

Metallkomplex-funktionalisierte
Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren
für die DNA-Sequenzerkennung

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Jens Brunner
aus Heilbronn

2004

Kurzfassung in Deutsch

Die Arbeit umfasst die Synthese Metallkomplex-funktionalisierter Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren und deren Anwendung als Sonden für den sequenzspezifischen DNA-Nachweis.

Die Ligation chemisch modifizierter Oligonucleotide (bzw. deren Analoga) am Nucleinsäure-Templat ist ein etabliertes Detektionsverfahren mit hoher Sequenzselektivität, aber geringer Sensitivität aufgrund starker Produkthemmung. Durch Entwicklung einer katalytischen Variante der templatgesteuerten Reaktion konnte die Sensitivität des Verfahrens durch Signalamplifikation gesteigert werden. Dazu wurden terminale Esterkonjugate (Substrate) und Metallkomplexkonjugate (Katalysatoren) von Peptidnucleinsäuren (PNAs) synthetisiert. Die Ester-PNA und die Metallkomplex-PNA wurden am komplementären DNA-Templat in räumliche Nähe gebracht, wodurch die metallkatalysierte Spaltung des Esters stark beschleunigt wurde. Durch den Templateffekt wurde eine Reaktionsbeschleunigung um den Faktor 150 gegenüber der Hintergrundreaktion erzielt. Bei 100fachem Esterkonjugat-Überschuss konnten 35 Umsätze erreicht werden. Eine Fehlbasenpaarung der komplementären DNA erniedrigte die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu 15fach.

„Molecular Beacons“ (Molekulare Leuchtfener) sind Oligonucleotid-Sonden mit Haarnadelstruktur, die bei Hybridisierung fluoreszieren, da eine intramolekulare Fluorophor-Quencher-Wechselwirkung unterbunden wird. Im Rahmen der Arbeit wurden „Molecular Beacons“ entwickelt, in denen ein Metallkomplex durch koordinative Bindung an den Fluorophor als fluoreszenzlöschende Komponente wirkt. Dazu wurden 3'-Fluorescein und 5'-Ligand modifizierte DNA-Oligonucleotide mit Haarnadelstruktur synthetisiert. Im nicht-hybridisierten Zustand ist die Fluoreszenz der Kupfer(II)-komplexierten Oligonucleotid-Sonden effektiv gelöscht. Durch Hybridisierung mit komplementärer DNA wurde der Metallkomplex vom Farbstoff räumlich getrennt. Dadurch konnte eine 14fache Erhöhung der Fluoreszenz und eine Diskriminierung einer einzelnen Fehlbase um den Faktor 40 erzielt werden. Das Potential dieses neuen Sondentyps liegt in der Möglichkeit, die Stärke der Fluorophor-Quencher-Wechselwirkung abzustimmen, und damit die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren und unspezifische, störende Wechselwirkungen zu blockieren.

Short summary in english

This study entails the syntheses of metal complex functionalized oligonucleotides and peptide nucleic acids and their application in DNA sequence detection.

Ligation reactions of chemically modified oligonucleotides (or their analogues) on DNA templates are widely used for DNA detection with high sequence selectivity but only little sensitivity due to product inhibition. Signal amplification of a DNA templated catalytic reaction can increase the sensitivity. For that purpose terminal ester conjugates and metal complex conjugates of peptide nucleic acids were synthesized. A DNA template brought ester PNA and metal complex PNA in close proximity and enabled therefore metal catalysed ester cleavage reaction. The template effect of complementary DNA increased the reaction rate 150 times. With 100 times excess of ester substrate, 35 turnovers could be observed. A single mismatch reduced the reaction rate up to 15 times.

“Molecular beacons” are oligonucleotides with hairpin structure. They fluoresce upon hybridization to complementary DNA, due to elimination of intramolecular fluorophore quencher interaction. In this work metal quenched “molecular beacons” were developed in which a fluorophore is quenched by coordinative interaction with a metal complex. 3'-fluorescein and 5'-ligand modified DNA oligonucleotides with hairpin structure were synthesized. Without complementary DNA fluorescence is efficiently quenched. After hybridization, the metal complex was spatially separated from the fluorophore by the rigid DNA duplex, and a 14-fold increase of fluorescence could be observed. Complementary DNA increased the fluorescence 40-fold compared to DNA with a single mismatch base pair. The advantage of this kind of detection reagent can be the possibility to tune the fluorophore quencher interaction to get lower background signal and to eliminate unspecific interactions.

Metallkomplex-funktionalisierte
Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren
für die DNA-Sequenzerkennung

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Jens Brunner
aus Heilbronn

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2004

Metallkomplex-funktionalisierte
Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren
für die DNA-Sequenzerkennung

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer

Prof. Dr. Gerald Linti

Die Überraschung und die
Verwunderung sind der Anfang
des Begreifens.

José Ortega y Gasset

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Januar 2002 bis Juni 2004 im Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

Herrn PROF. DR. ROLAND KRÄMER, unter dessen Anleitung diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich herzlich für zahlreiche Anregungen, Diskussionen, sein Interesse an meiner Arbeit und die materielle Unterstützung. Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für ein Doktorandenstipendium vom 1.7.2002 – 30.6.2004.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	DNA und PNA	1
1.1.1	Die Desoxyribonucleinsäure (DNA)	1
1.1.2	Die Peptidnucleinsäure (PNA)	3
1.2	Reaktionen am Oligonucleotid-Templaten	4
1.2.1	Einleitung	4
1.2.2	Nichtenzymatische Reaktionen am DNA-Templat	4
1.2.2.1	Reaktionen, die Oligonucleotide verbinden	4
1.2.2.2	Synthese kleiner Moleküle am DNA-Templat	5
1.2.2.3	Spaltreaktionen am DNA-Templat	5
1.3	Fluoreszenzlöschung durch Metallkomplexe	6
1.3.1	Einleitung	6
1.3.2	Anwendung der Fluoreszenzsensoren zur Metallionen-Detektion	7
1.4	„Molecular Beacons“	8
2	Zielsetzung	10
3	Synthese der PNA- und DNA-Konjugate	11
3.1	Synthese konjugierbarer Chelatliganden und niedermolekularer Modellsubstrate	11
3.1.1	Synthese konjugierbarer Liganden	11
3.1.2	Synthese des niedermolekularen Modellsubstrats Picolinsäure-p-nitrophenylester	11
3.2	Synthese der Ligand-PNA- und Ester-PNA-Konjugate für die DNA-templatgesteuerten Esterhydrolysen	12
3.2.1	N-terminal Ligand-modifizierte Peptidnucleinsäuren	12
3.2.1.1	Direkte N-terminale Ligand-Modifikation von PNA	13
3.2.1.2	N-terminale Modifikation von PNAs mit Azamakrocyclen	13
3.2.2	N-terminal Alkohol- und Ester-modifizierte Peptidnucleinsäuren	14
3.2.3	C-terminal modifizierte PNA	15
3.3	Synthese der metallgequenchten MB-DNAs	16
3.4	Übersicht über die dargestellten PNAs und DNAs	20
3.4.1	N-modifizierte PNAs	20
3.4.2	C-modifizierte PNAs	20
3.4.3	Übersicht über die dargestellten anorganischen „Molecular Beacons“	21
3.4.4	Übersicht über die eingesetzten DNAs	21

3.4.4.1	Reaktionen am DNA-Templat	21
3.4.4.2	Metallgequenchte MB	21
4	PNA/DNA- und DNA/DNA-Hybridisierungsexperimente	23
4.1	Einführung in die Hybridisierungsexperimente	23
4.2	PNA/DNA-Hybridisierungen	23
4.2.1	PNA/DNA-Hybridisierungen in wässriger Lösung	23
4.2.2	PNA/DNA-Hybridisierungen in Wasser/Acetonitril 5:1	24
4.2.3	Hybridisierungsexperimente von PNA/DNA in wässriger Lösung in Gegenwart von Kupfer(II)sulfat	25
4.3	DNA/DNA-Hybridisierungen	26
5	Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat	29
5.1	Einführung in die DNA-templatgesteuerten Spaltreaktionen	29
5.2	Vorversuche	29
5.3	Durchführung der Spaltexperimente	32
5.4	Kupfer(II)-induzierte Hydrolyse der Phenylpropansäureester-PNA 5 am DNA-Templat	34
5.5	Kupfer(II)-induzierte Hydrolyse der Picolinsäureester-PNA 6 am DNA-Templat	34
5.6	Kupfer(II)-katalysierte Hydrolyse der Picolinsäureester-PNA 6 am DNA-Templat	37
5.7	Kupfer(II)-induzierte und katalysierte Hydrolyse der Picolinsäureester-PNA 6 am DNA-Templat in Lösungen mit einem Acetonitrilanteil von 20%	39
5.8	Vergleich und weitere Arbeiten	41
6	Metallgequenchte „Molecular Beacons“ als Sonden für die fluorimetrische DNA-Sequenzerkennung	43
6.1	Einführung	43
6.2	Titration der Oligonucleotid-Sonden mit Kupfer(II)	44
6.2.1	Vorexperimente mit Fluorescein und Calcein	44
6.2.2	Titration der Oligonucleotid-Sonden 11, 12, 13 und 31, 32	45

6.3	Anwendung der metallgelöschten „Molecular Beacons“ zur DNA-Sequenzerkennung	50
6.3.1	Hybridisierung der Oligonucleotide 11 und 12 mit komplementärer DNA 23	50
6.3.2	Untersuchungen zur Fehlbasendiskriminierung	53
6.4	Messung der Hybridisierungsgeschwindigkeiten der metallgequenchten Sonde 12 bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen	55
6.5	Vergleich der Sonde 12 mit dem kommerziellen, Dabcylgequenchten Oligonucleotid 30	55
6.6	Untersuchungen zum Mechanismus der metallvermittelten Fluoreszenzlöschung in Sonde 12	57
6.7	Anwendung der metallgequenchten „Molecular Beacons“ in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	59
7	Zusammenfassung	61
8	Experimenteller Teil	63
8.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	63
8.2	Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin	65
8.2.1	Synthese von 2-(5-Methylpyrazolyl)-pyridin	65
8.2.2	Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin (L1)	65
8.2.3	Synthese des Picolinsäure-p-nitrophenylesters	66
8.3	Synthesen der PNA-Konjugate	67
8.3.1	Synthese von N-modifizierten PNAs	67
8.3.1.1	Synthese der PNA 1	67
8.3.1.2	Synthese der PNAs 2 und 3	68
8.3.1.3	Synthese der PNAs 4, 5 und 6	68
8.3.2	Synthese von C-modifizierten PNAs 7, 8 und 9	70
8.4	Synthesen der DNA-Konjugate	72
8.4.1	Synthese der MB-Oligonucleotide 11-19, 31 und 32	72
8.5	HPLC Reinigung der PNA- und DNA-Biokjugate	75
8.6	Durchführung der Hybridisierungsexperimente	77
8.6.1	Durchführung der Schmelzpunktuntersuchungen	77
8.6.2	Durchführung der T_m-Wertbestimmungen in 20% Acetonitril	78
8.6.3	Durchführung der T_m-Wertbestimmungen in Abhängigkeit von Kupfer(II)-Ionen	78

8.7	Metallkatalysierten Reaktionen am DNA-Templat	79
8.7.1	Durchführung der Voruntersuchungen zur Esterspaltung	79
8.7.2	Durchführung metallkatalysierter Reaktionen am DNA-Templat	80
8.7.2.1	Stammlösungen	80
8.7.2.2	Durchführung der Kupfer(II)-induzierten Hydrolyse der PNA	5
8.7.2.3	Durchführung der Kupfer(II)-induzierten Hydrolyse der PNA	6
8.7.2.4	Durchführung der Kupfer(II)-katalysierten Hydrolyse der PNA	6
8.7.2.5	HPLC-Analyse der Esterspaltungsreaktion der PNA	6
8.8	Durchführung der Experimente mit metallgequenchten Molecular Beacons	81
8.8.1	Durchführung der UV-Vis- und Fluoreszenz-Kupfertitrationen von Fluorescein und Calcein	81
8.8.2	Durchführung der Fluoreszenz- bzw. UV-Vis-spektrophotometrischen Kupfertitrationen der DNA-Oligonucleotide	82
8.8.3	Durchführung der Experimente zur DNA-Sequenzerkennung	82
8.8.4	Durchführung der Messung der Hybridisierungsgeschwindigkeit	82
8.8.5	Durchführung der Fluoreszenzuntersuchungen mit Oligonucleotid 30	82
8.7.6	Durchführung der Messung der Fluoreszenzwiederherstellung mit Ethylendiamin	83
9	Literaturverzeichnis	84

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1: DNA-Helix</i>	1
<i>Abb. 1.2: Watson-Crick-Basenpaarung</i>	2
<i>Abb. 1.3: PNA/DNA-Hybrid</i>	3
<i>Abb. 1.4: Organokatalysierte Nitrophenylesterspaltung am DNA-Templat</i>	6
<i>Abb. 1.5: Struktur von a: Newport Green, b: Calcein und c: Fura –Red</i>	7
<i>Abb. 1.6: „Molecular Beacon“, der durch Hybridisierung mit komplementärer DNA aufleuchtet</i>	9
<i>Abb. 1.7: a) Fluorescein, b) Tetramethylrhodamin, c) Dansyl, d) Dabcyl</i>	9
<i>Abb. 3.1: Oligonucleotid 31</i>	17
<i>Abb. 5.1: MALDI-TOF Spektrum der PNA 3 (M=2773) und des Kupferkomplexes von 3 (M=2836)</i>	30
<i>Abb. 5.2: Picolinsäure-p-nitrophenylesterhydrolyse: Schwarz: $1 \cdot 10^{-5}$ M Ester; rot: $+ 1 \cdot 10^{-6}$ M Kupfer(II)sulfat; grün: $+ 1 \cdot 10^{-5}$ M Kupfer(II)sulfat; 10 mM MOPS pH 7; T = 25°C</i>	31
<i>Abb.5.3: links: MALDI und HPLC-Spektren mit match DNA 20; rechts: MALDI und HPLC-Spektren mit mismatch-DNA 22; a = PNA 7 ($M+H^+ = 2426.4$); b = PNA 6 ($M+H^+ = 2726.7$); c = PNA 4 ($M+H^+ = 2621.6$); 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, T=40°C</i>	35
<i>Abb.5.4: Esterspaltung mit komplementärer DNA 20, und den DNAs 21, 22 mit einer mismatch-Basenpaarung; 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, T=40°C</i>	36
<i>Abb. 5.5: HPLC-Spektren der Spaltexperimente mit DNA 20 (links) und DNA 22 (rechts) nach 0 und 60 Minuten; a: PNA 7 ($R_t = 23.8$ min); b: PNA 6 ($R_t = 25.7$ min); c: PNA 4 ($R_t = 22.8$ min); 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, T=40°C</i>	36
<i>Abb. 5.6: Katalysierte Hydrolyse mit 5 Äq. Ester-PNA 6, 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, T=40°C</i>	37
<i>Abb. 5.7: Esterspaltung mit 100 Äq. Ester-PNA 6, 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, T=40°C</i>	38
<i>Abb.6.1: Versuchsdurchführung der DNA-Sequenzerkennung mit metallgequenchten Sonden</i>	43
<i>Abb.6.2: Die synthetisierten metallgequenchten MBs</i>	44
<i>Abb. 6.3: Fluorescein, Calcein</i>	44
<i>Abb. 6.4: Kupfer(II)-Fluoreszenztitration von Calcein; 10 µM Calcein, 10 mM MOPS pH 7, T=25°C</i>	45
<i>Abb. 6.5: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids 12 bei 522nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1M NaCl, T=25°C</i>	46
<i>Abb. 6.6: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids 11 bei 522nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1M NaCl, T=25°C</i>	47
<i>Abb. 6.7: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids 13 (0.1 µM) bei 522 nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, T=25°C</i>	49
<i>Abb. 6.8: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids 31 (0.1 µM) bei 583 nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, T=25°C</i>	49
<i>Abb. 6.9: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids 32 (0.1 µM) bei 381 nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala</i>	

<i>der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, T=25°C, Anregungswellenlänge: 340 nm; Emission: 381 nm</i>	50
<i>Abb. 6.10: 0.1 µM Oligonucleotid 12 (1), Zugabe von 5 µM Cu²⁺ (2), Zugabe von 0.5 µM DNA 23 (3); 10mM MOPS pH7, 1 M NaCl, T=25°C</i>	51
<i>Abb. 6.11: 0.1 µM Oligonucleotid 12 (1), Zugabe von 50 µM Cu²⁺ (2), Zugabe von 0.5 µM DNA 23 (3); 10 mM MOPS pH7, 1M NaCl, T=25°C</i>	51
<i>Abb. 6.12: 0.1 µM Oligonucleotid 11 (1), Zugabe von 5 µM Cu(II) (2), Zugabe von 0.5 µM DNA 23 (3); 10 mM MOPS pH7, 1 M NaCl, T=25°C</i>	52
<i>Abb. 6.13: 0.1 µM Oligonucleotid 31 (1), Zugabe von 5 µM Cu(II) (2), Zugabe von 0.5 µM DNA 23 (3); 10 mM MOPS pH 7, 0.1 M NaCl, T=25°C, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm</i>	52
<i>Abb. 6.14: 0.1 µM Oligonucleotid 12 (1), Zugabe von 5 µM Cu(II) (2), Zugabe von 0.5 µM DNA 25 (3), Zugabe von 0.5 µM DNA 24 (4); 10 mM MOPS pH7, 0.1 M NaCl, T= 25°C</i>	54
<i>Abb. 6.15: links: 0.1 µM Oligonucleotid 12 (1), Zugabe von 0.5 µM DNA 23 (2); rechts: µM 12 (1), Zugabe von 0.5 µM DNA 24 (2); 10 mM MOPS pH 7, 0.1 1M NaCl, T=25°C</i>	54
<i>Abb. 6.16: links: 0.1 µM Oligonucleotid 12, 5 µM Cu²⁺, 0.5 µM DNA 23, 1 M NaCl, T= 25°C; rechts: 0.1 µM Oligonucleotid 12, 5 µM Cu²⁺, 0.5 µM DNA 23, 0.1M NaCl, T=25°C</i>	55
<i>Abb. 6.17: 0.1 µM Dabcyl-gelöschter MB 30 (1), Zugabe von 0.5 µM DNA 23(2), 1M NaCl; 10 mM MOPS pH 7, T=25°C.</i>	56
<i>Abb. 6.18: 0.1 µM Dabcyl-gelöschter MB 30 (1), Zugabe von 0.5 µM DNA 25 (2), Zugabe von 0.5 µM DNA 24 (3), 10 mM MOPS pH 7, 0.1 M NaCl, T=25°C</i>	56
<i>Abb. 6.19: links: UV-Vis Kupfertitration von Calcein; 10 µM Calcein, 10 mM MOPS pH 7; rechts: UV-Vis Kupfertitration von Oligonucleotid 12, 5 µM 12, 10 mM MOPS pH 7, T=25°C</i>	57
<i>Abb. 6.20: 0.1µM Oligonucleotid 12 (1), Zugabe von 5 µM CuSO₄ (2), Zugabe von 5 µM Ethylendiamin (3); MOPS pH 7, 1 M NaCl, T=25°C</i>	58
<i>Abb. 6.21: Mit 17 markierte Chromosomen menschlicher Lymphozyten</i>	60

Schemataverzeichnis

<i>Schema 3.1: Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin (L1)</i>	11
<i>Schema 3.2: Synthese des Picolinsäure-p-nitrophenylesters</i>	12
<i>Schema 3.3: Synthese von 1: a) HOBT, HBTU, DIEA, 4,4'-Bipyridindicarbonsäure; b) TFA, m-Cresol</i>	13
<i>Schema 3.4: Synthese N-terminaler Ligandmodifikationen 2, 3 mit Bromessigsäurelinker a) Bromessigsäure-bromid, DIEA; b) TACN-Hydrochlorid, DIEA bzw. Cyclam; c) TFA/m-Cresol</i>	13
<i>Schema 3.5: Synthese Alkohol- und Ester-modifizierter PNAs; a) CDI, Ethylenglycol; b) Dihydrozimtsäure, HOBT, DMAP, DIC; c) Picolinsäure, HOBT, DMAP, DIC; d) TFA/m-Cresol</i>	14
<i>Schema 3.6: Synthese von am C-Terminus-funktionalisierten PNAs 7,8 und 9; a) (Fmoc)Lys(Aloc), HOBT, HBTU, DIEA; b) Piperidin; c) Säurefunktionalisierter Ligand, HBTU, HOBT, DIEA d) Bromessigsäure-bromid, DIEA, Triazacyclononantrihydrochlorid, DIEA dann schützen mit BOC; e) Pd(P(Ph)₃)₄, P(Ph)₃, [Et₂NH₂]⁺[HCO₃]⁻; f) PNA-Synthese; g) TFA/m-Cresol.</i>	15
<i>Schema 3.7: Synthese der MB-DNA-Konjugate 11-19</i>	16

<i>Schema 3.8: Synthese des Oligonucleotids 32</i>	18
<i>Schema 5.1: Katalysezyklus der metallkatalysierten Reaktion am DNA-Templat</i>	29
<i>Schema 5.2: Kupfer(II)-katalysierte Hydrolyse des Picolinsäure-p-nitrophenylesters</i>	31
<i>Schema 5.3: Kupfer(II)-vermittelte Esterhydrolyse am DNA-Templat (oben) und massenspektrometrische Reaktionskontrolle (schematisch, unten)</i>	33
<i>Schema 5.4: Kupfer(II)-vermittelte Esterhydrolyse am DNA-Templat mit an der PNA-verankerten Donorgruppe</i>	42
<i>Schema 6.1: Vorgeschlagener Mechanismus der Fluoreszenzzunahme bei Zugabe von Ethylendiamin zum Kupfer(II)-Komplex von 12</i>	58
<i>Schema 7.1: Katalysezyklus der metallkatalysierten Reaktion am DNA-Templat</i>	62
<i>Schema 7.2: Metallgequenchter „Molecular Beacon“, der bei Zugabe komplementärer DNA aufleuchtet</i>	62
<i>Schema 8.1: Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin (L1)</i>	65
<i>Schema 8.2: Synthese des Picolinsäure-p-nitrophenylesters</i>	66
<i>Schema 8.3: Synthese der PNA 1</i>	67
<i>Schema 8.4: Synthese der PNAs 2 und 3</i>	68
<i>Schema 8.5: Synthese Alkohol- und Ester-modifizierter PNAs 4, 5 und 6</i>	68
<i>Schema 8.6: Synthese der PNAs 7, 8 und 9</i>	70
<i>Schema 8.7: Addition von L1 an das Carboxyende der PNA</i>	70
<i>Schema 8.8: Addition von Cyclam an das Carboxyende der PNA</i>	71
<i>Schema 8.9: Synthese der MB-DNA-Konjugate 11-19</i>	72
<i>Schema 8.10: Synthese des MB-DNA-Konjugats 32</i>	74

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 4.1: Schmelzpunkte der PNAs/DNAs in wässriger Lösung; [DNA] = 2 μM; [PNA] = 2 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; $\Delta T_m \pm 2^\circ\text{C}$</i>	24
<i>Tab. 4.2: Schmelzpunkte der PNAs/DNAs in 20%iger Acetonitril-Lösung; [DNA] = 2 μM; [PNA] = 2 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; $\Delta T_m \pm 2^\circ\text{C}$</i>	25
<i>Tab. 4.3: Schmelzpunkte der PNAs/DNAs mit Kupfer(II)sulfat; [DNA] = 2 μM; [PNA] = 2 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; $\Delta T_m \pm 2^\circ\text{C}$</i>	26
<i>Tab. 4.4: Schmelzpunkte der Oligonucleotid-DNA 12/DNA 23; [DNA 12, 23] = 1 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 100 mM; $\Delta T_m \pm 1^\circ\text{C}$</i>	27
<i>Tab. 4.5: Schmelzpunkte der Oligonucleotid-DNAs 11 und 12 mit DNAs 23 und 24; [DNA 11, 12, 23, 24] = 0.2 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 100 mM; $\Delta T_m \pm 1^\circ\text{C}$</i>	27
<i>Tab. 4.6: Schmelzpunkte der Oligonucleotid-DNAs 14 und 15 mit DNA 26; [DNA 14, 15, 26] = 1 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; $\Delta T_m \pm 1^\circ\text{C}$</i>	28
<i>Tabelle 5.1: Übersicht der Ester-PNA-Spaltungen an DNA-Templaten in wässriger Lösung</i>	39
<i>Tabelle 5.2 a): Übersicht der Ester-PNA-Spaltungen an DNA-Templaten in 20%iger Acetonitril-Lösung</i>	40
<i>Tabelle 5.2 b): Übersicht der Ester-PNA-Spaltungen an DNA-Templaten in 20%iger Acetonitril-Lösung</i>	40

Abkürzungen

A	Adenosin
Aloc	Allyloxycarbonyl
Boc	t-Butyloxycarbonyl
C	Cytosin
CDI	Carbonyldiimidazol
CH ₃ CN	Acetonitril
CPG	Controlled Pore Glas
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fmoc	N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)
G	Guanin
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Intensität
Lys	Lysin
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
MB	“Molecular Beacon”
MMT	Monomethoxytrityl
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
PG	Schutzgruppen der Nucleobasen (DNA: C, A: Benzoyl-, G: Isobutyryl-Schutzgruppe) (PNA: C, A, G: Bhoc-Schutzgruppe)
Ph	Phenyl
PNA	Peptidnucleinsäure

R_t	Retentionszeit
T	Thymin
TACN	Triazacyclononan
Tamra	Tetramethylrhodamin
TFA	Trifluoressigsäure
T_m	Schmelzpunkt
UV/Vis	ultraviolett/visible (Wellenlängenbereich)

1 Einleitung

1.1 DNA und PNA

1.1.1 Die Desoxyribonucleinsäure (DNA)

Die DNA ist der zentrale Baustein des Lebens. Sie ist der Träger genetischer Informationen, die ein Lebewesen charakterisieren, und kodiert den Aufbau von Proteinen. In der Mitte des letzten Jahrhunderts gelang es O. T. Avery durch Experimente zur Bakterientransformation und A. D. Hershey und M. Chase durch Experimente zum Infektionsprozess des Bakteriophagen T2, der DNA ihre Funktion als Genträger zuzuordnen^[1].

Die endgültige Strukturaufklärung gelang Watson und Crick im Jahre 1953^[2]. Die DNA besteht aus zwei Einzelsträngen, die als Doppelhelix vorliegen (Abb. 1.1). Die einzelnen Stränge sind komplementär zueinander und verlaufen antiparallel, d.h. ein Strang verläuft vom 5` zum 3`-Ende, der andere vom 3`- zum 5`-Ende.

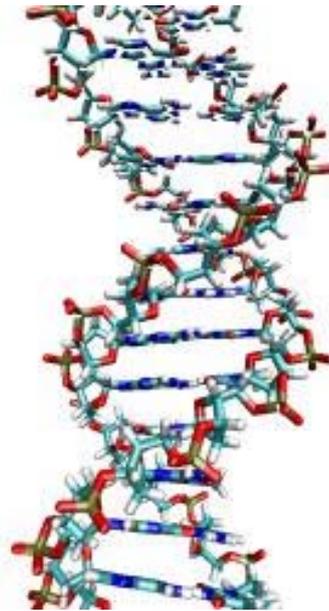


Abb.1.1: DNA-Helix

Ein einzelner DNA-Strang besteht aus Desoxyribosen, die am C5- und C3-Atom durch Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft sind. Am C1-Atom ist stets eine Purinbase (Adenin oder Guanin) oder eine Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin) N-glykosidisch gebunden. In der doppelsträngigen DNA ist das molare Verhältnis von Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin gleich^[3]. Nach der Watson-Crick-Basenpaarungsregel paart sich

immer Thymin mit Adenin und Guanin mit Cytosin (Abb. 1.2) über Wasserstoff-Brückenbindungen.

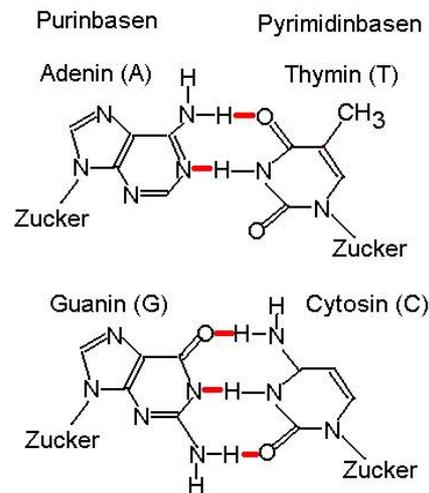


Abb.1.2: Watson-Crick-Basenpaarung

Der Zusammenhalt der Helix wird dadurch gewährleistet, dass das negativ geladene Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat nach außen verlagert ist, wobei die hydrophoben Basen nach innen zeigen und untereinander Wasserstoffbrücken bilden. Die Duplex-DNA kann, abhängig von ihrer Sequenz, ihrer Länge und dem Natriumchloridgehalt der Lösung, in verschiedenen Doppelstrangkongformationen vorliegen. Neben der sogenannten B-DNA, die sie besitzt die am weitest häufigste vorkommende Konformation, gibt es noch die A-DNA und die Z-DNA. Die B-DNA existiert in einer rechtsgängigen Helix. Jede Windung besteht aus 10 Nucleobasen in einem Abstand von jeweils 3,4 Å; die gesamte Windungslänge beträgt somit 34 Å.

Da die DNA alle genetischen Erbinformationen in sich trägt, können schon geringfügige Änderungen in ihrem molekularen Aufbau zu gravierenden Auswirkungen führen. So ist es von großem Interesse, neue Methoden und Techniken zu entwickeln, um DNA zu analysieren, modifizieren und reparieren. Durch die Erfindung der PCR (polymerase chain reaction) und den Einsatz von Restriktionsnucleasen war es beispielsweise möglich, das menschliche Genom in wenigen Jahren vollständig zu entschlüsseln^[4]. Auch bei der Herstellung schwer zugänglicher Proteine, zur Analyse neuer Gene und zur Herstellung transgener Tiere und Pflanzen finden die neuen Verfahren Anwendung. Besonders wichtig ist der Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen, da dies zu diagnostischen Zwecken genutzt werden kann, wie beispielsweise zur Früherkennung von Erbkrankheiten und in der Tumordiagnostik.

1.1.2 Die Peptidnucleinsäure (PNA)

Nielsen et al. beschrieben 1991^[5] ein DNA-Analogon, die Polyamid- oder Peptidnucleinsäure (PNA). In ihr ist das Phosphodiester-Desoxyribose-Rückgrat durch eine N-(2-Aminoethyl)glycin-Polyamidstruktur ersetzt. Die Basen entsprechen den DNA-Basen und sind über Methylen-Carbonyl-Bindungen mit dem Pseudopeptidrückgrat verknüpft. Per Konvention wird der Amino-Terminus eines PNA-Oligomers als äquivalent zum 5'-Ende der DNA angesehen^[6,7] (Abb. 1.3).

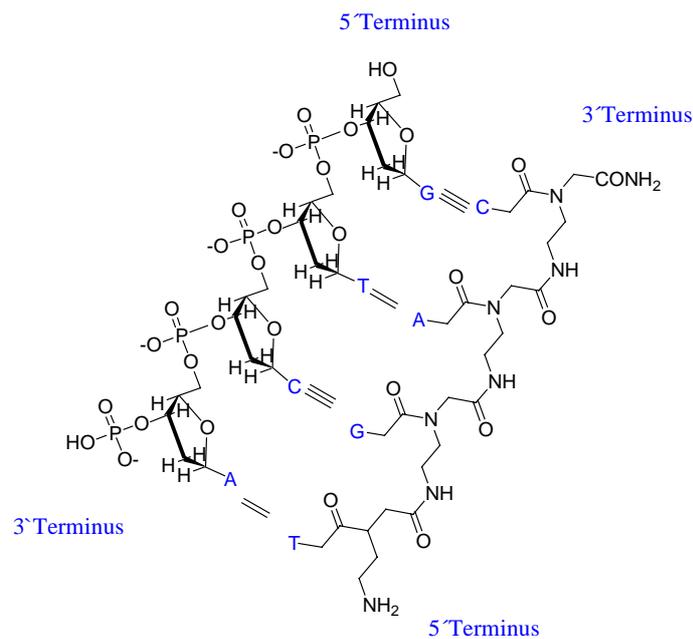


Abb.1.3: PNA/DNA-Hybrid

Im Wasser ist reine PNA schlecht löslich und neigt zur Selbstaggregation. Ihre Löslichkeit nimmt mit zunehmender Basenanzahl ab. Um die Löslichkeit zu steigern, können geladene Gruppierungen angehängt werden. Oft werden dazu eine oder mehrere Lysin-Einheiten in die PNA eingebaut.

Aufgrund der großen Stabilität der PNA gegenüber Säuren können bei der PNA-Synthese Schutzgruppen aus der Peptidchemie verwendet werden, die nur mit starken Säuren wieder abgespalten werden können. Auch gegen schwache Basen ist sie stabil. Die biologische Stabilität der PNA wurde im Humanserum und in Zellextrakten getestet. Im Gegensatz zur DNA, die schon nach wenigen Minuten durch Nucleasen abgebaut wurde, konnten 50% der eingesetzten PNA noch zwei Tage später detektiert werden^[6].

Die PNA zeichnet sich nicht nur durch ihre hohe biologische Stabilität aus, sondern besitzt auch aufgrund ihres ungeladenen Rückgrates, eine höhere Bindungsaffinität und -spezifität

gegenüber Nucleinsäuren als natürliche Oligonucleotide^[8]. Die Hybridisierungseigenschaften der PNA sind nahezu unabhängig von der Ionenstärke der Lösung^[9]. Mit DNA kann PNA α -Helices nach der Watson-Crick-Regel bilden oder auch (PNA)₂-DNA-Tripelhelices. Tripelhelices bestehen aus einem PNA-Strang, der nach der Watson-Crick-Regel an einen DNA-Strang gebunden ist; der zweite PNA-Strang bindet über Hoogsteen-Basenpaarungen an den DNA-Strang. Die Tendenz zur Bildung von (PNA)₂-DNA-Tripelhelices ist so groß, dass an speziellen Sequenzen die PNA einen Einzelstrang aus der doppelsträngigen DNA zu verdrängen vermag^[7]. Trotz einiger vorteilhafter Eigenschaften der PNA gegenüber der DNA konnte ein Problem nicht beseitigt werden: Die Aufnahme der PNA in Zellen ist ohne Hilfsreagenzien äußerst gering.

1.2 Reaktionen an Oligonucleotid-Templaten

1.2.1 Einleitung

Die Bedeutung von Reaktionen am DNA-Templat wurde durch die Aufklärung des DNA-Replikationsprozesses schnell klar, und ihr Einsatz als Werkzeug in der Diagnostik war abzusehen. Bedeutend ist gegenwärtig insbesondere die von Mullis und Mitarbeitern entwickelte enzymatische *in vitro* Amplifizierung der DNA, die polymerase chain reaction (PCR)^[10].

1.2.2 Nichtenzymatische Reaktionen am DNA-Templat

1.2.2.1 Reaktionen, die Oligonucleotide verbinden

Über die erste nichtenzymatische Reaktion am DNA-Templat wurde von Naylor et al. 1966 berichtet. Ein Polyadenosin diente dabei als Templat, um zwei Thymidin-Hexanucleotide mit einer Ausbeute von 5% nach 4 Tagen zu verknüpfen^[11]. Eine wesentliche Verbesserung gelang Kiedrowski et al. 1986. Durch die geschickte Wahl der Sequenz wurde die erste autokatalysierte Reaktion am DNA-Templat erhalten^[12]. Starke Produktinhibierung führte jedoch dazu, dass die Ausbeute bei dieser Reaktion nur 12% betrug, bei minimalem Turnover. Da kleine Veränderungen am Rückgrat der DNA nur wenig Auswirkungen auf die Hybridisierungseigenschaften der DNA haben, konnten mit modifizierten Oligonucleotiden ebenfalls Reaktionen am DNA-Templat durchgeführt werden. Beispielsweise gelang es Lynn et al., durch Kondensation Aldehyd-funktionalisierter DNA mit Amin-funktionalisierter DNA

und anschließender chemischer Reduktion des entstandenen Imins eine Umsetzung zu erhalten^[13], allerdings nur mit sehr kurzen Sequenzen (Trimere). Kool et al. erhielten durch Umsetzung eines 5'-Iodothymidin Oligonucleotids mit einem 3'-Phosphorthioat-modifizierten Oligonucleotid eine 2000fach schnellere Umsetzung an einer komplementären DNA im Vergleich zu einer DNA mit einer Fehlbasenpaarung. Durch diese hohe mismatch-Diskriminierung sollte die Erkennung einzelner Fehlbasen (single point-Mutationen) in DNA möglich sein^[14]. Sheppard et al. gelang die erste Komplexsynthese am DNA-Templat, indem er 3'-Salicylaldehyd- und 5'-Salicylaldehyd-modifizierte Oligonucleotide mit Ethylendiamin in Gegenwart von Mangan(II)acetat bzw. Nickel(II)acetat umsetzte. Die Ausbeute des gebildeten Salen-Komplexes war stark abhängig von der Anwesenheit des Metalls. Beispielsweise betrug die Ausbeute für die Umsetzung mit Mangan(II)-Salz 65%, bei der Umsetzung ohne die Hilfe des Metalls wurde nur 4% Produkt erhalten^[15].

1.2.2.2 Synthese kleiner Moleküle am DNA-Templat

Liu et al. entwickelten neue Methoden, um gezielt Reaktionen am DNA-Templat durchzuführen. Dabei gelang es unter anderem, ganze Molekülbibliotheken zu erzeugen. Die modifizierten DNAs dienten sowohl als Träger des Substrates als auch als Träger der Reagenzien^[16]. Neben S_N2-Reaktionen wurden auch Nitro-Aldol- und Nitro-Michael-Reaktionen, Wittig-Olefinierung, 1,3-dipolare Cycloadditionen und schließlich auch Palladium-katalysierte Heck-Reaktionen durchgeführt^[17]. Interessanterweise gelangen die templatvermittelten Reaktionen auch, wenn sich zusätzliche Basenpaare zwischen den Reagenzien und den Substraten befanden. Vermutlich fand eine Reaktion statt, solange die Reaktionsgeschwindigkeit schneller war als die Austauschgeschwindigkeit der zwei DNA-Stränge mit dem Templat. Das große Potential der Templat-Synthesen konnten Liu und Mitarbeiter durch eine mehrstufige Synthese am DNA-Templat zeigen^[18].

1.2.2.3 Spaltreaktionen am DNA-Templat

Durch die hohe Affinität des Ligationsprodukts zur Templat-DNA sind bei Reaktionen, die zur Verbindung zweier Nucleotidstränge führen, keine katalytischen Umsätze möglich. Taylor et al. umgingen dieses Problem, indem sie eine organokatalysierte Spaltreaktion durchführten (Abb.1.4)^[19,20,21].

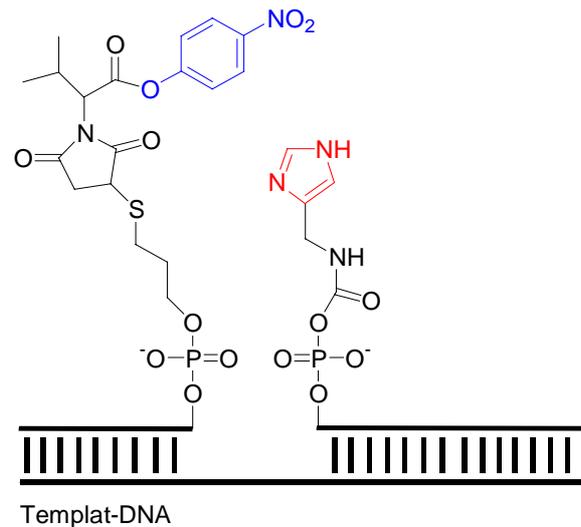


Abb. 1.4: Organokatalysierte Nitrophenylesterspaltung am DNA-Templat

Als Katalysator fungierte eine am 5'-Ende einer 15-mer DNA gebundene Imidazolgruppe, als Substrat eine am 3'-Ende modifizierte Ester-DNA. Mit diesem System gelang es, einen dreifachen Turnover nach 10 Stunden zu erzielen. Das Konzept wurde als potentielle Methode für die genspezifische Freisetzung von Wirkstoffen *in vivo* vorgestellt.

1.3 Fluoreszenzlöschung durch Metallkomplexe

1.3.1 Einleitung

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine empfindliche Messmethode, um strukturelle und dynamische Eigenschaften von Biomolekülen zu untersuchen. Anstelle der Lichtabsorption, wie beispielsweise bei der UV-Vis-Spektroskopie, wird bei Fluoreszenzmessungen das von der Probe reemittierte Fluoreszenzlicht beobachtet. Die Probe gelangt dabei durch Abgabe eines Fluoreszenzphotons vom ersten angeregten Zustand wieder in den Grundzustand^[22].

Neben der Fluoreszenzemission gibt es für angeregte Moleküle noch drei weitere Prozesse, wieder zum Grundzustand zu gelangen. Bei der inneren Konversion geht die Anregungsenergie durch Dissipation in Schwingungsmoden oder durch Kollision mit Lösungsmittelmolekülen verloren. Beide Prozesse nehmen mit steigender Temperatur zu, so dass die Fluoreszenz mit steigender Temperatur abnimmt. Beim „intersystem crossing“ wird der angeregte Singulettzustand in einen angeregten Triplettzustand überführt. Dieser Zustand geht entweder über Phosphoreszenz oder durch strahlungslose Prozesse in den Grundzustand

über. Ein weiterer Prozess ist das Quenching. Es wird dabei zwischen dem dynamischen oder Kollisions-Quenching, welches gewisse Moleküle in einer bimolekularen Reaktion vom angeregten Singulettzustand in einen Triplettzustand konvertiert, und dem statischen Quenching, in welchem das Quencher-molekül einen nicht fluoreszierenden Komplex mit dem fluoreszierenden Molekül eingeht, unterschieden.

1.3.2 Anwendung von Fluoreszenzsensoren zur Metallionen-Detektion

Die Prinzipien der Synthese von Fluoreszenzsensoren zum Nachweis von Metallionen wurden bereits 1954 von Anderegg et al. anhand eines optischen Metallionenindikators gezeigt^[23]. Fluoreszenzsensoren bestehen normalerweise aus einem Chelatliganden, der für die selektive Komplexbildung von Metallionen verantwortlich ist, und einem kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoff, der die Rolle der Signaltransduktion erfüllt. Durch Anlagerung von Metallionen wird die Fluoreszenz durch statisches Quenchen über Elektronen- oder Energieübertragung verhindert^[24,25]. Heute werden Sensoren auf Fluoreszenzbasis aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit häufig zur Detektion von Metallionen benutzt. In Abbildung 1.5 sind einige häufig verwendete, kommerzielle Metallionensensoren abgebildet.

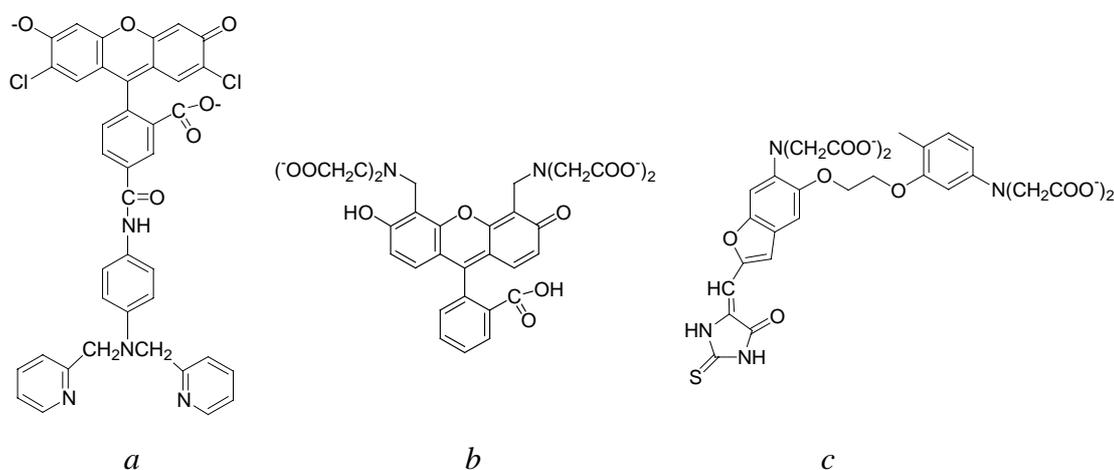


Abb.1.5: Struktur von a: Newport Green DCF, b: Calcein und c: Fura -Red

Es werden dabei oftmals Fluorescein- bzw. Rhodaminderivate verwendet, da sie eine hohe Quantenausbeute und eine relativ hohe Photostabilität besitzen. So ist Calcein (Abb. 1.6, Mitte) beispielsweise ein Diiminoacetat funktionalisierter Fluorescein-Farbstoff. Er wurde erstmals von Diehl und Ellingboe als Mischung nach einer Reaktion von Fluorescein mit Iminodiacetat und Formaldehyd^[26] erhalten, und konnte zur Calciumtitration im alkalischen Milieu verwendet werden. Die Synthese und die Eigenschaften des reinen Calceins wurden später von Körbl und Vydra beschrieben^[27]. Calcein kann neben dem Nachweis von Calcium-

Ionen auch zur Detektion zahlreicher weiterer zwei- und dreiwertiger Metallionen verwendet werden^[28]. Für Kupfer(II)-Ionen beträgt die effektive Bindungskonstante des Calcein bei pH 7 $\log K = 12$. Bei Koordination der Ionen wird eine starke Löschung der Fluoreszenz beobachtet (siehe Kapitel 6.2.1)^[29,30]. Neben der Anwendung zur Metallionendetektion wurden Fluoreszenzsensoren auch bei der Analyse von Koordinationsumgebungen in Komplexen durch Bestimmung freier Metallkoordinationsstellen erfolgreich verwendet^[31,32].

1.4 „Molecular Beacons“

Nach der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist es von besonderem Interesse, schnelle Methoden zu entwickeln, mit denen einzelne Personen auf Genvariationen hin untersucht werden können. Hierbei müssen individuelle genetische Variationen, bei denen es sich oft nur um den Austausch einer Base (single nucleotide polymorphisms; SNP's) handelt, detektiert werden, da diese für Krankheitsdispositionen verantwortlich gemacht werden. Auf Fluoreszenz basierende Methoden werden aufgrund ihrer leichten Handhabbarkeit, ihrer einfachen Messbarkeit und ihrer hohen Empfindlichkeit für Anwendungen in der schnellen Analytik und Diagnostik weltweit intensiv beforscht und weiterentwickelt. Die Einführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR-Methode) zur Vervielfältigung einzelner RNA-Moleküle bzw. DNA-Abschnitte macht auf Fluoreszenz basierende sensitive Nachweise von Genexpressionen möglich. So wird bei der sogenannten spektralen Genotypierung (spectral genotyping) Patienten-DNA in Gegenwart fluoreszierender Analyse-DNA durch PCR amplifiziert. Dafür häufig verwendete DNA-Reagenzien sind die von Tyagi und Kramer^[33] entwickelten „molekularen Leuchtsignale“ (Molecular Beacons). Ziel ist es, die Anwesenheit bestimmter DNA-Sequenzen über ein Fluoreszenzsignal detektierbar zu machen. Bei den „Molecular Beacons“ werden durch eine partiell selbstkomplementäre Basen-Sequenz die zwei Enden in räumliche Nähe gebracht. Man erhält eine Haarnadelstruktur der DNA, gebildet aus dem sogenannten Stamm- und der Loop-Region. Wird nun ein Ende der DNA mit einem Farbstoffmolekül funktionalisiert und das andere mit einem Quencher-molekül, ist in der Haarnadelstruktur keine Fluoreszenz zu beobachten, da die Anregungsenergie durch den von Förster beschriebenen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)^[34] auf den Quencher übertragen wird. Durch Hybridisierung mit vollständig komplementärer DNA werden aufgrund der starren Helix-

Anordnung der resultierenden Duplex-DNA die beiden Enden räumlich getrennt, und man erhält ein Fluoreszenzsignal (Abb.1.6).

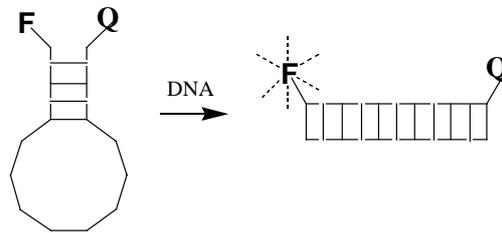


Abb. 1.6: „Molecular Beacon“, der durch Hybridisierung mit komplementärer DNA aufleuchtet (F = Fluoreszenzfarbstoff; Q = Quencher)

Alternativ zur zweifachen Modifizierung des Hairpins können auch Donorfarbstoffe verwendet werden, die in Anwesenheit von G-Nucleobasen nicht mehr fluoreszieren. Die Basis dieser Fluoreszenzlöschung ist ein Elektronentransfer der Nucleobase G auf den lichtangeregten Fluorophor. Durch Fluoreszenz-Quencher-Wechselwirkungen können auch biologische Prozesse direkt in Enzymen aufgeklärt werden^[35]. In Abbildung 1.7 sind einige häufig verwendete Fluoreszenzfarbstoffmoleküle wie Fluorescein, Tetramethylrhodamin und Dansyl oder Quencher-moleküle wie beispielsweise Dabcyl abgebildet, die über einen Aminolinker kovalent an die DNA gebunden werden können.

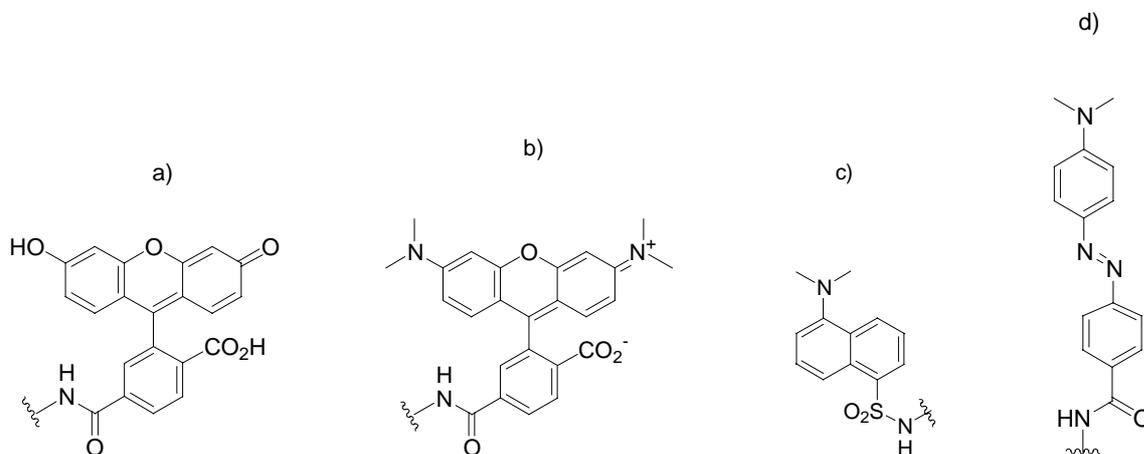


Abb. 1.7: a) Fluorescein, b) Tetramethylrhodamin, c) Dansyl, d) Dabcyl

2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Synthese Metallkomplex-funktionalisierter Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren und deren Anwendung als Sonden für den sequenzspezifischen DNA-Nachweis.

Katalytische Reaktionen chemisch modifizierter Oligonucleotide (bzw. deren Analoga) an DNA-Templaten sind aufgrund des Potentials in der DNA-Sequenzerkennung mit Signalamplifikation beziehungsweise bei der genspezifischen Freisetzung von Wirkstoffen in vivo für die Forschung von erheblichem Interesse. Bisher wurde lediglich eine organokatalytische Hydrolyse-Reaktion am DNA-Templat beschrieben^[20]. Metall-katalysierte Reaktionen sind generell vielfältiger und haben oftmals eine höhere Reaktivität als organokatalytische Reaktionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine metallkatalysierte Reaktion chemisch modifizierter Peptidnucleinsäuren am DNA-Templat entwickelt werden.

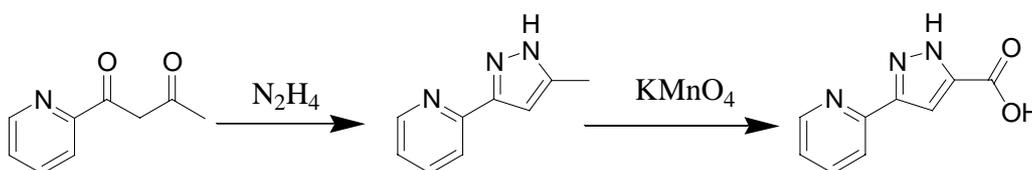
„Molecular Beacons“ (molekulare Leuchtfener) sind Oligonucleotid-Sonden mit Haarnadelstruktur, die bei Hybridisierung fluoreszieren, da eine intramolekulare Fluorophor-Quencher-Wechselwirkung unterbunden wird. Im Rahmen der Arbeit sollten „Molecular Beacons“ entwickelt werden, in denen ein Metallkomplex durch koordinative Bindung an den Fluorophor als fluoreszenzlöschende Komponente wirkt. Dadurch sollte die aus der Metallionendetektion bekannte Fähigkeit mancher Metallionen, stark die Fluoreszenz zu löschen, in die DNA-Sequenzanalyse eingeführt werden.

3 Synthese der PNA- und DNA-Konjugate

3.1 Synthese konjugierbarer Chelatliganden und niedermolekularer Modellsubstrate

3.1.1 Synthese konjugierbarer Liganden

Sowohl bei den metallvermittelten Reaktionen am DNA-Templat als auch bei den metallgequenchten „Molecular Beacons“ wurden kupferbindende Liganden, die aufgrund der Kupfer-Bindungskonstanten der Nucleobasen von $\log K \approx 4\text{-}5$ ^[36] mindestens Bindungskonstanten von $\log K = 7$ haben, und außerdem nicht alle äquatorialen Koordinationstellen besetzen sollten, benötigt. Als Ligand wurde der Carboxy-funktionalisierte Pyridyl-pyrazolyl-Ligand **L1** gewählt, da er in einer einfachen Synthese dargestellt werden kann und funktionelle Gruppen fehlen, die Schutzgruppen erfordern. Auch bindet **L1** genau ein Kupfer(II)-Ion, wobei zwei äquatoriale Koordinationstellen des Kupfers frei bleiben. Die Kupfer(II)-Bindungskonstante des Ethylamid-Derivates von **L1** wurde über eine UV-Titration mit Kupfer(II)sulfat zu $\log K = 7.6$ ^[37] bestimmt.



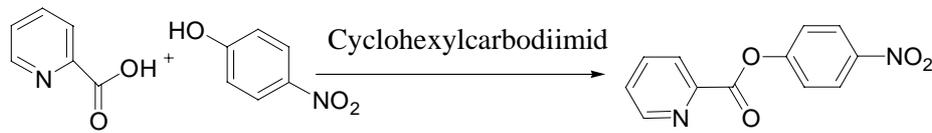
Schema 3.1: Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin (**L1**)

Die Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin wurde bereits im Arbeitskreis Krämer^[38] durchgeführt. Sie erfolgte, ausgehend vom 1-Pyridyl-butan-1,3-dion^[39], in zwei Stufen. Zuerst wurde durch Kondensation von 1-Pyridyl-butan-1,3-dion mit Hydrazinhydrat 2-(5-Methylpyrazolyl)-7-pyridin erhalten. Das Produkt der vorangegangenen Reaktion wurde dann im zweiten Schritt mit Kaliumpermanganat zur Carbonsäure oxidiert. Carbonsäuren können leicht an den N-Terminus von Peptidnucleinsäuren gekoppelt, beziehungsweise mit aminmodifizierten Oligonucleotiden in bekannten Peptidkopplungsreaktionen umgesetzt werden.

3.1.2 Synthese des niedermolekularen Modellsubstrats Picolinsäure-p-nitrophenylester

Um die Kupfer(II)-katalysierte Spaltung von Picolinsäureestern zunächst an einer niedermolekularen Verbindung zu untersuchen, wurde der Picolinsäure-p-nitrophenylester

synthetisiert. Der Verlauf der Esterspaltungsreaktion konnte durch Verfolgung der Absorption bei 400 nm des entstehenden p-Nitrophenolats beobachtet werden.



Schema 3.2: Synthese des Picolinsäure-p-nitrophenylesters

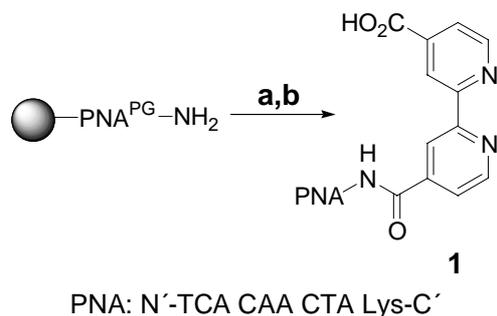
Durch Umsetzung von p-Nitrophenol mit Cyclohexylcarbodiimid aktivierter Picolinsäure in Methylenchlorid konnte das gewünschte Produkt dargestellt werden (Schema 3.2). Mehrmaliges Umkristallisieren des Rohproduktes aus Methanol ergab reinen Picolinsäure-p-nitrophenylester. Allerdings lag dadurch die Ausbeute des weißen Feststoffs bei nur 5%.

3.2 Synthese der Ligand-PNA- und Ester-PNA-Konjugate für die DNA-templatgesteuerten Esterhydrolysen

3.2.1 N-terminal Ligand-modifizierte Peptidnucleinsäuren

Um die Reaktionsbedingungen der Kopplungsreaktionen zu optimieren und die Eigenschaften ligandmodifizierter Peptidnucleinsäuren zu untersuchen, wurden zunächst einige leicht zugängliche N-modifizierte Peptidnucleinsäuren synthetisiert. Die Kopplung der kommerziell erhältlichen Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure mit dem N-Terminus der festphasengebundenen PNA erfolgte über Standard-Peptidkopplungsreaktionen. Im Gegensatz dazu verfügen die Makrocyclen Triazacyclononan und Cyclam nur über Aminfunktionen. Zur Anbindung an den N-Terminus von PNA war daher zunächst die Verknüpfung mit einem Linker erforderlich.

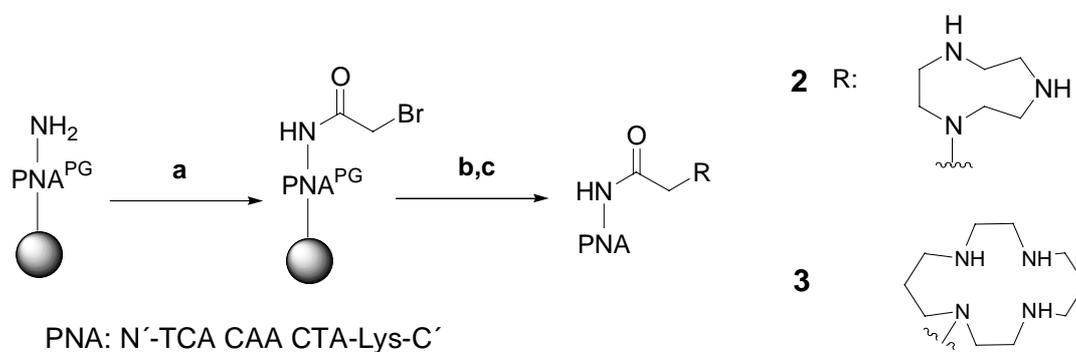
3.2.1.1 Direkte N-terminale Ligand-Modifikation von PNA



Schema 3.3: Synthese von **1**: a) HOBT, HBTU, DIEA, Bipyrindin-4,4'-dicarbonsäure; b) TFA, m-Cresol

Die modifizierte Peptidnucleinsäure **1** wurde in einer einstufigen Synthese dargestellt. Der Ligand Bipyrindin-4,4'-dicarbonsäure wurde mit dem Uroniumsalz 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) aktiviert, und nach Zugabe der Base N,N'-Diisopropylethylamin (DIEA) in DMF an die festphasengebundene PNA gekoppelt (Schema 3.3, a)^[40,41,42]. Die Abspaltung vom festen Träger erfolgte mit einer Mischung von Trifluoressigsäure und m-Cresol 4:1 (Schema 3.3, b). Die Reaktionskontrolle wurde mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Zur Reinigung wurde das Produkt mittels HPLC von entstandenen Nebenprodukten getrennt. Neben der gewünschten Mono-PNA-Bipyrindindicarbonsäure entstand auch etwas Bis-PNA-Bipyrindindicarbonsäure. Fraktionen, die mehr als 90% des gewünschten Produktes enthielten, wurden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.1.2 N-terminale Modifikation von PNAs mit Azamakrocyclen

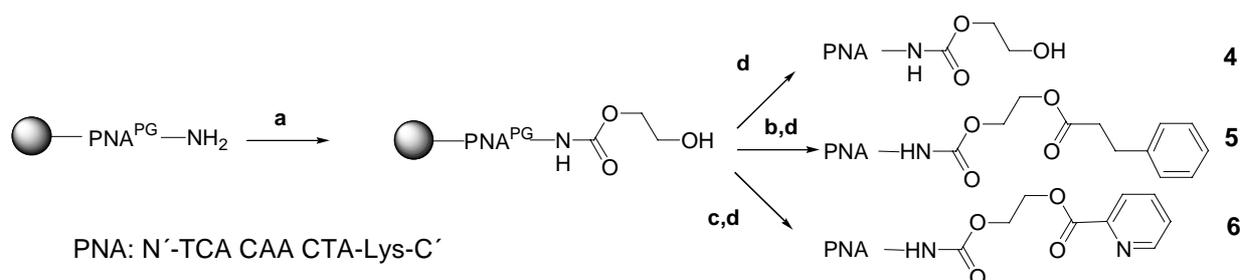


Schema 3.4: Synthese N-terminaler Ligandmodifikationen **2**, **3** mit Bromessigsäurelinker: a) Bromessigsäurebromid, DIEA; b) TACN-Hydrochlorid, DIEA bzw. Cyclam; c) TFA/m-Cresol

Um die PNA mit Azamakrocyclen zu modifizieren, war zunächst die Addition von Bromessigsäurebromid als Linker durch eine HOBT/HBTU-aktivierte Kupplung analog 3.2.1.1 erforderlich (Schema 3.4, a). Durch nucleophile Substitution des Bromids mit Aminofunktionen der Makrocyclen (b) wurde anschließend die gewünschte PNA erhalten. Die Aufreinigung der Produkte erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben (c).

3.2.2 N-terminal Alkohol- und Ester-modifizierte Peptidnucleinsäuren

Als Substrate für die metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat wurden Ester-modifizierte PNAs synthetisiert. Die Einführung einer Ester-Modifikation am C-Terminus der PNA ist synthetisch erheblich aufwendiger (siehe Kapitel 3.3). Deshalb wurde die Alkohol- und Esterfunktion am N-Terminus der PNA eingeführt.



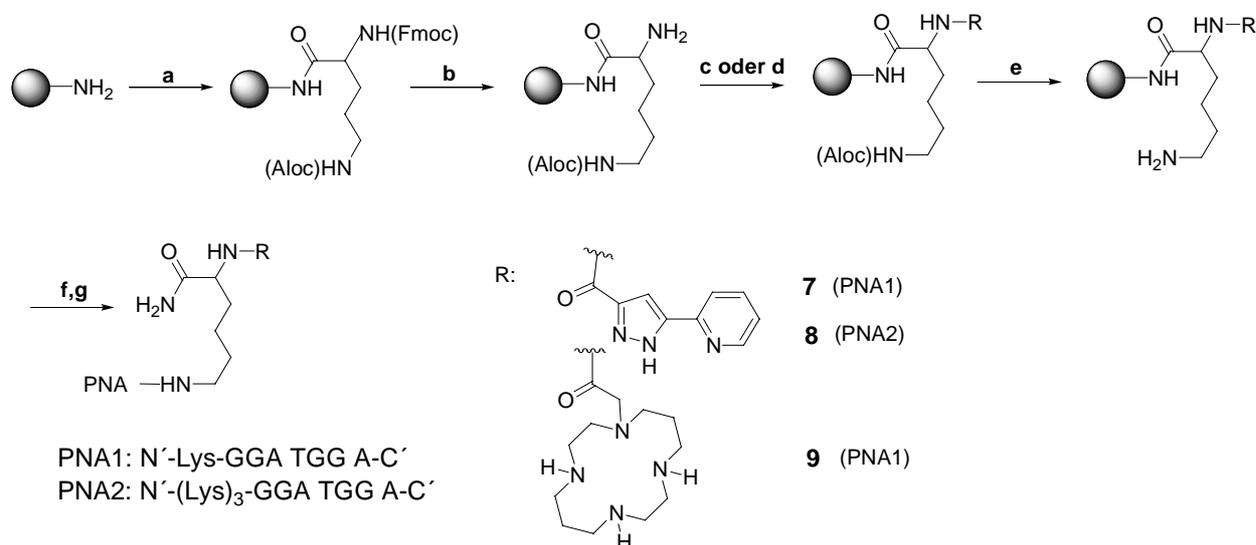
Schema 3.5: Synthese Alkohol- und Ester-modifizierter PNAs; a) CDI, Ethylenglycol; b) Dihydrozimtsäure, HOBT, DMAP, DIC; c) Picolinsäure, HOBT, DMAP, DIC d) TFA/m-Cresol

In Schema 3.5 ist die Darstellung N-Alkohol- bzw. N-Ester-modifizierter PNA-Derivate abgebildet. Durch Überführung des N-terminalen Amins der PNA mit Carbonyldiimidazol in ein Imidazolid und anschließende Umsetzung mit Ethylenglycol zum Hydroxyethylenfunktionalisierten Carbamat wurde die Alkoholmodifikation eingeführt (a). Abspalten von der Festphase mit Trifluoressigsäure/m-Cresol und anschließende Isolierung des Produkts (siehe Kapitel 3.2.1.1) ergab die hydroxyfunktionalisierte PNA **4** in guten Ausbeuten (d). Sie ist unter anderem das Hydrolyseprodukt der metallkatalysierten Esterhydrolyse.

Durch weitere Umsetzung des Alkohols mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT), Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Dimethylaminopyridin (DMAP) aktivierter Dihydrozimtsäure bzw. Picolinsäure wurden die Ester-modifizierten PNAs **5** und **6** erhalten (b, c). Die Abspaltung von der Festphase erfolgte analog zu den anderen PNA-Konjugaten mit nur geringen Ausbeuteverlusten (d).

3.2.3 C-terminal modifizierte PNA

Da die Estermodifikation bevorzugt am Aminoende der PNA eingeführt wurde, muss sich, im Hinblick auf die DNA-gesteuerte Templatreaktion, die Ligandmodifikation der zweiten PNA am C-Terminus befinden. Im Schema 3.6 ist die Darstellung der PNAs **7**, **8** und **9** abgebildet.



Schema 3.6: Synthese der am C-Terminus funktionalisierten PNAs **7**, **8** und **9**; a) (Fmoc)Lys(Aloc), HOBT, HBTU, DIEA; b) Piperidin; c) Säurefunktionalisierter Ligand, HBTU, HOBT, DIEA d) Bromessigsäure-bromid, DIEA, Triazacyclononantrihydrochlorid, DIEA, dann schützen mit BOC; e) Pd(PPh₃)₄, PPh₃, [Et₂NH₂]⁺ [HCO₃]⁻; f) PNA-Synthese; g) TFA/m-Cresol.

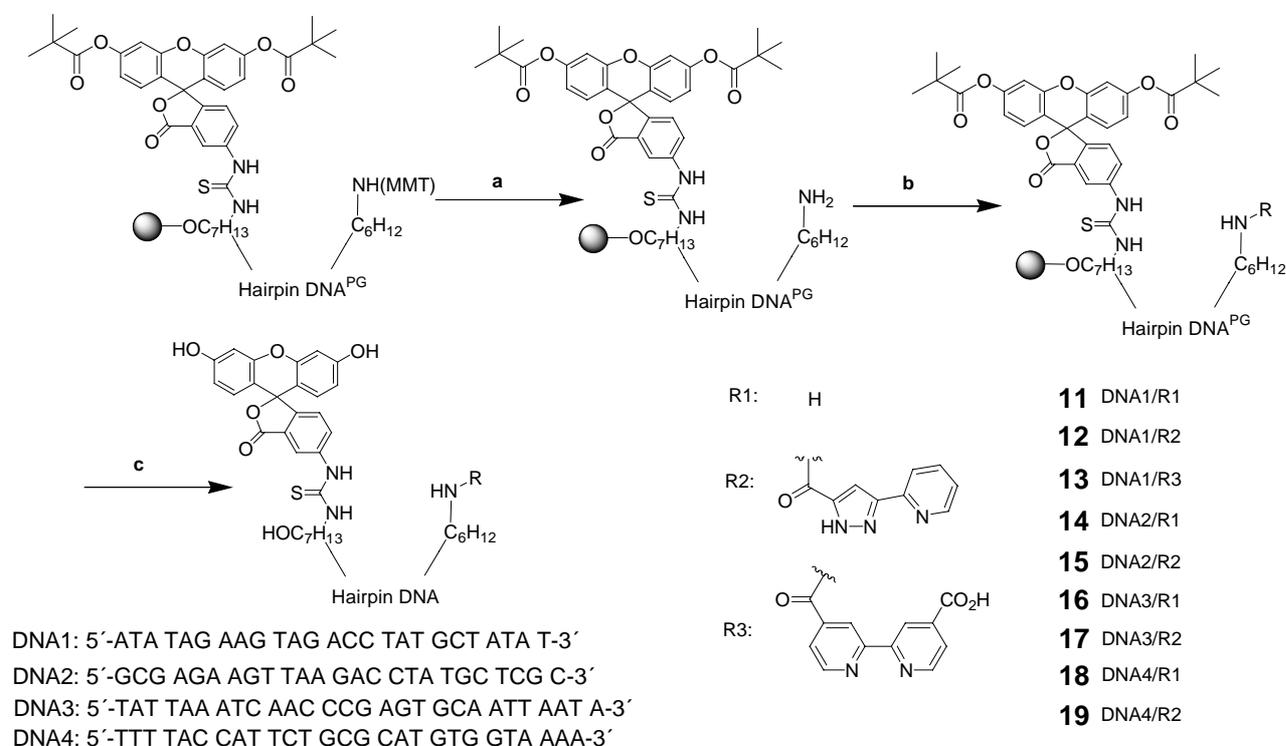
Um die Ligandmodifikation am Carboxyende der PNA einzuführen, musste die Säurefunktion in eine Aminogruppe „umgewandelt“ werden. Zuerst wurde die an den Amin-Stickstoffen Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)- und Allyloxycarbonyl (Aloc)-geschützte Aminosäure Lysin analog Kapitel 3.2.1.1 an die Festphase gekoppelt (a). Durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin wurde eine freie Aminofunktion erhalten (b). An diese wurde bei der Synthese von **7** und **8** der Carboxy-funktionalisierte Ligand **1** mit einer HOBT/HBTU-Kopplung analog 3.2.1.1 als Amid gebunden (c). Bei der Synthese der PNA **9** wurde zuerst Bromessigsäurebromid addiert, dann das Bromid durch eine Aminofunktion des Cyclams nucleophil substituiert. Die freien Aminofunktionen wurden anschließend mit t-Butyloxycarbonyl (Boc) geschützt (d). Sowohl bei den PNAs **7** und **8** als auch bei der PNA **9** wurde dann die Aloc-Schutzgruppe mit Tetrakis-(triphenylphosphan)palladium (Pd(PPh₃)₄)/Triphenylphosphan (PPh₃) abgespalten (e). Anschließend wurde die PNA-Synthese am Syntheseautomaten durchgeführt, und die am C-Terminus modifizierten PNAs mit Trifluoressigsäure/m-Cresol von der Festphase abgespalten und mittels HPLC gereinigt.

Die unmodifizierte PNA **10** (siehe 3.4.2) wurde durch Abspaltung der PNA von der Festphase direkt nach der PNA-Synthese erhalten.

3.3 Synthese der metallgequenchten MB-DNAs

Durch Verknüpfung eines Chelat-Liganden mit dem 5'-Ende eines 3'-Fluorescein-modifizierten DNA-Hairpins wurden die metallgequenchten „Molecular Beacons“ dargestellt.

Für die Synthesen wurde von kommerziell erhältlichen Hairpin-DNAs an CPG-Festphasen der Firma Metabion ausgegangen, die 3'-Fluorescein- und 5'-Aminolink modifiziert waren. Durch Abspaltung der Monomethoxytrityl (MMT)-Schutzgruppe des 5'-Aminolinks mit Trichloressigsäure (a) und anschließender Umsetzung mit HOBT/HBTU-aktivierter Pyridyl-Pyrazolylcarbonsäure bzw. Bipyridindicarbonsäure (b) wurden die festphasengebundenen DNAs **11-19** erhalten. Abspaltung mit wässriger Ammoniak-Lösung (c) und HPLC-Reinigung lieferte die bifunktionalisierten MBs in guten Ausbeuten.



Schema 3.7: Synthese der MB-DNA-Konjugate **11-19**; a: Trichloressigsäure; b: HOBT/HBTU-aktivierte Ligand-Carbonsäure; c: NH_3 -Lösung, HPLC-Reinigung

Um die 5'-unmodifizierten Konjugate zu erhalten, wurden die kommerziell erhältlichen, Farbstoff-markierten DNAs vom polymeren Träger abgespalten und ebenfalls HPLC-gereinigt. Die Fraktionen mit einer Reinheit von über 90% wurden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur Verwendung bei -20°C unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Die Synthese des mit Tetramethylrhodamin (Tamra) und Pyridylpyrazolyl modifizierten Oligonucleotids **31** wurde analog der Synthese der DNA **12** durchgeführt. Das 3'-Tamra- und 5'-Aminolink modifizierte Oligonucleotid wurde durch eine HOBT/HBTU-aktivierte Peptidkopplung mit **L1** verknüpft. Tamra ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei $\lambda_{\text{max}} = 559$ nm absorbiert und bei $\lambda_{\text{max}} = 583$ nm fluoresziert. In Abbildung 3.1 ist die Struktur des Oligonucleotids **31** abgebildet.

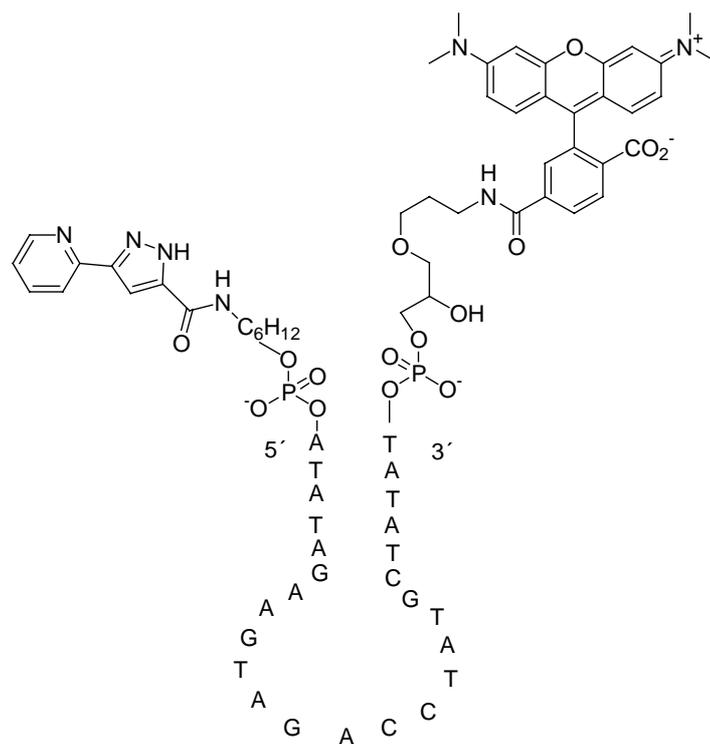
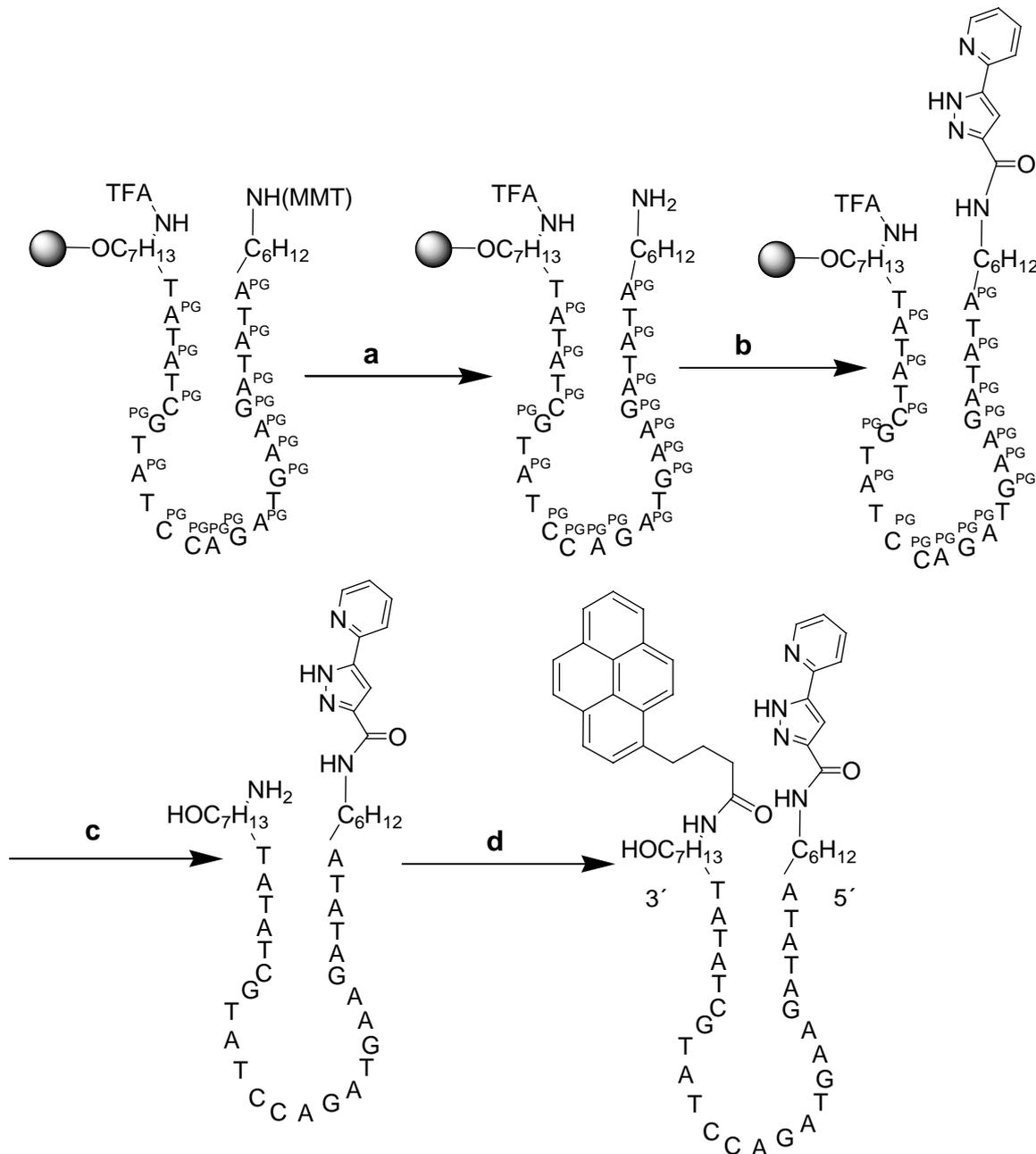


Abb. 3.1: Oligonucleotid **31**

Die Synthese des 5'-Pyrazolyl- und 3'-Pyren-modifizierten Oligonucleotids **32** erfolgte ausgehend von 5'- Monomethoxytrityl (MMT)- und 3'-Trifluoracetat (TFA)-geschützter zweifach Aminolink-modifizierten, festphasengebundenen DNA. In Schema 3.8 ist die Synthese abgebildet.



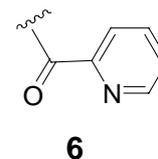
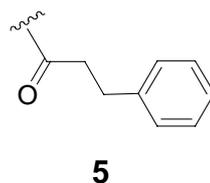
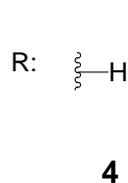
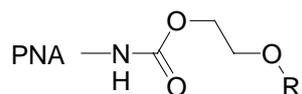
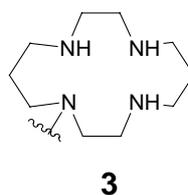
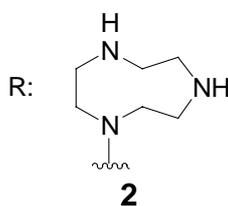
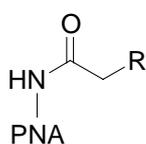
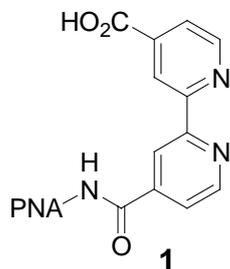
Schema 3.8: Synthese des Oligonucleotids **32**; a: Trichloressigsäure; b: HOBT/HBTU-aktivierte Ligand-Carbonsäure; c: NH₃-Lösung, HPLC-Reinigung; d: Pyren-carbonsäure-NHS-Ester, HPLC-Reinigung

Zuerst erfolgte die Abspaltung der MMT-Schutzgruppe mit Trichloressigsäure (a), anschließend wurde die Addition des Liganden durch eine HOBT/HBTU-aktivierte Kupplung (b) durchgeführt. Nach Abspaltung des Oligonucleotids vom festen Träger mit Ammoniak

und HPLC-Reinigung des Zwischenprodukts (c), wurde die N-Hydroxysuccinimidester-modifizierte Pyren-carbonsäure in einer Lösung Wasser/DMF bei pH 9 selektiv an die aliphatische Aminogruppe addiert. Durch HPLC-Reinigung erfolgte die Trennung des Produkts von Reagenzien und Nebenprodukten.

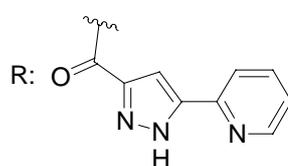
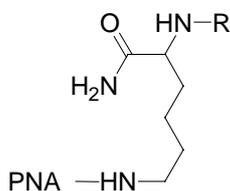
3.4 Übersicht über die dargestellten PNAs und DNAs

3.4.1 N-modifizierte PNAs

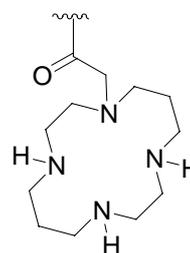


PNA: N'-TCA CAA CTA-Lys-C'

3.4.2 C-modifizierte PNAs



7 $n=1$ **8** $n=3$

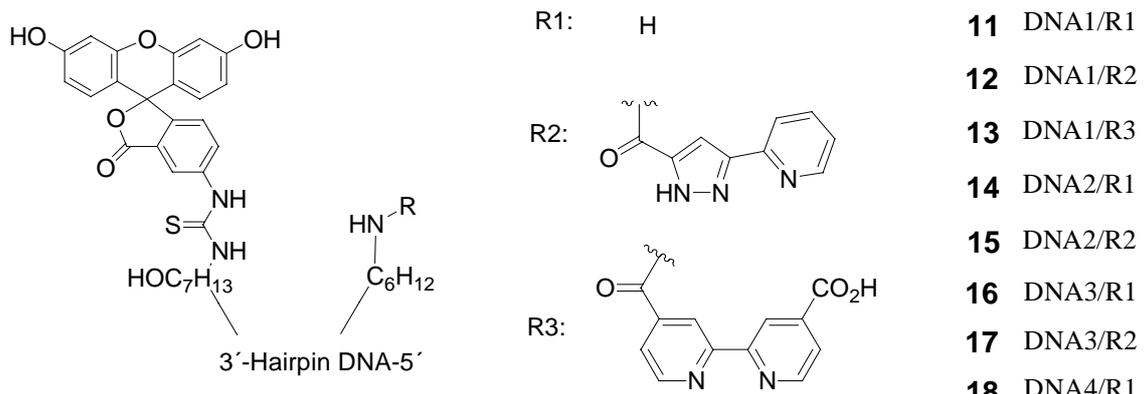


9 $n=1$

PNA: N'-(Lys) $_{n=1,3}$ GGA TGG A-C'

PNA **10**: N'-Lys-GGA TGG A-C'

3.4.3 Übersicht über die dargestellten anorganischen „Molecular Beacons“



DNA1: 5'-ATA TAG AAG TAG ACC TAT GCT ATA T-3'

DNA2: 5'-GCG AGA AGT TAA GAC CTA TGC TCG C-3'

DNA3: 5'-TAT TAA ATC AAC CCG AGT GCA ATT AAT A-3'

DNA4: 5'-TTT TAC CAT TCT GCG CAT GTG GTA AAA-3'

30: Fluorescein-5'-ATA TAG AAG TAG ACC TAT GCT ATA T-3'-Dabcyl

31: R2-5'-ATA TAG AAG TAG ACC TAT GCT ATA T-3'-Tamra

32: R2-5'-ATA TAG AAG TAG ACC TAT GCT ATA T-3'-Pyren

3.4.4 Übersicht über die eingesetzten DNAs

3.4.4.1 Reaktionen am DNA-Templat (kursiv = mismatch-Basenpaarung)

20: 5'-TAG TTG TGA TCC ATC C-3'

21: 5'-TAG TTG TGA TCT ATC C-3'

22: 5'-TAT TTG TGA TCC ATC C-3'

3.4.4.2 Metallgequenchte MB (kursiv = mismatch-Basenpaarung)

23: 5'-ATA TAG CAT AGG TCT ACT TCT ATA T-3'

24: 5'-CAT AGG TCT ACT T-3'

25: 5'-CAT ATG TCT ACT T-3'

26: 5'-GCG AGC ATA GGT CTT AAC TTC TCG C-3'

27: 5'-CAT AGG TCT TAA CTT-3'

28: 5'-CAT AGG TTT TAA CTT-3'

29: 5'-ATT GCA CTC GGG TTG ATT-3'

4 PNA/DNA- und DNA/DNA-Hybridisierungsexperimente

4.1 Einführung in die Hybridisierungsexperimente

Mit den Hybridisierungsexperimenten wurde die thermodynamische Stabilität der Duplices bestimmt. Der Schmelzpunkt (T_m -Wert) gibt die Temperatur wieder, bei der 50% der Oligonucleotide als Duplices vorliegen. Der T_m -Wert wurde ermittelt, indem die Abhängigkeit der Absorption von der Temperatur photometrisch bei $\lambda = 260$ nm verfolgt wurde. Anschließend wurde der T_m -Wert aus dem Wendepunkt der erhaltenen Kurve bestimmt. Die Schmelzpunkte sind Mittelwerte aus mindestens vier Messzyklen. Zur Untersuchung des Einflusses von Kupfer(II)-Ionen auf den Schmelzpunkt wurde die gewünschte Metallsalzkonzentration zusätzlich eingestellt.

Da Schmelzpunkte die Stabilität der Duplices wiedergeben, stellen sie die maximale Reaktionstemperatur bei den DNA templatgesteuerten Reaktionen (Kapitel 5) dar. Auch geben sie Hinweise auf die Reaktionsgeschwindigkeiten in Anwesenheit von mismatch-DNAs und lassen eine Abschätzung auf die zu erwartenden Umsätze zu.

Bei der DNA-Sequenzerkennung (Kapitel 6) kann anhand der Schmelzpunkte die Sequenz des Stamms bzw. des Loops der Haarnadel-Struktur und durch die Schmelztemperaturen der Hybride die mismatch-Diskriminierung optimiert werden.

4.2 PNA/DNA-Hybridisierungen

Die PNA/DNA-Hybridisierungsexperimente zeigten häufig einen weiten Schmelzbereich. Die Schmelztemperaturen waren dementsprechend nur schwer zu ermitteln und ihr Fehler ist groß. Die Schmelzexperimente wurden in Lösungen, die 2 μ M PNA, 2 μ M DNA, 10 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer und 50 mM NaCl enthielten, durchgeführt. Um die Löslichkeit der PNAs zu erhöhen, wurden in manchen Fällen auch Schmelzpunkte in wässriger Lösung mit 20% Acetonitril gemessen. Sollten die Schmelzpunkte in Abhängigkeit der Kupferkonzentration ermittelt werden, wurden entsprechende Mengen Kupfer(II)sulfat zugegeben.

4.2.1 PNA/DNA-Hybridisierungen in wässriger Lösung

Die Schmelzpunkte der am C-Terminus Ligand-modifizierten PNAs mit komplementärer DNA unterschieden sich nicht wesentlich von denen der unmodifizierten PNAs. Die Schmelztemperatur der unmodifizierten PNA **10** betrug $56.2 \pm 2^\circ\text{C}$ (Experiment 12), die Pyridylpyrazolyl- (PNA **7**) bzw. Cyclam-Modifikation (PNA **9**) destabilisierten die Duplex leicht (Experiment 7 bzw. 9).

Modifikationen am N-Terminus der PNA führten teilweise zu einer Abnahme der Schmelztemperatur um bis zu 6.3°C (PNA **4**, Experiment 4). Der Schmelzpunkt der unmodifizierten 5'-TCA CAA CTA-Lys 3'-PNA liegt nach Untersuchungen von Dr. Andriy Mokhir bei 54°C . Ein großer Unterschied wird durch die Anzahl der Lysin-Aminosäuren, die zur besseren Löslichkeit der PNAs führen, hervorgerufen. Beispielsweise unterschieden sich die Schmelzpunkte der Pyridylpyrazolyl-modifizierten PNAs **7** mit einem Lysin und **8** mit drei Lysinen um $9.4 \pm 4^\circ\text{C}$ (Experiment 7 und 9). Dies ist auf eine zusätzliche Stabilisierung der Duplices durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen den protonierten Lysinen und der negativ geladenen DNA zurückzuführen. Die Schmelzpunkte mit DNA mit einer Fehlbasenpaarung lagen $18 \pm 2^\circ\text{C}$ (PNA **7**, **8**, Experiment 8, 10) bzw. $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (PNA **6**, Experiment 6) unter den mit komplementärer DNA gemessenen. Die PNA/DNA mismatch-Diskriminierung ist generell höher als bei DNA/DNA-Hybridisierungen.

Nr.	DNA	PNA	T_m ($^\circ\text{C}$)
1	20	1	53.0
2	20	2	56.1
3	20	3	54.2
4	20	4	47.7
5	20	6	50.7
6	22	6	27.1
7	20	7	56.5
8	21	7	38.1
9	20	8	65.9
10	21	8	47.1
11	20	9	55.2
12	20	10	56.2

Tab. 4.1: Schmelzpunkte der PNAs/DNAs in wässriger Lösung; $[DNA] = 2 \mu\text{M}$; $[PNA] = 2 \mu\text{M}$; $[MOPS \text{ pH } 7] = 10 \text{ mM}$; $[NaCl] = 50 \text{ mM}$; $\Delta T_m \pm 2^\circ\text{C}$

4.2.2 PNA/DNA-Hybridisierungen in Wasser/Acetonitril 5:1

PNAs zeigen manchmal eine schlechte Löslichkeit in Wasser. Durch Verwendung von Wasser/Acetonitril-Mischungen ist eine Stabilisierung der PNAs in Lösung möglich. Durch

die unpolare Umgebung veränderten sich jedoch die Schmelzpunkte. Wegen der destabilisierenden Wirkung des Acetonitrils waren die gemessenen Schmelztemperaturen ca. 7°C tiefer als bei vergleichbaren Messungen in reinem Wasser. In Experiment 16 (Tabelle 4.2) nahm die Schmelztemperatur der Ester-modifizierten PNA **6** im Laufe der Messung ab und näherte sich dem Schmelzpunkt des Alkohols. Dies deutet auf eine langsame kupferkatalysierte Hydrolyse der PNA **6** hin. MALDI-TOF-Untersuchungen ergaben nach Beendigung des Experiments eine 100%ige Hydrolyse des Esters.

Nr.	DNA	PNA	T _m (°C)	Cu(II)SO ₄	Bemerkungen
13	20	4	36.0		
14	20	6	36.7		
15	21	6	16.1		
16	20	6	37.9	2µM	Hydrolyse
17	20	7	49		
18	22	7	30.8		
19	20	8	58.6		
20	22	8	41.4		
21	20	8	60.1	2µM	

Tab. 4.2: Schmelzpunkte der PNAs/DNAs in 20%iger acetonitrilischer Lösung; [DNA] = 2 µM; [PNA] = 2 µM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; ΔT_m ± 2°C

4.2.3 Hybridisierungsexperimente von PNA/DNA in wässriger Lösung in Gegenwart von Kupfer(II)sulfat

Um den Effekt von Kupfer(II)-Ionen auf Ligand-modifizierte PNAs zu untersuchen, wurden entsprechende Kupfersulfatmengen zugegeben (Tabelle 4.3). Die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen verbreiterte den Schmelzbereich noch zusätzlich und machte die Bestimmung der Schmelztemperaturen noch problematischer. Bei der Ester-modifizierten PNA **6** (Experiment 25) war eine Abnahme der Schmelztemperaturen mit zunehmender Anzahl der Messzyklen festzustellen, was, analog Experiment 16, auf eine Zersetzung des Esters hinweist. MALDI-TOF-Kontrolle am Ende des Experiments zeigte nahezu vollständige Hydrolyse des Esters. Die Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen hat, abgesehen von Experiment 26 und 28, nur einen geringen Einfluss auf die Schmelzpunkte.

Die Schmelztemperaturen der Pyridylpyrazolyl-funktionalisierten PNAs **7** und **8** erhöhten sich deutlich nach Zugabe eines Äquivalents Kupfer(II)-Salz. Ein Messfehler kann aufgrund des breiten Schmelzbereichs nicht ausgeschlossen werden.

Nr.	DNA	PNA	T _m	Kupfer	Bemerkungen
	20	3	54.2		
22	20	3	52.9	2μM	
23	20	3	52.8	4μM	
	20	4	47.7		
24	20	4	45.7	2μM	
	20	6	50.7		
25	20	6	47.0	2μM	Hydrolyse
	20	7	56.5		
26	20	7	67.8	2μM	
27	20	7	57.1	4μM	
	20	8	65.9		
28	20	8	72.5	2μM	
	20	9	55.2		
29	20	9	56.7	2μM	
30	20	9	54.5	4μM	

Tab. 4.3: Schmelzpunkte der PNAs/DNAs mit Kupfer(II)sulfat; [DNA] = 2 μM; [PNA] = 2 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; ΔT_m ± 2°C

4.3 DNA/DNA-Hybridisierungen

Die DNA/DNA-Hybridisierungsexperimente weisen eine scharfe Schmelztemperatur auf. Die Schmelzexperimente wurden, falls nicht anders angegeben, in Lösungen, die 1 μM modifiziertes Oligonucleotid, 1 μM unmodifizierte DNA, 10 mM MOPS-Puffer und 100 mM NaCl enthielten, durchgeführt. Sollten die Schmelzpunkte in Abhängigkeit der Kupferkonzentration ermittelt werden, wurden entsprechende Mengen Kupfersulfat zugegeben.

Die Schmelztemperatur der Hairpin-Struktur des Oligonucleotids **12** lag bei 38.2 ± 1°C (Experiment 31). Nach Zugabe von vollständig komplementärer DNA **23** wurde eine Duplex-Schmelztemperatur von 55.7 ± 1°C gemessen (Experiment 33). Die Zugabe von Kupfer(II)sulfat hatte auf die Schmelztemperatur der Substanz **12** nur geringe Auswirkung.

Nr.	Oligo-DNA	DNA	Cu	T _m (°C)
31	12	-	-	38,2
32	12	-	5µM	37.3
33	12	23	-	55,7
34	12	23	5µM	58.0
35	12	23	50µM	53.8
36	-	23	-	29.3
37	-	23	5µM	29

Tab. 4.4: Schmelzpunkte der Oligo-DNA **12**/DNA **23**; [DNA **12**, **23**] = 1 µM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 100 mM; $\Delta T_m \pm 1^\circ\text{C}$

Da Oligonucleotid **11** nur in geringer Menge verfügbar war, wurden die Schmelzpunktmessungen mit 0.2 µM Substanz, 10 mM MOPS pH7 und 100 mM NaCl durchgeführt. Zum Vergleich wurden auch einige Schmelztemperaturen von **12** nochmals mit 0.2 µM Substanz bestimmt. Sie stimmten innerhalb der Fehlergrenzen mit den bei einer Substanzkonzentration von 1 µM gemessenen Werten überein.

Die Schmelzpunkte der nicht mit einem Liganden modifizierten DNAs waren denen der modifizierten Oligonucleotide sehr ähnlich. Auch beim unmodifizierten Oligonucleotid **11** hatte die Kupferzugabe kaum Auswirkungen auf die Schmelztemperatur. Die Schmelzpunkte von **11** und **12** mit DNA **24**, die nur komplementär zur Loop-Sequenz ist, waren gleich oder kleiner als die Schmelztemperaturen der Haarnadel-Struktur. Die Fluorescein-modifizierten DNAs **11** und **12** besaßen eine um 8 – 9°C höhere Schmelztemperatur als die vergleichbare DNA **23**.

Nr.	Oligo-DNA	DNA	Cu	T _m (°C)
38	11	-	-	37.0
39	11	-	1µM	37.0
40	11	24	-	37.6
41	11	24	1µM	36.0
42	11	23	1µM	56.0
43	11	23	1µM	55.7
44	12	-	-	37,6
45	12	24	-	36.8
46	12	24	1µM	36.7
47	12	23	-	55.7

Tab. 4.5: Schmelzpunkte der Oligo-DNAs **11** und **12** mit DNAs **23** und **24**; [DNA **11**, **12**, **23**, **24**] = 0.2 µM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 100 mM; $\Delta T_m \pm 1^\circ\text{C}$

Schmelzpunktexperimente mit den DNAs **14** und **15** (Nr. 48 – 53) wurden in Lösungen, die 1 µM modifizierte DNA **14** oder **15**, 1 µM komplementäre DNA **26**, 10 mM MOPS-Puffer

und 50 mM NaCl enthielten, durchgeführt. Die Schmelztemperatur der Haarnadel (Hairpin)-Struktur lag aufgrund des GC-reichen Stamms noch über dem der DNA **12**.

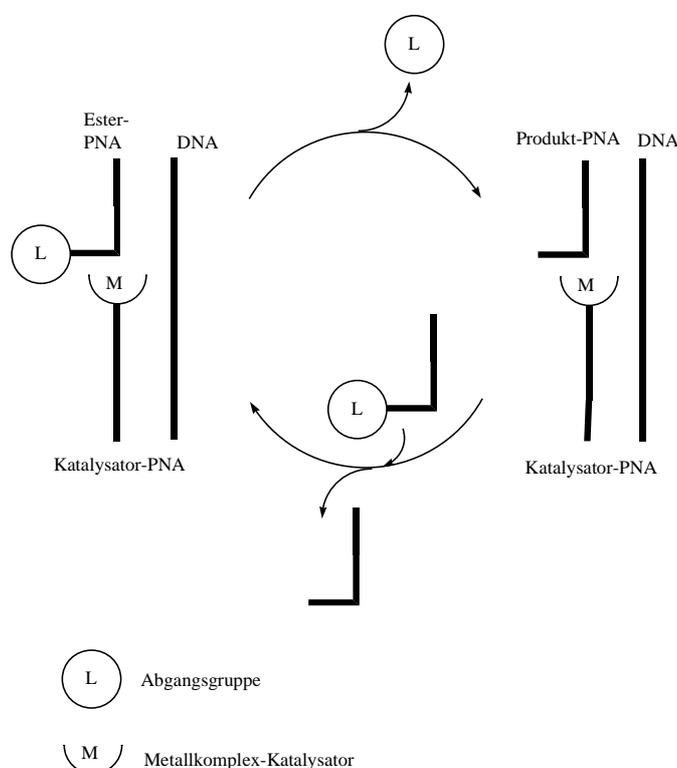
Nr.	Oligo-DNA	DNA	Cu	T _m (°C)
48	14	-	-	45.5
49	14	-	5µM	47.5
50	14	26	5µM	64.7
51	15	-	-	44.6
52	15	-	5µM	48.7
53	15	26	5µM	61.8

Tab. 4.6: Schmelzpunkte der Oligo-DNAs **14** und **15** mit DNA **26**; [DNA **14**, **15**, **26**] = 1 µM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; $\Delta T_m \pm 1^\circ\text{C}$

5 Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat

5.1 Einführung in die DNA-templatgesteuerten Spaltreaktionen

In den Experimenten sollte die DNA-templatgesteuerte Kupfer(II)-katalysierte Esterspaltung untersucht werden. Dabei werden, wie in Schema 5.1 gezeigt, durch den Templat-Effekt der DNA ein PNA-Ester-Konjugat (Ester-PNA) und ein PNA-Katalysator-Konjugat (Katalysator-PNA) in räumliche Nähe gebracht. In Anwesenheit komplementärer DNA wird eine Beschleunigung der Reaktion, die die Ester-PNA in die Produkt-PNA überführt, erwartet. Im Gegensatz zu templatvermittelten Reaktionen, die Nucleotide verbinden (siehe Kapitel 1.2), haben Substrat- und Produkt-PNA ähnliche Affinitäten zum DNA-Templat, und somit wäre eine katalytische Umsetzung möglich.



Schema 5.1: Katalysezyklus der metallkatalysierten Reaktion am DNA-Templat

5.2 Vorversuche

Die quantitative Analyse der PNA-Spaltreaktion durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MS) setzt voraus, dass die Signalintensitäten der Ausgangs- und der Produkt-PNA mit den Konzentrationen in der Lösung korrelieren. Dazu müssen die Flugeigenschaften der Edukt- und Produkt-PNAs ähnlich sein, oder zumindest in einer konstanten Relation zueinander

stehen. Um dieses zu Überprüfen, wurden Alkohol-PNA **4** und Ester-PNA **6** in 1:1, 1:2 und 1:3 Verhältnissen gemischt und mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert. Die mit MALDI-TOF-MS erhaltenen Intensitäten stimmten mit einem Fehler von maximal $\pm 15\%$ gut mit den Mischungsverhältnissen überein. Durch diese Voruntersuchung konnte gezeigt werden, dass sich die MALDI-TOF-MS-Analyse für die schnelle quantitative Analyse ($< 1\text{min}$) des Verlaufs dieser PNA-Spaltreaktion eignet.

In einem weiteren Vorexperiment sollte untersucht werden, ob sich Metallionenkomplexe der mit Liganden modifizierten PNAs unter Reaktionsbedingungen bilden und ob ihre Detektion MALDI-TOF massenspektrometrisch gelingt. Dabei wurden die mit Liganden modifizierten PNAs **1**, **2**, **3**, **7**, **8** und **9** in verschiedenen Verhältnissen mit Metallsalzen 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, mit 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Matrix) getüpfelt und mit MALDI-TOF-MS gemessen. Es gelang, die Kupfer(II)- und Nickel(II)-Komplexe der PNAs **2**, **3** und **9** mit MALDI-TOF massenspektrometrisch nachzuweisen. Von den PNA-Konjugaten **1**, **7** und **8** konnte trotz eines 100-fachen Metallionenüberschusses kein PNA-Metallionenaddukt detektiert werden. Durch den hohen Überschuss an 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure-Matrix wurde vermutlich bei Liganden mit kleiner Bindungskonstante das Metallion von der Matrix komplexiert. Mit Nickel(II)nitrat konnten bei einer 1:1 Mischung des Metallsalzes mit den Triazacyclononan- bzw. Cyclam-modifizierten PNAs **2** und **3** bis zu 90% Komplex nachgewiesen werden. Mit Kupfer(II)-Ionen konnten jedoch nur ca. 75% als Komplex mit **3** erhalten werden (Abb. 5.1). Durch eine Erhöhung der Kupferkonzentration auf das 10-fache der Ligandenkonzentration wurde die relative Intensität des Komplexsignals auf ca. 90% gesteigert. Die vollständige Unterdrückung des Signals für unkomplexiertes **3** gelang auch mit einem 100-fachen Überschuss des Kupfer(II)-Metallsalzes nicht.

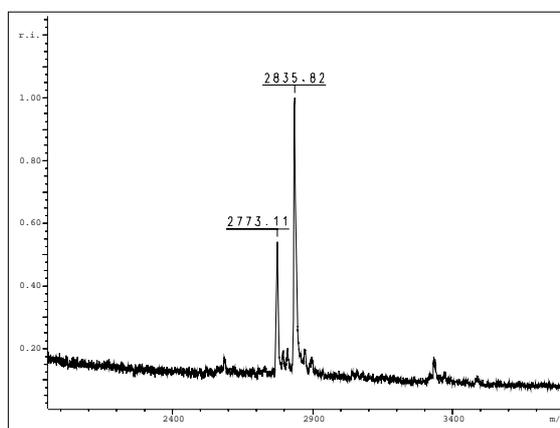
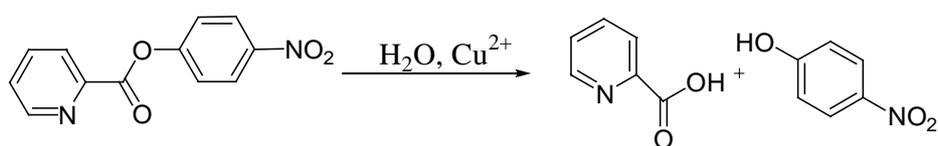


Abb. 5.1: MALDI-TOF Spektrum der PNA **3** ($M=2773$) und des Kupferkomplexes von **3** ($M=2836$)

Einen ersten Eindruck von der Kupfer-katalysierten Spaltung von Picolinsäureestern, die als reaktive Komponenten der Substrat-PNA eingesetzt werden, sollten Vorexperimente zur Hydrolyse des Picolinsäure-p-nitrophenylesters liefern. Wie in Schema 5.2 gezeigt, entsteht als Produkt p-Nitrophenol. Der Reaktionsverlauf kann leicht durch UV-Vis-Messungen des bei pH 7 gebildeten, intensiv gelb gefärbten p-Nitrophenolats verfolgt werden.



Schema 5.2: Kupferkatalysierte Hydrolyse des Picolinsäure-p-nitrophenylesters

Es wurde die Hydrolysegeschwindigkeit einer $1 \cdot 10^{-5}$ M Picolinsäure-p-nitrophenylester-Lösung bei 25°C und pH 7 mit verschiedenen Kupferkonzentrationen bestimmt (Abb.5.2).

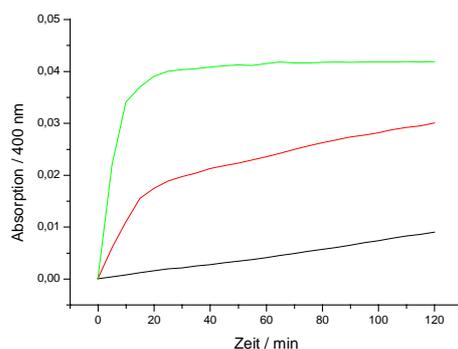


Abb. 5.2: Picolinsäure-p-nitrophenylester-Hydrolyse: Schwarz: $1 \cdot 10^{-5}$ M Ester; rot: + $1 \cdot 10^{-6}$ M Kupfer(II)sulfat; grün: + $1 \cdot 10^{-5}$ M Kupfer(II)sulfat; 10 mM MOPS pH 7; $T=25^\circ\text{C}$

Bei Zusatz von Kupfer(II)-Ionen war eine deutliche Beschleunigung der Hydrolysereaktion festzustellen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Kupfer(II)-Ionen-katalysierten Reaktion lag um einen Faktor 70 über der der Hintergrundreaktion. Nach 5 Umsätzen war eine deutliche Inhibierung der Katalyse durch Komplexierung des Kupfers mit entstandener Picolinsäure festzustellen.

Die Spaltbarkeit der PNA-konjugierten Ester wurde durch Zugabe von unterschiedlichen Metallsalzlösungen zu den PNAs **5** und **6** in einem weiteren Vorexperiment untersucht. Während der Picolinsäureester **6** bei Zugabe äquimolarer Mengen Kupfer(II)- oder Nickel(II)-Metallsalz bei neutralem pH rasch hydrolysiert wurde, zeigte der Phenylpropansäureester **5** erst nach 24 h bei 50°C mit Nickel(II)-, Cobalt(III)- und Kupfer(II)-Metallsalzen eine

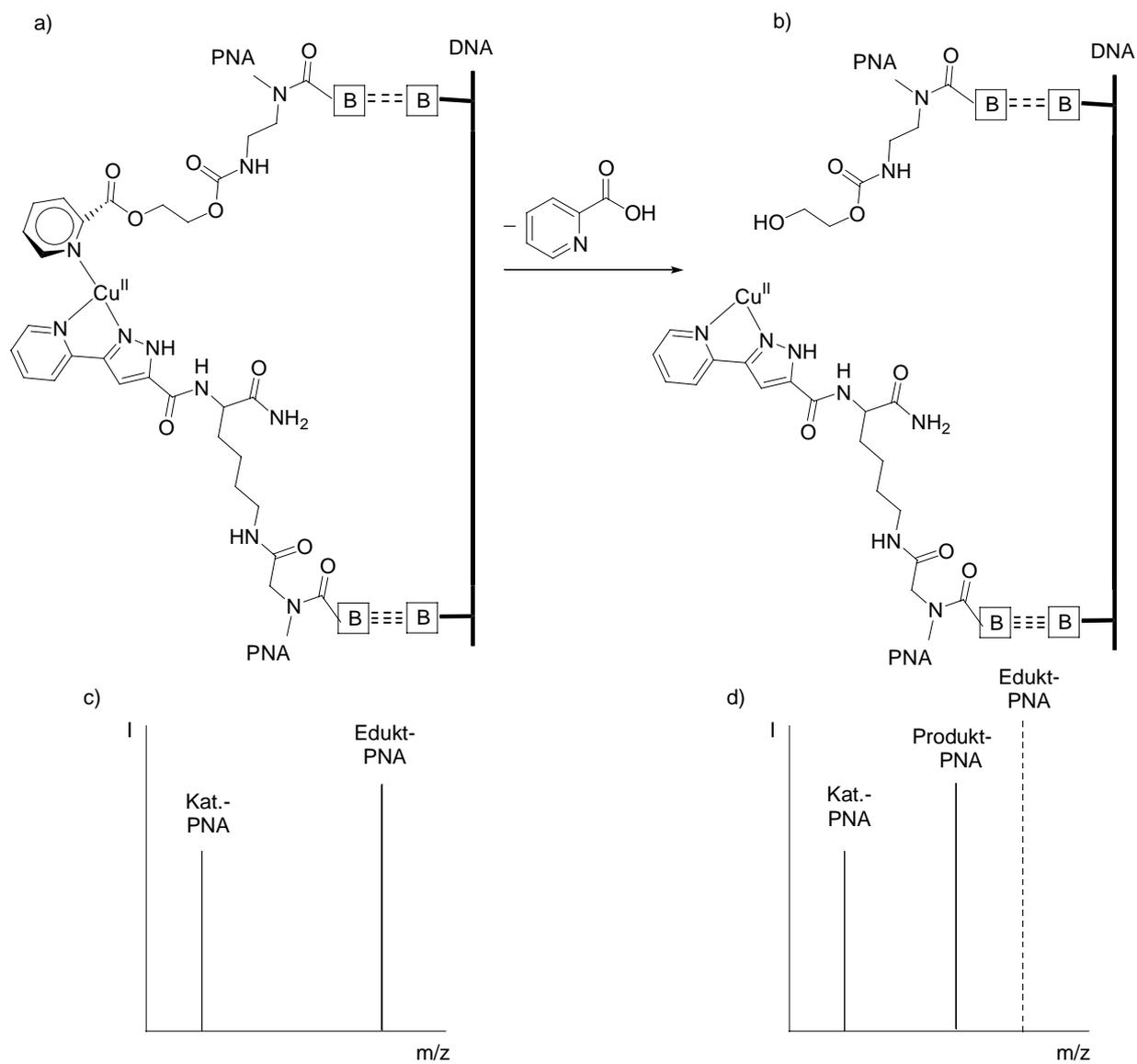
messbare Umsetzung. Eine metallkomplexierende Ankergruppe war demnach für die rasche Hydrolyse der Ester entscheidend.

5.3 Durchführung der Spaltexperimente

Als Substrate dienten die estermodifizierten PNAs **5** und **6** (Edukt-PNAs), die zur Produkt-PNA **4** umgesetzt wurden. Als Katalysator-PNAs wurden die am 3'-Ende modifizierten PNAs **7**, **8** und **9** überprüft. Es ist bekannt, dass Kupferkomplexe Esterhydrolysen um bis zu 10^9 fach beschleunigen können^[43]. Durch den Templateffekt komplementärer DNA sollten Metallkomplex und Carbonsäureester in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden, so dass die Esterhydrolyse wesentlich schneller ablaufen kann, als bei Abwesenheit des Templats. In Schema 5.3 oben ist die Templat-gesteuerte, Kupfer(II)-vermittelte Esterhydrolyse skizziert.

Die Spaltreaktionen sollten durch quantitative MALDI-TOF-MS untersucht und durch HPLC bestätigt werden. Die Abnahme des Peaks der Edukt-PNAs (**5**: $[M+H^+] = 2753.8$; **6**: $[M+H^+] = 2726.7$) (Schema 5.3 unten, c) bei gleichzeitiger Zunahme des Peaks der Produkt-PNA (**4**: $[M+H^+] = 2620.5$) wurde verfolgt (Schema 5.3 unten, d).

Des Weiteren sollte der Einfluss von Fehlbasen (DNAs **21**, **22**) auf die Spaltselektivität sowie der katalytische Umsatz am DNA-Templat näher untersucht werden.



PNA **7,8**: N'-(Lys)_{1,3}GGA TGG A-(Ligand)-C'
 PNA **5,6**: N'-(Ester)-TCA CAA CTA(Lys)₃-C'
 PNA **4**: N'-(HO)-TCA CAA CTA(Lys)₃C'

DNA **20**: 5'-TAG TTG TGA TCC ATC C-3'
 DNA **21**: 5'-TAT TTG TGA TCC ATC C-3'
 DNA **22**: 5'-TAG TTG TGA TCT ATC C-3'

Schema 5.3: Kupfer(II)-vermittelte Esterhydrolyse am DNA-Templat (oben) und massenspektrometrische Reaktionskontrolle (schematisch, unten)

5.4 Kupfer(II)-induzierte Hydrolyse der Phenylpropansäureester-PNA 5 am DNA-Templat

Der PNA-Ester **5** wurde auf eine DNA-templatgesteuerte Esterspaltung hin untersucht. Die Reaktionslösungen enthielten folgende Konzentrationen: PNA-Ester **5** (1 μM), Ligand-modifizierte PNAs **9** oder **7** (1 μM), Kupfer(II)sulfat oder Nickel(II)nitrat (1 μM) und komplementäre DNA **23** (0 bzw. 1 μM). Die Reaktionstemperatur betrug 40°C. Des Weiteren enthielten die Lösungen NaCl (50 mM) und auf pH 7 eingestellten MOPS-Puffer (10 mM).

Mit dem Nickel(II)-Komplex der PNA **9** wurde in Anwesenheit komplementärer DNA **20** nach 20 Tagen bei 37°C eine Esterspaltung von 80% beobachtet. Im Kontrollexperiment ohne DNA konnte nach 20 Tagen Reaktionszeit eine Spaltung von 65% beobachtet werden. Mit PNA **7** lag die Zeit bis zur vollständigen Hydrolyse bei 15 Tagen. Im Laufe der Reaktion wurde jedoch eine Abnahme von **7** durch Adsorption an den Reaktionsgefäßen beobachtet. Die lange Reaktionsdauer und die geringe Selektivität machten diesen Ester- und die Cyclam-modifizierte PNA **9** für Reaktionen am DNA-Templat uninteressant.

5.5 Kupfer(II)-induzierte Hydrolyse der Picolinsäureester-PNA 6 am DNA-Templat

Durch den Einsatz der Picolinsäureester-PNA **6**, die über eine „Anker-Gruppe“ am Ester verfügt, sollte in Kombination mit den Pyridylpyrazolyl-modifizierten PNAs **7** und **8** die Reaktionsgeschwindigkeit und die Selektivität verbessert werden. Es ist literaturbekannt, dass Picolinsäureester^[44] bei Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen viel schneller hydrolysieren als Ester ohne zusätzliche Donorgruppen.

Die Spaltreaktionen wurden in Anwesenheit komplementärer DNA **20** (1 μM) und mit den DNAs **21** und **22** (je 1 μM) mit je einer Fehlbasenpaarung bzw. in Abwesenheit von DNA durchgeführt. DNA **22** weist eine Fehlbase (T3) gegenüber der PNA **7** und DNA **21** (T12) gegenüber PNA **6** auf. Die Reaktionstemperatur betrug 40°C, und die Spaltreaktionen wurden durch quantitative MALDI-TOF-MS untersucht und durch HPLC-Analyse bestätigt.

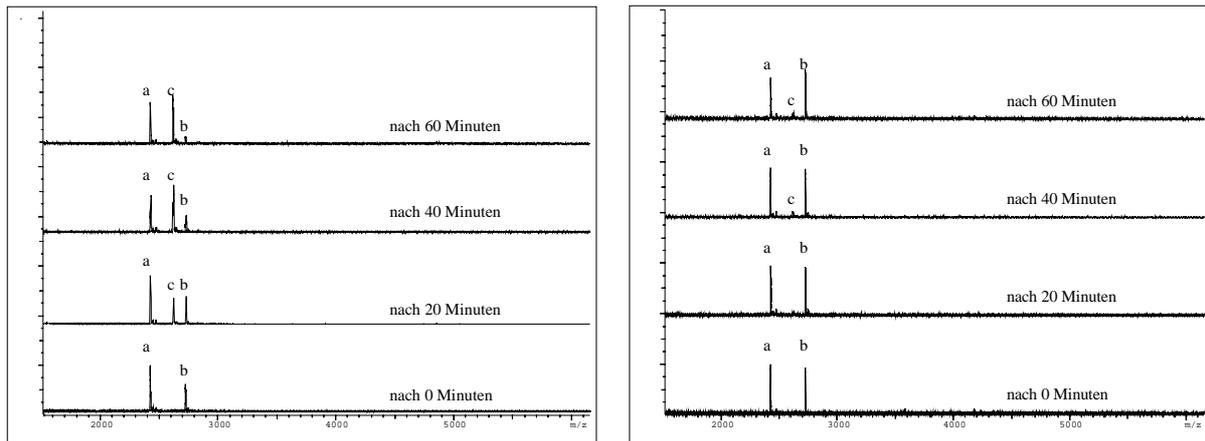


Abb.5.3: links: MALDI- und HPLC-Spektren mit match-DNA **20**; rechts: MALDI- und HPLC-Spektren mit mismatch-DNA **22**; a = PNA **7** ($[M+H^+]=2426.44$); b = PNA **6** ($[M+H^+]=2726.69$); c = PNA **4** ($[M+H^+]=2621.59$); 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, $T=40^\circ\text{C}$

In Abbildung 5.3 ist links die kupferkatalysierte Hydrolyse des PNA-Esters **6** in Anwesenheit der Ligand-modifizierten PNA **7** und komplementärer DNA **20** gezeigt, und rechts mit DNA **22**, die eine Fehlbasenpaarung besitzt (T statt G an Position 3). Die nach 0, 20, 40 und 60 Minuten aufgenommenen MALDI-Spektren zeigen, wie die Ester-PNA **6** = b ($M=2725.69$) zur Alkohol-PNA **4** = c ($M=2620.59$) hydrolysiert wurde, während die Metallkomplex-PNA **7** = a ($M=2425.44$) als Katalysator wirkte. In Anwesenheit komplementärer DNA **20** wurde nach 20 Minuten eine Esterhydrolyse von 38% und nach 60 min von 91% erreicht (Abb. 5.3, links), bei der Spaltreaktion mit DNA **22**, die an der Basenposition 3 eine Fehlbasenpaarung besitzt, nach 60 Minuten nur 8.6% und mit DNA **21**, bei der an Position 12 Cytosin durch Thymin substituiert ist, nach 60 Minuten 12%. Fasst man die Ergebnisse der unterschiedlichen Experimente zu einem Graphen zusammen, wird die 150fache Beschleunigung der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion durch den Templateffekt der komplementären DNA deutlich. Im Vergleich mit den DNAs mit einer Fehlbasenpaarung wird eine 7 bzw. 15fache Beschleunigung erreicht (Abb. 5.4).

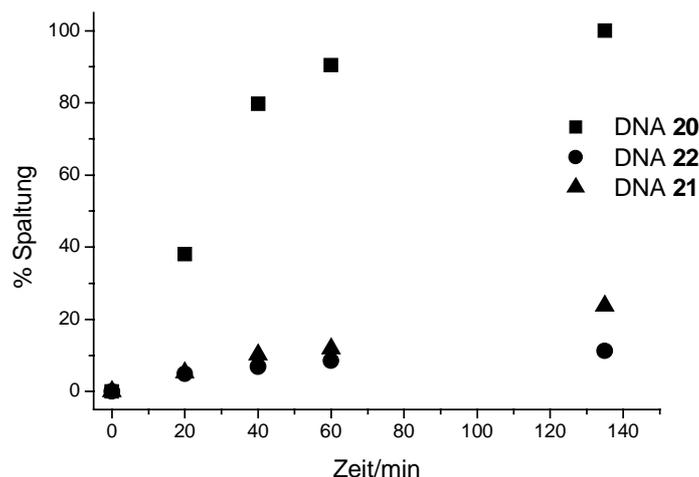


Abb.5.4: Esterspaltung mit komplementärer DNA **20**, und den DNAs **21**, **22** mit einer mismatch-Basenpaarung; 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, $T=40^{\circ}\text{C}$

Die verringerten Anfangsgeschwindigkeiten der Esterspaltungsreaktion (um den Faktor 15 bzw. 7 bei Reaktionen mit PNA **7**/DNA **22** und PNA **6**/DNA **21**) können als Folge der verringerten Stabilität der Fehlbasen-Duplex interpretiert werden: Die T_m -Werte betragen 50.7°C für PNA **6**/ DNA **20** gegenüber 27.1°C für PNA **6**/ DNA **21** (siehe Kapitel 4.3) und 56.5°C für PNA **7**/ DNA **20** gegenüber 38.1°C für PNA **7**/ DNA **22**.

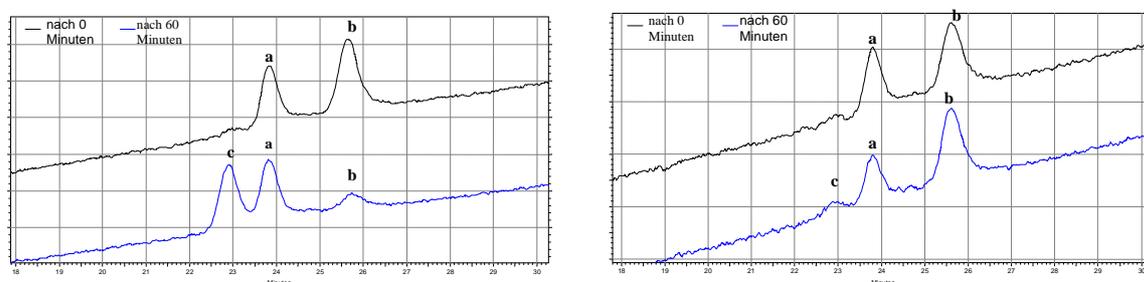


Abb. 5.5: HPLC-Spektren der Spaltexperimente mit DNA **20** (links) und DNA **22** (rechts) nach 0 und 60 Minuten; a: PNA **7** ($R_t = 23.8$ min); b: PNA **6** ($R_t = 25.7$ min); c: PNA **4** ($R_t = 22.8$ min); 10 mM MOPS pH 7, 50 mM NaCl, $T=40^{\circ}\text{C}$

Die MALDI-TOF-Ergebnisse sollten durch HPLC-Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 5.5). Die HPLC-Spektren der Spaltreaktionen der estermodifizierten PNA **6** mit der Kupfer(II)-PNA **7** und komplementärer DNA **20** oder DNA **22** mit einer Fehlbasenpaarung sind in Abbildung 5.5 nach einer Reaktionszeit von 0 und 60 Minuten dargestellt. Die Trennung der einzelnen PNA-Komponenten erfolgte an einer reversed-phase C-4 Säule bei $T = 49^{\circ}\text{C}$ mit den Laufmitteln A (Wasser, 0,1% TFA) und B (CH_3CN , 0,1% TFA). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, und die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte photometrisch bei $\lambda = 260$ nm.

Bei den Proben, die den Reaktionslösungen entnommen und sofort gemessen wurden bzw. bis zur Messung bei -20°C eingelagert wurden, konnten die Katalysator-PNA **7** bei einer Retentionszeit von $R_t = 23.8$ min sowie die estermodifizierte PNA **6** bei $R_t = 25.7$ min und das Hydrolyseprodukt, die Alkohol-PNA **4**, bei $R_t = 22.8$ min beobachtet werden. Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen bestätigten die der MALDI-TOF-MS-Analyse (Abb. 5.3) mit einem maximalen Fehler von $\pm 15\%$.

5.6 Kupfer(II)-katalysierte Hydrolyse der Picolinsäureester PNA **6** am DNA-Templat

Nachdem gezeigt wurde, dass bei stöchiometrischer Verwendung aller beteiligten Reaktionspartner die templatgesteuerte Esterspaltung wesentlich schneller ablief als die Hintergrundreaktion (Kap. 5.4), wurde nun die katalytische Umsetzung am DNA-Templat untersucht. Für die Experimente wurde die Ester-modifizierte PNA **6** in einem 5- bzw. 100fachem Überschuss eingesetzt. Die Konzentrationen der weiteren Komponenten betragen: PNA **7** ($1\ \mu\text{M}$), Kupfer(II)sulfat ($1\ \mu\text{M}$), NaCl ($50\ \text{mM}$) und MOPS-Puffer ($10\ \text{mM}$). Die Reaktionstemperatur betrug $T = 40^{\circ}\text{C}$.

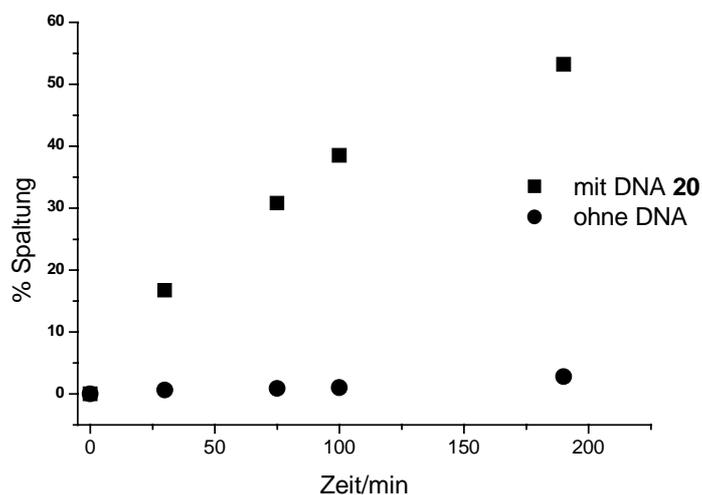


Abb. 5.6: Katalysierte Hydrolyse mit 5 Äq. Ester-PNA **6** ($5\ \mu\text{M}$), PNA **7** ($1\ \mu\text{M}$), CuSO_4 ($1\ \mu\text{M}$), $10\ \text{mM}$ MOPS pH 7 und $50\ \text{mM}$ NaCl, $T=40^{\circ}\text{C}$

Mit 5 Äquivalenten Ester-PNA **6** wurde nach ca. 3 Stunden eine 55%ige und nach 7 Stunden eine 90%ige Umsetzung erzielt (Abb. 5.6). Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion war in Anwesenheit komplementärer DNA **20** ($1\ \mu\text{M}$) immer noch 40-mal schneller als die der Hintergrundreaktion ohne DNA.

Mit 100fachem Überschuss der Ester-PNA **6** (Abb. 5.7) verlief die Reaktion in Anwesenheit der komplementären DNA **20** etwa doppelt so schnell wie die Hintergrundreaktion. Nach 23 Stunden Reaktionszeit wurden etwa 35 Äquivalente des Produktes **4** bezogen auf die DNA gebildet. Trotz der hohen Kupferbindungskonstante ($\log K=8 \text{ M}^{-1}$) der gebildeten Pyridin-2-carbonsäure wurde die Reaktion nur wenig durch Komplexierung des Kupfers inhibiert. Produktinhibierung durch die gebildete Alkohol-PNA **4** war ebenfalls gering, da die Schmelztemperatur der Edukt-PNA (50.7°C für **6**/ DNA **20**) die der Produkt-PNA (47.7°C für **4**/ DNA **20**) übertrifft (s. Kap. 4. 3).

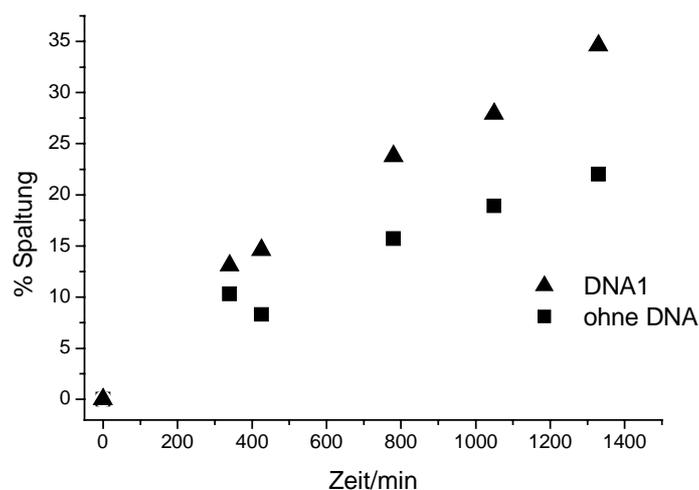


Abb. 5.7: Esterspaltung mit 100 Äq. Ester-PNA **6** ($100 \mu\text{M}$), PNA **7** ($1 \mu\text{M}$), CuSO_4 ($1 \mu\text{M}$), $10 \text{ mM MOPS pH } 7$ und 50 mM NaCl , $T=40^\circ\text{C}$

In der Tabelle 5.1 sind die durchgeführten Spaltexperimente in wässriger Lösung nochmals zusammenfassend dargestellt. Es sind die Konzentrationen der beteiligten Substanzen in μM angegeben. In den Reaktionslösungen waren außerdem $10 \text{ mM MOPS pH } 7$ und 50 mM NaCl . Die Reaktionstemperatur betrug 40°C .

	1	2	3	4	5	6	7	8
PNA 7 [μM]	1	1	1	1	1	1	1	1
PNA 6 [μM]	1	1	1	1	5	5	100	100
Cu ^{II} [μM]	1	1	1	1	1	1	1	1
DNA 20 [μM]	1				1		1	
DNA 22 [μM]		1						
DNA 21 [μM]			1					
Spaltung von PNA 6	38 % nach 20 Minuten	2.5 % nach 20 Minuten	5.2 % nach 20 Minuten	0.8 % nach 120 Minuten	38.6 % nach 100 Minuten	1 % nach 100 Minuten	16 % nach 400 Minuten	8 % nach 400 Minuten

Tabelle 5.1: Übersicht der Ester-PNA-Spaltungen an DNA-Templaten in wässriger Lösung

5.7 Spaltung von PNA-Estern am DNA-Templat in Lösungen mit einem Acetonitril-Anteil von 20%

Bei längeren Reaktionszeiten wurde bei den in Kapitel 5.6 beschriebenen Esterspaltungsexperimenten gelegentlich eine Konzentrationsabnahme der PNA 7 beobachtet, möglicherweise durch Adsorption an die Oberfläche der Reaktionsgefäße oder durch Ausfallen aus der Lösung. Deshalb wurde statt der mit nur einem Lysin modifizierten PNA 7 die PNA 8, zur besseren Wasserlöslichkeit mit 3 Lysinen modifiziert, benutzt. Außerdem wurde den Reaktionsmischungen 20% Acetonitril zugesetzt. Der Acetonitril-Anteil hatte erhebliche Auswirkungen auf die Schmelzpunkte der Hybride: Die Schmelztemperatur der PNA 8/DNA 20-Duplex betrug 58.6°C, die der PNA 6/DNA 20-Duplex jedoch nur 36.7°C (Kap. 4.2.2); letztere liegt sogar unter der Reaktionstemperatur von 40°C. Insgesamt wurde ein starker Rückgang der Schmelztemperaturen beobachtet und damit auch ein Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeiten.

In den Tabellen 5.2 a) und 5.2 b) sind die durchgeführten Experimente zusammenfassend dargestellt. Die Konzentrationen der beteiligten Substanzen sind in μM angegeben. Zu den Reaktionsmischungen wurde noch 20% Acetonitril, 10 mM MOPS pH 7 und 50 mM NaCl gegeben. Die Reaktionstemperatur lag bei 40°C.

	8	9	10	11	12	13
PNA 8 [μM]	1	1	1	1	1	1
PNA 6 [μM]	1	1	1	1	1	1
Cu ^{II} [μM]	1	1	1	1	1	1
DNA 20 [μM]	0.1			1		
DNA 22 [μM]		0.1			1	
DNA 21 [μM]			0.1			1
Spaltung	45 % nach 1800 Minuten	13 % nach 1800 Minuten	32 % nach 1800 Minuten	46.7 % nach 300 Minuten	3.8 % nach 1800 Minuten	14 % nach 1800 Minuten

Tabelle 5.2 (a): Übersicht der Ester-PNA-Spaltungen an DNA-Templaten in 20%iger Acetonitril-Lösung

	14	15	16
PNA 8 [μM]	1		1
PNA 6 [μM]	1	1	1
Cu ^{II} [μM]	1		
DNA 20 [μM]			
DNA 22 [μM]			
DNA 21 [μM]			
Spaltung	11 % nach 1800 Minuten	5.4 % nach 1800 Minuten	9.7 % nach 1800 Minuten

Tabelle 5.2 (b): Übersicht der Ester-PNA-Spaltungen an DNA-Templaten in 20%iger Acetonitril-Lösung

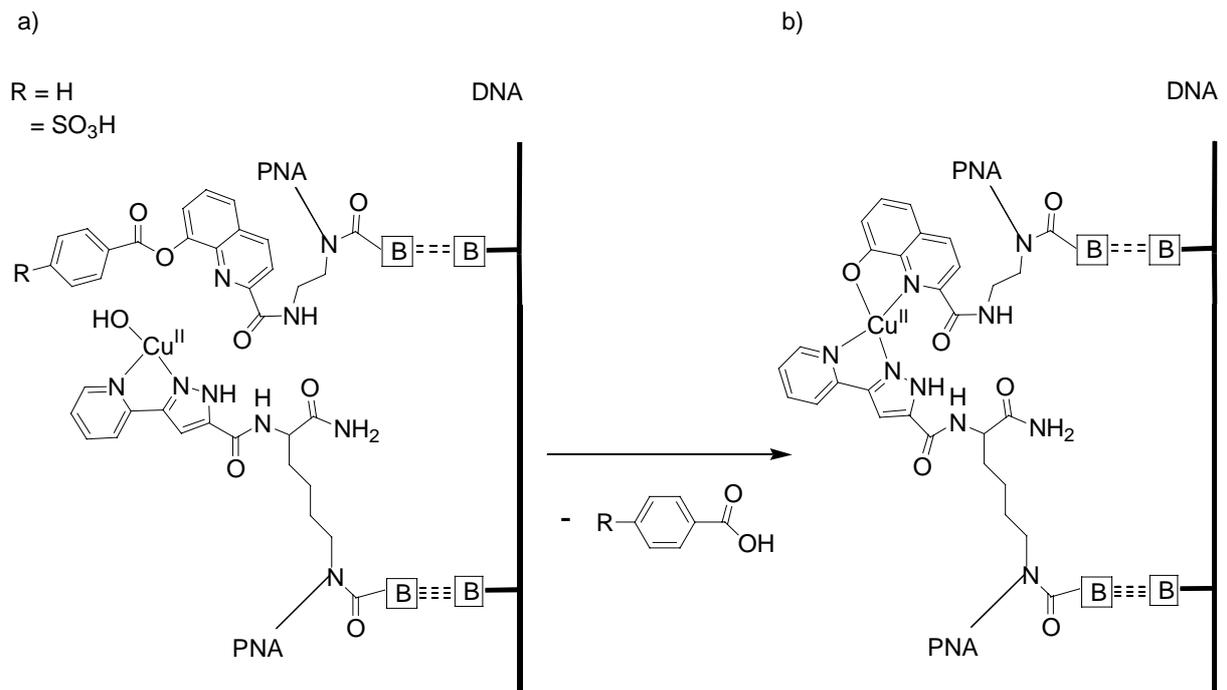
Die Reaktionsgeschwindigkeiten in acetonitrilischer Lösung waren generell langsamer als in wässriger Lösung. Beispielsweise war bei Reaktionen mit äquimolaren Konzentrationen der Reaktionspartner (Experimente Nr. 11-13) die Reaktionsgeschwindigkeit etwa um einen Faktor 10 niedriger. Es war jedoch weiterhin eine starke Fehlbasendiskriminierung zu beobachten, und durch den Templateffekt fand weiterhin eine starke Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der Hintergrundreaktion (Experimente 14-16) statt. Auch bei Reaktionen mit 0.1 μM komplementären DNA **20** (10facher Substratüberschuss) war die Reaktionsgeschwindigkeit 4-mal höher als die Hintergrundreaktion, und 3.5-mal

schneller als mit DNA **22** bzw. 1.5-mal schneller als mit **21** mit jeweils einer Fehlbasenpaarung.

5.8 Vergleich und weitere Arbeiten

Vergleicht man die metallkatalysierte Esterspaltung in dieser Arbeit mit der zuvor von Taylor beschriebenen organokatalysierten Esterspaltung^[20], unterscheiden sich die Reaktionsgeschwindigkeiten ca. um einen Faktor 2.5 (organokatalysierte Reaktion: Umsatzungsrate ca. 0.6 h^{-1} ; metallkatalysierte Reaktion: Umsatzungsrate ca. 1.5 h^{-1}). Die Fehlbasendiskriminierung der metallkatalysierten Reaktion liegt bei maximal einem Faktor 15, während sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der organokatalysierten Reaktion mit komplementärer DNA und DNA mit einer einzelnen Fehlbasenpaarung um einen Faktor 7 unterscheiden. Einschränkend muss erwähnt werden, dass bei der organokatalysierten Reaktion sowohl ein anderes Substrat (organokatalysierte Reaktion: aktivierter p-Nitrophenylester; metallkatalysierte Reaktion: Alkylester) als auch andere Reaktionstemperaturen (20°C bzw. 40°C) und andere Oligonucleotide (DNA bzw. PNA mit unterschiedliche Sequenzen) eingesetzt wurden, und ein direkter Vergleich dadurch nur sehr bedingt aussagekräftig ist.

Bisher war die Esterspaltungsreaktion auf Ester mit metallkoordinierenden Einheiten beschränkt. Dr. Felix Zelder konnte die für Kupfer(II)-Ionen vermittelte Katalyse wichtige Donorgruppe in das Grundgerüst der PNA einbauen^[45]. Dadurch kann man prinzipiell jede Säure als Substrat für die metallkatalysierten Reaktionen einsetzen. In Schema 5.4 ist diese Umsetzung gezeigt. Als Katalysator-PNA wurde PNA **8** eingesetzt. Als Substrat diente ein Ester des Hydroxychinolins. Hydroxychinolin ist der Stickstoffdonor und bleibt auch nach der Reaktion an die PNA gebunden. Die Umsatzrate bei einer 1:1-Mischung ähnelt der bei der Hydrolyse der PNA **6**. Der in etwa gleich hohe Schmelzpunkt von Produkt- und Edukt-PNA in Kombination mit einer Inhibierung der Katalyse durch Komplexbildung des Kupfers durch gebildetes Hydroxychinolin verhinderte jedoch höhere Umsätze.



Schema 5.4: Kupfer(II)-vermittelte Esterhydrolyse am DNA-Templat mit an der PNA verankerter Donorgruppe

6 Metallgequenchte „Molecular Beacons“ als Sonden für die fluorimetrische DNA-Sequenzerkennung

6.1 Einführung

Fluoreszenzsensoren zur Metallionendetektion sind vielfach im Einsatz. Sie bestehen normalerweise aus einem Fluoreszenzfarbstoff, an dem eine metallkoordinierende Einheit kovalent gebunden ist. Durch Anlagerung von Metallionen wird nun die Fluoreszenz über Elektronen- oder Energieübertragung gequencht^[24,25]. Es sollte getestet werden, ob Quenchen der Fluoreszenz mit nicht unmittelbar an den Farbstoff gebundenen Metallkomplexen durch Selbstorganisation möglich ist, und ob dies zur DNA-Sequenzerkennung verwendet werden kann. Als Anordnung wurde eine wie die in Kapitel 1.3.3 beschriebene „Molecular Beacon“ (MB)-Anordnung gewählt.

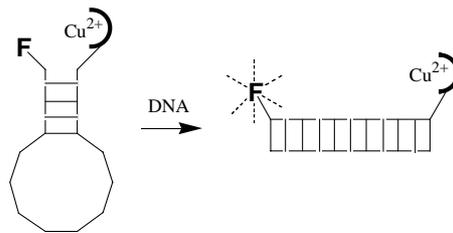


Abb. 6.1: Versuchsdurchführung der DNA-Sequenzerkennung mit metallgequenchten Sonden

Ein als Quencher fungierender Metallkomplex kommt dabei einem Fluoreszenzfarbstoff durch die Hairpin-Anordnung nahe und verhindert in Abwesenheit komplementärer DNA ein Fluoreszieren. Durch Hybridisierung mit komplementärer DNA wird der Farbstoff von dem Metallionen-Quencher durch die starre, lineare Duplex-DNA räumlich getrennt, wodurch ein Fluoreszenzsignal erhalten wird (s. Abb. 6.1).

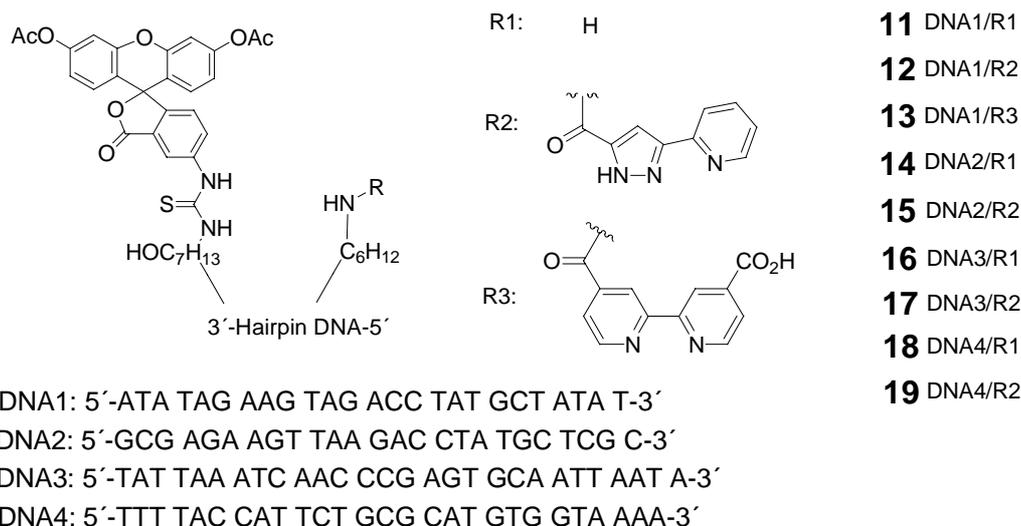


Abb. 6.2: Die synthetisierten metallgequenchten MBs

In den Versuchen wurden Kupfer(II)-Komplexe der isolierten „Molecular Beacon“ Oligonucleotide **11-19** (Abb.6.2) und **31, 32** mit einer Reinheit von über 90% verwendet. Die Fluorescein-modifizierten Oligonucleotide wurden bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt, und die Emission wurde in den Metalltitrationsexperimenten bei 522 nm und bei den DNA-Erkennungsexperimenten in dem Wellenlängenbereich zwischen 500 und 600 nm gemessen.

6.2 Titration der Oligonucleotid-Sonden mit Kupfer(II)

6.2.1 Vorexperimente mit Fluorescein und Calcein

In Vorexperimenten wurden unmodifiziertes Fluorescein und Calcein, ein Bis(iminodiacetat)-funktionalisiertes Fluorescein-Derivat, mit Kupfersulfat titriert (Abb. 6.3). Calcein besitzt mit den Iminodiacetat-Einheiten chelatisierende Gruppen und wird zum Metallionennachweis verwendet^[28].

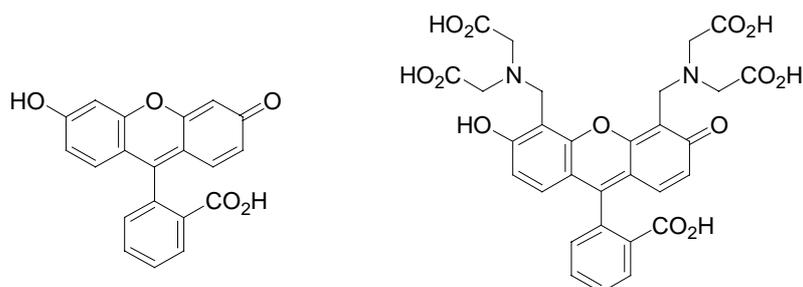


Abb. 6.3: Fluorescein, Calcein

Die Metalltitrationen wurden mit 1 μM Fluorescein bzw. 10 μM Calcein in mit 10 mM MOPS auf pH 7 gepufferten wässrigen Lösungen durchgeführt. Die Fluorescein-Kupfertitration ergab bis zu einer Kupferkonzentration von $6 \cdot 10^{-4}$ M keine Abnahme der Fluoreszenz, bei höheren Kupferkonzentrationen erhielt man einen Niederschlag von Kupfer(II)hydroxid. Wie aus Abbildung 6.4 ersichtlich, wurde die Fluoreszenz von Calcein bei Zugabe von 2 Äquivalenten Kupfer(II)sulfat (20 μM) durch Koordination der Kupferionen an die Iminodiacetatgruppen bis auf ca. 10% des Anfangswertes gequencht. Eine weitere Zugabe von Kupfer(II)sulfat bewirkte keine weitere Abnahme der Fluoreszenz.

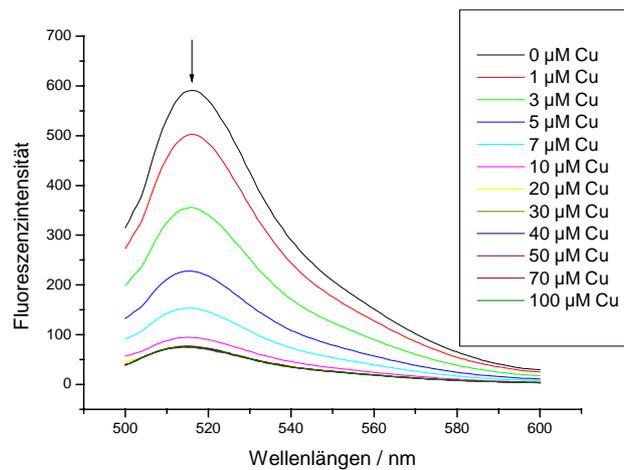


Abb. 6.4 Fluoreszenztitration von Calcein mit Kupfer(II)sulfat; 10 μM Calcein, 10 mM MOPS pH 7, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

Die Chelatligand-modifizierten Oligonucleotidsonden sind mit Calcein insofern vergleichbar, dass durch die Haarnadelstruktur das Kupfer(II)-Ion in räumliche Nähe zum Fluorescein gebracht wird und so eine Fluoreszenzlöschung (beispielsweise durch Phenolat-O-Koordination) auslösen kann. Die Vorversuche mit Fluorescein zeigten, dass eine unerwünschte intermolekulare Löschung durch Kupfer(II) bei Verwendung der Sonden in μM Konzentrationen nicht zu erwarten ist.

6.2.2 Titration der Oligonucleotid-Sonden 11, 12, 13 und 31, 32

Durch Titration der synthetisierten Oligonucleotid-Sonden mit Kupfersulfat wurde überprüft, welche Hintergrundfluoreszenz die metallgequenchten „Molecular Beacons“ aufweisen. Außerdem konnte durch die Titrationsexperimente die optimale Kupferkonzentration für die Fluoreszenzversuche bestimmt werden. Die Metalltitrationsexperimente wurden mit 0.1 μM

der entsprechenden Oligonucleotide, 10 mM MOPS pH 7 und 1 M NaCl durchgeführt. Die Anregungswellenlänge lag bei 494 nm. In den folgenden Abbildungen wurde die Emission bei 522 nm gegen die Kupferkonzentration aufgetragen.

Die Metalltitration der am 5'-Ende modifizierten DNA **12** (Abb.6.5) zeigte eine starke Abnahme der Fluoreszenz bei Kupferkonzentrationen zwischen 0.1 und 2 μM . Die Fluoreszenz sank dabei bis auf ca. 25% des ursprünglichen Wertes. Bei Kupferkonzentrationen zwischen 2 und 8 μM änderte sich die Fluoreszenz kaum. Ab einer Kupfer(II)sulfatkonzentration von 8 μM erfolgte ein weiterer, langsamer Abfall der Fluoreszenz.

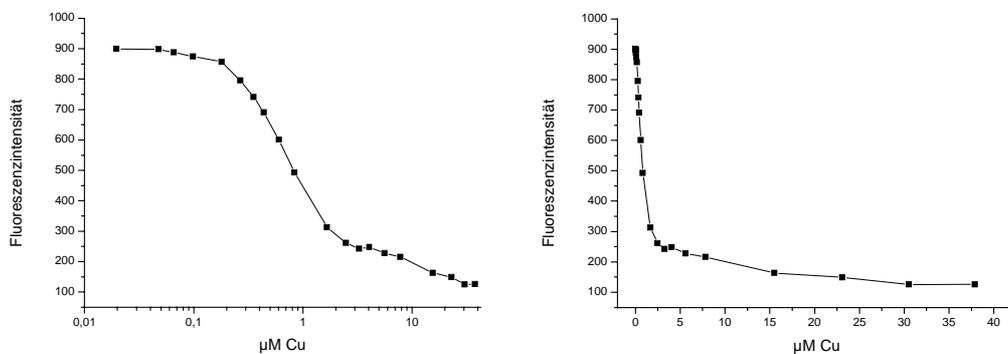


Abb. 6.5: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids **12** bei 522nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 522 nm

Beim unmodifizierten Oligonucleotid **11** wurde im Gegensatz zum Oligonucleotid **12** bei Zugabe von ca. 10 μM Kupfer(II)sulfat nur ein geringer Abfall der Fluoreszenz beobachtet (Abb. 6.6). Bei Kupferkonzentrationen zwischen 10 und 100 μM ergab sich ein deutlicher Abfall der Fluoreszenz bis auf ca. 6% der Ausgangsfluoreszenz. Bei noch höheren Kupferkonzentrationen pendelte sich die Fluoreszenz auf eine konstante Restfluoreszenz ein.

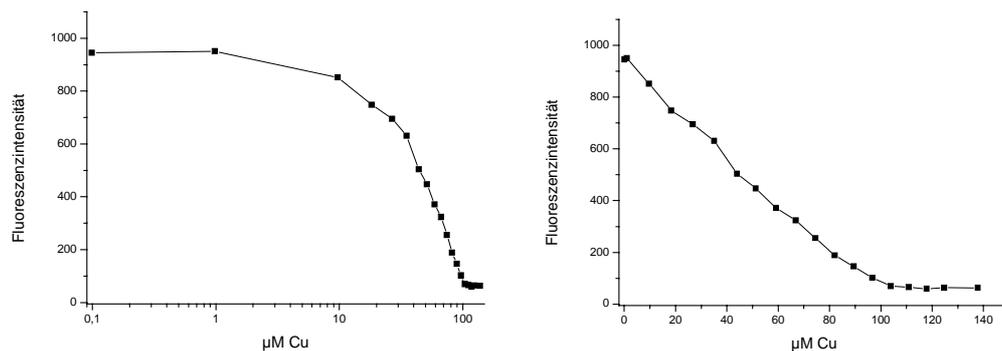


Abb. 6.6: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids **11** (0.1 μM) bei 522nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 522 nm

Das Löschen der Fluoreszenz bei kleinen Kupferkonzentrationen ($< 2 \mu\text{M}$) wird beim Ligand-modifizierten Oligonucleotid **12** offenbar durch Koordination eines Kupferions an den Pyridylpyrazol-Chelatliganden hervorgerufen. Die Kupferbindungskonstante des Ethylamid-Derivates dieses Liganden wurde durch UV-Vis-spektroskopische Titration mit Kupfer(II)sulfat bestimmt und betrug $\log K = 7.6^{[37]}$. Die ursprüngliche Fluoreszenz wurde dabei auf ca. 20% des ursprünglichen Wertes gequencht. Durch weitere Anlagerung von Kupfer(II)-Ionen, vermutlich an die Nucleobasen der DNA **12**, sank bei höheren Kupferkonzentrationen die Fluoreszenz schließlich langsam auf ca. 6% des ursprünglichen Wertes. Im Fluoreszenz-Spektrum wurde somit ein starker Abfall bei kleinen Kupferkonzentrationen (Kupferkoordination an den Liganden) und ein zweiter, kleiner Abfall bei größeren Kupferkonzentrationen (Kupferkoordination an die Nucleobasen) beobachtet.

Im Falle des unmodifizierten Oligonucleotids **11** entfällt die Bindung durch den Liganden, und es wurde lediglich ein Abfall durch die Kupferkoordination an die Nucleobasen der DNA beobachtet.

Die Bindungskonstanten von Metallionen an Nucleobasen sind aufgrund ihrer herausragenden Rolle in biochemischen Prozessen sehr wichtig und wurden deshalb detailliert untersucht. Insbesondere Guanosin besitzt die Fähigkeit, zweiwertige Metallionen am N-7 Stickstoff-Atom zu koordinieren. So beträgt die potentiometrisch ermittelte Bindungskonstante des Kupfer(II)/Guanosin-Systems bei 35°C $\log K = 4.31 \pm 0.05^{[46]}$. Durch die Koordination der Kupferionen an die Nucleobasen der DNA wird bei den metallgequenchten Sonden die Kupferkonzentration am Fluorescein erhöht, und ein zusätzliches Quenchen der Fluoreszenz findet statt.

Geht man von einem stark vereinfachten Modell mit Gleichgewichten zwischen freiem Kupfer [Cu], freiem und somit fluoreszierendem Fluoreszenzfarbstoff [F] und über den Liganden bzw. die Nucleobasen an den Fluoreszenzfarbstoff gebundenem Kupfer (und somit nicht fluoreszierend) $[\text{Cu}_L\text{F}]$ bzw. $[\text{Cu}_N\text{F}]$ aus, kann man die Kupferbindungskonstanten näherungsweise abschätzen. Da sich die Bindungskonstanten des an den Liganden bzw. an die Nucleobasen gebundenen Kupfers erheblich unterscheiden, kann man bei sehr kleinen Kupferkonzentrationen ($0.1 - 1 \mu\text{M}$) die Koordination an die Nucleobasen vernachlässigen. Bei großen Kupferkonzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) wird der Ligand als vollständig Kupferkoordiniert betrachtet; die Änderung der Fluoreszenz ist daher ausschließlich auf die Koordination an die Nucleobasen zurückzuführen. Daher können die Gleichgewichte näherungsweise als voneinander unabhängig betrachtet werden (Gleichung 6.1 und 6.2). Setzt man die Kupferkonzentration bei der halben Fluoreszenz ein ($[\text{Cu}_L\text{F}]/[\text{F}] = 1$) bzw. ($[\text{Cu}_N\text{F}]/[\text{F}] = 1$), kann K erhalten werden.

Gleichung 6.1: $K_L = [\text{Cu}_L\text{F}]/[\text{Cu}][\text{F}]$

Gleichung 6.2: $K_N = [\text{Cu}_N\text{F}]/[\text{Cu}][\text{F}]$

Die aus den Titrationsspektren ermittelten Kupfer-Bindungskonstanten für den Ligand-Komplex der DNA **12** lag bei $\log K_L = 6.3$, und die Bindungskonstante der Nucleobasen der DNA lag bei $\log K_N = 4.2$, in guter Übereinstimmung mit den publizierten Bindungskonstanten der Nucleobasen^[46].

Die Fluoreszenztitration des 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure-modifizierten Oligonucleotids **13** mit Kupfer(II)sulfat ergab, aufgrund der höheren Bindungskonstante des Bipyridins mit Kupfer, bereits einen deutlichen Abfall der Fluoreszenz bei zur Sonde äquimolaren Kupferkonzentrationen (Abb. 6.7). Die Kupfer(II)-Bindungskonstante des Bipyridins beträgt nach Literaturangaben $\log K = 8^{[47]}$ und ist damit etwas höher als die des Pyridylpyrazol-3-carbonsäureamids. Ein zweiter Abfall der Fluoreszenz war bei Kupfer(II)-Ionenkonzentrationen von über $1 \mu\text{M}$ festzustellen. Kompliziert wurden die Messungen dadurch, dass offenbar schon geringste Mengen an Metallionen (möglicherweise Cu oder Fe) in den Probenlösungen ausreichten, um die Fluoreszenz effektiv zu löschen. Deshalb wurden die

verwendeten Stammlösungen zuvor mit Chelex (Iminodiacetat-funktionalisiertes Polystyrol) behandelt.

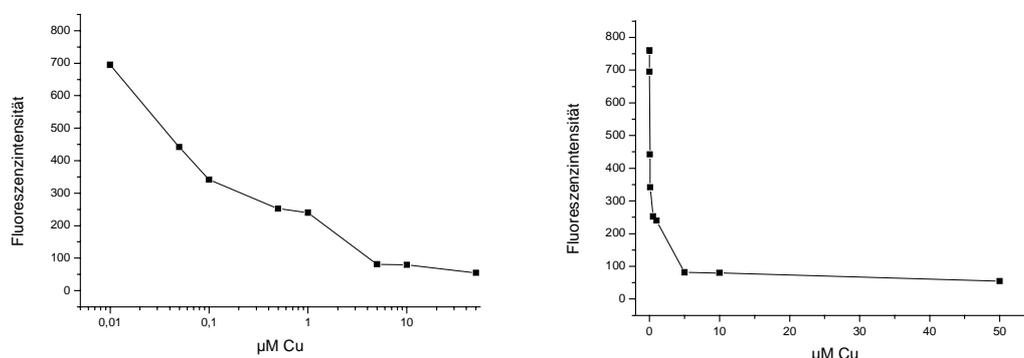


Abb. 6.7: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids **13** ($0.1 \mu\text{M}$) bei 522nm ; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; $10 \text{ mM MOPS pH } 7$, 1 M NaCl , $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm ; Emission: 522 nm

Die Fluoreszenztitration des Tetramethylrhodamin (Tamra)-modifizierten Oligonucleotids **31** wurde ebenfalls mit $0.1 \mu\text{M}$ Oligonucleotid und 1 M NaCl in mit MOPS auf $\text{pH } 7$ eingestellter Lösung durchgeführt. In **31** ist der Fluorescein-Farbstoff des Oligonucleotids **12** durch Tamra ersetzt. Das Oligonucleotid **31** zeigte auch gegenüber Kupfer ein ähnliches Verhalten wie **12** (Abb. 6.8). Die Koordinationsfähigkeit der N,N'-Dimethylaminofunktion scheint für ein Quenchen des Farbstoffs ausreichend zu sein. In der Literatur findet man für die vergleichbare Substanz N,N'-Dimethylanilin eine Cobalt(II)-Bindungskonstante von $\log K = 2.3^{[47]}$, die Kupfer(II)-Bindungskonstanten von N-Donoren sind üblicherweise noch etwas höher. Die Anregungswellenlänge lag bei 559 nm . Es wurde die Emission bei 583 nm gegen die Kupferkonzentration aufgetragen.

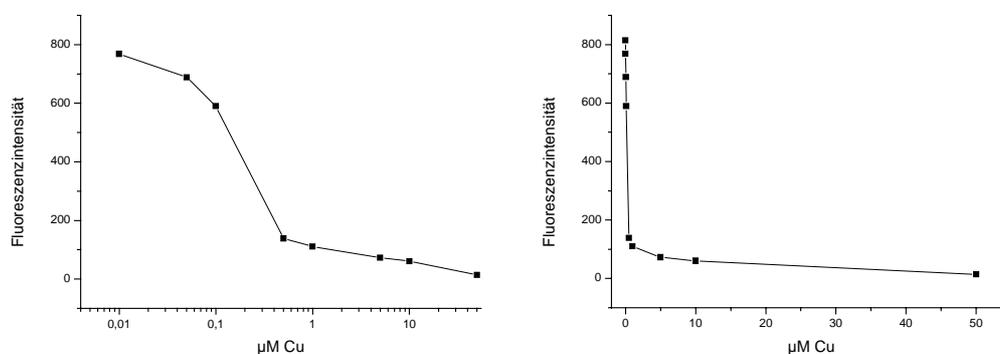


Abb. 6.8: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids **31** ($0.1 \mu\text{M}$) bei 583 nm ; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; $10 \text{ mM MOPS pH } 7$, 1 M NaCl , $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 559 nm ; Emission: 583 nm

Das Pyren-modifizierte Analogon von **12**, die DNA **32**, zeigte keine signifikante Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Kupferkonzentration. Bei diesem Oligonucleotid fehlen am Farbstoffmolekül koordinationsfähige Donoren. Die Anregungswellenlänge lag bei 340 nm; es wurde die Fluoreszenz bei 381 nm gegen die Kupferkonzentration aufgetragen (Abb. 6.9).

Dieses Kontrollexperiment untermauert die Annahme einer direkten, koordinativen Bindung zwischen Kupfer(II) und Donorgruppen des Fluoreszenzfarbstoffs in **12** und **31** als Ursache der Fluoreszenzlöschung.

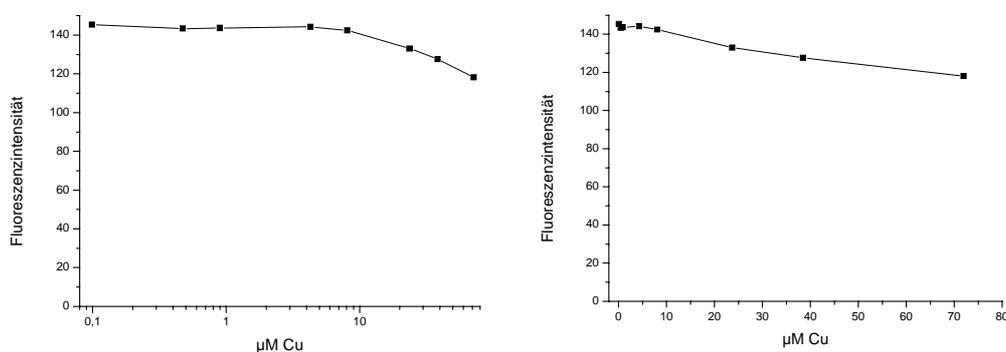


Abb. 6.9: Fluoreszenz-Kupfer(II)-Titration des Oligonucleotids **32** ($0.1 \mu\text{M}$) bei 381 nm; links: logarithmische Skala der Kupferionenkonzentration, rechts: lineare Skala der Kupferionenkonzentration; 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 340 nm; Emission: 381 nm

6.3 Anwendung der metallgelöschten „Molecular Beacons“ zur DNA-Sequenzerkennung

6.3.1 Hybridisierung der Oligonucleotide **11** und **12** mit komplementärer DNA **23**

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob eine fluorimetrische DNA-Sequenzerkennung mit den Kupfer(II)-gelöschten 5'-Fluorescein- und 3'-Ligand-modifizierten Oligonucleotiden möglich ist. Die Experimente wurden mit $0.1 \mu\text{M}$ Oligonucleotid, 10 mM MOPS pH 7 und 0.1 M oder 1 M NaCl durchgeführt. Unmittelbar nach der Zugabe von Kupfersulfat wurde die Fluoreszenz gequencht und blieb konstant. Um ein rasches Einstellen des Hybridisierungsgleichgewichts (siehe Kapitel 6.4) nach Zugabe von komplementärer DNA zu gewährleisten, wurden die Proben mit einer Heißluftpistole kurz erwärmt. Exemplarisch sind

in den folgenden Abbildungen die Experimente mit Ligand-modifiziertem Oligonucleotid **12** und mit Oligonucleotid **11**, dem die Ligandmodifikation fehlt, abgebildet.

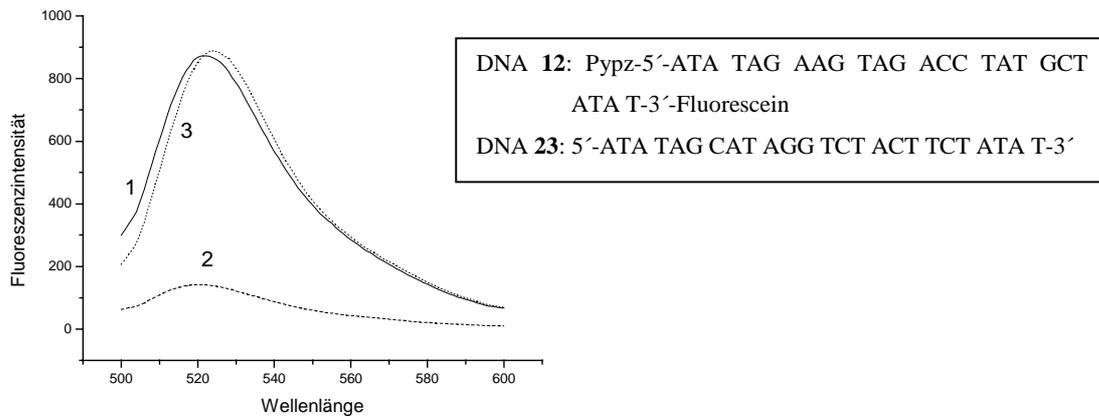


Abb. 6.10: 0.1 μM Oligonucleotid **12** (1), Zugabe von 5 μM Cu^{2+} (2), Zugabe von 0.5 μM DNA **23** (3); 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

Im ersten Experiment wurde eine 0.1 μM Lösung des Oligonucleotids **12** (Linie 1, Abb. 6.10) mit 5 μM Kupfer(II)sulfat versetzt. Die Fluoreszenz wurde dabei auf 15.5% der ursprünglichen Fluoreszenz gequencht (Linie 2). Durch Zugabe von 0.5 μM der komplementären DNA **23** konnte die Fluoreszenz wiederhergestellt werden (Linie 3).

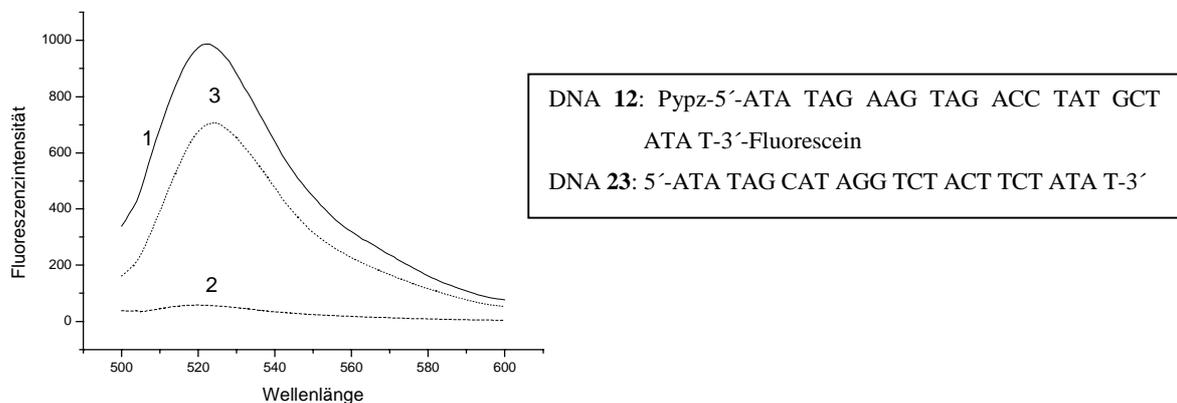


Abb. 6.11: 0.1 μM Oligonucleotid **12** (1), Zugabe von 50 μM Cu^{2+} (2), Zugabe von 0.5 μM DNA **23** (3); 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

Bei Durchführung des Experimentes mit 50 μM Kupfer(II)sulfat wurde eine Restfluoreszenz von 5.2% erhalten (Linie 2, Abb. 6.11). Zugabe komplementärer DNA konnte noch 72% der Ausgangsfluoreszenz wiederherstellen. Dies entspricht einer 14fachen Fluoreszenzverstärkung. Bezogen auf die Duplex-Fluoreszenz beträgt die Fluoreszenz im gequenchten Zustand 7.2%.

Mit einer 14fachen Fluoreszenz der offenen Form im Vergleich zur Hairpin-Form ist der Kupfer(II)-gelöschte Fluorescein-„Molecular Beacon“ **12** im Signal/Rausch-Verhältnis vergleichbar mit organischen Fluorescein-Quencher-Paaren. Beispielsweise wurde in einer Studie von Tyagi und Kramer durch Kontakt-Quenchen von Fluorescein mit „Black-Hole-Quencher-1“ (BHQ-1) 7% und mit Tetramethylrhodamin 8% Restfluoreszenz erhalten^[49].

Zum Vergleich wurden analoge Experimente mit am 5'-Ende unmodifizierter DNA **11** durchgeführt (Abb. 6.12). Mit 5 μ M Kupfersulfat-Lösung wurde nur eine geringe Abnahme der Fluoreszenz auf 91% beobachtet (Linie 2), die nach Zugabe komplementärer DNA **23** geringfügig anstieg (Linie 3).

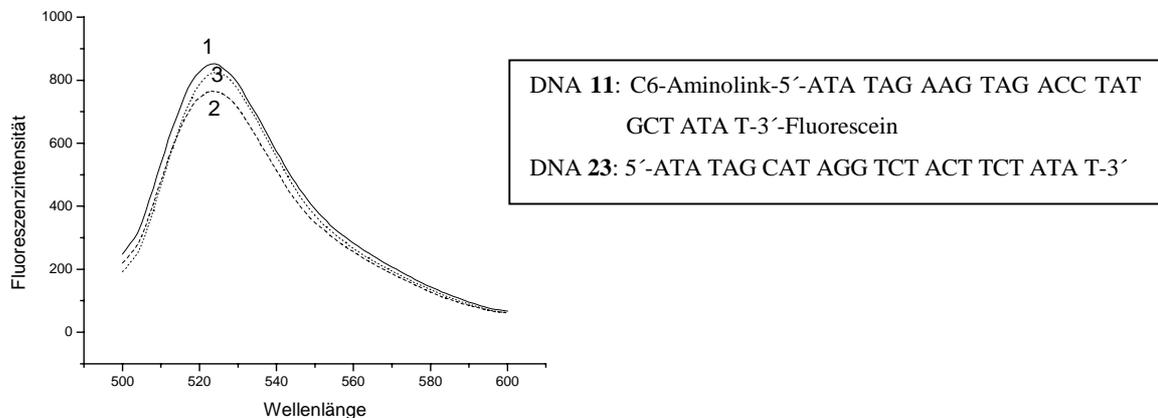


Abb. 6.12: 0.1 μ M Oligonucleotid **11** (1), Zugabe von 5 μ M Cu(II) (2), Zugabe von 0.5 μ M DNA **23** (3); 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

Mit dem Tamra-modifizierten „Molecular Beacon“ **31** wurden der Fluorescein-Sonde **12** analoge Quench- und Hybridisierungseffekte beobachtet (Abb. 6.13). Dies war aufgrund des gleichen Verhaltens gegenüber Kupfer (siehe 6.2.2) zu erwarten. **31** wurde bei 559 nm angeregt und es wurde die Fluoreszenzintensität zwischen 565 und 700 nm gemessen.

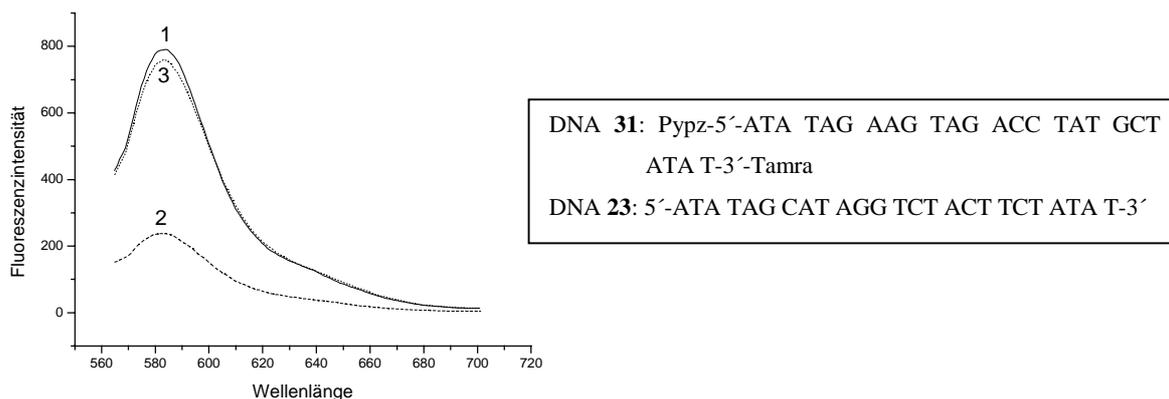


Abb. 6.13: 0.1 μM Oligonucleotid **31** (1), Zugabe von 5 μM Cu(II) (2), Zugabe von 0.5 μM DNA **23** (3); 10 mM MOPS pH 7, 0.1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

Die mit Liganden modifizierte Sonden **13**, **15**, **17** und **19** verhielten sich mit Kupfer bzw. DNA wie Sonde **12**. Die Fluoreszenz dieser Oligonucleotide wurde mit 5 μM Kupfer(II)-Ionen bis auf 15-20% der Ausgangsfluoreszenz gelöscht; durch Zugabe der jeweiligen komplementären DNA konnte die Fluoreszenz wiederhergestellt werden.

Die Oligonucleotide **14**, **16** und **18**, ohne Ligandmodifikation, verhielten sich analog Oligonucleotid **11**. Bei ihnen wurde die Fluoreszenz durch Kupfer(II)-Ionenzugabe nur wenig gequencht. Durch den GC-reichen Stamm der Oligonucleotide **14** und **15** war lediglich das Löschen der Fluoreszenz durch die Duplex stärker. Die beobachteten Effekte waren somit sequenzunabhängig.

6.3.2 Untersuchungen zur Fehlbasendiskriminierung

Von besonderer Bedeutung bei der Nucleinsäuredetektion (z.B. in der Analyse von PCR-Produkten) ist hohe Sequenzselektivität und die Möglichkeit, einzelne Fehlbasenpaarungen sicher zu identifizieren. Daher wurde getestet, ob eine Diskriminierung einer einzelnen Fehlbasenpaarung durch die Kupfer(II)-gelöschte Sonde **12** möglich ist. Die Experimente wurden mit 0.1 μM Oligonucleotid, 10 mM MOPS pH 7 und 0.1 M NaCl durchgeführt. Hohe Fehlbasendiskriminierung wurde mit DNAs erreicht, die kürzere, komplementäre Sequenzen als **23** haben und nur mit dem „Loop“ des Hairpins hybridisieren. Nach Zugabe zu dem mit 5 μM Kupfer(II)-gequenchem Oligonucleotid **12** (Linie 2, Abb. 6.14) von 0.5 μM DNA **25**, die an der Basenposition 5 eine Fehlbasenpaarung besaß, erfolgte nur eine geringe Erhöhung der Fluoreszenz (Linie 3). Mit 0.5 μM der DNA **24**, die perfekt komplementär zum Loop des Beacons war, stieg die Fluoreszenz stark an und es wurde sogar eine um 12% höhere Fluoreszenz als die Ausgangsfluoreszenz beobachtet (Linie 4). Der Anstieg der Fluoreszenz

mit komplementärer DNA **24** war 40-mal größer als mit DNA **25**. Die Fluoreszenz nach Hybridisierung mit DNA **24** lag über der Ausgangsfluoreszenz, da der Doppelstrangbereich des Hairpins die Fluoreszenz geringfügig quencht. Dieser Effekt entfällt in der hybridisierten Form, wo der Farbstoff durch einzelsträngige Überhangbereiche vom Doppelstrang separiert ist^[48].

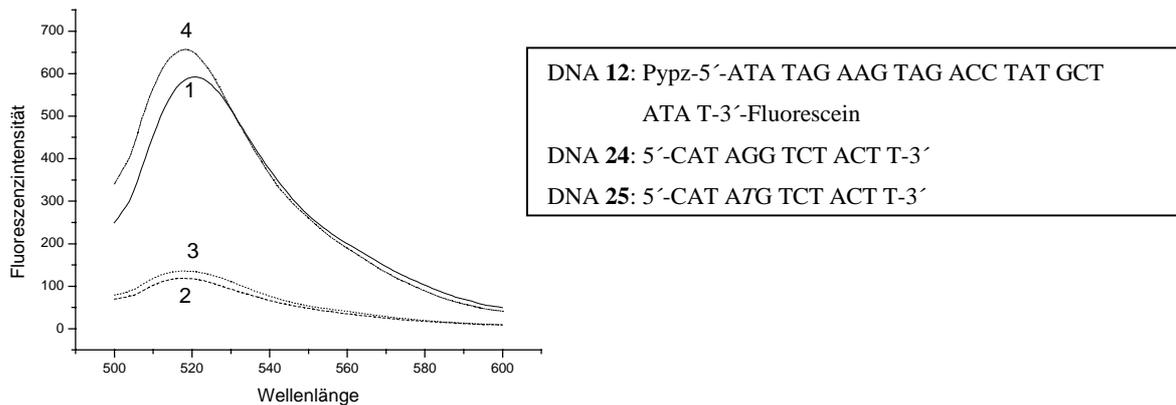
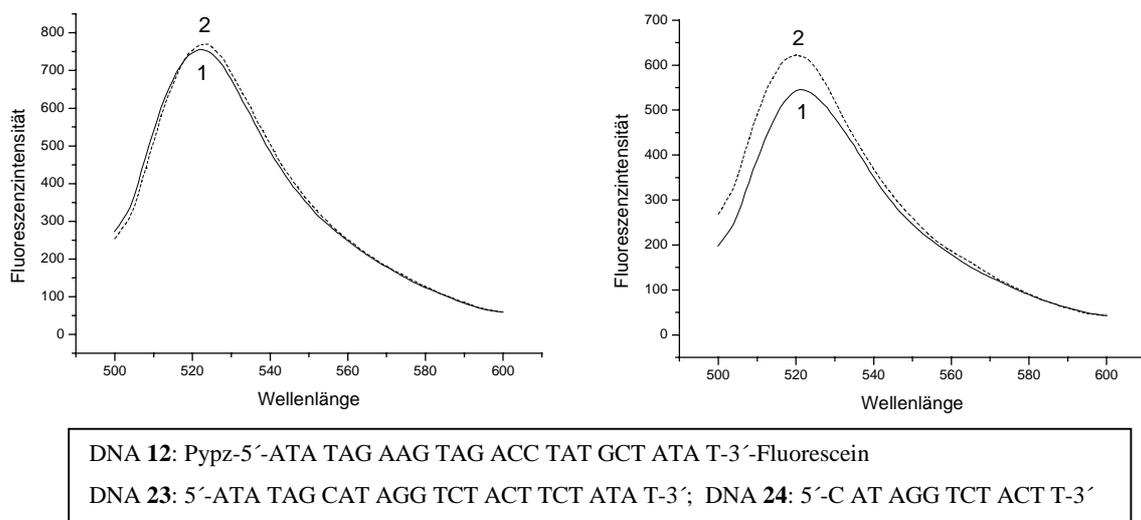


Abb. 6.14: 0.1 μM Oligonucleotid **12** (1), Zugabe von 5 μM Cu(II) (2), Zugabe von 0.5 μM DNA **25** (3), Zugabe von 0.5 μM DNA **24** (4); 10 mM MOPS pH 7, 0.1 M NaCl, $T = 25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

Ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals um 13% konnte auch nach Zugabe von DNA **24** zur nicht mit Kupferionen gequenchten Sonde **12** beobachtet werden (Abb. 6.15, rechts). Durch Zugabe der DNA **23**, die auch zum Stamm komplementäre Nucleobasen besitzt, wurde kein Ansteigen der Fluoreszenz nach Hybridisierung mit **12** beobachtet (Abb. 6.15, links).



6.15: links: 0.1 μM Oligonucleotid **12** (1), Zugabe von 0.5 μM DNA **23** (2); rechts: 0.1 μM **12** (1), Zugabe von 0.5 μM DNA **24** (2); 10 mM MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T = 25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

6.4 Messung der Hybridisierungsgeschwindigkeiten der Metall-gequenchten Sonde **12** bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen

Die Geschwindigkeit, mit der sich das Hybridisierungsgleichgewicht einstellte, wurde nach Zugabe von 0.5 μM DNA **23** zu einer mit 5 μM Kupfersulfat-gequenchten Lösung von 0.1 μM des Oligonucleotids **12**, 0.1 M bzw. 1 M NaCl bei 25°C und einem pH-Wert von 7 verfolgt (Abb. 6.16). Durch Zusatz komplementärer DNA **23** bildete sich die starre Duplex aus, der Quencher wurde vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt und die Fluoreszenz stieg. Die eingestrahlte Wellenlänge betrug 494 nm. Die Fluoreszenz wurde bei 522 nm gemessen.

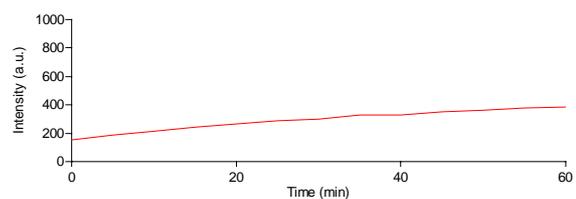
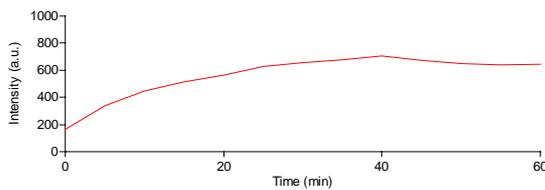


Abb. 6.16: 0.1 μM Oligonucleotid **12**, 5 μM Cu^{2+} , 0.5 μM DNA **23**, 1 M NaCl, MOPS pH 7, $T = 25^\circ\text{C}$
Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 522 nm

0.1 μM Oligonucleotid **12**, 5 μM Cu^{2+} , 0.5 μM DNA **23**, 0.1 M NaCl, MOPS pH 7, $T = 25^\circ\text{C}$
Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 522 nm

In 1 M-NaCl Lösung stellte sich das Gleichgewicht zwischen offenem und geschlossenem MB nach 40 Minuten ein, während in 0.1 M NaCl die Gleichgewichtseinstellung viel langsamer und nach 60 Minuten noch nicht abgeschlossen war. Die beschleunigende Wirkung des hohen Salzgehalts ist auf eine schnellere Assoziation der Einzelstränge aufgrund der geringeren elektrostatischen Abstoßung der gebildeten Na^+ -DNA-Komplexe zurückzuführen. In den unter 6.3 beschriebenen Experimenten wurde, wie erwähnt, die Gleichgewichtseinstellung durch kurzes Erhitzen der Reaktionsansätze beschleunigt.

6.5 Vergleich von Sonde **12** mit dem kommerziellen, Dabcyl-gequenchten Oligonucleotid **30**

Fluorescein und Dabcyl sind bei der DNA-Sequenzanalyse ein häufig verwendetes Farbstoff/Quencherpaar. Vergleicht man die metallgequenchte Sonde **12** mit dem kommerziell erworbenen 3'-Dabcyl- und 5'-Fluorescein-modifiziertem „Molecular Beacon“ **30** der gleichen Sequenz, so liegt dessen Hintergrundfluoreszenz bei 4.7% (Linie 1, Abb. 6.17) von 100% nach Hybridisierung mit DNA **23** (Linie 2) und ist damit etwas geringer als die der kupfergelöschten Sonde **12** bei 50 μM Kupfer(II)sulfat.

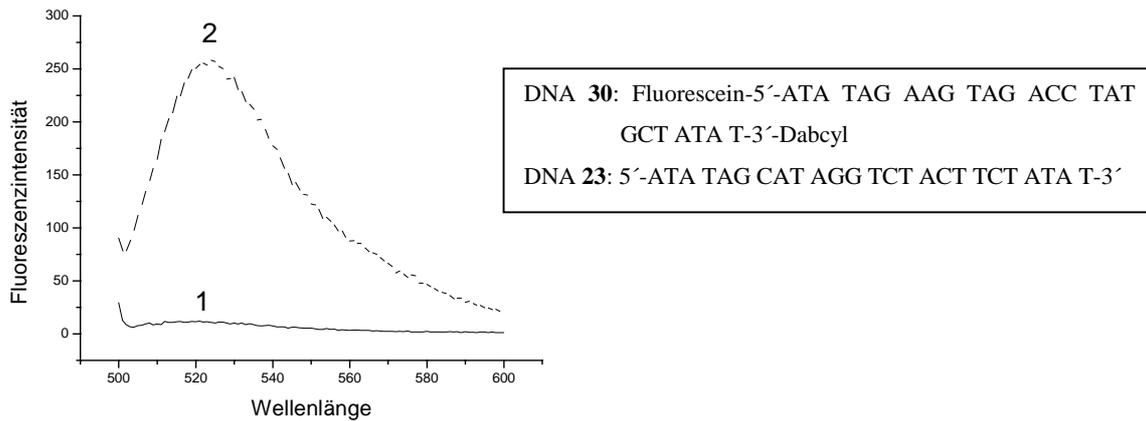


Abb. 6.17: 0.1 μM Dabcyl gelöschter MB **30** (1), Zugabe von 0.5 μM DNA **23** (2), 1M NaCl; 10 mM MOPS pH 7, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

Die Fehlbasendiskriminierung der Dabcyl-gequenchten Sonde **30** mit DNA **25** und **24** war mit der des metallgequenchten Oligonucleotids **12** vergleichbar (Abb. 6.18). Bei Zugabe von komplementärer DNA **24** wurde eine 84-mal höhere Zunahme der Fluoreszenz als bei Zugabe der DNA **25** mit einer Fehlbasenpaarung beobachtet. Die höhere Restfluoreszenz in Abb. 6.18 im Vergleich zu 6.17 war wahrscheinlich auf den geringeren NaCl-Gehalt und damit der Ausbildung zum Hairpin konkurrierender Strukturen zurückzuführen, die nicht zu einer Fluoreszenzlöschung führten.

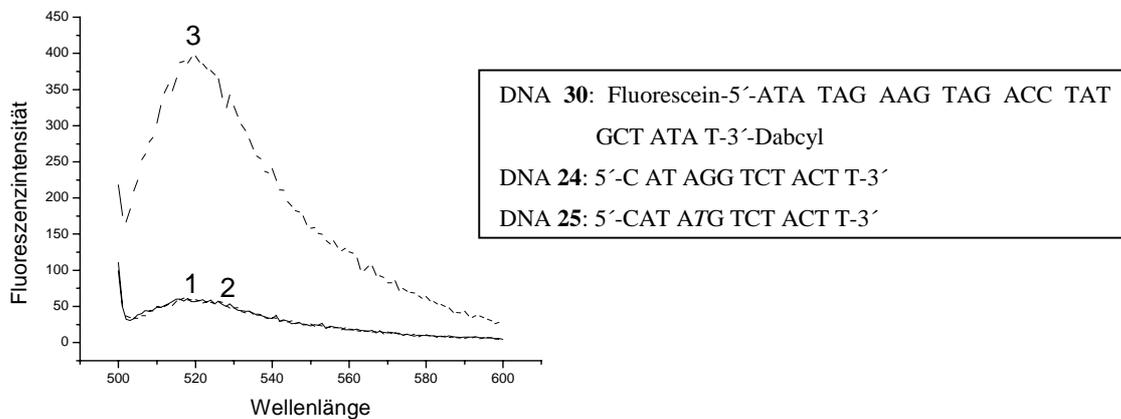


Abb. 6.18: 0.1 μM Dabcyl-gelöschter MB **30** (1), Zugabe von 0.5 μM DNA **25** (2), Zugabe von 0.5 μM DNA **24** (3), 10 mM MOPS pH 7, 0.1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, Anregungswellenlänge: 494 nm; Emission: 500 – 600 nm

6.6 Untersuchungen zum Mechanismus der metallvermittelten Fluoreszenzlöschung in Sonde 12

Die Fluoreszenz ist generell stärker von der Umgebung beeinflusst als die Absorption. Diese höhere Sensitivität ist dadurch bedingt, dass dynamische Prozesse, die während der Verweilzeit der Fluorophore im angeregten Zustand (typisch: 1-10 ns) stattfinden, die Fluoreszenzemission beeinflussen. Zu diesen Prozessen gehören: Lösungsmittelrelaxationen, chemische Reaktionen, Veränderungen der Moleküllorientierungen und Quenching. Der Absorptionsprozess läuft dagegen um Größenordnungen schneller ab, so dass die Umgebung effektiv statisch ist. Die Absorptionsspektroskopie ist deshalb die geeignete Methode, Informationen über die Molekülanordnung und dadurch über den Quenchmechanismus zu erhalten.

Im Experiment wurde Calcein mit Kupfer(II)sulfat-Lösung titriert und die Absorption bei 492 nm gemessen. Bei Erhöhung der Kupferkonzentration wurde eine Abnahme der Absorption (Abb. 6.19, links) erhalten. Durch die Iminodiacetat-Gruppen ist von Koordination des Kupfers an die Phenolatgruppen des Fluoresceins auszugehen. Die gleiche prozentuale Abnahme der Absorption wurde bei der Titration des Oligonucleotids **12** mit Kupfer erhalten (Abb. 6.19, rechts; Absorption bei 494 nm). Das Löschen der Fluoreszenz fand vermutlich durch direkte, koordinative Wechselwirkung zwischen Fluorescein und Kupfer statt. Wahrscheinlich wurden beide Fluoresceinderivate durch Koordination des Kupfers an das Phenolat-Ion gequencht.

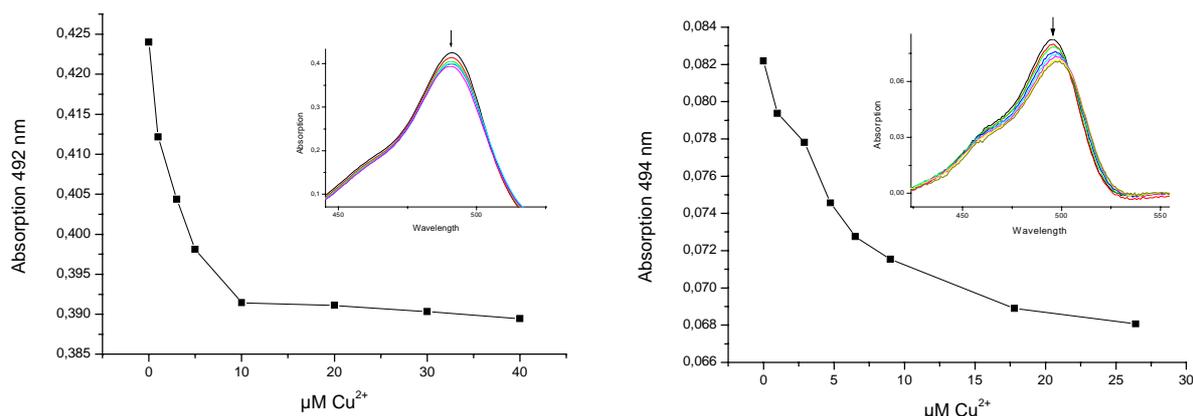
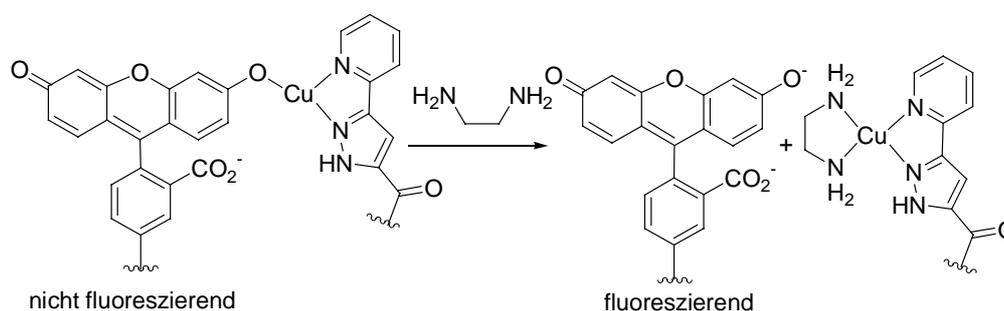


Abb. 6.19: links: UV-Vis Kupfertitration von Calcein; 10 µM Calcein, 10 mM MOPS pH 7; rechts: UV-Vis-Kupfertitration von Oligonucleotid **12**; 5 µM **12**, 10 mM MOPS pH 7, T=25°C

Das Fehlen koordinationsfähiger Atome am Fluoreszenzfarbstoff verhindert ein effektives Quenchen. So wurde bei Oligonucleotid **32**, dem Pyren-modifizierten Analogon des

Oligonucleotids **12**, bei Zugabe von Kupfer(II)sulfat keine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Kupferkonzentration festgestellt (siehe 6.2.2). Auch diese Beobachtung untermauert einen Mechanismus der Fluoreszenzlöschung durch koordinative Wechselwirkung in **12**.

Einen weiteren Hinweis auf die direkte Koordination des Kupfers an den Fluoreszenzfarbstoff lieferte die Beobachtung, dass durch den Zusatz von Ethylendiamin, einem zweizähligen Liganden, die Fluoreszenz der Kupfer(II)-gelöschten Sonde **12** teilweise wiederhergestellt werden konnte. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 6.1 vorgeschlagen.



Schema 6.1: Vorgeschlagener Mechanismus der Fluoreszenzzunahme bei Zugabe von Ethylendiamin zum Kupfer(II)-Komplex von **12**

Zu dem mit 5 μM Kupfer(II)sulfat gequenchem Oligonucleotid **12** (Abb. 6.20, Linie 2) wurde 5 μM Ethylendiamin (en) zugesetzt. Dadurch konnte die Fluoreszenz zu 58% wiederhergestellt werden (Linie 3).

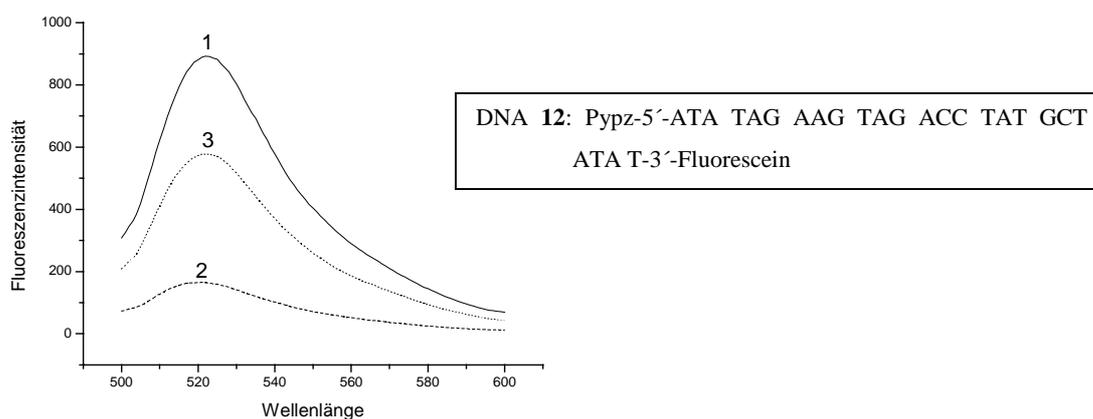


Abb. 6.20: 0.1 μM Oligonucleotid **12** (1), Zugabe von 5 μM CuSO_4 (2), Zugabe von 5 μM Ethylendiamin (3); MOPS pH 7, 1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$

Geht man von dem in Schema 6.1 dargestellten Mechanismus der Fluoreszenzlöschung aus, ist der ternäre Komplex $[\text{Cu}^{2+}(\mathbf{12})(\text{en})]$ die dominierende Spezies. Dieser Komplex ist vergleichbar mit $[\text{Cu}^{2+}(2,2'\text{-Bipyridin})(\text{en})]$, für das es kristallographische Daten gibt^[50] und

in welchem die vier äquatorialen Koordinationsstellen durch die zwei bidentaten Liganden blockiert sind, und somit nicht mehr für die Koordination zur Verfügung stehen.

Bei der Berechnung einer Speziesverteilung wurden folgende Komplexe berücksichtigt: $[\text{Cu}^{2+}(\mathbf{12})]$, $[\text{Cu}^{2+}(\text{en})]$, $[\mathbf{12}]$, $[\text{Cu}^{2+}(\text{en})_2]$ und $[(\mathbf{12})\text{Cu}^{2+}(\text{en})]$. Die Kupfer(II)-Bindungskonstante von $\mathbf{12}$ wurde durch Titrationsexperimente zu $\log K = 6.3$ ermittelt (Kapitel 6.2.2). Nimmt man den realistischen Wert $\log K = 5.9$ für die Assoziation von $\mathbf{12}$ mit $[\text{Cu}^{2+}(\text{en})]$ an (der Wert ist vergleichbar mit der Assoziationskonstante von 2,2'-Bipyridin und $[\text{Cu}^{2+}(\text{en})]^{[51]}$), so sollten in Übereinstimmung mit dem Experiment 58% des nicht-quencheden $[\text{Cu}(\mathbf{12})(\text{en})]$ -Komplexes und 42% des quencheden $[\text{Cu}(\mathbf{12})]$ -Komplexes vorliegen. Die Speziesverteilung wurde mit dem Programm „Species Version 1.2“ von L. D. Petit errechnet.

6.7 Anwendung der metallgequenchten „Molecular Beacons“ in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Cremer (Kirchhoff-Institut für Physik) wurden von Frau Dr. Finsterle Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungsexperimente (FISH) mit den metallgequenchten MB durchgeführt. Die in situ Hybridisierung wurde Ende der sechziger Jahre von Gall und Pardue entwickelt. Mit ihr gelingt es, einzelne Regionen der DNA sequenzspezifisch zu markieren. Dazu werden Zellen fixiert, wobei die doppelhelikale Struktur der DNA zum Teil aufgebrochen wird. Die gebildeten Einzelstränge werden dann mit fluoreszenzmarkierten, komplementären Oligonucleotiden behandelt (Hybridisierung). Die FISH-Technik ist heute ein Routineverfahren für die Detektion von Chromosomenaberrationen in Tumorzellen, wodurch eine Klassifizierung der Malignität ermöglicht wird.

Bei den von Frau Dr. Finsterle durchgeführten Experimenten wurde die Fluoreszenzmarkierte Sonde $\mathbf{17}$ auf präparierte menschliche Lymphozyten aufgetragen, die mit Methanol/Eisessig fixiert waren. Nicht hybridisierte überschüssige DNA $\mathbf{17}$ wurde durch Waschen entfernt. In Abbildung 6.21 sind die mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen der Präparate gezeigt.

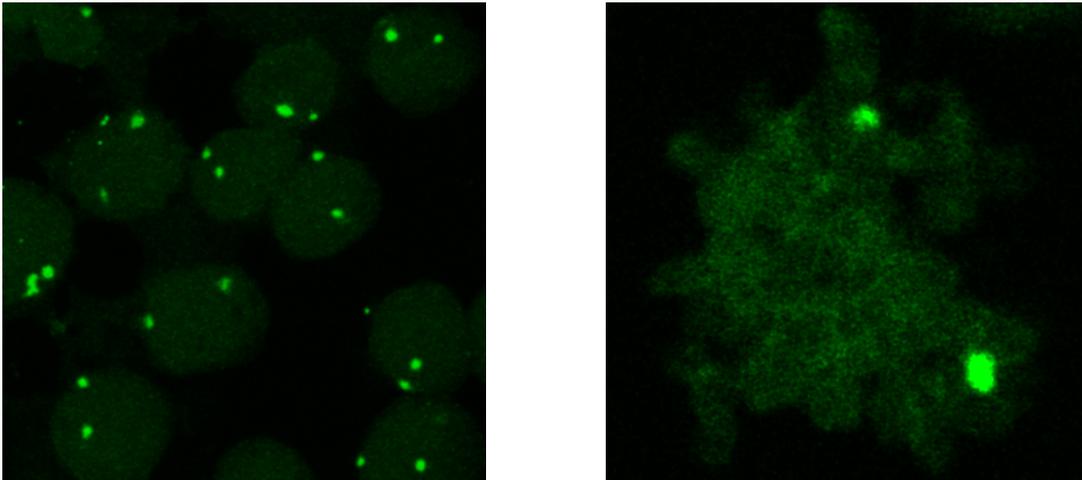


Abb. 6.21: Mit **17** markierte Chromosomen menschlicher Lymphozyten (rechts: Zoomansicht)

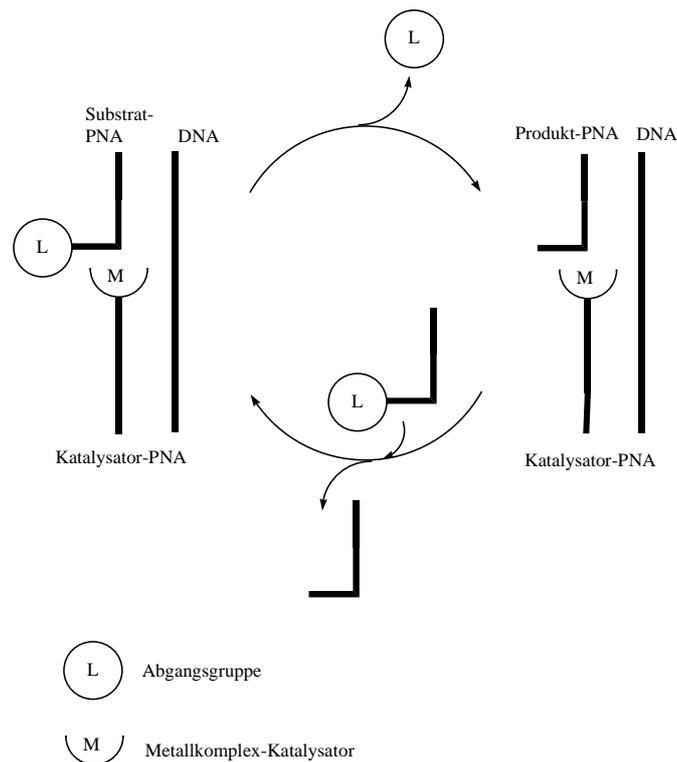
Eine repetitive Sequenz des Chromosoms 9 wurde selektiv markiert. Es waren aber auch Fluoreszenzsignale aufgrund unspezifischer Bindung des Oligonucleotids **17** zu beobachten. Durch Zugabe von Kupfer(II)sulfat wurde versucht, die Hintergrundfluoreszenz zu verringern, und damit die Markierungssensitivität zu steigern. Die Behandlung der Präparate mit Kupfer(II)sulfat-Lösung beeinträchtigt die Markierung nicht, wäre also im Prinzip ein praktikables Verfahren. Allerdings wurde keine wesentliche Verringerung der Hintergrundfluoreszenz erreicht. Offenbar liegen auch die unspezifisch gebundenen Sonden in einer „offenen“ Form vor, die durch Kupfer(II)-Zugabe nicht gelöscht wird und sich auch nicht in die Hairpin-Form überführen lässt.

Weitere Experimente, wie die Inkubation der präparierten Zellen direkt mit der Kupfer(II)-gelöschten Sonde **17**, stehen noch aus.

7 Zusammenfassung

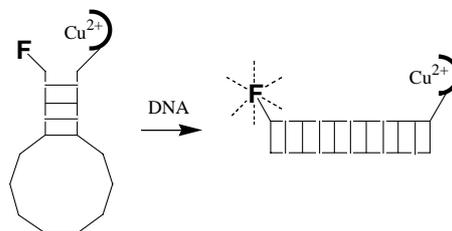
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Chelatliganden modifizierte Peptidnucleinsäuren (PNA) und Desoxyribonucleinsäuren (DNA) synthetisiert und deren Metallkomplexe für die Detektion von DNA-Sequenzen eingesetzt.

Es gelang erstmals, eine metallkatalysierte Reaktion am DNA-Templat durchzuführen. Dazu wurden N-terminal esterfunktionalisierte PNAs synthetisiert, welche als Substrat dienten, und C-terminal mit Chelatliganden modifizierte PNAs hergestellt, die in Gegenwart von Kupfer(II)-Ionen als Katalysatorkomponente wirkten. PNAs sind Oligonucleotid-Analoga, in denen das Zuckerphosphat-Rückgrat durch ein neutrales Polyamid-Rückgrat ersetzt ist. PNAs bilden stabilere Duplices mit komplementären Nucleinsäuren als DNA, so dass relativ kurze, präparativ gut zugängliche Sequenzen verwendet werden konnten. Außerdem ist, im Gegensatz zur DNA, die Estermodifikation kompatibel mit den Bedingungen der Standard-Festphasensynthese der PNA. Über Hybridisierung der modifizierten PNAs am DNA-Templat wurde der Katalysator in räumliche Nähe des Ester-Substrates gebracht, wodurch schnelle Hydrolyse des Esters stattfand. Der Reaktionsverlauf wurde MALDI-TOF-massenspektrometrisch durch Quantifizierung der Produkt-PNA verfolgt und durch HPLC bestätigt. Mit Kupferkomplexen der Katalysator-PNA **7** und der reaktivsten Substrat-PNA **6** gelang eine 150fache Beschleunigung der Esterhydrolyse gegenüber der Hintergrundreaktion in Abwesenheit des DNA-Templats. Die Selektivität gegenüber Fehlbasenpaarungen wurde ebenfalls getestet. Mit komplementärer DNA wurde eine 15-mal schnellere Reaktion gemessen als mit DNA, die eine einzelne Fehlbasenpaarung aufwies. Bei einem 100fachen Überschuss der Substrat-PNA relativ zum DNA-Templat wurden bis zu 35 Turnover beobachtet. In Schema 7.1 ist der Katalysezyklus abgebildet.



Schema 7.1: Katalysezyklus der metallkatalysierten Reaktion am DNA-Templat

In einem weiteren Projekt wurden die ersten metallgequenchten „Molecular Beacons“ entwickelt und erfolgreich für die DNA-Sequenzerkennung eingesetzt. Dazu wurden am 5'-Terminus Ligand- und am 3'-Terminus Fluorescein-modifizierte, haarnadelförmige DNAs synthetisiert. Durch Zusatz von Kupfer(II)sulfat wurde ein effektives Quenchen der Fluoreszenz erreicht. Nach Zugabe komplementärer DNA konnte die Fluoreszenz durch räumliche Trennung von Fluorophor und Quencher wiederhergestellt werden (Schema 7.2) und nahm um den Faktor 14 zu.



Schema 7.2: Metallgequenchter „Molecular Beacon“, der bei Zugabe komplementärer DNA fluoresziert

Die Sonden wurden auch auf Fehlbasen-Diskriminierung getestet. Eine Fehlbasenpaarung in der Sequenz bewirkte nur 1/40 der Fluoreszenzzunahme, die mit perfekt komplementärer DNA beobachtet wird.

8 Experimenteller Teil

8.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Die für die Synthesen und die Aktivitätsuntersuchungen verwendeten Chemikalien wurden von Acros (Geel, Belgien), Aldrich/Sigma/Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Advanced Chemtech (Louisville, KY) und Novabiochem (Laufelfingen, Schweiz) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Reagenzien für die PNA-Synthesen wurden von PerSeptiv Biosystems (Hamburg, Deutschland) erhalten und die PNA-Biokonjugate mit einem ExpediteTM 8909 System derselben Firma synthetisiert. Die verwendeten DNA-Oligonucleotide wurden von Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) bezogen und waren HPLC-gereinigt. Für alle Versuche wurde Wasser mit HPLC-Reinheit verwendet. Mit Ausnahme der Cu(II)-Salz- und Puffer-Lösungen wurden alle anderen Lösungen vor den Experimenten frisch angesetzt.

Die MALDI-TOF-MS-Untersuchungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg an einem Bruker BIFLEX III Spektrometer durchgeführt, wobei für Messungen der DNAs der negative und für Messungen der PNA-Konjugate der positive Messmodus verwendet wurde. Wenn nicht anders erwähnt, wurde für MALDI-TOF-MS-Analysen der DNAs eine Matrix bestehend aus einer gesättigten Lösung von Azathiathymidin in Acetonitril ($\text{ATT}_{\text{ges.}(\text{CH}_3\text{CN})}$) : Diammoniumcitrat (DAC; 0,1 M, in Wasser) = 1:1 benutzt, wohingegen für die PNA-Konjugate eine Lösung von 27 mM Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymethylsäure) in Acetonitril : Wasser : Methanol = 1:1:1 mit 0,1% TFA verwendet wurde. Die zu untersuchende Probe (1 μl) wurde auf einen MALDI-Träger gegeben und mit der Matrix vermischt. Für die PNA-Proben wurden für Wasser- und Wasser/ CH_3CN -Lösungen ein Probe-zu-Matrix-Verhältnis von 1:3 verwendet, wohingegen für TFA/m-Cresol-Lösungen (4:1) ein Verhältnis von 1:20 benutzt wurde. Bei den wässrigen DNA-Proben wurde immer ein Probe-zu-Matrix-Verhältnis von 1:1 verwendet. Die Proben trockneten an der Luft und wurden innerhalb der nächsten drei Stunden untersucht oder bis zur Messung in einer Argonatmosphäre bei 4°C aufbewahrt. Die Genauigkeit der MALDI-TOF-MS-Untersuchungen mit externer Kalibrierung betrug $\pm 0,1\%$ der Molekülionenmasse. Die HPLC-Messungen wurden bei 22°C und 49°C an einem Shimadzu Flüssigkeits-Chromatographen durchgeführt, der mit einem UV-Vis-Detektor und seit dem 1.10.02 auch mit einem Säulen-Ofen ausgerüstet war. Als Säule wurde eine "Nucleosil C4"-Säule (250 x 4,6 mm) von Machery-Nagel eingesetzt. Für die HPLC-Reinigung der PNA- und DNA-Biokonjugate wurde eine 500 μl -Injektionsschleife verwendet, wohingegen in allen anderen

Untersuchungen eine 20 µl-Injektionsschleife eingesetzt wurde. Als Lösungsmittelgradient wurde für PNA-Proben CH₃CN (0,1% TFA, Lösungsmittel B) und Wasser (0,1% TFA, Lösungsmittel A) und für die DNA-Proben CH₃CN (Lösungsmittel B) und Wasser (Triethylammoniumacetat 0,1 M, Lösungsmittel A) eingesetzt. Der Reinheitsgrad der für die HPLC-Untersuchungen verwendeten Lösungsmittel betrug > 99,8%.

Die UV/Vis Experimente wurden auf einem Varian Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer durchgeführt, wobei für Absorptionsmessungen (T=22°C) eine Quarz-Küvette (V = 1 ml) der Firma Hellma und für DNA/PNA-Schmelzpunktbestimmungen (T=10-70°C; 20-80°C) schwarzwandige Quarz-Semi-Mikroküvetten (V = 0,9 ml; ø = 1 cm) der Firma Varian benutzt wurden.

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer aufgenommen, wobei eine Ultra-Mikro-Küvette (50 µl) der Firma Hellma verwendet wurde.

NMR-Messungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg mit einem Bruker AVANCE DPX 200 NMR-Spektrometer durchgeführt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von Deutero bezogen. Zur Standardisierung der chemischen Verschiebungen wurden die Restwasserstoffsignale der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard verwendet.

Die FAB-Massenspektren wurden von Herrn Dr. J. Gross von der massenspektroskopischen Abteilung des Organisch-Chemischen Institutes an einem Joel JMS-700 Gerät angefertigt.

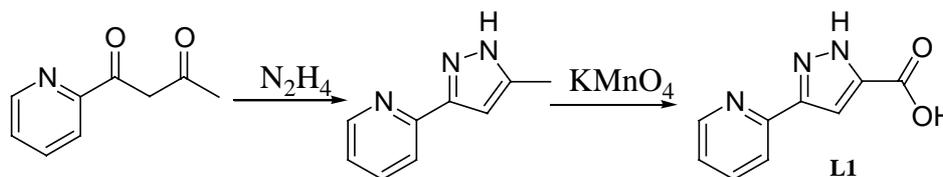
Um Reaktionslösungen zu zentrifugieren, wurde die Biofuge pico von Heraeus verwendet. Als Reaktionsgefäße für die kupferkatalysierten Reaktionen am DNA-Templat wurden low-retention Reaktionsgefäße (V = 0,6 und 1,7 ml) der Firma Kisker (Steinfurt) benutzt.

Lösungen wurden mit einem MS2 Minishaker von IKA gemischt.

Reaktionslösungen wurden mit einem Thermomixer comfort für 1,5 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf temperiert und durchmischt.

PNA-Lösungen wurden bis zur Trockene mit einem Gefriertrockner VaCo 5 der Firma Zirbus eingengt.

8.2 Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin



Schema 8.1: Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin (L1)

8.2.1 Synthese von 2-(5-Methylpyrazolyl)-pyridin

Es werden 4.5 g (27.6 mmol) 1-Pyridyl-butan-1,3-dion in 50 ml Ethanol vorgelegt. Unter Rühren werden dann 40 ml 80% Hydrazinhydrat bei Raumtemperatur langsam hinzuge tropft. Anschließend erhitzt man die Lösung 5h unter Rückfluss. Das Lösungsmittel und überschüssiges Hydrazinhydrat zieht man am Rotationsverdampfer ab. Das erhaltene rotbraune Öl wird nicht aufgereinigt und sofort in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 4.3 g (27.0 mmol, 97.8%)

8.2.2 Synthese von 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin (L1)

4.3 g (27.0 mmol) 2-(5-Methylpyrazolyl)-pyridin werden in 100 ml Wasser suspendiert. Man erwärmt die Suspension auf 70°C, und gibt unter Rühren portionsweise 20 g (0.12 mol) Kaliumpermanganat zu. Nach Beenden der Oxidation wird die Reaktionslösung weitere 45 min unter Rückfluss erhitzt, und der entstandene Braunstein heiß abfiltriert. Die leicht gelbliche Lösung säuert man mit konzentrierter Salzsäure an, und rührt den Ansatz anschließend 20 h bei Raumtemperatur. Dabei fällt weißes 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin aus der Lösung aus, welches abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet wird.

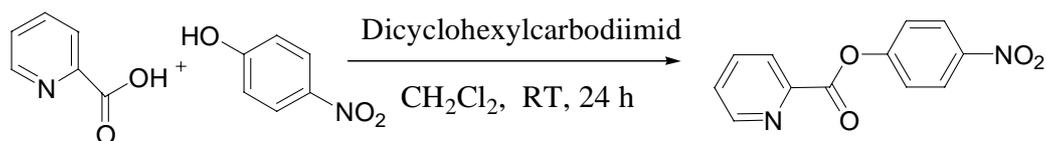
Ausbeute: 0.54 g (2.85 mmol, 10.6%)

Habitus: weißer Feststoff

¹H-NMR (D₂O, 200 MHz): δ = 8.59 (d, J = 5.6 Hz, 1H); 8.49 (t, J = 8 Hz, 1H); 8.24 (d; J = 8 Hz, 1H); 7.86 (t, J = 6,4 Hz, 1H); 7.37 (s, 1H)

MS (FAB+): m/z = 190.1 (M+H⁺)

8.2.3 Synthese des Picolinsäure-*p*-nitrophenylesters



Schema 8.2: Synthese des Picolinsäure-*p*-nitrophenylesters

In einem 250 ml-Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Stickstoffüberleitung werden 1.23 g Picolinsäure (10 mmol), 1.39 g Nitrophenol (10 mmol) und 10 ml Dicyclohexylcarbodiimid einer 1 M Lösung in CH₂Cl₂ (DCC; 10 mmol) unter Stickstoffatmosphäre in 100 ml absolutem Methylenchlorid gelöst. Der Ansatz wird einen Tag bei RT gerührt, wobei sich die Lösung gelb färbt. Das entstandene Harnstoff-Derivat wird abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockene eingengt. Den verbleibenden gelblichen Feststoff kristallisiert man aus Methanol dreimal um und trocknet den weißen Feststoff im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 120 mg (0.5 mmol; 5.0 %)

Habitus: weißer, feinkörniger Feststoff

¹H-NMR (CDCl₃; 200 MHz): δ = 7.49 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 7.65 (dd, 1H), 7.97 (dd, 1H), 8.33 (m, 3H), 8.87 (d, 1H).

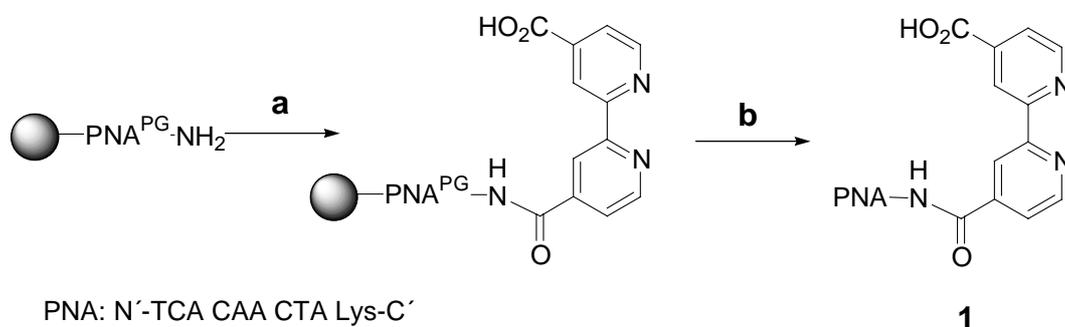
MS (FAB+): m/z = 245.2 (M+H⁺)

8.3 Synthesen der PNA-Konjugate

Die Synthesen der PNA-Fragmente erfolgten an einem Expedite 8909 PNA/DNA-Syntheseautomaten, der vom Hersteller für 2 μ molare Ansätze empfohlen wird. Bei den Festphasensynthesen wurde, falls nicht anders angegeben, die Festphase in einer Spritze mit Fritte vorgelegt und die gelösten Reagenzien aufgezogen. Das Reinigen der Festphasen und das Abspalten vom polymeren Träger erfolgte ebenfalls in der Spritze.

8.3.1 Synthese von N-modifizierten PNAs

8.3.1.1 Synthese der PNA 1



Schema 8.3: Synthese der PNA 1

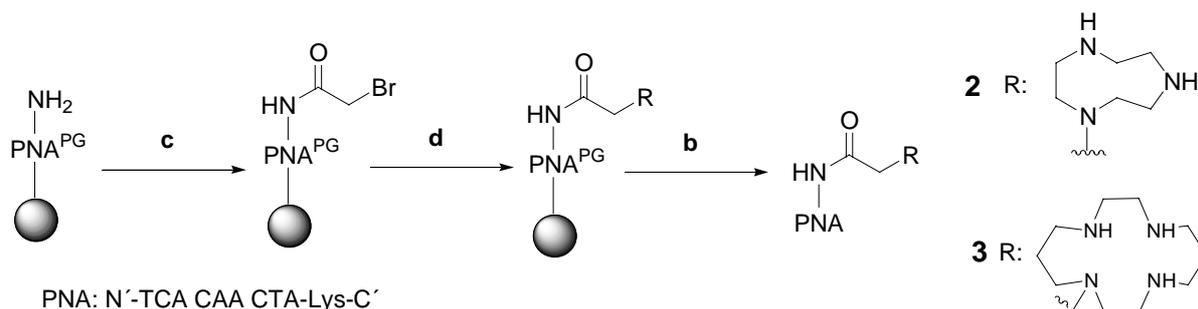
a Addition der 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure an das Polymer

Für 2 μ mol Polymer werden 48.8 mg (200 μ mol) 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure, 68 mg (180 μ mol) HBTU und 27 mg (200 μ mol) HOBT abgewogen. Die Stoffe werden in 1 ml DMF gelöst, mit 76 μ l (440 μ mol) DIEA versetzt und zur Festphase gegeben. Nach 30 min wird die Flüssigkeit verworfen, die Festphase dreimal mit DMF (je 1 ml) und dreimal mit Acetonitril (je 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

b Abspaltung der PNA von der Festphase:

Zur festphasengebundenen PNA werden 300-400 μ l einer TFA/m-Cresol Lösung (4:1) gegeben. Nach 90 min wird die Festphase abfiltriert und das Filtrat mit 3 ml Diethylether versetzt. Es bildet sich ein Niederschlag; der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit Diethylether resuspendiert. Das Pellet wird dreimal mit Diethylether gewaschen, getrocknet, in Wasser gelöst und HPLC-gereinigt.

8.3.1.2 Synthese der PNAs 2 und 3



Schema 8.4: Synthese der PNAs 2 und 3

c Addition von Bromessigsäurebromid an die PNA–Festphase

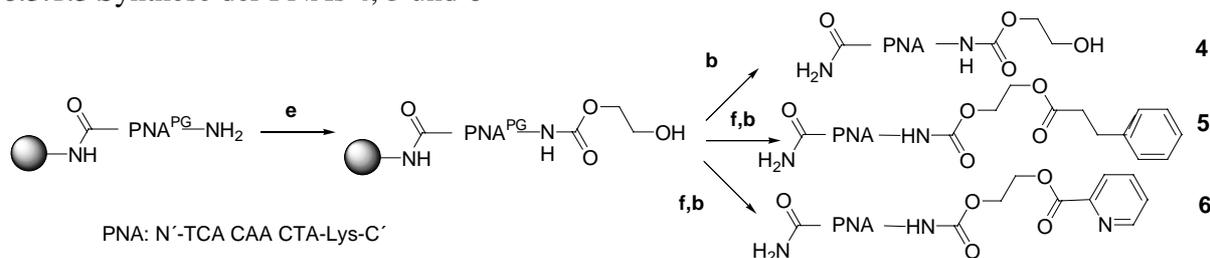
17.2 μl (200 μmol) Bromessigsäurebromid werden in 1 ml DMF gelöst und mit 34 μl (200 μmol) DIEA versetzt. Die Lösung wird zur Festphase gegeben und 40 min geschüttelt. Nach der Reaktion wird die Festphase dreimal mit je 1 ml DMF und dreimal mit je 1 ml Acetonitril gewaschen und im Vakuum getrocknet.

d Addition von Triazacyclononan bzw. Cyclam an das PNA--Festphase-Bromessigsäure-Amid

40 mg Cyclam (200 μmol) oder 47.7 mg (200 μmol) Triazacyclononan-Trihydrochlorid werden als Feststoff zur Festphase in die Spritze mit Fritte gegeben. In 2 ml Dichlormethan wird 34 μl (200 μmol) DIEA gelöst und ebenfalls zur Festphase gegeben. Die Lösung wird 24 h geschüttelt; im Anschluss wird die Festphase mit Chloroform, DMF und Acetonitril gewaschen und getrocknet.

b Die Abspaltung von der Festphase erfolgt analog Kapitel 8.3.1.1 **b**

8.3.1.3 Synthese der PNAs 4, 5 und 6



Schema 8.5: Synthese Alkohol- und Ester-modifizierter PNAs 4, 5 und 6

e Addition des Ethylenglycols mit CDI an die Festphase

2 μmol der festphasengebundenen PNA werden mit 32.4 mg (200 μmol) Carbonyldiimidazol (CDI) in 300 μl DMF versetzt, und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird die Reaktionslösung entfernt und die Festphase dreimal mit DMF gewaschen. Nun gibt man 200 μl (3.58 mmol) Ethylenglycol hinzu und schüttelt für weitere 24 Stunden. Das festphasengebundene Produkt wird mit DMF und CH_3CN (je dreimal mit 1 ml) gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

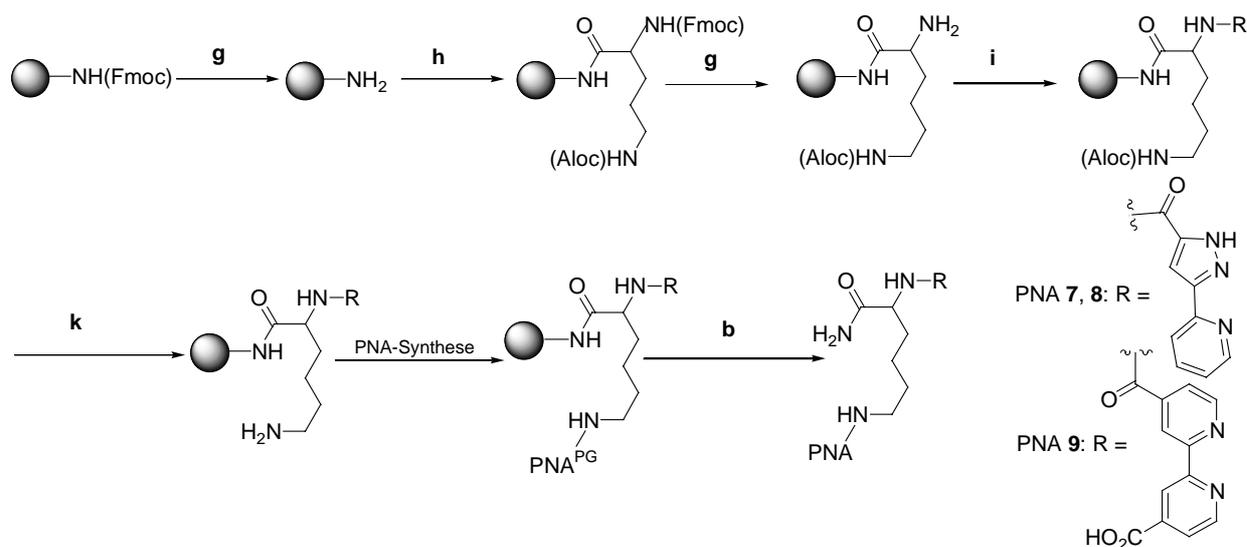
b Abspaltung der PNAs von der Festphase

Die Abspaltung wird analog 8.3.1.1 **b** durchgeführt.

f Veresterung der festphasengebundenen Alkohol-PNA

200 μmol Hydrozimtsäure (30 mg) bzw. 200 μmol 2-Picolinsäure (24.6 mg) und HOBT (27 mg; 200 μmol), sowie DMAP (24.4 mg; 200 μmol) und DIC (25.2 mg; 31.3 μmol) werden in 1 ml DMF suspendiert und umgehend zu der festphasengebundenen PNA gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 25°C für 24 h geschüttelt und die überschüssige Reaktionslösung entfernt. Das festphasengebundene Produkt wird dreimal mit DMF, dann dreimal mit CH_3CN gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

8.3.2 Synthese von C-modifizierten PNAs 7, 8 und 9



Schema 8.6: Synthese der PNAs 7, 8 und 9

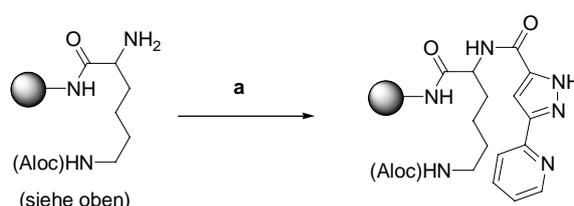
g Abspaltung von Fmoc-Schutzgruppen

Zum Festphasenpolymer (2 μmol) wird eine Lösung aus Piperidin/DMF (1:4, Deblock Solution) gegeben. Es wird 20–30 min geschüttelt. Anschließend wird die Flüssigkeit verworfen. Die Festphase wird dreimal mit jeweils 1 ml DMF und ebenfalls dreimal mit 1 ml Acetonitril gewaschen. Es wird mindestens 1h im Vakuum getrocknet.

h Addition der Fmoc- und Aloc- geschützten Aminosäure Lysin

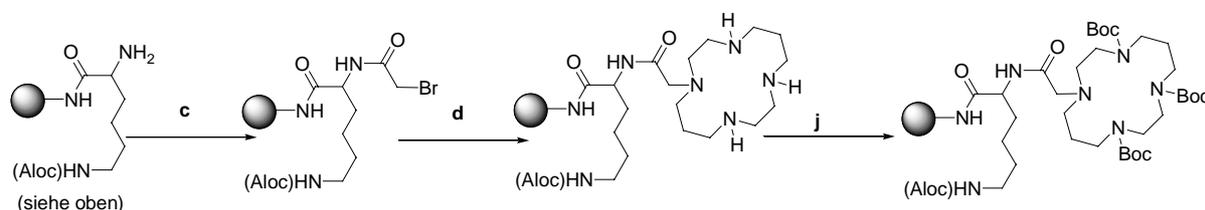
Die Addition der Fmoc- und Aloc-geschützten Aminosäure Lysin erfolgt analog der in 8.3.1.1 a beschriebenen Durchführung. In diesem Fall wurde jedoch als Säure 90.5 mg (200 μmol) der Fmoc- und Aloc- geschützten Aminosäure Lysin verwendet wird.

i Addition von L1 bzw. Cyclam an die Festphase



Schema 8.7: Addition von L1 an das Carboxyende der PNA

Die Addition von **L1** an die festphasengebundene entschützte Aminogruppe des Lysins erfolgt analog der in 8.3.1.1 **a** durchgeführten Synthese, jedoch werden anstatt der dort verwendeten Säure 38 mg (200 μmol) des 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridins benutzt.



Schema 8.8: Addition von Cyclam an das Carboxyende der PNA

Die Addition des Cyclams erfolgt, wie in 8.3.1.2 **c**, **d** beschrieben, über die Kopplung des Bromessigsäurebromids an die Festphase und anschließende Umsetzung des Bromids mit Cyclam. Da anschließend weitere Umsetzung folgen, müssen die Aminogruppen des Cyclams geschützt werden.

j Schützen der Aminofunktionen des Cyclams mit BOC

Zu 0.8 μmol der festphasengebundenen Cyclam-modifizierten Substanz gibt man 41.9 μl (240 μmol) DIEA und 52.4 mg (240 μmol) Di-*t*-Butyldicarbonat gelöst in 1 ml CH_2Cl_2 und schüttelt für 24 h bei 25°C. Anschließend wird das festphasengebundene Produkt fünfmal mit je 1 ml Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet.

k Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe

1.25 mg (5 μmol) Triphenylphosphan (PPh_3) und 6.25 mg (5,5 μmol) Tetrakis(triphenylphosphan)palladium ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) werden unter Argon-Atmosphäre in 0.5 ml Dichlormethan gelöst. In einem anderen Gefäß werden 6.25 mg (31 μmol) Diethylammoniumhydrogencarbonat ($[\text{Et}_2\text{NH}_2]^+ (\text{HCO}_3)^-$) ebenfalls unter Argon-Atmosphäre in Dichlormethan suspendiert. Beide Lösungen werden vermischt und zur Festphasen-PNA gegeben. Es wird mindestens 2 h (2-24 h) geschüttelt, wobei die Lösung vor Lichteinstrahlung geschützt werden muss. Dazu wird sie mit Alufolie umgeben.

Der Überstand wird nach der Reaktion verworfen und die Festphase 3 Mal mit je 1 ml DMF/DIEA (0.15% DIEA) und ebenfalls dreimal mit DMF/Ethylthiocarbonat (0.5%

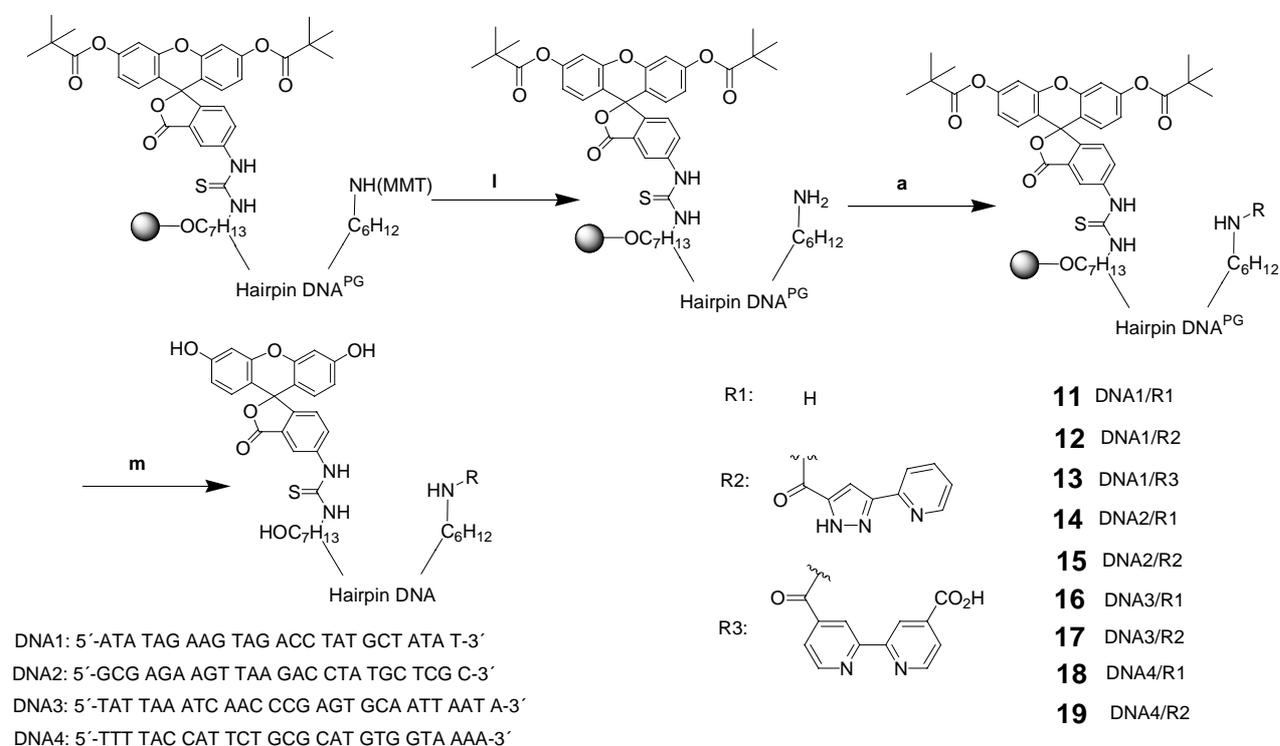
Ethylthiocarbonat) gewaschen. Anschließend wird dreimal mit DMF und dreimal mit Acetonitril gewaschen, bevor im Vakuum getrocknet wird.

b Die Abspaltung von der Festphase erfolgte wie in 8.3.1.1 **b** beschrieben.

8.4 Synthesen der DNA-Konjugate

Die 5'-MMT-geschützten Aminolink und 3'-Fluorescein-, Tamra- oder Aminolink-modifizierten Oligonucleotide wurden im 0.2 μmol -Maßstab von der Firma Metabion aus Planegg-Martinsried an einer CPG-Festphase synthetisiert und nicht abgespalten geliefert. Bei den Festphasensynthesen wird, falls nicht anders angegeben, die Festphase in einer Spritze mit Fritte vorgelegt und die gelösten Reagenzien aufgezogen. Das Reinigen der Festphasen und das Abspalten vom polymeren Träger erfolgte ebenfalls in der Spritze.

8.4.1 Synthese der Oligonucleotide 11-19, 31 und 32



Schema 8.9: Synthese der MB-DNA-Konjugate 11-19

I Abspaltung der MMT-Schutzgruppe von dem Aminolink der DNA-Oligonucleotide

Zu 0.2 μmol festphasengebundenem Oligonucleotid wird 1 ml Deblock-Solution (Trichloressigsäure in Dichlormethan) der Firma Proligo gegeben und 10min bei 25°C geschüttelt. Anschließend wird die überschüssige Reaktionslösung entfernt, dreimal mit CH_2Cl_2 (1 ml), dreimal mit DMF (1 ml) und dreimal mit CH_3CN (je 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

a Addition der Säure

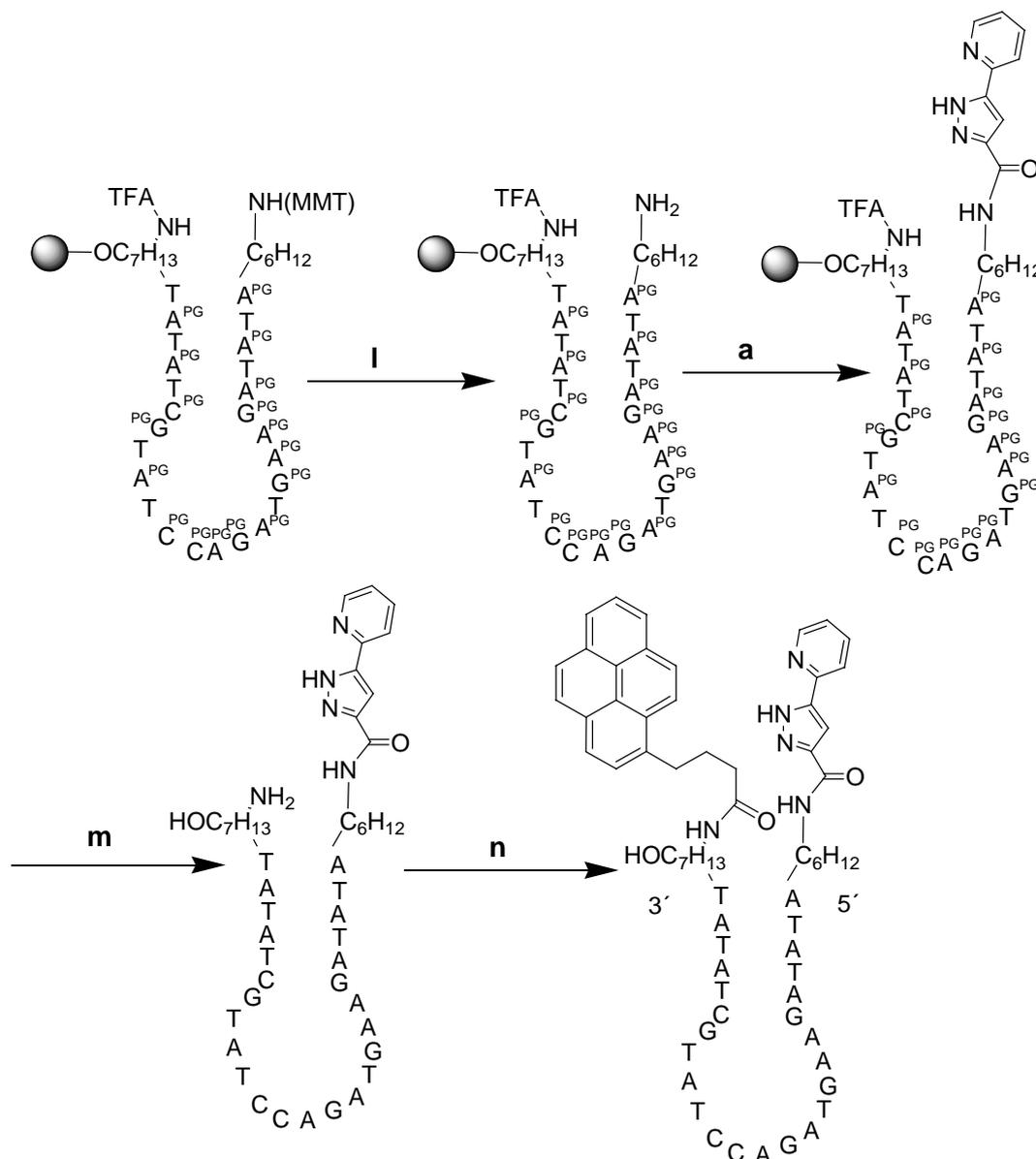
Die Addition der Säure erfolgt analog 8.3.1.1 **a** für das 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure-Addukt, bzw. analog 8.3.2 **a** für das 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin Addukt.

m Abspaltung der DNA-Oligonucleotide von der Festphase

Zu 0.2 μmol der festphasengebundenen DNA werden 500 μl 25% wässrige Ammoniumhydroxid-Lösung gegeben und 24h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Lösung mit Wasser verdünnt, gefriergetrocknet, HPLC gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert (siehe 8.4).

Die Synthese des Oligonucleotids **31** erfolgte analog der Synthese der DNA **12**. Der 5'-MMT-geschützte C6-Aminolink- und 3'-Tamra-modifizierte „Molecular Beacon“ wurde ebenfalls von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) erhalten und wurde nicht abgespalten geliefert.

Die Synthese des Oligonucleotids **32** erfolgte ausgehend von einer am 3'-Ende C7-Aminolink- und 5'-C6-Aminolink-modifizierten DNA, die von Metabion an der Festphase geliefert wurde.



Schema 8.10: Synthese des MB-DNA-Konjugats 32

I Die Abspaltung der Monomethoxytrityl-Schutzgruppe erfolgt analog der Synthese der Oligonucleotide **11-19**.

a Addition der Säure

Die Addition der Säure erfolgt analog 8.3.2 **a** für das 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin-Addukt.

m Die Abspaltung des DNA-Oligonucleotids von der Festphase erfolgt analog der Synthese der Oligonucleotide **11-19**.

n 0.05 μmol des HPLC-gereinigten 5'-Ligand- und 3'-C7-Aminolink-modifizierten Oligonucleotids werden in 100 μl Wasser gelöst. Anschließend gibt man 100 μl eines Natriumcarbonat/Natriumhydrogencarbonat-Puffers (pH 9) und 0.5 μmol des N-Hydroxysuccinimidesters der Pyrenbuttersäure gelöst in 200 μl DMF zu. Nach 2 h Reaktionszeit wird die Lösung lyophilisiert und von überschüssigen Reagenzien durch HPLC-Reinigung getrennt.

8.5 HPLC-Reinigung der PNA- und DNA-Biokonjugate

Zur Reinigung werden die PNA-Biokonjugate **1-10** mittels HPLC von entstandenen Nebenprodukten getrennt und die erhaltenen Fraktionen über MALDI-TOF-MS charakterisiert. Fraktionen, die mehr als 90% des gewünschten Produktes enthalten, werden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Dafür werden folgende Laufmittelgradienten von 0.1% TFA in CH_3CN (Lösungsmittel B) und 0.1% TFA in Wasser (Lösungsmittel A) verwendet:

Gradient B, 49°C : 5 min bei 0% B, in 30 min von 0-35% B, in 10 min von 35-90% B, 10 min bei 90% B.

Zur Reinigung der DNA-Biokonjugate **11-19** werden die entstandenen Nebenprodukte mit einer Shimadzu HPLC, ausgestattet mit einem UV-Vis-Detektor auf einer EC 250 x 4.6 mm Nucleosil 300-5 C4-Säule, abgetrennt. Fraktionen, die mehr als 90% des gewünschten Produktes enthalten, werden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Für die HPLC-Trennung werden folgende Laufmittelgradienten von CH_3CN (Lösungsmittel B) und 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser (Lösungsmittel A) verwendet:

Gradient B, 25°C : 1 min bei 0% B, in 20 min von 0-30% B, in 6 min von 30-90% B, 10 min bei 90% B.

Die Ausbeuten der Konjugate wurden durch Bestimmung der Konzentration der reinsten Fraktion bei 260 nm in einem bestimmten Volumen Wasser erhalten und auf die eingesetzte Menge Polymer zurückgerechnet.

Charakterisierung der PNAs **1-10**:

- 1:** Ausbeute 2.8%; HPLC $R_t=25.9$ min; MALDI-TOF MS für $C_{114}H_{141}N_{56}O_{29}$ $[M+H]^+$: theor. 2759.5; gef. 2760.2.
- 2:** Ausbeute 4.4%; HPLC $R_t=22.6$ min; MALDI-TOF MS für $C_{110}H_{150}N_{57}O_{27}$ $[M+H]^+$: theor. 2702.8; gef. 2700.5.
- 3:** Ausbeute 1.8%; HPLC $R_t=23.4$ min; MALDI-TOF MS für $C_{114}H_{159}N_{58}O_{27}$ $[M+H]^+$: theor. 2774.5; gef. 2776.4.
- 4:** Ausbeute 5.2%; HPLC $R_t=22.8$ min; MALDI-TOF MS für $C_{105}H_{139}N_{54}O_{29}$ $[M+H]^+$: theor. 2620.5; gef. 2617.6.
- 5:** Ausbeute 0.9%; HPLC $R_t=24.6$ min; MALDI-TOF MS für $C_{114}H_{147}N_{54}O_{30}$ $[M+H]^+$: theor. 2753.8; gef. 2754.0.
- 6:** Ausbeute 2.9%; HPLC $R_t=25.7$ min; MALDI-TOF MS für $C_{111}H_{142}N_{55}O_{30}$ $[M+H]^+$: theor. 2726.7; gef. 2726.7.
- 7:** Ausbeute 3.7%; HPLC $R_t=23.8$ min; MALDI-TOF MS für $C_{98}H_{126}N_{55}O_{22}$ $[M+H]^+$: theor. 2426.4; gef. 2426.2.
- 8:** Ausbeute 1.4%; HPLC $R_t=23.7$ min; MALDI-TOF MS für $C_{110}H_{150}N_{59}O_{24}$ $[M+H]^+$: theor. 2684.4; gef. 2687.0.
- 9:** Ausbeute: 2.9%; HPLC $R_t=24.9$ min; MALDI-TOF MS für $C_{101}H_{145}N_{56}O_{22}$ $[M+H]^+$: theor. 2495.6; gef. 2496.0.
- 10:** Ausbeute: 3.7%; HPLC $R_t=22.4$ min; MALDI-TOF MS für $C_{83}H_{108}N_{49}O_{21}$ $[M+H]^+$: theor. 2127.1; gef. 2124.2.

Charakterisierung der DNAs **11-19** und **31, 32**:

- 11:** Ausbeute: 10.5%; HPLC $R_t=23.6$ min; MALDI-TOF MS für $C_{281}H_{349}N_{98}O_{158}P_{26}S_1$ $[M-H]^+$: theor. 8465.1; gef. 8467.8.
- 12:** Ausbeute: 9.8%; HPLC $R_t=24.5$ min; MALDI-TOF MS für $C_{290}H_{354}N_{101}O_{159}P_{26}S_1$ $[M-H]^+$: theor. 8636.1; gef. 8640.3.
- 13:** Ausbeute: 6.5%; HPLC $R_t=27.9$ min; MALDI-TOF MS für $C_{293}H_{355}N_{100}O_{161}P_{26}S_1$ $[M-H]^+$: theor. 8691.2; gef. 8690.9.
- 14:** Ausbeute: 8.7%; HPLC $R_t=23.6$ min; MALDI-TOF MS für $C_{278}H_{346}N_{101}O_{158}P_{26}S_1$ $[M-H]^+$: theor. 8468.1; gef. 8462.7.
- 15:** Ausbeute: 5.3%; HPLC $R_t=25.1$ min; MALDI-TOF MS für $C_{287}H_{351}N_{104}O_{159}P_{26}S_1$ $[M-H]^+$: theor. 8639.2; gef. 8634.7.

16: Ausbeute: 6.8%; HPLC $R_t=19.2$ min; MALDI-TOF MS für $C_{309}H_{385}N_{109}O_{174}P_{29}S_1$ [M-H⁺]: theor. 9340.8; gef. 9343.2.

17: Ausbeute: 5.7%; HPLC $R_t=19.9$ min; MALDI-TOF MS für $C_{318}H_{390}N_{112}O_{175}P_{29}S_1$ [M-H⁺]: theor. 9511.8; gef. 9515.3.

18: Ausbeute: 9.8%; HPLC $R_t=19.4$ min; MALDI-TOF MS für $C_{299}H_{375}N_{98}O_{175}P_{28}S_1$ [M-H⁺]: theor. 9041.5; gef. 9042.0.

19: Ausbeute: 7.2%; HPLC $R_t=21.2$ min; MALDI-TOF MS für $C_{308}H_{380}N_{103}O_{176}P_{28}S_1$ [M-H⁺]: theor. 9212.5; gef. 9212.8.

31: Ausbeute: 8.5%; HPLC $R_t=24.8$ min; MALDI-TOF MS für $C_{310}H_{392}N_{103}O_{167}P_{26}$ [M-H⁺]: theor. 9038.2; gef. 9039.4.

32: Ausbeute: 2.4%; HPLC $R_t=22.2$ min; MALDI-TOF MS für $C_{289}H_{357}N_{100}O_{155}P_{26}$ [M-H⁺]: theor. 8515.9 gef. 8519.8

8.6 Durchführung der Hybridisierungsexperimente

8.6.1 Durchführung der Schmelzpunktuntersuchungen

Für die Schmelzpunktexperimente der PNAs werden Lösungen ($V = 700 \mu\text{l}$) bestehend aus DNA (2 μM), PNA (2 μM), MOPS-Puffer (10 mM) und NaCl (50 mM) untersucht.

Bei den DNA/DNA-Schmelzpunktmessungen werden 1 μM Oligonucleotid **12**, **14**, **15** und 1 μM DNA bzw. 0.2 μM Oligonucleotid **11**, **12** und 0.2 μM DNA verwendet.

Zunächst wird die Absorption (A ; dimensionslos) der wässrigen PNA- und DNA-Lösungen photometrisch bei $\lambda=260$ nm bestimmt, so dass anschließend die Konzentrationen (c ; mol l^{-1}) bei bekannter Küvettendicke (d ; cm) und molarem bekannten Extinktionskoeffizienten (ϵ ; $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt werden können.

$$\text{Lambert-Beersches Gesetz: } \mathbf{A = \epsilon c d}$$

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ der PNAs und DNAs wird folgendermaßen berechnet⁵²:

$$\epsilon = n \epsilon(\text{A}) + m \epsilon(\text{C}) + l \epsilon(\text{G}) + m \epsilon(\text{T})$$

$n =$ Anzahl der Adeninbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(\text{A}) = 13700 \text{ l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$m =$ Anzahl der Cytosinbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(\text{A}) = 6600 \text{ l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$l =$ Anzahl der Guaninbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(A) = 11700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 $k =$ Anzahl der Thyminbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(A) = 8600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
+ Fluorescein: $\epsilon(A) = 21000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; + Pyridylpyrazolyl: $\epsilon(A) = 8000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
+ Bipyridindicarbonsäure: $\epsilon(A) = 10000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; + Tamra: $\epsilon(A) = 32300$.

Dann werden nacheinander die MOPS-, NaCl-, PNA- und DNA-Lösungen sowie Wasser in eine Küvette gegeben, so dass das gewünschte Endvolumen ($V = 700 \mu\text{l}$) mit den anfangs angegebenen Konzentrationen erreicht wird. Die Lösung wird durchmischt ($3 \times 10 \text{ sec}$) und mit Argon gespült (5 min). Anschließend wird auf 90°C erwärmt (10 min) und dann auf die gewünschte Starttemperatur abgekühlt. Bei der Messung wird die Absorption in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt, indem in Schritten von 0.5°C erwärmt bzw. abgekühlt wird. Jeder Messvorgang wird mindestens zweimal wiederholt. Ist der Messbereich so gewählt, dass die Temperatur von 20°C unterschritten wird, wird die Küvette von außen mit Stickstoff umspült, um ein Beschlagen des Küvettenglases zu vermeiden.

8.6.2 Durchführung der T_m -Wertbestimmungen in 20% Acetonitril

Die Durchführung erfolgt analog 8.6.1, jedoch wird $140 \mu\text{l}$ Acetonitril (20%) bei einem Gesamtvolumen von $700 \mu\text{l}$ zugefügt.

8.6.3 Durchführung der T_m -Wertbestimmungen in Abhängigkeit von Kupfer(II)-Ionen

Zu den Lösungen ($V = 700 \mu\text{l}$) bestehend aus DNA ($2 \mu\text{M}$), PNA ($2 \mu\text{M}$), MOPS-Puffer (10 mM) und NaCl (50 mM), für welche in Schmelzpunktexperimenten die DNA/PNA-Duplexstabilität bereits bestimmt wurde (Kap. 8.6.1), werden schrittweise folgende wässrige CuSO_4 -Lösungen hinzugefügt:

CuSO_4 -Lösung: Zugabe von $1.4 \mu\text{l}$ einer $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Stammlösung bei einem Kupferionengehalt von $2 \mu\text{M}$ oder die entsprechenden Mengen bei größeren Kupfer(II)-Konzentrationen.

Nach jeder Metallsalzzugabe wird durchmischt (10 sec), mit Argon gespült (5 min) und der T_m -Wert, analog zu der in 8.6.1 beschriebenen Durchführung, bestimmt.

8.7 Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat

8.7.1 Durchführung der Voruntersuchungen zur Esterspaltung

Vorversuch der Quantifizierung der Reaktionsedukte und Reaktionsprodukte mit MALDI-TOF MS: Es werden 1 μM der Produkt-PNA **4**, 1, 2 oder 3 μM der Edukt-PNA **6**, 10 mM MOPS pH 7 und 50 mM NaCl Lösung 10 Sekunden durchmischt (Gesamtvolumen: 10 μl) und je 1 μl zu messende Substanz und 3 μl Matrix (27 mM Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamoylchlorid) in Acetonitril:Wasser:Methanol = 1:1:1 mit 0.1% TFA) auf das MALDI-Target getüpfelt. Es wird einige Minuten gewartet, bis der Spot getrocknet ist und dann im positiven Modus des MALDI-TOF Gerätes gemessen. Jede Reaktionsmischung wird zweimal getüpfelt und jeder Spot wird mindestens dreimal an unterschiedlichen Positionen gemessen. Durch Integration der erhaltenen Signale kann die Signalintensität bestimmt und verglichen werden.

Versuch der Analyse der Metall/Biokonjugatkomplexe mit MALDI-TOF: Bei einem Gesamtvolumen von 20 μl je Eppendorf-Gefäß werden folgende Konzentrationen vorgelegt: je 1 μM der zu untersuchenden PNA (**1**, **2**, **3**, **7**, **8** oder **9**), 10 mM MOPS Puffer pH 7 und 1 μM , 10 μM , 50 μM oder 100 μM Kupfer(II)sulfat bzw. Nickel(II)nitrat. Nach einer Stunde werden die Mischungen wie oben beschrieben getüpfelt und mit MALDI-TOF quantifiziert.

Für die Vorversuche zur Spaltfähigkeit des Picolinsäure-p-nitrophenylesters wird eine $1 \cdot 10^{-2}$ M Stammlösung des Esters in Acetonitril dargestellt. Für die Experimente wird zu 1 ml einer mit 10 mM MOPS auf pH 7 gepufferten wässrigen Lösung 1 μl der Stammlösung gegeben, so dass die Endkonzentration des Esters bei $1 \cdot 10^{-5}$ M liegt. Es werden 0 und $5 \cdot 10^{-6}$ M und $1 \cdot 10^{-5}$ M Kupfer(II)sulfat zugegeben und in 5-minütigen Abständen die Absorptionen bei 400 nm gemessen.

Vorversuche zur Spaltfähigkeit der Ester-modifizierten PNAs **5** und **6** mit freiem Kupfer: Es werden 20 μl einer Reaktionslösung mit folgendem Inhalt gemischt: 1 μM **5** oder **6**, 1 μM CuSO_4 , 10 mM MOPS pH 7 und 50 mM NaCl. Dann wird auf 50°C erwärmt. Aus der Reaktionslösung wird nach 0, 1, 2, 24, und 48h je 1 μl Probe entnommen, getüpfelt und MALDI-TOF gemessen. Aus den erhaltenen Signalen wird durch Integration der Edukt- und des Produkt-Peaks die Umsetzung bestimmt.

8.7.2 Durchführung metallkatalysierter Reaktionen am DNA-Templat

8.7.2.1 Stammlösungen

Für die Cu(II)-induzierten Esterhydrolysen der PNAs **5** und **6** werden Stammlösungen von NaCl, CuSO₄ und MOPS-Puffer hergestellt. Die Konzentration an CuSO₄ beträgt dabei 10 µM, die von NaCl 1 M und die des MOPS-Puffers 50 mM. Der MOPS-Puffer wird in Wasser gelöst und mit NaOH (2 N) auf pH 7 eingestellt. Vor den eigentlichen Spaltexperimenten werden die Konzentrationen der wässrigen PNA- und DNA-Lösungen durch Messung der Absorption bei $\lambda=260$ nm bestimmt und die Reinheit durch MALDI-TOF MS überprüft. Sie muss über 90% betragen.

8.7.2.2 Durchführung der Cu(II)-induzierten Hydrolyse der PNA **5**

Die Reaktionslösung ($V = 50$ µl) für die Versuche setzen sich wie folgt zusammen: PNA **5** (1 µM), PNA **7** bzw. **9** (1 µM), DNA **20** (1 µM) bzw. ohne DNA, CuSO₄ (1 µM), MOPS-Puffer (10 mM; pH 7) und NaCl (50 mM). Es werden Wasser, MOPS-, NaCl-, PNA **7** bzw. **9** und CuSO₄-Lösungen in das Reaktionsgefäß gegeben und die Lösung geschüttelt (3x15 sec). Danach werden PNA **5** und DNA **20** (Wasser im Kontrollexperiment) zugegeben, so dass das gewünschte Endvolumen ($V = 50$ µl) mit den anfangs angegebenen Konzentrationen erreicht wird. Die Reaktion wird durch die DNA-Zugabe gestartet. Den Reaktionslösungen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben für die MALDI-TOF MS Untersuchung (1 µl) entnommen und anschließend untersucht. Die Reaktionstemperatur für die Experimente beträgt 40°C.

8.7.2.3 Durchführung der Cu(II)-induzierten Hydrolyse der PNA **6**

Die Reaktionslösung ($V = 50$ µl) des Spaltexperimentes enthält PNA **6** (1 µM), PNA **7** (1 µM), DNA **20** (1 µM), CuSO₄ (1 µM), MOPS-Puffer (10 mM; pH 7) und NaCl (50 mM) bei 40°C. Außerdem werden analoge Experimente ohne DNA bzw. mit den DNAs **21** und **22** durchgeführt.

Wasser, MOPS-, NaCl-, PNA **7**- und CuSO₄-Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben und die Lösung geschüttelt (3x15 sec). Danach werden PNA **6** und DNA **20** (Wasser bzw. DNA **21** oder **22** im Kontrollexperiment) zugegeben, so dass das gewünschte Endvolumen ($V = 50$ µl) mit den anfangs angegebenen Konzentrationen erreicht wird. Durch die DNA-Zugabe wird die Reaktion gestartet. Für die MALDI-TOF-MS-Untersuchungen werden den Reaktionslösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben (1 µl) entnommen, auf einen MALDI-Träger gegeben und dort mit der Sinapinsäure-Matrix (3 µl) vermischt. Die

Proben trocknen an der Luft und werden anschließend massenspektrometrisch untersucht. Für die HPLC-Analysen wurden 15 μl entnommen und bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren.

8.7.2.4 Durchführung der Cu(II)-katalysierten Hydrolyse der PNA **6**

Diese Reaktion wird analog zu dem Spaltexperiment der PNA **6** (Kap. 8.7.2.3) bei $T = 40^\circ\text{C}$ durchgeführt, jedoch besitzen die an der Esterhydrolyse beteiligten Komponenten folgende Konzentrationen: PNA **6** (100 μM), PNA **7** (1 μM), DNA **20** (1 μM) (Wasser im Kontrollexperiment) und CuSO_4 (0.1 μM). Diese Spaltreaktionen werden durch MALDI-TOF MS und HPLC untersucht.

8.7.2.5 HPLC-Analyse der Esterspaltreaktion der PNA **6**

Der Reaktionslösung mit PNA **6** (1 μM), PNA **7** (1 μM), CuSO_4 (1 μM), MOPS-Puffer (10 mM; pH 7), NaCl (50 mM) und DNA **20**, **21** oder **22** (1 μM) bzw. keiner DNA bei 40°C (Kap. 8.6.3) werden nach 0 min und 60 min Proben (15 μl) entnommen und durch HPLC analysiert. Das Injektionsvolumen beträgt 10 μl . Es wird folgender Laufmittelgradient von 0.1% TFA in CH_3CN (Lösungsmittel B) und 0.1% TFA in Wasser (Lösungsmittel A) verwendet (Gradient B, 49°C): 5 min bei 0% B, in 30 min von 0-35% B, in 10 min von 35-90% B, 10 min bei 90% B.

8.8 Durchführung der Experimente mit metallgequenchtem „Molecular Beacon“

8.8.1 Durchführung der UV-Vis- und Fluoreszenz-Kupfertitrations von Fluorescein und Calcein

In einer 1 ml Fluoreszenzküvette werden 1 ml einer 1 μM Fluorescein bzw. 10 oder 50 μM Calcein, 1 M NaCl und 10 mM MOPS pH 7 Lösung vorgelegt und 10 Sekunden durchmischt. Dann wird durch Zugabe einiger μl einer 1×10^{-3} M Kupfer(II)sulfatlösung die jeweilige Metallionenkonzentration eingestellt, 10 Sekunden durchmischt und nach einer Anregung von 494 nm die Fluoreszenz im Bereich von 500-600 nm bzw. die Absorption zwischen 400 und 550 nm gemessen. Es wird 5 Minuten gewartet und nochmals gemessen, bis die erhaltene Fluoreszenz bzw. Absorption konstant ist. Anschließend werden die erhaltenen Werte noch volumenkorrigiert.

8.8.2 Durchführung der Fluoreszenz- bzw. UV-Vis-spektrophotometrischen Kupfertitrationen der DNA- Oligonucleotide

In einer 50 μl Fluoreszenzküvette wird für die Fluoreszenzmessungen 0.1 bzw. 1 μM der Oligonucleotide **11-19** bzw. **31** in 10 mM MOPS pH 7, und 1 M NaCl vorgelegt. Das Gesamtvolumen beträgt 60 μl . Durch Zugabe von Kupfer(II)sulfat-Lösung wird die jeweilige Kupferkonzentration eingestellt und die Fluoreszenz bzw. Absorption wie in 8.8.1 beschrieben gemessen. Die erhaltenen Daten werden volumenkoriert und die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 522 nm gegen die Kupferkonzentration aufgetragen. In den Kupfertitrationsexperimenten des Oligonucleotids **13** wird der MOPS-Puffer, die NaCl-Lösung und das verwendete Wasser vorher eine Stunde mit Chelex inkubiert, um Metallionenverunreinigungen zu entfernen.

8.8.3 Durchführung der Experimente zur DNA-Sequenzerkennung

In einer 50 μl Fluoreszenzküvette wird eine 0.1 μM Lösung der DNAs **11-19** in 10 mM MOPS pH 7 und 100 mM bzw. 1 M NaCl vorgelegt. Die Fluoreszenz wird gemessen, bis ein konstanter Wert erhalten wird. Durch Zugabe von Kupfersulfatlösung wird die Kupfer(II)-Ionenkonzentration auf 5 bzw. 50 μM eingestellt und die Fluoreszenz wieder bis zu einem konstanten Wert gemessen. Nun werden 5 Äquivalente komplementäre DNA bzw. DNA mit einer mismatch-Basenpaarung zugefügt und mit einer Heißluftpistole kurz erwärmt. Nach dem Erkalten der Lösung wird wieder die Fluoreszenz gemessen.

8.8.4 Durchführung der Messung der Hybridisierungsgeschwindigkeit

Um die Hybridisierungsgeschwindigkeit des Oligonucleotids **12** mit DNA **23** zu messen, werden 60 μl einer Lösung mit 0.1 μM Oligonucleotid **12**, 10 mM MOPS pH 7, 100 mM bzw. 1 M NaCl und 5 μM Kupfer(II)sulfat in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt. Das Experiment wird durch Zugabe von 0.5 μl der komplementären DNA **23** gestartet. Die Fluoreszenz wird jede 5 Minuten bei einer Wellenlänge von 522 nm (Anregungswellenlänge 494 nm) in einem Zeitraum von 60 Minuten gemessen.

8.8.5 Durchführung der Fluoreszenzuntersuchungen mit Oligonucleotid 30

In einer 50 μl Fluoreszenzküvette wird 0.1 μM des Oligonucleotids **30** (Metabion) zusammen mit 1 M (bzw. 0.1 M) NaCl und 10 mM MOPS pH 7 vorgelegt. Nach der Messung der Fluoreszenz wird 0.5 μM DNA **23** (bzw. DNA **25** dann **24**) zugegeben, 10 Sekunden

durchmischt, kurz mit einer Heißluftpistole erwärmt, und abermals die Fluoreszenz zwischen 500 nm und 600 nm gemessen.

8.8.6 Durchführung der Messung der Fluoreszenzwiederherstellung mit

Ethylendiamin

Das Experiment wird analog 8.8.3 durchgeführt, jedoch wird nach Zugabe der Kupfersulfatlösung ein Äquivalent (5 μM) Ethylendiamin zugesetzt und die Fluoreszenz gemessen. Die Konzentrationen betragen somit: 0.1 μM DNA **12**, 5 μM Kupfer(II)sulfat, 5 μM Ethylendiamin, 10 mM MOPS pH 7 und 1 M NaCl.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Löffler, Basiswissen Biochemie
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737-738
- [3] Knippers, Molekulare Genetik
- [4] J. Craig Venter et al., The Sequence of the Human Genome, *Science*, **2001**, 291, 1304-1351
- [5] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature*, **1993**, 365, 566
- [6] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 2954-2983
- [7] A. Ray, B. Norden, *The FASEB Journal*, **2000**, 14, 1041-1060
- [8] *Peptide Nucleic Acids – Protocols and Application*. Eds. P. E. Nielsen, M. Egholm, Horizon Scientific Press, Norfolk **1999**
- [9] B. Armitage, T. Koch, H. Frydenlund, H. Orum, G. B. Schuster, *Nucl. Acids Res.*, **1998**, 26, 715-720
- [10] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science*, **1988**, 239, 487-491
- [11] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry*, **1996**, 5, 2722-2728
- [12] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1986**, 25, 932-935
- [13] J. T. Goodwin, D. G. J. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 9197-9198
- [14] Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nature Biotechnology*, **2001**, 19, 148-152
- [15] J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 8618-8619
- [16] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 6961-6963
- [17] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1796-1800
- [18] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10304-10306
- [19] Z. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 11159-11163
- [22] J. S. Taylor, *U.S Pat. Appl. Pub.*, **2003**, 35pp.
- [21] Z. Ma, J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9(9), 2501-2510
- [22] Physik; Christian Gerthsen, Hans O. Kneser, Helmut Vogel, 16. Auflage, Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York; **1989**
- [23] G. Anderegg, H. Flaschka, R. Sallmann, G. Schwarzenbach, *Helv. Chim. Acta*, **1954**, 37, 113
- [24] R. Krämer, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 804
- [25] F. Pina, M. A. Bernardo, E. Garcia-Espana, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 2143-2157
- [26] H. Diehl, J. L. Ellingboe, *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 882
- [27] J. Körbl, F. Vydra, *Z. Anal. Chem.*, **1958**, 161, 200
- [28] Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition, by Richard P. Haugland
- [29] L. Saari, W. Seitz, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 810
- [30] D. F. Hoelzl Wallach, T. L. Steck, *Anal. Chem.*, **1963**, 46, 1035-1044
- [31] L. Fabrizzi, A. Leone, A. Taglietti, *Angew. Chem.*, **2001**, 113, 3156-3159
- [32] V. Amendola, L. Fabrizzi, C. Mangano, H. Miller, P. Pallavicini, A. Perotti, A. Taglietti, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2553-2556
- [33] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature biotechnology*, **1996**, 14, 303-308
- [34] "Principles of Fluorescence Spectroscopy", **1983**, Joseph Lakowicz, Plenum Publishers, New York
- [35] H. Neuweiler, A. Schulz, A. C. Vaiana, J. C. Smith, S. Kaul, J. Wolfrum, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 4769-4773
- [36] B. T. Kahn, M. Raju, S. M. Zakeeruddin, *Dalton Trans.*, **1998**, 67-71
- [37] J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 12410-12411

- [38] R. Krämer, I. O. Fritsky, H. Pritzkow, L. A. Kovabasyuk, *Dalton Trans.*, **2002**, 1307-1314
- [39] K. Micko, *Monatsh. Chem.*, **1896**, *17*, 442
- [40] S. R. Pully, L. S. Hegedus, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9037-9047
- [41] P. A. Tempest, S. D. Brown, R. W. Armstrong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 640-642
- [42] G. Böhm, J. Dowden, D. C. Rice, I. Burgess, J. F. Pilard, B. Guilbert, A. Haxton, R. C. Hunter, N. J. Turner, S. L. Flitsch *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *39*, 3819-3822
- [43] J. Chin, V. Jubian, *Chem. Commun.*, **1989**, 839-841
- [44] T. H. Fife, T. J. Przystas, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 1041-1047
- [45] F. H. Zelder, J. Brunner, R. Krämer, *Chem. Comm.*, **2004**, *7*, 902-903
- [46] B. T. Kahn, M. Raju, S. M. Zakeeruddin, *Dalton Trans.*, **1988**, 67-71
- [47] SCDatabase *Academic Software*
- [48] I. Nazarenko, R. Pires, B. Lowe, M. Obaidy, A. Rashtchian, *Nucl. Acids Res.*, **2002**, *30*, 2089-2195
- [49] A.E.Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, e122
- [50] C. C. Su, Y. L. Lin, S. J. Liu, T. H. Chang, S. L. Wang, L. F. Liao, *Polyhedron*, **1993**, *12*, 2687-2696.
- [51] R. Griesser, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, **1970**, *9*, 1238-1243
- [52] Handbuch *Expedite 8900 PNA Chemistry User's Guide C-2/ C-3*.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

„Copper(II) quenched oligonucleotide probes for fluorescent DNA sensing“

J. Brunner, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, im Druck

„DNA-templated metal catalysis“

J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 12410-12411

„DNA-templated catalysis using a metal cleavable linker“

F. H. Zelder, J. Brunner, R. Krämer, *Chem. Comm.*, **2004**, *7*, 902-903

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben

Dr. Andriy Mokhir danke ich für die gute Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen, die Instandhaltung der Laborgeräte und für die praktischen Tipps und Kniffe.

Bei Heike Vongerichten, Karin Gabel, Tanja Krüger und Claudia Dienemann möchte ich mich für die Organisation des „alltäglichen“ Laborbetriebs und für die Unterstützung bei den HPLC-Untersuchungen bedanken.

Meinen Laborkollegen Malgorzata Jagoda, Dr. Felix Zelder, Nora Härdle, Dr. Andriy Mokhir, Iris Boll, Patrick Plitt, Stefan Wörl, Mareike Göritz und Radek Kierat danke ich für das gute „Teamwork“.

Mareike Göritz, Nora Härdle und Iris Boll gilt mein Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Auszubildenden Julia Dietze danke ich für die Unterstützung und Unterhaltung im Labor.

Bei meiner Lehramtskandidatin Beate Ucinck, meinem FH-Praktikanten Jakob Kwak sowie zahlreichen Anorganik- und Organikpraktikanten möchte ich mich ebenfalls für die Hilfe im Labor bedanken.

Allen übrigen Arbeitskreis-Mitgliedern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank an meine Eltern, meinen Großeltern, meiner Schwester und meiner Freundin Gosia für die Unterstützung und das Verständnis während der Promotion.

Erklärungen gemäß § 7 (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 einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 22.09.2004

(Jens Brunner)

