zugabe von Target-DNA bzw. Zn^{II} . Die Konzentrationen in der Küvette betragen $1 \mu M [(TPY)_2DNA]Zn^{II}$ (= Sonde) $1 \mu M$ Zinpyr und $1,1 \mu M$ Target (blau), $1 \mu M Zn^{II}$ (rot) in $0,1 M NaCl$ bei $pH 7,0$ ($50 mM MOPS$ -Puffer) und $25 ^\circ C$. Die Anregungswellenlänge betrug $504 nm$.

Bei Anwesenheit von Target-DNA kommt es zu einer 1,6-fachen Erhöhung der Anfangsintensität. Dabei wurden mehrere Vorgehensweisen verfolgt. Zum einen wurde zunächst $(\text{TPY})_2\text{DNA1}$ mit Target-DNA 30 min bei 40°C inkubiert und danach Zn^{II} und Zinpyr zugegeben. Alternativ wurde erst $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Zn}^{\text{II}}$ gebildet und dieses dann mit Target-DNA inkubiert. Schließlich wurde die Hybridisierung von Sonde und Target auch *in-situ* in der Küvette durchgeführt, wobei für 5 min auf 60°C erhitzt wurde. Bei allen Durchführungsvarianten wurde qualitativ dasselbe Ergebnis erhalten, was den postulierten Mechanismus der aktiven Sondenöffnung aus der zyklischen in die gestreckte Form durch Target-DNA stützt.

Diese Effekte wurden durch Experimente mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Cu}^{\text{II}}$ bestätigt. Hier ist nach 120 min gemeinsamer Inkubation mit Zinpyr kein Intensitätsverlust beobachtbar. Durch Zugabe von Target-DNA wird eine Löschung der Fluoreszenz auf 40 %, mit einem Äquivalent freiem Cu^{II} auf 17 % erreicht (s. **Abb. 18**). Im Vergleich mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Zn}^{\text{II}}$ ist die Änderung der Fluoreszenzintensität etwas deutlicher, was die unterschiedlichen Stabilitäten der Cu^{II} und der Zn^{II} enthaltenden Sonde (s. **Kap. 3.1**) widerspiegelt.

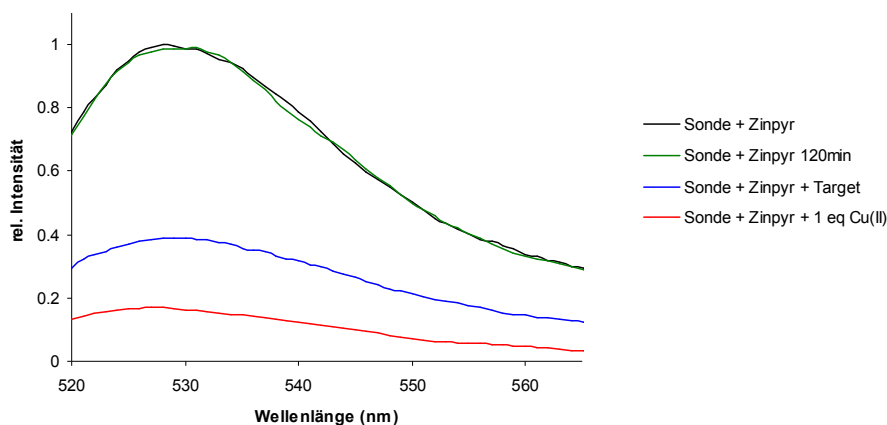


Abb. 18: Änderung der Fluoreszenz von Zinpyr mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ durch Zugabe von Target und Cu^{II} . Die Konzentrationen in der Küvette betragen $1\ \mu\text{M}$ $[(\text{TPY})_2\text{DNA1}]\text{Cu}^{\text{II}}$ (= Sonde), $1\ \mu\text{M}$ Zinpyr und $1,1\ \mu\text{M}$ Target (blau), $1\ \mu\text{M}$ Cu^{II} (rot) in $0,1\ \text{M}$ NaCl bei pH 7,0 (50 mM MOPS-Puffer) und 25°C . Die Anregungswellenlänge betrug $504\ \text{nm}$.

Die nur partielle Fluoreszenzänderung von Zinpyr könnte mehrere Gründe haben. Da Sonde und Zinpyr im äquimolaren Maßstab eingesetzt wurden, ist es möglich, dass das Gleichgewicht zwischen $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{M}^{\text{II}}$ und dem Zinpyr- M^{II} -Komplex nicht völlig auf der Seite des Zinpyr- M^{II} -Komplexes liegt. Dagegen sprechen jedoch

die große Stabilitätskonstante von Zinpyr für Zn^{II} ($\log K = 9$)⁶³ und Kontrollexperimente mit Bisterpyridin- M^{II} -Komplexen, welche schnelle und vollständige Verstärkungs- bzw. Löschungseffekte zeigten. Ein Metallkomplex mit zwei freien TPY-Liganden ist in der Stabilität vergleichbar mit dem Sondensystem nach Hybridisierung mit Target-DNA, so dass das Gleichgewicht weit auf der Seite des Zinpyr- M^{II} -Komplexes liegen sollte.

Eine weitere Möglichkeit könnte eine langsame oder unvollständige Hybridisierung der Sonde mit Target-DNA sein. Da der Zinpyr-Ligand nur mit destabilisierten Bisterpyridin- M^{II} -Komplexen in Wechselwirkung treten kann, wären verminderte Verstärkungs- oder Löscheffekte zu erwarten. Ein Überschuss von bis zu 10 Äquivalenten Target zeigte jedoch keine Veränderung der Fluoreszenz, was auch diese Ursache ausschließt. Zusätzlich wird eine langsame Hybridisierung durch Heizen auf 40 °C bzw. 60 °C vermieden. Dies zeigt sich darin, dass sich die Fluoreszenzintensität auch mit der Zeit nach der Hybridisierung nicht mehr ändert.

Weiterhin wurde die Kinetik der Hybridisierung bei Raumtemperatur mit Zinpyr als Reporter untersucht. Bereits nach 6 min wird ein Endniveau erreicht, was eine schnelle Reaktion anzeigt (s. **Abb. 19**).

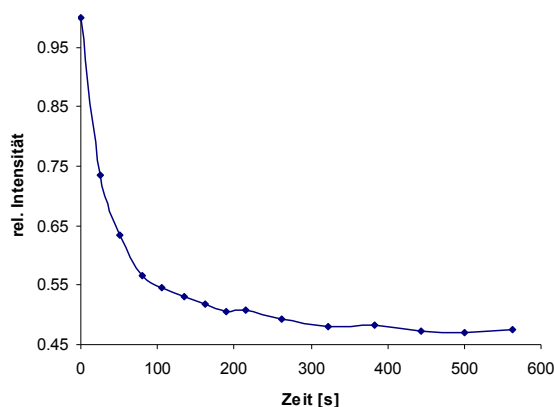


Abb. 19: Änderung der Fluoreszenz von Zinpyr mit $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$ bei 529 nm mit der Zeit durch Zugabe von Target-DNA. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 1 μM $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$, 1 μM Zinpyr, 1,1 μM Target, 0,1 M NaCl bei pH 7,0 (50 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 504 nm.

Eine dritte Möglichkeit zur Erklärung der unvollständigen Verstärkung bzw. Löschung der Fluoreszenz ist die Bildung eines ternären Komplexes, bei dem sowohl TPY als auch Zinpyr M^{II} koordinieren. Die zusätzliche Koordination durch TPY

könnte die Wechselwirkung mit dem phenolischen Sauerstoff von Zinpyr schwächen und so verminderte Effekte auf die Fluoreszenzeigenschaften der Fluoresceineinheit erzeugen.

Auch durch die Experimente mit Zinpyr konnte keine lückenlose Aufklärung des Mechanismus des Transduktionsvorgangs im Nucleinsäuredetektionssystem erreicht werden. Jedoch wurden wichtige Informationen erhalten, die eine schnelle und vollständige Hybridisierung mit Target-DNA belegen. Die Bildung eines ternären TPY-Zinpyr- M^{II} -Komplexes wird vermutet. Der Einsatz eines 6-zähligen Präkatalysators mit hoher Affinität zu Cu^{II} und Zn^{II} könnte zur weiteren Optimierung des Nachweisverfahrens dienen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von Zinpyr wurde in der Quantifizierung von $[(TPY)_2DNA]M^{II}$ entdeckt. Bei der Modifizierung von DNA mit TPY traten häufig Kontaminationen der $(TPY)_2DNA$ mit Cu^{II} auf, so dass im *MALDI-TOF*-Massenspektrum Mischfraktionen aus $(TPY)_2DNA$ und $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$ beobachtet wurden. Da eine genaue Quantifizierung der DNA-Konjugate mittels Cu^{II} -Titration so nicht mehr möglich war, wurden solche Verunreinigungen bisher stets verworfen. Titriert man jedoch eine teilweise bereits mit Cu^{II} versetzte $(TPY)_2DNA$ mit weiterem Cu^{II} bei Anwesenheit von Zinpyr, so zeigt eine beginnende Löschung der Fluoreszenz deutlich den Äquivalenzpunkt an. Zusammen mit der zuvor über die Absorption der DNA-Basen bestimmte Konzentration der DNA-Konjugate kann $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$ mit exakt bestimmter Konzentration erhalten werden, die eine Vielzahl von Experimenten ermöglicht.

3.3 Integration alternativer katalytischer Module in das DNA-Nachweissystem

Im Amplifikationsschritt des in **Kap. 1.2** vorgestellten Nachweissystems für Nucleinsäuren steht eine Cu^{II} -katalysierte Reaktion im Mittelpunkt (s. **Abb. 5**). Zur Bestätigung und Optimierung des Verfahrens und Belegung des postulierten

Mechanismus wurden alternative Cu^{II} -katalysierte Reaktionen in das bestehende System integriert. Idealerweise sollte dabei ein deutlich vom Hintergrund unterscheidbares Signal hoher Intensität in kurzer Zeit generiert werden. In Frage kommende Reaktionen müssen in Wasser bei einem pH-Wert von 7 ablaufen und schon bei geringen Katalysatormengen hohe Umsatzgeschwindigkeiten erreichen. Das Produkt sollte farbig oder fluoreszierend sowie deutlich vom Edukt differenzierbar sein, um eine hohe Sensitivität zu ermöglichen. Weiterhin ist eine nur geringfügige Aktivität bei Abwesenheit von Cu^{II} nötig, um ein deutlich vom Hintergrund unterscheidbares Signal zu generieren.

Eine entscheidende Rolle spielt der zugesetzte Präkatalysator. Dieser muss nicht nur mit Cu^{II} eine katalytisch aktive Spezies bilden, sondern auch eine genügend hohe Affinität aufweisen, um Cu^{II} aus dem bei Anwesenheit von Target-DNA vorliegenden intermolekularen Bisterpyridinkomplex zu extrahieren (s. **Abb. 20**). Gleichzeitig sollte es nicht zur Öffnung des zyklischen $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexes in Abwesenheit von Target-DNA kommen, so dass basierend auf den Ergebnissen aus **Kap. 3.1** und **3.2** eine Stabilitätskonstante $\log K = 9 - 18$ in Frage kommt.

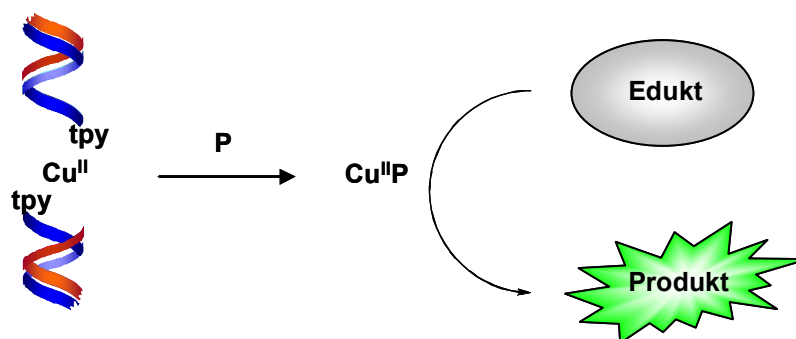


Abb. 20: Komplexbildung von Cu^{II} durch Präkatalysator und anschließende Amplifikation nach Hybridisierung von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ mit komplementärer DNA. (P = Präkatalysator)

3.3.1 Click-Reaktion

Die 1,3-dipolare-Huisgen-Cycloaddition eines Alkins an ein Organoazid stellt eine interessante Methode zur Kohlenstoff-Heteroatom-Verknüpfung dar (s. **Abb. 21**). 2002 beobachteten *Sharpless*⁶⁴ und *Meldal*⁶⁵ unabhängig voneinander die katalytische Wirkung von Cu^{I} und führten die Bezeichnung „Click-reaction“ ein.⁶⁶ Viele Anforderungen einer biologisch relevanten Nachweisreaktion werden erfüllt:

Sowohl die Edukte als auch das Produkt sind unter physiologischen Bedingungen stabil, die Reaktion verläuft rasch und mit hohen Ausbeuten. Von entscheidender Bedeutung ist die Verwendung eines Cu^I-stabilisierenden Liganden.⁶⁷ Meist werden Tristriazolyl-Amine verwendet.

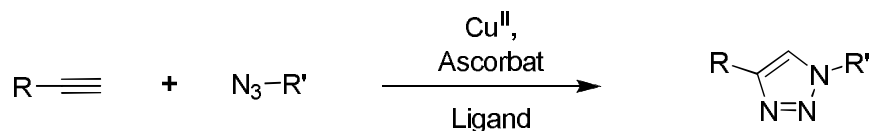


Abb. 21: Schema der Click-Reaktion. Die benötigte Cu^I-Verbindung kann *in-situ* durch Zugabe von Cu^{II} und Ascorbat generiert werden.

Diese Reaktion wurde schon vielfach zur Funktionalisierung von DNA eingesetzt,⁶⁸⁻⁷¹ aber auch Anwendungen als Chemidosimeter für Cu^{II} sind bekannt.⁷²

Cu^{II} wird häufig über seine Eigenschaft der Fluoreszenzlöschung nachgewiesen, eine „turn-on“-Reaktion ist jedoch stets vorzuziehen. Click-Reaktionen bieten eine Möglichkeit, durch Anwesenheit von Kupfer eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu erreichen. So konnten beispielsweise Zhou und Fahrni die Elektronendonoreigenschaften des in der Click-Reaktion gebildeten Triazols zur Modifizierung der Fluoreszenzeigenschaften eines Cumarinderivates nutzen.⁷² Die Intensität stieg bei der Konjugation des Fluorophors an ein Azid stark an.

Im Arbeitskreis Krämer wurde 2009 ebenfalls ein System vorgestellt, bei dem es durch eine Click-Reaktion zur Bildung eines fluoreszenten 1,8-Naphthalimids kommt.⁷³ Die Reaktion wurde zum Templat-vermittelten Nachweis von Nucleinsäuren verwendet (s. **Abb. 22**) und Cu^{II} stöchiometrisch eingesetzt.

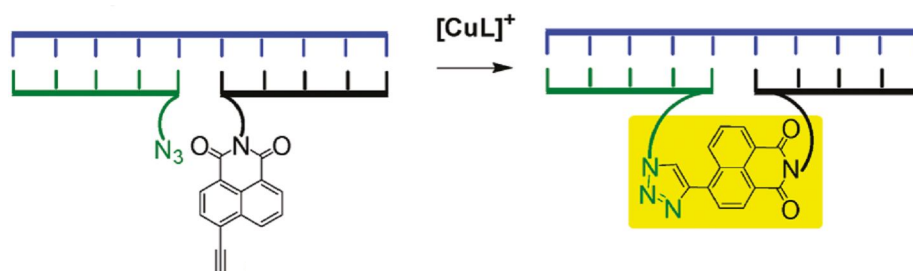


Abb. 22: Templat-vermittelte Click-Reaktion unter Bildung eines Triazol-funktionalisierten 1,8-Naphthalimids.

Basierend auf den Ergebnissen von *Elmar Jentsch*⁷⁴ sollte die Click-Reaktion von 4-(Azidomethyl)-benzoesäure und eines in 4-Position Alkin-substituierten 1,8-Naphthalimids als kupferkatalysiertes Amplifikationsmodul in das etablierte Nucleinsäuredetektionssystem integriert werden (s. **Abb. 23**). Als Präkatalysator wurde Tris((1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin (THPTA) eingesetzt.

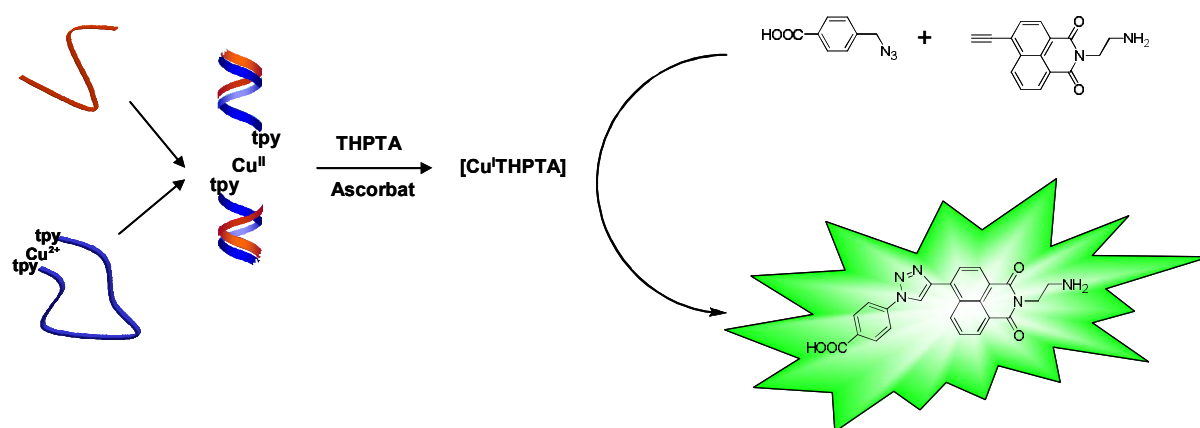


Abb. 23: Angestrebtes Nachweissystem für Nucleinsäuren mit [(TPY)₂DNA]Cu^{II} und einer Click-Reaktion als Amplifikationsmodul.

In Vorversuchen wurde zunächst die optimale Substrat-, THPTA- und Ascorbat-Konzentration ermittelt, welche möglichst unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Cu^{II} sein sollten. Für die Substrate wurden Konzentrationen zwischen 20 μ M und 1000 μ M untersucht, für THPTA 5 - 100 μ M, für Ascorbat 0,1 - 5 mM. Bei 400 μ M Azid und Alkin, 50 μ M THPTA und 1 mM Ascorbat konnten schnelle Click-Reaktionen beobachtet werden, so dass diese Konzentrationen im Folgenden verwendet wurden. Weiterhin wurden zwei Durchführungsvarianten untersucht, zum einen die direkte Reaktion in der Küvette im Fluorimeter, zum anderen eine Inkubation aller Reaktanden im Thermomixer bei 25 °C mit anschließender Messung. Letztere erwies sich als überlegen und erzielte deutlich höhere Umsätze. Die optimierte Inkubationszeit betrug 90 min.

Cu^{II} wurde in Konzentrationen zwischen 0,5 μ M und 10 μ M eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass submikromolare Cu^{II}-Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit nicht entscheidend beeinflussen (s. **Abb. 24**), so dass eine Erhöhung der Empfindlichkeit des bestehenden Systems nicht möglich ist. Dennoch könnte

durch die Integration der Click-Reaktion eine sehr interessante Signalkaskade aufgebaut werden, so dass das Projekt weitergeführt wurde.

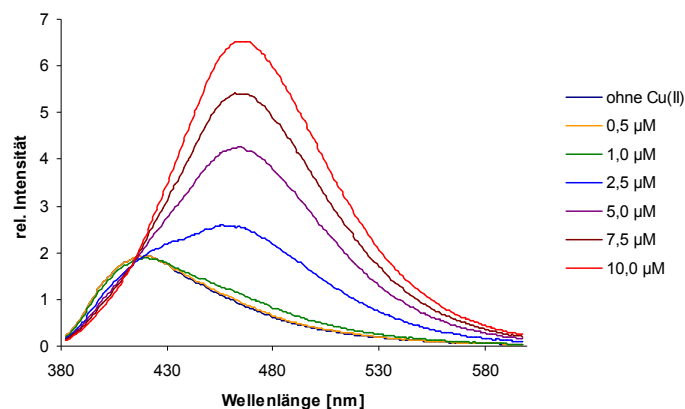


Abb. 24: Fluoreszenz nach Click-Reaktion bei verschiedenen Cu^{II}-Konzentrationen. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 200 mM NaCl, 1 mM Ascorbat, 50 µM THPTA, 400 µM Substrate und 0 - 10 µM Cu^{II} bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 340 nm.

Daraufhin wurde das in den bisherigen Experimenten eingesetzte freie Cu^{II} durch Bisterpyridin-Cu^{II}-Komplexe ersetzt, welche jedoch keine detektierbare Aktivität aufwiesen. Eine Erhöhung der THPTA-Konzentration zeigte keinen Effekt. Daraus lässt sich folgern, dass der THPTA-Ligand eine zu geringe Affinität zu Cu^{II} hat, um dieses aus dem Bisterpyridin-Komplex zu extrahieren. Weiterhin wurde die Ascorbat-Konzentration erhöht, um eine Reduktion von Cu^{II} zu Cu^I zu erzwingen, da THPTA vor allem Cu^I stabilisiert. Auch dies zeigte jedoch keine Wirkung.

Abschließend wurden Experimente mit [(TPY)₂DNA1]Cu^{II} durchgeführt, um das in **Abb. 23** dargestellte Detektionssystem zu realisieren. Aufgrund der großen dsDNA-Reste an der (TPY)₂Cu^{II}-Einheit wäre eine zusätzliche Destabilisierung gegenüber freien Bisterpyridin-Cu^{II}-Komplexen denkbar, so dass ein nachweisbarer Umsatz in der Click-Reaktion zu beobachten sein könnte.

Dazu wurden zunächst 5 µM [(TPY)₂DNA1]Cu^{II} und 5,5 µM Target-DNA 2 min bei 90 °C inkubiert und innerhalb von 30 min auf 20 °C abgekühlt, um eine vollständige Hybridisierung zu gewährleisten. Nach Zugabe der Substrate, Ascorbat und THPTA wurde weitere 90 min bei 25 °C inkubiert und danach die Fluoreszenz bei 25 °C und 60 °C gemessen. Als positives Kontrollexperiment wurde eine Probe zusätzlich mit 3 µM freiem Cu^{II} versetzt. Im DNA-Experiment konnte im Gegensatz zum

Kontrollexperiment mit freiem Cu^{II} kein Umsatz detektiert werden (s. **Abb. 25**), was die Ergebnisse der Vorexperimente mit freien Bisterpyridin- Cu^{II} -Komplexen bestätigt: Die Kupferaffinität des Präkatalysators THPTA ist nicht hoch genug, um das Gleichgewicht in der Konkurrenz zum $(\text{TPY})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ Komplex in Richtung des THPTA-Komplexes zu verschieben, weshalb das angestrebte Detektionssystem nicht realisiert werden konnte.

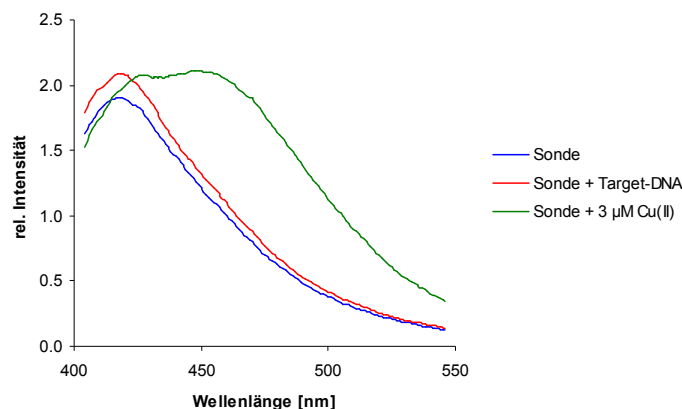


Abb. 25: Fluoreszenz nach Nucleinsäuredetektion mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ und anschließender Click-Reaktion. Die Konzentrationen in der Küvette betragen $5 \mu\text{M} [(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$, 200 mM NaCl , 1 mM Ascorbat , $50 \mu\text{M THPTA}$ und $400 \mu\text{M Substrate}$ bei $\text{pH } 7,0$ ($20 \text{ mM MOPS-Puffer}$) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (blau), dazu $5,5 \mu\text{M Target-DNA}$ (rot) und $3 \mu\text{M Cu}^{\text{II}}$ (grün). Die Anregungswellenlänge betrug 340 nm .

3.3.2 Cu^{II} -katalysierte Hydrazidspaltung mit anschließender HRP-Aktivierung

Enzyme stellen durch ihre hohen Beschleunigungsfaktoren und die bereits von der Natur auf physiologische Bedingungen optimierte Wirkungsweise ideale Katalysatoren in Amplifikationsmodulen für das in **Kap. 1.2** vorgestellte Nachweissystem für Nucleinsäuren dar. Der interessante Punkt beim Einsatz besteht in der Aktivierung des Enzyms. Bereits zwischen 2004 und 2006 wurden im Arbeitskreis *Krämer* intensiv mögliche Systeme untersucht.⁵⁹ Der Fokus lag dabei auf der Verwendung von Enzymen, die durch Extraktion eines Zn^{II} -Ions inaktiviert vorlagen. Eingesetzt wurden Aldolase, Carboanhydrase, Astacin und Mung Bean Nuclease. Durch einen positiven DNA-Nachweis kommt es zur Freisetzung des benötigten Metallions und zur Rekonstitution des Enzyms, was durch eine geeignete

Wahl der Substrate beobachtbar wird. (s. **Abb. 26**). 2006 wurde ein solches Nucleinsäuredetektionssystem unter Verwendung von Carboanhydrase veröffentlicht.²⁸

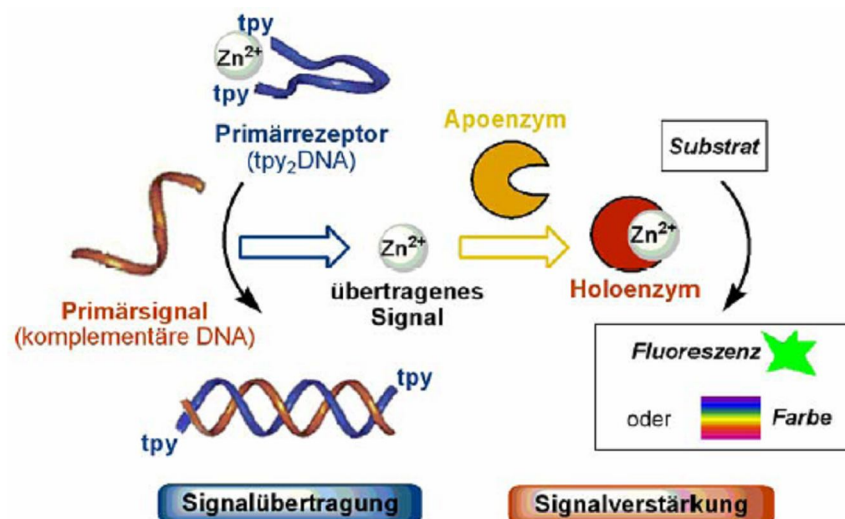


Abb. 26: Nachweis von DNA durch eine chemische Signalkaskade mit Amplifikation unter Verwendung von Carboanhydrase.

2007 wurde im Arbeitskreis *Krämer* ein Verfahren zum ultrasensitiven Nachweis von H₂O₂ auf Basis einer Rekonstitution von Meerrettich-Peroxidase (HRP) vorgestellt, das einen ähnlichen Ansatz verfolgte.⁷⁵

Im aktiven Zentrum der HRP ist als Cofaktor ein Hämin-System enthalten, ein Eisen-Protoporphyrin IX-Komplex, welcher in vielen Enzymen wie Katalasen oder Peroxidasen als prosthetische Gruppe dient. Häm-haltige Enzyme sind häufig an Elektronentransportprozessen beteiligt, wie z. B. der kontrollierten Umsetzung sauerstoffhaltiger Zwischenprodukte wie Peroxide, Nitrite oder Sulfite. **Abb. 27** zeigt eine generelle Reaktionsgleichung, welche die durch HRP katalysierten Prozesse anhand des reduzierenden Substrates S beschreibt.



Abb. 27: Reaktionsgleichung der katalytischen Umsetzung von Substrat S und H₂O₂ mit HRP.

Zu den typischen Substraten gehören Phenole, Indole, Amine oder Sulfonate. Ein kommerziell erwerbliches Substrat ist 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), ein Diamin, welches sich durch Oxidation tiefblau färbt und gut colorimetrisch verfolgt werden kann. Die blaue Farbe ist durch einen Charge-Transfer-Komplex des Diamins mit dem entstehenden Diimin zu erklären. Weitere Oxidation im sauren Milieu liefert schließlich ausschließlich das gelbe Diimin (s. **Abb. 28**).⁷⁶

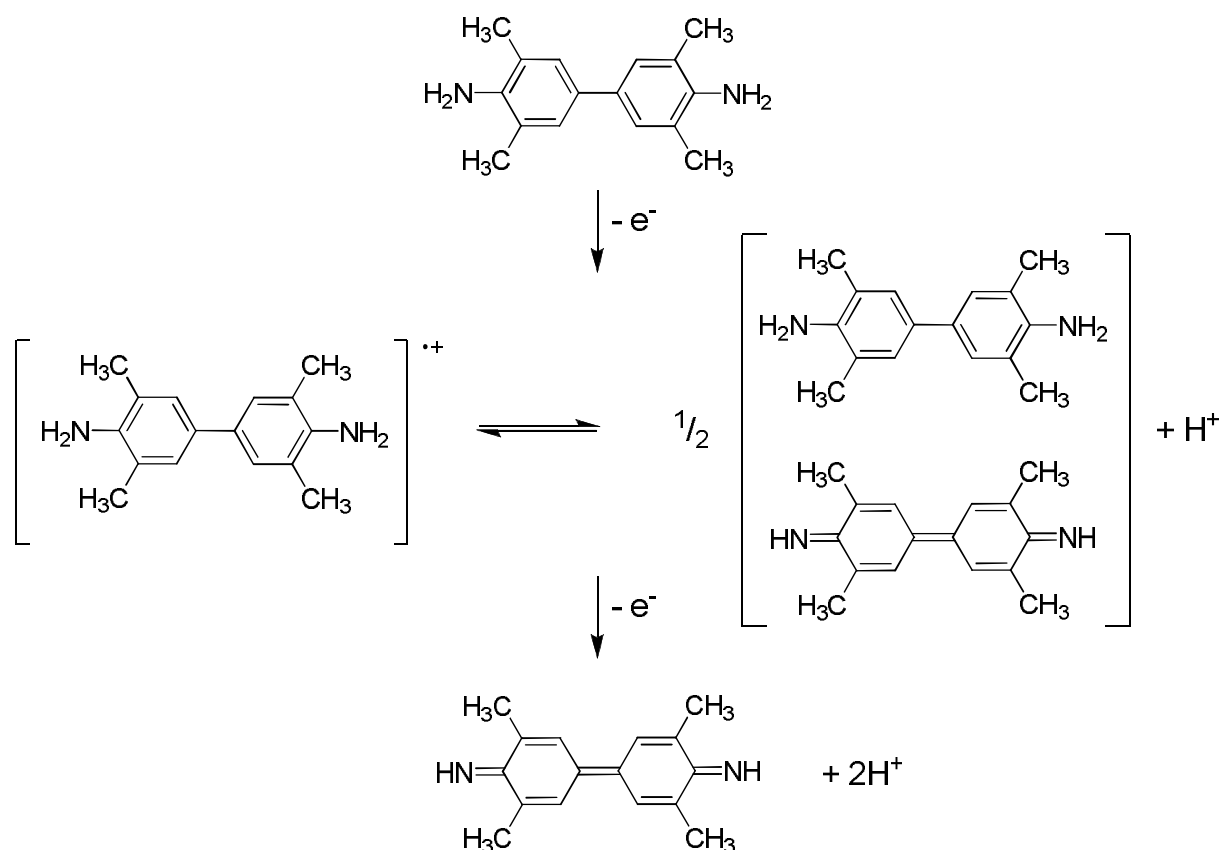


Abb. 28: Oxidationsprodukte von TMB.

Der im Wasserstoffperoxid-Detektionssystem verfolgte Ansatz beruht auf der Entfernung des Hämin-Cofaktors aus HRP und der chemischen Blockierung der darin enthaltenen Carbonsäuregruppen als Hydrazide. Ohne freie Carbonsäuregruppen wird der Cofaktor vom Apoenzym nicht erkannt und es kommt nicht zur Rekonstitution. H_2O_2 spaltet Hydrazide oxidativ ab, regeneriert so den Cofaktor und leitet die Bildung des Holoenzym ein, was über die Farbreaktion von TMB leicht nachgewiesen werden kann (s. **Abb. 29**).

Der Assay besteht also aus zwei Schritten: Zunächst wird der blockierte Cofaktor mit der H_2O_2 enthaltenden Probelösung inkubiert, um die Rekonstitution der HRP zu

initiiieren. Im zweiten Schritt wird die Inkubationslösung hundertfach mit einer Nachweislösung verdünnt, die TMB und einen Überschuss H_2O_2 enthält. Die beim positiven Nachweis im ersten Schritt gebildete HRP führt nun innerhalb kurzer Zeit zur Oxidation des TMB.

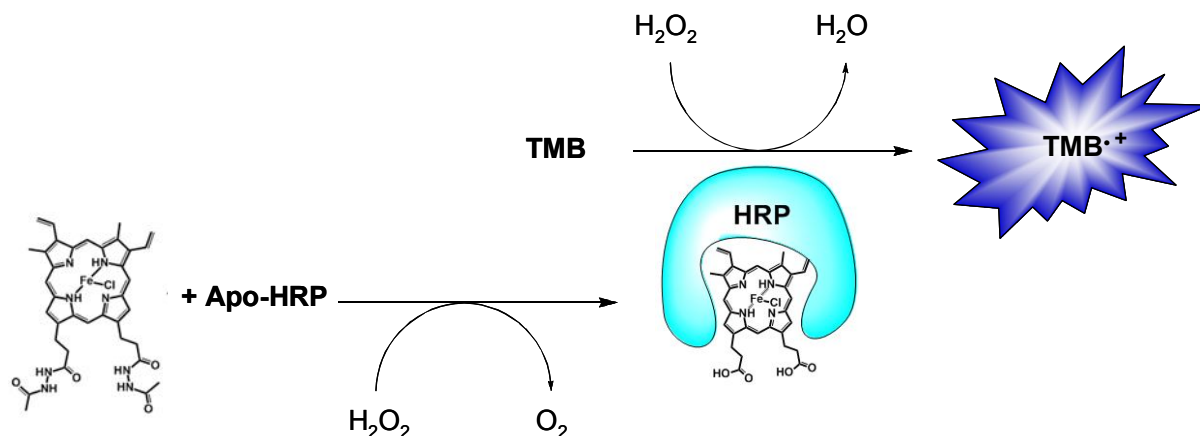


Abb. 29: H_2O_2 -Nachweis über oxidative Rekonstitution von HRP mit anschließender Signalamplifikation durch HRP-katalysierte Oxidation von TMB.

Auf diese Weise konnten in nur 40 min bis zu 50 nM (50 fmol) H_2O_2 nachgewiesen werden, was die kommerziellen Detektionssysteme um eine Größenordnung übertrifft.

Hydrazide können nicht nur durch Zugabe von Oxidationsmitteln, sondern bei Anwesenheit von Cu^{II} und einem Reduktionsmittel auch durch Luftsauerstoff zu den freien Carbonsäuren oxidiert werden. Weiterhin berichteten *Ma et al.* 2006 über die Cu^{II} -katalysierte Hydrolyse eines nicht-fluoreszenten Fluorescein-Hydrazids (s. **Abb. 30**), welche unter physiologischen Bedingungen zum fluorogenen Nachweis von 64 nM Cu^{II} in nur 2 h genutzt werden konnte.⁷⁷

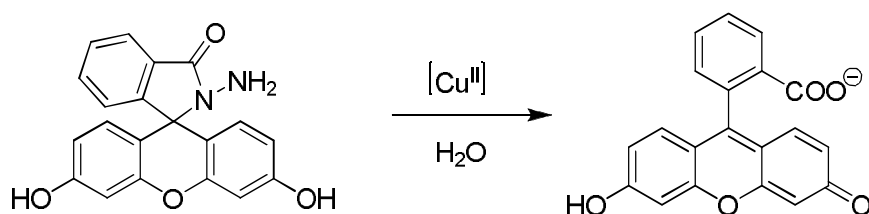


Abb. 30: Cu^{II} -Nachweis durch hydrolytische Spaltung eines Fluorescein-Hydrazids.

Das Ziel dieses Teilprojektes war, eine Cu^{II} -katalysierte Hydrazidspaltung zur Aktivierung des Hämin-Cofaktors für HRP zu nutzen, um das in **Abb. 31** dargestellte Detektionssystem für Nucleinsäuren zu konstruieren. Durch die Aneinanderreihung einer chemischen und einer enzymatischen Katalyse könnte eine doppelte Amplifikation und so eine Verbesserung der Nachweisgrenze erreicht werden.

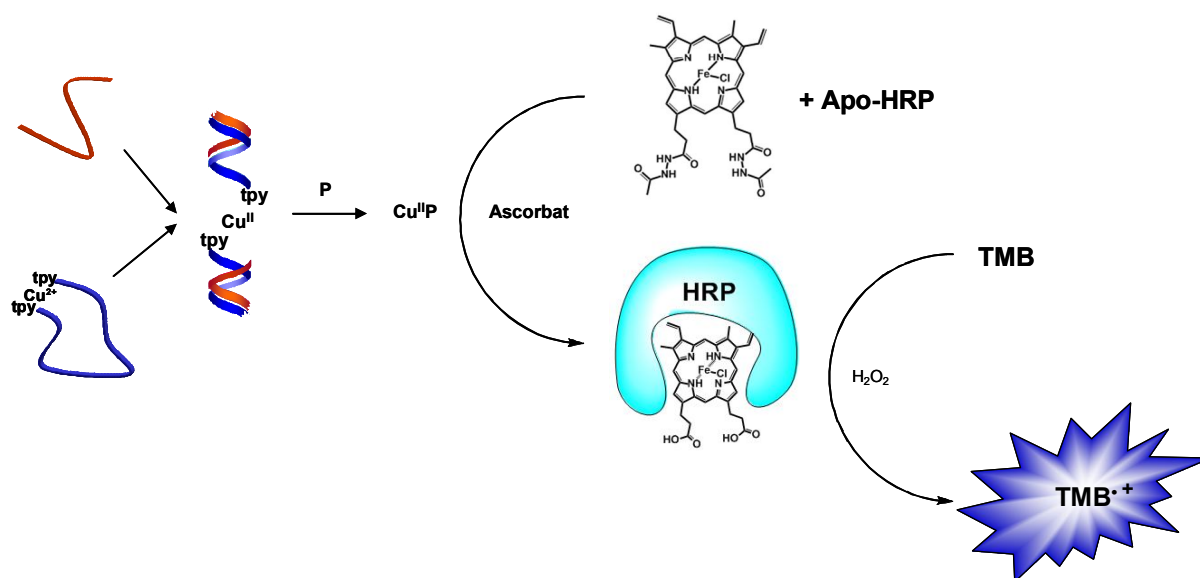


Abb. 31: Angestrebtes Nachweissystem für Nucleinsäuren mit $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ mit anschließender Amplifikation durch Hydrazidspaltung, oxidativer Rekonstitution von HRP und HRP-katalysierter Oxidation von TMB.

Das „Schlüsselmolekül“ in diesem System ist das Hydrazid des Hämin-Cofaktors. Die Synthese erfolgt ausgehend vom Hämin. Das Produkt ist empfindlich gegenüber Licht, erhöhten Temperaturen, Luftsauerstoff und Wasser, so dass bei Synthese, Aufarbeitung und Handhabung sehr sorgfältig gearbeitet werden sollte. Es empfiehlt sich, die Aufarbeitung möglichst schnell und lichtgeschützt durchzuführen sowie stets Temperaturen unter $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ einzuhalten. Vor allem bei der säulenchromatographischen Aufreinigung sollte mit größter Sorgfalt vorgegangen werden, da bereits kleinste Kontaminationen mit dem Edukt Hämin die Öffnung des Hydrazids katalysieren.

Ein Problem stellte bisher die auf einen Tag begrenzte Haltbarkeit einer DMF-Stammlösung des Hydrazids dar. Durch sorgfältige Handhabung und unter

Verwendung hochreinen Lösungsmittels konnte diese deutlich erhöht werden. Entscheidend ist dabei, die Stammlösung vor Entnahme stets bis auf Raumtemperatur zu erwärmen, um Einkondensieren von Luftfeuchtigkeit zu vermeiden.

Auf diese Weise konnten frühere Ergebnisse auch nach 6-monatiger Lagerzeit bei -32 °C reproduziert werden, für $100\text{ nM H}_2\text{O}_2$ wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis von 2:1 erreicht, für $1000\text{ nM H}_2\text{O}_2$ 5:1 (s. **Abb. 32**). Auch bei Raumtemperatur konnte die Lagerfähigkeit auf bis zu 4 Tage verlängert werden.

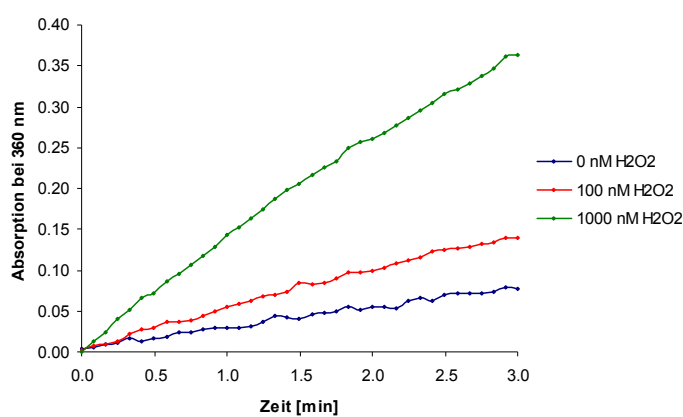


Abb. 32: Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch H_2O_2 und Rekonstitution. Die Konzentrationen in der Küvette betragen $0,33\text{ mM TMB}$, $0,76\text{ mM H}_2\text{O}_2$ und 1 vol\% der Inkubationslösung bei $\text{pH } 4$ ($125\text{ mM Citrat-Puffer}$) und 25 °C . Inkubationslösung: $110\text{ }\mu\text{M EDTA}$, $0,26\text{ M NaCl}$, $0,86\text{ }\mu\text{M Apo-HRP}$ und $2,33\text{ }\mu\text{M Häm-in-(N,N'-diacetylhydrazid)}$ 40 min inkubiert mit H_2O_2 -Probe ($0, 100, 1000\text{ nM}$) bei $\text{pH } 7,5$ (80 mM Tris-Puffer) und 20 °C .

Mit derselben Stammlösung wurden im Folgenden Experimente mit Cu^{II} statt H_2O_2 durchgeführt. Im H_2O_2 -Assay werden der Inkubationslösung $110\text{ }\mu\text{M EDTA}$ zugesetzt, um störende Metalle zu entfernen. Bei den Experimenten mit Cu^{II} erwies sich eine Konzentration von 100 nM EDTA als optimal, um Metallkontaminationen zu vermeiden und so ein größeres Signal/Rausch-Verhältnis für Cu^{II} -Konzentrationen unter $1\text{ }\mu\text{M}$ zu erreichen. Auch die Wahl des Reduktionsmittels ist von entscheidender Bedeutung. Bei Untersuchungen mit Dithiothreitol, 3-Mercaptopropionsäure und Ascorbat zeigte nur letzteres eine von der Cu^{II} -Konzentration abhängige Kinetik im TMB-Assay. Bei der Optimierung von

Inkubationstemperatur und -dauer lieferte eine 100-minütige Inkubation bei 20 °C die besten Ergebnisse.

Es gelang auf diese Weise, 100 nM Cu^{II} bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 2:1 nach 1 min Messzeit im TMB-Assay nachzuweisen. Für 250, 500 und 1000 nM Cu^{II} betrug der Quotient durch den Hintergrundwert 4:1, 6:1 und 9:1, was eine deutliche Abhängigkeit der HRP-Rekonstitution von der Cu^{II}-Konzentration anzeigt (s. **Abb. 33**).

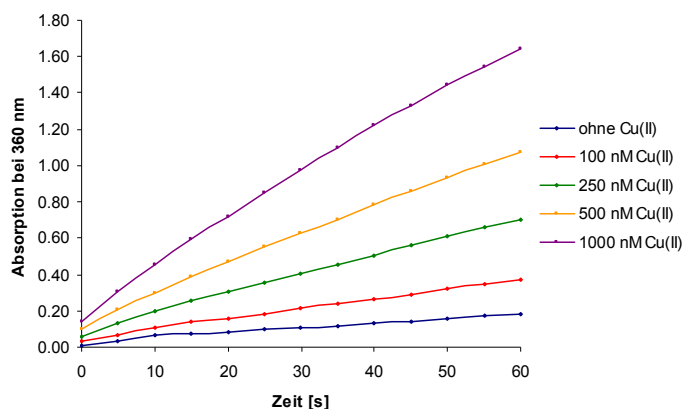


Abb. 33: Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch Cu^{II} und Rekonstitution. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 0,33 mM TMB, 0,76 mM H₂O₂ und 0,2 vol% der Inkubationslösung bei pH 4 (125 mM Citrat-Puffer) und 25 °C. Inkubationslösung: 100 nM EDTA, 0,26 M NaCl, 1 mM Ascorbat, 0,86 µM Apo-HRP und 2,33 µM Häm-in-(N,N'-diacetylhydrazid) 100 min inkubiert mit Cu^{II}-Probe (0, 100, 250, 500, 1000 nM) bei pH 7,5 (80 mM Tris-Puffer) und 20 °C.

In Experimenten mit (TPY)₂Cu^{II} wurde erwartungsgemäß keine Aktivität im TMB-Assay beobachtet, da Ascorbat auch in erhöhter Konzentration nicht ausreicht, um Cu^{II} aus diesem Komplex zu extrahieren. Daher wurde der Einsatz verschiedener Präkatalysatoren untersucht. THPTA führte in Experimenten mit freiem Cu^{II} zu einer Reaktion, zeigte jedoch mit (TPY)₂Cu^{II} keine Aktivität, was die Ergebnisse aus den Experimenten zur Click-Reaktion (**Kap. 3.3.1**) bestätigt. Als weitere mögliche Präkatalysatoren wurden BPY und PHEN untersucht. Beide Liganden besitzen eine hohe Affinität zu Cu^{II} und sollten das Gleichgewicht zwischen (TPY)₂Cu^{II} und einem (BPY)₂Cu^{II} - bzw. (PHEN)₂Cu^{II} -Komplex schnell auf ihre Seite verschieben. Tatsächlich zeigten beide Liganden bei einer Konzentration von 50 µM hohe

Absorptionen im TMB-Assay, jedoch stieg auch die Aktivität im Kontrollexperiment ohne Cu^{II} beträchtlich. Bei PHEN war dieser Effekt ausgeprägter, weshalb im Folgenden BPY als Präkatalysator verwendet wurde. Durch Verringerung der Ligand-Konzentration auf $1 \mu\text{M}$ konnte die Absorption der Kontrollprobe ohne Cu^{II} nach 1 min im TMB-Assay deutlich reduziert werden und es gelang die Detektion von $250 \text{ nM } (\text{TPY})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 2:1 (s. **Abb. 34**).

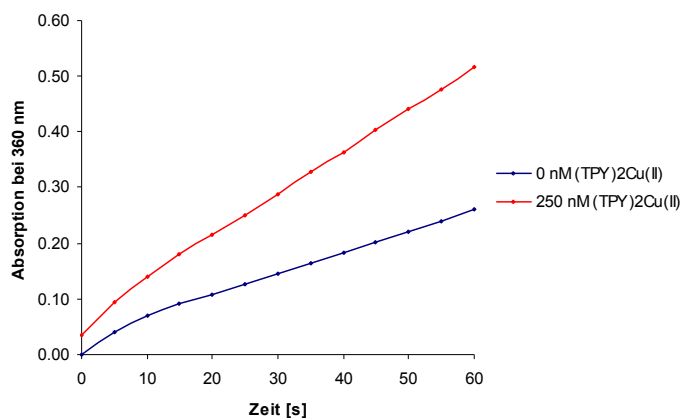


Abb. 34: Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch $(\text{TPY})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ und Rekonstitution. Die Konzentrationen in der Küvette betragen $0,33 \text{ mM TMB}$, $0,76 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ und $0,3 \text{ %vol}$ der Inkubationslösung bei $\text{pH } 4$ ($125 \text{ mM Citrat-Puffer}$) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Inkubationslösung: 100 nM EDTA , $0,26 \text{ M NaCl}$, $1 \mu\text{M BPY}$, 1 mM Ascorbat , $0,86 \mu\text{M Apo-HRP}$ und $2,33 \mu\text{M Häm-in-(N,N'-diacetylhydrazid)}$ 100 min inkubiert mit $250 \text{ nM } (\text{TPY})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ -Probe (rot) und ohne $(\text{TPY})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ (blau). bei $\text{pH } 7,5$ ($80 \text{ mM Tris-Puffer}$) und $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Als letzter Schritt wurde nun das in **Abb. 31** dargestellte Nachweissystem für Nucleinsäuren komplettiert. Dazu wurden zunächst $1 \mu\text{M } [(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ und $1,1 \mu\text{M Target-DNA}$ 2 min bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und innerhalb von 30 min auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt, um eine vollständige Hybridisierung zu gewährleisten. Nach Zugabe von Ascorbat, BPY, EDTA, Apo-HRP und Häm-in-(N,N'-diacetylhydrazid) wurde 100 min bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, anschließend $1 \mu\text{l}$ dieser Lösung mit der TMB-Nachweislösung auf $300 \mu\text{l}$ verdünnt und die Absorption bei 360 nm verfolgt. Als Kontrollexperimente wurde eine Probe ohne Target-DNA und eine unter Zugabe von *mismatch*-DNA (mmDNA) inkubiert. mmDNA weist eine CT-Basenfehlpaarung auf.

Vor allem in den ersten Sekunden des TMB-Assays zeigt sich eine deutliche Beschleunigung der Absorptionszunahme bei Anwesenheit von komplementärer DNA, nach 30 s wird eine um den Faktor 1,8 erhöhte Absorption verglichen mit dem Kontrollexperiment ohne Target gemessen (s. **Abb. 35**). Der Einsatz von mmDNA führt zu einer 1,3-fachen Erhöhung der Absorption.

Deutlicher wird dieser Trend bei Betrachtung der Absorptionsänderungen. Nach 45 s ist der Wert bei Anwesenheit von kDNA doppelt so hoch wie der für mmDNA und bei Abwesenheit von Target.

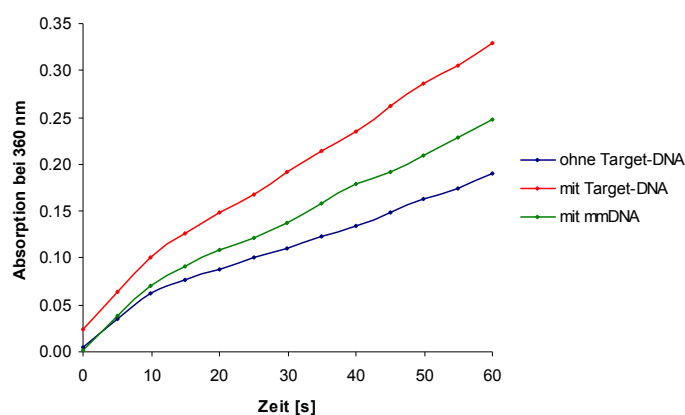


Abb. 35: Zunahme der Absorption bei 360 nm im TMB-Assay für HRP nach Cofaktor-Aktivierung durch DNA-Nachweis mit $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$ und Rekonstitution. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 0,33 mM TMB, 0,76 mM H_2O_2 und 0,3 vol% der Inkubationslösung bei pH 4 (125 mM Citrat-Puffer) und 25 °C. Inkubationslösung: 100 nM EDTA, 0,26 M NaCl, 0,86 μ M Apo-HRP und 2,33 μ M Häm-in-(N,N'-diacetylhydrazid) 100 min inkubiert mit 1 μ M $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$, 1,1 μ M kDNA und 1,1 μ M mmDNA bei pH 7,5 (80 mM Tris-Puffer) und 20 °C.

Es konnten nicht die Empfindlichkeiten für $(TPY)_2Cu^{II}$ oder freies Cu^{II} erreicht werden, jedoch ist eine Differenzierung von 1 μ M Target-DNA vor mmDNA bzw. ohne DNA möglich.

Durch Integration zweier Katalyseschritte konnte keine Verbesserung der Empfindlichkeit des in **Kap 1.2** vorgestellten Nucleinsäuredetektionssystems erreicht werden. Es gelang jedoch der „*proof-of-principle*“ einer 3-stufigen Signalkaskade zum sequenzspezifischen Nachweis von DNA, in der eine chemische und eine enzymatische Katalyse in einem System vereint wurden.

3.4 Synthese von CP und CPCOOH

Der Bisphenanthrolin-Ligand 3-Clip-phen (CP) stellt nach Komplexierung eines Cu^{II} -Ions einen funktionierenden Redoxkatalysator dar, der durch Kopplung an DNA für spätere Einzelmolekülexperimente immobilisiert werden kann. Ensemblemessungen zur Stabilität der Cu^{II} -Komplexe und ihrer Redoxaktivität sollten erste Erkenntnisse bezüglich der Eignung des Systems für Einzelmolekülexperimente liefern.

3-Clip-phen (CP) wird in einer zweistufigen Synthese ausgehend von PHEN synthetisiert (s. **Abb. 36**).

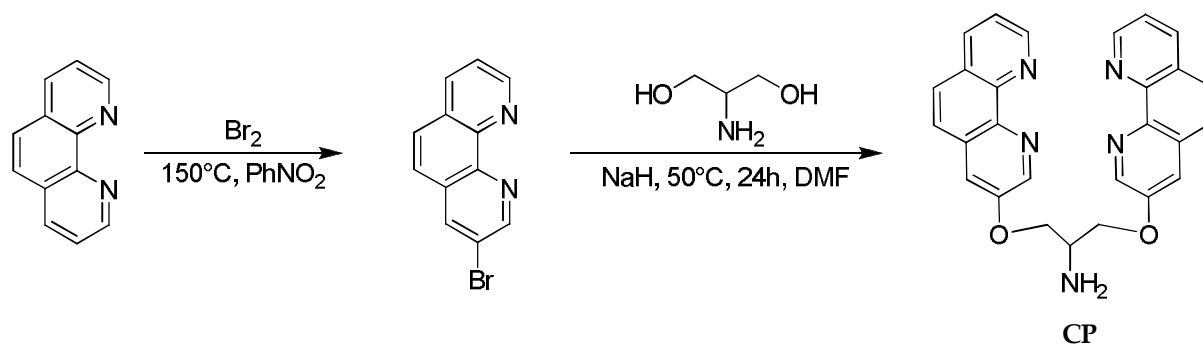


Abb. 36: Synthese von CP.

Der Bromierung des PHENs folgt eine nucleophile Substitution durch Serinol am Aromaten. Beide Schritte sind literaturbekannt,^{83,85} wurden aber in Durchführung und Aufarbeitung optimiert.

Zuerst wird PHEN in Nitrobenzol suspendiert, erhitzt und Brom zugetropft. Hierbei erwies sich eine sehr vorsichtige und langsame Durchführung bei etwas niedrigeren Temperaturen (115°C) als angegeben ($130\text{-}140^\circ\text{C}$) als vorteilhaft, da so ein besseres Verhältnis von einfach zu mehrfach bromiertem PHEN erhalten wurde. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung war die Ausbeute an 3-Bromphenanthrolin sehr gering, da eine Abtrennung von den mehrfach bromierten PHEN-Derivaten nur sehr schwer gelang. Daher wurde eine zusätzliche Aufreinigungsmethode nach *Meunier et al.*⁸⁴ durchgeführt, welche die unterschiedliche Basizität der bromierten PHEN-Derivate nutzt. Dabei werden zunächst alle Mischfraktionen ohne das Nebenprodukt PHEN vereinigt und NMR-

analytisch untersucht. Durch Zugabe einer definierten Menge Acetonitril ist nach Integration eine Quantifizierung des Produktgehaltes möglich. Im Vergleich zu den mehrfach bromierten Nebenprodukten hat 3-Bromphenanthrolin die höchste Basizität, so dass es stöchiometrisch mit HCl (in Diethylether) bei 15 °C selektiv und in hoher Reinheit aus DCM gefällt werden kann.

Im zweiten Schritt wird 3-Bromphenanthrolin mit Serinol umgesetzt. Dieses bietet den Vorteil, dass es neben zwei deprotonierbaren Alkohol-Funktionen für den nucleophilen Angriff auf 3-Bromphenanthrolin noch eine zusätzliche Aminofunktion besitzt, die während der Reaktion unbeteiligt bleibt und danach eine Möglichkeit für weitere Modifizierungen bietet.

Vor der Reaktion sollten Serinol, Natriumhydrid-Dispersion und 3-Bromphenanthrolin sorgfältig am Vakuum getrocknet werden. Entgegen der als „Eintopfsynthese“ formulierten Literaturvorschrift⁸⁵ führte eine separate Deprotonierung des Serinols und anschließendes langsames Zutropfen zu 3-Bromphenanthrolin bei 50 °C zu deutlich erhöhten Ausbeuten. Zur Überführung der Serinolat-Suspension wurde dabei eine Teflonkanüle und Argon-Überdruck verwendet. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel DMF vollständig entfernt, das Rohprodukt in wenig Chloroform aufgenommen und mit dem etwa 4-fachen Volumen n-Hexan gefällt. Das optimale Volumenverhältnis von Chloroform und Hexan ist dabei von der Produktmenge und dem Verhältnis des Produkts zu den Nebenprodukten abhängig und muss bei jeder Durchführung mittels Dünnschichtchromatographie experimentell bestimmt werden. Die abschließende Säulenchromatographie sollte im leicht basischen Milieu durchgeführt werden, um 3-Clip-phen (CP) in hoher Reinheit zu erhalten.

Im CP-DNA-Konjugat liegt die Aminofunktion acyliert vor, was ihre Nucleophilie entscheidend beeinflusst. Um das Komplexierungsverhalten in Vorversuchen genauer simulieren zu können und gleichzeitig eine funktionelle Gruppe für die Kopplung an DNA zu generieren, wurde CP mit Succinanhydrid weiter zu CPCOOH umgesetzt (s. **Abb. 37**). Auch dieser Syntheseschritt wurde bereits beschrieben,⁸⁶ die Aufarbeitung jedoch optimiert. Nach 1 h Rückflusskochen der Edukte in Chloroform wird das Lösungsmittel entfernt, das Rohprodukt in Methanol aufgenommen und Verunreinigungen bei -32 °C ausgefällt. Das Filtrat wird erneut eingengt und CPCOOH mit ca. 20-fachem Überschuss Diethylether ausgefällt. Auch hier ist das exakte Volumenverhältnis durch Dünnschichtchromatographie

experimentell zu ermitteln. Hochreines CPCOOH wurde in einer Ausbeute von 66 % erhalten.

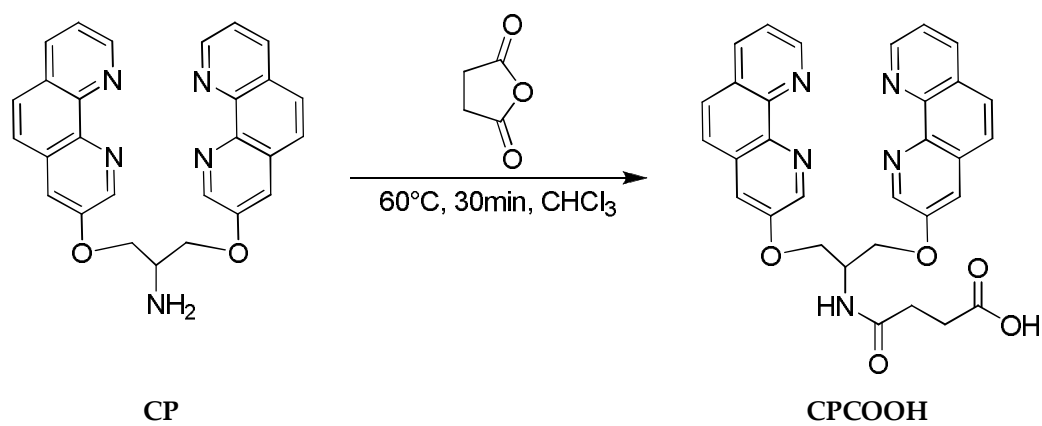


Abb. 37: Synthese von CPCOOH.

3.5 Modifizierung von DNA mit CP und CPCOOH

Modifizierungen an DNA werden meist über die Bildung von Amidbindungen vorgenommen, d. h. man benötigt Amino- oder Carbonsäure-funktionalisierte Substrate. Da CP eine freie Aminofunktion aufweist, sollte es direkt als Substrat eingesetzt werden. Eine einfache, Arbeitskreis-intern entwickelte Strategie zur DNA-Modifizierung besteht in der Aktivierung des 5'-OH-Endes eines DNA-Stranges mit 1,1-Carbonyldiimidazol (CDI) und der anschließenden Umsetzung mit einem Amin (s. **Abb. 38a**).⁷⁸

Weiterhin hat es sich im Arbeitskreis *Krämer* bewährt, am Ende der DNA-Festphasensynthese am 5'-Ende durch ein kommerziell erhältliches Phosphoramidit eine primäre Aminofunktion einzuführen. Diese ermöglicht Reaktionen mit aktivierten Carbonsäuren. So kann eine 2-fach als NHS-Ester aktivierte Dicarbonsäure als Linker zwischen zwei Aminofunktionen eingesetzt werden⁷³ (s. **Abb. 38b**), oder das gewünschte Substrat direkt durch HOBt, HBTU und DIEA *in-situ* aktivierte Carbonsäure eingeführt werden (s. **Abb. 38c**).²⁷

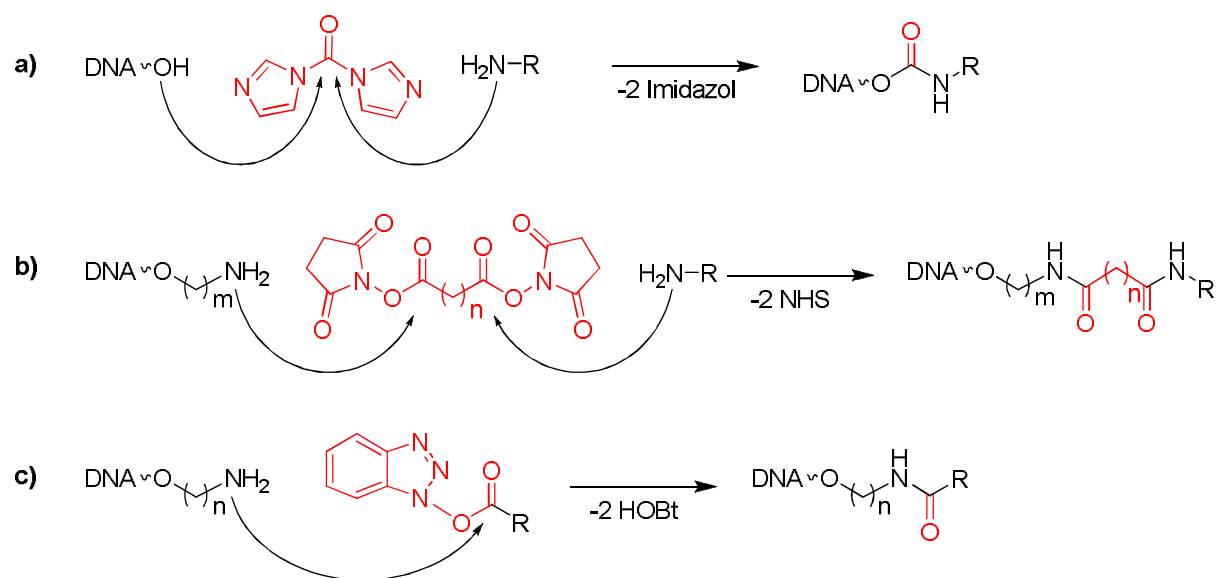


Abb. 38: Im Arbeitskreis *Krämer* verwendete Strategien zur DNA-Modifizierung.

Zunächst wurden Strategien **a)** und **b)** verfolgt, um DNA mit CP zu modifizieren. Zum einen konnte direkt CP eingesetzt und so die Säurefunktionalisierung zu

CPCOOH umgangen werden. Zum anderen sollten zwei CP-DNA-Konjugate mit einer deutlich unterschiedlichen Anzahl an Linkeratomen zwischen CP und dem 5'-Ende des DNA-Stranges erhalten werden, nämlich nur einem bei Strategie **a)** und 13 bei Strategie **b)** (s. **Abb. 39**).

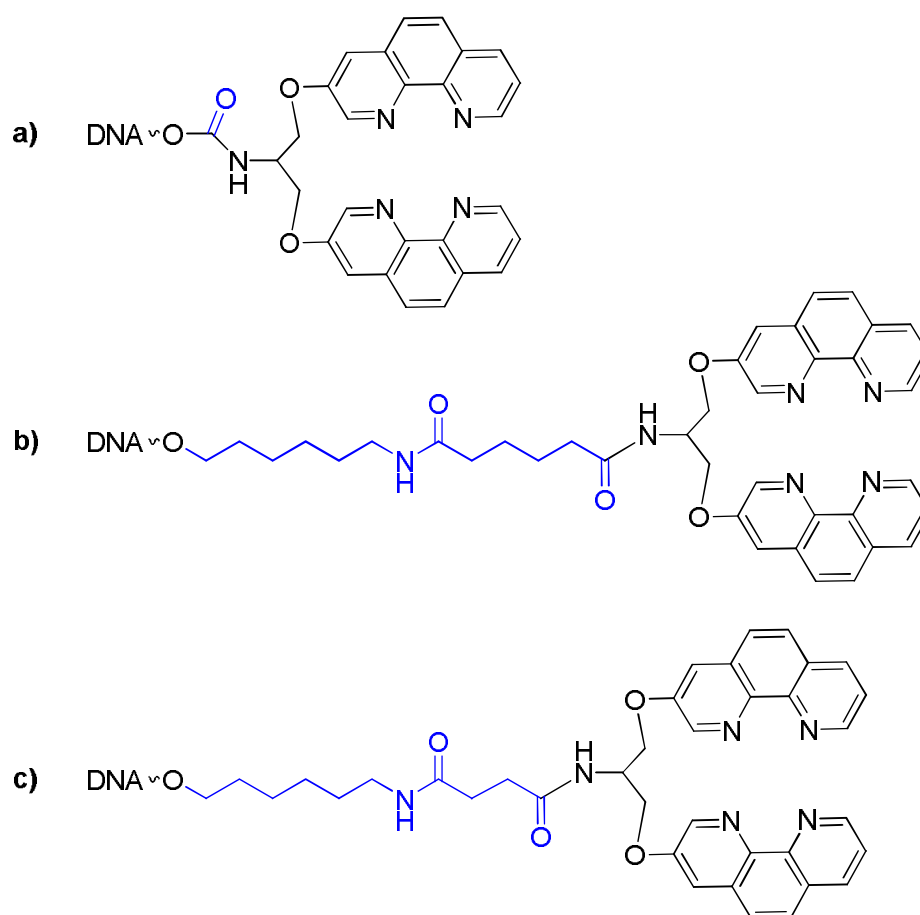


Abb. 39: Angestrebte CP-DNA Konjugate.

Über Vergleiche in anschließenden Experimenten zum Komplexierungs- und Fluoreszenzverhalten einer TMR-CP-dsDNA sollten Informationen über die Rolle der Linkerlänge gewonnen werden. Bei beiden Strategien erfolgt zunächst die Umsetzung der Festphasen-gebundenen DNA mit der aktivierten Dicarbonsäure bzw. CDI. Die entstehende carboxylfunktionalisierte DNA konnte jeweils durch MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden, die weitere Umsetzung mit CP war jedoch erfolglos. Möglicherweise ist das auf eine sterische Hinderung der Aminofunktion durch die 2 PHEN-Einheiten zurückzuführen.

Bei Strategie **c)** wurde CPCOOH *in-situ* aktiviert und in einem Schritt mit aminomodifizierter DNA umgesetzt. Obwohl nur ein 30-facher Überschuss an CPCOOH eingesetzt wurde, konnte das entsprechende CP-DNA-Konjugat (s. **Abb. 39**) in guten Ausbeuten und hoher Reinheit nach Ablösen von der Festphase und HPLC-Trennung isoliert werden.

3.6 Experimente mit CP

3.6.1 Stabilität von CPCu^{II} -Komplexen

In den Einzelmolekülexperimenten mit $\text{Cu}(\text{BPY})$ -Komplexen (s. **Kap. 1.4**) erhöhten schon geringe Mengen an freiem Cu^{II} die Hintergrundkatalyse beträchtlich. CPCu^{II} sollte als Katalysator für Redoxreaktionen untersucht werden. Viele derartige Reaktionen werden auch durch freies Cu^{II} katalysiert, welches die Messungen verfälschen würde. Der CPCu^{II} -Komplex bietet im Vergleich zu BPYCu^{II} den Vorteil einer deutlich höheren thermodynamischen Stabilität, was durch Experimente analog zu **Kap. 3.1.2** (Ermittlung der Stabilitätskonstante $\log K$ für $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{M}^{\text{II}}$) belegt wurde. Als Konkurrenzligand wurde Nitriolotriacetat (NTA, $\log K = 12,96$)⁷⁹ verwendet, welcher genau wie CP vierzählig ist. Es zeigte sich, dass man drei Äquivalente NTA benötigt, um etwa die Hälfte des Cu^{II} aus einem CPCu^{II} Komplex zu extrahieren. Daraus ergibt sich $\log K = 13,5$ für CPCu^{II} . Diese im Vergleich zu den bisher verwendeten $\text{Cu}(\text{BPY})$ -Komplexen ($\log K = 8,7$)⁴⁵ hohe thermodynamische Stabilität sollte eine bessere Handhabung in Einzelmolekülexperimenten ermöglichen. Störendes freies Cu^{II} kann durch Waschvorgänge aus dem Beobachtungsvolumen entfernt werden, während komplexiertes Cu^{II} dagegen zurück bleibt.

3.6.2 Vorexperimente zum Redoxverhalten von CPCu^{II}

Eine wässrige CPCu^{II} -Lösung hat bei pH 7 (50 mM NaH_2PO_4 -Puffer) eine gelbliche Färbung und zwei charakteristische Absorptionsbanden bei 231 nm und 279 nm. Bei Zugabe von 10 Äquivalenten Dithionit verfärbt sich diese Lösung zu rotbraun, was typisch für Cu^{I} -PHEN-Komplexe ist. Es konnten jedoch keine spektrophotometrischen Messungen durchgeführt werden. Eine Referenzprobe eines Cu^{I} -Salzes und 2 Äquivalenten PHEN in Acetonitril zeigt eine sehr ähnliche Farbe und eine Bande bei 440 nm. Dies legt eine Reduktion von CPCu^{II} zu dem entsprechenden Cu^{I} -Komplex nahe. Durch Zugabe von 10 Äquivalenten H_2O_2 konnte die anfängliche gelbe Färbung wieder hergestellt werden, was auf eine Reoxidation zu CPCu^{II} hindeuten könnte. Eine erneute Zugabe von 10 Äquivalenten Dithionit

und H_2O_2 zeigte dieselben Effekte, jedoch in leicht verminderter Intensität, auch ein dritter Zyklus war noch deutlich erkennbar.

Die Ergebnisse zeigen ein reversibles Redoxverhalten von $\text{CPCu}^{\text{I/II}}$ an, das durch Dithionit und H_2O_2 gesteuert werden kann.

3.6.3 Cu^{II} -katalysierte Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon

In späteren Einzelmolekülstudien sollen mechanistische Untersuchungen zur kupferkatalysierten Oxidation z. B. von Hydrochinon zu Benzochinon durchgeführt werden. Zuerst wurde die katalytische Aktivität von CPCu^{II} bei Raumtemperatur daher in Ensemblesmessungen evaluiert und mit der von freiem Cu^{II} und $(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ verglichen. Das Substrat Hydrochinon wurde sowohl in 5-fachem ($50 \mu\text{M}$) als auch in 1000-fachem Überschuss (10mM) bezogen auf die Katalysatorkonzentration ($10 \mu\text{M}$) eingesetzt. Alle Experimente wurden sowohl bei pH 7 als auch pH 8 durchgeführt (s. **Abb. 40**).

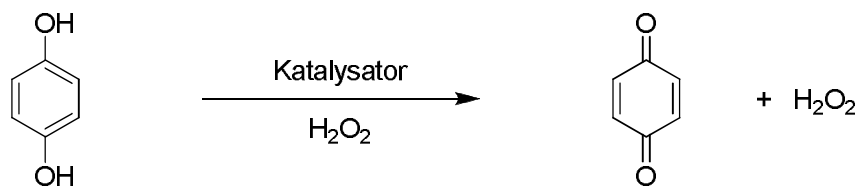


Abb. 40: Reaktionsgleichung der Cu^{II} -katalysierten Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon. Als Katalysator wurden freies Cu^{II} , $(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ und CPCu^{II} eingesetzt. Die Reaktion wurde sowohl bei pH 7 als auch pH 8 durchgeführt.

Die Umsetzung von Hydrochinon zu Benzochinon lässt sich gut UV/VIS-spektrophotometrisch verfolgen, die Absorptionsbanden für Edukt und Produkt liegen bei 293 nm ($\epsilon = 2\,960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bzw. 242 nm ($\epsilon = 24\,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Exemplarisch ist das Spektrum einer solchen Messung in **Abb. 41** abgebildet, eine vollständige Auflistung aller Spektren befindet sich im Anhang (**Kap. 6.3**). Die Reaktionen wurde in Eppendorf-Gefäßen durchgeführt, aus denen Proben entnommen, verdünnt und gemessen wurden.

Die Absorptionsbande des Hydrochinons war aufgrund der relativ geringen Extinktion und Überlagerungen mit den Absorptionsbanden von PHEN und CP nicht eindeutig zuzuordnen, der Anstieg der Benzochinonbande bei 242 nm war

jedoch gut verfolgbar und wurde im Folgenden zur Konzentrationsbestimmung herangezogen.

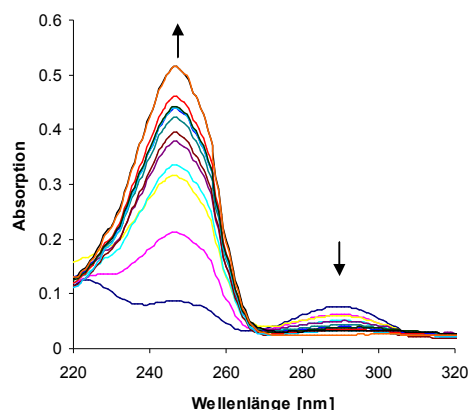


Abb. 41: Änderung der Absorption während der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon mit der Zeit (20 min). Die Konzentrationen in der Küvette betragen 50 μM Hydrochinon, 100 μM H_2O_2 und 10 μM Cu^{II} -Katalysator bei pH 7 (1 mM MOPS-Puffer) und 25 $^\circ\text{C}$.

Beim Einsatz von 5-fachem Überschuss Hydrochinon zeigt die Änderung der Absorption bei 242 nm einen deutlich vom Kontrollexperiment ohne Katalysator zu unterscheidenden Umsatz an (s. **Abb. 42**). Daraus errechnen sich TONs zwischen 0,8 und 2,5 und TOFs zwischen 0,3 min^{-1} und 0,9 min^{-1} in den ersten 180 s (s. **Tab. 5**)

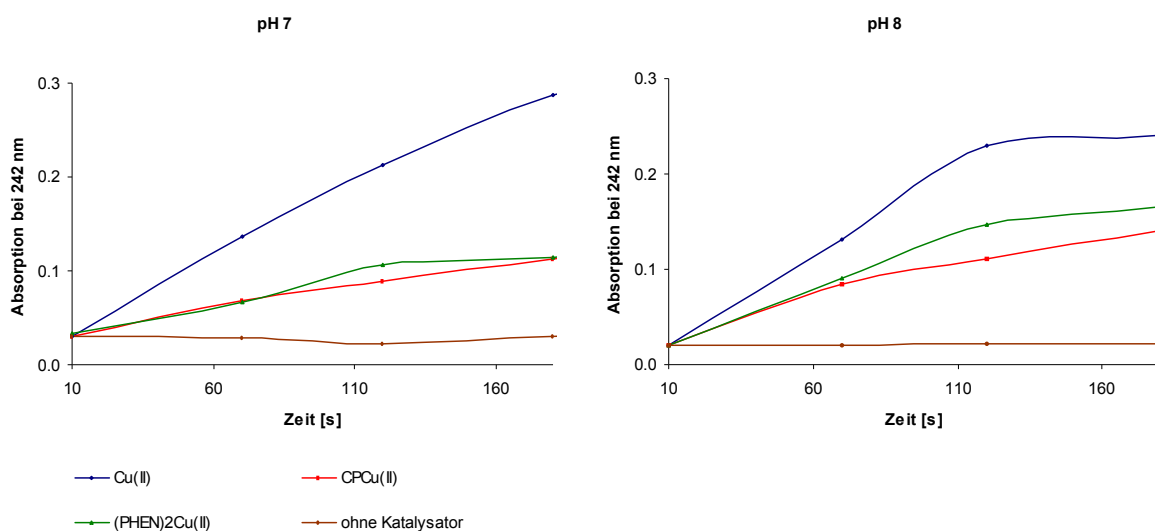


Abb. 42: Änderung der Absorption bei 242 nm bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 5-fachem Substratüberschuss gegenüber dem Katalysator. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 25 μM Hydrochinon, 50 μM H_2O_2 und 5 μM Cu^{II} -Katalysator bei 25 $^\circ\text{C}$. Links: pH = 7 (500 μM MOPS-Puffer), rechts: pH = 8 (500 μM DHP-Puffer).

Dabei zeigt freies Cu^{II} eine ca. 3-fache Aktivität verglichen mit CPCu^{II} und $(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$. Alle Reaktionen verlaufen mit geringer Geschwindigkeit. Eine pH-Wert-Erhöhung führt zu einer leichten Steigerung der Aktivität von CPCu^{II} und $(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$.

	Katalysator	TON	TOF [min^{-1}]
pH 7	Cu^{II}	2,5	0,9
	$(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$	0,8	0,3
	CPCu^{II}	0,8	0,3
	-	0,0	0,0
pH 8	Cu^{II}	2,1	0,8
	$(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$	1,4	0,5
	CPCu^{II}	1,2	0,4
	-	0,0	0,0

Tab. 5: Aktivität der eingesetzten Cu^{II} -Katalysatoren bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 5-fachem Substratüberschuss gegenüber dem Katalysator. Die Berechnung erfolgte aus der Änderung der Absorption bei 242 nm im Zeitraum von 10 - 180 s (s. **Abb. 42**).

Erhöht man die Substratkonzentration auf einen 1000-fachen Überschuss gegenüber der Katalysatorkonzentration, so werden bei pH 7 TONs zwischen 12 und 28 erreicht und die TOFs steigen auf $4,5 \text{ min}^{-1}$ bis $9,7 \text{ min}^{-1}$ (s. **Abb. 43, Tab. 6**).

Das entspricht einer Steigerung der Aktivität um den Faktor 10 bis 20 verglichen mit den Werten für einen 5-fachen Substratüberschuss. Bei Erhöhung des pH-Wertes um eine Einheit kommt es bei freiem Cu^{II} und $(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ zu einem weiteren deutlichen Anstieg der Aktivität, während diese bei CPCu^{II} nahezu konstant bleibt. Kontrollexperimente ohne Katalysator zeigten auch bei den großen Substratkonzentrationen nahezu keinen Umsatz.

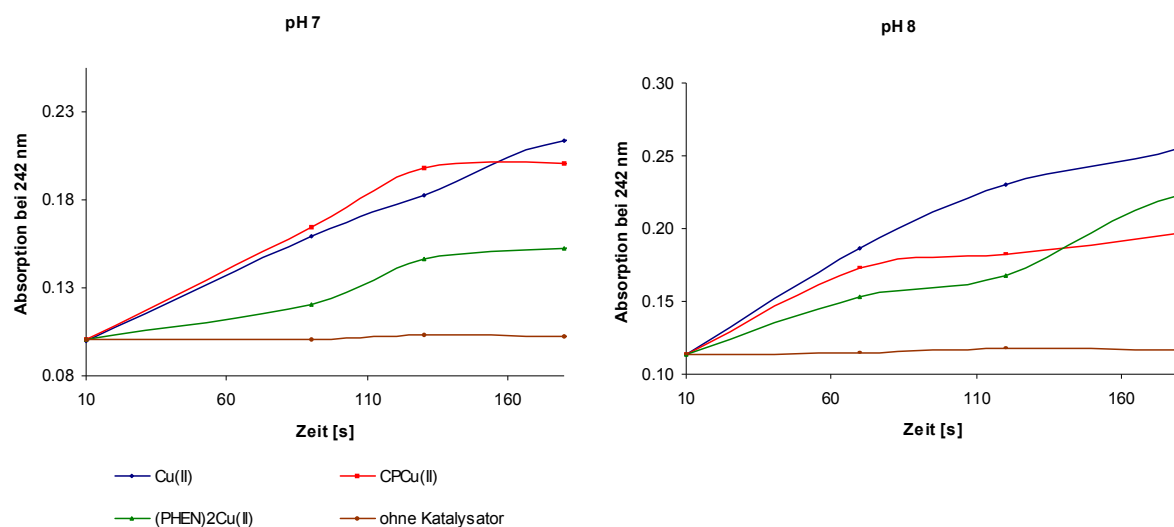


Abb. 43: Änderung der Absorption bei 242 nm bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 1000-fachem Substratüberschuss gegenüber dem Katalysator. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 200 μM Hydrochinon, 400 μM H_2O_2 und 0,2 μM Cu^{II} -Katalysator bei 25 °C. Links: pH = 7 (400 μM MOPS-Puffer) , rechts: pH = 8 (400 μM DHP-Puffer).

	Katalysator	TON	TOF [min^{-1}]
pH 7	Cu^{II}	27,4	9,7
	$(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$	12,6	4,5
	CPCu^{II}	24,3	8,6
	-	0,4	0,1
pH 8	Cu^{II}	34,4	12,2
	$(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$	26,6	9,4
	CPCu^{II}	20,3	7,2
	-	0,9	0,3

Tab. 6: Aktivität der eingesetzten Cu^{II} -Katalysatoren bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon bei 1000-fachem Substratüberschuss gegenüber dem Katalysator. Die Berechnung erfolgte aus der Änderung der Absorption bei 242 nm im Zeitraum von 10 - 180 s (s. **Abb. 43**).

Die Experimente zeigen, dass CPCu^{II} bei physiologischen pH-Werten die Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon katalysiert und mit freiem Cu^{II} und $(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$

vergleichbare Aktivitäten erreicht. Durch Erhöhung der Substratkonzentration können größere Umsätze erreicht werden.

Die Aktivität ist moderat, was jedoch gerade für die Einzelmolekülspektroskopische Detektion von Reaktionszwischenstufen interessant sein kann. Zudem wird die Möglichkeit aufgezeigt, die Reaktionsgeschwindigkeit durch Änderung der Substratkonzentration optimal für das betreffende Experiment einzustellen.

3.7 Experimente mit CPCOOH

3.7.1 Stabilität von CPCOOHCu^{II}-Komplexen

Analog zu Kap. 3.6.1 wurde auch für CPCOOH eine Stabilitätsbestimmung mit NTA durchgeführt. Durch Zugabe eines Äquivalentes NTA konnte ein Viertel des Cu^{II} aus CPCOOHCu^{II} entfernt werden. Daraus errechnet sich eine Stabilitätskonstante von $\log K = 13,1$ für CPCOOHCu^{II}.

Der im Vergleich zu CPCu^{II} ($\log K = 13,5$) leicht verringerte Wert könnte darauf hindeuten, dass die primäre Aminofunktion des CPs an der Koordination eines Cu^{II} teilnimmt. In CPCOOH liegt sie acyliert und somit deaktiviert vor. Gleichzeitig weist die noch immer sehr hohe Stabilitätskonstante auf eine quantitative Bildung DNA-immobilisierter CP-Cu^{II}-Komplexe auch bei sehr kleinen Konzentrationen an freiem Cu^{II} hin, was für die Minimierung der Hintergrundaktivität durch freies Cu^{II} wichtig ist.

Weiterhin konnte auch der CPCOOHCu^I-Komplex spektroskopisch untersucht werden. Bei Zugabe eines Cu^I-Salzes zu CPCOOH bildet sich eine charakteristische Absorptionsbande bei 428 nm (s. Abb. 44).

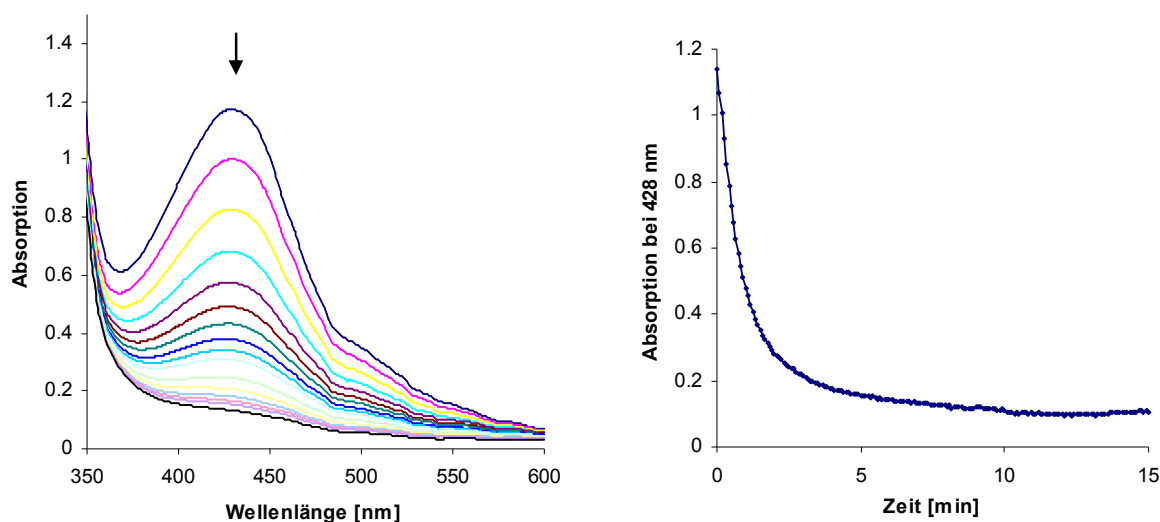


Abb. 44: Änderung der Absorption von CPCOOH Cu^I mit der Zeit. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 100 μM CPCOOH, 100 μM $[\text{Cu}^{\text{I}}\text{CH}_3\text{CN}]_4\text{PF}_6$ in Acetonitril. Links: Wellenlängenbereich von 350 nm - 600 nm, rechts: Bei 428 nm.

Durch Luftsauerstoff kommt es jedoch schnell zur Oxidation zu $\text{CPCOOHCu}^{\text{II}}$, was sich durch die Abnahme der Absorption gut verfolgen lässt. Aus der Halbwertszeit von 55 s kann eine Zerfallskonstante von 65 min^{-1} errechnet werden.

3.7.2 $\text{CPCOOHCu}^{\text{II}}$ -katalysierte Oxidation von MBA

Als weiteres Substrat für eine Cu^{II} -katalysierte Oxidation wurde 4-Mercaptobenzoessäure (MBA) untersucht. Als Dinatriumsalz zeigt dieses Thiolat eine hohe Wasserlöslichkeit und kann leicht zum Disulfid oxidiert werden (s. **Abb. 45**).

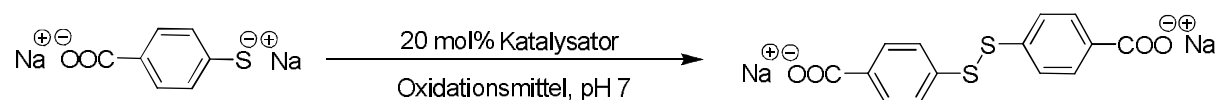


Abb. 45: Reaktionsgleichung der Cu^{II} -katalysierten Oxidation von MBA. Als Katalysator wurden 20 mol% freies Cu^{II} und $\text{CPCOOHCu}^{\text{II}}$ eingesetzt, als Oxidationsmittel Luftsauerstoff und H_2O_2 .

Auch diese Reaktion kann gut UV/VIS-spektrophotometrisch verfolgt werden, MBA hat eine Absorptionsbande bei 303 nm ($\epsilon = 20\,650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Produktbande liegt bei 266 nm, ist jedoch nicht scharf und wird von Absorptionsbanden von PHEN und CPCOOH überlagert, weshalb nur die Eduktbande für die folgenden Untersuchungen betrachtet wurde.

Abb. 46 zeigt die Änderung der Absorption während der Oxidation von MBA mit Luftsauerstoff (*links*) und H_2O_2 (*rechts*), **Tab. 7** die daraus errechneten TOFs.

MBA wird weitaus leichter oxidiert als Hydrochinon, was der deutlich erkennbare Umsatz sowohl mit Luftsauerstoff als auch bei Zugabe von H_2O_2 zeigt. Die Anfangsgeschwindigkeit steigt bei Abwesenheit von H_2O_2 durch Zugabe eines Katalysators deutlich an, die TOFs erreichen nach 1 min den 4- bis 5-fachen Wert. Die Anwesenheit von H_2O_2 bringt keine Vorteile.

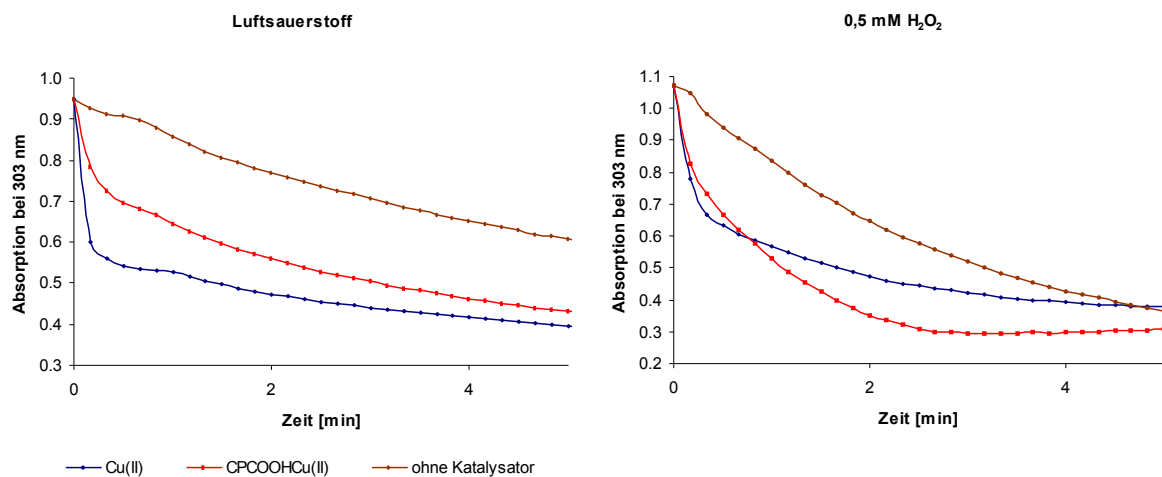


Abb. 46: Änderung der Absorption bei 303 nm bei der kupferkatalysierten Oxidation von MBA. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 100 mM NaCl, 50 μ M MBA, 10 μ M Katalysator bei pH 7 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. *links:* Ohne Zusatz, *rechts:* + 0,5 mM H₂O₂.

	Katalysator	TOF [min ⁻¹]
Luftsauerstoff	Cu ^{II}	2,0
	CPCOOHCu ^{II}	1,5
	-	0,4
0,5 mM H ₂ O ₂	Cu ^{II}	2,4
	CPCOOHCu ^{II}	2,6
	-	1,1

Tab. 7: Aktivität der eingesetzten Cu^{II}-Katalysatoren (20 mol%) bei der Oxidation von MBA. Die Berechnung erfolgte aus der Änderung der Absorption bei 303 nm in den ersten 60 s (s. **Abb. 46**). Die Zahlenwerte der TONs sind mit den TOFs identisch.

Die Reaktivität mit Luftsauerstoff macht MBA zu einem besonders interessanten Substrat für spätere Einzelmolekülexperimente, da so eine Versuchsführung ohne zusätzliches Oxidationsmittel ermöglicht wird. CPCOOHCu^{II} bewirkt als Katalysator eine 4-fache Beschleunigung gegenüber der unkatalysierten Reaktion und zeigt so eine vergleichbare Aktivität wie freies Cu^{II}.

3.8 Experimente mit CP-TMR-dsDNA

Das synthetisierte CP-DNA-Konjugat wurde mit einem komplementären TMR-DNA-Konjugat hybridisiert und die so erhaltene CP-TMR-dsDNA zu Ensemblemessungen verwendet.

Erste Kontrollexperimente zeigten, dass sich die Fluoreszenzintensitäten von CP-TMR-dsDNA und TMR-DNA nur unwesentlich unterscheiden. Anschließend wurde untersucht, ob sich die Assoziation und Dissoziation des CPCu^{II} -Komplexes (vgl. Kap. 1.4) über Fluoreszenzänderungen verfolgen lässt (s. Abb. 47).

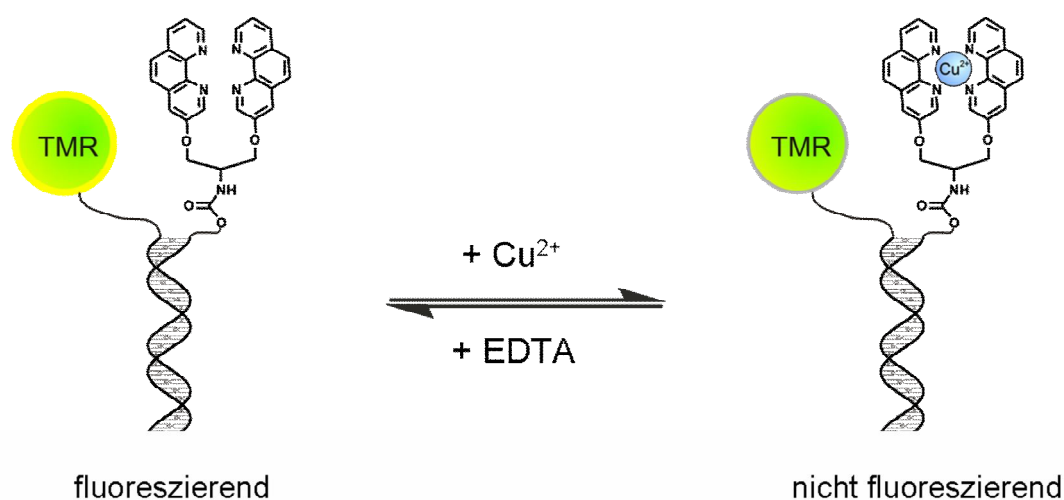


Abb. 47: Prinzip der Fluoreszenzlöschung und -regeneration von CP-TMR-dsDNA durch Cu^{II} - und EDTA-Zugabe.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch mit CP ein Chelator-Farbstoff-System aufgebaut werden kann, bei dem die Fluoreszenz des Farbstoffs durch Cu^{II} -Koordinat ion gelöscht wird: Bei Zugabe von 2 Äquivalenten Cu^{II} (bezogen auf die Konzentration der CP-TMR-dsDNA) kommt es sofort zu einer Fluoreszenzlöschung auf unter 10 % der Anfangsintensität. Erwartungsgemäß lässt sich die Fluoreszenz durch Zugabe von 4 000 Äquivalenten EDTA fast vollständig regenerieren, jedoch nur langsam. Erst nach ca. 10 min werden wieder über 90 % der Anfangsintensität erreicht (s. Abb. 48). Das deutet auf eine hohe kinetische Stabilität des Cu^{II} -Komplexes des CP-DNA-Konjugats hin, die im Einzelmolekülexperiment von Vorteil sein kann, da

die schnelle Dissoziation und Reassoziierung die Beobachtung anderer Prozesse stören kann.

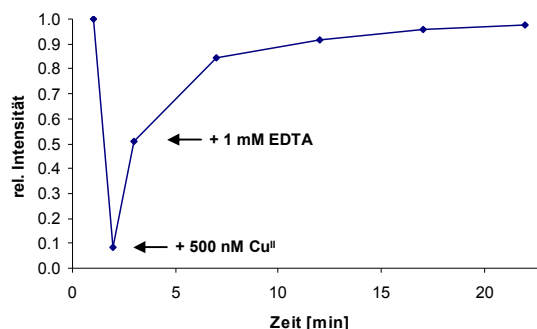


Abb. 48: Änderung der Fluoreszenzintensität von CP-TMR-dsDNA bei 588 nm durch Cu^{II}- und EDTA-Zugabe mit der Zeit. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 100 mM NaCl, 250 nM CP-TMR-dsDNA, 500 nM Cu^{II} und 1 mM EDTA bei pH 7 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 530 nm.

Diese Eigenschaften konnten auch bereits durch Einzelmolekülexperimente in der Arbeitsgruppe *Herten* bestätigt werden. Bei Zugabe von Cu^{II}-Ionen in geringer Konzentration zeigt eine CP-Farbstoff-dsDNA eine deutlich stärkere Fluoreszenzlöschung als die entsprechende BPY-TMR-dsDNA (s. **Abb. 49**).

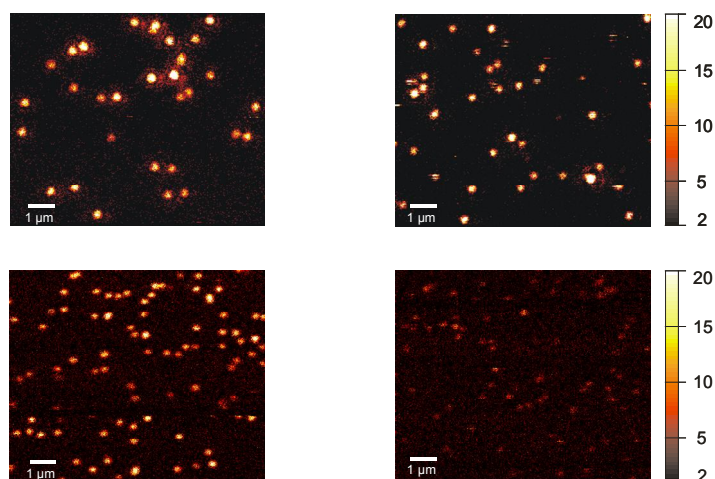


Abb. 49: Einzelmolekül-Rasterbilder, Vergleich von TMR-BPY- und Atto620-CP-Konjugaten mit Messung der Fluoreszenzintensität. *links oben:* BPY, ohne Cu^{II}, *rechts oben:* BPY, 2 μM Cu^{II}, *links unten:* CP, ohne Cu^{II}, *rechts unten:* CP, 4 μM Cu^{II}. Atto620 ist ein kommerzieller Pyroninfarbstoff mit Emissionsmaximum bei 620 nm.

Als nächster Schritt sollte die Reduktion von Cu^{II} zu Cu^{I} an der CP-TMR-dsDNA beobachtet werden. Eine Regeneration der Fluoreszenz wurde erwartet, da Cu^{II} als Fluoreszenzlöcher von TMR wirkt, Cu^{I} jedoch nicht (s. **Abb. 50**).

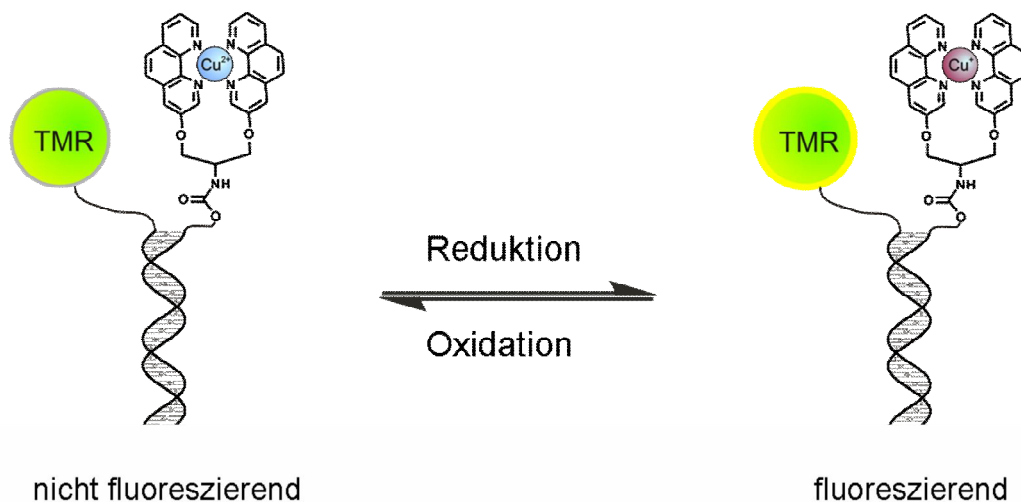


Abb. 50: Prinzip der Fluoreszenzlöschung und -regeneration von CP-TMR-dsDNA durch Wechsel der Oxidationsstufe des koordinierten Kupfers.

Als Reduktionsmittel wurde zunächst Dithionit eingesetzt. Wie **Abb. 51** zeigt, konnte nach Fluoreszenzlöschung mit Cu^{II} durch Zugabe von Dithionit eine Regeneration der Fluoreszenz auf ca. 65 % der Anfangsintensität beobachtet werden. Ausmaß und Geschwindigkeit sind dabei von der Menge zugesetzten Dithionits abhängig.

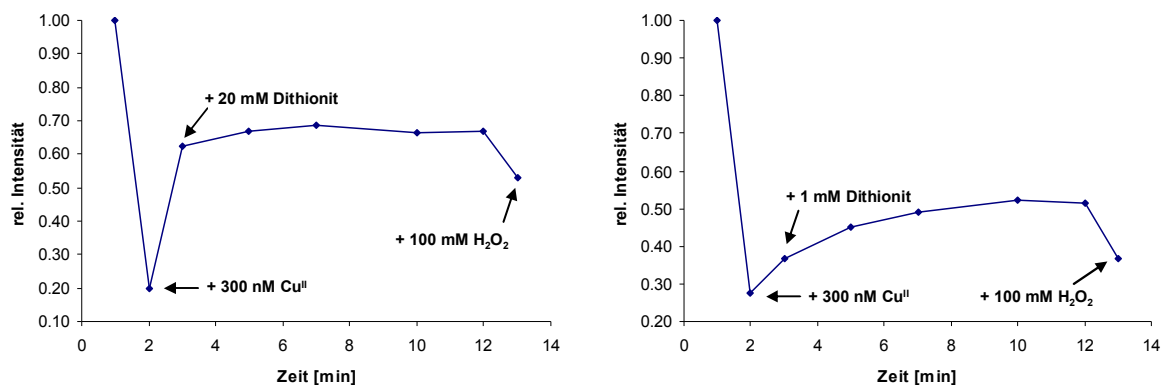


Abb. 51: Änderung der Fluoreszenzintensität von CP-TMR-dsDNA bei 588 nm durch Zugabe von Cu^{II} , Dithionit und H_2O_2 mit der Zeit. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 100 mM NaCl, 250 nM CP-TMR-dsDNA, 300 nM Cu^{II} , 20 mM Dithionit (*links*), 1 mM Dithionit (*rechts*) und 100 mM H_2O_2 bei pH 7 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 530 nm.

Durch Zugabe von H_2O_2 sollte eine Reoxidation des Cu^{I} zu Cu^{II} ausgelöst werden, wobei eine erneute Löschung der Fluoreszenz erwartet wurde. Tatsächlich zeigte eine Zugabe von H_2O_2 im 100- bzw. 5-fachen Überschuss bei 1 mM und 20 mM Dithionit eine erneute Verringerung der Intensität um 15 % (s. **Abb. 51**). Durch erneute Zugabe von Dithionit konnten keine weiteren Intensitätsänderungen ausgelöst werden.

Bei weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass die Verhältnisse von Reduktions- zu Oxidationsmittel und deren Stoffmenge eine entscheidende Rolle bezüglich der Änderung der Intensität spielen. So konnte beispielsweise bei mehrfacher Zugabe von je 20 mM Dithionit eine stufenartige Regeneration der Fluoreszenz beobachtet werden, was die Abhängigkeit dieses Effektes von der Konzentration des Reduktionsmittels belegt. Weiterhin führte eine H_2O_2 -Zugabe in 10- bis 20-fachem Überschuss entgegen der Theorie wiederholt zu einem deutlichen Anstieg der Intensität.

Diese zusätzlichen Informationen deuten auf ein kompliziertes Gleichgewicht redoxaktiver Spezies hin. Darüber hinaus könnte die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzregeneration auch auf eine Koordination des Kupfers durch Dithionit hindeuten, das im großen Überschuss vorliegt und als zweizähniger Ligand wirken kann. Die Regeneration der Fluoreszenz könnte auch auf eine Verdrängung des CP-Liganden durch Dithionit zurückgeführt werden.

Daher wurden im Folgenden weitere Reduktionsmittel untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass diese keine Chelatoreigenschaften aufweisen, so dass keine Konkurrenz zum CP-Liganden ermöglicht wird. Eingesetzt wurden Thiosulfat, Mercaptopropionsäure, Thiophenol, MBA und Hydrazin. **Abb. 52** zeigt die Änderungen der Fluoreszenz mit der Zeit.

Thiosulfat und Mercaptopropionsäure führen zu einer nur geringen und langsamen Regeneration der Fluoreszenz, während Hydrazin, Thiophenol und MBA mit Dithionit vergleichbare Resultate erzielen. Da MBA dabei jedoch in der geringsten Konzentration eingesetzt werden konnte, wurden abschließende Experimente mit diesem Reduktionsmittel durchgeführt.

MBA wurde in Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 5 mM eingesetzt. MBA-Konzentrationen unter 0,5 mM verursachten dabei eine geringere Regeneration, während sich die Effekte bei größeren Konzentrationen nicht wesentlich unterschieden.

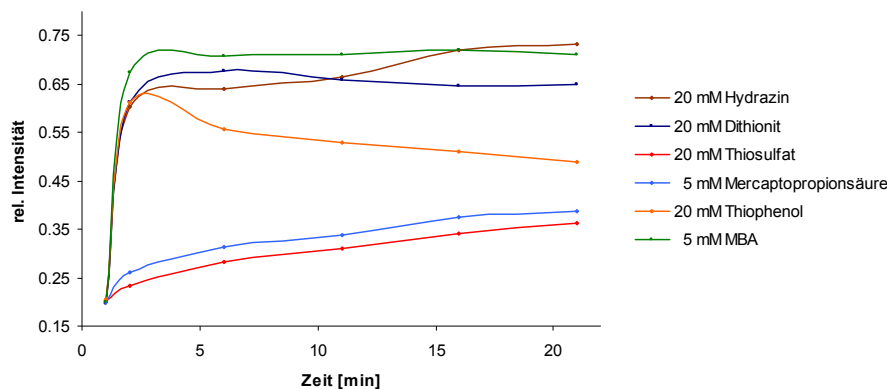


Abb. 52: Änderung der Fluoreszenzintensität von CPCu^{II}-TMR-dsDNA bei 588 nm nach Zugabe verschiedener Reduktionsmittel mit der Zeit. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 100 mM NaCl, 250 nM CP-TMR-dsDNA, 300 nM Cu^{II} bei pH 7 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. Die Konzentration an Reduktionsmittel ist der Legende zu entnehmen. Die Anregungswellenlänge betrug 530 nm.

Nach partieller Regeneration der gelöschten Fluoreszenz mit MBA konnte durch Zugabe von EDTA eine nahezu vollständige Wiederherstellung der Anfangsintensität beobachtet werden (s. **Abb. 53**).

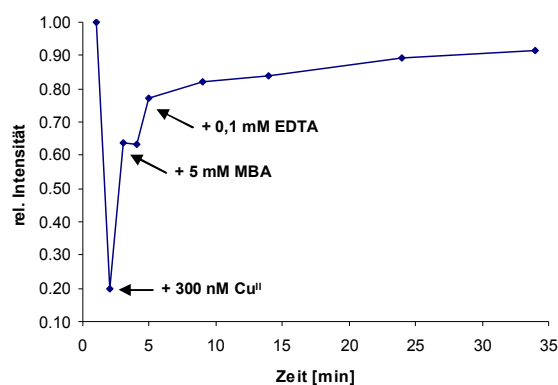


Abb. 53: Änderung der Fluoreszenzintensität von CP-TMR-dsDNA bei 588 nm durch Zugabe von Cu^{II}, MBA und EDTA mit der Zeit. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 100 mM NaCl, 250 nM CP-TMR-dsDNA, 300 nM Cu^{II}, 5 mM MBA und 100 µM EDTA bei pH 7 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 530 nm.

Dieser durch EDTA hervorgerufene Effekt lässt vermuten, dass zumindest ein Teil des Cu^{I/II} während der Experimente an der CP-TMR-dsDNA verbleibt. Kontrollexperimente mit Cu^I-Salzen konnten aufgrund der geringen Stabilität des CPCOOHCu^I-Komplexes jedoch nicht durchgeführt werden, so dass weiterer

Spielraum für Interpretationen bleibt. So kann z. B. nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die CP-TMR-dsDNA durch MBA teilweise zerstört wird, während EDTA anschließend dem verbliebenen Konjugat Cu^{II} entzieht.

Die $\text{CPCOOHCu}^{\text{II}}$ -katalysierte Oxidation von MBA wurde bereits in **Kap. 3.7.2** beschrieben, so dass dieses Reduktionsmittel zum jetzigen Zeitpunkt als am besten geeignetes Substrat für die Untersuchung der Cu^{II} -vermittelten Katalyse in Einzelmolekülexperimenten angesehen werden kann.

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte und Chemikalien

Die *DNA-Modifikationen und Messungen* wurden in low-retention-Reaktionsgefäßen (0,6 bzw. 1,7 ml) der Firma Kisker (Steinfurt, Deutschland) und Safe-Lock-Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zum Zentrifugieren wurde eine Biofuge pico von Heraeus (Hanau, Deutschland) verwendet, Lösungen wurden mit einem MS2-Minishaker der Firma IKA (Staufen, Deutschland) gemischt bzw. mit einem Thermomixer comfort für 1,5 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf temperiert und durchmischt.

Wässrige Oligonucleotid-Lösungen wurden bis zur Trockene mit einem Gefriertrockner VaCo der Firma Zirbus (Bad Grund, Deutschland) lyophilisiert.

Die *Oligonucleotidsynthesen* wurden an einem Expedite™ 8909 System der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Die *HPLC-Trennungen* in der Biokonjugatsynthese wurden bei 50 °C an einem Shimadzu Flüssigkeitschromatographen mit UV/VIS-Detektor und Säulenofen durchgeführt. Als Säule wurde eine Nucleosil C4-Säule (250 x 4,6 mm) der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Die Injektionsschleife fasste 500 µl, 300 µl wurden injiziert. Folgende Gradienten von 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser (Lösungsmittel A) und Acetonitril (Lösungsmittel B) wurden durchlaufen: Bei Bisterpyridin-DNA-Konjugaten in 35 min 0 - 25 % B, in 10 min 25 - 90 % B, 10 min 90 % B bei 25 °C, beim CP-DNA-Konjugat 5 min 5 % B, in 30 min 5 - 60 % B, in 10 min 60 - 90 % B, 9 min 90 % B bei 60 °C.

Die *MALDI-TOF-Massenspektrometrie-Untersuchungen* wurden im negativen Messmodus an einem Bruker BIFLEX III – Spektrometer durchgeführt. Als Matrix wurde ein 1:1-Gemisch von 6-Aza-thiothymin in Acetonitril und 0,1 M Diammoniumhydrogencitrat in Wasser verwendet. Die zu untersuchende Probe (1 µl) wurde auf den MALDI-Träger aufgetragen, mit der Matrix vermischt, an der Luft getrocknet und sofort gemessen. Die Genauigkeit der der MALDI-TOF-MS-Untersuchungen mit externer Kalibrierung betrug $\pm 0,1$ % der Molekülionenmasse.

Die *ESI-Massenspektrometrie-Untersuchungen* wurden am Anorganisch-Chemischen Institut an einem Q-Tof Ultima API-Massenspektrometer von Waters (Milford, Massachusetts, USA) durchgeführt.

Für die *NMR-Untersuchungen* wurde ebenfalls am Anorganisch-Chemischen Institut ein Bruker AVANCE II 200 NMR-Spektrometer sowie ein Bruker AVANCE II 400 NMR-Spektrometer verwendet. Die deuterierten Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero (Kastellaun, Deutschland) bezogen. Zur Standardisierung der chemischen Verschiebungen wurden die Restwasserstoffsignale der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard verwendet.

Die *UV/VIS-Experimente* wurden an einem Varian Cary 100 Bio UV/VIS-Spektrophotometer sowie einem Perkin Elmer Lambda Bio durchgeführt. Für die Experimente wurden zur Vermeidung von Metallkontaminationen Kunststoff-UV-Mikroküvetten der Firma Brand (Wertheim, Deutschland) mit Schichtdicke 1 cm verwendet.

Für *Fluoreszenzmessungen* wurde ein Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer mit sowohl Makrokunststoffküvetten der Firma Brand (Wertheim, Deutschland) als auch Ultra-Mikroküvetten (Quarz) der Firma Hellma (Mühlheim, Deutschland) verwendet.

Die eingesetzten Chemikalien wurden von Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Acros (Geel, Belgien) und Sigma Aldrich/Fluka (Deisenhofen, Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Reagenzien zur DNA-Synthese wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland), Prologo Reagents (Hamburg, Deutschland) und Link Technologies (Bellshill Lanarkshire, Schottland) geliefert, wobei *Controlled Pore Glass* (CPG) als Festphasenträger dient. Es handelt sich dabei um einen Glasträger, der mit primären Aminen funktionalisiert wurde. Als CPG-Linker fungiert Succinat.

Die verwendeten unmodifizierten DNA-Oligonucleotide wurden von Metabion (Plannegg-Martinsried, Deutschland) bezogen und waren HPLC-gereinigt. Für alle Synthesen und Experimente wurde Wasser mit HPLC-Reinheit verwendet, alle Lösungen mit Ausnahme der Metallsalz-, Puffer- und Ligand-Lösungen wurden frisch angesetzt. Die Trocknung der Edukte und Produkte wurde bei einem Vakuum von 10^{-2} mbar vorgenommen.

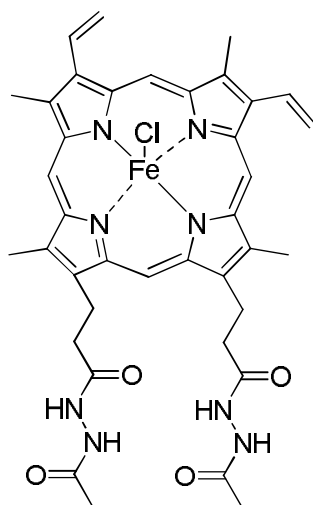
4.2 Synthesen

Die Synthesen von 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)-hexansäure³¹, 4-(Azidomethyl)-benzoesäure⁸⁰ und Bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-adipat⁸¹ sind literaturbekannt und wurden nicht weiter optimiert.

Aus dem Arbeitskreis wurde Zinpyr von Dr. Helga Szelke, THPTA und 2-(-Aminoethyl)-7-ethynyl-3a,6-dihydro-1H-benzo[*de*]isochinolin-1,3(2*H*)-dion von Dr. Elmar Jentzsch zur Verfügung gestellt.

Die im Folgenden beschriebenen Synthesen von 3-Bromphenanthrolin, CP und CPCOOH sind literaturbekannt, die Produkte konnten jedoch nicht erhalten werden. Daher wurden die Synthesen und Aufarbeitungen optimiert.

4.2.1 Hämin-di(N,N'-acetylhydrazid)⁸²



Summenformel: $C_{38}H_{40}ClFeN_8O_4$
Molmasse: 764,07

Diese Synthese ist literaturbekannt, wurde aber weiterentwickelt.

Die gesamte Synthese einschließlich Aufarbeitung sollte möglichst lichtgeschützt stattfinden und die Temperatur 25 °C nicht überschreiten. Es wurde unter Argonatmosphäre gearbeitet.

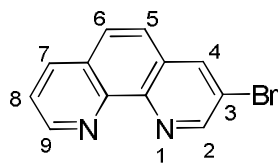
0,19 g Hämin (0,29 mmol) und 0,18 g (2,39 mmol) Acetylhydrazid werden in 10 ml absolutem DMF gelöst. Nach Zugabe von 0,25 g EDAC (1,32 mmol) in 13 ml absolutem DMF wird über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird mit etwas MeOH/ $CHCl_3$ 3:7 verdünnt und mit demselben Eluent säulenchromatographisch (SiO_2) gereinigt. Es wird nur das erste Drittel der Produktbande verwendet, da im Weiteren erste Spuren unumgesetzten Hämins enthalten sind. Das Produkt wird unter Eiskühlung am Vakuum getrocknet.

Habitus: brauner Feststoff

Ausbeute: 0,19 g (0,25 mmol, 85 %)

MS (ESI): $m/z = 728,30 [M+H]^+$; ber. 728,25.

4.2.2 3-Bromphenanthrolin^{83,84}



Summenformel: $C_{12}H_7BrN_2$
Molmasse: 259,10 g/mol

5,00 g Phenanthrolin (21,30 mmol) werden in Nitrobenzol (10 ml) suspendiert und auf 130 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur tropft man 1,65 ml Brom in 4,6 ml Nitrobenzol (32,00 mmol) in 45 Minuten zu. Nach 3 h Rühren bei 115 °C und Abkühlen auf Raumtemperatur werden 40 ml konz. Ammoniak zugegeben und die wässrige Phase mit 60 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 60 ml Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Die erhaltene braune, ölige Flüssigkeit wird säulenchromatographisch (SiO_2) aufgereinigt. Zunächst wird mit DCM das verbliebene Nitrobenzol eluiert, anschließend mit DCM mit 0,6 % MeOH das Produkt. Man erhält 2,03 g eines Gemisches aus Brom- und Dibromophenanthrolin, aus welchem der Gehalt an 3-Bromphenanthrolin NMR-spektroskopisch ermittelt wird. Dazu werden ca. 20 mg Mischprodukt und 5,2 μ l (0,10 mmol) Acetonitril als interner Standard analysiert. Aus den Integralen des Signals des Acetonitrils (Signal wird auf drei normiert) und dem Durchschnitt der Signale bei 7,79 - 7,81 und 8,23 - 8,26 ppm wird der Anteil an 3-Bromphenanthrolin im Mischprodukt errechnet:

$$\frac{\text{Integral}(Br-phen) \times 0,1 \text{ mmol}}{m(\text{Einwaage NMR})} \times m(\text{Mischprodukt}) = n(Br-phen)$$

Die 2,03 g Mischprodukt werden in DCM (32 ml) gelöst und auf -15 °C gekühlt. Es werden 0,9 Äquivalente 1 M HCl in Ether zugegeben und das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt, um 3-Bromphenanthrolin selektiv zu fällen. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, in Wasser aufgenommen, mit 1,5 Äquivalenten 2 M Natronlauge neutralisiert, mit Chloroform extrahiert und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Vakuum entfernt.

Habitus: weißer Feststoff

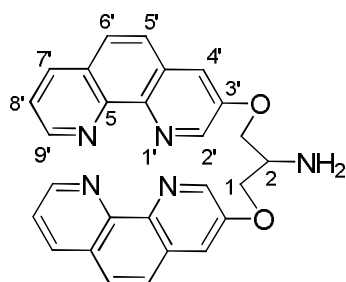
Ausbeute: 1,19 g (4,59 mmol, 22 %)

MS (ESI): $m/z = 259,02$ $[M+H]^+$; ber. 258,99.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 399,89 MHz):

δ (ppm) = 7,64 – 7,67 (dd, 1H, H8, $^3J = 8,4$ Hz; $^3J = 4,4$ Hz); 7,68 – 7,70 (d, 1H, H6, $^3J = 8,8$ Hz); 7,79 – 7,81 (d, 1H, H5, $^3J = 8,8$ Hz); 8,24 – 8,27 (dd, 1H, H7, $^3J = 8,0$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz); 8,36 – 8,37 (d, 1H, H4, $^4J = 2,0$ Hz); 9,15 – 9,16 (d, 1H, H2, $^4J = 2,4$ Hz); 9,1 – 9,20 (dd, 1H, H9 $^3J = 4,0$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz).

4.2.3 1,3-Bis(1,10-phenanthrolin-3-yloxy)propan-2-amin (CP)⁸⁵



Summenformel: $C_{27}H_{21}N_5O_2$
Molmasse: 447,49 g/mol

Die Reaktion wird unter Argonatmosphäre durchgeführt. 0,84 g Serinol (0,92 mmol) werden 1 h am Vakuum getrocknet und anschließend in wasserfreiem DMF (6 ml) gelöst. Die Reaktionsmischung wird auf 50 °C erhitzt, 0,22 g Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 5,55 mmol) zugegeben und 1 h gerührt. In einem weiteren Kolben werden 0,6 g 3-Bromphenanthrolin (2,31 mmol) in trockenem DMF (4 ml) gelöst und auf 50 °C erhitzt. Die Serinolatlösung wird mit Hilfe einer Teflonkanüle in einen Tropftrichter überführt und dem 3-Bromphenanthrolin in ca. 20 min zugetropft. Nach 24 h Rühren bei 50 °C unter Lichtausschluss und Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit etwas Wasser und Ethanol überschüssiges Natriumhydrid zerstört. Die wässrige Phase wird mit Chloroform (170 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen am Vakuum vollständig getrocknet. Das Rohprodukt wird in Chloroform (60 ml) gelöst und das Produkt durch Zugabe von Hexan (ca. 3,7 - 4,0-facher Überschuss, Menge variiert) gefällt. Die Kontrolle der Fällung erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Eluent: Chloroform mit 5 % Methanol und 0,5 % konz. Ammoniak) aufgereinigt und am Vakuum getrocknet.

Habitus: braungelber Feststoff

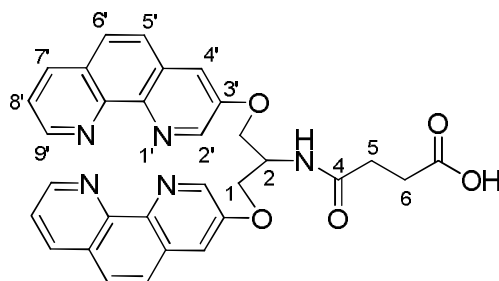
Ausbeute: 0,12 g (0,26 mmol, 28 %)

MS (ESI): $m/z = 448,20 [M+H]^+$; ber. 448,18.
 $m/z = 224,59 [M+2H]^{2+}$; ber. 224,60.

¹H-NMR (MeOD, 199,92 MHz):

δ (ppm) = 3,68 (qi, $^3J = 5,4$ Hz, 1H, H2); 4,27 – 4,41 (m, 4H, H1); 7,55 (dd, $^3J = 8,0$ Hz; $^4J = 4,4$ Hz, 2H, H7'); 7,59 (d, $^4J = 4,4$ Hz, 2H, H4'); 7,72 (d, $^3J = 2,8$ Hz, 4H, H5', H6'); 8,21 (dd, $^3J = 8,0$ Hz; $^4J = 1,6$ Hz, 2H, H8'); 8,76 (d, $^4J = 2,8$ Hz, 2H, H2'); 8,93 (dd, $^3J = 4,4$ Hz; $^4J = 1,6$ Hz, 2H, H9').

4.2.4 4-(1,3-Bis(1,10-phenanthrolin-3-yloxy)propan-2-ylamino)-4-oxobutansäure (CPCOOH)⁸⁶



Summenformel: C₃₁H₂₅N₅O₅
Molmasse: 547,56 g/mol

0,36 g CP (0,08 mmol) werden in 10 ml CHCl₃ gelöst und 0,22 g Succinanhydrid (0,22 mmol) zugegeben. Nach 1 h Rückflusskochen und Abkühlen wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 21 ml heißem MeOH aufgenommen und Verunreinigungen bei -32 °C ausgefällt. Es wird eingengt, das Produkt in wenig MeOH aufgenommen, mit 20-fachem Überschuss Et₂O gefällt und am Vakuum getrocknet.

Habitus: braungelber Feststoff

Ausbeute: 0,03 g (0,52 mmol, 66 %)

MS (ESI): m/z = 547,20 [M+H]⁺; ber. 547,19.

¹H-NMR (MeOD, 199,92 MHz):

δ (ppm) = 2,65-2,69 (m, 4H, H5, H6); 4,46 – 4,54 (m, 4H, H1); 4,83 (qi, ³J = 5,4 Hz, 1H, H2); 7,70 (dd, ³J = 8,0 Hz; ⁴J = 4,6 Hz, 2H, H7'); 7,76 (d, ⁴J = 4,4 Hz, 2H, H4'); 7,84 (d, ³J = 2,6 Hz, 4H, H5', H6'); 8,41 (dd, ³J = 8,2 Hz; ⁴J = 1,2 Hz, 2H, H8'); 8,76 (d, ⁴J = 2,8 Hz, 2H, H2'); 8,94 (dd, ³J = 4,6 Hz; ⁴J = 1,2 Hz, 2H, H9').

4.3 DNA-Synthesen

Die Synthese der DNA-Sequenzen erfolgt nach dem DMT-Standard-Protokoll für 1 μmol DNA-Ansätze an (Bz)dG-CPG- bzw. 3'-Amino-Modifier-C7-CPG-Festphasen in Anlehnung an etablierte Protokolle.¹⁸ Die Kopplungsreaktionen werden in 3 ml-Plastikspritzen mit Frittenboden durchgeführt, in denen die Festphase vorgelegt und die Reaktionslösung durch Aufziehen zugefügt wird. Reinigung und Abspaltung vom polymeren Träger werden ebenso in der Filterspritze durchgeführt. Es wurden Plastikspatel verwendet, um Kontamination mit Metallionen zu vermeiden.

4.3.1 Synthese der Bisterpyridin-DNA-Konjugate

(i) Abspaltung von Fmoc-Schutzgruppen

Im Arbeitskreis Krämer hat es sich bewährt, eine bereits mit einem Aminolinker versehene Festphase (*3'-Aminomodifier C7 CPG 1000*) für die Synthese 3'-modifizierter DNAs zu verwenden. Diese wird eingewogen, 1 ml Deblock-Lösung (Piperidin : DMF = 1 : 4) zugegeben und 20 min bei RT geschüttelt. Die Lösung wird verworfen, die Festphase mit DMF (10 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml), Wasser (3 x 1 ml) und erneut Acetonitril (3 x 1 ml) gewaschen. Danach wird im Vakuum getrocknet.

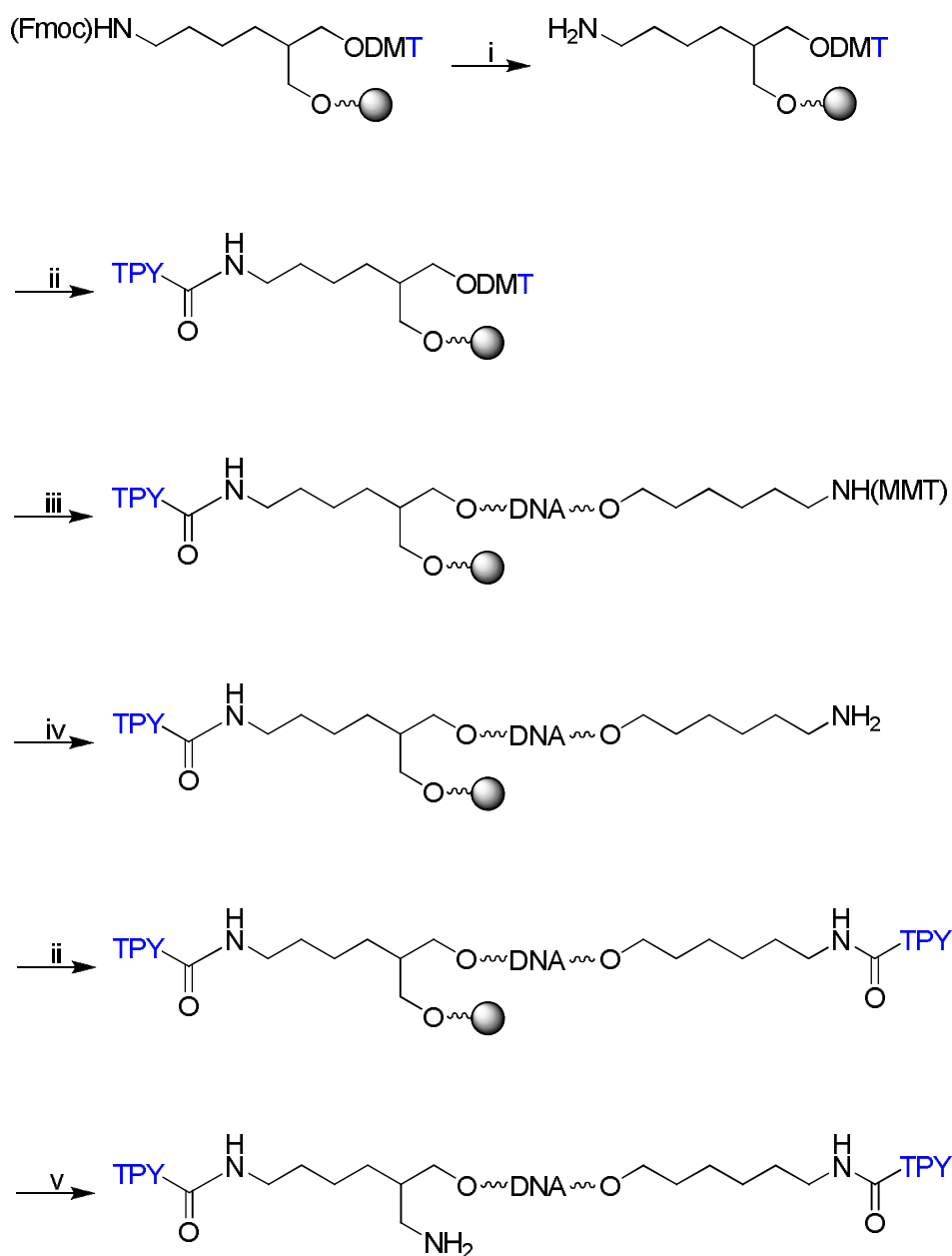
(ii) Kopplung mit TPY-COOH

TPYCOOH (55 Äq.), HOBt (55 Äq.) und HBTU (49,5 Äq.) werden vor der Reaktion 1 h im Vakuum getrocknet und dann in 0,55 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 20 μl DIEA wird die Lösung sofort zur Festphase gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Es wird mit DMF (3 x 1 ml) und Acetonitril (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Nach der Kopplung des zweiten TPYCOOHs wird zur Reaktionskontrolle ein MALDI-TOF-Massenspektrum aufgenommen. Dafür wird eine Probe der Festphase entnommen und 1 h bei 55 °C mit 20 μl konz. Ammoniak geschüttelt. Nach dem Abdampfen des Ammoniaks ist die Probe bereit zur Messung.

(iii) DNA-Synthese

Für die DNA-Synthese wird die Festphase in eine DNA-Säule überführt. Das 5'-Ende wird mit einem käuflichen Aminolinker (5'-MMT-Aminomodifizier C6-CE Phosphoramidit) modifiziert. Nach der DNA-Synthese wird mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Danach wird zur Reaktionskontrolle ein MALDI-TOF-Massenspektrum aufgenommen.



- i: Piperidin
 ii: TPYCOOH, HOBt, HBTU, DIEA
 iii: DNA-Synthese
 iv: TCA
 v: konz. NH_3

Abb. 54: 3',5'-Festphasensynthese bisterpyridin-modifizierter DNAs.

(iv) Abspaltung von MMT-Schutzgruppen

Nach Überführung in eine Spritze wird zur Festphase mit DNA 1 ml DNA-Deblock-Lösung (~ 1 % TCA in DCM) gegeben. Nach 10 s kräftigem Schütteln wird die tiefgelbe Lösung verworfen und diese Prozedur so lange wiederholt, bis die Lösung farblos bleibt. Danach wird mit DCM (3 x 1 ml), DMF (3 x 1 ml) und Acetonitril (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

(v) Abspaltung von der Festphase

Zur Abspaltung wird das festphasengebundene DNA-Konjugat 24 h bei RT in 1 ml konzentriertem Ammoniak geschüttelt. Die Festphase wird abfiltriert und mit Wasser (3 x 1 ml) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden lyophilisiert und in 300 µl Wasser gelöst.

Die Aufarbeitung erfolgt durch HPLC, die erhaltenen Fraktionen werden MALDI-TOF-massenspektrometrisch untersucht, die sauberen Produktfraktionen lyophilisiert, vereinigt und in 200 µl Wasser gelöst. Die Aufbewahrung erfolgt bei -32 °C.

Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der in Wasser gelösten DNA-Konjugate wird UV/VIS-Spektrophotometrie genutzt. Zur groben Konzentrationsbestimmung wird die Absorption der Nucleobasen bei 260 nm bestimmt. Der genaue Wert wird dann durch eine Titration mit Cu^{II} erhalten. Cu^{II}-Komplexe mit dem Konjugat zeigen eine charakteristische Absorptionsbande bei 323 nm, welche am Äquivalenzpunkt ein Maximum aufweist.

Eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung bietet eine Cu^{II}-Titration bei gleichzeitiger Anwesenheit des Zinpyr-Liganden. Dessen Fluoreszenz wird durch Komplexierung von Cu^{II} gelöscht. Zutitriertes Cu^{II} wird bis zum Äquivalenzpunkt ausschließlich von bisterpyridin-modifizierter DNA komplexiert und führt nicht zur Löschung.

Es wurden fünf bisterpyridin-modifizierte DNAs synthetisiert. Selbstkomplementarität in den DNA-Sequenzen wurde bewusst vermieden. Die einzige Ausnahme hierbei ist das 28mer, welches eine Hairpin-Struktur mit einem Stamm aus vier Basenpaaren besitzt.

DNA1	20mer	$C_{250}H_{315}N_{84}O_{126}P_{21}$
	Ausbeute:	3,5 %
	HPLC:	$t_R = 36,6$ min
	MS (MALDI-TOF): [M-H] ⁻ :	gef. 7156; ber. 7163
DNA2	15mer	$C_{201}H_{253}N_{67}O_{95}P_{16}$
	Ausbeute:	0,7 %
	HPLC:	$t_R = 34,2$ min
	MS (MALDI-TOF): [M-H] ⁻ :	gef. 5621; ber. 5624
DNA3	25mer	$C_{296}H_{376}N_{98}O_{157}P_{26}$
	Ausbeute:	2,5 %
	HPLC:	$t_R = 38,4$ min
	MS (MALDI-TOF): [M-H] ⁻ :	gef. 8613; ber. 8618
DNA4	28mer	$C_{326}H_{411}N_{116}O_{174}P_{29}$
	Ausbeute:	0,3 %
	HPLC:	$t_R = 38,2$ min
	MS (MALDI-TOF): [M-H] ⁻ :	gef. 9622; ber. 9631
DNA5	20mer	$C_{248}H_{315}N_{80}O_{130}P_{21}$
	Ausbeute:	1,7 %
	HPLC:	$t_R = 36,8$ min
	MS (MALDI-TOF): [M-H] ⁻ :	gef. 7143; ber. 7147

4.3.2 Synthese der CP-DNA-Konjugate

(i) DNA-Synthese

Für die DNA-Synthese wird eine (Bz)dG-CPG-Festphase verwendet. Das 5'-Ende wird mit einem käuflichen Aminolinker (5'-MMT-Aminomodifizier C6-CE Phosphoramidit) modifiziert. Nach der DNA-Synthese wird mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Danach wird zur Reaktionskontrolle ein MALDI-TOF-Massenspektrum aufgenommen.

(ii) Abspaltung von MMT-Schutzgruppen

Nach Überführung in eine Spritze wird zur Festphase mit DNA 1 ml DNA-Deblock-Lösung (~ 1 % TCA in DCM) gegeben. Nach 10 s kräftigem Schütteln wird die tiefgelbe Lösung verworfen und diese Prozedur so lange wiederholt, bis die Lösung farblos bleibt. Danach wird mit DCM (3 x 1 ml), DMF (3 x 1 ml) und Acetonitril (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

(iii) Kopplung von Carbonsäuren

CP_nCOOH (30 Äq.), HOBt (30 Äq.) und HBTU (27 Äq.) werden vor der Reaktion 1 h im Vakuum getrocknet und dann in 0,3 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 11 µl DIEA wird die Lösung sofort zur Festphase gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Es wird mit DMF (3 x 1 ml) und Acetonitril (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Danach wird als Reaktionskontrolle ein MALDI-TOF-Massenspektrum aufgenommen. Dafür wird eine Probe der Festphase entnommen und 1 h bei 55 °C mit 20 µl konz. Ammoniak geschüttelt. Nach dem Abdampfen des Ammoniaks ist die Probe bereit zur Messung.

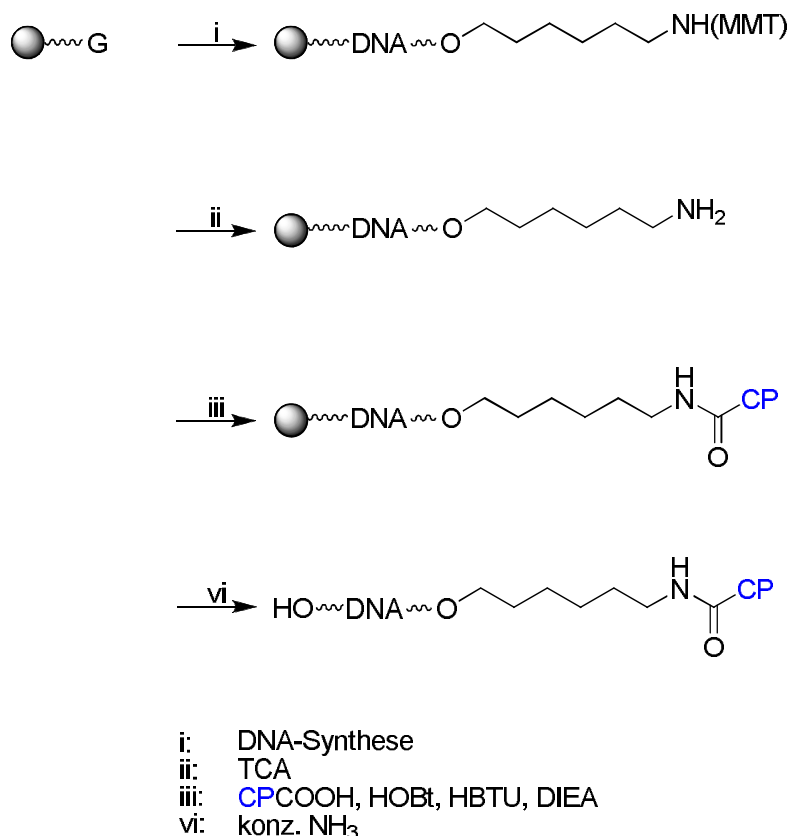


Abb. 55: 3',5'-Festphasensynthese CP-modifizierter DNAs.

(iv) Abspaltung von der Festphase

Zur Abspaltung wird das festphasengebundene DNA-Konjugat 24 h bei RT in 1 ml konzentriertem Ammoniak geschüttelt. Die Festphase wird abfiltriert und mit Wasser (3 x 1 ml) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden lyophilisiert und in 300 µl Wasser gelöst.

Die Aufarbeitung erfolgt durch HPLC, die erhaltenen Fraktionen werden MALDI-TOF-massenspektrometrisch untersucht. Die sauberen Produktfraktionen lyophilisiert, vereinigt und in 200 µl Wasser gelöst. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20 °C.

Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung des in Wasser gelösten DNA-Konjugats wird UV/VIS-Spektrophotometrie genutzt und die Absorption der Nucleobasen bei 260 nm bestimmt. Dabei verfälschen die Absorptionsmaxima bei 240 nm und 272 nm von CP das Ergebnis, sodass ein Korrekturfaktor eingeführt werden muss. Es wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 40 000 M⁻¹ cm⁻¹ abgeschätzt, welcher sich später in Titrationsexperimenten mit komplementärer TMR-DNA und Cu^{II} bestätigte. CP-DNA und Cu^{II} in äquimolarer Menge führen zu einer Fluoreszenzlöschung des TMR-Farbstoffes.

CP-DNA	22mer	C ₂₅₂ H ₃₀₂ N ₁₀₆ O ₁₂₇ P ₂₂
	Ausbeute:	4,0 %
	HPLC:	t _R = 18,1 min
	MS (MALDI-TOF):	[M-H] ⁻ : gef. 7522; ber. 7527

4.4 Experimente zum DNA-Nachweis mit bisterpyridin-modifizierten Oligonucleotiden

Um eine Metallkontamination weitgehend zu vermeiden, wurden alle verwendeten Lösungen in Plastikgefäßen aufbewahrt und zur Reaktion gebracht. Zum Einwiegen wurden ausschließlich Plastikspatel, zum Ansetzen der Lösungen nur Wasser und Reagentien von *TraceSelectUltra*-Qualität (TSU) verwendet. Die Pufferlösungen wurden in Falcon-Tubes eingestellt und aufbewahrt.

4.4.1 Untersuchungen zur Stabilität von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{M}^{\text{II}}$

Konkurrenzkinetiken von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{M}^{\text{II}}$ mit TPEN

Die Experimente wurden in Plastikmikroküvetten in einem Volumen von 70 μl durchgeführt. Um durch Material oder Gerät verursachte Schwankungen ausgleichen zu können, wurde nicht eine einzelne Wellenlänge, sondern stets ein weiter Bereich gemessen. Das ermöglicht eine Angleichung der Graphen bei einer Wellenlänge ohne Absorption weitab der zu verfolgenden Bande.

Die zu untersuchende bisterpyridin-modifizierte DNA (**DNA1-5**) wird 5 μM mit 10 mM MOPS-Puffer (pH 7,0), 100 mM NaCl und 5 μM Cu^{II} oder Zn^{II} vorgelegt. Nach der Bestimmung der Ausgangsabsorption der $(\text{TPY})_2\text{M}$ -Bande (Cu^{II} : 320 nm, Zn^{II} : 323 nm) wird TPEN zugegeben und die Änderung der Absorption über die Zeit verfolgt.

Bei Messungen zur Bestimmung der kinetischen Stabilität von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{M}^{\text{II}}$ wird ein 20-facher Überschuss TPEN (100 μM) verwendet, um so eine Reaktion pseudo-1.-Ordnung zu gewährleisten.

Soll die thermodynamische Stabilität bestimmt werden, so gibt man eine TPEN-Konzentration von 5 – 15 μM zu und verfolgt die Gleichgewichtseinstellung. Die Absorption der $(\text{TPY})_2\text{M}$ -Bande erreicht dabei einen Wert, welcher sich mit der Zeit nicht mehr ändert, aber deutlich über dem Hintergrund liegt. Die benötigte TPEN-Konzentration muss jeweils experimentell ermittelt werden.

4.4.2 DNA-Nachweis mit Zinpyr

In einem Eppendorf-Gefäß wird die zu untersuchende bisterpyridin-modifizierte DNA (**DNA1-5**) 1 μM mit 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0), 100 mM NaCl und 1 μM Cu^{II} oder Zn^{II} vorgelegt. Nach Zugabe von 1 μM Target-DNA wird 30 min bei 40 °C geschüttelt, danach 1 ml der Lösung in eine Plastikmakroküvette überführt, 1 μM Zinpyr zugegeben und die Intensität der Fluoreszenzbande bei 529 nm gemessen. Die Anregungswellenlänge liegt bei 504 nm, die Küvette wird 9 mm angehoben. Alternativ kann das Experiment auch direkt in der Küvette durchgeführt werden. Hierbei legt man die zu untersuchende bisterpyridin-modifizierte DNA (**DNA1-5**) 1 μM mit 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0), 100 mM NaCl, 1 μM Cu^{II} oder Zn^{II} und 1 μM Zinpyr vor und misst die Fluoreszenz. Danach wird 1 μM Target-DNA zugefügt, 5 min auf 60 °C geheizt und erneut gemessen.

4.4.3 DNA-Nachweis durch Click-Reaktion

Sämtliche Vorversuche wurden in Plastikmakroküvetten in einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Zur Messung müssen diese 9 mm im Gerät angehoben werden, da das Volumen sonst nicht im Anregungsstrahl liegt. Bei den Experimenten zum DNA-Nachweis wurden aufgrund des verringerten Volumens 100 μl -Quarzküvetten verwendet.

Vor dem Experiment wird eine Lösung vorbereitet, die 20 μl 10 mM 4-(Azidomethyl)-benzoesäure, 20 μl 10 mM 2-(-Aminoethyl)-7-ethynyl-3a,6-dihydro-1H-benzo[*de*]isochinolin-1,3(2*H*)-dion, 5 μl 100 mM Natriumascorbat und 5 μl 15 mM THPTA enthält.

In einem Eppendorf-Gefäß werden 5,5 μM Target-DNA und 5 μM [(TPY)₂DNACu^{II}] mit 22 mM Tris-Puffer und 222 mM NaCl bei einem Gesamtvolumen von 90 μl 2 min bei 90 °C, dann während einer 30-minütigen Abkühlphase auf 20 °C geschüttelt. Anschließend gibt man 10 μl der vorbereiteten Lösung hinzu, sodass das Reaktionsgemisch 0,2 M NaCl, 1 mM Natriumascorbat, 50 μM THPTA und je 400 μM an Substraten enthält. Nach 90 min Schütteln bei 25 °C wird das Gesamtvolumen von

100 µl komplett in eine Quarzküvette überführt und die Fluoreszenz gemessen. Die Anregungswellenlänge beträgt 340 nm (Slit 5 nm), das Emissionsmaximum liegt bei 460 nm (Slit 10 nm).

4.4.4 DNA-Nachweis unter Nutzung des HRP-Assays

Verwendete Stammlösungen:

0,1 M Tris-Puffer (pH 7,5):

6,05 g Tris-(hydroxymethyl)-methylamin werden in 500 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M HCl auf pH 7,5 eingestellt.

0,2 M Kalium-Citrat-Puffer (pH 4,0):

21,01 g Citronensäure-Monohydrat werden in 500 ml Wasser und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf pH 4,0 eingestellt.

Hämin-di(*N,N'*-diacetylhydrazid):

5,0 mg werden in 1 ml DMF (abs.) gelöst. Man erhält eine 6,5 mM Stammlösung.

Apo-HRP:

1,0 mg wird in 500 µl Puffer A gelöst und ergibt eine 50 µM Stammlösung.

HRP (Typ VI a):

1,8 mg werden in 1ml Puffer A gelöst und ergeben eine 45 µM Stammlösung.

TMB:

7,0 mg werden in 1 ml Wasser gelöst. Man erhält eine 22,3 mM Stammlösung.

EDTA (Tetranatrium-Tetrahydrat):

0,02 g werden in 1ml Wasser (HPLC-rein) gelöst. Man erhält eine 44,2 mM Stammlösung.

H₂O₂ (1/500):

20 µl 30 %ige H₂O₂-Lsg. werden mit 10 ml Wasser verdünnt. Man erhält eine 19,4 mM Stammlösung.

H₂O₂ (0,3%):

100 µl 30%ige H₂O₂-Lsg. werden mit 10 ml Wasser verdünnt. Man erhält eine 97 mM Stammlösung.

BPY:

19,3 mg BPY-Hydrochlorid in 10 ml Wasser gelöst ergeben eine 10 mM Stammlösung, aus der man durch 100-fache Verdünnung die benötigte 100 µM BPY-Lösung erhält.

NaCl:

Es wurde eine 5 M kommerzielle Lösung von *Ultra*-Qualität verwendet.

Frisch anzusetzende Lösungen:**Natriumascorbat:**

19,8 mg in 10 ml Wasser gelöst ergeben eine 10 mM Stammlösung.

Lösung A:

500 µl Tris-Puffer werden mit 20 µl 1:10 verdünnter EDTA-Lösung versetzt.

Lösung B:

1 µl Hämin-di(N,N'-diacetylhydrazid)-Lösung werden mit Tris-Puffer auf 600 µl verdünnt.

Lösung C:

40 µl TMB-Lösung, 26 µl H₂O₂ (0,3 %) und 934 µl Citrat-Puffer werden mit Wasser wahlweise auf 3 ml bzw. 5 ml verdünnt.

Lösung D:

18 µl 1:100 verdünnte Hämin-di(N,N'-diacetylhydrazid)-Lösung, 8,6 µl Apo-HRP, 5 µl Natriumascorbat, 5 µl BPY, 11,3 µl 1:10 000 verdünnte EDTA-Lösung und 2,1 µl Wasser werden zusammenpipettiert.

H₂O₂-Nachweis

Beim Wasserstoffperoxid-Nachweis wurde EDTA zugesetzt, um eventuell in Lösung vorhandene Metalle zu binden.

300 µl Lösung A werden mit 100 µl Lösung B versetzt. Es werden 24 µl NaCl und 8 µl Apo-HRP zugegeben. Diese Lösung enthält 110 µM EDTA, 0,26 M NaCl, 0,86 µM Apo-HRP und 2,33 µM Hämin-di(*N,N'*-diacetylhydrazid). Es werden 95 µl entnommen und mit 5 µl nachzuweisender H₂O₂-Lösung 40 min bei 20 °C inkubiert. Danach wird 1 µl entnommen, in eine Plastikmikroküvette zu 300 µl (bzw. 500 µl) Lösung C gegeben und sofort die Absorption bei 360 nm verfolgt.

DNA-Nachweis

1,1 µM TargetDNA und 1 µM [(TPY)₂DNACu^{II}] werden mit 89 mM Tris-Puffer und 222 mM NaCl bei einem Gesamtvolumen von 90 µl 2 min bei 90 °C, dann während einer 30-minütigen Abkühlphase auf 20 °C geschüttelt. Dann gibt man 10 µl Lösung D hinzu, sodass das Reaktionsgemisch 100 nM EDTA, 0,2 M NaCl, 100 µM Natriumascorbat, 1 µM BPY, 0,86 µM Apo-HRP und 2,34 µM Hämin-di(*N,N'*-diacetylhydrazid) enthält. Nach 100 min Inkubation bei 20 °C wird 1 µl in eine Plastikmikroküvette zu 300 µl Lösung C gegeben und sofort die Absorption bei 360 nm verfolgt.

4.5 Experimente mit CP und CP-DNA-Konjugaten

4.5.1 Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon

Zum Zeitpunkt der Durchführung der im Folgenden beschriebenen Experimente war CP noch nicht in einem ausreichend hohen Reinheitsgrad verfügbar, um direkt Stammlösungen daraus anzusetzen. Daher wurden die verwendeten CPCu^{II}-Lösungen durch Extraktion aus einer organischen Phase gewonnen:

CP wird in einer Konzentration von 5 mM in Chloroform gelöst und mit einer 2 mM Cu^{II}-Lösung überschichtet. Nach 120 min Schütteln bei RT wird die wässrige Phase isoliert und deren Konzentration an CPCu^{II} durch Bestimmung der Absorption bei

280 nm ($\epsilon = 41\,100\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) spektrophotometrisch geprüft. Man erhält eine 2 mM Stammlösung.

Die Experimente wurden in Eppendorf-Gefäßen in einem Volumen von 1 ml, die Messungen in Plastikmikroküvetten in einem Volumen von 100 μl oder 500 μl durchgeführt.

Als Katalysatoren wurden CPCu^{II} , $(\text{PHEN})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ sowie Cu^{II} verwendet, als Kontrollexperiment wurden alle Experimente zusätzlich ohne Katalysator durchgeführt.

Es wurde sowohl bei pH 7 (MOPS-Puffer) als auch bei pH 8 (DHP-Puffer) gearbeitet und das Substrat Hydrochinon im 5- oder 1000-fachen Überschuss bezogen auf den Katalysator eingesetzt.

Experimente mit 5-fachem Überschuss Hydrochinon

Man legt im Eppendorf-Gefäß 1 mM Puffer, 50 μM Hydrochinon und 100 μM H_2O_2 vor. Durch Zugabe von 10 μM Katalysator wird die Reaktion gestartet. Nach bestimmten Zeitabständen wird eine Probe von 50 μl entnommen, mit 50 μl Wasser verdünnt und die Absorption bei 242 nm gemessen. Diese Absorptionsbande ist Benzochinon zuzuordnen und kann direkt zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden ($\epsilon = 24\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

Experimente mit 1000-fachem Überschuss Hydrochinon

Man legt im Eppendorf-Gefäß 20 mM Puffer, 10 mM Hydrochinon und 20 mM H_2O_2 vor. Durch Zugabe von 10 μM Katalysator wird die Reaktion gestartet. Es werden Proben von 10 μl entnommen, mit 490 μl Wasser verdünnt und die Absorption bei 242 nm gemessen.

4.5.2 Bildung und Zerfall des $\text{CPCOOHCu}^{\text{I}}$ -Komplex

In einer Plastikmikroküvette werden 98 μl MeCN, 1 μl 10 mM CPCOOH in DMF vorgelegt. Nach Zugabe von 1 μl 10 mM $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$ in MeCN wird geschüttelt und sofort die Absorption zwischen 300 nm und 600 nm gemessen bzw. der zeitliche Verlauf der Absorption bei 428 nm verfolgt.

Eine 10-fache Verdünnung ermöglicht die Beobachtung der Banden im Absorptionsbereich von 200 nm - 300 nm.

4.5.3 Oxidation von MBA

Die Experimente wurden direkt in Plastikmikroküvetten in einem Volumen von 100 μ l durchgeführt und gemessen. Wässrige Stammlösungen von CPCOOH bzw. MBA wurden unter Verwendung eines Äquivalents bzw. zwei Äquivalenten NaOH hergestellt.

Als Katalysatoren wurden CPCu^{II} und Cu^{II} verwendet, weiterhin wurden alle Experimente auch ohne Katalysator durchgeführt.

In einer Plastikmikroküvette werden 92 μ l Wasser, 5 μ l 200 mM MOPS-Puffer pH 7, 2 μ l 5 M NaCl und 1 μ l 5 mM MBA vorgelegt und die Absorption zwischen 200 nm und 600 nm gemessen. Nach Zugabe von 1 μ l 1 mM Katalysator-Lösung wird sofort der zeitliche Verlauf der Absorptionsbande von MBA bei 303 nm für 10 min verfolgt. Danach wird erneut die Absorption zwischen 200 nm und 600 nm gemessen.

4.5.4 Fluoreszenzlöschung und Regeneration von CP-TMR-dsDNA

Eine Lösung aus 5 μ M CP-DNA, 5 μ M TMR-DNA, 10 mM MOPS und 50 mM NaCl wird 2 min bei 90 °C, dann während einer 30-minütigen Abkühlphase auf 20 °C geschüttelt. 5 μ l dieser Lösung werden in einer Quarzküvette zu 4,75 μ l 200 mM MOPS-Puffer pH 7 und 1,95 μ l 5 M NaCl gegeben und mit Wasser auf 100 μ l verdünnt. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 250 nM CP-TMR-dsDNA, 10 mM MOPS-Puffer und 100 mM NaCl. Nach der Messung der Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 530 nm, Emissionsmaximum 588 nm, Slits 5nm) wird 1 μ l 30 μ M Cu^{II} zugegeben und erneut die Fluoreszenz gemessen. Eine Fluoreszenzlöschung wird ersichtlich.

Zur Regeneration können nun 0,1 – 1 mM EDTA oder 0,1 - 50 mM diverser Reduktionsmittel wie Dithionit, Thiosulfat, Hydrazin oder MBA zugegeben werden. In weiteren Experimenten wurden zusätzlich H_2O_2 als Reoxidationsmittel eingesetzt sowie die beschriebenen Experimente in direkter Folge durchgeführt.

5 Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung des in **Abb. 56** dargestellten Nachweissystems für Nucleinsäuren. Ein zyklischer, intramolekular stabilisierter $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplex stellt dabei einen allosterischen Rezeptor für komplementäre Target-DNA dar. Durch Hybridisierung kommt es zur Destabilisierung der $(\text{TPY})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ -Einheit, so dass Cu^{II} von bestimmten Liganden abgefangen werden und katalytisch aktive Komplexe bilden kann. Durch Verwendung geeigneter Substrate kann ein Fluoreszenzsignal generiert werden. Auch ein System unter Verwendung von $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ und einer enzymatischen Amplifikation ist bekannt.

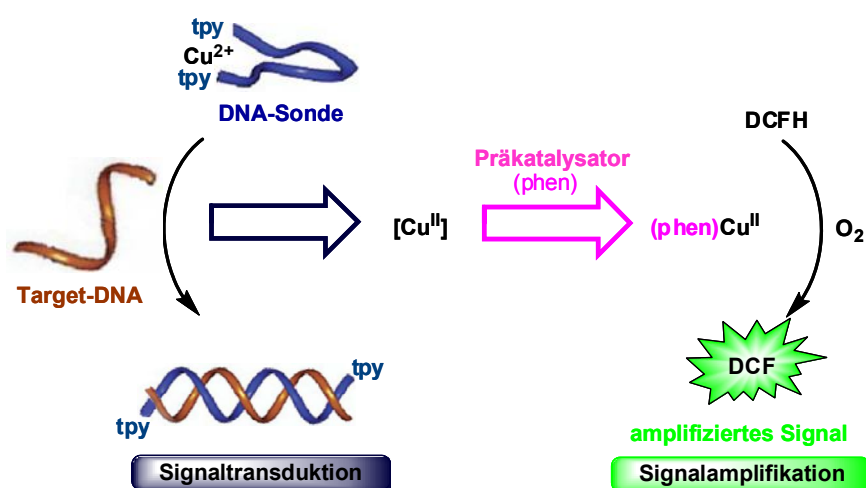


Abb. 56: Nachweis von DNA durch eine chemische Signalkaskade mit Amplifikation.

tpy = 2,2':6',2''-Terpyridin, phen = 1,10-Phenanthrolin,

DCFH = 2',7'-Dichlordihydrofluorescein, DCF = 2',7'-Dichlorfluorescein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die kinetische und thermodynamische Stabilität der DNA-Sonde quantifiziert werden. So wurde gezeigt, dass diese Eigenschaften weitgehend unabhängig von der Primär- und Sekundärstruktur ihrer DNA-Bindungsdomäne sind. Für fünf verschiedene DNAs wurden Dissoziationsraten und Stabilitätskonstanten für $[(\text{TPY})_2\text{DNA}]\text{Zn}^{\text{II}}$ -Komplexe bestimmt. Die Stabilitätskonstanten zeigen mit Werten um $\log K = 15$ eine hohe thermodynamische

Stabilität an, was Voraussetzung für ein geringes Signal/Hintergrund-Verhältnis ist. Hohe Zerfallsraten spiegeln dagegen eine hohe Labilität wider, was bei einem positiven Nachweis zu einer raschen Bildung katalytischer Spezies führen kann, wenn die Zn^{II} -Affinität der Präkatalysatoren hoch genug ist.

Weitere Experimente wurden mit $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$ -Komplexen durchgeführt. Diese weisen eine deutlich höhere thermodynamische Stabilität ($\log K = 20,4$) bei gleichzeitig geringerer kinetischer Stabilität auf, weshalb sie optimale Rezeptoren für das in **Abb. 56** gezeigte Detektionssystem darstellen.

Durch fluorimetrische Untersuchungen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Zinpyr wurde die Öffnung der zyklischen DNA-Strukturen bei Hybridisierung bestätigt. Bei Anwesenheit von Zn^{II} kommt es zu einer Intensitätserhöhung, durch Cu^{II} zu einer Fluoreszenzlöschung. Verglichen mit den freien Ionen bewirkten die DNA-Komplexe nur partielle Effekte, was auf die Bildung gemischter TPY-Zinpyr-Komplexe von Zn^{II} und Cu^{II} hindeutet. Kinetische Untersuchungen mit komplementärer DNA zeigten eine schnelle und vollständige Hybridisierung bei Raumtemperatur in wenigen Minuten an.

Des Weiteren wurde Versuche unternommen, alternative kupferkatalysierte Reaktionen für eine effiziente Signalamplifikation einzusetzen.

Eine fluorogene Click-Reaktion führte erwies sich als ungeeignet, da der für die Katalyse nötige Ligand Tris((1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin (THPTA) nicht in der Lage war, Cu^{II} aus dem nach Hybridisierung vorliegenden $[(TPY)_2DNA]Cu^{II}$ -Komplex zu extrahieren.

Dagegen konnte eine 3-stufige Signalkaskade mit aufeinander folgender chemischer und enzymatischer Katalyse entwickelt werden. Nach Hybridisierung wird ein $BPYCu^{II}$ -Komplex gebildet, der in Gegenwart von Ascorbat katalytisch ein als Hydrazid maskierten Hämin-Cofaktor entschützt. Es kommt dabei zur Rekonstitution des Enzyms Meerrettichperoxidase (HRP). Über eine colorimetrischen TMB-Assay konnten so etwa $1 \mu M$ Target-DNA nachgewiesen werden.

Ein zweiter Aspekt der Arbeit war der Aufbau von DNA-gekoppelten Cu^{II} -Redoxkatalysatoren. Von Interesse sind solche Verbindungen u. a. für einzelmolekülspektroskopische Experimente zur Beobachtung redoxkatalytischer Reaktionen. Dabei wird ein Katalysator-DNA-Konjugat durch Hybridisierung mit einem komplementären Farbstoff-modifizierten Einzelstrang an einer Oberfläche immobilisiert und dann Fluktuationen der Fluoreszenzintensität einzelner Farbstoffmoleküle detektiert (s. **Abb. 57**).

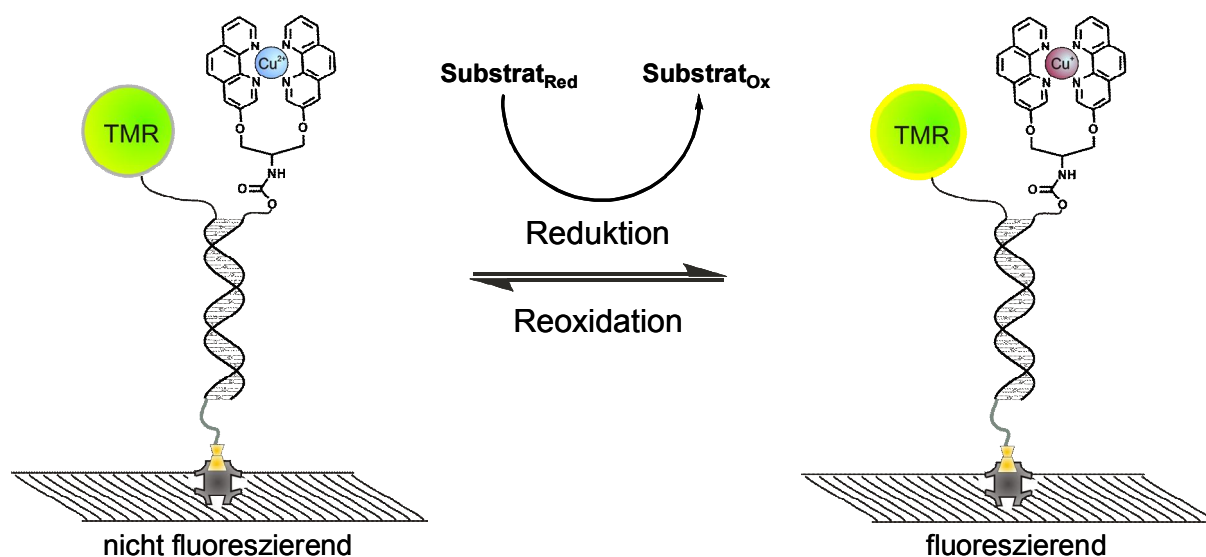


Abb. 57: Prinzip der Fluoreszenzfluktuation einer CPCu^{II} -TMR-modifizierten dsDNA durch Redoxprozesse. TMR = Tetramethylrhodamin.

Der Ligand 3-Clip-phen (CP) konnte synthetisiert, charakterisiert und die katalytische Aktivität seiner Cu^{II} -Komplexe in Ensembleexperimenten untersucht werden. CPCu^{II} -Komplexe sind mit einer Bildungskonstante von $\log K = 13,5$ sehr stabil, was in der Durchführung von Einzelmolekülexperimenten große Vorteile mit sich bringt.

Weiterhin konnte eine katalytische Aktivität bei der Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon mit TONs von 24 und TOFs von $8,6 \text{ min}^{-1}$ beobachtet werden. Die Geschwindigkeit der Reaktion liegt in einem Bereich, der eine Verfolgung in Einzelmolekülexperimenten ermöglichen sollte.

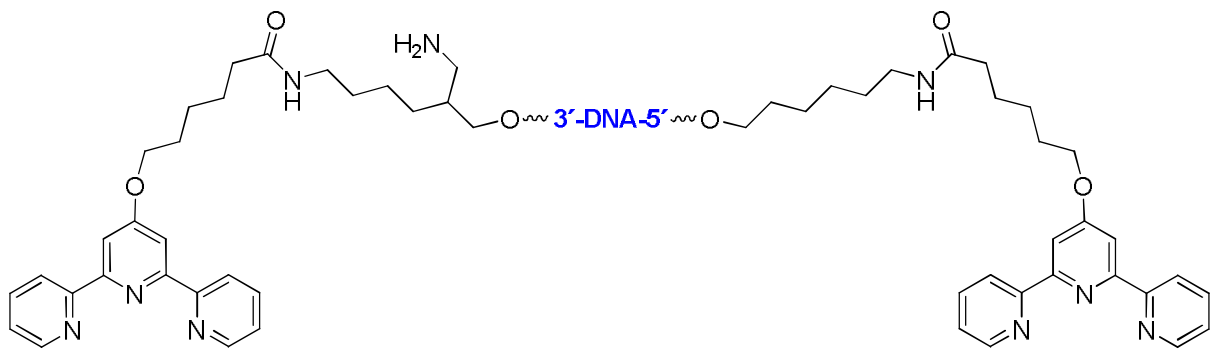
Mit dem Carboxylderivat von CP gelang die Synthese eines CP-modifizierten DNA-Einzelstrangs. Ensembleexperimente mit CP-TMR-dsDNA zeigten eine ca. 90 %ige Löschung der Fluoreszenz durch Cu^{II} -Komplexierung, während es durch Zugabe

von Reduktionsmitteln wieder zu einer Regeneration kommt. Kontrollexperimente lassen vermuten, dass dieser Effekt auf die Reduktion von Cu^{II} zu Cu^{I} am Reaktionszentrum zurückzuführen ist. Dithionit und 4-Mercaptobenzoessäure stellen geeignete Reduktionsmittel dar.

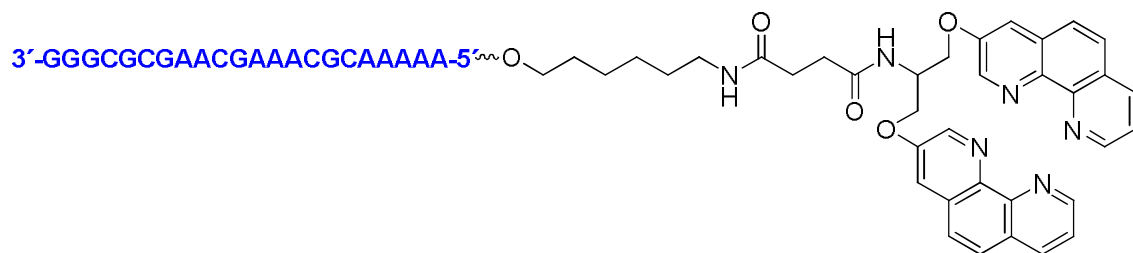
In ersten Einzelmolekülexperimenten, die von der Arbeitsgruppe *Herten* (Bioquant) durchgeführt wurden, konnten Hybride von CP-DNA mit fluoreszenzmarkierter DNA immobilisiert und einzeln beobachtet werden. Eine starke Fluoreszenzlöschung bei Bildung des Cu^{II} -Komplexes wurde auf Einzelmolekülebene bestätigt.

6 Anhang

6.1 Übersicht der modifizierten Oligonucleotide



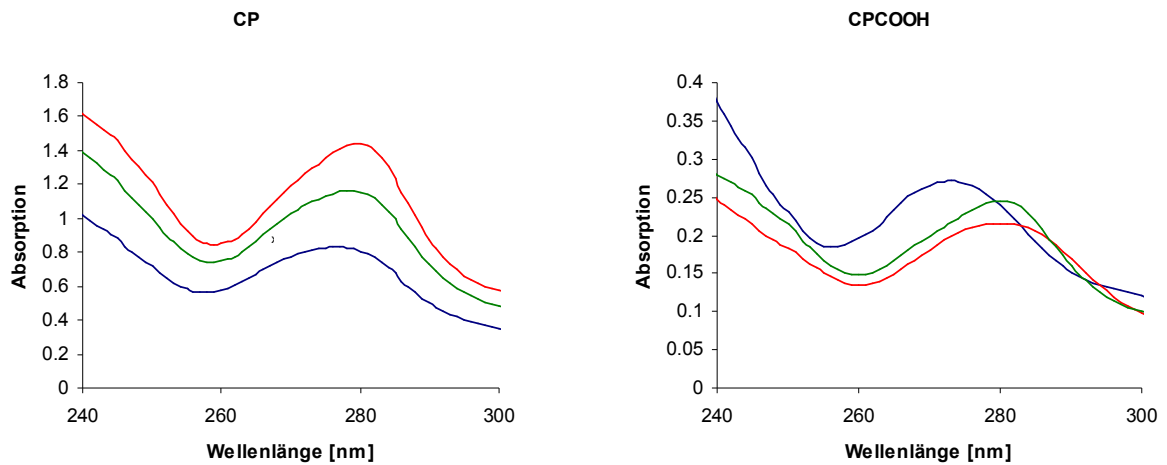
DNA1: 3'-ATCGTTACCAAAGCATCGTA-5'
 DNA2: 3'-TACCAAAGCATCGTA-5'
 DNA3: 3'-CCTCCATCGTTACCAAAGCATCGTA-5'
 DNA4: 3'-GCGCATCGTTACCAAAGCATCGTAGCGC-5'
 DNA5: 3'-TACTGCCAGGCGCTTCTGCA-5'



Sonstige eingesetzte DNAs:

kDNA	5'-TACGATGCTTTGGTAACGAT-3'
mmDNA	5'-TACGATGCTTTGGTAAIGAT-3'
TMR-DNA	5'-CCCGCGCTTGCTTTGCGTTTTT-TMR-3'

6.2 UV/VIS-Spektren zur Stabilitätsbestimmung von CP und CPCOOH

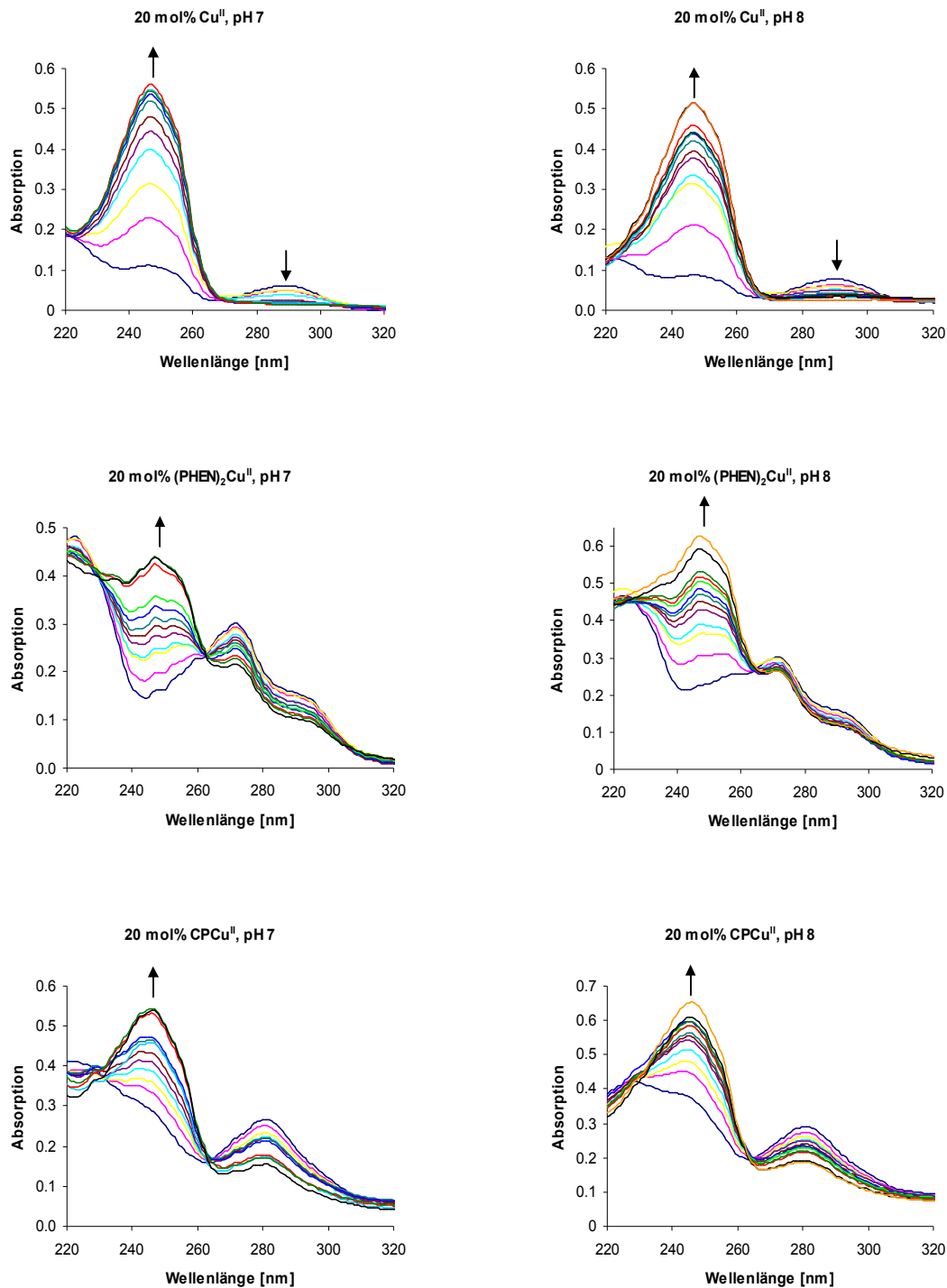


- CPCOOH/CP
- CPCOOH/CP + Cu^{II}
- CPCOOH/CP + Cu^{II} + NTA

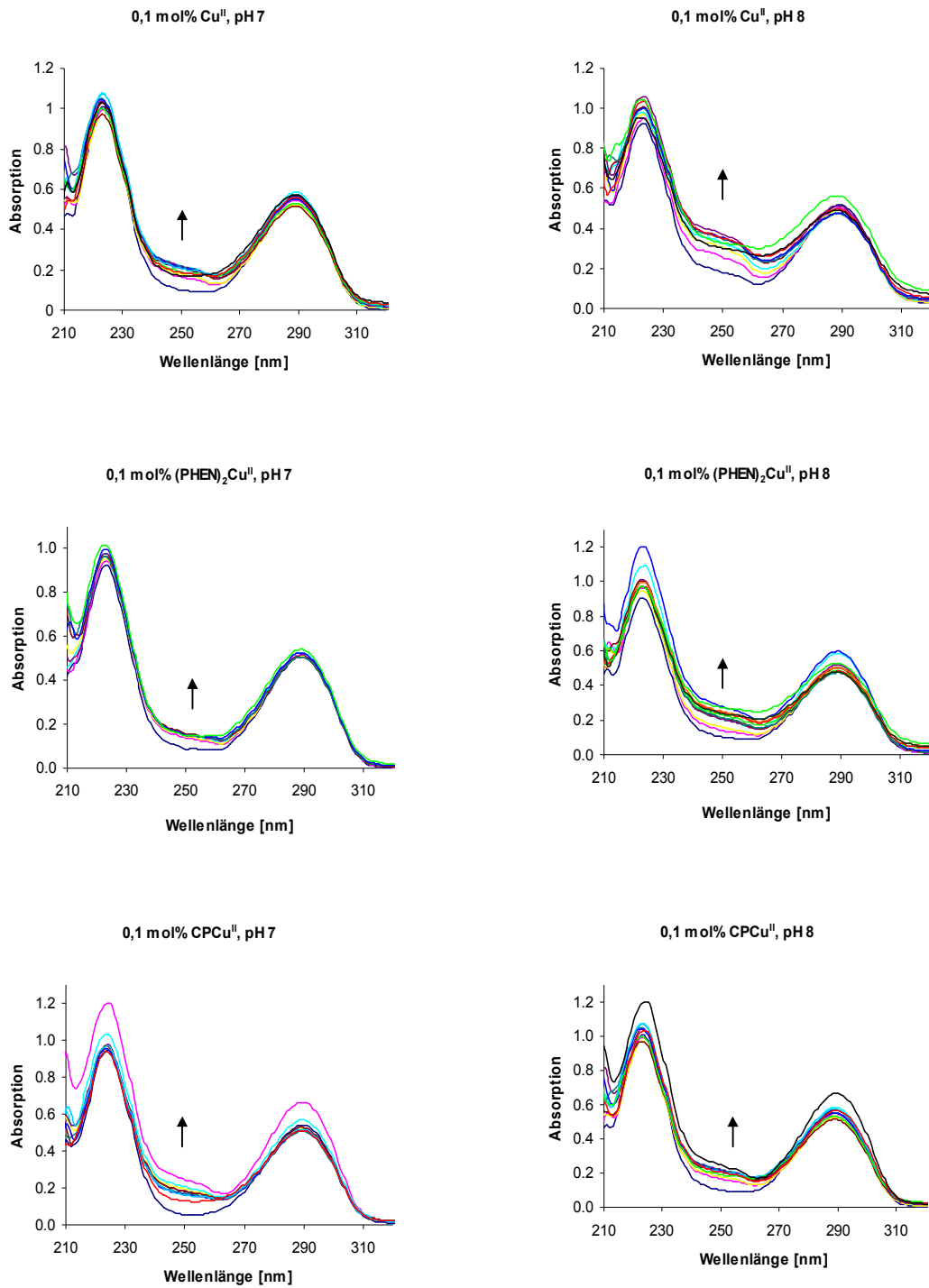
Die Konzentrationen in der Küvette betragen:

10 μ M CPCOOH / 20 μ M CP, 10 μ M / 20 μ M Cu^{II}, 10 μ M / 20 μ M NTA, 250 mM NaCl bei pH 7 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C.

6.3 CP-katalysierte Oxidation von Hydrochinon zu Benzochinon



Die Konzentrationen in der Küvette betragen 25 μM Hydrochinon, 50 μM H_2O_2 und 5 μM Katalysator bei pH 7 (500 μM MOPS-Puffer) bzw. pH 8 (500 μM DHP-Puffer) bei 25 $^\circ\text{C}$.



Die Konzentrationen in der Küvette betragen 200 μM Hydrochinon, 400 μM H₂O₂ und 0,2 μM Katalysator bei pH 7 (400 μM MOPS-Puffer) bzw. pH 8 (400 μM DHP-Puffer) bei 25 °C.

6.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Roland Krämer für die Stellung des äußerst interessanten Themas, die Möglichkeit zur Eigeninitiative und die stets für Fragestellungen oder Diskussionen geöffnete Tür.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreis Krämer danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen fruchtbaren Diskussionen. Auch über das Berufliche hinaus haben wir viele schöne Momente miteinander erlebt, die ich nicht vergessen möchte.

Dr. Andriy Mokhir möchte ich sehr herzlich für die stete Hilfsbereitschaft bei technischen und chemischen Problemen danken.

Claudia Dienemann danke ich für die Synthese der Oligonucleotide und die Aufnahme der ESI-MS-Spektren.

Annemarie Schwarz, Susanne Kohlmaier und Gerrit Rebmann danke ich ganz herzlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen Forschungspraktikanten Johannes Troendlin, Jochen Wagner, Kerstin Zawatzky und Michael Porz danke ich für nahezu immer hervorragend durchgeführte experimentelle Arbeiten.

Dr. Helga Szelke und Dr. Elmar Jentsch danke ich für die bereitgestellten Verbindungen.

Ann-Kathrin Marguerre und Korbinian Müller-Graff danke ich für die unvergessliche Tour durch Neuseeland.

Den Feinmechanikern, Schlossern, Glasbläsern und Elektrikern des chemischen Instituts danke ich recht herzlich für die stets unkomplizierte und schnelle Hilfe bei allerlei Problemen.

Den Turnern im Turnzentrum Heidelberg danke ich für die freundliche Aufnahme und den wichtigen Ausgleich vom Studium und der Doktorarbeit.

Meinen Kommilitonen Fabian, Thomas und Suse möchte ich für die nahezu endlose Unterstützung seit dem ersten Semester unseres Chemiestudiums und weit darüber hinaus danken. Weiterhin danke ich Marie, Erik, Phil und Tina, die mir außerhalb des Studiums und der Doktorarbeit stets zur Seite standen. Ihr habt mir ermöglicht, das Wesentliche im Leben nicht aus den Augen zu verlieren, Eure Freundschaft bedeutet mir sehr viel!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für ihr Verständnis, ihren Rückhalt und ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Doktorarbeit.

7 Literatur

- 1 N. A. Campell, *Biologie*, Spektrum Akad. Verlag, Berlin, **1998**.
- 2 J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- 3 J. A. Robinson, *CHE 172: Organische Chemie für die Biologie*, **2009**,
www.oci.uzh.ch/edu/lectures/material/AC_BII/.
- 4 D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Springer Verlag, Heidelberg, **2001**.
- 5 SciFinder Scholar, American Chemical Society, Washington D.C., **2007**.
- 6 M. Heller, *Annuv. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 129-153.
- 7 Y. S. Lie, C. Petropoulos, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 43-48.
- 8 E. Schopf, Y. Chen, *Anal. Biochem.* **2010**, *397*, 115-117.
- 9 V. V. Didenko, *BioTechniques* **2001**, *31*, 1106-1121.
- 10 H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13980-13986.
- 11 O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.
- 12 S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- 13 C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5495-5499.
- 14 R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16021-16023.
- 15 T. Li, S. Dong, E. Wang, *Chem. Commun.* **2007**, 4209-4211.
- 16 X. Zuo, F. Xia, Y. Xiao, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1816-1818.
- 17 M. Hong, X. Zhou, Z. Lu, J. Zhu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9667-9770.
- 18 N. Graf, M. Göritz, R. Krämer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1-4.
- 19 J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618-8619.
- 20 L. Zapata, K. Bathany, J.-M. Schmittler, S. Moreau, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**,
1022-1028.
- 21 T. Ihara, Y. Takeda, A. Jyo, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1772-1773.
- 22 E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz,
J. Am. Chem. Soc. **2000**, *122*, 10714-10715.
- 23 I. Horsey, Y. Krishnan-Ghosch, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2002**,
1950-1951.
- 24 J. S. Choi, C. W. Kang, K. Jung, J. W. Yang, Y.-G. Kim, H. Han, *J. Am. Chem. Soc.*
2004, *126*, 8606-8607.

- 25 D. Mitra, N. Di Cesare, H. F. Sleiman, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5928-5932;
Angew. Chem. Int. Ed. **2004**, *43*, 5804-5808.
- 26 K. V. Gothelf, A. H. Thomson, M. Nielsen, E. Cló, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1044-1046.
- 27 M. Göritz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18016-18017.
- 28 N. Graf, R. Krämer, *Chem. Commun.* **2006**, 4374-4376.
- 29 G. T. Morgan, F. H. Burstall, *J. Chem. Soc.* **1932**, 20-30.
- 30 M. G. B. Drew, M. J. Hudson, P. B. Iveson, M. L. Russell, J.-O. Liljenzin, M. Skålberg, L. Spjuth, C. Madic, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, *18*, 2973-2980.
- 31 A. Hulanicki, T. Krawczyk, A. Lewenstam, *Anal. Chim. Acta* **1984**, *158*, 343-355.
- 32 P. O'D. Offenhartz, P. George, G. P. Haight Jr., *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 116-118.
- 33 R. B. Martin, J. A. Lissfelt, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 938-940.
- 34 L. Lashgari, M. Kritikos, R. Norrestam, T. Norrby.
Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun. **1999**, *55*, 64-67.
- 35 H. Hofmeier, U. S. Schubert. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 373-399.
- 36 R. Ziessel, *Synthesis* **1999**, *11*, 1839-1865.
- 37 P. Carter, C.-C. Cheng, H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 632-642.
- 38 A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Commun.* **1998**, 1077-1078.
- 39 R. Hogg, R. C. Wilkins, *J. Chem. Soc.* **1962**, 341-350.
- 40 R. H. Holyer, C. D. Hubbard, S. Kettle, R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.* **1966**, *5* (4), 622-625.
- 41 D.-P. Herten, *Chem. unserer Zeit* **2008**, *42*, 192-199.
- 42 P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2698-2728.
- 43 A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer, D.-P. Herten, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3427-3430.
- 44 A. Mokhir, A. Kiel, D.-P. Herten, R. Krämer, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5661-5666.
- 45 K. D. Weston, L. S. Goldner, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 3453-3462.
- 46 J. Huheey, E. Keiter, R. Keiter, *Anorganische Chemie*, de Gruyter, Berlin, **2003**.
- 47 W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner Verlag Stuttgart, **2005**.

- 48 J. R. Hartman, R. W. Vachet, W. Pearson, R. J. Wheat, J. H. Callahan, *Inorg. Chim. Act.* **2003**, 343, 119-132.
- 49 P. Gamez, S. Gupta, J. Reedijk, *C. R. Chimie* **2007**, 10, 295-304.
- 50 P. M. Bush, J. P. Whitehead, C. C. Pink, E. C. Gramm, J. L. Eglin, S. P. Watton, L. E. Pence, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 1871-1877.
- 51 D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 12269-12272.
- 52 B. R. James, R. J. P. Williams, *J. Chem.Soc.* **1961**, 2007-2018.
- 53 L. G. Sillen, A. E. Martell, „*Stability Constants of Metal-ion Complexes*“, The Chemical Society London Publication: Oxford, **1971**.
- 54 M. Pitié, C. Boldron, H. Gornitzka, C. Hemmert, B. Donnadieu, B. Meunier, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 528-540.
- 55 A. Robertazzi, A. V. Vargiu, A. Magistrato, P. Ruggerone, P. Carloni, P. de Hoog, J. Reedijk, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 10881–10890.
- 56 M. B. J. Roeffars, G. De Cremer, H. Ujii, B. Muls, B. F. Sels, P. A. Jacobs, F.C. De Schryver, D. E. De Vos, J. Hofkens, *PNAS* **2007**, 104, 12603-12609.
- 57 Y. Li, M. A. Trush, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 346-355.
- 58 S. Mandal, N. H. Kazmi, L. M. Sayre, *Arch. Biochem. Phys.* **2005**, 435, 21-31.
- 59 N. Graf, *Dissertation*, **Oktober 2006**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- 60 C. E. Outten, T. V. O'Halloran, *Science* **2001**, 292, 2488-2492.
- 61 F. Wenk, G. Anderegg, *Chimia*, **1970**, 24, 427-433.
- 62 G. K. Walkup, S. C. Burdette, S. J. Lippard, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5644-5645.
- 63 S. C. Burdette, G. K. Walkup, B. Spingler, R. Y. Tsien, S. L. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7831-7841.
- 64 V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708-2711.
- 65 C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- 66 O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3038-3040.
- 67 Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192-3193.

- 68 T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609-612.
- 69 J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8* (17), 3639-3642.
- 70 F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem Biodiv.* **2006**, *3*, 509-514.
- 71 A. Salic, T. J. Mitchison, *PNAS* **2008**, *105* (7), 2415-2420.
- 72 Z. Zhou, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862-8863.
- 73 E. Jentsch, A. Mokhir, *Inorg. Chem.* **2009**, *68*, 9592-9595.
- 74 E. Jentsch, *Dissertation*, **November 2009**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- 75 V. Pavlov, R. Krämer, EP/PCT **2008**, EP 1990347 A1, WO 2008 135139 A1.
- 76 P. D. Josephy, T. Elling, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3669-3675.
- 77 X. Chen, H. Ma, *Anal. Chim. Act.* **2006**, *575*, 217-222.
- 78 A. Mokhir, Ergebnisse noch nicht veröffentlicht.
- 79 A. Hulanicki, T. Krawczyk, A Lewenstam, *Anal. Chim. Acta* **1984**, *158*, 343-355.
- 80 K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1660-1661.
- 81 M. Hill, J.-J. Bechet, A. D'Albis, *FEBS Lett.* **1979**, *102*, 282-286.
- 82 David Köster, *Diplomarbeit*, **Februar 2007**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- 83 D. Tzalis, Y. Tor, S. Failla, J. S. Siegel, *Tet. Lett.* **1995**, *36* (20), 3489-3490.
- 84 C. Boldron, M. Pitié, B. Meunier, *Synlett* **2001**, *10*, 1629-1631.
- 85 M. Pitié, B. Sudres, B. Meunier, *Chem. Commun.* **1998**, 2597-2598.
- 86 M. Pitié, B. Meunier, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 604-611.

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

- a) ich erkläre hiermit, 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, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder in einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 12.04.2010

.....

(Arnd Sprödefeld)