

# Funktionalisierte Nucleinsäuren für die DNA-Sequenzerkennung

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von  
Mareike Göritz  
aus  
Marburg a. d. Lahn

**2006**



# Kurzfassung auf Deutsch

Die Arbeit umfasste die Synthese modifizierter Peptidnucleinsäuren und Metallkomplex-funktionalisierter Oligonucleotide und deren Anwendung für die sequenzspezifische Nucleinsäuredetektion.

In das Polyamid-Rückgrat von Peptidnucleinsäuren (PNAs) wurden reaktive Estergruppen integriert. Es wurden vier verschiedene PNAester synthetisiert und es konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität der Ester durch die Hybridisierung mit komplementärer DNA beeinflusst wird: Eine hydrolytische oder Ethylendiamin-vermittelte Spaltung der PNAester war in der Duplex im Vergleich zum Einzelstrang oder der Hybridisierung mit mismatch-DNA um ca. 50% gehemmt.

Metall-gelöschte Molecular Beacons sind Oligonucleotid-Sonden mit Haarnadelstruktur, bei denen im nicht-hybridisierten Zustand die Fluoreszenz eines Fluorphors an einem Ende der DNA durch einen Chelatkomplex am entgegengesetzten Terminus effektiv gelöscht wird. Ein Nachteil der literaturbeschriebenen Systeme ist die relativ geringe Metallionen-Affinität. Es wurden 3'-Fluorescein- bzw. 3'-Tetramethylrhodamin-modifizierte Oligonucleotide synthetisiert, die mit Terpyridin als Chelatliganden derivatisiert wurden. Dadurch konnte eine annähernd maximale Löschung der Fluoreszenz bereits durch ein Äquivalent Cu(II) bei submikromolaren Konzentrationen erreicht werden. Es konnte zudem zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Zn(II) die Fluoreszenz vergleichbar effektiv löscht wie Cu(II).

Die Integration künstlicher allosterischer Bindungstellen in Nucleinsäuren eröffnet die Möglichkeit, die Struktur und Funktion dieser Makromoleküle mit niedermolekularen Effektoren zu kontrollieren. Es wurden Bisterpyridin-modifizierte DNAs (tpy<sub>2</sub>DNA) als allosterische Rezeptoren mit zwei voneinander getrennten Untereinheiten für die Bindung komplementärer Nucleinsäure und eines Metallions synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass tpy<sub>2</sub>DNA mit Fe(II) und Ni(II) kinetisch stabile, cyclische Komplexe bildet, wodurch die Wechselwirkung mit komplementärer DNA geschwächt wurde. Mit Zn(II) konnte die Hybridisierungseigenschaften von tpy<sub>2</sub>DNA in Abhängigkeit von der Zink(II)-Konzentration allosterisch kontrolliert werden. Ein Äquivalent Zn(II) hemmte die Duplexbildung, mit >1 Äquivalent wurde sie wieder hergestellt.

Bei der Hybridisierung von Cu(II)-komplexierter tpy<sub>2</sub>DNA mit komplementärer DNA in Gegenwart von 1,10-Phenanthrolin konnte die Freisetzung des Metallions aus der DNA beobachtet werden. Darauf aufbauend konnte in Zusammenarbeit mit Frau N. Graf (AK Krämer) ein sequenzspezifisches Detektionsverfahren für Nucleinsäuren mit Signalamplifikation etabliert werden. Dabei wird das Primärsignal (DNA) in einer "chemischen Signalkaskade" in ein sekundäres Signal (Cu(II)) umgewandelt, welches als Katalysator wirkt und eine Signalverstärkung auslöst.

## Short Summary in English

This work comprised the synthesis of modified peptide nucleic acids (PNA) and metal-functionalised oligonucleotides and their application to sequence specific DNA detection.

A reactive ester group was inserted into the polyamide backbone of PNA, four different PNA esters were synthesised. It could be shown that the reactivity of the ester bond was influenced by the hybridisation to complementary DNA: Hydrolytical or ethylene diamine based cleavage of the PNA ester was 50% lower when in the single stranded form or hybridised to mismatch DNA than when hybridised to complementary DNA.

Metal-quenched "molecular beacons" are oligonucleotides with hairpin structure. In the hairpin form the fluorescence of a terminally-attached fluorophore is efficiently quenched by a chelating copper complex attached to the opposite end of the oligonucleotide. A big disadvantage of the published systems is the low affinity towards metal ions. 3'-Fluorescein- or 3'-tetramethyl rhodamine-modified oligonucleotides were synthesised, which carry 2,2':6',2''-terpyridine (tpy) as chelating moiety. Close to maximum quenching was obtained upon addition of only one equivalent of Cu(II) at submicromolar concentrations. For the first time it could be shown that Zn(II) acts as a quencher with efficiency similar to Cu(II).

The integration of artificial allosteric binding sites into nucleic acids provides the possibility of controlling the structure and function of these macromolecules with low molecular effectors. Bisterpyridine-modified DNA (tpy<sub>2</sub>DNA) was synthesised as an allosteric receptor comprising two spatially separated moieties for the binding of a complementary nucleic acid and a metal ion. It could be demonstrated that tpy<sub>2</sub>DNA formed kinetically stable cyclic complexes with Fe(II) and Ni(II), which weakened the interaction with complementary DNA. With Zn(II), the hybridisation properties of tpy<sub>2</sub>DNA could be controlled allosterically as a function of the Zn(II) concentration. One equivalent Zn(II) inhibited the duplex formation, while with >1 equivalent it could be restored. Hybridisation of copper-complexed tpy<sub>2</sub>DNA to complementary DNA in the presence of 1,10-phenanthroline resulted in a release of Cu(II). Based on this phenomenon a sequence specific detection assay for nucleic acids with signal amplification was established in collaboration with Mrs. N. Graf (AK Krämer). Via a "chemical signal cascade" a primary signal (DNA) is transduced to a secondary signal (Cu(II)), which acts a catalyst and triggers the signal amplification.



# Funktionalisierte Nucleinsäuren für die DNA-Sequenzerkennung

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von  
Mareike Göritz  
aus  
Marburg a. d. Lahn

**2006**



# Funktionalisierte Nucleinsäuren für die DNA-Sequenzerkennung

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer  
Prof. Dr. Peter Comba

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2006



Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. R. Krämer, der durch sein Interesse, seine Anregungen, Diskussionen und seine stete Unterstützung sowie das angenehme Arbeitsklima das Entstehen dieser Arbeit wesentlich gefördert hat.



Dem Land Baden-Württemberg danke ich für ein Stipendium des Landesgraduiertenkollegs vom 1.5.2002-30.4.2004.

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von März 2002 bis November 2005 am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.



Dem gesamten Arbeitskreis KRÄMER danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Malgorzata Jagoda, Herrn Dr. Stefan Wöhrl, Herrn Dr. Patrick Plitt, Herrn Dr. Felix Zelder, Frau Dr. Iris Boll, Herrn Radek Kierat, Herrn Dr. Andriy Mokhir, Frau Ann-Kathrin Maguerre, Herrn Dr. Janos Kovacs und Herrn Elmar Jentzsch für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima im Labor 207.

Frau Claudia Dienemann, Frau Karin Gabel und Frau Heike Vongerichten möchte ich für die viele technische Unterstützung und die Hilfe bei den Oligonucleotid-Synthesen danken, Herrn Volker Seifried für die vielen interessanten und aufheiternden Gespräche.

Herr Tobias Graf möchte ich für seine große Hilfsbereitschaft und unendliche Geduld in Computerfragen danken.

Herrn Andreas Füßl und Frau Nora Graf danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Frau Ann-Kathrin Maguerre und Herrn Dr. Stefan Wöhrl möchte ich für die reibungslose Zusammenarbeit in unserer "Box" danken.

Herrn Dirk Bebenroth, Arbeitskreis Jäschke, Institut für Pharmazeutische Chemie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg, danke ich für die Hilfe bei den Gelelektrophorese-Untersuchungen.

Dem Graduiertenkolleg 850 "Modellieren von Moleküleigenschaften" möchte ich für die Organisation vieler interessanter und lehrreicher Vorträge, Seminare, Workshops und SummerSchools danken.

Herrn Dr. Bodo Martin sei für seine Unterstützung in Computer- und Modelling-Fragen im Rahmen des Graduiertenkollegs gedankt.

Herrn Dr. Andriy Mokhir möchte ich herzlich für die vielen Hilfestellungen, inspirierenden Diskussionen, technische Unterstützung und interessanten Gespräche danken.

Herrn Dr. Jens Brunner und Herrn Radek Kierat gilt mein Dank für das Korrekturlesen eines Teils dieser Arbeit.

Bei Frau Silvia Lenz, die im Rahmen ihrer Zulassungsarbeit viele Kinetikmessungen für mich durchgeführt hat, möchte ich mich herzlich für die fröhliche Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Praktikanten Carsten Müller, Alexander Brodde, Paul Brown, Patrick Hanno-Igels und Björn Beele danke ich für ihre Hilfe.

Ganz besonders dankbar bin ich Frau Dr. Malgorzata Jagoda für die vielen schönen gemeinsamen Stunden und die weitreichende moralische Unterstützung.

Besonderer Dank geht auch an Dr. Alexander Wartini, der es während der letzten vier Jahre geschafft hat, mich auch in den unangenehmsten Situationen immer wieder zum Lachen zu bringen.

Meiner Familie möchte ich für das geduldige Verständnis für die Schwierigkeiten einer Doktorarbeit und die immerwährende moralische und seelische Unterstützung danken.

Mein ganz spezieller Dank geht schließlich an Pau Montes, der mich nicht nur stets voll unterstützt und liebevoll ertragen hat, sondern dem ich auch drei wunderschöne Jahre in Heidelberg zu verdanken habe.

*Pau und meiner Familie gewidmet*



# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	DNA und PNA	5
1.1.1	Desoxyribonucleinsäure (DNA)	5
1.1.2	Peptidnucleinsäure (PNA)	6
1.2	Molecular Beacons (MB)	8
1.3	2,2':6',2''-Terpyridin als Ligand	10
2	ZIELSETZUNG	15
3	ESTER-MODIFIZIERTE PEPTIDNUCLEINSÄUREN ZUR DNA-ERKENNUNG	17
3.1	Synthese von Ester-modifizierten Peptidnucleinsäuren	17
3.1.1	Synthese der PNAester <b>4-6</b> über Linker <b>2</b>	18
3.1.2	Synthese der PNAesters <b>7</b> über Linker <b>3</b>	20
3.2	Schmelzpunktexperimente ( $T_m$ )	21
3.3	Esterspaltung	22
4	FLUORESCENZSONDEN: METALL GELÖSCHTE "MOLECULAR BEACONS"	25
4.1	Stand der Forschung	25
4.2	Synthese (2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure <b>8</b>	28
4.3	Synthese der 3'-Fluo,5'-tpy- bzw. 3'-Tamra,5'-tpy-modifizierten DNA-Sonden <b>9</b> und <b>10</b>	28
4.4	Optimierung der Hybridisierungskinetik	29
4.5	Fluoreszenztitration der 3'-Fluo,5'-tpy-DNA <b>9</b> und der 3'-Tamra,5'-tpy-DNA <b>10</b> mit Cu(II)	31
4.6	Titration von <b>9</b> und <b>10</b> mit Zn(II), Ni(II) und Fe(II)	34

4.7	Titration der 3'-Fluorescein modifizierten Sonde <b>11</b> mit Fe(II), Ni(II), Zn(II) . . . . .	39
4.8	Metallgelöschte Molecular Beacons auf Peptidnucleinsäure(PNA)-Basis .	41
5	ALLOSTERISCHE DNA-METALLKOMPLEX-KONJUGATE	45
5.1	Synthese Bis(terpyridin)-modifizierter DNA . . . . .	45
5.2	Metall induzierte Cyclisierung von DNA . . . . .	48
5.2.1	Fe(II) . . . . .	48
5.2.2	Ni(II) . . . . .	52
5.3	Allosterische Kontrolle der Oligonucleotid-Hybridisierung . . . . .	55
5.3.1	Zn(II) . . . . .	55
5.3.2	Cu(II) . . . . .	59
5.4	Freisetzung von Cu(II) durch Bindung komplementärer Nucleinsäuren . .	62
5.5	Auf dem Weg zu artifiziellen Signalkaskaden . . . . .	63
5.6	Molecular Dynamics Simulation von ( <b>12</b> )Cu in wässriger Lösung . . . .	66
5.6.1	Methodik . . . . .	66
5.6.2	Molecular Dynamics Simulation . . . . .	67
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	EXPERIMENTELLER TEIL	73
7.1	Verwendete Geräte und Chemikalien . . . . .	73
7.2	Synthese der DMT-geschützten Glykolsäure <b>2</b> . . . . .	75
7.2.1	Synthese von Dimethoxytriphenylmethyl(DMT)-glykolsäureethyl- ester . . . . .	75
7.2.2	Synthese von Dimethoxytriphenylmethyl(DMT)-glykolsäure <b>2</b> . .	76
7.3	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-(4,4'-dimethoxytriphenylmethoxy)-ethyl)-glycin <b>3</b> . . . . .	77
7.3.1	Synthese von <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)glycin- <i>t</i> butylester <b>i</b> . . . . .	77
7.3.2	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-allyloxycarbonyloxyethyl)- glycin- <i>t</i> butylester <b>ii</b> . . . . .	78
7.3.3	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)glycin- <i>t</i> bu- tylester <b>iii</b> . . . . .	79
7.3.4	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)glycin <b>iv</b> .	79

7.3.5	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)glycinmethylester <b>v</b> . . . . .	80
7.3.6	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-(4,4'-dimethoxytriphenylmethoxy)-ethyl)glycinmethylester <b>vi</b> . . . . .	80
7.3.7	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-(4,4'-dimethoxytriphenylmethoxy)-ethyl)glycin <b>3</b> . . . . .	81
7.4	Synthese von (2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure <b>8</b> . . . . .	82
7.5	Synthese der PNA-Konjugate . . . . .	83
7.5.1	Synthese der PNAester <b>4-6</b> . . . . .	83
7.5.2	Synthese von PNAester <b>7</b> . . . . .	85
7.5.3	Charakterisierung der PNAester <b>4-7</b> . . . . .	86
7.6	Untersuchung der Reaktivität der PNAester <b>4-7</b> . . . . .	87
7.6.1	Quantifizierung über MALDI-TOF MS . . . . .	87
7.6.2	Quantifizierung über HPLC . . . . .	87
7.7	Synthese der DNA-Konjugate . . . . .	88
7.7.1	Molecular Beacon-Derivate <b>9-11</b> . . . . .	88
7.7.2	Terpyridin-derivatisierte DNAs <b>12-16</b> . . . . .	90
7.7.3	Charakterisierung . . . . .	92
7.8	Durchführung der Hybridisierungsexperimente . . . . .	93
7.8.1	Bestimmung der Schmelzpunkte von <b>12-16</b> . . . . .	93
7.9	Durchführung der Experimente mit Metall-gelöschten Molecular Beacons <b>9-11</b> . . . . .	94
7.9.1	Fluoreszenz-Experimente . . . . .	94
7.9.2	Optimierung der Hybridisierungsgeschwindigkeit . . . . .	95
7.10	Durchführung der Experimente mit den Terpyridin-modifizierten DNAs <b>12-16</b> . . . . .	95
7.10.1	UV-Vis Spektrophotometrie . . . . .	95
7.10.2	Massenspektrometrische Untersuchungen . . . . .	95
7.10.3	Hybridisierungsexperimente mit dem 5'-Tamra,3'-Dabcyl-modifiziertem MB <b>17</b> . . . . .	96
7.10.4	Untersuchung der <b>12-</b> bzw. <b>16-</b> Metall(II)-Addukte über Gelelektrophorese . . . . .	96
	REFERENCES . . . . .	99



# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Watson-Crick Basenpaarung . . . . .	6
1.2	Darstellung der DNA-Doppelhelix ( <i>Abbildung aus Vorlesung "Organische Chemie für die Biologie", Prof. Dr. J. A. Robinson</i> ) . . . . .	7
1.3	Struktur von PNA und DNA im Vergleich . . . . .	8
1.4	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Molecular Beacon . . . . .	9
1.5	Struktur von Terpyridin <b>1</b> in der trans-Form . . . . .	10
1.6	Konformationsänderung von tpy <b>1</b> bei Protonierung . . . . .	11
1.7	Beispiele supramolekularer Strukturen von Metallkomplex-modifizierten DNAs: Lineare Arrays, Dreiecke, Vierecke und Ringe . . . . .	12
3.1	Strukturen der Linker <b>2</b> bzw. <b>3</b> zur Bildung von PNAestern . . . . .	18
3.2	Synthese der DMT-geschützten Glykolsäure <b>2</b> . . . . .	18
3.3	Synthese der PNAester <b>4-6</b> und Übersicht über die verwendeten PNA- und DNA-Sequenzen: (a) HOBT, HBTU, DIEA, <b>2</b> ; (b) TCA; (c) HOBT, DIC, DMAP, Fmoc-Gly/Ala/His(Trt)-OH; (d) PNA-Synthese; (e) TFA, m-Cresol . . . . .	20
3.4	Synthese des <i>O</i> -DMT-, <i>N</i> -Aloc-geschützten Linkers <b>3</b> . . . . .	20
3.5	Synthese des PNAesters <b>7</b> und Übersicht über die verwendeten PNA- und DNA-Sequenzen: (a) HOBT, HBTU, DIEA, <b>3</b> ; (b) PPh <sub>3</sub> , [Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ], (Et <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N)HCO <sub>3</sub> ; (c) HOBT, HBTU, DIEA, Thyminessigsäure; (d) TCA; (e) HOBT, DIC, DMAP, Fmoc-Gly/Ala/His(Trt)-OH; (f) PNA-Synthese; (g) TFA, m-Cresol . . . . .	21
3.6	Vergleich der prozentualen Esterspaltung nach 2h, RT: (1) Glycinester <b>4</b> ; (2) Alaninester <b>5</b> ; (3) Histidinester <b>6</b> ; links: Hydrolyse bei pH 8; rechts: Spaltung mit Ethylendiamin . . . . .	23

3.7	HPLC-bestimmte Spaltung des Alaninesters <b>5</b> in Prozent nach 2h, 10mM MOPS pH 8, 50mM NaCl, RT: (1) ohne DNA; (2) mit komplementärer DNA; (3) DNA mit einem mismatch (A-bulge) . . . . .	24
3.8	HPLC-ermittelte Spaltung des Glycinesters <b>7</b> in Prozent nach 2h, 10mM MOPS pH 8, 50mM NaCl, RT: (1) ohne DNA; (2) mit kompl. DNA <sub>2</sub> ; (3) DNA <sub>3</sub> mit einem mismatch. . . . .	24
4.1	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines "anorganischen" Molecular Beacon . . . . .	26
4.2	Farbstoffe und Chelatliganden als Komponenten literaturbeschriebener[1], metallgelöschter Molecular Beacons . . . . .	26
4.3	Synthese des Terpyridinliganden <b>8</b> ; a) $\epsilon$ -Caprolacton, KOH, DMSO . . . . .	28
4.4	Synthese der MB <b>9-11</b> und Darstellung der verwendeten DNA-Sequenzen; a) CCl <sub>3</sub> COOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ; b) HOBT, HBTU, DIEA, <b>8</b> ; c) konz. NH <sub>3</sub> , HPLC . . . . .	29
4.5	Zeitabhängigkeit der Hybridisierungsgeschwindigkeit: Links: 0,1 $\mu$ M <b>10</b> , 5 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub> , 0,5 $\mu$ M DNA <sub>7</sub> , 10mM MOPS pH7, 1M NaCl. Rechts: 0,1 $\mu$ M <b>10</b> , 5 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub> , 0,5 $\mu$ M DNA <sub>7</sub> , 10mM MOPS pH7, 100mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> . . . . .	30
4.6	Links: Fluoreszenzspektren von <b>9</b> : 0,1 $\mu$ M <b>9</b> , 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl, 25°C. Rechts: Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Cu(II)-Konzentration . . . . .	31
4.7	Links: Fluoreszenzspektren von <b>10</b> : 0,1 $\mu$ M <b>10</b> , 10mM MOPS, pH 7, 100mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Cu(II)-Konzentration . . . . .	32
4.8	Links: Fluoreszenzspektren von <b>9</b> : 0,01 $\mu$ M <b>9</b> , 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl, 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Cu(II)-Konzentration . . . . .	33
4.9	Links: Fluoreszenzspektren von <b>9</b> : 0,1 $\mu$ M <b>9</b> , 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl, 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zn(II)-Konzentration . . . . .	34
4.10	Links: Fluoreszenzspektren von <b>10</b> : 0,1 $\mu$ M <b>10</b> , 10mM MOPS, pH 7, 100mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zn(II)-Konzentration . . . . .	35

4.11	Links: Fluoreszenzspektren von <b>9</b> : 0,1 $\mu$ M <b>9</b> , 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl, 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Ni(II)-Konzentration . . . . .	36
4.12	Links: Fluoreszenzspektren von <b>10</b> in Abhängigkeit: 0,1 $\mu$ M <b>10</b> , 10mM MOPS, pH 7, 100mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Ni(II)-Konzentration . . . . .	37
4.13	Links: Fluoreszenzspektren von <b>9</b> : 0,1 $\mu$ M <b>9</b> , 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl, 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fe(II)-Konzentration . . . . .	38
4.14	Rel. Fluoreszenzintensitäten von <b>11</b> : Links: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Metallionen-Konzentration; rechts: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von (1) 0,1 $\mu$ M <b>11</b> , (2) 0,1 $\mu$ M <b>11</b> + 5 $\mu$ M FeCl <sub>2</sub> , (3) 0,1 $\mu$ M <b>11</b> + 5 $\mu$ M NiCl <sub>2</sub> , (4) 0,1 $\mu$ M <b>11</b> + 5 $\mu$ M ZnSO <sub>4</sub> ; 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl, 25°C . . . . .	39
4.15	Struktur der 5'-tpy,3'-Tamra-modifizierten PNA <b>VII</b> , und die komplementäre DNA-Sequenz DNA <sub>8</sub> . . . . .	42
4.16	rel. Fluoreszenzintensitäten von <b>VII</b> ; (1) 1 $\mu$ M <b>VII</b> ; (2) links: 1 $\mu$ M <b>VII</b> +1- $\mu$ M Cu(II); rechts: 1 $\mu$ M <b>VII</b> +1 $\mu$ M Zn(II); (3) links: 1 $\mu$ M <b>VII</b> +1 $\mu$ M Cu(II)+1- $\mu$ M DNA <sub>8</sub> ; rechts: 1 $\mu$ M <b>VII</b> +1 $\mu$ M Zn(II)+1 $\mu$ M DNA <sub>8</sub> . . . . .	42
5.1	Kopplung von <b>8</b> über Homoserinlinker an 3'-Ende der DNA; a) Fmoc-Hse(Trt)-OH, HOBT, DIC, DMAP; b) Piperidin c) <b>8</b> , HOBT, HBTU, DIEA; d) DNA Synthese . . . . .	46
5.2	Kopplung von <b>8</b> über Aminolinker an das 5'-Ende von DNA; a) CDI, Ethylendiamin; b) <b>8</b> , HOBT, HBTU, DIEA; c) NH <sub>3</sub> . . . . .	46
5.3	Übersicht über die tpy-modifizierten DNAs und die verwendeten DNA-Sequenzen . . . . .	47
5.4	UV-Vis Titration von 10 $\mu$ M Bis(tpy)DNA <b>12</b> mit FeSO <sub>4</sub> , 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl. Links: Absorptionsspektrum im Bereich von 300-600nm; rechts: Titrationsverlauf bei 558nm . . . . .	48
5.5	ESI MS Spektrum von <b>12</b> (Fe): m/z = 1796 [M+Fe(II)] <sup>4-</sup> , 1437 [M+Fe(II)] <sup>5-</sup> . . . . .	49

5.6	Denaturierende 20% Polyacrylamid-Gelelektrophorese; Bahn 1: <b>16</b> +Fe(II); Bahn 2: <b>12</b> +Fe(II); Bahn 3: <b>12</b> +Ni(II); Bahn 4: <b>12</b> +Zn(II); Bahn 5: <b>12</b> +Cu(II); Bahn 6: <b>12</b> ; Bahn 7: DNA <sub>7</sub> . . . . .	50
5.7	Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Titration der Duplices <b>12:17</b> (Kreise) und <b>16:17</b> (Dreiecke) mit Fe(II); 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , RT . . . . .	51
5.8	UV-Vis Titration von 5μM Bis(tpy)DNA <b>12</b> mit NiCl <sub>2</sub> . Links: Absorptionsspektrum im Bereich von 290-350nm; rechts: Titrationsverlauf bei 325nm . . . . .	52
5.9	Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Titration der Duplices <b>12:17</b> (Kreise) und <b>12:DNA</b> <sub>10</sub> (Dreiecke) mit Ni(II);10mM HEPES pH7, 150mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> . . . . .	53
5.10	UV-Vis Titration von 10μM Bis(tpy)DNA <b>12</b> mit ZnSO <sub>4</sub> , 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl. Links: Absorptionsspektrum im Bereich von 290-350nm; rechts: Titrationsverlauf bei 3253nm . . . . .	56
5.11	ESI MS Spektrum von <b>12</b> (Zn): m/z = 1815 [M+2Zn(II)] <sup>4-</sup> , 1800 [M+Zn(II)] <sup>4-</sup> , 1440 [M+Zn(II)] <sup>5-</sup> . . . . .	56
5.12	Titration der DNA-Duplices <b>12:17</b> (Kreise) und <b>16:17</b> (Dreiecke) mit Zn(II); 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , RT . . . . .	57
5.13	Schematische Darstellung der Kontrolle der Hybridisierung von <b>12</b> mit Zn(II) als negativem und positivem allosterischen Effektor . . . . .	58
5.14	Titrationsverlauf von tpy <sub>2</sub> DNA <b>12</b> mit CuSO <sub>4</sub> bei 313nm; 5μM <b>12</b> , 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl . . . . .	60
5.15	Absorptionsänderung im Bereich von 290-350nm bei Titration von 5μM tpy <sub>2</sub> DNA <b>12</b> mit CuSO <sub>4</sub> , 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl. Links: 0-1 Äquivalent Cu(II); rechts: 1-2,4 Äquivalente Cu(II) . . . . .	60
5.16	Titration der Duplices <b>12:17</b> (Kreise) und <b>16:17</b> (Dreiecke) mit Cu(II); 10mM HEPES pH 7, 150mM NaCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , RT . . . . .	61

5.17	Links: UV Spektrum von ( <b>12</b> )Cu mit phen; 5 $\mu$ M ( <b>12</b> )Cu, 25 $\mu$ M phen, 10mM HEPES, 150mM NaCl. Rechts: Ausschnitt aus einem UV-Spektrum von 300-360nm; Cal1: Addition der Einzelspektren von 5 $\mu$ M <b>12</b> /Cu(II)= 1:0,7, 25 $\mu$ M phen und 5 $\mu$ M <b>DNA</b> <sub>9</sub> ; Cal2: Addition der Einzelspektren von 5 $\mu$ M <b>12</b> : <b>DNA</b> <sub>9</sub> und phen/Cu(II) = 25 $\mu$ M/3.5 $\mu$ M; Experimentell: 5 $\mu$ M <b>12</b> , 3,5 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub> , 25 $\mu$ M phen, 5 $\mu$ M <b>DNA</b> <sub>9</sub> , 10mM HEPES-Puffer pH 7, 150mM NaCl . . . . .	63
5.18	Schematische Darstellung einer "chemischen Signalkaskade", die eine allosterische Signalwandlung (DNA $\rightarrow$ Cu <sup>2+</sup> ) kombiniert mit einer katalytischen Signalverstärkung [2] . . . . .	64
5.19	Vergleich der Zunahme des Fluoreszenzsignals von 2',7'-Dihydrofluorescein bei Zugabe von a)DNA <b>12</b> ; b)DNA <b>16</b> ; c)DNA <b>12</b> + <b>DNA</b> <sub>9</sub> ; d) DNA <b>12</b> + <b>DNA</b> <sub>11</sub> . Die Abbildung wurde von Frau Nora Graf zur Verfügung gestellt . . . . .	65
5.20	Über MD-Simulation ermittelte, energetische günstige Konformation von ( <b>12</b> )Cu . . . . .	67
6.1	Struktur der PNAester <b>4-7</b> . . . . .	69
6.2	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines "anorganischen" Molecular Beacon . . . . .	70
6.3	Schematische Darstellung der Kontrolle der Hybridisierung von <b>12</b> mit Zn(II) als negativem und positivem allosterischen Effektor . . . . .	71
7.1	Synthese des DMT-geschützten Glykolsäure-Linkers <b>2</b> . . . . .	75
7.2	Synthese von <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -(2-(4,4'-dimethoxytriphenylmethoxy)-ethyl)-glycin <b>3</b> . . . . .	77
7.3	Synthese von (2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure <b>8</b> . . . . .	82
7.4	Syntheschema der PNAester <b>4-6</b> . . . . .	83
7.5	Syntheschema des PNAesters <b>7</b> . . . . .	85
7.6	Syntheschema der MB-DNA-Kojugate <b>9</b> und <b>10</b> . . . . .	88
7.7	Syntheschema der tpy <sub>2</sub> DNA-Kojugate <b>12</b> und <b>13</b> . . . . .	90



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
abs.	absolut
Ala	Alanin
Aloc	Allyloxycarbonyl
Boc	t-Butyloxycarbonyl
C	Cytosin
CDI	Carbonyldiimidazol
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitril
CPG	Controlled Pore Glas
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
DCFH	2',7'-Dichlordihydrofluorescein
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat-dinatriumsalz
EE	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Fmoc	N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)
eq	Äquivalente
G	Guanin
Gly	Glycin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

---

HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
His	Histidin
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hse	Homoserin
I	Intensität
Lys	Lysin
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight
MB	Molecular Beacon
MeOH	Methanol
MMT	Monomethoxytrityl
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
ÖV	Ölpumpenvakuum (ca. 10 <sup>-2</sup> mbar)
PE	Petrolether
PG	Schutzgruppen der Nucleobasen (DNA C, A: Benzoyl-, G: Isobutyryl-Schutzgruppe) (PNA C, A, G: Benzylhydroxycarbonyl-Schutzgruppe)
phen	1,10-Phenanthrolin
PNA	Peptidnucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
T	Thymin
Tamra	Tetramethylrhodamin
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
tpy	2,2':6',2''-Terpyridin
Trt	Trityl

UV/Vis      ultraviolett/visibel (Wellenlängenbereich)



# KAPITEL 1

## EINLEITUNG

Über die Sequenz der Nucleobasen von Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist die genetische Information in Zellen gespeichert. Peptidnucleinsäure (PNA) ist ein Strukturmimetikum natürlich vorkommender Nucleinsäuren, in dem das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine Polyamidkette ersetzt wurde. Molecular Beacons (MB) sind Oligonucleotide zum Nachweis komplementärer Nucleinsäuresequenzen, die an einem Ende ein Fluorophor-, am anderen ein Quencher-molekül gebunden haben. In Abwesenheit der target-DNA sind Fluorophor und Quencher in räumlicher Nähe zueinander, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird. Durch Hybridisierung mit einer komplementären Nucleinsäure werden Fluorophor und Quencher voneinander getrennt und Fluoreszenz messbar. 2,2':6',2''-Terpyridin (tpy) bildet mit vielen Übergangsmetallen stabile Komplexe und ist daher ein in der Supramolekularen Chemie häufig verwendeter Ligand. Durch die Modifizierung von DNA mit tpy-Metallkomplexen lassen sich supramolekulare DNA-Strukturen wie DNA-Dreiecke, -Vierecke, -Ringe sowie lineare Polymere durch die Hybridisierung komplementärer DNA-Stränge erzeugen.

---

### 1.1 DNA UND PNA

#### 1.1.1 DESOXYRIBONUCLEINSÄURE (DNA)

Als Träger der genetischen Information ist die Desoxyribonucleinsäure (DNA) der tragende Baustein in zellulären Prozessen. Über die Nucleobasensequenz ist der Aufbau von Proteinen oder Molekülen codiert, die an der Proteinsynthese oder Regulierung des zellulären Stoffwechsels beteiligt sind.

Zwei antiparallel angeordnete DNA-Einzelstränge bilden die DNA Doppelhelixstruktur aus. Die Einzelstränge bestehen aus Desoxyribosen, die am C5- und C3-Atom über Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft sind. Am C1-Atom der Desoxyribose ist eine der vier Nucleobasen, entweder eine der beiden Purinbasen Adenin und Guanin

bzw. eine der beiden Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin, N-glykosidisch gebunden. Die Desoxyribonucleinsäure-Phosphodiesterkette bildet das negativ geladene Rückgrat der DNA, während die unpolaren Nucleobasen in das Innere der Helix weisen. Über Wasserstoffbrückenbindung sind nach Watson und Crick immer Adenin und Thymin, sowie Cytosin und Guanin miteinander verbunden (Abbildung 1.1). In der Sequenzfolge der Nucleobasen ist die genetische Information gespeichert.

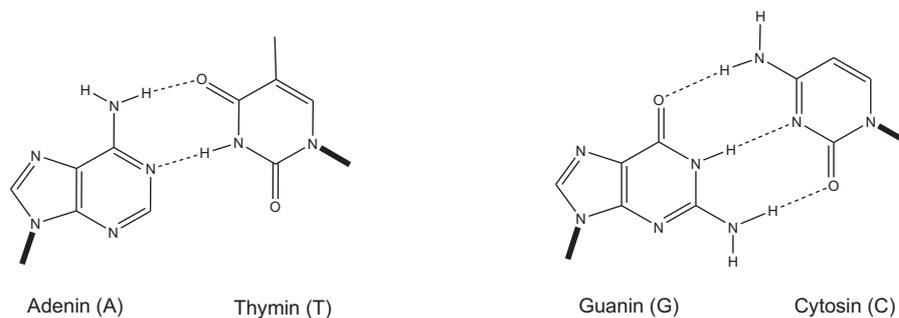


Abbildung 1.1: Watson-Crick Basenpaarung

Die Konformation der DNA-Duplex ist von ihrer Länge, der Sequenz der Nucleobasen und dem Salzgehalt der Lösung abhängig. Am häufigsten liegt sie in der B-DNA Form vor, als rechtsgängige Helix mit einer Windungslänge von 34Å, wobei eine Windung aus 10 Nucleobasen im Abstand von 3,4Å zueinander besteht. In eukaryotischen Zellen ist jeweils ein langer DNA-Doppelstrang um eine Vielzahl von Kernproteinen, den Histonen, gewickelt und zu einer kompakten Form, den Chromosomen, spiralisiert. In bakteriellen Zellen liegt DNA auch als ringförmiges Plasmid vor, wobei die Enden eines Doppelhelix-Stranges kovalent miteinander verknüpft sind.

Um Krankheiten auf molekularer Ebene erkennen und bekämpfen zu können, ist es erforderlich, die Basensequenz der natürlich vorkommenden Nucleinsäuren "lesen" zu können. Eine der am weitesten verbreiteten Techniken in diesem Zusammenhang ist die PCR (Polymerase Chain Reaction), die in Kombination mit Hybridisierungsassays eine zuverlässige Detektionsmethode zum Nachweis von Nucleinsäuresequenzen darstellt.

### 1.1.2 PEPTIDNUCLEINSÄURE (PNA)

Auf der Suche nach Nucleinsäure-Analoga zur sequenzspezifischen Erkennung doppelsträngiger DNA entwickelten Nielsen et al. 1991 die sogenannten Peptid- oder Poly-

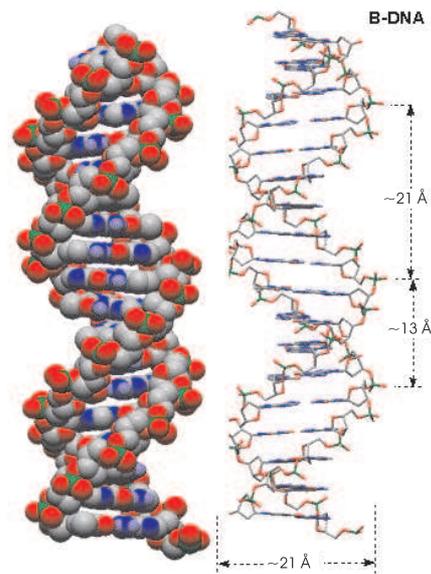


Abbildung 1.2: Darstellung der DNA-Doppelhelix (Abbildung aus Vorlesung "Organische Chemie für die Biologie", Prof. Dr. J. A. Robinson)

amidnucleinsäuren (PNA). Man wollte ein Oligonucleotid kreieren, mit dessen Hilfe man doppelsträngige DNA über Triplexbildung durch Anlagerung an die "major groove" der Doppelhelix erkennen kann.[3] In der PNA ist das Desoxyribose-Phosphodiester-Rückgrat der DNA durch eine Polyamidkette aus N-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten ersetzt. An diese sind in regelmäßigen Abständen über Methylencarbonyllinker die Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin gebunden. PNA besitzt ein acyclisches und achirales Rückgrat und ist im Gegensatz zur negativ geladenen DNA ladungsneutral. Dies verleiht Peptidnucleinsäuren eine hohe biologische und chemische Stabilität. Bemerkenswerterweise sind PNA/DNA-Doppelstränge stabiler als entsprechende DNA/DNA-Doppelstränge. Außerdem zeigen PNAs eine höhere Sequenzspezifität, ihre Hybridisierungseigenschaften sind zudem nahezu unabhängig von der Ionenstärke der Lösung.[4] Diese Eigenschaften prädestinieren sie für den Einsatz in Hybridisierungsassays zur Detektion von Nucleinsäuren (DNA, RNA). Neben PNA/DNA-Duplicates kann PNA mit DNA auch (PNA)<sub>2</sub>DNA-Tripelhelices ausbilden. Dabei ist der eine PNA-Strang an die DNA über Watson-Crick-Basenpaarung gebunden, der andere über Hoogsteen-Basenpaarung. Die Tendenz zur Bildung von PNA<sub>2</sub>DNA-Tripelhelices ist so groß, dass an speziellen Sequenzen PNA einen DNA-Einzelstrang aus einer DNA-

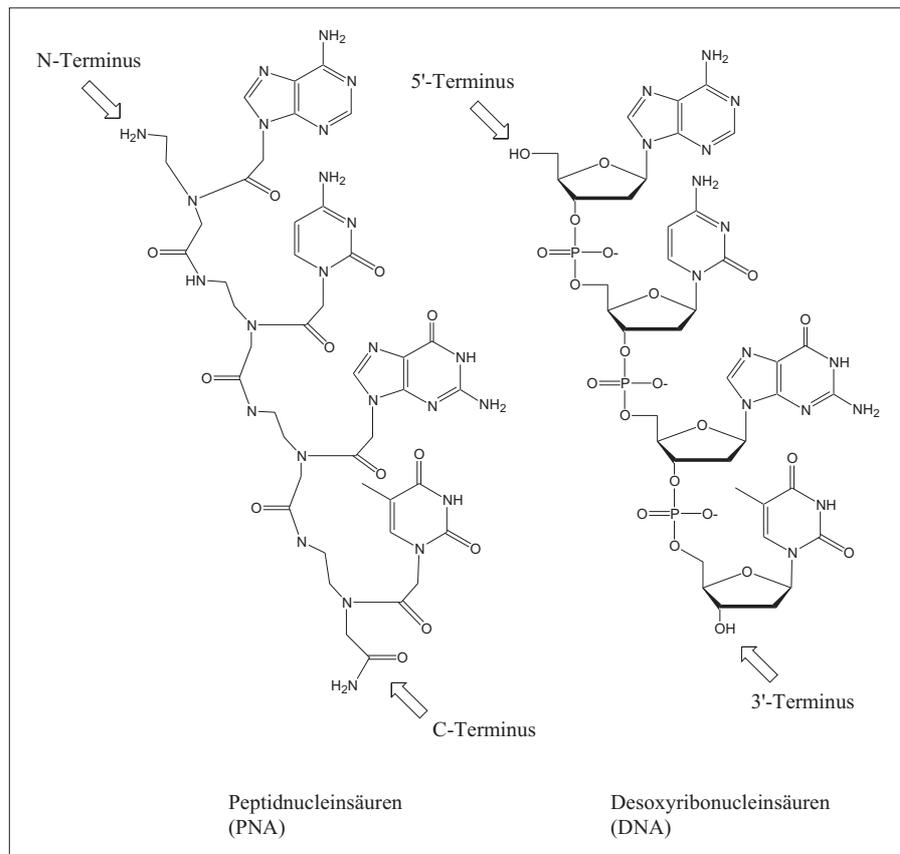


Abbildung 1.3: Struktur von PNA und DNA im Vergleich

Duplex verdrängen kann.[5]

Unmodifizierte PNA ist in Wasser schwer löslich und neigt zur Selbstaggregation, die Löslichkeit nimmt mit zunehmender Anzahl an Nucleobasen ab. Durch die Integration geladener Gruppen kann die Löslichkeit verbessert werden, meistens werden dafür eine oder mehrere Lysin-Einheiten an die PNA Termini gekoppelt. Ein bisher wenig gelöstes Problem der Verwendung von PNA als Antisense- oder Antigen-Reagenz ist die schlechte Aufnahme von PNA in Zellen.

## 1.2 MOLECULAR BEACONS (MB)

Detektionsmethoden, mit denen schnell und zuverlässig Nucleinsäuresequenzen nachgewiesen werden können, sind für viele Bereiche von großem Interesse. Dabei spielen

Fluoreszenz basierte Methoden wegen ihrer leichten Handhabbarkeit, einfachen Analytik und hohen Empfindlichkeit eine besondere Rolle. Ein weit verbreitetes Beispiel sind die von S. Tyagi und F. R. Kramer in den 1990er Jahren eingeführten *Molecular Beacons* ("molekulare Leuchtfeuer").[6] An einen DNA-Einzelstrang mit selbstkomplementären Enden ist an einem Ende ein Fluorophor und an dem anderen ein Quencher-molekül gekoppelt. In Abwesenheit einer komplementären Sequenz hybridisieren die beiden Enden mit sich selbst und bilden so eine Haarnadel-("Hairpin")-Struktur aus, bestehend aus einer Stammregion, dem hybridisierten Teil, und dem als Einzelstrang vorliegenden *loop*. Fluorophor und Quencher kommen so in räumliche Nähe zueinander, was zur Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffmoleküls führt, da die Anregungsenergie durch den von Förster beschriebenen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)[7] bzw. durch Kontaktlöschung auf die Quenchereinheit übertragen wird. Durch die Hybridisierung der *loop*-Region mit komplementärer DNA bildet sich eine Doppelhelix aus, Fluorophor und Quencher werden räumlich voneinander getrennt und die Fluoreszenz regeneriert (Abbildung 1.4). Als Fluoreszenzfarbstoffe werden häufig Fluorescein, Tetramethylrodamin, Dansyl oder EDANS verwendet, als Quencher Dabcyl.

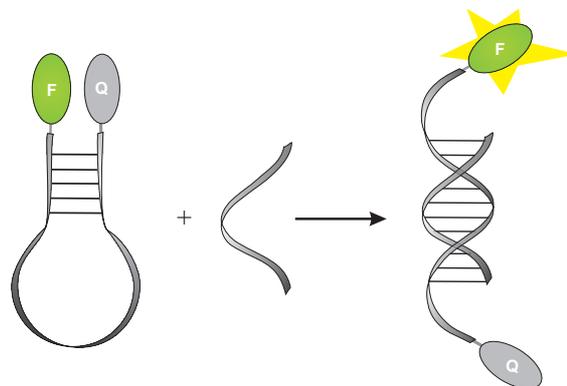


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Molecular Beacon

Alternativ zur Fluorophor-Quencher Modifizierung können auch Donorfarbstoffe verwendet werden, die durch Guanin-Nucleobasen gelöscht werden. In der Haarnadelstruktur ist der Farbstoff Guaninbasen benachbart, wodurch es zu einem Elektronentransfer von G zum lichtangeregten Farbstoff kommt.[8]

Von O. Seitz wurden im Jahr 2000 zum ersten Mal Molecular Beacon beschrieben, die aus einer doppelt markierten Peptidnucleinsäure (PNA) bestehen.[9] PNA MBs besitzen

gegenüber ihren DNA Analoga den Vorteil, dass bedingt durch die größere Flexibilität des PNA-Rückgrats keine Stammregion zur Beacon-Bildung erforderlich ist. Als Einzelstrang liegt die PNA geknäuel vor, durch hydrophobe Wechselwirkung kommen Fluorophor und Quencher in räumliche Nähe zueinander und die Fluoreszenz wird gelöscht.

### 1.3 2,2':6',2''-TERPYRIDIN ALS LIGAND

2,2':6',2''-Terpyridin (tpy) **1** wurde zum ersten Mal von Morgan und Burstall 1932 synthetisiert und charakterisiert.[10] Aufgrund seiner einfachen Zugänglichkeit und seiner gut untersuchten Metall-Komplexierungseigenschaften ist es heute ein vielfach verwendeter Chelatligand, der besonders als Rezeptoreinheit bei Metall-Ligand kontrolliertem *self-assembly* zum Einsatz kommt.

Die Konformation des ungebundenen und nicht protonierten Liganden in der festen Phase ist *trans/trans*, was sich durch die sterische Abstoßung der *ortho*-Wasserstoffe (3/3' und 5'/3'') in Kombination mit der elektrostatischen Abstoßung der drei freien Elektronenpaare der Stickstoffatome erklären lässt.

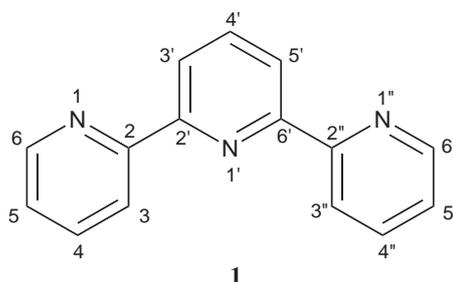


Abbildung 1.5: Struktur von Terpyridin **1** in der *trans*-Form

Energie-Berechnungen verschiedener Konformationen unterstützen die *trans/trans* Konformation als energetisch günstigste.[11]

Die Konformation von Terpyridin in Lösung ist von der Fähigkeit des Lösungsmittels zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken abhängig. In saurem Medium wird eine Stabilisierung der *cis/cis* Konformation durch die Protonierung einer Pyridineinheit erreicht, was zu einer Wasserstoffbrücken-Bildung zwischen dem Proton und den freien Elektronenpaaren der beiden verbleibenden N-Atome führt. Im energetisch günstigsten Fall ist

dabei der zentrale Pyridinring protoniert und mit den beiden äußeren über das Proton verbrückt, was zur cis/cis Konformation führt.[11] Zur Verdeutlichung der Chelatisierungseigenschaften wird tpy meist in der cis/cis-Konformation dargestellt.

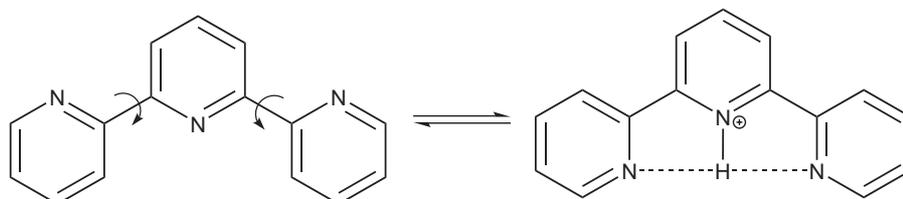
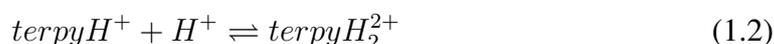


Abbildung 1.6: Konformationsänderung von tpy **1** bei Protonierung

Wie in Gleichung 1.1 bzw. 1.2 dargestellt, lässt sich Terpyridin zweifach protonieren, ist jedoch mit  $pK_1 = 4.7$  und  $pK_2 = 3.33$  eine relativ schwache Base.[12] Erst in 95%  $H_2SO_4$  erreicht man die Protonierung des 3. Pyridinrings, dessen Protonierungskonstante allerdings nicht quantitativ bestimmbar ist.[13]



#### TERPYRIDIN-METALLKOMPLEXE

Terpyridin bildet mit vielen Übergangsmetallen in niedrigen Oxidationsstufen Bis(terpyridin)-Metallkomplexe. Die hohe Stabilität dieser Komplexe kann außer über den starken Chelateffekt über eine starke Metall-Ligand d-( $\pi$ ) Rückbindung erklärt werden. Die typische Koordinationsgeometrie dieser Komplexe ist verzerrt oktaedrisch, was aus Röntgen-Kristallstrukturanalysen hervorgeht.[14]

In den letzten Jahren wurden viele an unterschiedlichen Positionen substituierte Terpyridinderivate synthetisiert. Unter ihnen sind vor allem 4'-funktionalisierte Terpyridine nützliche Bausteine für supramolekulare Komplexe und Polymere, da sie eine exakt collineare Anordnung zweier Struktureinheiten erlauben. Aufgrund der  $C_{2v}$  Symmetrie der Komplexe mit einer Rotationsachse durch die 4'-Position erhält man außerdem bei der Komplexbildung keine Isomergemische.[15]

Terpyridine, die in 4'-Position Phenyl- oder Alkynylgruppen als Substituenten tragen, haben aufgrund des ausgedehnten konjugierten  $\pi$ -Systems hervorragende optische Eigenschaften, wie z.B. die Lumineszenz der entsprechenden Komplexe mit Ruthenium, Osmium, Iridium oder Platin bei Raumtemperatur.[16]

Beispiele für supramolekulare Strukturen mit tpy als Rezeptor für Metall-Ligand Wechselwirkung sind z.B. starre, stabartige Strukturen, Gitter, Rechen, radartige Anordnungen, Vierecke, Rotaxane, Catenane und Ringe.[15] Terpyridin als Ligand in Kombination mit Phenanthrolin ermöglichte J.-P. Sauvage sogar die Konstruktion eines redoxaktiven "molekularen Muskels".[17]

#### TERPYRIDIN-FUNKTIONALISIERTE OLIGONUCLEOTIDE

Die hohe Komplexstabilität und die Reversibilität der Metallkoordination machen Terpyridin-Metall-Komplexe für die Kombination mit biochemischen Systemen interessant. Ein System aus tpy und L-Tyrosin mit Ruthenium wurde als Modellkomplex des Photosystems II untersucht.[18] Verschiedene Terpyridin-basierte Systeme mit gut charakterisierbaren Elektronentransfer-Eigenschaften zur Entwicklung von *light harvesting* Bausteinen sind bereits bekannt.[19, 20, 21]

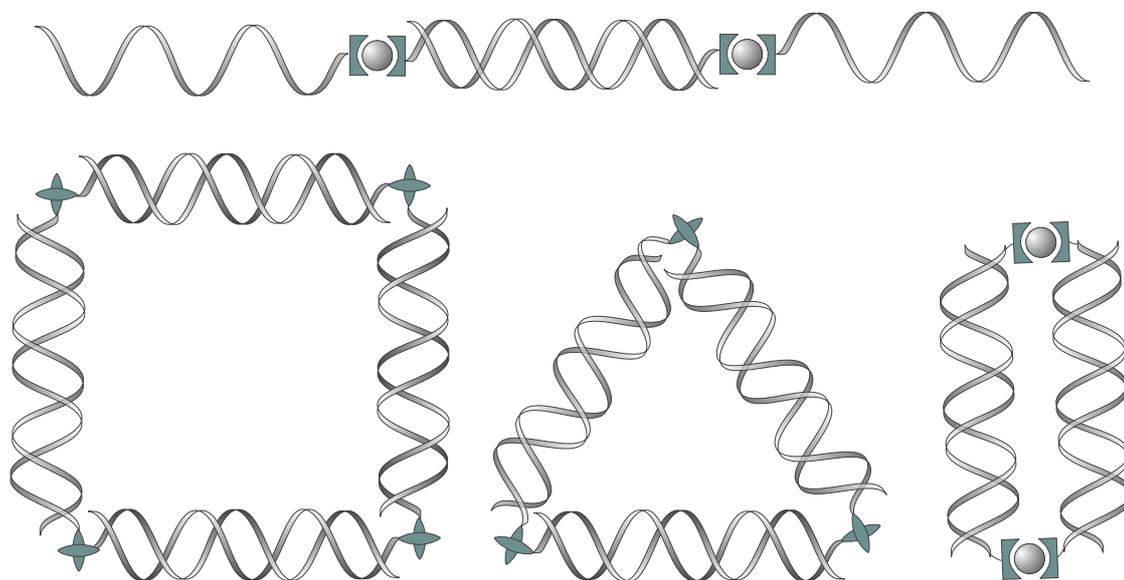


Abbildung 1.7: Beispiele supramolekularer Strukturen von Metallkomplex-modifizierten DNAs: Lineare Arrays, Dreiecke, Vierecke und Ringe

In verschiedenen Arbeiten wurde die Verknüpfung von DNA mit Terpyridinkomplexen untersucht. K. M. Stewart und L. W. McLaughlin koppelten Bisterpyridin-Ruthenium Komplexe über Triethylglykol-Linker in 4'-Position jeweils an DNA komplementärer Sequenzen. Durch die spontane Hybridisierung der DNA-Stränge wurden die Komplexe kontrolliert in einem linearen Array angeordnet.[22] Han et al. konnten gezielt nach dem Prinzip von *Holliday Junctions* DNA-Dreiecke herstellen, in denen Bis(terpyridin)Fe(II)-Komplexe die Ecken bilden. Dafür synthetisierten sie drei verschiedene DNA-Sequenzen mit den jeweils komplementären Strängen dazu, und modifizierten sie mit Terpyridin. Durch die Fe(II)-induzierte Komplexierung wurden je zwei der Stränge präorganisiert, die Hybridisierung mit den jeweils komplementären, ebenfalls präorganisierten DNA-Sequenzen führte zur Bildung molekularer Dreiecke.[23] Auf eine ähnliche Weise nutzten H. Sleiman und Mitarbeiter die Präorganisation von Ruthenium-Bipyridin-Komplex-modifizierter DNA zur Ausbildung molekularer Ringe und Vierecke.[24] S. Moreau et al. nutzten tpy zur Verstärkung der Struktur von circularisierter RNA, indem sie an kurze stem-loop Sequenzen sowohl am 3'- als auch 5'-Ende Terpyridin konjugierten und durch Zink(II) Zugabe so die Stammbildung der selbst-komplementären Enden unterstützen konnten.



# KAPITEL 2

## ZIELSETZUNG

Der schnelle und zuverlässige Nachweis von Nucleinsäuren ist in Medizin und Biowissenschaften von großer Bedeutung. Hybridisierungsassays basierend auf PCR bieten sichere Nachweismethoden, haben aber den Nachteil einer praktisch und zeitlich aufwendigen Methodik. Die Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit war die Synthese modifizierter Peptidnucleinsäuren und Metallkomplex-funktionalisierter Oligonucleotide für die Entwicklung einfacher sequenzspezifischer DNA-Nachweisverfahren.

Eine Methode zum Nachweis komplementärer Nucleinsäure ist die Konstruktion eines Oligonucleotids mit einer integrierten reaktiven Gruppe, die durch die Hybridisierung mit komplementärer DNA aktiviert oder deaktiviert wird. Es sollten nun Peptidnucleinsäuren (PNA) synthetisiert werden, bei denen eine im Vergleich zu den Amidbindungen des Rückgrats labilere Estergruppe in die Polyamidkette integriert ist. Unter der Annahme, durch diese Modifikation unterliege die Estergruppe in der Duplex mit komplementärer DNA anderen konformativen und sterischen Zwängen als im Einzelstrang, ist eine unterschiedliche Reaktivität der PNAester in Abhängigkeit vom Hybridisierungszustand zu erwarten.

Die Verwendung Metallkomplex-funktionalisierter Oligonucleotide für Templat-katalysierte Reaktionen oder den sequenzspezifischen Nachweis von DNA ist im Arbeitskreis Krämer mehrfach beschrieben worden. Ein Nachteil der literaturbeschriebenen Metallgelöschten Molecular Beacon ist die geringe Metallionenaffinität. Eine Aufgabenstellung im Rahmen dieser Arbeit war daher die Erhöhung der Kupferaffinität solcher "anorganischer" Molecular Beacon zur Verbesserung ihrer Anwendbarkeit in der Nucleinsäure-Detektion.

Terpyridin-Metallkomplex-funktionalisierte Nucleinsäuren wurden in der Literatur bisher nur als supramolekulare Bausteine bzw. zur Duplexstabilisierung beschrieben. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese Bisterpyridin-modifizierter DNA und die

Untersuchung des Koordinationsverhaltens mit den Metallionen Fe(II), Ni(II), Zn(II) bzw. Cu(II) unter dem Aspekt der allosterischen Konformationskontrolle.

# KAPITEL 3

## ESTER-MODIFIZIERTE PEPTIDNUCLEINSÄUREN ZUR DNA-ERKENNUNG

In Peptidnucleinsäure (PNA) konnte zum ersten Mal in das Rückgrat eine Esterbindung integriert werden. Dafür wurden zwei verschiedene Linkermoleküle **2** und **3** entwickelt, die die Einführung einer Esterbindung in das Polyamid-Rückgrat ermöglichen. Durch Veresterung der terminalen Hydroxygruppe von **2** bzw. **3** mit einer Aminosäure konnte eine einfache Möglichkeit gefunden werden, die Estergruppe in das Rückgrat einzubinden und die PNA-Synthese anschließend an der Aminofunktion der Aminosäure fortzusetzen. Die Verwendung verschiedener Aminosäuren (Glycin, Alanin, Histidin) stellte eine einfache Möglichkeit zur Variation der Nachbargruppe des Esters dar. In Linker **3** wurde im Unterschied zu **2** noch eine Nucleobase integriert, um die Störung der Hybridisierung durch die Estermodifikation zu minimieren. Die Hydrolyse der PNAester bei pH 8 sowie die Spaltung mit Ethylendiamin als Nucleophil verlief in Gegenwart komplementärer DNA um ca. 50% langsamer als mit mismatch-DNA bzw. im Einzelstrang.

---

### 3.1 SYNTHESE VON ESTER-MODIFIZIERTEN PEPTIDNUCLEINSÄUREN

Terminal Ester-modifizierte PNAs sind in der Literatur beschrieben[25, 26], es ist jedoch kein Fall der Integration einer Estergruppen in das PNA-Rückgrat bekannt. In dem hier vorgestellten Ansatz zum Nachweis komplementärer Nucleinsäuren wurde ein Verfahren entwickelt, das die Modifizierung des Rückgrats von PNA mit einer im Vergleich zu den Amidbindungen labileren Estergruppe erlaubt. Die PNAester sollten eine unterschiedliche Reaktivität in Abhängigkeit von der Hybridisierung aufweisen, um so komplementäre

DNA-Sequenzen nachweisen zu können.

Die schrittweise Verlängerung festphasengebundener PNA erfolgt standardmäßig vom C'- zum N'-Terminus durch Kopplung der Carbonsäure-Funktion des neuen Bausteins an das Aminoende der Kette. Zur Integration einer Estergruppe in das Polyamidrückgrat ist daher ein Linkermolekül erforderlich, das eine Carbonsäure-Funktion und eine Hydroxygruppe enthält. Aminosäuren sind in diesem Zusammenhang besonders geeignet, da sie zwei wesentliche Vorteile besitzen: Erstens gewinnt man auf diese Weise die für den weiteren Syntheseverlauf erforderliche Aminofunktion zurück, und zweitens stellen Aminosäuren als kommerziell erhältliche Substanzen einen leicht zu variierenden Baustein dar. Es wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: Glykolsäure stellt eine der einfachsten

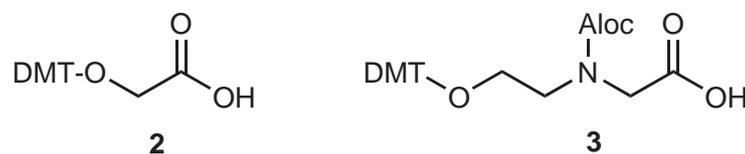


Abbildung 3.1: Strukturen der Linker **2** bzw. **3** zur Bildung von PNAestern

Möglichkeiten dar, in einem kurzen Linkermolekül (Linker **2**) eine Carbonsäure-Funktion zur Bindung an die PNA und eine Hydroxyfunktion zur Esterbildung zu vereinen. Die Integration der Estergruppe unterbricht allerdings die Periodizität des Rückgrates, was Einfluss auf die Hybridisierungseigenschaften der PNAester hat. Linker **3** besitzt noch zusätzlich eine funktionelle Gruppe zur Integration einer Nucleobase, um die Hybridisierungseigenschaften der Ester-modifizierten PNA mit der target-DNA zu verbessern.

### 3.1.1 SYNTHESE DER PNAESTER **4-6** ÜBER LINKER **2**

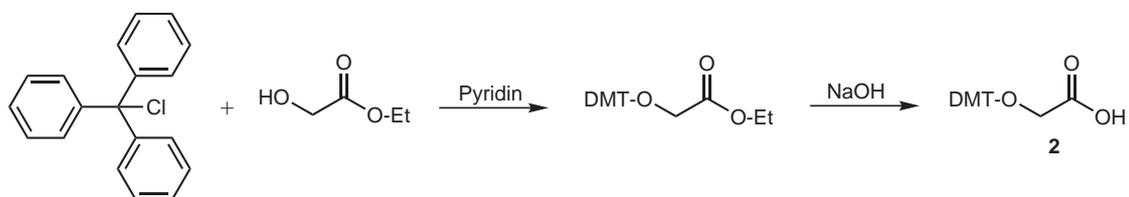


Abbildung 3.2: Synthese der DMT-geschützten Glykolsäure **2**

Für die Einführung der Glykolsäure in das PNA-Rückgrat muss die Carbonsäurefunktion mit einer zur PNA-Synthese orthogonalen Schutzgruppe geschützt werden. Dafür wurde Glykolsäureethylester unter Schutzgas in Pyridin/THF mit Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMT-Cl) bei 0°C umgesetzt. Nach Aufarbeitung der Reaktionslösung und Reinigung über Säulenchromatographie wurde der DMT-Glykolsäureester in Methanol gelöst und mit Natriumhydroxidlösung verseift. Nach anschließender Aufarbeitung konnte die DMT-geschützte Glykolsäure **2** in 35% Ausbeute erhalten werden, die Charakterisierung erfolgte über NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Die relativ geringe Ausbeute ist auf die schwierige Handhabung der säurelabilen DMT-Schutzgruppe zurückzuführen, die bereits durch die Acidität des zur Reinigung verwendeten Kieselgels teilweise hydrolysiert wurde.

Die N-terminale Kopplung des Linkers **2** an festphasengebundene PNA erfolgte über eine Standard-Peptidkopplungsreaktion. Dafür wurde **2** mit dem Uroniumsalz 2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) aktiviert, mit der Base N,N'-Diisopropylethylamin (DIEA) versetzt und an die festphasengebundene PNA gekoppelt. Nach Abspalten der DMT-Schutzgruppe mit Trichloressigsäure wurde durch Reaktion der freien Hydroxygruppe mit HOBT, Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Dimethylaminopyridin (DMAP) aktivierter, N-Fmoc-geschützter Aminosäure der entsprechende PNA-gebundene Aminosäureester gebildet. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit Piperidin entfernt und die PNA-Synthese am Syntheseautomaten bis zum Konjugat gewünschter Länge fortgeführt. Nach Abspalten von der Festphase mit Trifluoressigsäure/m-Cresol und anschließender HPLC-Reinigung wurden die PNAester **4-6** in geringen Ausbeuten (1-2%) erhalten. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte über HPLC und MALDI-TOF Massenspektrometrie. Grund für die geringen Ausbeuten der PNAester ist vermutlich der mehrfach wiederholte basische Entschützungsprozess der PNA-Bausteine während der PNA-Synthese, wobei die Estergruppe teilweise hydrolysiert wurde. In Abbildung 3.3 ist die Synthese der Konjugate **4-6** dargestellt.

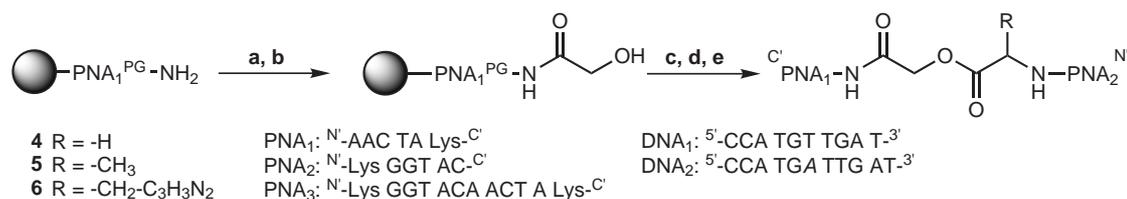


Abbildung 3.3: Synthese der PNAester **4-6** und Übersicht über die verwendeten PNA- und DNA-Sequenzen: (a) HOBT, HBTU, DIEA, **2**; (b) TCA; (c) HOBT, DIC, DMAP, Fmoc-Gly/Ala/His(Trt)-OH; (d) PNA-Synthese; (e) TFA, m-Cresol

### 3.1.2 SYNTHESE DER PNAESTERS **7** ÜBER LINKER **3**

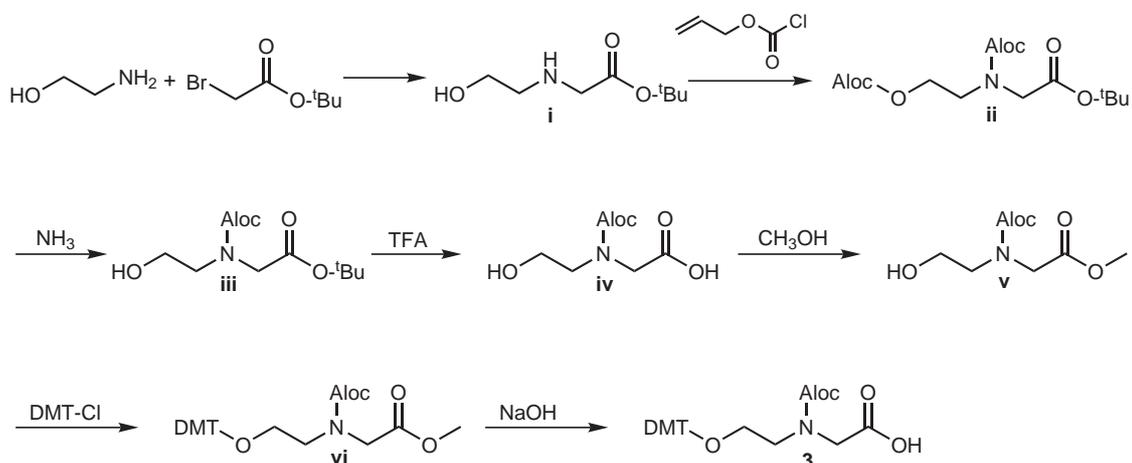


Abbildung 3.4: Synthese des *O*-DMT-,*N*-Aloc-geschützten Linkers **3**

Für die Kopplung von **3** an PNA sind zur Festphase orthogonale Schutzgruppen erforderlich. Nach einer Literaturvorschrift von Uhlmann et al.[27] wurde *N*-(2-Hydroxyethyl)glycin-*t*butylester **i** durch eine  $S_N2$ -Reaktion von 2-Aminoethanol und Bromessigsäure-*t*butylester in DMF mit DIEA synthetisiert. Die anschließende Umsetzung mit Allyloxycarbonylchlorid nach einer Literaturvorschrift von Richert et al.[28] ergab den bis-Aloc-geschützten *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-allyloxycarbonyloxyethyl)glycin-*t*butylester **ii**, von dem in konzentrierter Ammoniaklösung selektiv die *O*-Aloc-Schutzgruppe entfernt werden konnte. Der einfach Aloc-entschützte Ester **iii** wurde mit TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verseift (**iv**), um die säurelabile *t*Butyl-Schutzgruppe durch den basenlabilen Methyl ester zu ersetzen (**v**). Anschließend wurde die Hydroxygruppe des *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-hydroxy-

ethyl)glycinmethylesters **v** DMT geschützt und der über Säulenchromatographie isolierte *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-(4,4'-dimethoxytriphenylmethoxy)-ethyl)glycinmethylester **vi** in Natriumhydroxidlösung zur DMT-geschützten Carbonsäure **3** verseift. Die Gesamtausbeute lag bei 12%. Die Charakterisierung der einzelnen Verbindungen erfolgte über Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie.

Die N-terminale Kopplung des Linkers **3** an festphasengebundene PNA erfolgte wie bei Linker **2** über eine Standard-Peptidkopplungsreaktion mit HOBT, HBTU und DIEA in DMF (Abbildung 3.5 a). An der Festphase wurde die Alloc-Schutzgruppe mit  $\text{Pd}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$  quantitativ enternt (b). Die Nucleobase Thymin wurde durch Kopplung von Thyminessigsäure mit HOBT, HBTU zur Aktivierung der Carbonsäure und DIEA als Base an die sekundäre Aminogruppe in 70% Ausbeute eingeführt (c). Nach Abspalten der DMT-Gruppe (d) wurde die Hydroxygruppe mit *N*-Fmoc-geschütztem Glycin verestert (e). Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit Piperidin abgespalten und die PNA-Synthese am Syntheseautomaten bis zum Konjugat gewünschter Länge fortgeführt (f). Nach Abspalten von der Festphase mit Trifluoressigsäure/*m*-Cresol und anschließender HPLC-Reinigung (g) wurde der PNAester **7** in geringen Ausbeuten (2%) erhalten (siehe 3.1.1). Die Charakterisierung erfolgte über HPLC und MALDI-TOF Massenspektrometrie. Abbildung 3.5 zeigt das Syntheschema des PNAesters **7**.

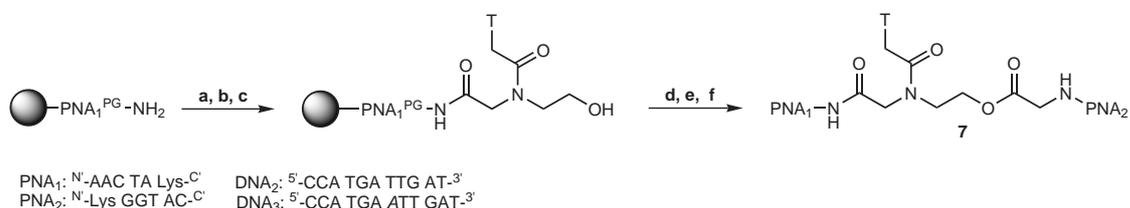


Abbildung 3.5: Synthese des PNAesters **7** und Übersicht über die verwendeten PNA- und DNA-Sequenzen: (a) HOBT, HBTU, DIEA, **3**; (b)  $\text{PPh}_3$ ,  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ ,  $(\text{Et}_2\text{H}_2\text{N})\text{HCO}_3$ ; (c) HOBT, HBTU, DIEA, Thyminessigsäure; (d) TCA; (e) HOBT, DIC, DMAP, Fmoc-Gly/Ala/His(Trt)-OH; (f) PNA-Synthese; (g) TFA, *m*-Cresol

## 3.2 SCHMELZPUNKTEXPERIMENTE ( $T_m$ )

Ob das Hybridisierungsvermögen der PNAester durch die Modifikation beeinträchtigt wird, lässt sich über die Ermittlung des Schmelzpunktes ( $T_m$ -Wert) mit einem tempe-

raturvariablen UV-Vis-Spektrophotometer bestimmen. Als Schmelzpunkt wird diejenige Temperatur bezeichnet, bei der die Duplex zur Hälfte dissoziiert vorliegt. Da zur Schmelzpunktbestimmung PNA in sehr reiner Form und relativ hoher Konzentration (700  $\mu$ l, 2  $\mu$ M) erforderlich ist, konnten wegen der geringen Ausbeuten nur die  $T_m$ -Werte des Glycinesters **4** und der entsprechenden unmodifizierten PNA<sub>3</sub> zweifelsfrei bestimmt werden.

PNA	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_m(^{\circ}\text{C})$
PNA <sub>3</sub>	58	
<b>4</b>	34	24

Im Fall des Glycinesters **4** führte die Estermodifikation offensichtlich zu einer starken Destabilisierung ( $\Delta T_m = 24^{\circ}\text{C}$ ) der PNA/DNA-Duplex. Diese starke Abnahme der Schmelzpunkttemperatur um über 40% im Vergleich zur unmodifizierten PNA<sub>3</sub> deutet darauf hin, dass in der Duplex mit komplementärer DNA der PNAester nur teilweise hybridisiert vorliegt.

### 3.3 ESTERSPALTUNG

Die Untersuchung der Reaktivität der Peptidnucleinsäureester **4-7** erfolgte durch Bestimmung des prozentualen Anteils der Spaltfragmente über MALDI-TOF MS und HPLC. Quantitative MALDI-TOF Massenspektrometrie[29] zur Verfolgung der Esterhydrolyse besitzt gegenüber HPLC den Vorteil eines schnellen Nachweises und sehr kleiner benötigter Probenmenge. Da sich die Verwendung eines internen PNA-Standards für die quantitative Bestimmung der Spaltprodukte über MALDI-TOF MS als nicht geeignet erwies, wurde der Umsatz der Spaltung prozentual über das Verhältnis der Signalintensitäten von Produkt zu Edukt bestimmt (es konnte eine lineare Abhängigkeit der Signalintensitäten von PNAester und Spaltprodukten beobachtet werden).

Die Hydrolysegeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit der eingesetzten Nucleophile gemessen. Die besten Ergebnisse wurden mit 2mM Cu(II) und 50mM NaCl entweder in 10mM MOPS-Puffer pH 8, oder mit Ethylendiamin in 10mM MOPS-Puffer pH 7 erhalten. In Abbildung 3.6 sind die prozentualen Umsätze der Spaltung (2h, RT) der PNAester **1-3** in Abhängigkeit der verwendeten DNA dargestellt. Die relative Standardabweichung lag im Bereich von 12-15%, weshalb sich die Spaltaktivität nicht exakt quantifizieren

ließ. Es konnte aber ein eindeutiger Trend beobachtet werden: Im Fall der Esterhydrolyse bei pH 8 (Abbildung 3.6, links) war bei allen drei PNAs eine leichte Hemmung der Hydrolyse in Gegenwart komplementärer DNA im Gegensatz zum DNA-freien System oder mit DNA mit einem mismatch (A-bulge) zu beobachten. Die Spaltung der PNAester mit Ethylendiamin wies die gleiche Tendenz mit etwas stärker ausgeprägtem Effekt auf (Abbildung 3.6, rechts). Dieser Trend konnte durch die Analyse der Esterspaltung

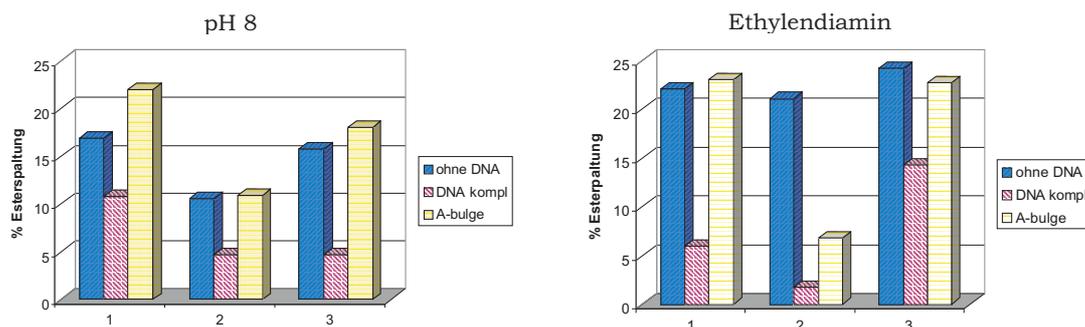


Abbildung 3.6: Vergleich der prozentualen Esterspaltung nach 2h, RT: (1) Glycinester **4**; (2) Alaninester **5**; (3) Histidinester **6**; links: Hydrolyse bei pH 8; rechts: Spaltung mit Ethylendiamin

über HPLC bestätigt werden, die beobachtete Hydrolyseaktivität war jedoch etwas kleiner (Abbildung 3.7).

Der über den Linker **3** synthetisierte Glycinester **7** zeigte den gleichen Trend der Reaktivität wie die PNAester **4-6**: Die Hybridisierung mit komplementärer DNA hatte eine Hemmung der Esterspaltung zur Folge. Die Integration einer Nucleobase in das Linkermolekül zeigte kaum Auswirkung auf die Hydrolyse des Esters. In Abbildung 3.8 ist der prozentuale Anteil der Esterhydrolyse ohne DNA (1), mit komplementärer DNA (2) sowie DNA<sub>3</sub> mit einem mismatch (3) dargestellt.

Es konnten zwei verschiedene Linkermoleküle zur Bildung einer Esterbindung im Polyamidrückgrat von PNA synthetisiert und erfolgreich in PNA integriert werden. Die Veresterung mit Aminosäuren ermöglichte die Synthese vier unterschiedlicher PNAester **4-7**. Die Hybridisierung mit komplementärer DNA hatte im Vergleich zu mismatch-DNA bzw. der Kontrolle ohne DNA eine Hemmung der Spaltreaktion um ca. 50% zur Folge.

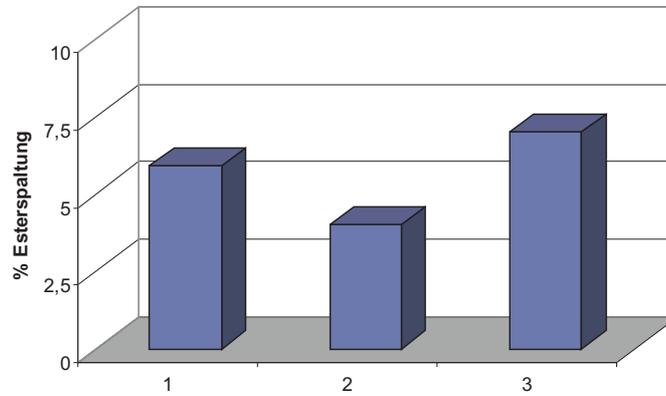


Abbildung 3.7: HPLC-bestimmte Spaltung des Alaninesters **5** in Prozent nach 2h, 10mM MOPS pH 8, 50mM NaCl, RT: (1) ohne DNA; (2) mit komplementärer DNA; (3) DNA mit einem mismatch (A-bulge)

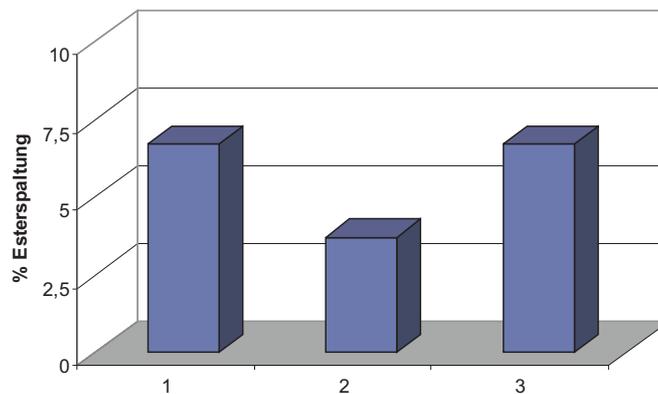


Abbildung 3.8: HPLC-ermittelte Spaltung des Glycinesters **7** in Prozent nach 2h, 10mM MOPS pH 8, 50mM NaCl, RT: (1) ohne DNA; (2) mit kompl. DNA<sub>2</sub>; (3) DNA<sub>3</sub> mit einem mismatch.

# KAPITEL 4

## FLUORESZENZSONDEN: METALL GELÖSCHTE "MOLECULAR BEACONS"

Die Fluoreszenzlöschung von 5'-Terpyridin-modifizierten, 3'-Fluorescein- bzw. 3'-Tamra-markierten "anorganischen" Molecular Beacons wurde mit Cu(II), Zn(II), Ni(II) und Fe(II) untersucht und mit den Fluoreszenzeigenschaften der bereits bekannten 5'-Pyridylpyrazolyl- bzw. 5'-Bipyridin- und 3'-Fluorescein- oder 3'-Tamra-modifizierten MBs verglichen. Die um ein bzw. zwei Größenordnungen höhere Kupferbindungskonstante von Terpyridin im Vergleich zu bipy bzw. pypz ermöglichte eine Reduzierung der zur Löschung erforderlichen Kupferkonzentration. Die Hybridisierungsgeschwindigkeiten der MBs mit der jeweiligen komplementären DNA konnten optimiert werden. In 5'-tpy,3'-Tamra-modifizierter PNA ermöglichte das flexiblere PNA-Rückgrat eine effizientere Wechselwirkung zwischen Chromophor und Chelatkomplex. Die Hybridisierung mit komplementärer DNA führte zu einer 40-90fachen Fluoreszenzerhöhung.

---

### 4.1 STAND DER FORSCHUNG

In den von S. Tyagi und F. R. Kramer entwickelten Molecular-Beacon(MB)-Systemen wird die Fluoreszenzlöschung im geschlossen (Hairpin-) Zustand durch Kontaktlöschung oder FRET-Effekt zwischen einem Fluorophor und einem organischen Quencher verursacht.[6] Bei den von Herrn Dr. Jens Brunner in unserer Arbeitsgruppe erstmals synthetisierten Metall-gelöschten MBs[1] ist anstelle eines organischen Quenchers terminal ein Chelatligand gebunden. An den Liganden koordiniertes Cu(II) ist in räumlicher Nähe zum Fluorophor, wodurch es zur Löschung der Fluoreszenz durch Elektronen- oder Energieübertragung kommt (vgl. Abbildung 6.2). Eine direkte Wechselwirkung des koordinativ ungesättigten Metallions mit den Donoratomen des Farbstoffs wurde vorgeschlagen.[1, 30, 31]

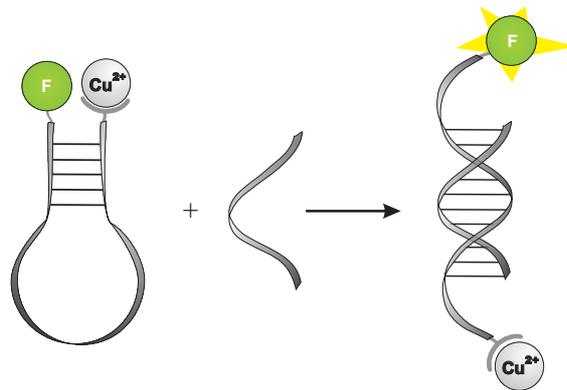
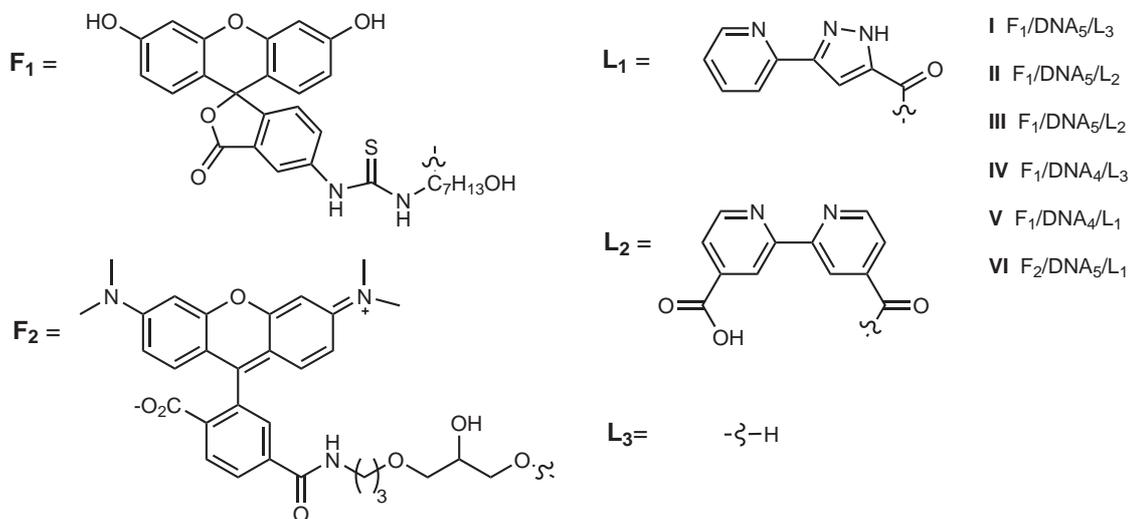


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines "anorganischen" Molecular Beacon

Als Fluoreszenzfarbstoffe verwendete J. Brunner Fluorescein, Tetramethylrhodamin und Pyren, als Chelatliganden Pyridylpyrazolylcarbonsäure (pypz) und Bipyridindicarbonsäure (bipy). In Abbildung 4.2 sind einige der von ihm eingesetzten Oligonucleotide **I-VI** im Überblick dargestellt.



**DNA<sub>4</sub>**: 5'-GCG AGA AGT TAA GAC CTA TGC TCG C-3'

**DNA<sub>5</sub>**: 5'-ATA TAG AAG TAG ACC TAT GCT ATA T-3'

Abbildung 4.2: Farbstoffe und Chelatliganden als Komponenten literaturbeschriebener [1], metallgelöschter Molecular Beacons

Die Löschwirkung von Cu(II) wurde mit den Sonden **II**, **III**, **V** und **VI** untersucht. Zugabe von  $5\mu\text{M}$  Cu(II) zu einer  $0,1\mu\text{M}$  Lösung der 5'-pypz,3'-Fluorescein-derivatisierten DNA<sub>1</sub> **V** führte zu 80%-85% Löschung[32]. Mit  $5\mu\text{M}$  Cu(II) konnte bei einer  $0,1\mu\text{M}$  Lösung von 5'-pypz,3'-Fluorescein-DNA<sub>2</sub> **II** eine Abnahme um 85%, mit  $50\mu\text{M}$  Cu(II) sogar um 95% beobachtet werden. Die 5'-pypz,3'-Tamra-modifizierte Sonde **VI** verhielt sich ähnlich wie **II**. [1]

Der für das Löschen der Fluoreszenz benötigte Überschuss an Cu(II)-Ionen lässt sich über die Komplexbildungseigenschaften der Liganden erklären: Die Komplexbildungskonstante von Cu(II) mit **II** wurde fluorimetrisch zu  $\log K = 6.3$  bestimmt. [1] Mit **III** ließ sich bereits mit  $0,1\mu\text{M}$  Cu(II) eine deutliche Abnahme (50-60%) der Fluoreszenz beobachten ( $\log K = 7$ ), für eine vollständige Löschung waren jedoch Konzentrationen  $> 1\mu\text{M}$  Cu(II) nötig. [32]

Die relativ schwache Cu(II)-Affinität der eingesetzten Chelatliganden stellt in Hinblick auf die Anwendung der Sonden eine Komplikation dar. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit metallgelöschte Molecular Beacons mit dem effizienteren dreizähligen Chelatliganden Terpyridin entwickelt. Terpyridin **1** weist als terdentater Ligand eine höhere Kupfer-Bindungskonstante ( $\log K = 9.1$ ) [33] als L<sub>1</sub> bzw. L<sub>2</sub> auf.

## 4.2 SYNTHESE

### (2,2':6',2''-TERPYRIDIN-4'-YLOXY)HEXANSÄURE **8**

Um tpy als Liganden an das 3'- bzw. 5'-Ende von DNA koppeln zu können, muss es mit einer geeigneten funktionellen Gruppe ausgestattet werden, die eine kovalente Bindungsbildung ermöglicht. Daher wurde nach einer Literaturvorschrift[34] ein in 4'-Position mit einer Carbonsäurefunktion modifiziertes Terpyridinderivat **8** synthetisiert. 4'-Chloro-2,2':6',2''-Terpyridin wurde in einer Suspension von KOH in DMSO bei 80°C mit  $\epsilon$ -Caprolacton umgesetzt. Nach Aufarbeitung der Reaktionslösung konnte das 4'-Alkyl-oxycarbonsäure substituierte Terpyridinderivat **8** in 66% Ausbeute als seidig-weißer Feststoff erhalten werden. Das Produkt wurde über Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisiert.

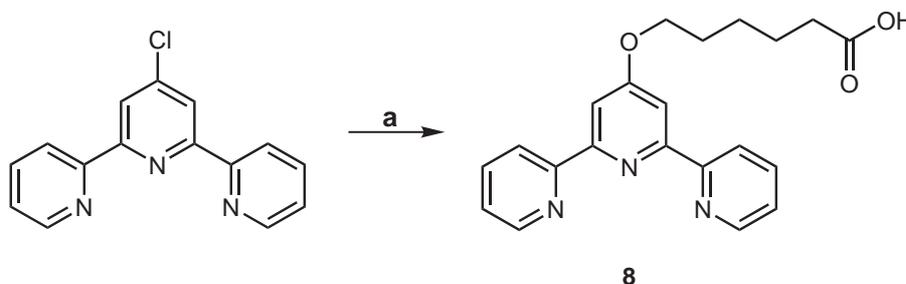


Abbildung 4.3: Synthese des Terpyridinliganden **8**; a)  $\epsilon$ -Caprolacton, KOH, DMSO

## 4.3 SYNTHESE DER 3'-FLUO,5'-TPY- BZW.

### 3'-TAMRA,5'-TPY-MODIFIZIERTEN DNA-SONDEN **9** UND **10**

Die Synthese der Sonden **9** und **10** erfolgte analog zur beschriebenen Syntheseroute.[32] Dafür wurden kommerziell erhältliche, CPG-gebundene, 3'-Fluorescein bzw. 3'-Tamra und 5'-NH<sub>2</sub>-(MMT geschützte) modifizierte DNAs an der Festphase zunächst entschützt, und anschließend an das freie Aminoende 4'-Alkoxycarbonsäure-derivatisiertes Terpyridin **8** mit HOBT, HBTU als Kopplungsreagenzien und DIEA als Base gekoppelt. Nach Abspalten von der Festphase mit konz. NH<sub>3</sub> und anschließender HPLC-Reinigung wurden der 3'-Fluo,5'-tpy-modifizierte MB **9** und 3'-Tamra,5'-tpy-modifizierte MB **10** in gu-

ten Ausbeuten erhalten. Die Charakterisierung der Oligonucleotide erfolgte über MALDI-TOF MS und HPLC.

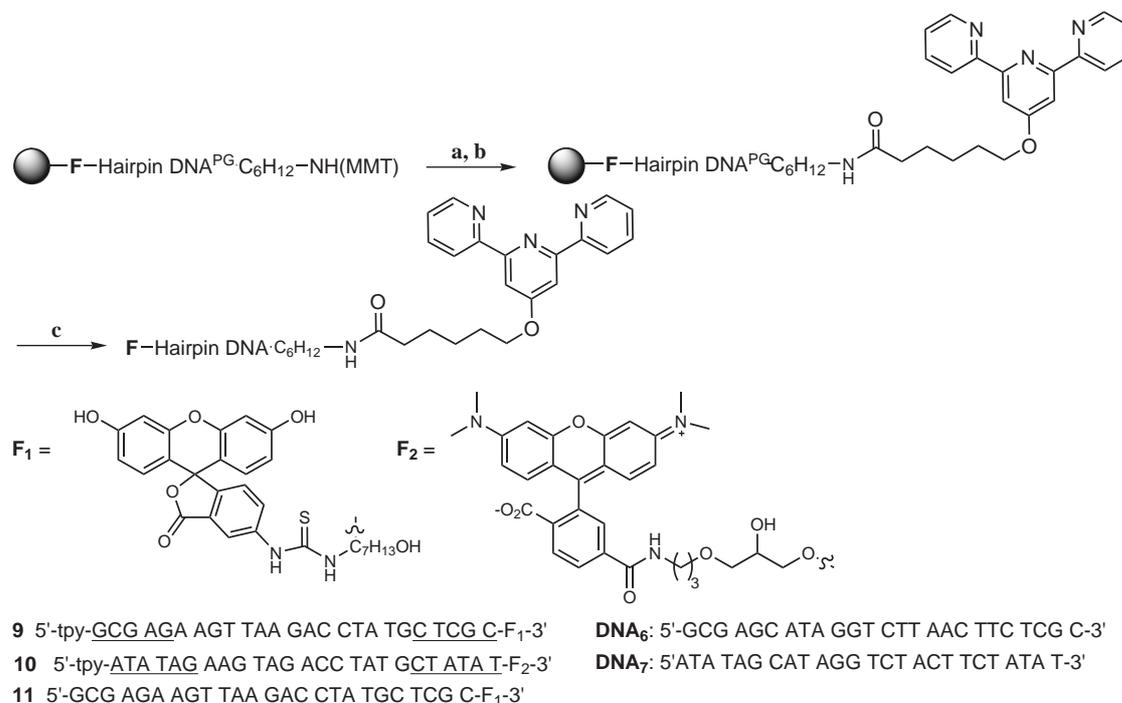


Abbildung 4.4: Synthese der MB **9-11** und Darstellung der verwendeten DNA-Sequenzen; a)  $\text{CCl}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b) HOBt, HBTU, DIEA, **8**; c) konz.  $\text{NH}_3$ , HPLC

## 4.4 OPTIMIERUNG DER HYBRIDISIERUNGSKINETIK

Die Hybridisierungskinetik von DNA-Hairpinstrukturen ist von der Sequenz des Beacons und der Salzkonzentration abhängig.[35] Während für einen kommerziellen 5'-Fluorescein,3'-Dabcyl-MB der Sequenz DNA<sub>4</sub> die in Bezug auf Signal/Rausch-Verhältnis und Kinetik optimale Salzkonzentration als 150mM NaCl und 10mM  $\text{MgCl}_2$  bestimmt wurde, wurde für den metallgelöschten Molecular Beacon **9** das beste Signal/Rausch-Verhältnis bei 1M NaCl ermittelt. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen Hairpin- und hybridisierter Form erwies sich für **9** unter beiden Bedingungen als vergleichbar schnell.

Die Kinetik von **10** mit der Sequenz DNA<sub>5</sub> wurde deutlich stärker von der Salzkonzentration beeinflusst als **9**. J. Brunner konnte zeigen, dass sich für das von ihm synthetisierte

Oligonucleotid **II** der gleichen Sequenz wie der in dieser Arbeit verwendete Beacon **10** in 1M NaCl das Hybridisierungsgleichgewicht nach 40 Minuten einstellte, während in 100mM NaCl die Gleichgewichtseinstellung auch nach 60 Minuten noch nicht abgeschlossen war.[32] Durch die zusätzliche Verwendung von  $MgCl_2$  konnte nun die NaCl-Konzentration gesenkt und die Hybridisierung stark beschleunigt werden: Während die Fluoreszenzintensität von **10** in 1M NaCl nach 10min erst bei 53% des Endwertes lag, waren in 100mM NaCl/20mM  $MgCl_2$  nach 10min bereits 82% des Endwertes erreicht (Abbildung 4.5).

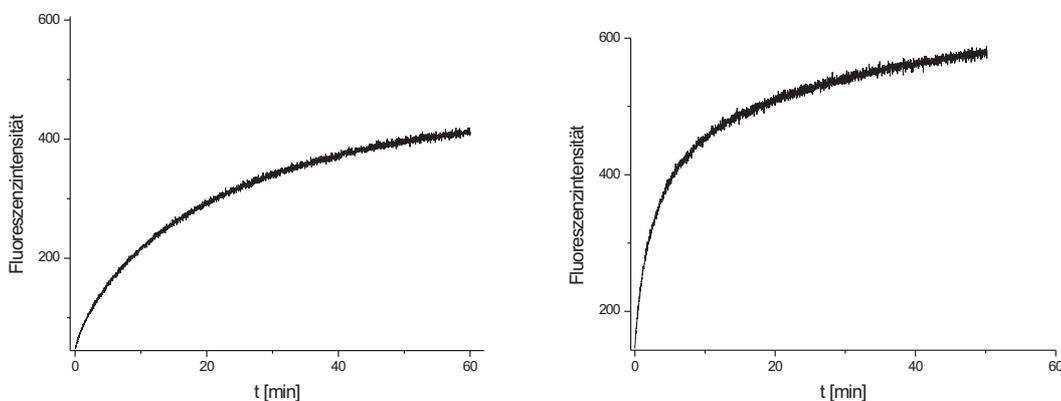


Abbildung 4.5: Zeitabhängigkeit der Hybridisierungsgeschwindigkeit: Links:  $0,1\mu M$  **10**,  $5\mu M$   $CuSO_4$ ,  $0,5\mu M$   $DNA_7$ , 10mM MOPS pH7, 1M NaCl. Rechts:  $0,1\mu M$  **10**,  $5\mu M$   $CuSO_4$ ,  $0,5\mu M$   $DNA_7$ , 10mM MOPS pH7, 100mM NaCl, 20mM  $MgCl_2$

Über die Variation der Salzkonzentration von 1M NaCl zu 100mM NaCl/20mM  $MgCl_2$  konnte die Gleichgewichtseinstellung zwischen hybridisierter und Hairpinform beschleunigt und die Fluoreszenzeigenschaften optimiert werden. Eine Beschleunigung der Hybridisierung bei Verwendung von Sequenz  $DNA_5$  durch kurzes Erhitzen war nicht erforderlich.

#### 4.5 Fluoreszenztitration der 3'-Fluo,5'-tpy-DNA **9** und der 3'-Tamra,5'-tpy-DNA **10** mit Cu(II)

### 4.5 FLUORESZENZTITRATION DER 3'-FLUO,5'-TPY-DNA **9** UND DER 3'-TAMRA,5'-TPY-DNA **10** MIT CU(II)

Terpyridin **8** bildet den Mono-Komplex  $[\text{Cu}(\text{tpy})\text{OH}_2]^{2+}$  mit einer Bindungskonstante von  $\log K = 9,1$ . [33] Es wurde nun untersucht, ob bedingt durch den höheren  $\log K$ -Wert eine höhere Kupfersensitivität der Kupfer-vermittelten Fluoreszenzlöschung erreicht werden kann.

Die Fluoreszenzexperimente wurden mit  $0,1 \mu\text{M}$  DNA des entsprechenden Oligonucleotids in 10mM MOPS-Puffer, pH 7, und 1M NaCl im Fall von **9** und 100mM NaCl/20mM  $\text{MgCl}_2$  im Fall von **10** (vgl. Abschnitt 4.4) durchgeführt. Da bereits geringste Metall-Verunreinigungen die Fluoreszenz der Oligonucleotidsonden stark beeinträchtigten, wurden alle verwendeten Stammlösungen (bis auf die DNA- und Metallsalzlösungen) über Chelex (Iminodiacetat-funktionalisiertes Polystyrol) aufbewahrt. Die Fluorescein-modifizierten DNAs **9** und **11** wurde bei 494nm, die Tamra-tpy-modifizierte **10** bei 558nm angeregt. In Abbildung 4.6 ist die Änderung der Fluoreszenzintensität von  $0,1 \mu\text{M}$  **9** in Abhängigkeit von der  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration dargestellt.

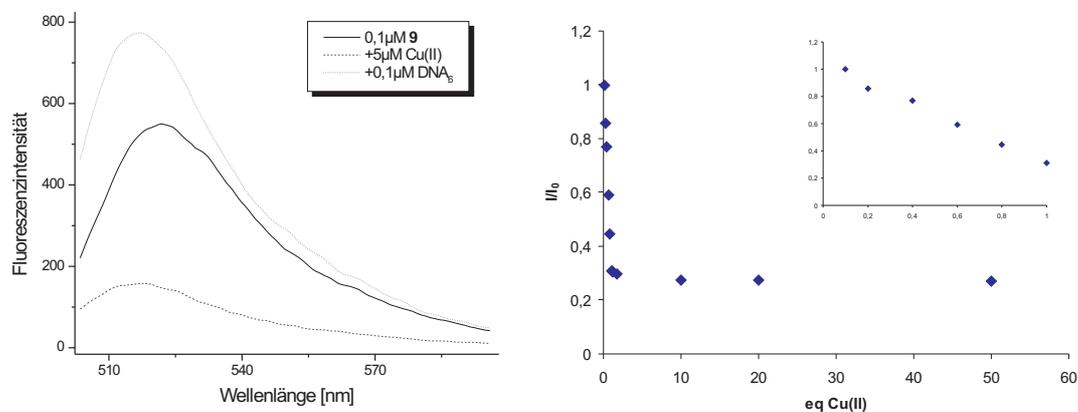


Abbildung 4.6: Links: Fluoreszenzspektren von **9**:  $0,1 \mu\text{M}$  **9**, 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl,  $25^\circ\text{C}$ . Rechts: Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Cu(II)-Konzentration

Nach der Zugabe von  $0,1 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  zu **9** war sofort eine starke Abnahme der Fluoreszenz um 70% messbar. Bei weiterer  $\text{CuSO}_4$ -Zugabe sank die Fluoreszenz nur noch

geringfügig weiter. Die Hybridisierung mit der komplementären DNA<sub>6</sub> führte zu einer fünffachen Fluoreszenz-Zunahme. Mit 15-20% Restfluoreszenz ist die Löschwirkung mit 5  $\mu$ M Cu(II) bei **9** mit der bei **V** in etwa vergleichbar,[32] der Terpyridin-modifizierte Beacon **9** ist aber im Gegensatz zum Pyridylpyrazolyl-modifizierten **V** schon mit einem Äquivalent Cu(II) weitestgehend gelöscht. Die in allen Fällen beobachtete Zunahme der Fluoreszenzintensität über den Ausgangswert ist auf ein zusätzliches Quenchen des Farbstoffes in der Hairpinstruktur durch den Terpyridinliganden oder auf leichte Metallverunreinigungen zurückzuführen.

Der 5'-Tpy,3'-Tamra-modifizierte MB **10** verhielt sich ähnlich wie **9**. Nach Zugabe von 2 Äquivalenten Cu(II) war eine Restfluoreszenz von 25% zu beobachten, mit 5  $\mu$ M Cu(II) lag sie bei 12%. Die Hybridisierung mit 0,5  $\mu$ M DNA<sub>7</sub> regenerierte die Fluoreszenzemission (Abbildung 4.7).

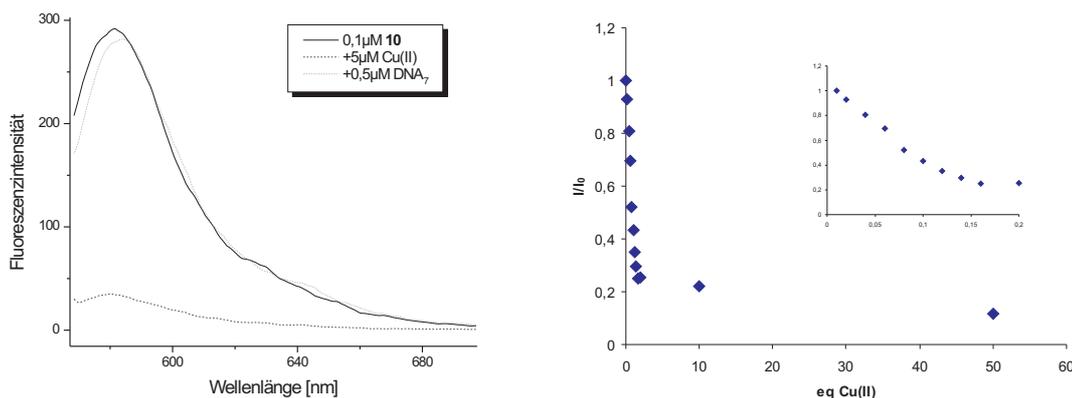


Abbildung 4.7: Links: Fluoreszenzspektren von **10**: 0,1  $\mu$ M **10**, 10mM MOPS, pH 7, 100mM NaCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Cu(II)-Konzentration

Die Verwendung von tpy als Chelatliganden für die "anorganischen" MBs **9** und **10** hatte gegenüber den literaturbeschriebenen Systemen den Vorteil, dass bereits bei submikromolaren Konzentrationen der Sonden eine annähernd maximale Fluoreszenzlöschung durch Zugabe von nur einem Äquivalent Cu(II) erreicht wurde. Da die Kupferbindungskonstante von tpy  $\log K_D = 9.1$  beträgt, sollte es auch möglich sein, die Kupferkonzentration zum Löschen der Sonden um noch eine weitere Größenordnung herabzusetzen. In

#### 4.5 Fluoreszenztitration der 3'-Fluo,5'-tpy-DNA **9** und der 3'-Tamra,5'-tpy-DNA **10** mit Cu(II)

Abbildung 4.8 ist die Änderung der Fluoreszenzintensität einer  $1 \cdot 10^{-8}$ M Lösung von **9** in Abhängigkeit von Cu(II) dargestellt.

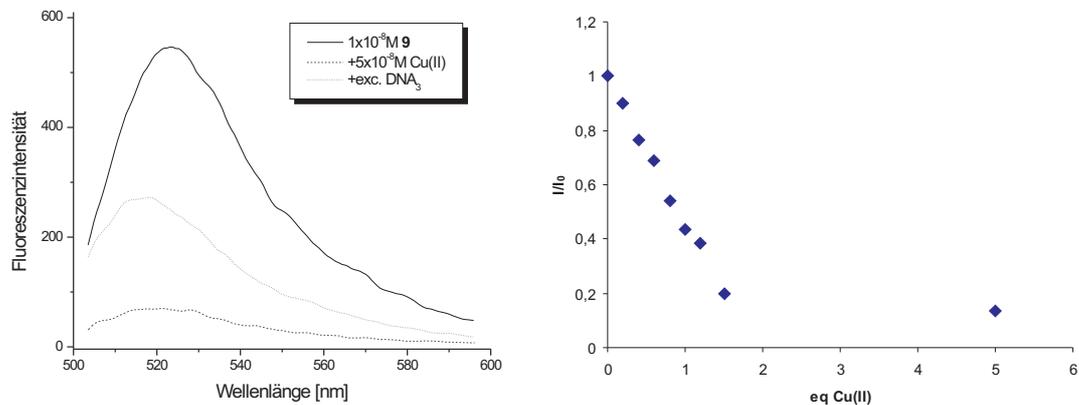


Abbildung 4.8: Links: Fluoreszenzspektren von **9**:  $0,01 \mu\text{M}$  **9**, 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl,  $25^\circ\text{C}$ . Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Cu(II)-Konzentration

Die Zugabe von  $0,01 \mu\text{M}$  Cu(II) hatte eine Löschung der Fluoreszenz um 66% zur Folge, mit 1,5 Äquivalenten Cu(II) betrug die Restfluoreszenz nur noch 13% des Ausgangswertes. Die Hybridisierung mit der komplementären DNA<sub>6</sub> führte zu einer vierfachen Zunahme der Fluoreszenz, allerdings ließ sich auch mit einem großen Überschuss keine vollständige Regenerierung der Fluoreszenz beobachten.

## 4.6 TITRATION VON **9** UND **10** MIT ZN(II), NI(II) UND FE(II)

Viele fluoreszierende Metallsensoren werden effizient von paramagnetischem Kupfer(II) gelöscht. [31, 30] Dieser Effekt wird bei den "anorganischen" Molecular Beacon genutzt. Aber auch andere Metallionen können die Fluoreszenz spezifischer Metallsensoren löschen. Da Terpyridin mit vielen Übergangsmetallen stabile Chelatkomplexe bildet, sollte untersucht werden, ob die physiologischen Metalle Zn(II), Fe(II) und Ni(II) die Fähigkeit besitzen, die MBs **9** und **10** effizient zu löschen. Die Titrations wurden unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie mit Cu(II) durchgeführt.

### TITRATION VON **9**, **10** MIT ZN(II)

Die Zugabe von  $0,1\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  (d.h. einem Äquivalent) zu einer  $0,1\mu\text{M}$  Lösung von **9** hatte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 67% zur Folge, mit einem weiteren Äquivalent wurde die Fluoreszenz bis auf 16% Restfluoreszenz gelöscht. Selbst ein hoher Überschuss Zinksulfat ( $50\mu\text{M}$ ) führte nur zu einer weiteren Abnahme um 3%. Durch die Hybridisierung mit komplementärer  $\text{DNA}_6$  konnte das Fluoreszenzsignal nur zu knapp 50% wiederhergestellt werden (Abbildung 4.9).

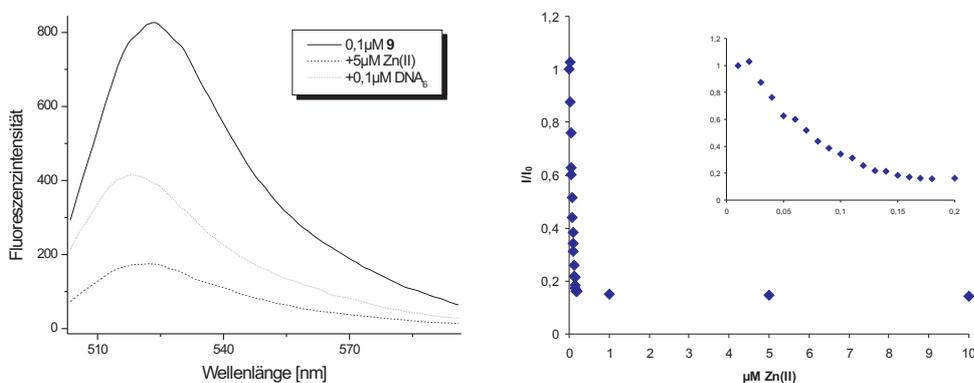


Abbildung 4.9: Links: Fluoreszenzspektren von **9**:  $0,1\mu\text{M}$  **9**,  $10\text{mM}$  MOPS, pH 7,  $1\text{M}$  NaCl,  $25^\circ\text{C}$ . Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zn(II)-Konzentration

Der MB **10** verhielt sich mit Zn(II) ähnlich wie **9**. Mit einem Äquivalent  $\text{ZnSO}_4$  nahm

die Fluoreszenz um 83% ab. Ein Überschuss von Zn(II) ( $5\mu\text{M}$ ) ließ die Fluoreszenzintensität nur leicht weiter sinken, auf 13% Restfluoreszenz. Die Hybridisierung mit DNA<sub>74</sub> führte zu einer vierfachen Erhöhung der Fluoreszenz, es wurden allerdings nur 75% des Ausgangswertes erreicht (Abbildung 4.10).

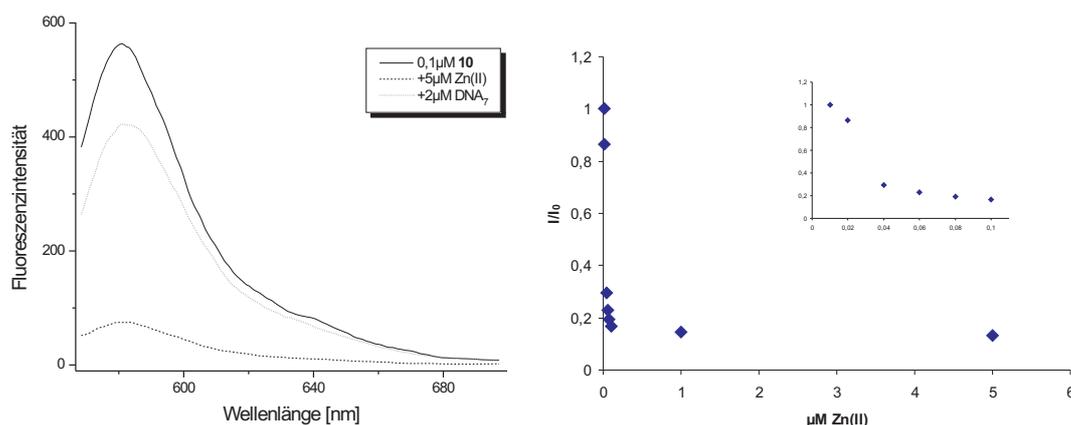


Abbildung 4.10: Links: Fluoreszenzspektren von **10**:  $0,1\mu\text{M}$  **10**, 10mM MOPS, pH 7, 100mM NaCl, 20mM MgCl<sub>2</sub> 25°C. Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zn(II)-Konzentration

Obwohl Zn(II) nicht wie Cu(II) paramagnetisch ist, löscht es die Fluoreszenz von **9** und **10** ähnlich effizient. Durch die Hairpin-Struktur werden Chromophor und tpy in räumlicher Nähe zueinander gebracht, so dass die Fluoreszenzlöschung vermutlich auf eine effiziente Kontaktlöschung des Farbstoffes durch den tpyZn-Komplex zurückzuführen ist. Die durch Hybridisierung mit komplementärer DNA nur teilweise regenerierbare Fluoreszenzintensität stellt allerdings einen Nachteil des Systems im Vergleich zur Löschung mit Cu(II) dar.

TITRATION VON **9**, **10** MIT Ni(II)

Anders als im Fall von Cu(II) und Zn(II) hatte die Zugabe von  $0,1\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> zu einer  $0,1\mu\text{M}$  Lösung von **9** nur eine Verringerung der Fluoreszenz um 30% zur Folge. Auch mit einem großen Überschuss Ni(II) ( $10\mu\text{M}$ , d.h. 100 Äquivalenten) kam es nur zu einer Abnahme um 40% bezogen auf die Ausgangsintensität. Die Hybridisierung mit komplementärer DNA<sub>6</sub> führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz weit über den Ausgangswert (Abbildung 4.11).

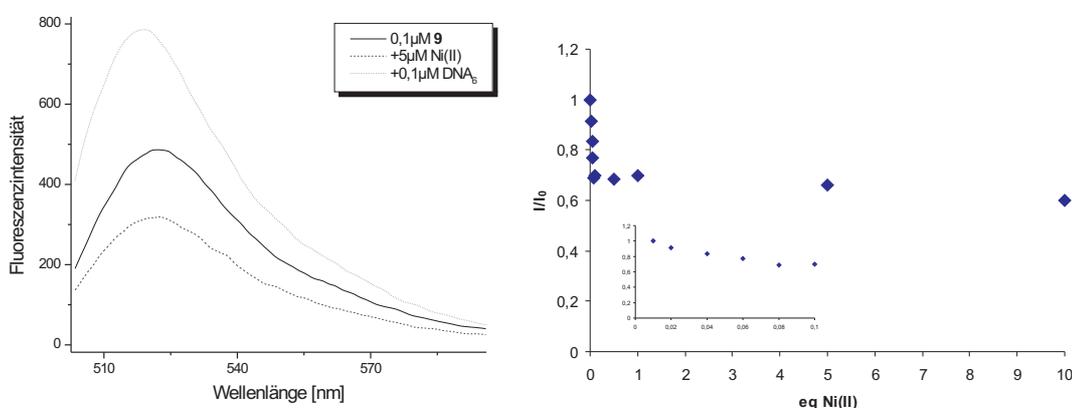


Abbildung 4.11: Links: Fluoreszenzspektren von **9**:  $0,1\mu\text{M}$  **9**,  $10\text{mM}$  MOPS, pH 7,  $1\text{M}$  NaCl,  $25^\circ\text{C}$ . Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Ni(II)-Konzentration

Nickel(II)ionen bilden mit tpy je nach Stöchiometrie  $[\text{Ni}(\text{terpy})]^{2+}$ - oder  $[\text{Ni}(\text{terpy})_2]^{2+}$ -Komplexe, wobei die Bildung des  $[\text{Ni}(\text{terpy})_2]^{2+}$ -Komplexes mit schwacher positiver Kooperativität verläuft. [36] Es ist daher anzunehmen, dass die folgenden zwei Reaktionen parallel zueinander ablaufen:



Die Komplexbildungskonstante von tpy mit Ni(II) beträgt  $\log K_1 = 10,7$  bzw.  $\log K_2 = 11,1$ . [36] Bei einer Konzentration von  $10^{-7}\mu\text{M}$  liegt das Gleichgewicht in Gleichung 4.1

also auf der rechten Seite, die Bildung des Biskomplexes ist daher begünstigt. Die Kinetik der Komplexbildung von tpy mit Ni(II) ist um Faktor  $10^5$  langsamer als mit Cu(II). Deswegen lassen sich vermutlich der Mono(tpy)-Ni(II)-Komplex (**9**)Ni und der Bis(tpy)-Ni(II)-Komplex (**9**)<sub>2</sub>Ni nebeneinander beobachten.[36] Es ist anzunehmen, dass im Fall des intermolekularen (**9**)<sub>2</sub>Ni-Komplexes durch die oktaedrische Koordination zweier tpy-Liganden an das Nickelion das Metallion abgeschirmt ist und daher nicht oder kaum in Wechselwirkung mit dem Fluorophor tritt.

Das Oligonucleotid **10** verhielt sich mit Ni(II) ähnlich wie **9**. Bei den Sonden der Sequenz DNA<sub>5</sub> ist die Fluoreszenzlöschung durch die Nucleobasen nicht so stark ausgeprägt wie bei DNA<sub>4</sub>, wodurch die Löschwirkung etwas ausgeprägter war: Mit  $0,1\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> nahm die Fluoreszenz um 45% ab, mit  $5\mu\text{M}$  Ni(II) betrug die Restfluoreszenz 34%. Die Hybridisierung mit komplementärer DNA<sub>7</sub> stellte die Fluoreszenz wieder auf ihren Ausgangswert her (Abbildung 4.12).

Obwohl die hohe Nickelbindungskonstante von tpy eine starke Erhöhung der Sensitivität ermöglichen würde, ist Ni(II) wegen der Tendenz zur Bildung intermolekularer Addukte in Zusammenhang mit tpy als Chelatligand der Sonden nicht interessant.

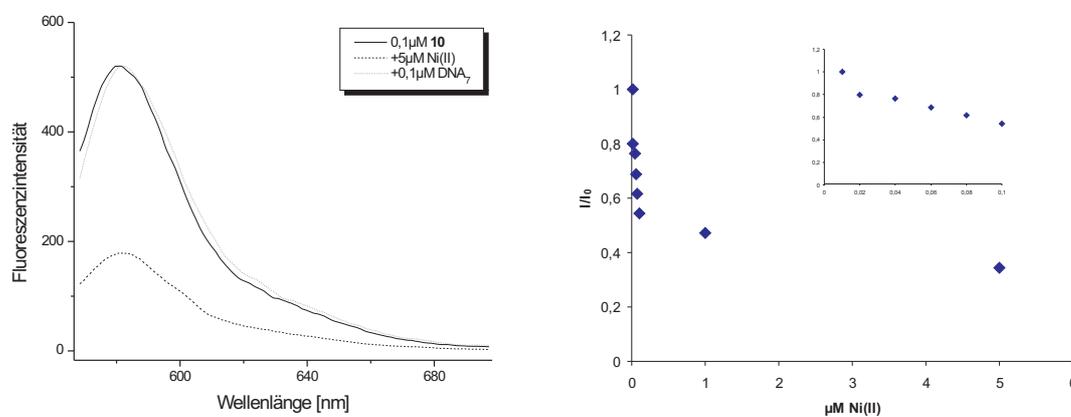


Abbildung 4.12: Links: Fluoreszenzspektren von **10** in Abhängigkeit:  $0,1\mu\text{M}$  **10**,  $10\text{mM}$  MOPS, pH 7,  $100\text{mM}$  NaCl,  $20\text{mM}$  MgCl<sub>2</sub>,  $25^\circ\text{C}$ . Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Ni(II)-Konzentration

TITRATION VON **9**, **10** MIT Fe(II)

Wie mit Ni(II) wurde mit  $0,1\mu\text{M}$  Fe(II) nur eine geringe Fluoreszenzlöschung einer  $0,1\mu\text{M}$  Lösung von **9** um 22% erreicht. Mit höherer Konzentration der Fe(II)ionen nahm die Fluoreszenz zwar weiter ab, aber selbst mit  $50\mu\text{M}$  Fe(II) wurden nur 46% der Ausgangsfluoreszenz gelöscht (Abbildung 4.13).

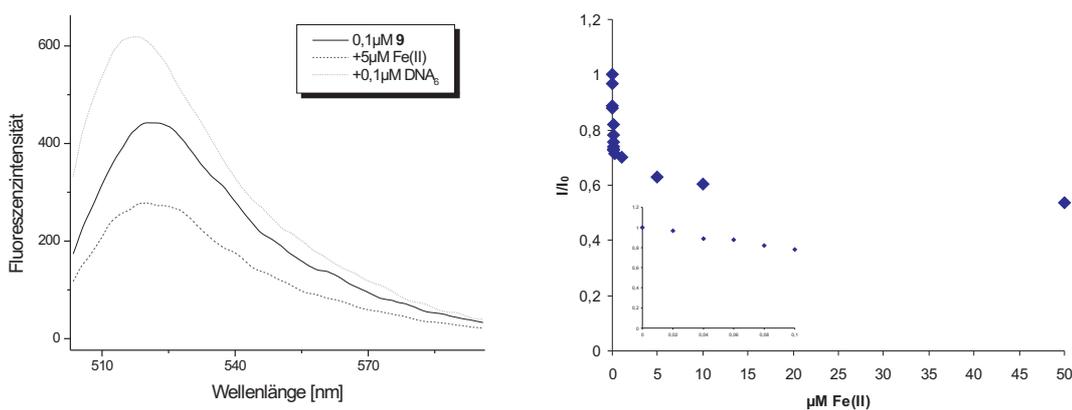


Abbildung 4.13: Links: Fluoreszenzspektren von **9**:  $0,1\mu\text{M}$  **9**, 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl,  $25^\circ\text{C}$ . Rechts: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fe(II)-Konzentration

Mit Fe(II) bildet Terpyridin thermodynamisch und kinetisch stabile oktaedrische  $[\text{Fe}(\text{terpy})_2]^{2+}$ -Komplexe. Die Komplexbildung ist wie im Fall von Ni(II) positiv kooperativ, anders als bei Ni(II) lässt sich der mono(tpy)-Fe(II)-Komplex jedoch nicht isolieren. Die Eisen-Komplexbildungskonstanten von tpy betragen  $\log K_1 = 7.1$  und  $\log K_2 = 13.8$ . [37] Bei einer Konzentration von  $10^{-7}\text{M}$  liegt das Fe(II) daher nur als  $\text{tpy}_2\text{Fe}$  vor, wodurch die Wechselwirkung mit dem Fluorophor wie im Fall von Ni(II) schwach oder kaum vorhanden ist. Fe(II) ist deshalb für die Fluoreszenzlöschung der MB **9** und **10** nicht geeignet.

## 4.7 TITRATION DER 3'-FLUORESCEIN MODIFIZIERTEN SONDE **11** MIT Fe(II), Ni(II), Zn(II)

Die Fluoreszenzlöschung der Sonden **9** und **10** hängt mit der Koordination des Metalls an den Chelatliganden und der damit verbundenen räumlichen Nähe zum Fluorophor in der Hairpinform zusammen. J. Brunner konnte zeigen, dass die Fluoreszenz der 3'-Fluorescein-modifizierten DNA **IV** (bzw. **11**) ohne Chelatligand mit  $5\mu\text{M}$  Cu(II) nur um 9% abnahm.[32] Die Fluoreszenztitration von **11** mit  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  und  $\text{ZnSO}_4$  zeigte, dass es auch bei diesen Metallionen ohne die Koordination an den Liganden kaum zu einer nennenswerten Löschung der Fluoreszenz kam. Selbst mit  $50\mu\text{M}$   $\text{M}^{2+}$  verringerte sich die Intensität nur um 15-20%. Im Fall von Zn(II) ließ sich bei dieser Konzentration allerdings eine starke spontane Abnahme der Fluoreszenz beobachten, was auf ein Ausfallen oder Aggregieren der Sonde hindeutet. In Abbildung 4.14 sind die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Metallionkonzentration vergleichend dargestellt.

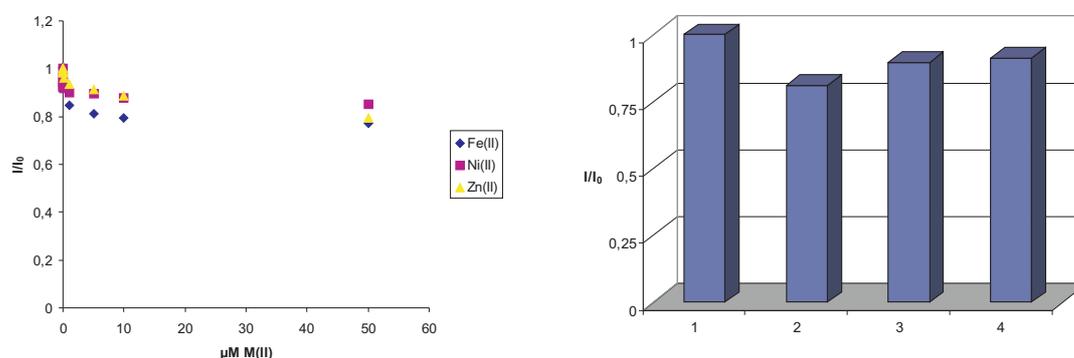


Abbildung 4.14: Rel. Fluoreszenzintensitäten von **11**: Links: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Metallionen-Konzentration; rechts: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von (1)  $0,1\mu\text{M}$  **11**, (2)  $0,1\mu\text{M}$  **11** +  $5\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_2$ , (3)  $0,1\mu\text{M}$  **11** +  $5\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ , (4)  $0,1\mu\text{M}$  **11** +  $5\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ; 10mM MOPS, pH 7, 1M NaCl,  $25^\circ\text{C}$

Durch die Verwendung von tpy als Ligand konnte die Cu(II)-Sensitivität der "anorganischen" MB im Vergleich zu pypz als Ligand um Faktor 100, bzw. bipy um Faktor 10 auf  $10^{-8}$  erhöht werden. Die Verwendung kleiner Cu(II)-Konzentrationen ist ein großer

Vorteil in Hinblick auf Anwendungen in lebenden Zellen.

Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Zn(II) die Fluoreszenz der "anorganischen" MB effektiv löscht. Im Vergleich zu Cu(II) ist das Signal/Rausch-Verhältnis allerdings schlechter, da durch Hybridisierung mit komplementärer DNA die Fluoreszenz nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte.

## 4.8 METALLGELÖSCHTE MOLECULAR BEACONS AUF PEPTIDNUCLEINSÄURE(PNA)-BASIS

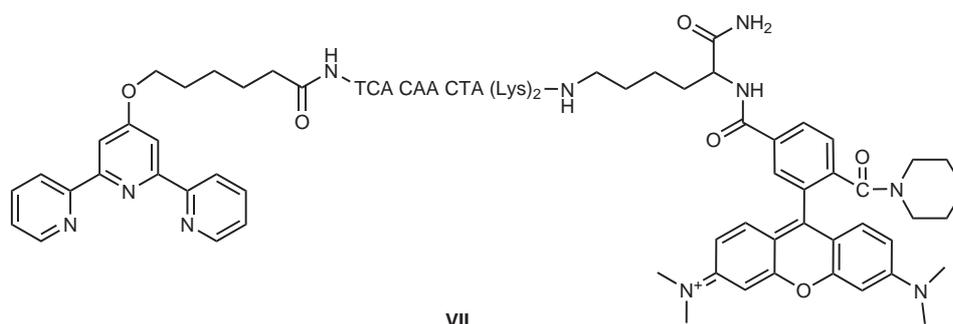
Aufbauend auf den Betrachtungen an tpy-Fluorophor-modifizierten DNAs konnten analoge metallgelöschte Molecular Beacons auf Peptidnucleinsäure-Basis entwickelt werden. Die Synthesen und fluorimetrischen Charakterisierung wurden von Herrn Andreas Füßl durchgeführt und sind daher hier nur kurz am Beispiel der 5'-tpy,3'-Tamra-modifizierten PNA **VII** erläutert. Teile dieser gemeinsam geplanten Untersuchungen sind bereits zur Publikation eingereicht.[38]

Die in Kapitel 4.1 diskutierten Metall-basierten Molecular Beacon sind in Bezug auf das Signal-Rausch-Verhältnis mit bekannten, auf FRET basierenden Fluorophor-Quencher-Paaren vergleichbar, allerdings ist dafür ein Überschuss Cu(II) notwendig. Arbeitet man mit stöchiometrischen Metallsalzmengen, liegt die Restfluoreszenz bei 15-20% und ist daher um Faktor 2-3 höher als bei einem entsprechenden Fluorescein-Dabcyl-MB.[32] Wie bei allen DNA MB ist die Hintergrundfluoreszenz außerdem stark von der Salzkonzentration abhängig; das beste Signal-Rausch-Verhältnis konnte z.B. für **9** mit 1M NaCl erreicht werden. Diese Konzentration liegt weit über physiologischen Bedingungen und limitiert daher die Anwendungsmöglichkeit in vivo.

PNA Molecular Beacons mit organischem Fluorophor-Quencher-Paar sind literaturbeschrieben[9] und haben gewisse Vorteile gegenüber ihren DNA-Analoga. Ihre Hybridisierungseigenschaften sind über einen weiten Bereich von der Ionenstärke der Lösung unabhängig, sie sind chemisch und v.a. biologisch stabiler, und es wird keine Stammregion zur Beacon-Bildung benötigt, weshalb auf nicht an der Bindung des Nucleinsäuretargets beteiligte Sequenzen verzichtet werden kann. Bereits aufgrund der flexibleren Struktur von PNA und wegen der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Quencher kommt es zur Interaktion zwischen Fluorophor und Quencher.[9] Das hat eine effiziente Löschung des Fluorophors zur Folge, das Signal-Rausch-Verhältnis von PNA Molecular Beacons ist mit dem von DNA Hairpin Molecular Beacons in etwa vergleichbar.[35]

Die Fluoreszenzexperimente wurden mit je  $1\mu\text{M}$  Oligonucleotid in 1mM Mops-Puffer, pH 7, und 100mM NaCl durchgeführt. In Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse von **VII** mit Cu(II) (links) und Zn(II) (rechts) zusammengefasst dargestellt.

Bei einer  $1\mu\text{M}$  Lösung von PNA **VII** war nur eine relativ geringe Restfluoreszenz zu beobachten (ca. 5-20% bezogen auf den hybridisierten Zustand), d.h. in Kombination mit einem geeigneten Donorfarbstoff wirkt Terpyridin offensichtlich als Akzeptor.



VII

DNA<sub>8</sub>: 5'-TAG TTG TGA-3'

Abbildung 4.15: Struktur der 5'-tpy,3'-Tamra-modifizierten PNA **VII**, und die komplementäre DNA-Sequenz DNA<sub>8</sub>.

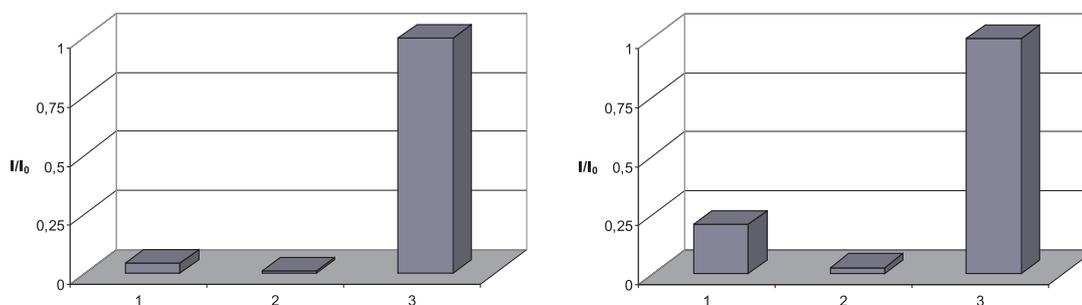


Abbildung 4.16: rel. Fluoreszenzintensitäten von **VII**; (1) 1 μM **VII**; (2) links: 1 μM **VII**+1 μM Cu(II); rechts: 1 μM **VII**+1 μM Zn(II); (3) links: 1 μM **VII**+1 μM Cu(II)+1 μM DNA<sub>8</sub>; rechts: 1 μM **VII**+1 μM Zn(II)+1 μM DNA<sub>8</sub>

Im Gegensatz zum rigiden 5'-Tpy,3'-Tamra-MB **10** kommt es bei der flexibleren PNA-Struktur im geschlossenen Zustand zu einer Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Ligand, und daher bereits ohne Metallzugabe zur Löschung der Fluoreszenz. Die Hybridisierung von **VII** mit der komplementären DNA<sub>8</sub> führte zu einer 5fachen Verstärkung der Fluoreszenzintensität. Durch Zugabe von einem Äquivalent Cu(II) bzw. Zn(II) zu **VII** nahm die Fluoreszenz weiter auf 1-2% Restfluoreszenz ab, sie lag damit deutlich unter der von **II** bzw. **V**. Die Hybridisierung von **VII** mit komplementärer DNA<sub>8</sub> führte in diesem Fall zu einer 90fachen Fluoreszenzerhöhung für Cu(II), bzw. 40fachen für Zn(II), das Signal-Rausch-Verhältnis war damit um Faktor 3-4 besser als bei den entsprechenden Metall-gelöschten DNA MBs. Da bei der PNA-Sonde allerdings mit einer

zehnfach höheren Nucleinsäurekonzentration gearbeitet wurde, ist ein direkter Vergleich mit den entsprechenden DNA-Sonden nur eingeschränkt möglich. Die Fluoreszenz einer tpy-unmodifizierten Kontroll-PNA nahm nach Metallzugabe nur um ca. 30% ab. Wie im Fall der "anorganischen" DNA MB erfolgte die Löschung also durch Koordination des Metalls an den Liganden in räumlicher Nähe zum Farbstoff.



# KAPITEL 5

## ALLOSTERISCHE DNA-METALLKOMPLEX-KONJUGATE

DNA wurde am 3'- und am 5'-Terminus mit Terpyridinliganden modifiziert und die Komplexbildung von Fe(II), Ni(II), Zn(II) und Cu(II) mit Hilfe von UV-Vis-, Fluoreszenzspektroskopie, Massenspektrometrie und Gelelektrophorese charakterisiert. Mit Fe(II) und Ni(II) bildete tpy<sub>2</sub>DNA stabile ringförmige Komplexe. Zn(II) und Cu(II) koordinierten reversibel an tpy<sub>2</sub>DNA und konnten als allosterische Effektoren die Hybridisierungseigenschaften der DNA beeinflussen. Mit ~1 Äquivalent Zn(II) konnte die Hybridisierung deaktiviert, und mit >2 Äquivalenten wieder regeneriert werden. An tpy<sub>2</sub>DNA koordiniertes Cu(II) konnte bei der Hybridisierung mit komplementärer DNA freigesetzt werden und so eine Reaktionskaskade zur Signalamplifizierung auslösen.

---

### 5.1 SYNTHESE BIS(TERPYRIDIN)-MODIFIZIERTER DNA

Die Synthese des 4'-Alkoxy-carbonsäure-Terpyridinderivates **8** ist in Kapitel 4.2 beschrieben.

Modifikationen am 3'-Ende von DNA lassen sich über einen Homoserinlinker einführen. Dafür wurde die OH-Gruppe einer CPG-dA-Festphase zuerst DMT entschützt und anschließend mit Fmoc-Hse(Trt)-OH und HOBT, DIC als Kopplungsreagenzien sowie DMAP als Katalysator verestert. Nach Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe von der Aminofunktion mit 30% Piperidin in DMF wurde der Ligand über eine Amidkopplung eingeführt. Anschließend wurde die Trityl-Schutzgruppe mit 1% TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> entfernt und die DNA-Synthese an einem Syntheseautomaten durchgeführt.

Eine zu späterem Zeitpunkt verwendete Alternative zur 3'-Modifizierung über einen Homoserinlinker ist die Verwendung von kommerziell erhältlicher, C<sub>7</sub>-NH(Fmoc) modi-

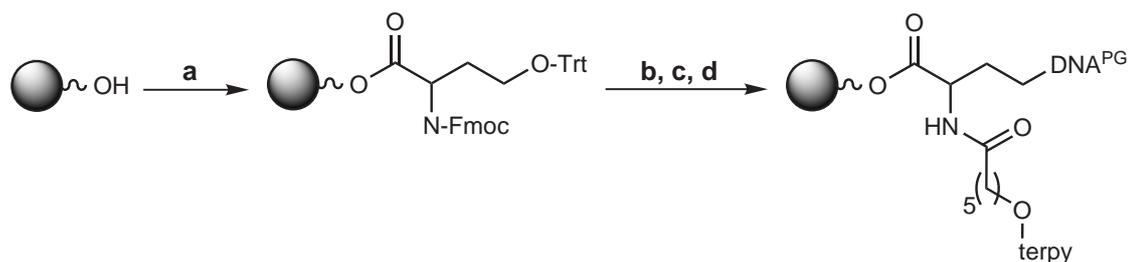


Abbildung 5.1: Kopplung von **8** über Homoserinlinker an 3'-Ende der DNA; a) Fmoc-Hse(Trt)-OH, HOBT, DIC, DMAP; b) Piperidin c) **8**, HOBT, HBTU, DIEA; d) DNA Synthese

fizierter CPG-Festphase (Link Technologies, Schottland): Nach Entschützen der Aminogruppe mit 30% Piperidin in DMF konnte der Carbonsäure-modifizierte Ligand **8** direkt an den Linker gekoppelt und anschließend die DNA-Synthese am Syntheseautomaten durchgeführt werden.

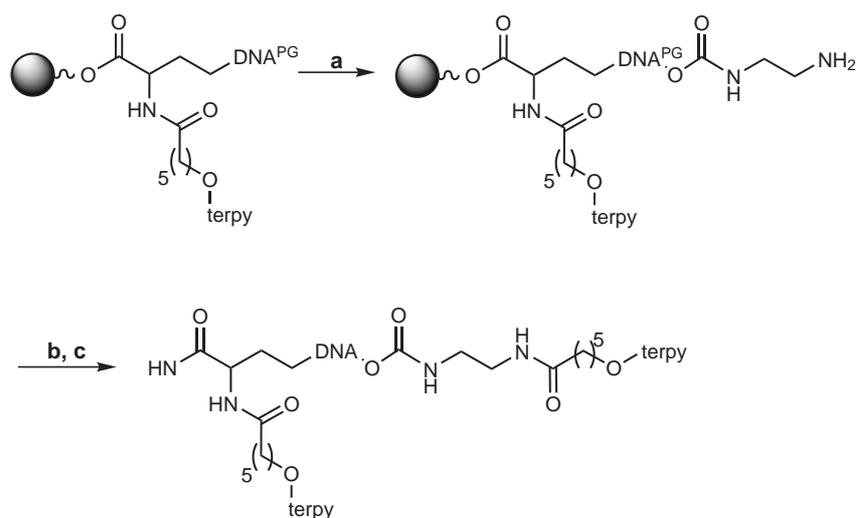


Abbildung 5.2: Kopplung von **8** über Aminolinker an das 5'-Ende von DNA; a) CDI, Ethylendiamin; b) **8**, HOBT, HBTU, DIEA; c) NH<sub>3</sub>

Für die 5'-Modifizierung der DNA wurde die 5'-OH-Gruppe zuerst mit Carbodiimidazol (CDI) aktiviert und dann über die Kopplung von Ethylendiamin eine Aminofunktion eingeführt. An die terminale Aminogruppe konnte anschließend über eine Amidierung mit HOBT/HBTU als Kopplungsreagenzien und DIEA als Base der Terpyridinligand **8** gekoppelt werden. Nach Abspalten von der Festphase und Entschützen der DNA-

Nucleobasen mit konz.  $\text{NH}_3$  und nachfolgender Reinigung und Isolierung über HPLC wurden die Bisterpyridin modifizierten DNAs **12** und **13** in guten Ausbeuten erhalten.

Die Mono(terpyridin)-modifizierten DNAs **14-16** wurden nach dem gleichen Prinzip synthetisiert, wobei die Modifizierung entweder am 3'- oder am 5'-Terminus erfolgte. In Abbildung 5.3 sind die verwendeten DNA Sequenzen dargestellt.

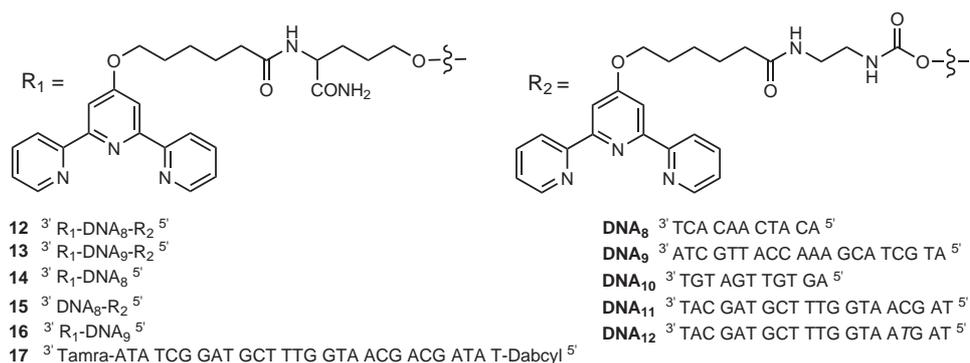


Abbildung 5.3: Übersicht über die tpy-modifizierten DNAs und die verwendeten DNA-Sequenzen

## 5.2 METALL INDUZIERTE CYCLISIERUNG VON DNA

2,2':6',2''-Terpyridin bildet mit fast allen Übergangsmetallen Mono- und Bis-Chelatkomplexe, die unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Es wurde das Komplexierungsverhalten der bismodifizierten DNAs **12** und **13** mit Fe(II), Ni(II), Zn(II) und Cu(II) untersucht.

### 5.2.1 FE(II)

Mit Fe(II) bildet Terpyridin farbige, thermodynamisch ( $\log K_1 = 7,1$ ;  $\log \beta = 20,9$ ) und kinetisch stabile oktaedrische  $[\text{Fe}(\text{tpy})_2]^{2+}$ -Komplexe[36]. Die Bildung des Bisterpyridin-Fe(II)-Komplexes ist positiv kooperativ, weshalb sich auch in Gegenwart eines Fe(II)-Überschusses kein  $[\text{Fe}(\text{tpy})]^{2+}$  bildet. Die Lebensdauer von  $[\text{Fe}(\text{tpy})_2]^{2+}$  in Wasser beträgt  $t_{1/2} = 8400\text{min}$ . [37] Die Koordination des Metallions an den terdentaten Liganden **8** lässt sich gut über UV-Vis Spektroskopie verfolgen. Die Entstehung einer Doppelbande bei 315 bzw. 323nm im UV-Bereich ist auf den Übergang des tpy von der trans/trans-Konformation in die planare cis/cis-Konformation im Komplex zurückzuführen (vgl. 1.3). Außerdem lässt sich die Entstehung einer für  $[\text{Fe}(\text{tpy})_2]^{2+}$  charakteristischen Absorptionsbande im sichtbaren Bereich bei 558nm (ML-CT) beobachten.

Abbildung 5.4 gibt den Titrationsverlauf von  $\text{tpy}_2\text{DNA}$  **12** mit Fe(II) im UV-Vis-Bereich wieder. Die Intensität der Bande bei 558nm stieg linear an, bis sie für ein Verhältnis

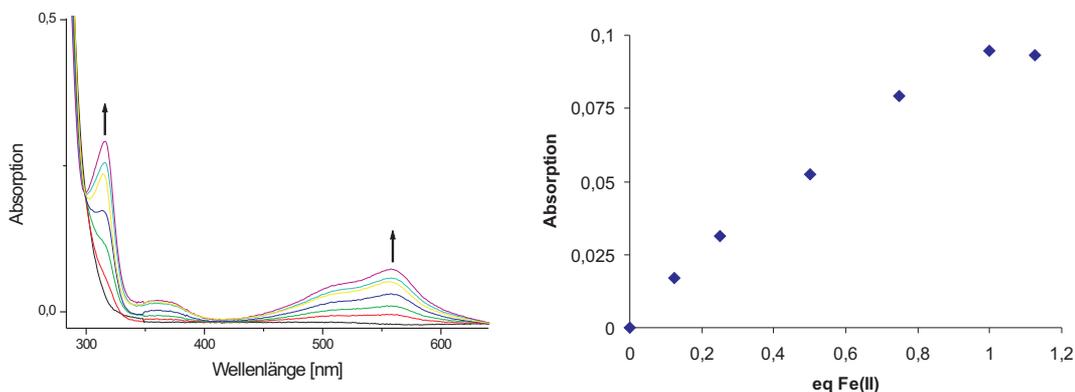


Abbildung 5.4: UV-Vis Titration von  $10\mu\text{M}$  Bis(tpy)DNA **12** mit  $\text{FeSO}_4$ , 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl. Links: Absorptionsspektrum im Bereich von 300-600nm; rechts: Titrationsverlauf bei 558nm

von **12**/Fe(II) = 1:1, d.h. 2:1 in Bezug auf tpy/Fe(II), ein Plateau erreichte, das sich

auch bei weiterer Metallzugabe nicht mehr veränderte. Aus dieser Beobachtung und dem positiv kooperativem Bindungsverhalten von  $[\text{Fe}(\text{tpy})_2]^{2+}$ -Komplexen lässt sich eine schnelle und glatte  $[\text{Fe}(\text{tpy})_2]$ -DNA Komplexbildung ableiten. Eine Abnahme der für den  $[\text{Fe}(\text{tpy})_2]^{2+}$ -Komplex charakteristischen Absorptionsbanden konnte weder nach Zugabe von komplementärer DNA noch von EDTA gemessen werden.

Im MALDI-TOF und ESI Massenspektrum ist nach Zugabe eines Äquivalents Fe(II) zu einer Lösung von **12** nur noch das Signal des 1:1 (**12**)Fe(II) Komplexes ( $m/z = 7185$ ) zu sehen (Abbildung 5.5). Die kürzere,  $\text{tpy}_2$ modifizierte DNA **13** zeigte mit Fe(II) das

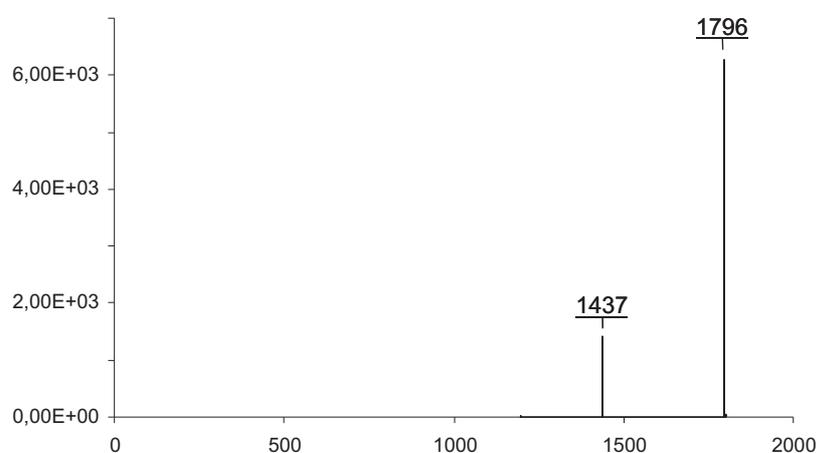


Abbildung 5.5: ESI MS Spektrum von **12**(Fe):  $m/z = 1796$   $[\text{M}+\text{Fe}(\text{II})]^{4-}$ ,  $1437$   $[\text{M}+\text{Fe}(\text{II})]^{5-}$

gleiche Absorptionsspektrum wie **12**, auch im MALDI-TOF MS Spektrum von **13**(Fe) war nur das Signal für den DNA/Fe(II) = 1:1 Komplex ( $m/z = 4281$ ) zu beobachten.

Aufgrund der hohen Verdünnung ( $10^{-6}\text{M}$ ) sollte die intramolekulare Koordination von Fe(II) an **12** und **13** gegenüber einer intermolekularen bevorzugt sein. Um die Möglichkeit einer intermolekularen Koordination auszuschließen zu können, wurde eine denaturierende Gel-shift Analyse (20% vernetztes Polyacrylamid) durchgeführt. Es wurden  $20\mu\text{l}$  einer  $50\mu\text{M}$  Probenlösung eingesetzt, wodurch die Banden über *UV-shadowing* sichtbar gemacht werden konnten. Abbildung 5.6 zeigt einen Ausschnitt aus dem Gel.

(**12**)Fe auf Bahn 2 wies eine etwas größere Mobilität (22,20 cm) auf als **12** ohne Metall (21,35 cm) auf Bahn 6. Dies ist in Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Mobilität circularer DNA vergleichbarer Länge[39]. Im Vergleich dazu zeigte die Haupt-



Abbildung 5.6: Denaturierende 20% Polyacrylamid-Gelelektrophorese; Bahn 1: **16**+Fe(II); Bahn 2: **12**+Fe(II); Bahn 3: **12**+Ni(II); Bahn 4: **12**+Zn(II); Bahn 5: **12**+Cu(II); Bahn 6: **12**; Bahn 7: DNA<sub>7</sub>.

bande der einfach tpy-modifizierten Probe **16**/Fe(II) auf Bahn 1 die geringste Mobilität (12,5 cm), was sich auf das höhere Molekulargewicht eines DNA/Fe 2:1 Komplexes zurückführen lässt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese unterstützen die Annahme einer bevorzugten intramolekularen Komplexbildung von (**12**)Fe.

#### HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE MIT DEM 5'-TAMRA,3'-DABCYL-MODIFIZIERTEN MB **17**

Zur Unterstützung der Annahme, DNA **12** bilde mit Fe(II) einen cyclischen 1:1 Komplex, wurden Hybridisierungsexperimente mit einem 5'-Tamra,3'-Dabcyl-modifizierten MB **17** durchgeführt. In Abwesenheit von **12** bilden die beiden selbstkomplementären Enden von **17** einen 6-basigen Stamm aus. Dadurch kommt an das 5'-Ende gebundenes Tamra in räumliche Nähe zu 3'-gebundenem Dabcyl, und die Tamra-Fluoreszenz wird gelöscht (vgl. 1.2) [6]. Die *loop*-Region von **17** besteht aus 16 Nucleobasen und ist komplementär zu **12**. Die Hybridisierung von **17** mit einem Äquivalent **12** führte zur Trennung des Fluorophor-Quencher Paares und dadurch bedingt zu einer Zunahme der

Fluoreszenzintensität des Tetramethylrhodamin-Farbstoffes um Faktor 35. Bei Zugabe von einem Äquivalent Fe(II) nahm die Fluoreszenz der Duplex **12:17** sofort um 82% ab, was auf eine Destabilisierung der Duplex hindeutet und sich mit der Freisetzung des geschlossenen, nicht-fluoreszenten MB **17** erklären lässt. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme der Ausbildung eines cyclischen **12(Fe)**-Komplexes. Durch Zugabe eines starken Chelatliganden wie EDTA konnte die Fluoreszenz nicht wieder hergestellt werden.

Umgekehrt hatte die Zugabe von einem Äquivalent **12(Fe)** zu **17** nur eine leichte Erhöhung der Beacon-Fluoreszenz zur Folge, d.h. es ließ sich keine effektive Hybridisierung zwischen **12(Fe)** und dem Molecular Beacon nachweisen.

Um Wechselwirkungen zwischen dem Terpyridin-Metall-Komplex und dem Farbstoff des MB als Ursache für die Fluoreszenzabnahme ausschließen zu können, wurden die gleichen Experimente mit der einfach tpy-modifizierter DNA **16** wiederholt. Die Fluoreszenz der Duplex **16:17** nahm bei Zugabe von Fe(II) nur leicht ab. Offensichtlich wurde in diesem Fall die Hybridisierung nicht gestört. Die Zugabe von Fe(II) zu einer Duplex aus **17** und unmodifizierter DNA DNA<sub>9</sub> hatte keine Veränderung der Fluoreszenzintensität zur Folge.

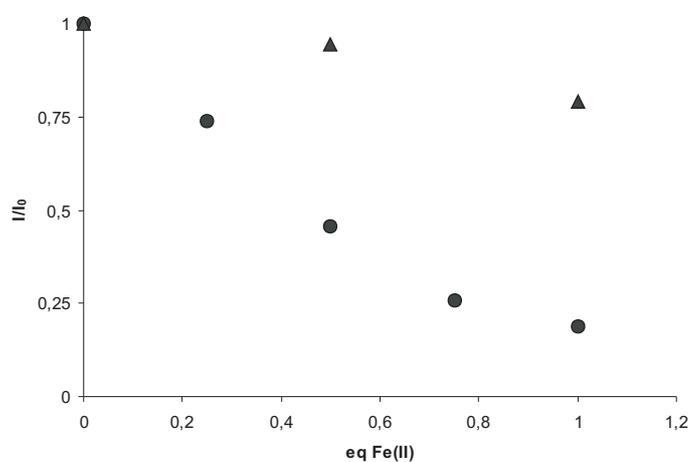


Abbildung 5.7: Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Titration der Duplices **12:17** (Kreise) und **16:17** (Dreiecke) mit Fe(II); 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, RT

## 5.2.2 Ni(II)

Nickel(II) bildet mit tpy je nach Stöchiometrie  $[\text{Ni}(\text{tpy})]^{2+}$ - oder  $[\text{Ni}(\text{tpy})_2]^{2+}$ -Komplexe ( $\log K_1 = 10,7$ ;  $\log \beta = 21,8$ ), wie im Fall von Fe(II) ist die Bildung von  $[\text{Ni}(\text{tpy})_2]^{2+}$ -Komplexen positiv kooperativ.[36] Die Lebensdauer von  $[\text{Ni}(\text{tpy})_2]^{2+}$  in Wasser beträgt  $t_{1/2} = 610$  min.[37]

Im UV-Vis-Spektrum lässt sich die Komplexierung nur über die Ausbildung einer Absorptionsdoppelbande bei 313 bzw. 325nm verfolgen, es sind keine Banden im sichtbaren Bereich zu beobachten. In Abbildung 5.8 ist die Absorptionsänderung für die Titration von tpy<sub>2</sub>DNA **12** mit NiCl<sub>2</sub> dargestellt.

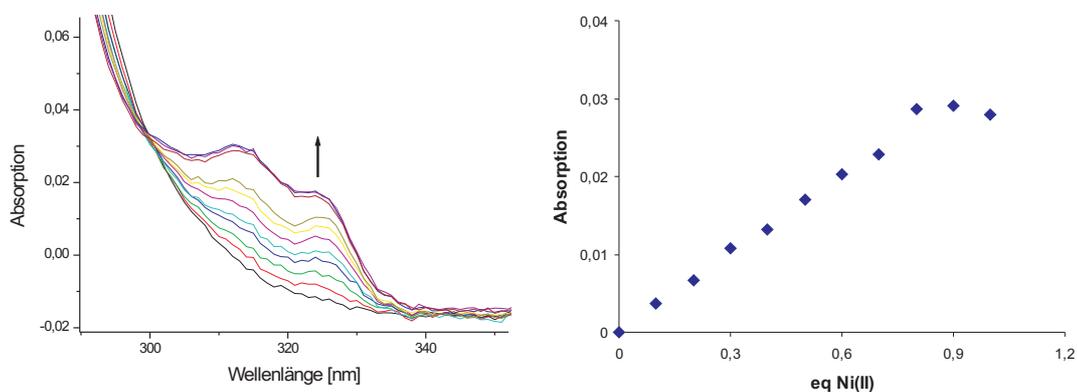


Abbildung 5.8: UV-Vis Titration von 5  $\mu\text{M}$  Bis(tpy)DNA **12** mit NiCl<sub>2</sub>. Links: Absorptionsspektrum im Bereich von 290-350nm; rechts: Titrationsverlauf bei 325nm

Im MALDI-TOF-Massenspektrum einer Probe von **12**/Ni(II) = 1:1 ist wie im Fall von Fe(II) nur das Signal des 1:1 Komplexes zu erkennen.

Die Titration der kürzeren DNA **13** mit Nickel(II) ergab das gleiche Absorptionsspektrum wie **12**.

Unter den Bedingungen einer denaturierenden Gel-shift Analyse (20% vernetztes Polyacrylamid) ist der (**12**)Ni-Komplex stabil, d.h. es lässt sich nur eine Bande beobachten, die in etwa die gleiche Mobilität (22,4 cm) wie der entsprechende Eisenkomplex (22,2 cm) aufweist (s. Bahn 3 in Abbildung 5.6).

## HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE

Ni(II) beeinflusste das Hybridisierungsverhalten von **12** mit dem Molecular Beacon **17** auf die gleiche Weise wie Fe(II). Die Zugabe von einem Äquivalent Ni(II) zur Duplex **12:17** bewirkte eine Abnahme der Fluoreszenz um 75%, was wie im Fall von Fe(II) auf eine Destabilisierung der Duplex deutet, und sich mit der Freisetzung des geschlossenen, nicht-fluoreszierenden MB erklären lässt. Umgekehrt führte die Zugabe von **12**(Ni) zu **17** nur zu einer 4,5fachen Erhöhung der Beacon Fluoreszenz, d.h. es kam zu keiner effektiven Hybridisierung zwischen dem **12**(Ni) und dem Molecular Beacon **17**.

Um Wechselwirkungen zwischen dem Terpyridin-Nickel(II)-Komplex und dem Farbstoff des MB als Ursache für die Fluoreszenzabnahme ausschließen zu können, wurden die Experimente mit 3'-Monotpy-modifizierter DNA **16** wiederholt. Die Fluoreszenz der Duplex **16:17** nahm bei Zugabe von Ni(II) zuerst vernachlässigbar, bei  $>0.5$  eq um 25% ab. Offensichtlich wurde in diesem Fall die Hybridisierung nur wenig gestört. Die Zugabe von Ni(II) zu einer Duplex aus **17** und unmodifizierter DNA DNA<sub>9</sub> hatte keine Änderung der Fluoreszenzintensität zur Folge. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Ni(II) ähnlich wie Fe(II) mit der Bistpy-modifizierten DNA **12** überwiegend intramolekulare, d.h. cyclische Komplexe bildet.

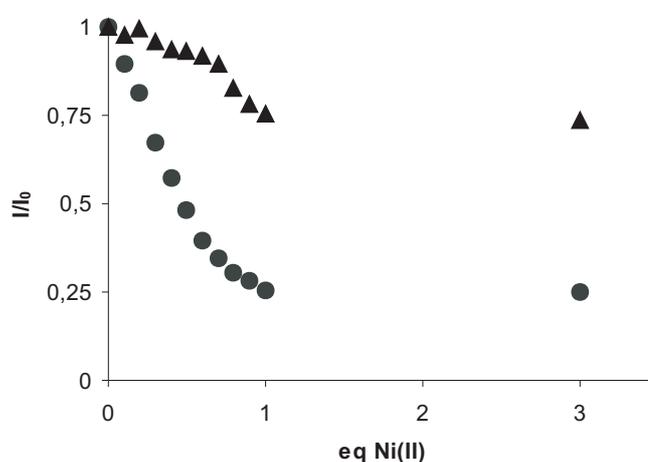


Abbildung 5.9: Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Titration der Duplices **12:17** (Kreise) und **12:DNA<sub>10</sub>** (Dreiecke) mit Ni(II); 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>

tpy<sub>2</sub>DNA bildete mit Fe(II) und Ni(II) 1:1 Komplexe, deren Entstehung über UV-Vis-Spektroskopie verfolgt werden konnte. Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MALDI-TOF, ESI) ließen sich für ein tpy<sub>2</sub>DNA/Fe(II)- bzw. Ni(II)-Verhältnis von 1:1 nur die Signale der einfach metallierten DNA nachweisen, was auf eine glatte Komplexbildung hindeutet. (**12**)Fe und (**12**)Ni waren unter den Bedingungen denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese stabil und wiesen eine etwas höhere Mobilität auf als die Vergleichsprobe von **12** ohne Metall. Die cyclische Struktur konnte außerdem indirekt durch die Destabilisierung einer Duplex aus **12** und einem komplementären Molecular Beacon **17** nach Metallzugabe durch Löschen der Fluoreszenz des MB bestätigt werden. Auch die Zugabe eines Überschusses von EDTA bewirkte keine Wiederherstellung der Fluoreszenz. Diese Beobachtungen lassen auf die Bildung stabiler ringförmiger Komplexe von tpy<sub>2</sub>DNA mit Fe(II) und Ni(II) schließen, es konnten somit zum ersten Mal Einzelstrang-DNA Ringe erzeugt werden, die auf nicht-kovalenter Bindungsbildung (*self-assembly*) beruhen.

## 5.3 ALLOSTERISCHE KONTROLLE DER OLIGONUCLEOTID-HYBRIDISIERUNG

Tpy<sub>2</sub>DNA kann als allosterischer Rezeptor mit zwei voneinander getrennten Untereinheiten für die Bindung einer komplementären Nucleinsäure und eines Metallions verstanden werden. Die Bindung eines Metallions schwächt die Wechselwirkung mit einer komplementären Nucleinsäure, im Fall von Fe(II) und Ni(II) ist dieser Prozess aufgrund der hohen Komplexstabilität irreversibel. Mit Zn(II) und Cu(II) bildet Terpyridin dagegen kinetisch labile Komplexe aus, was diese Metalle als allosterische Effektoren interessant macht.

### 5.3.1 ZN(II)

Zn(II) bildet mit Terpyridin in Abhängigkeit von der Stöchiometrie kinetisch labile [Zn(terpy)]<sup>2+</sup>- bzw. [Zn(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>-Komplexe. Bei [Zn(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> findet ein relativ schneller Ligandenaustausch statt (bei 0,1°C ist t<sub>1/2</sub> < 0,1min), weshalb die Komplexbildung reversibel ist. [37] Diese Eigenschaft ist für die Bildung supramolekularer Strukturen unter thermodynamischer Kontrolle interessant.

Terpyridin-Zink Komplexe absorbieren kein Licht im sichtbaren Bereich, im UV-Vis-Spektrum lässt sich daher die Komplexbildung nur über die Ausbildung der charakteristischen Terpyridin-Zn(II) Absorptionsdoppelbande bei 315 bzw. 323nm verfolgen. In Abbildung 5.10 ist die Absorptionsänderung für die Titration von Bisterpyridin-DNA **12** mit ZnSO<sub>4</sub> dargestellt.

Die Absorptionsspektren des 1:1 und 2:1 Komplex sind identisch, daher lieferte die UV-Vis-Spektroskopie keinen Hinweis auf die Stöchiometrie des Komplexes für Zn/Terpyridin >0,5.

Im MALDI-TOF Massenspektrum war für Zn/**12** = 1:1 nur das Signal für den (**12**)Zn-Komplex zu sehen, d.h. die gesamte DNA **12** lag "metalliert" vor. Für ein Verhältnis von Zn/**12** > 2 ließ sich im ESI-Massenspektrum bei m/z = 1815 auch das Signal für den vierfach negativ geladenen (**12**)Zn<sub>2</sub>-Komplex erkennen.

Unter den Bedingungen denaturierender Gel-shift Analyse (PAGE) war der (**12**)Zn-Komplex nicht stabil, man erkennt eine Bande der gleichen Mobilität wie die von **12** ohne Metall. Anders als bei Fe(II) oder Ni(II) konnte daher aus der PAGE-Analyse kein direkter Hinweis auf eine cyclische Koordination des Metalls erhalten werden.

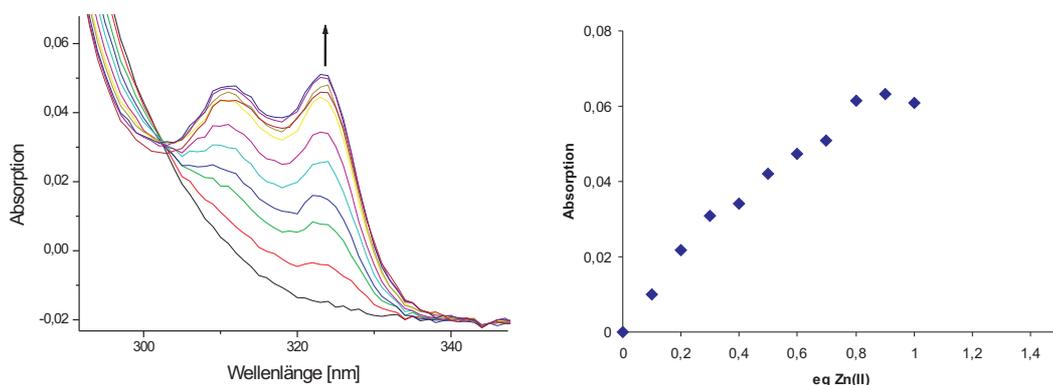


Abbildung 5.10: UV-Vis Titration von 10  $\mu\text{M}$  Bis(tpy)DNA **12** mit ZnSO<sub>4</sub>, 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl. Links: Absorptionsspektrum im Bereich von 290-350nm; rechts: Titrationsverlauf bei 3253nm

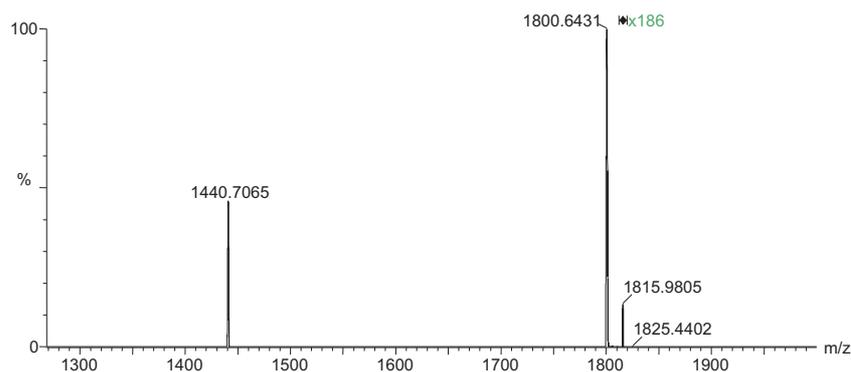


Abbildung 5.11: ESI MS Spektrum von **12**(Zn):  $m/z = 1815$   $[\text{M}+2\text{Zn}(\text{II})]^{4-}$ ,  $1800$   $[\text{M}+\text{Zn}(\text{II})]^{4-}$ ,  $1440$   $[\text{M}+\text{Zn}(\text{II})]^{5-}$

#### HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE

Zur Unterstützung der Annahme, Zn(II) bilde mit **12** ringförmige Addukte wie Fe(II) und Ni(II), wurden Hybridisierungsexperimente mit dem in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen 5'-Tamra-3'-Dabcyl MB **17** durchgeführt. Bei der Zugabe von ZnSO<sub>4</sub> zu einer 1  $\mu\text{M}$  Lösung von **12:17** nahm die Fluoreszenz des MB stark ab und erreichte ein Minimum für ein Äquivalent Zinkionen (Abbildung 5.12). Durch Zugabe eines Äquivalents EDTA wurde die Fluoreszenz wieder hergestellt, was ein Hinweis auf eine reversible Koordination von Zn(II) an **12** ist. Durch Zugabe eines weiteren Äquivalents Zn(II) konnte die Fluoreszenz

ebenfalls bis beinahe auf den Ausgangswert wieder hergestellt werden. Das lässt sich über ein Öffnen von (**12**)Zn durch Koordination eines zweiten Zinkions erklären. Während die Fluoreszenzabnahme, d.h. die Ringbildung, bei Zugabe des ersten Äquivalents spontan erfolgte, war die Wiederherstellung der Fluoreszenz, d.h. die Wiederöffnung, zunächst kinetisch gehemmt. Durch kurzes Erwärmen der Probe auf 50°C wurde die Reaktion beschleunigt, d.h. der Ring wieder geöffnet und die Fluoreszenz dadurch regeneriert. Im Gegensatz dazu blieb die Tamra-Fluoreszenz in der Duplex **16:17** bei Titration mit Zn(II) weitestgehend unverändert. Die schwache Zunahme der Intensität bei Zugabe bis ca. 0,5 Äquivalenten Zn(II) kann durch die Bildung des Komplexes (**16**)<sub>2</sub>Zn durch intermolekulare Bis(tpy)-Koordination des Metallions erklärt werden. In diesem Komplex ist das Metallion abgeschirmt und kann nicht direkt mit dem Farbstoff wechselwirken. Im Gegensatz zu den Zn(II)-gelöschten MBs **9** und **10**, bei denen es im geschlossenen Zustand bedingt durch die räumliche Nähe zum Fluorophor zu einer direkten Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Metallkomplex kam, waren in der Duplex **12:17** die letzten drei Basenpaare von **12** am 3'-Ende bzw. die letzten 6 am 5'-Terminus von **17** nicht hybridisiert. Das verhinderte einen direkten Kontakt zwischen dem Terpyridin-Zink-Komplex und Tamra, weshalb keine Löschung der Fluoreszenz zu beobachten war.

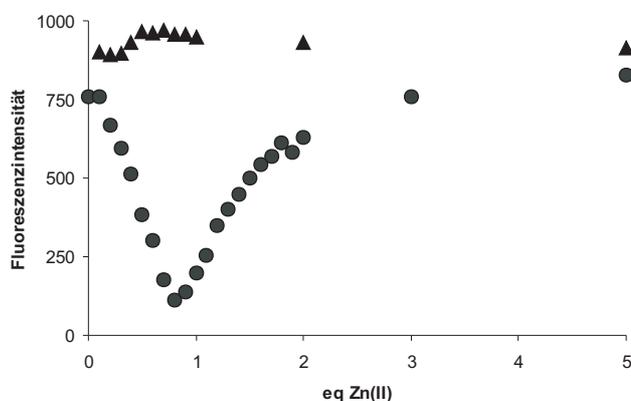


Abbildung 5.12: Titration der DNA-Duplices **12:17** (Kreise) und **16:17** (Dreiecke) mit Zn(II); 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, RT

Zn(II) beeinflusste die DNA-Probe also allosterisch, d.h. das erste Äquivalent Zn(II) hatte einen negativen allosterischen Effekt auf die Hybridisierungseigenschaften von **12**, das zweite Äquivalent einen positiven. Die Hybridisierungseigenschaften von **12** mit

komplementärer Nucleinsäure konnten in einem engen Konzentrationsbereich ( $\sim 1$  eq.  $\text{Zn(II)}$ ) "abgeschaltet" werden (Abbildung 6.3).

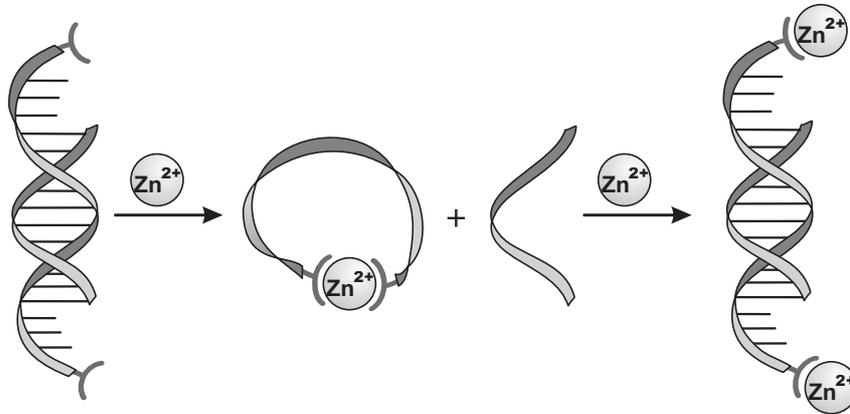


Abbildung 5.13: Schematische Darstellung der Kontrolle der Hybridisierung von **12** mit  $\text{Zn(II)}$  als negativem und positivem allosterischen Effektor

### 5.3.2 Cu(II)

Ebenso wie Zn(II) bildet Cu(II) mit Terpyridin sowohl 1:1, d.h.  $[\text{Cu}(\text{tpy})]^{2+}$ , als auch 2:1 Komplexe der Zusammensetzung  $[\text{Cu}(\text{tpy})_2]^{2+}$ . Die Komplexe sind thermodynamisch stabil, die Komplexbildungskonstante beträgt für  $[\text{Cu}(\text{tpy})]^{2+}$   $\log K=9.1$ [33], aber kinetisch labil. Die Kinetik der Metallkoordination an Terpyridin wurde bereits vor 40 Jahren von Wilkins und Mitarbeitern untersucht.[36] Er schlug einen allgemeinen Mechanismus für die Ausbildung von Terpyridin-Metallkomplexen vor, bei dem zuerst ein Outer-sphere Komplex zwischen dem aquatisierten Metallion und einem Terpyridin-Liganden entsteht und das zweite Terpyridinmolekül dann entweder nucleophil ( $S_N2$ ) den Komplex angreift, oder ein Addukt mit ihm bildet, bevor es zur Ausbildung eines Inner-sphere Komplexes kommt.[36] Neuere Arbeiten von A. E. Merbach unterstützen diesen Mechanismus, Cu(II) weist jedoch eine komplexere Kinetik auf. Bei Stopped-flow Untersuchungen in  $\text{H}_2\text{O}$ , MES-Puffer pH 6,1, konnten sie mit einem Überschuss Terpyridin mehrere kinetische Schritte bei der Komplexbildung beobachten. Sie ordneten diese der schnellen Bildung eines fünffach koordinierten  $\text{tpy}_2\text{-Cu(II)}$  Intermediates zu, bei dem ein tpy-Ligand dreizählig, der zweite zweizählig koordiniert, gefolgt von langsamen Umlagerungen zum sechsfach koordinierten Bis(tpy)-Cu(II) Komplex.[40]

Ob der Mono- oder der Bis(terpyridin)-Cu(II)-Komplex gebildet wird, hängt vom Verhältnis Ligand/Metall ab. Im Unterschied zu den meisten anderen Übergangsmetall-Terpyridinkomplexen weisen Mono- und Biskomplex leicht unterschiedliche Absorptionsbanden im UV-Spektrum auf, so dass sie spektroskopisch unterscheidbar sind.[37] Bei einem Cu(II)/tpy-Verhältnis bis 0.5 lässt sich die Bildung des Biskomplexes verfolgen,  $> 0.5$  bildet sich der Monoterpyridinkomplex. Abbildung 5.14 zeigt die Änderung der Absorption bei 313nm in Abhängigkeit von Cu(II).

Die Titration von  $\text{tpy}_2\text{DNA } \mathbf{12}$  mit Cu(II) bei  $25^\circ\text{C}$  in HEPES-Puffer, pH7, zeigte im UV-Spektrum bis zu einem Cu/**12**-Verhältnis von 1:1 die Entstehung einer Doppelbande bei 313 bzw. 322nm. Bei weiterer Zugabe von Cu(II) ließ sich eine Abnahme der Bande bei 313nm sowie eine Verschiebung der Maxima nach 320nm bzw. 330nm beobachten, bis bei einem Metall/ $\text{tpy}_2\text{DNA}$  Verhältnis  $\geq 2$  eine Sättigung erreicht wurde. In Abbildung 5.15 ist links das UV-Spektrum der Titration von  $5\mu\text{M } \mathbf{12}$  mit 0-1 Äquivalent CuSO<sub>4</sub> im Bereich von 290-350nm abgebildet, rechts für 1-2,4 Äquivalente Cu(II).

Unter den Bedingungen denaturierender Polyacrylamid-Gel-shift Analyse (PAGE) war der (**12**)Cu 1:1 Komplex nicht stabil, man erhielt wie im Fall des Zn(II)-Komplexes eine

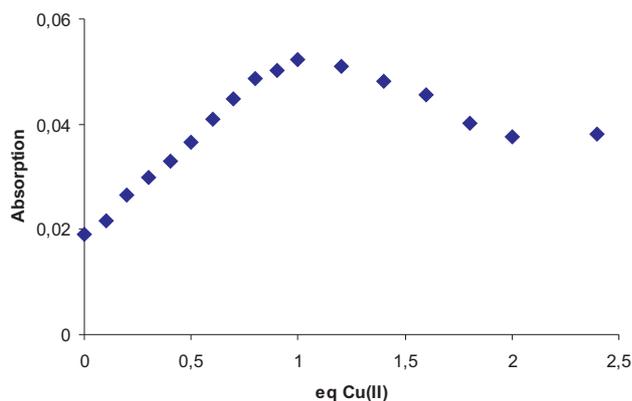


Abbildung 5.14: Titrationsverlauf von tpy<sub>2</sub>DNA **12** mit CuSO<sub>4</sub> bei 313nm; 5 μM **12**, 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl

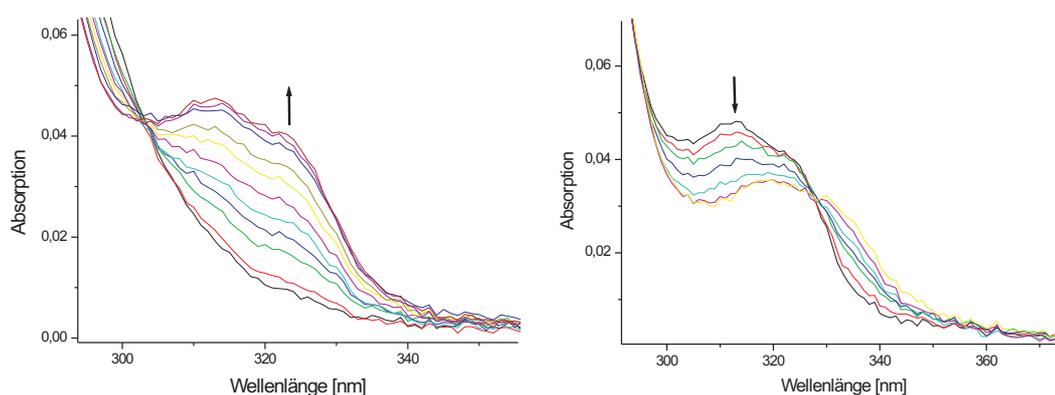


Abbildung 5.15: Absorptionsänderung im Bereich von 290-350nm bei Titration von 5 μM tpy<sub>2</sub>DNA **12** mit CuSO<sub>4</sub>, 10mM HEPES pH7, 150mM NaCl. Links: 0-1 Äquivalent Cu(II); rechts: 1-2,4 Äquivalente Cu(II)

Bande der gleichen Mobilität wie die von **12** ohne Metall (s. Abbildung 5.6, Bahn 5 und Bahn 6).

#### HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE

Um einen Hinweis zu erhalten, ob **12** mit Cu(II) ebenso cyclische Komplexe bildet wie mit Fe(II), Ni(II) und Zn(II), wurden Hybridisierungsexperimente mit dem komplemen-

tären MB **17** durchgeführt (vgl. 5.2.1). Titration der Duplex **12:17** mit  $\text{CuSO}_4$  führte zu einer stufenweise Abnahme der Fluoreszenz, die bei einem Äquivalent ein Minimum erreichte. Zugabe eines weiteren Äquivalentes  $\text{Cu(II)}$  hatte nur eine leichte Regenerierung des Fluoreszenzintensität (Faktor 2) zur Folge (Abbildung 5.16). Eine mögliche Erklärung dafür ist die  $\text{Cu(II)}$  bedingte Löschung des Fluorophors, da bei der Wiederöffnung von (**12**)Cu an beiden terpy-Liganden Kupferionen gebunden sind, wodurch es zu einer Wechselwirkung zwischen dem Mono(terpy)Cu(II)-Komplex am 3'-Ende von **12** und dem Tetramethylrhodamin-Farbstoff am 5'-Ende von **17** kommt. Da die Zugabe von  $\text{Cu(II)}$  zur Duplex von tpyDNA und 5'-Tamra,3'-Dabcyl-MB **16:17** im Gegensatz zu den Metallionen  $\text{Fe(II)}$ ,  $\text{Zn(II)}$  und  $\text{Ni(II)}$  auch eine starke Fluoreszenzlöschung zur Folge hatte, handelt es sich um einen Kupfer-spezifischen Effekt.

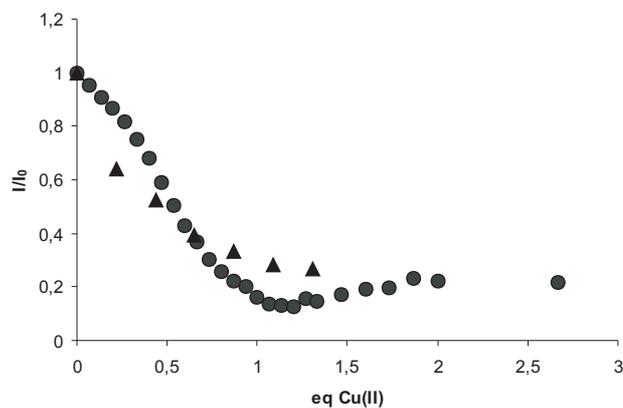


Abbildung 5.16: Titration der Duplices **12:17** (Kreise) und **16:17** (Dreiecke) mit  $\text{Cu(II)}$ ; 10mM HEPES pH 7, 150mM NaCl, 20mM  $\text{MgCl}_2$ , RT

## 5.4 FREISETZUNG VON CU(II) DURCH BINDUNG KOMPLEMENTÄRER NUCLEINSÄUREN

Die  $\text{tpy}_2\text{DNA}$  **12** ist ein allosterischer Rezeptor mit räumlich separierten Untereinheiten für die Bindung einer komplementären Nucleinsäure und eines Metallions. Die Wirkung von Metallionen als negative allosterische Rezeptoren, die die Wechselwirkung des Rezeptors  $\text{tpy}_2\text{DNA}$  mit dem "Substrat" komplementäre DNA schwächen, wurde in den voranstehenden Kapiteln gezeigt. Umgekehrt sollte aber bei negativer Allosterie auch der Metallkomplex durch Wechselwirkung mit komplementärer DNA geschwächt werden. Welcher Komponente die Rolle des Substrats und welcher die Rolle des Effektors zukommt, hängt allein vom Betrachtungswinkel ab.

Die Koordination von Cu(II) an DNA **12** und die Charakterisierung des (**12**)Cu-Adduktes wurde wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben, untersucht. **12** bildet mit der äquimolaren Menge  $\text{CuSO}_4$  einen Komplex, aus dem selbst ein fünffacher Überschuss 1,10-Phenanthrolin trotz dessen hoher Affinität zu Cu(II) ( $\log K=9.2$ )[41] das Metallion nicht freisetzen konnte. Wie in Abbildung 5.17, links, dargestellt, ließ sich im UV-Spektrum nach der Zugabe von phen keine Abnahme der Absorptionsintensität bei 320nm ( $\text{tpy-Cu}$ -Wechselwirkung) beobachten. Bei Zugabe der komplementären  $\text{DNA}_{11}$  zu dieser Lösung war dagegen eine spontane Abnahme der Intensität zu sehen. Die Ausbildung einer starren **12**: $\text{DNA}_{11}$  Doppelhelix destabilisierte offensichtlich die intramolekulare **12**-Cu Wechselwirkung. Zur Verdeutlichung der Abnahme der Absorptionsintensität bei 320nm durch die Freisetzung des Cu(II) aus **12** mit komplementärer  $\text{DNA}_{11}$ , wurden in Abbildung 5.17, rechts, drei UV-Spektren überlagert. Cal1 ist das Ergebnis der Addition der Spektren von  $5\mu\text{M}$  **12**/Cu(II)= 1:0,7,  $25\mu\text{M}$  phen und  $5\mu\text{M}$   $\text{DNA}_{11}$ . Für Cal2 wurden die Spektren von  $5\mu\text{M}$  **12**: $\text{DNA}_{11}$  und einer Mischung von phen/Cu(II) =  $25\mu\text{M}/3.5\mu\text{M}$  addiert. Der dritte Graph gibt den experimentell bestimmten Kurvenverlauf einer Lösung aus  $5\mu\text{M}$  **12**,  $3.5\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ,  $25\mu\text{M}$  Phenanthrolin und  $5\mu\text{M}$   $\text{DNA}_{11}$  in 10mM HEPES-Puffer pH 7 wieder. Es ist deutlich zu erkennen, dass die experimentell bestimmten Werte näher an dem hypothetischen Fall Cal2 liegen, in dem in einer **12**/Cu/phen/ $\text{DNA}_{11}$ -Mischung alles Cu(II) an phen gebunden vorliegt, als an dem hypothetischen Fall Cal1, bei dem Cu(II) ganz an **12** gebunden vorliegt. Das zeigt, dass PhenanthrolineCu(II) aus (**12**)Cu nur in Gegenwart der komplementären DNA  $\text{DNA}_9$  binden kann.

Diese Untersuchungen bildeten die Grundlage für die Entwicklung einer "artificialen Signalkaskade" für den sequenzspezifischen Nucleinsäurenachweis (siehe Kapitel 5.5).

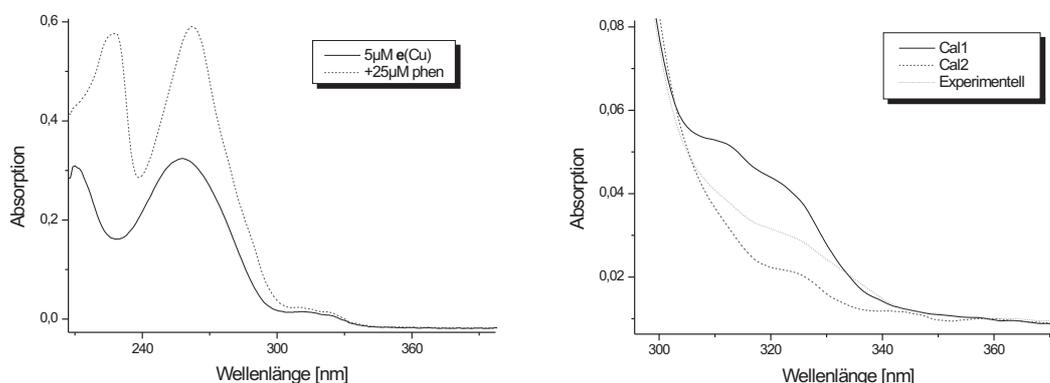


Abbildung 5.17: Links: UV Spektrum von **(12)**Cu mit phen;  $5\mu\text{M}$  **(12)**Cu,  $25\mu\text{M}$  phen,  $10\text{mM}$  HEPES,  $150\text{mM}$  NaCl. Rechts: Ausschnitt aus einem UV-Spektrum von  $300\text{-}360\text{nm}$ ; Cal1: Addition der Einzelspektren von  $5\mu\text{M}$  **12**/Cu(II)=  $1:0,7$ ,  $25\mu\text{M}$  phen und  $5\mu\text{M}$  **DNA**<sub>9</sub>; Cal2: Addition der Einzelspektren von  $5\mu\text{M}$  **12**:**DNA**<sub>9</sub> und phen/Cu(II) =  $25\mu\text{M}/3,5\mu\text{M}$ ; Experimentell:  $5\mu\text{M}$  **12**,  $3,5\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>,  $25\mu\text{M}$  phen,  $5\mu\text{M}$  **DNA**<sub>9</sub>,  $10\text{mM}$  HEPES-Puffer pH 7,  $150\text{mM}$  NaCl

## 5.5 AUF DEM WEG ZU ARTIFIZIELLEN SIGNALKASKADEN

Im voranstehenden Kapitel wurde zum ersten Mal die Freisetzung eines Metallions aus einem DNA-Konjugat bei Hybridisierung mit komplementärer Nucleinsäure beschrieben. Betrachtet man die Nucleinsäure als chemisches Primärsignal (Input) und das freigesetzte Metallion als sekundäres Signal (Output), so hat **tpy**<sub>2</sub>**DNA 12** die Rolle eines Signalwandlers. Kombiniert man diese Signalwandlung mit einer Signalverstärkung, so erhält man ein modulares, chemisches System, das an biologische Signalkaskaden erinnert. Beispielsweise führt - vereinfacht dargestellt - die Bindung des Hormons Adrenalin als "chemisches Primärsignal" an einen Membranrezeptor zur Freisetzung des G-Proteins (allosterische Signalwandlung), welches wiederum das Enzym Adenylat-Cyclase "einschaltet" und so die katalytische Produktion von cAMP aus ATP stimuliert (katalytische Signalverstärkung).

Ein zum chemischen Signalwandler **tpy**<sub>2</sub>**DNA 12** "passendes", signalverstärkendes Modul wurde von Frau Nora Graf in unserem Arbeitskreis entwickelt. Durch Kom-

bination beider Komponenten konnte ein sequenzspezifisches Detektionsverfahren für Nucleinsäuren mit Signalamplifikation aufgebaut werden (Abbildung 5.18), das in einem gemeinsamen Publikationsmanuskript beschrieben ist.[2] Alle Untersuchungen, die die katalytische Signalverstärkung durch Phenanthrolin-Cu(II)-Komplexe betreffen, wurden von Frau Graf durchgeführt und sind daher hier nur kurz erläutert.

Zentral war dabei die Aktivierung des "Präkatalysators" 1,10-Phenanthrolin durch Komplexierung des "freigesetzten" Cu(II). Der aktive Katalysator setzt in Gegenwart von Luftsauerstoff ein nichtfluoreszierendes Substrat (2',7'-Dichlordihydrofluorescein) zum fluoreszierenden Produkt (2',7'-Dichlorfluorescein) um.

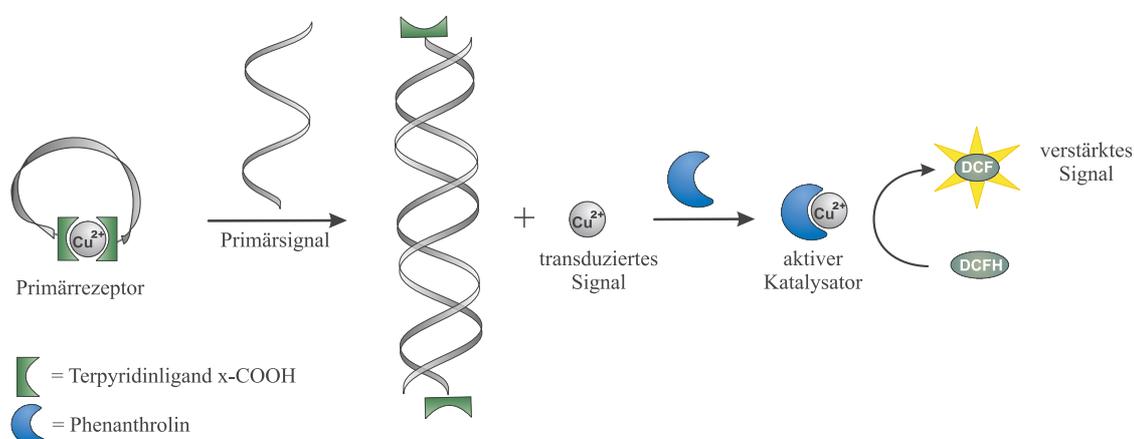


Abbildung 5.18: Schematische Darstellung einer "chemischen Signalkaskade", die eine allosterische Signalwandlung (DNA → Cu<sup>2+</sup>) kombiniert mit einer katalytischen Signalverstärkung [2]

Im Standard-Assay wurden 1 μM DNA **12**, 0,5 μM CuSO<sub>4</sub>, 5 μM phen, 10 μM Dihydrofluorescein, 2 μM target-DNA (DNA<sub>11</sub>) und 100 μM Cysteamin in 10 mM MOPS, pH 7, und 0,1 M NaCl eingesetzt. Die Empfindlichkeit des Verfahrens lag bei 5 nM DNA. Es konnten 20 Turnover, d.h. gebildete Farbstoffmoleküle pro Cu<sup>2+</sup>-Ion, nachgewiesen werden.

Die Katalysatoreinheit des Systems bestand aus 1,10-Phenanthrolin, dem nicht fluoreszierenden Substrat 2',7'-Dichlordihydrofluorescein, Disauerstoff aus der Luft und dem Cosubstrat Cysteamin. Während tpy als Ligand alleine keinen Einfluss auf die Reaktion hatte, katalysierte phen mit dem Redoxpaar Cu(I/II) als Cofaktor die O<sub>2</sub>-Oxidation des Precursormoleküls zum stark fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein. Die Reaktion ließ sich über die Zunahme der Fluoreszenz bei 523 nm in Abhängigkeit von der Zeit

verfolgen. Abbildung 5.19 zeigt die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensitäten nach 25min im Vergleich für die verschiedenen DNA-Oligonucleotide.

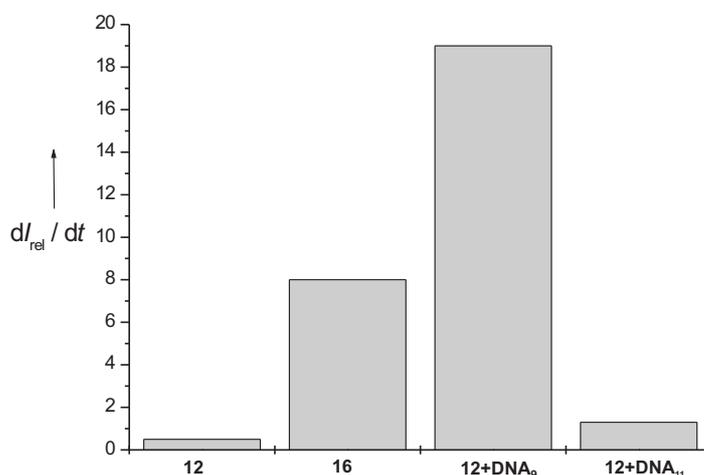


Abbildung 5.19: Vergleich der Zunahme des Fluoreszenzsignals von 2',7'-Dihydrofluorescein bei Zugabe von a)DNA **12**; b)DNA **16**; c)DNA **12** + **DNA<sub>9</sub>**; d) DNA **12** + **DNA<sub>11</sub>**. Die Abbildung wurde von Frau Nora Graf zur Verfügung gestellt

Mit DNA **12** ohne komplementäre DNA **DNA<sub>11</sub>** betrug die Fluoreszenzintensität nur 3% der Fluoreszenzintensität von **12**+**DNA<sub>11</sub>**. Im Gegensatz dazu bewirkte der Monoterpyridin-DNA Kupferkomplex (**16**)Cu sofort einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz. Das lässt sich mit der "Extraktion" des Cu(II) aus dem tpy<sub>2</sub>DNA-Komplex durch Phenanthrolin erklären, und bestätigt die intramolekulare Stabilisierung in (**12**)Cu durch Bis-Chelatisierung. Das System wies eine starke Mismatch-Diskriminierung auf: **DNA<sub>12</sub>** mit einem C/T Mismatch löste eine Änderung der Fluoreszenzintensität aus, die mit 5% der Intensität im Fall von **12**+**DNA<sub>11</sub>** nur etwas über der Hintergrundreaktion lag.

Die Sensitivität des Systems ist durch die Hintergrundoxidation von 2',7'-Dichloridihydrofluorescein begrenzt, weshalb das Detektionslimit mit 5nm DNA höher ist als das bekannter Systeme.[42, 43, 44] Die Stärke des hier beschriebenen Assays ist jedoch die Möglichkeit, Erstrezeptor und Katalysator unabhängig voneinander optimieren zu können.

## 5.6 MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION VON (12)CU IN WÄSSRIGER LÖSUNG

Die in 5.2 beschriebene Metall-induzierte Cyclisierung von DNA ist der erste Fall eines DNA-Einzelstrang-Rings, der über nicht-kovalente Bindungskräfte zusammengehalten wird. Um eine Vorstellung von der Struktur eines solchen Metall-verknüpften DNA-Rings zu erhalten, wurde von (12)Cu eine Molecular Dynamics Simulation in wässriger Lösung durchgeführt.

### 5.6.1 METHODIK

Die Modellierung wurde mit MacroModel 8.5 (Schrödinger) durchgeführt, als Kraftfeld wurde die MacroModel interne Version von AMBER5.0[45], AMBER94, verwendet. AMBER5.0 ist eines der aktuell am häufigsten eingesetzten Kraftfelder zur Modellierung von DNA-Eigenschaften.[46]

Als Startstruktur wurde die per Templatfunktion von MacroModel verfügbare Struktur von B-DNA verwendet. Da AMBER keinen Parametersatz für Übergangsmetallkomplexe enthält, wurde die Struktur einer Kristallstrukturanalyse des  $[\text{Cu}(\text{tpy})_2]^{2+}$ -Komplexes aus der Cambridge Structural Database importiert und in die Struktur integriert. Für die Kraftfeldrechnungen wurde das Metallion aus dem Komplex entfernt, und die beiden Terpyridineinheiten mit hohen Kraftkonstanten auf den Bindungslängen und -winkeln fixiert.

$\text{Na}^+$ -Ionen wurden zum Ladungsausgleich jeweils in der Nähe der Phosphatgruppen positioniert und über Kraftkonstanten im Abstand von ca.  $2,3\text{\AA}$  festgehalten.

Für die Kraftfeldrechnungen wurde die von MacroModel angebotene  $\text{H}_2\text{O}$ -Solvatisierung gewählt. Im Gegensatz zum *explicit solvent* Modell werden dabei nicht explizite Lösungsmittelmoleküle um die Struktur herum angeordnet, sondern eine analytische Funktion zur Beschreibung eines kontinuierlichen Solvens eingesetzt. Dadurch werden Wechselwirkungen zwischen gelöstem Stoff und Solvens berücksichtigt, gleichzeitig aber die Rechenzeit deutlich verkürzt. Verwendet wurde die am häufigsten eingesetzte GB/SA (Generalized-Born/Solvent Accessible surface)-Methode.[47]

### 5.6.2 MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION

Zwei unabhängige Molecular Dynamics Simulationen wurden über Trajektorien von je 2ns ausgeführt. Im Verlauf der Simulationen war eine relativ starke Bewegung in der Struktur zu beobachten, die mit Aufhebungen und Neuordnungen der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen einherging. Diese Beobachtung entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verhalten von DNA-Einzelsträngen in Lösung: Sowohl experimentelle Studien als auch MD Simulationen deuten darauf hin, dass Einzelstrang DNA in wässriger Lösung keine signifikant geordnete Struktur annimmt.[48] Dieses Verhalten erklärt die Vielzahl energetisch ähnlicher, aber konformativ deutlich unterschiedlicher Strukturen, die während des MD Simulationsverlaufs erhalten wurden.

Die beiden MD Trajektorien wurden bei 300K über einen Zeitraum von 2ns aufgenommen, wobei alle 400 Schritte eine Struktur gespeichert wurde. Zu Beginn der Simulation wurde 2ps lang eine Gleichgewichtseinstellung durchgeführt. Als Zeitschritt wurde 2fs gewählt, da alle Bindungen mit *SHAKE* fixiert waren. Aus beiden Simulationen wurden jeweils die 20 energetisch günstigsten Strukturen ausgewählt, Energie minimiert und mit Hilfe einer Cluster-Analyse über "rigid body superposition" miteinander verglichen. Aus dem Cluster mit der größten Anzahl ähnlicher Strukturen wurde eine repräsentative Konformation ausgewählt, die in Abbildung 5.20 dargestellt ist.

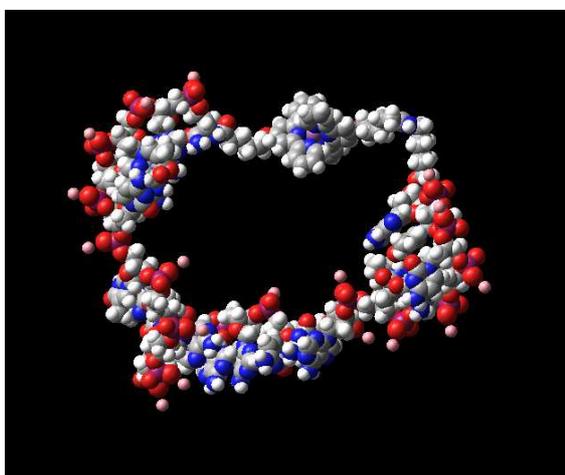


Abbildung 5.20: Über MD-Simulation ermittelte, energetische günstige Konformation von (12)Cu



# KAPITEL 6

## ZUSAMMENFASSUNG

Schnelle und zuverlässige Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren spielen in Medizin und Biowissenschaften eine elementare Rolle. Ziel dieser Arbeit war die Synthese modifizierter Peptidnucleinsäuren und Metallkomplex-funktionalisierter Oligonucleotide und deren Anwendung für die sequenzspezifische Nucleinsäuredetektion.

Über die Kopplung zwei verschiedener Linkermoleküle an Peptidnucleinsäure und die jeweils anschließende Veresterung mit einer Aminosäure konnten zum ersten Mal PNAs mit einer in das Polyamidrückgrat integrierten Esterbindung synthetisiert werden (Abbildung 6.1).

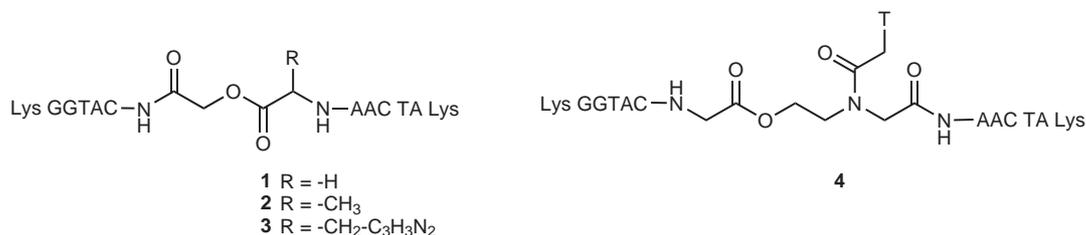


Abbildung 6.1: Struktur der PNAester **4-7**

Die Untersuchung der Reaktivität der PNAester erfolgte über MALDI-TOF MS und HPLC. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Hybridisierung mit komplementärer DNA die Spaltung des Esters im Vergleich zu mismatch-DNA bzw. dem DNA freien System um ca. 50% gehemmt wurde.

Die Metall-gelöschten Molecular Beacons **9** und **10** mit dem modifizierten Terpyridin **8** als Chelatligand konnten synthetisiert und erfolgreich für die DNA-Sequenzerkennung eingesetzt werden. Der Vorteil von Terpyridin gegenüber den bisher beschriebenen Pyridylpyrazolyl- bzw. Bipyridylliganden liegt in der höheren Metallionenaffinität von tpy,

bereits ein Äquivalent ( $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ ) Cu(II) bewirkte eine beinahe maximale Fluoreszenzlöschung. Es war daher eine 10-100fach geringere Cu(II)-Konzentration zum Löschen der Fluoreszenz erforderlich, was einen großen Vorteil in Hinblick auf Anwendungen in lebenden Zellen darstellt. Mit komplementärer DNA konnte eine fünffache Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. In Abbildung 6.2 ist die Funktionsweise eines Metall-gelöschten MB schematisch dargestellt.

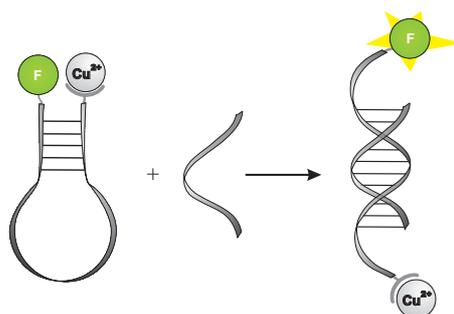


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines "anorganischen" Molecular Beacon

Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch eine Zn(II)-vermittelte Fluoreszenzlöschung der "anorganischen" MBs möglich ist. Mit zwei Äquivalenten Zn(II) konnte die Fluoreszenz einer  $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$  Lösung der tpy-modifizierten MBs **9** und **10** effizient gelöscht werden. Mit 16% Restfluoreszenz lag die Effektivität im Bereich der Cu(II)-vermittelten Löschung. Ein noch deutlich besseres Signal/Rausch-Verhältnis kann mit Terpyridin-modifizierten PNA-Beacons erreicht werden (Kooperation mit Herrn A. Füßl, AK Krämer). Die Restfluoreszenz lag hier mit Cu(II) und Zn(II) bei 1-2%, mit komplementärer DNA wird eine 40-90fache Fluoreszenzzunahme beobachtet.

Die Integration künstlicher allosterischer Bindungsstellen on Nucleinsäuren eröffnet die Möglichkeit, die Funktion dieser Makromoleküle durch chemische oder biologische Effektoren gezielt zu beeinflussen. 3',5'-Bis(terpyridin)-modifizierte DNA kann als allosterischer Rezeptor mit zwei voneinander getrennten Untereinheiten für die Bindung einer komplementären Nucleinsäure und eines Metallions verstanden werden. Die tpy<sub>2</sub>DNAs **12** und **13** wurden an der Festphase synthetisiert und das Komplexierungsverhalten mit den Metallionen Fe(II), Ni(II), Zn(II) und Cu(II) untersucht.

Mit Fe(II) und Ni(II) konnte über UV-Vis-, Fluoreszenz-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Gelelektrophorese zum ersten Mal die Bildung von Einzelstrang-DNA Rin-

gen über nicht-kovalente Bindungsbildung (*self-assembly*) nachgewiesen werden.

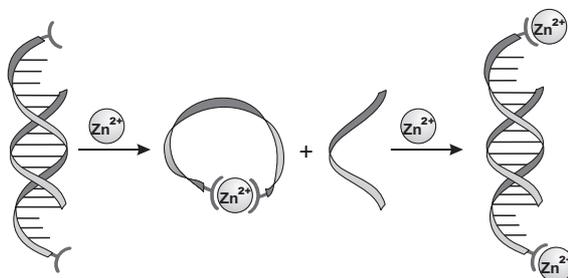


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der Kontrolle der Hybridisierung von **12** mit Zn(II) als negativem und positivem allosterischen Effektor

Während die Cyclisierung mit Ni(II) und Fe(II) irreversibel verlief, koordinierten Zn(II) und Cu(II) reversibel an  $tpy_2$ DNA und konnten als allosterische Effektoren die Hybridisierungseigenschaften von DNA beeinflussen. Zn(II) wirkte dabei als negativer und positiver allosterischer Effektor, der die Hybridisierung von **12** mit komplementärer DNA innerhalb eines engen Konzentrationsbereichs ( $\sim 1$  eq. Zn(II)) abschalten konnte (Abbildung 6.3).

Die allosterisch regulierte Freisetzung von Cu(II) aus (**12**)Cu bei der Hybridisierung mit komplementärer DNA in Anwesenheit des effizienten Cu(II)-Chelators 1,10-Phenanthrolin (phen) konnte über UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden. Durch Kombination mit einem von Frau Nora Graf (AK Krämer) entwickelten signalverstärkenden Fluoreszenz-Assay konnte ein sequenzspezifisches Detektionsverfahren für Nucleinsäuren aufgebaut werden. Dabei wirkte das "freigesetzte" Cu(II)-Ion als katalytischer Kofaktor, und der aktive Redoxkatalysator erzeugte den Farbstoff Fluorescein aus einem nicht-fluoreszierenden Precursor. Die Reaktionssequenz verbindet eine allosterische Signalwandlung (Nucleinsäure  $\rightarrow$  Metallion) mit einer katalytischen Signalverstärkung und erinnert an biologische Signalkaskaden, die molekulare Signal (z.B. Hormone) schnell und effizient amplifizieren und in biochemische Antworten umsetzen. Die Nachweisgrenze lag bei 5nM DNA.



# KAPITEL 7

## EXPERIMENTELLER TEIL

Im experimentellen Teil sind die verwendeten Geräte und Chemikalien, Synthesevorschriften und Analytik sowohl der organischen Liganden- und Linkermoleküle, als auch der Oligonucleotide beschrieben. Ferner sind Anleitungen zur Durchführung der experimentellen Untersuchungsmethoden angegeben.

---

### 7.1 VERWENDETE GERÄTE UND CHEMIKALIEN

Die für die Synthesen und Experimente verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Sigma/Aldrich/Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Advanced Chemtech (Louisville, KY), Novabiochem (Laufelfingen, Schweiz), Invitrogen/Molecular Probes (Leiden, Niederlande) und Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Reagenzien für die PNA- und DNA-Synthesen wurden von Prologo Biochemie (Hamburg, Deutschland) bzw. Applied Biosystems (Warrington, UK) erhalten und die jeweiligen Biokonjugate mit einem Expedite<sup>TM</sup> 8909 System der Firma Applied Biosystems synthetisiert. Die verwendeten DNA-Oligonucleotide wurden von Metabion bezogen und waren HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Für alle Versuche wurde Wasser von HPLC-Qualität verwendet. Die Festphasen-Synthesen wurden, soweit nicht anders angegeben, unter Argon-Schutzatmosphäre durchgeführt. Von den Metallsalzen ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub>, von den Pufferlösungen, den Oligonucleotidproben sowie von den Liganden Terpyridin, Phenanthrolin und EDTA wurden Stammlösungen angesetzt und verwendet.

Die MALDI-TOF MS Untersuchungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg an einem Bruker BIFLEX III Spektrometer durchgeführt, wobei für die Messungen von DNA der negative, und für die Messungen von PNA der positive Messmodus verwendet wurde. Soweit nicht anders angegeben, wurde als

Matrix für DNA Messungen eine 1:1 Mischung von gesättigter Azathiathymidinlösung (ATT) in Ethanol und einer 0,1M Diammoniumcitratlösung in Wasser, für PNA eine Lösung von 27mM Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH = 1:1:1 mit 0,1% TFA verwendet. 1  $\mu$ l der zu untersuchenden Probe wurde auf einen MALDI-Stahlträger gegeben und mit Matrix vermischt. Die Proben wurden im Ölpumpenvakuum getrocknet und sofort untersucht, sonst unter Argon-Atmosphäre bis zur Messung aufbewahrt. Für wässrige DNA-Proben wurden Probe und Matrix im Verhältnis 1:1, für H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN-haltige Proben im Verhältnis 1:2,5 verwendet. Für wässrige oder H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN-haltige PNA-Proben wurden Probe und Matrix im Verhältnis 1:1, für TFA/m-Cresol-Lösungen im Verhältnis 1:20 verwendet. Die Genauigkeit der MALDI-TOF Massenspektrometrie mit externer Kalibrierung betrug  $\pm 0,1\%$  der Molekülmasse.

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

ESI-MS Untersuchungen wurden im Anorganisch-Chemischen Institut an einem Waters Micromass Q-TOF Ultima Spektrometer durchgeführt. Die DNA-Proben wurden im negativen Modus gemessen. Der Injektionsmodus war nanoESI, dafür wurden Goldbeschichtete ESI-Kapillaren (ID 2  $\mu$ ) der Firma MaasCom (Deutschland) verwendet.

Die HPLC-Messungen wurden bei 22°C und 49°C an einem Shimadzu Flüssigkeits-Chromatographen durchgeführt, der mit einem UV-Vis-Detektor und einem Säulen-Ofen ausgerüstet war. Als Trennsäule wurde eine EC 250 x 4.6mm Nucleosil 300-5 C4-Säule der Firma Machery-Nagel eingesetzt. Zur Reinigung der Biokonjugate wurde eine 500  $\mu$ l Injektionsschleife verwendet, für analytische Untersuchungen eine 20  $\mu$ l Injektionsschleife. Für die HPLC wurden alle Lösungsmittel in HPLC-Qualität eingesetzt. Das Injektionsvolumen für analytische Trennung betrug 10  $\mu$ l, für präparative 300  $\mu$ l. Für die DNA Trennung wurde ein Gradient von CH<sub>3</sub>CN (Lösungsmittel B) und 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser (Lösungsmittel A) verwendet: 1 min bei 0% B; in 20 min von 0%-30% B; in 6 min von 30%-90% B; 10 min bei 90% B. Für die PNA Trennung wurde ein Gradient von CH<sub>3</sub>CN + 0,1% TFA (Lösungsmittel B) und 0,1% TFA-Lösung in Wasser (Lösungsmittel A) verwendet: 5 min bei 0% B; in 30 min von 0%-35% B; in 10 min von 35%-90% B; 10 min bei 90% B.

Die UV/Vis-Experimente wurden auf einem Varian Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer durchgeführt. Für die Absorptionsmessungen (T=25°C) wurden Quarzküvetten (V=1ml bzw. 45  $\mu$ l) der Firma Hellma, und für die Schmelzpunktexperimente (T=20°-

80°C) schwarzwandige Quarz-Halbmikroküvetten ( $V = 0,9\text{ml}$ ,  $l = 1\text{cm}$ ) der Firma Varian benutzt.

Die Fluoreszenz-Messungen wurden mit einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer in Ultra-Mikro-Küvetten ( $V = 45\mu\text{l}$ ) der Firma Hellma aufgenommen.

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

Die Polyacrylamid-Gel-shift Analysen wurden mit Hilfe von Herrn Dirk Bebenroth im Arbeitskreis Prof. Jäschke, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg, angefertigt.

Als Reaktionsgefäße wurden low-retention Reaktionsgefäße der Firma Kisker (Steinfurt) bzw. Eppendorf verwendet. Reaktionslösungen wurden mit einem Reax Control der Firma Heidolph gemischt und mit einem Thermomixer Comfort für 1,5ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf temperiert und durchmischt. Wässrige Oligonucleotidlösungen wurden bis zur Trockene an einem Gefriertrockner VaCo 5 der Firma Zirbus eingengt.

## 7.2 SYNTHESE DER DMT-GESCHÜTZTEN GLYKOLSÄURE 2

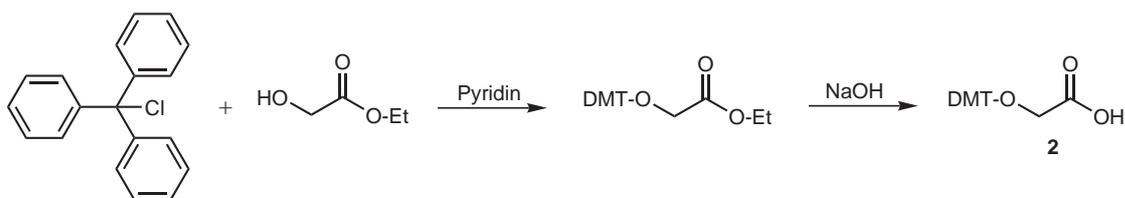


Abbildung 7.1: Synthese des DMT-geschützten Glykolsäure-Linkers 2

### 7.2.1 SYNTHESE VON DIMETHOXYTRIPHENYLMETHYL(DMT)-GLYKOLSÄUREETHYLESTER

#### SYNTHESEVORSCHRIFT:

1,0g (2,95mmol) Dimethoxytriphenylmethylchlorid werden unter Schutzgasatmosphäre

2h im ÖV getrocknet, anschließend in 30ml abs. THF gelöst und auf 0°C abgekühlt. 277mg (2,66mmol) Glykolsäureethylester werden in 30ml abs. Pyridin gelöst und langsam in die Lösung getropft. Nach 1h bei 0°C wird die Reaktionslösung 24h bei RT gerührt. Die Reaktion wird über Dünnschichtchromatographie (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE = 60:40, 1% NEt<sub>3</sub>, 0,5% EtOH) verfolgt: R<sub>f</sub>(Produkt) = 0,36; R<sub>f</sub>(DMT-Cl) = 0,18. Nach Zugabe von 5ml Methanol wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Toluol aufgenommen. Unlösliches Pyridiniumsalz wird abfiltriert und das Filtrat eingengt. Es wird dreimal mit Toluol coevaporiert und der Rückstand über Säulenchromatographie gereinigt (Silikagel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE = 60:40, 1% NEt<sub>3</sub>, 0,5% EtOH).

AUSBEUTE: 0,39g (0,96mmol, 36%).  
HABITUS: farbloses Öl.  
<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>-ACETON, 200 MHz): δ = 7,55-6,86 (m, 13H); 4,10 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 7,2Hz); 3,80 (s, 6H); 3,74 (s, 2H); 1,19 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 7,3Hz).

### 7.2.2 SYNTHESE VON DIMETHOXYTRIPHENYLMETHYL(DMT)-GLYKOLSÄURE **2**

#### SYNTHESEVORSCHRIFT:

0,39g (0,96mmol) DMT-Glykolsäureethylester werden in 10ml Methanol gelöst, mit 5ml H<sub>2</sub>O versetzt und auf 0°C abgekühlt. 10ml NaOH (1M) werden langsam zugetropft und anschließend 2,5h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Dowex<sup>®</sup>-Pyridiniumsalz neutralisiert. Der Ionentauscher wird abfiltriert, das Lösungsmittel evaporiert und noch dreimal mit MeOH coevaporiert. Das Produkt wird im ÖV getrocknet.

AUSBEUTE: 0,34g (0,9mmol, 99%).  
HABITUS: gelb-weißer Feststoff.  
MS (FAB+): m/z = 379,4 [M+H<sup>+</sup>].  
<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz): δ = 7,49-6,74 (m, 13H); 4,90 (s, 2H); 3,80 (s, 6H).

### 7.3 SYNTHESE VON

### *N*-ALLYLOXYCARBONYL-*N*-(2-(4,4'-DIMETHOXY-TRIPHENYLMETHOXY)-ETHYL)-GLYCIN

### **3**

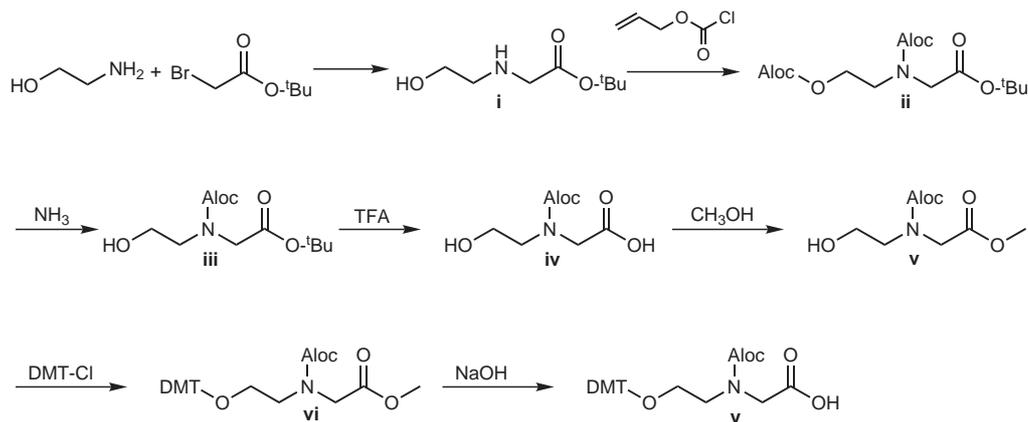


Abbildung 7.2: Synthese von *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-(4,4'-dimethoxytriphenylmethoxy)-ethyl)-glycin **3**

#### 7.3.1 SYNTHESE VON *N*-(2-HYDROXYETHYL)GLYCIN-*t*BUTYLESTER

#### **I**

##### SYNTHESEVORSCHRIFT:

Nach einer Literaturvorschrift[27] werden 52,52g (0,86mol) frisch destilliertes 2-Aminoethanol in 300ml abs. DMF gelöst und mit 29,7ml (0,17mol) DIEA versetzt. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt und 25,1ml (0,17mol) tert.-Butylbromacetat zugetropft. Nach 24h Rühren bei RT wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 150ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, die Lösung mit NaCl gesättigt und dreimal mit 100ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Trockenmittel wird abfiltriert, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt im ÖV getrocknet.

AUSBEUTE: 16,6g (0,094mol, 56%).

HABITUS: farbloses Öl.

MS (FAB+):	$m/z = 176,1 [M+H^+]$ .
$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):	$\delta = 3,4$ (t, 2H); 3,8 (m, H); 3,04 (s, H); 2,45 (t, 2H); 1,26 (s, 9H).
$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):	$\delta = 171,8$ ; 81,29; 60,94; 51,34; 28,55; 28,17; 28,07; 27,76.

### 7.3.2 SYNTHESE VON *N*-ALLYLOXYCARBONYL-*N*-(2-ALLYLOXY-CARBONYLOXYETHYL)GLYCIN-*t*BUTYLESTER

#### II

##### SYNTHESEVORSCHRIFT:

Nach einer Literaturvorschrift[28] werden unter Schutzgasatmosphäre 11,74g (67,0mmol) *N*-(2-Hydroxyethyl)glycin-*tert*-butylester **i** in 100ml abs. THF gelöst und mit 12,29ml (150,8 mmol) abs. Pyridin versetzt. Die Reaktionslösung wird auf 0°C abgekühlt und so langsam 16,08ml (150,8mmol) Allyloxycarbonylchlorid gelöst in 15ml abs. THF zutropft, dass die Temperatur der Lösung nicht über +5°C ansteigt. Nach 12h Rühren bei RT wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 100ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Das Produkt wird dreimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert, die vereinten organischen Phasen nacheinander mit je 100ml einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, 1M HCl, gesättigter NaCl-Lösung und deionisiertem H<sub>2</sub>O gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Trockenmittel wird abfiltriert, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt im ÖV getrocknet.

AUSBEUTE:	18,63g (54,2mmol, 81%).
HABITUS:	gelbes Öl.
MS (FAB+):	$m/z = 344,4 [M+H^+]$ .
$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):	2 Rotamere: $\delta = 5,91$ -5,77 (m, 4H); 5,31-5,15 (m, 8H); 4,51-4,48 (m, 8H); 4,21-4,19 (m, 4H); 3,85 (2s, 4H); 3,56-3,51 (m, 4H); 1,46 (2s, 18H).
$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):	2 Rotamere: $\delta = 168,7$ ; 156,2; 156,1; 155,1; 155,0; 154,9; 132,9; 132,8; 131,9; 131,8; 131,7; 119,3; 119,2; 119,1; 118,0; 117,6; 82,1; 82,0; 69,1; 68,9; 68,8; 68,7; 66,9; 66,8; 66,6; 66,5; 51,2; 51,0; 48,1; 47,3; 28,4; 28,3.

7.3.3 SYNTHESE VON *N*-ALLYLOXYCARBONYL-*N*-(2-HYDROXY-ETHYL)GLYCIN-*t*BUTYLESTER

## III

## SYNTHESEVORSCHRIFT:

10,4g (30mmol) *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-allyloxycarbonyloxyethyl)glycin-tert.-butylester **ii** werden unter kräftigem Rühren in 250ml 25% Ammoniaklösung suspendiert. Nach 24h Rühren bei RT wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wird im ÖV getrocknet.

AUSBEUTE:	6,8g (26mmol, 87%).
HABITUS:	hochviskoses, rot-gelbes Öl.
MS (FAB+):	m/z = 260,4 [M+H <sup>+</sup> ].
<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz):	2 Rotamere: δ = 6,06-5,74 (m, 2H); 5,45-5,20 (m, 4H); 4,89 (bs, 2H); 4,74-4,60 (sh, 4H); 4,18 (m, 2H); 3,94 (s, 2H); 3,89 (s, 2H); 3,71 (m, 2H); 3,57 (m, 2H); 3,50 (m, 2H); 1,46 (s, 9H); 1,44 (s, 9H).
<sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz):	2 Rotamere: δ = 168,8; 155,9; 154,9; 132,5; 117,9; 81,9; 66,5; 65,8; 63,4; 51,3; 50,6; 28,0.

## 7.3.4 SYNTHESE VON

*N*-ALLYLOXYCARBONYL-*N*-(2-HYDROXYETHYL)GLYCIN **IV**

## SYNTHESEVORSCHRIFT:

6,5g (25mmol) *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-hydroxyethyl)glycin-tert.-butylester **iii** werden in 60ml TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 95:5 gelöst und 16h bei RT gerührt. Die Reaktion wird über Dünnschichtchromatographie (SiO<sub>2</sub>, EE/Hexan = 6:4) verfolgt: R<sub>f</sub>(Edukt) = 0,51; R<sub>f</sub>(Produkt) = 0,15. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert. Das Produkt wird im ÖV getrocknet und direkt in der nächsten Synthese eingesetzt.

AUSBEUTE:	5,08g (25mmol, 99%).
HABITUS:	hochviskoses, farbloses Öl.
MS (FAB+):	m/z = 204,2 [M+H <sup>+</sup> ].

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 2 Rotamere:  $\delta$  = 10,84 (bs, 2H); 6,06-5,76 (m, 2H); 5,40-5,12 (m, 4H); 4,67-4,48 (m, 4H); 4,53 (m, 2H); 4,28 (m, 2H); 4,19 (s, 2H); 4,17 (s, 2H); 3,79 (m, 2H); 3,67 (m, 2H).

### 7.3.5 SYNTHESE VON *N*-ALLYLOXYCARBONYL-*N*-(2-HYDROXY-ETHYL)GLYCINMETHYLESTER

#### V

##### SYNTHESEVORSCHRIFT:

3g (16mmol) *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-hydroxyethyl)glycin werden in 250ml Methanol gelöst und auf 0°C abgekühlt. 1,3ml (17,7mmol) Thionylchlorid werden langsam zugegeben. Anschließend wird die Reaktionslösung 16h bei RT gerührt, die Reaktion über Dünnschichtchromatographie (SiO<sub>2</sub>, EE/Hexan = 6:4) verfolgt: R<sub>f</sub>(Edukt) = 0,15; R<sub>f</sub>(Produkt) = 0,33. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt über Säulenchromatographie gereinigt (Silikagel, EE/PE = 1:1).

AUSBEUTE: 2,71g (12mmol, 77%).

HABITUS: farbloses Öl.

MS (FAB+): m/z = 219,2 [M+H<sup>+</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 2 Rotamere:  $\delta$  = 6,08-5,74 (m, 2H); 5,41-5,14 (m, 4H); 4,75-4,54 (m, 4H); 4,27-4,15 (m, 4H); 4,09 (s, 2H); 4,05 (s, 2H); 3,77 (s, 2H); 3,74 (s, 2H); 3,67 (m, 2H); 3,54 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): 2 Rotamere:  $\delta$  = 172,5; 172,1; 156,4; 156,0; 132,4; 117,8; 117,4; 66,6; 66,4; 61,1; 60,9; 52,7; 52,6; 52,5; 52,2; 50,7; 50,5.

### 7.3.6 SYNTHESE VON *N*-ALLYLOXYCARBONYL-*N*-(2-(4,4'-DIMETHOXYTRIPHENYLMETHOXY)-ETHYL)GLYCINMETHYLESTER

#### VI

##### SYNTHESEVORSCHRIFT:

1,9g (5,7mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid werden unter Schutzgasatmosphä-

re in 45ml abs. Pyridin gelöst und auf 0°C abgekühlt. 1,08g (5,4mmol) *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-hydroxyethyl)glycinmethylester werden in 6ml abs. Pyridin gelöst und langsam zur Reaktionslösung zugetropft. Nach 16h Rühren bei RT wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und anschließend dreimal mit 50ml Toluol coevaporiert. Das Produkt wird über Säulenchromatographie gereinigt (Silikagel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE = 3:1, 1% NEt<sub>3</sub>).

AUSBEUTE:	0,86g (1,65mmol, 29%).
HABITUS:	gelbes Öl.
MS (FAB <sup>+</sup> ):	m/z = 520,6 [M+H <sup>+</sup> ].
<sup>1</sup> H-NMR (D <sub>6</sub> -ACETON, 200 MHz):	2 Rotamere: δ = 7,52-7,17 (sh, 18H); 6,90 (d, 8H); 6,06-5,78 (m, 2H); 5,26 (d, 2H); 5,16 (d, 2H); 4,55 (d, 4H); 4,19 (s, 2H); 4,14 (s, 2H); 3,8 (s, 12H); 3,77 (s, 2H); 3,67 (s, 6H); 3,55 (t, 4H); 3,34 (m, 2H); 3,27 (m, 2H).
<sup>13</sup> C-NMR (D <sub>6</sub> -ACETON, 50 MHz):	2 Rotamere: δ = 169,7; 158,6; 153,6; 145,4; 136,2; 133,0; 130,0; 129,2; 128,0; 127,9; 127,7; 127,4; 126,6; 116,4; 116,0; 113,0; 112,7; 86,2; 66,4; 65,9; 62,3; 61,8; 54,4; 54,0; 51,3; 49,4; 49,0; 48,5; 48,0.

### 7.3.7 SYNTHESE VON *N*-ALLYLOXYCARBONYL-*N*-(2-(4,4'-DIMETHOXYTRIPHENYLMETHOXY)-ETHYL)GLYCIN **3**

#### SYNTHESEVORSCHRIFT:

0,6g (1mmol) *N*-Allyloxycarbonyl-*N*-(2-(4,4'-dimethoxytriphenylmethoxy)-ethyl)glycinmethylester werden in 30ml Methanol gelöst und mit 15ml 5M NaOH versetzt. Nach 16h Rühren bei RT wird die Reaktionslösung mit Dowex<sup>®</sup>-Pyridiniumsalz neutralisiert. Der Ionentauscher wird abfiltriert, das Filtrat eingengt und das Produkt im ÖV getrocknet.

AUSBEUTE:	463mg (0,92mmol, 92%).
HABITUS:	gelbes Öl.
MS (FAB <sup>+</sup> ):	m/z = 506,6 [M+H <sup>+</sup> ].

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-ACETON}$ , 200 MHz): 2 Rotamere:  $\delta = 7,52\text{-}7,06$  (sh, 18H); 6,95-6,73 (m, 8H); 6,00-5,71 (m, 2H); 5,16 (d, 2H); 5,03 (d; 2H); 4,53 (d, 4H); 3,96-3,73 (m, 8H); 3,70-3,67 (m, 12H) 3,52 (m, 4H); 3,13 (bs, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-ACETON}$ , 50 MHz): 2 Rotamere:  $\delta = 158,6$ ; 153,6; 145,4; 136,3; 136,2; 133,6; 129,9; 129,2; 128,0; 127,9; 127,6; 127,4; 126,6; 113,3; 112,3; 86,2; 52,4; 46,7.

## 7.4 SYNTHESE VON (2,2':6',2''-TERPYRIDIN-4'-YLOXY)HEXANSÄURE **8**

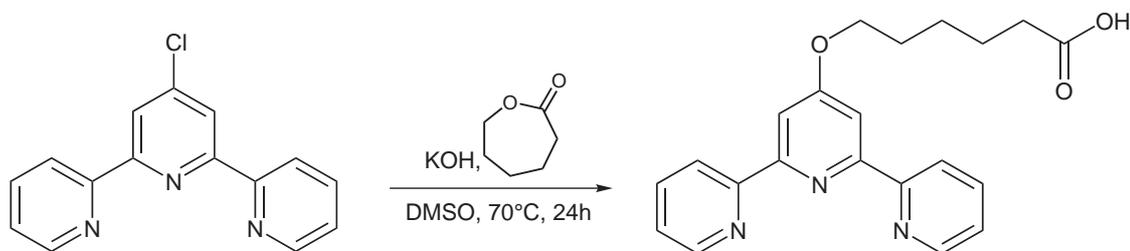


Abbildung 7.3: Synthese von (2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure **8**

### SYNTHESEVORSCHRIFT:

Nach einer Literaturvorschrift von Schubert et al.[34] werden in einem ausgeheizten Dreihalskolben unter Schutzgasatmosphäre 500mg (8,9mmol) getrocknetes und gemörstertes KOH in 50ml abs. DMSO suspendiert und auf 80°C erwärmt. Nach Zugabe von 207 $\mu\text{l}$  (1,9mmol)  $\epsilon$ -Caprolacton wird zuerst 30 min bei 80°C unter Rückfluss gerührt, nach der Zugabe von 500mg (1,9mmol) 4'-Chloro-2,2':6',2''-Terpyridin weitere 24h bei 70°C. Die abgekühlte Reaktionslösung wird in 100ml Wasser gegossen und die Lösung mit 1M HCl neutralisiert, bis sich ein weißer Niederschlag bildet. Der Niederschlag wird abfiltriert und zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Diethylether gewaschen.

AUSBEUTE: 180mg (0,5mmol, 66%).

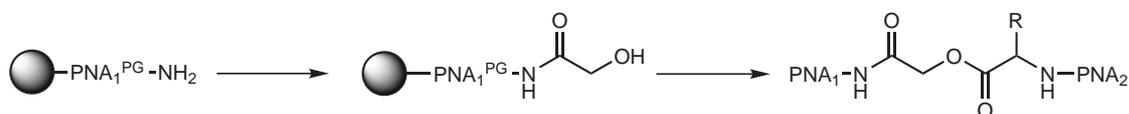
HABITUS: weißer, schuppiger Feststoff.

MS (ESI+):  $m/z = 364,2 [M+H^+]$ .  
 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO}$ , 200 MHz):  $\delta = 1,38\text{-}1,67$  (m, 4H); 1,78-1,90 (m, 2H); 2,26 (t, 2H,  $^3\text{J} = 6,8$  Hz); 4,27 (t, 2H,  $^3\text{J} = 2,4$  Hz); 7,55 (ddd,  $^3\text{J} = 6,0$  Hz,  $^3\text{J} = 4,8$  Hz,  $^4\text{J} = 1,2$  Hz;  $^3\text{J} = 6,8$  Hz); 8,03 (dt,  $^3\text{J} = 7,6$  Hz,  $^3\text{J} = 1,8$  Hz); 8,65 (d,  $^3\text{J} = 7,8$  Hz); 8,75 (dq,  $^3\text{J} = 1,8$  Hz,  $^4\text{J} = 0,9$  Hz).

## 7.5 SYNTHESE DER PNA-KONJUGATE

Die Synthese der PNA-Sequenzen erfolgte nach dem Fmoc-Standard-Protokoll für  $2\mu\text{M}$  PNA-Ansätze an der Festphase. Bei den Festphasensynthesen wurde, soweit nicht anders angegeben, die Festphase in einer Plastikspritze mit Frittenboden vorgelegt und die gelösten Reagenzien aufgezogen. Das Reinigen der Festphasen und das Abspalten vom polymeren Träger erfolgte ebenfalls in der Spritze.

### 7.5.1 SYNTHESE DER PNAESTER 4-6



$\text{PNA}_1$ : N'-AAC TA Lys-C'     $\text{PNA}_2$ : N'-Lys GGT AC-C'

4 R = -H

5 R = -CH<sub>3</sub>

6 R = -CH<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

Abbildung 7.4: Syntheschema der PNAester 4-6

#### ALLGEMEINE ARBEITSWEISE:

1. KOPPLUNG DES LINKERS **2** 3,4mg HOBT ( $25\mu\text{mol}$ ), 8,5mg HBTU ( $22,5\mu\text{mol}$ ) und 11,4mg ( $25\mu\text{mol}$ ) der DMT-geschützten Glykolsäure **2** werden in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß eingewogen und 30min im ÖV zusammen mit  $2\mu\text{mol}$  PNA der Sequenz N'-AAC TA Lys-C' getrocknet. Die Reagenzien werden unter Schutzgasatmosphäre in 1ml abs. DMF gelöst, mit  $9,6\mu\text{l}$  DIEA ( $55\mu\text{mol}$ ) versetzt und in die Filterspritze mit PNA aufgezogen.

Nach 1h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml DMF und 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN gewaschen und im ÖV getrocknet.

2. DMT-ENTSCHÜTZEN 1ml DNA *Deblock-Solution* (Proligo, Hamburg) (CCl<sub>3</sub>COOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wird zur modifizierten PNA in die Spritze aufgezogen und 2min bei RT geschüttelt, anschließend mit 3 x 1ml 1% N-Methylpyrrolidinon in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 3 x 1ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen und im ÖV getrocknet.

3. ESTERKOPPLUNG Nach einer modifizierten Literaturvorschrift[49] werden 100μmol Fmoc-geschützte Aminosäure (im Fall von His Imidazolring zusätzlich Trityl-geschützt) und 13,5mg (100μmol) HOBT in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß eingewogen, 1 Pellet DMAP in ein zweites Reaktionsgefäß gegeben und zusammen mit der modifizierten Festphase 30min im ÖV getrocknet. Aminosäure und HOBT werden in 0,3ml abs. DMF gelöst und in die Spritze aufgezogen. In einem weiteren 1,5ml-Reaktionsgefäß werden 15,6μl (100μmol) DIC in 0,3ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und in die Reaktionsspritze aufgenommen. Anschließend wird das DMAP in 0,3ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und ebenfalls in die Spritze aufgezogen. Nach 5h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml DMF und 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN gewaschen und im ÖV getrocknet.

4. CAPPING In die Spritze mit der veresterten PNA wird 2ml *Capping Solution* (Essigsäureanhydrid/2,6-Dimethylpyridin = 1:1) aufgezogen und 10min bei RT geschüttelt. Die Reaktionslösung wird verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml DMF und 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN gewaschen und anschließend im ÖV getrocknet.

5. PNA-SYNTHESE Die trockene, modifizierte Festphase wird in eine Kunststoffsäule mit zwei Frittenböden umgefüllt, und am PNA-Syntheseautomaten die PNA Synthese durchgeführt.

6. ABSPALTUNG UND ISOLISIERUNG Um die PNA von dem polymeren Trägermaterial abzuspalten, werden 200μl TFA/m-Cresol (4:1) in die Spritze mit der PNA aufgenommen und 1,5h bei RT geschüttelt. Die Lösung wird in ein Zentrifugenröhrchen gespült, mit Diethylether überschichtet und die PNA ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert, dreimal mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Für die HPLC-Reinigung wird der Rückstand in 250μl aufgenommen. Nach der Reinigung werden die Fraktionen, die mehr als

90% Produkt enthalten, vereinigt, am Lyophilisator getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 7.5.2 SYNTHESE VON PNAESTER 7

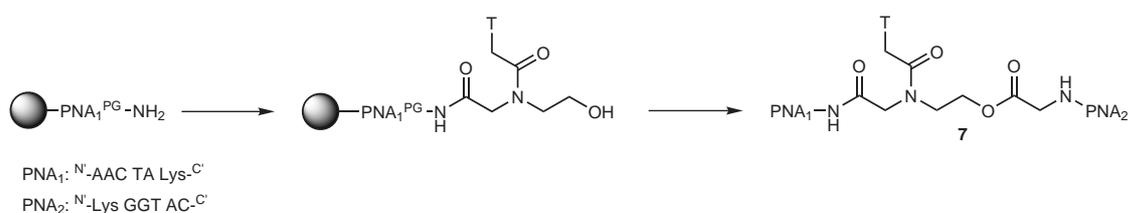


Abbildung 7.5: Syntheschema des PNAesters 7

1. KOPPLUNG DES LINKERS 3 Die Kopplung des Linkermoleküls 3 erfolgte wie in Abschnitt 7.5.1 beschrieben.

2. ABSPALTEN DER ALOC-GRUPPE In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß werden 0,8mg ( $6 \mu\text{mol}$ ) Diethylammoniumhydrogencarbonat ( $(\text{Et}_2\text{H}_2\text{N})\text{HCO}_3$ ), in ein weiteres, lichtgeschütztes 0,2mg ( $0,63 \mu\text{mol}$ )  $\text{PPh}_3$  und 0,8mg ( $0,69 \mu\text{mol}$ )  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$  eingewogen und zusammen mit der modifizierten Festphase 30min im ÖV getrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre werden  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ ,  $\text{PPh}_3$  und  $(\text{Et}_2\text{H}_2\text{N})\text{HCO}_3$  in 1ml abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst, in die Spritze aufgezogen und unter Lichtausschluss 24h bei RT geschüttelt. Die Reaktionslösung wird verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml 0,15% DIEA in DMF, 3 x 0,5% Ethylthiocarbamat in DMF und 3 x 1ml Acetonitril gewaschen und im ÖV getrocknet.

3. KOPPLUNG DER NUCLEOBASE 3,4mg HOBt ( $25 \mu\text{mol}$ ), 8,5mg HBTU ( $22,5 \mu\text{mol}$ ) und 4,6mg ( $25 \mu\text{mol}$ ) Thyminessigsäure werden in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß eingewogen und 30min im ÖV zusammen mit  $2 \mu\text{mol}$  PNA der Sequenz N'-AAC TA Lys-C' getrocknet. Die Reagenzien werden unter Schutzgasatmosphäre in 1ml abs. DMF gelöst, mit  $9,6 \mu\text{l}$  DIEA ( $55 \mu\text{mol}$ ) versetzt und in die Filterspritze mit PNA aufgezogen. Nach 1h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml DMF und 3 x 1ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  gewaschen und im ÖV getrocknet.

4.-8. VERESTERUNG, PNA-SYNTHESE, ABSPALTUNG UND ISOLIERUNG Das Abspalten der DMT-Gruppe, die Veresterung mit Fmoc-geschütztem Glycin, Capping, PNA-Synthese und Abspaltung und Isolierung erfolgt wie in Abschnitt 7.5.1 beschrieben.

### 7.5.3 CHARAKTERISIERUNG DER PNAESTER 4-7

Die Konzentration und Ausbeute der PNAs 4-7 wurde bestimmt, indem die Absorption der reinsten Fraktion bei 260nm in einem genau definierten Volumen Wasser gemessen wurde. Die Konzentration der Probe wurde nach Lambert-Beer mit

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (7.1)$$

unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet (A: Absorption,  $\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient, c: Konzentration, d: Schichtdicke Küvette). Zur Ermittlung der Ausbeute wurde über die bestimmte Konzentration die Stoffmenge errechnet und auf die eingesetzte Menge Festphase bezogen.

- 4** Ausbeute: 1,8%  
 HPLC:  $R_t = 24,3\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $C_{124}H_{164}N_{66}O_{33}$   $[M+H]^+$ : theor. 3105,3; gef. 3107,2.
- 5** Ausbeute: 2,2%  
 HPLC:  $R_t = 23,5\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $C_{125}H_{166}N_{66}O_{33}$   $[M+H]^+$ : theor. 3119,3; gef. 3120,7.
- 6** Ausbeute: 1,5%  
 HPLC:  $R_t = 25,6\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $C_{128}H_{168}N_{69}O_{33}$   $[M+H]^+$ : theor. 3199,4; gef. 3203,1.
- 7** Ausbeute: 2,0%  
 HPLC:  $R_t = 22,5\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $C_{133}H_{175}N_{69}O_{36}$   $[M+H]^+$ : theor. 3314,4; gef.3317,7.

## 7.6 UNTERSUCHUNG DER REAKTIVITÄT DER PNAESTER 4-7

### 7.6.1 QUANTIFIZIERUNG ÜBER MALDI-TOF MS

Als Vorversuch zur Quantifizierung der Reaktionsedukte und -produkte über MALDI-TOF MS werden  $1\mu\text{M}$  Glykolsäure-modifizierte PNA der Sequenz N'-AAC TA Lys-C' mit einem der PNAester 4-6 im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 und 1:8, sowie 10mM MOPS-Puffer pH 7 und 50mM NaCl gemischt. Die Intensitäten der Signale im Massenspektrum werden verglichen, es konnte eine lineare Abhängigkeit der Intensitäten voneinander für die PNAester beobachtet werden.

Zur Quantifizierung der PNAester-Spaltung werden die Signale im MALDI-TOF-Massenspektrum integriert und das des Eduktes gleich eins gesetzt. Die Signalintensitäten ( $I$ ) der Spaltfragmente werden über diesen Wert integriert. Nach Gleichung 7.2 kann der prozentuale Reaktionsumsatz berechnet werden:

$$I_{[\text{Produkt}]} / I_{[\text{Produkt} + \text{Edukt}]} \cdot 100 = \% \text{Umsatz} \quad (7.2)$$

Für die Experimente zur Untersuchung der Esterreaktivität werden im Fall der hydrolytischen Spaltung 10mM MOPS pH 8, je  $1\mu\text{M}$  der verwendeten Oligonucleotide, 2mM Cu(II) und 50mM NaCl, für die Ethylendiamin-vermittelte Spaltung 10mM MOPS pH 7, je  $1\mu\text{M}$  der verwendeten Oligonucleotide,  $100\mu\text{M}$  Ethylendiamin, 2mM Cu(II) und 50mM NaCl eingesetzt (Probenvolumen:  $5\mu\text{l}$ ). Es werden Proben zum Zeitpunkt 0min und 120min entnommen und über MALDI-TOF MS quantifiziert. Um Störungen der Bestimmung durch Cu(II) zu reduzieren, enthält die Sinapinsäure-Matrix noch zusätzlich 1mM Zitronensäure (vgl. 7.1).

### 7.6.2 QUANTIFIZIERUNG ÜBER HPLC

Für die Experimente zur Untersuchung der Esterreaktivität über HPLC werden 10mM MOPS pH 8, je  $1\mu\text{M}$  der verwendeten Oligonucleotide, und 50mM NaCl eingesetzt (Probenvolumen:  $50\mu\text{l}$ ). Zum Zeitpunkt 0min und 120min werden Proben entnommen und über HPLC quantifiziert. Das Injektionsvolumen beträgt  $10\mu\text{l}$ , der Laufmittelgradient wird wie für PNA in 7.1 angegeben, verwendet. Die Quantifizierung der PNAester-Hydrolyse erfolgt durch Integration der Peakflächen und Bestimmung der prozentualen Signalanteile in Bezug auf die PNA-Gesamtkonzentration.

## 7.7 SYNTHESE DER DNA-KONJUGATE

Die DNA-Konjugate **12-16** wurden an CPG-dA-Festphasen der Firma Proligo synthetisiert. Die Kopplungsreaktionen wurden in 3ml-Spritzen mit Filter durchgeführt, in die die Festphase vorgelegt und die Reaktionslösung durch Aufziehen zugefügt wurde. Reinigung und Abspaltung vom polymeren Träger wurde ebenso in der Filterspritze durchgeführt. Für die Molecular Beacon **9-11** wurden die 5'-MMT-Aminolink- und 3'-Fluorescein- bzw. -Tamra-modifizierten Oligonucleotide im 0,2  $\mu$ mol-Maßstab von der Firma Metabion in Planegg-Martinsried an einer CPG-Festphase bezogen.

### 7.7.1 MOLECULAR BEACON-DERIVATE **9-11**

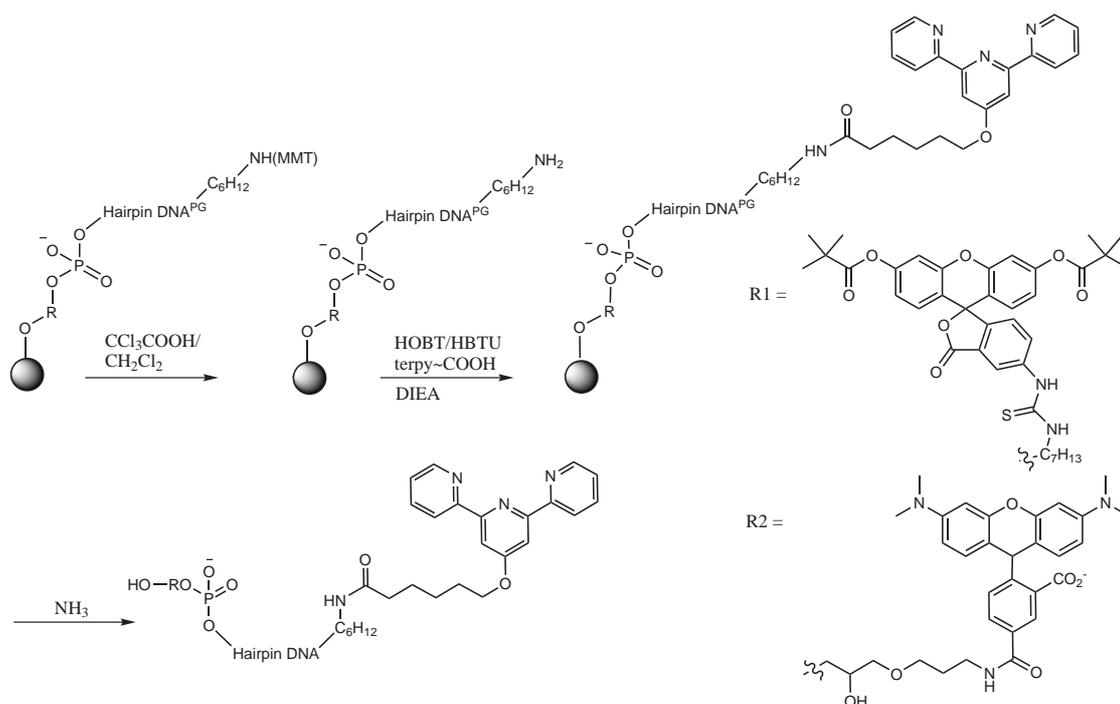


Abbildung 7.6: Syntheseschema der MB-DNA-Konjugate **9** und **10**

#### 7.7.1.1 DARSTELLUNG

##### ALLGEMEINE ARBEITSWEISE:

Zum Entschützen der Aminogruppe wird die Oligonucleotid-derivatisierte Festphase mit

1ml DNA *Deblock-Solution* (Firma Proligo:  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 10min bei  $25^\circ\text{C}$  geschüttelt. Die Reaktionslösung wird verworfen und die Festphase mit 3 x 1ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 5 x 1ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 3 x 1ml  $\text{Et}_2\text{O}$  gewaschen und im ÖV getrocknet.

Zur Kopplung des Terpyridinliganden werden 4,1mg HOBt ( $30\mu\text{mol}$ ), 9,5mg HBTU ( $25\mu\text{mol}$ ) und 10,9mg **8** ( $30\mu\text{mol}$ ) in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß eingewogen und 30min im ÖV getrocknet. Die Reagenzien werden in 0,5ml abs. DMF gelöst, mit  $19,8\mu\text{l}$  DIEA ( $110\mu\text{mol}$ ) versetzt und in die Filterspritze mit der modifizierten DNA aufgezogen. Nach 1h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml DMF und 3 x 1ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  gewaschen und im ÖV getrocknet.

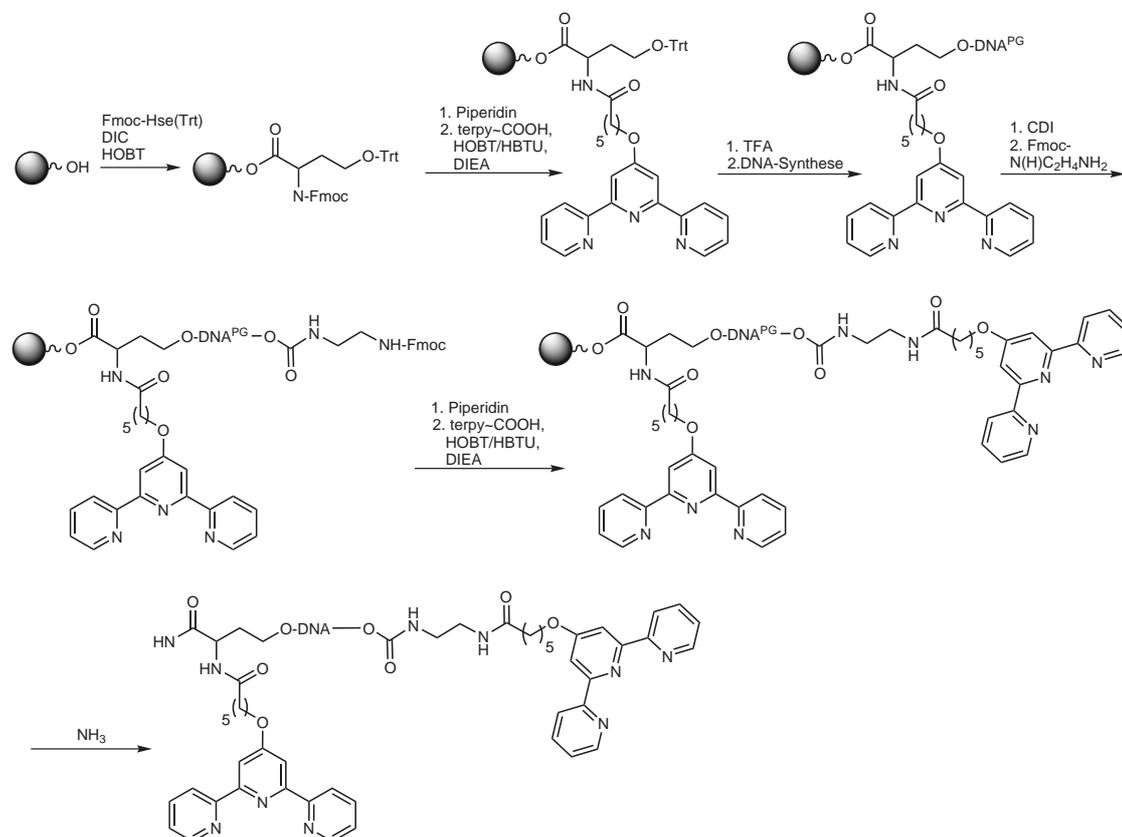
Um die DNA von dem polymeren Trägermaterial abzuspalten, werden  $200\text{--}300\mu\text{l}$  25% wässriger Ammoniumhydroxidlösung in die Spritze mit der DNA aufgenommen und 12h bei RT geschüttelt. Die Lösung wird in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß gespült, mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Nach HPLC-Reinigung werden die Fraktionen, die mehr als 90% Produkt enthalten, vereinigt, am Lyophilisator getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 7.7.1.2 CHARAKTERISIERUNG

Die Konzentrationen der DNAs **9** und **10** wurden wie in Abschnitt 7.5.3 bestimmt.

- 9** Ausbeute: 3,1%  
HPLC:  $R_t = 27,3\text{min}$   
MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{299}\text{H}_{366}\text{N}_{104}\text{O}_{160}\text{P}_{26}\text{S}_1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : theor. 8809,7; gef. 8815,5.
- 10** Ausbeute: 2,8%  
HPLC:  $R_t = 28,2\text{min}$   
MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{305}\text{H}_{376}\text{N}_{102}\text{O}_{157}\text{P}_{25}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : theor. 8752,8; gef. 87557,3.
- 11** Ausbeute: 8,7%  
HPLC:  $R_t = 23,6\text{min}$   
MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{278}\text{H}_{346}\text{N}_{101}\text{O}_{158}\text{P}_{26}\text{S}_1$   $[\text{M}-\text{H}^+]$ : theor. 8468,1; gef. 8462,7.

## 7.7.2 TERPYRIDIN-DERIVATISIERTE DNAs 12-16

Abbildung 7.7: Syntheschema der tpy<sub>2</sub>DNA-Kojugate 12 und 13

## 7.7.2.1 DARSTELLUNG

## ALLGEMEINE ARBEITSWEISE:

1. DMT-ENTSCHÜTZEN Für die 3'-Modifizierung wird eine CPG-dA(bz)-Festphase (1  $\mu\text{mol}$ , Firma Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) in eine 3ml-Filter-spritze gefüllt und zuerst mit 1ml DNA *Deblock-Solution* 2min bei RT geschüttelt, dann mit 3 x 1ml CH<sub>3</sub>OH, 5 x 1ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 3 x 1ml Et<sub>2</sub>O gewaschen und im ÖV getrocknet.

2. HOMOSERINLINKER KOPPLUNG Nach einer modifizierten Literaturvorschrift[49] werden 58,4mg (100  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Hse(Trt)-OH und 13,5mg (100  $\mu\text{mol}$ ) HOBT in ein

1,5ml-Reaktionsgefäß eingewogen, 1 Pellet DMAP in ein zweites Reaktionsgefäß gegeben und zusammen mit der dA-modifizierten Festphase 30min im ÖV getrocknet. Hse und HOBt werden in 0,3ml abs. DMF gelöst und in die Spritze aufgezogen. In einem weiteren 1,5ml-Reaktionsgefäß werden 15,6  $\mu$ l (100  $\mu$ mol) DIC in 0,3ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und in die Reaktionspritze aufgenommen. Anschließend wird das DMAP in 0,3ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und ebenfalls in die Spritze aufgezogen. Nach 5h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml DMF und 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN gewaschen und im ÖV getrocknet.

3. FMOC-ENTSCHÜTZEN Die Fmoc-geschützte Aminogruppe wird mit 1ml *PNA De-block-Solution* (Proligo, Hamburg: Piperidin in DMF) 15min bei RT entschützt, die Reaktionslösung verworfen und die Festphase mit 10 x 1ml DMF, 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN, 3 x 1ml H<sub>2</sub>O und 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN gewaschen und im ÖV getrocknet.

4. TERPYRIDIN KOPPLUNG 4,1mg HOBt (30  $\mu$ mol), 9,5mg HBTU (25  $\mu$ mol) und 10,9mg **8**(30  $\mu$ mol) werden in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß eingewogen und 30min im ÖV getrocknet. Die Reagenzien werden in 0,5ml abs. DMF gelöst, mit 19,8  $\mu$ l DIEA (110  $\mu$ mol) versetzt und in die Filterspritze aufgezogen. Nach 1h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml DMF und 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN gewaschen und im ÖV getrocknet.

5. DNA-SYNTHESE Die trockene, modifizierte Festphase wird in eine Kunststoffsäule mit zwei Frittenböden umgefüllt, und am DNA Syntheseautomaten die DNA Synthese durchgeführt.

6. AMINOFUNKTIONALISIERUNG Zur Modifizierung des 5'-Terminus wird die Festphasen-gebundene DNA in eine 3ml-Filterspritze gefüllt. 16,2mg (100  $\mu$ mol) CDI werden in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß gewogen, 30min im ÖV getrocknet, in 1ml abs. DMF gelöst, mit 19  $\mu$ l (110  $\mu$ mol) DIEA versetzt und in die Spritze aufgezogen. Nach 24h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 3 x 1ml abs. DMF gewaschen und sofort eine Lösung von 33,3mg (100  $\mu$ mol) Fmoc-geschütztem Ethylendiamin in 1ml abs. DMF, mit 23  $\mu$ l DIEA versetzt, in die Spritze aufgenommen. Nach 24h Schütteln bei RT wird die Reaktionslösung verworfen, die Festphase mit 10 x 1ml DMF und 3 x 1ml CH<sub>3</sub>CN gewaschen und im ÖV getrocknet.

7. TERPYRIDIN KOPPLUNG Die Terpyridin-Kopplung an das 5'-Ende erfolgt wie am 3'-Ende (s. Punkt 3).

8. ABSPALTUNG UND ISOLISIERUNG Um die DNA von dem polymeren Trägermaterial abzuspalten, werden 200-300  $\mu$ l 25% wässriger Ammoniumhydroxidlösung in die Spritze mit der DNA aufgenommen und 24h bei RT geschüttelt. Die Lösung wird in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß gespült, mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Nach HPLC-Reinigung werden die Fraktionen, die mehr als 90% Produkt enthalten, vereinigt, am Lyophilisator getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 7.7.2.2 VERWENDUNG AMINO-FUNKTIONALISIERTER FESTPHASE

$\text{C}_7$ -NH-Fmoc funktionalisierte CPG-Festphase (Link Technologies, Schottland) wird mit *PNA Deblock-Solution* wie unter 7.7.2.1 beschrieben entschützt. Anschließend kann direkt mit den Schritten 4-8 fortgefahren werden.

#### 7.7.2.3 DARSTELLUNG DER MONOTPY-DNA DERIVATE

Die Darstellung der Mono(tpy)-Derivate **14-16** entspricht der der bis-substituierten, mit dem Unterschied, dass entweder nur die Schritte 1-5, 8 oder 6-8 durchgeführt wurden.

### 7.7.3 CHARAKTERISIERUNG

Die Konzentration und Ausbeute der DNAs **12-16** wurde wie unter 7.7.1.2 beschrieben bestimmt.

Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  von DNA wird wie in Gleichung 7.3 angegeben berechnet:

$$\varepsilon = n \cdot \varepsilon(A) + m \cdot \varepsilon(C) + l \cdot \varepsilon(G) + k \cdot \varepsilon(T) \quad (7.3)$$

n =	Anzahl der Adeninbasen in der DNA	$\varepsilon(A) = 13700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
m =	Anzahl der Cytosinbasen in der DNA	$\varepsilon(A) = 6600 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
l =	Anzahl der Guaninbasen in der DNA	$\varepsilon(A) = 11700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
k =	Anzahl der Thyminbasen in der DNA	$\varepsilon(A) = 8600 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	+ Fluorescein	$\varepsilon(A) = 21000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	+ Tetramethylrhodamin	$\varepsilon(A) = 323000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

+ Terpyridin

$$\varepsilon(\text{A}) = 16000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

- 12** Ausbeute: 4,5%  
 HPLC:  $R_t = 28,2\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{244}\text{H}_{300}\text{N}_{85}\text{O}_{125}\text{P}_{20}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : theor. 7039,4; gef. 7032,1.
- 13** Ausbeute: 3,4%  
 HPLC:  $R_t = 27,2\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{155}\text{H}_{189}\text{N}_{51}\text{O}_{70}\text{P}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : theor. 4225,0; gef. 4227,7.
- 14** Ausbeute: 2,5%  
 HPLC:  $R_t = 25,0\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{131}\text{H}_{163}\text{N}_{46}\text{O}_{67}\text{P}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : theor. 3792,8; gef. 3795,1.
- 15** Ausbeute: 1,9%  
 HPLC:  $R_t = 25,9\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{130}\text{H}_{161}\text{N}_{46}\text{O}_{64}\text{P}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : theor. 3700,0; gef. 3702,4.
- 16** Ausbeute: 2,8%  
 HPLC:  $R_t = 25,6\text{min}$   
 MALDI-TOF MS:  $\text{C}_{220}\text{H}_{274}\text{N}_{80}\text{O}_{122}\text{P}_{20}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : theor. 6607,2; gef. 6610,1.

## 7.8 DURCHFÜHRUNG DER HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE

### 7.8.1 BESTIMMUNG DER SCHMELZPUNKTE VON **12-16**

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte der DNAs **12-16** werden Lösungen ( $V = 700\mu\text{l}$ ) aus  $2\mu\text{M}$  Oligonucleotid **12-16**,  $2\mu\text{M}$  komplementärer DNA,  $10\text{mM}$  MOPS-Puffer, pH 7, und  $100\text{mM}$  NaCl verwendet.

MOPS-Puffer, NaCl und  $\text{H}_2\text{O}$  werden in die Küvette gegeben, so dass ein Volumen von  $500\mu\text{l}$  erreicht wird. Die DNA-Lösungen werden hinzugefügt, und zur exakten Bestimmung der Oligonucleotid-Konzentrationen die Absorption der wässrigen DNA-Lösungen photometrisch bei  $\lambda = 260\text{nm}$  bestimmt. Über das Lambert-Beersche Gesetz (s. Gleichung 7.1) kann bei bekannter Küvettendicke und molarem Extinktionskoeffizient die tatsächliche Konzentration berechnet werden.

Anschließend wird mit Wasser bis zum Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wird durchmischt (3 x 10 sec) und 5 min mit Argon gespült. Vor Beginn der Messung wird zur Einstellung des Hybridisierungsgleichgewichtes zuerst auf 90°C erwärmt (10 min), und dann auf die Starttemperatur abkühlt.

Die Abhängigkeit der Absorption von der Temperatur wird bestimmt, indem in Schritten von 0,5°C erwärmt bzw. abgekühlt und jeweils die Absorption gemessen wird. Jeder Messvorgang wird mindestens zweimal wiederholt. Ist der Messvorgang so gewählt, dass die Temperatur von 20°C zntersritten wird, wird die Küvette von außen mit Stickstoff umspült, um ein Anlaufen des Küvettenglases zu vermeiden.

DNA	ohne Metall	Fe(II)	Zn(II)	Ni(II)	Cu(II)
DNA <sub>9</sub>	58,5				
<b>12</b>	61,0	-	50,2	59,3	58,1
<b>16</b>	59,5				
DNA <sub>8</sub>	35,9				
<b>13</b>	41,9	-			

## 7.9 DURCHFÜHRUNG DER EXPERIMENTE MIT METALL-GELÖSCHTEN MOLECULAR BEACONS **9-11**

### 7.9.1 FLUORESZENZ-EXPERIMENTE

In einer Fluoreszenzküvette mit 45µl Messzelle werden 0,01µM, 0,1µM bzw. 1µM der Oligonucleotide **9-11** in 10mM MOPS-Puffer pH 7 und 1M NaCl im Fall von **9** und **11**, bzw. 100mM NaCl und 20mM MgCl<sub>2</sub> im Fall von **10** vorgelegt. Das Gesamtvolumen der Probenlösung beträgt 50µl. Durch Zugabe der entsprechenden Metallsalzlösung wird die jeweilige Metallionenkonzentration eingestellt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Fluorescein-modifizierten DNAs **9** und **11** werden bei 494nm angeregt, die Fluoreszenz im Bereich von 500-600nm gemessen. Für den Tamra-derivatisierten MB **10** beträgt die Anregungswellenlänge 558nm, die Fluoreszenz wird im Bereich von 565-700nm bestimmt. Zur Kontrolle, ob die Fluoreszenzintensität konstant ist, wird jede Messung nach wenigen Minuten wiederholt. Für die erhaltenen Werte wird die Intensität in Bezug auf die Volumenänderung korrigiert und bei einer Wellenlänge von 522nm (**9, 11**) bzw. 581nm (**10**) gegen die Metallionenkonzentration aufgetragen.

Für die Hybridisierung mit komplementärer DNA werden 1-5 Äquivalente der entsprechenden Nucleinsäure zugegeben und die Fluoreszenzzunahme solange verfolgt, bis sich ein konstanter Wert einstellt.

### 7.9.2 OPTIMIERUNG DER HYBRIDISIERUNGSGESCHWINDIGKEIT

Zur Optimierung der Hybridisierungsgeschwindigkeiten von **9** und **10** mit jeweils komplementärer DNA werden 50  $\mu$ l einer Lösung aus 0,1  $\mu$ M Oligonucleotid **9** bzw. **10**, 10mM MOPS-Puffer pH 7, 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> und verschiedenen Salzkonzentrationen (NaCl und MgCl<sub>2</sub>) in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt. Nach Zugabe von 0,5  $\mu$ M der entsprechenden komplementären DNA-Sequenz wird die Messung gestartet, und bei 522nm für **9** bzw. 581nm für **10** über einen Zeitraum von 60min jede Sekunde die Fluoreszenz gemessen.

## 7.10 DURCHFÜHRUNG DER EXPERIMENTE MIT DEN TERPYRIDIN-MODIFIZIERTEN DNAs **12-16**

### 7.10.1 UV-VIS SPEKTROPHOTOMETRIE

Zum Nachweis der Koordination der Metallionen an den Terpyridinliganden von **12-16** werden 60  $\mu$ l der Probenlösung aus 5  $\mu$ M Terpyridin-modifizierter DNA, 10mM HEPES-Puffer pH 7 und 150mM NaCl in einer Küvette mit 45  $\mu$ l Messzelle vorgelegt und in 0,5  $\mu$ l-Schritten die Metallionenlösung hinzugefügt. Die Lösung wird durchmischt und die Absorption über den Bereich von 200-600nm gemessen. Die gemessenen Werte werden in Bezug auf die Konzentrationsänderung korrigiert, und die Maxima der entstehenden Banden gegen die Metallionenkonzentration aufgetragen.

### 7.10.2 MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

Für die Charakterisierung der DNA-Metallkomplexe mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie werden 5  $\mu$ l Probenlösungen aus 1  $\mu$ M Oligonucleotid, 1,2  $\mu$ M Metallsalz und 10mM HEPES-Puffer hergestellt. 1  $\mu$ l der Probe wird zusammen mit 2  $\mu$ l ATT-Matrix wie unter 7.1 beschrieben auf das MALDI-Target aufgetragen und gemessen.

Für die Charakterisierung der DNA-Metallkomplexe über ESI Massenspektrometrie werden 15  $\mu$ l einer Probe aus 50  $\mu$ M Oligonucleotid in 100mM Triethylammoniumacetat-

Puffer pH 7 mit einem Äquivalent Metall(II)ionen für den M(II)/DNA 1:1 Komplex, bzw. fünf Äquivalenten für den 2:1 Komplex, hergestellt und im nanoESI-Modus gemessen.

### 7.10.3 HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE MIT DEM 5'-TAMRA,3'-DABCYL-MODIFIZIERTEM MB **17**

Die Probenlösung aus  $1\mu\text{M}$  bzw.  $0,1\mu\text{M}$  **17**,  $10\text{mM}$  HEPES-Puffer pH 7,  $150\text{mM}$  NaCl und  $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  wird in einer Fluoreszenz-Küvette mit  $45\mu\text{l}$  Messzelle vorgelegt und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von  $558\text{nm}$  im Bereich von  $565\text{-}700\text{nm}$  gemessen.  $1\mu\text{M}$  bzw.  $0,1\mu\text{M}$  des Terpyridin-modifizierten Oligonucleotids werden zugegeben und die Zunahme der Fluoreszenzintensität solange verfolgt, bis sich ein konstanter Wert eingestellt hat. Das Gesamtvolumen der Probenlösung beträgt  $60\mu\text{l}$ . Die Metallsalzlösung wird schrittweise dazu titriert und bei jedem Schritt solange gewartet, bis sich ein konstanter Wert für die Fluoreszenzintensität einstellt. Zur Kontrolle werden der Probenlösung beim Erreichen des Fluoreszenzminimums fünf Äquivalente unmodifizierte, zum MB komplementäre DNA<sub>9</sub> zugefügt und beobachtet, ob die Fluoreszenzintensität wiederhergestellt wird.

Zur Überprüfung der Reversibilität der Metallkoordination an **12** wird die Fluoreszenz der Duplex aus **12:17** mit einem Äquivalent Metallionen gelöscht, die Probenlösung anschließend mit 10 Äquivalenten EDTA versetzt und die Fluoreszenz gemessen.

### 7.10.4 UNTERSUCHUNG DER **12**- BZW. **16**-METALL(II)-ADDUKTE ÜBER GELELEKTROPHORESE

Die Gelelektrophorese-Eperimente wurden im Arbeitskreis Jäschke, Institut für Pharmazeutische Chemie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg, in Zusammenarbeit mit Herrn Dirk Bebenroth durchgeführt. Es wurde 20% vernetztes Polyacrylamid unter denaturierenden Bedingungen verwendet:  $8,3\text{M}$  Urea,  $100\text{mM}$  Trisborat/EDTA-Puffer pH 8,3, Auftragung der Proben mit Formamid. Die Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau wurden zur Markierung der Laufgeschwindigkeit in den äußeren Taschen aufgetragen. Die Proben bestanden aus  $20\mu\text{l}$  einer  $50\mu\text{M}$  Lösung der **12**- bzw. **16**-Metall-Addukte in  $5\text{mM}$  MOPS-Puffer pH 7. Die Länge des Gels betrug  $44,5\text{cm}$ . Nach beendeter Elektrophorese wurden die zurückgelegten Strecken der Proben relativ zum Startpunkt bestimmt, die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proben mit einer  $300\text{mM}$  Ammoniumacetat-Lösung pH 5,5 extrahiert und mit MALDI-TOF MS

überprüft.



# LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Brunner and R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 13626–13627, **2004**.
- [2] N. Graf, M. Göritz, and R. Krämer. *Angew. Chem*, **2005**, *submitted*.
- [3] P.E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, and O. Buchardt. *Science*, 254, 1497–1500, **1991**.
- [4] B. Armitage, T. Koch, H. Frydenlund, H. Orum, and G. B. Schuster. *Nucl. Acids Res.*, 26, 715–720, **1998**.
- [5] A. Ray and B. Norden. *The FASEB Journal*, 14, 1041–1060, **2000**.
- [6] S. Tyagi and F. R. Kramer. *Nature Biotech.*, 14(3), 303–308, **1996**.
- [7] Joseph Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Publishers, New York, **1998**.
- [8] H. Neuweiler, A. Schulz, A. C. Vaiana, J. C. Smith, S. Kaul, J. Wolfrum, and M. Sauer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41(24), 4769–4773, **2002**.
- [9] O. Seitz. Festphasensynthese doppelt markierter peptidnucleinsäuren als sonden für die echtzeitdetektion der hybridisierung. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39(18), 3249–3252, **2000**.
- [10] G. T. Morgan and F. H. Burstall. *J. Chem. Soc., Abstr.*, pages 20–30, **1932**.
- [11] M. G. B. Drew, M. J. Hudson, P. B. Iveson, M. L. Russell, J.-O. Liljenzin, M. Skålberg, L. Spjuth, and Ch. Madic. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, pages 2973–2980, **1998**.

- [12] P. O'D. Offenhardt, P. George, and G. P. Haight Jr. *J. Phys. Chem.*, 67, 116–118, **1963**.
- [13] R. B. Martin and J. A. Lissfelt. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 938–940, **1956**.
- [14] L. Lashgari, M. Kritikos, R. Norrestam, and T. Norrby. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, 55, 64–67, **1999**.
- [15] H. Hofmeier and U. S. Schubert. *Chem. Soc. Rev.*, 33, 373–399, **2004**.
- [16] R. Ziesel. *Synthesis*, 11, 1839–1865, **1999**.
- [17] M. C. Jimenez-Molero, Ch. Dietrich-Buchecker, and J.-P. Sauvage. *Chem. Commun.*, 1613–1616, **2003**.
- [18] A. Klatyr and R. Ziesel. *Synthesis*, 11, 1665–1670, **2001**.
- [19] J. M. Haider, R. M. Williams, L. DeCola, and Z. Pikramenou. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42(28), 1830–1833, **2003**.
- [20] L. Flamigni, I. M. Dixon, J.-P. Collin, and J.-P. Sauvage. *Chem. Commun.*, 2479–2480, **2000**.
- [21] S. Ott, M. Kritikos, B. Akermark, and L. Sun. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42(28), 3285–3288, **2003**.
- [22] K. M. Stewart and L. W. McLaughlin. *Chem. Commun.*, pages 2934–2935, **2003**.
- [23] J. S. Choi, Ch. W. Kang, J. W. Yang, Y.-G. Kim, and H. Han. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 8606–8607, **2004**.
- [24] D. Mitra, N. di Cesare, and H. F. Sleiman. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43(43), 5804–5808, **2004**.
- [25] J. Brunner, A. Mokhir, and R. Krämer. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 12410–12411, **2003**.
- [26] N. Bendifallah, E. Kristensen, O. Dahl, U. Koppelhus, and P. E. Nielsen. *Bioconjugate Chem.*, 14(3), 588–592, **2003**.
- [27] G. Breipohl, D. W. Will, A. Peyman, and E. Uhlmann. *Tetrahedron*, 53(43), 14671–14686, **1997**.

- [28] A. A. Mokhir, W. H. Connors and C. Richert. *Nuc. Acids Res.*, 29(17), 3674–3684, **2001**.
- [29] D. Sarracino and C. Richert. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(24), 3057, **1996**.
- [30] F. Pina, M. A. Bernardo, and E. Garcia-Espana. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2143–2157, **2000**.
- [31] R. Krämer. *Angew. Chem.*, 110, 804–806, **1998**.
- [32] J. Brunner. *Metallkomplex-funktionalisierte Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren für die DNA-Sequenzerkennung*. PhD thesis, Universität Heidelberg, **2004**.
- [33] A. Odani, H. Masuda, K. Inukai, and O. Yamauchi. *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 6294–6300, **1992**.
- [34] P. R. Andres, R. Lunkwitz, G. R. Pabst, K. Boehn, D. Wouters, S. Schmatloch, and U. S. Schubert. *Eur. J. Org. Chem.*, 19, 3769–3776, **2003**.
- [35] H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, and M. D. Frank-Kamenteskii. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(6), 1097–1103, **2002**.
- [36] R. H. Holyer, C. D. Hubbard, S. F. A. Kettle, and R. G. Wilkins. *Inorg. Chem.*, 5(4), 622–625, **1966**.
- [37] R. C. Wilkins and R. Hogg. *J. Chem. Soc.*, 341–350, **1962**.
- [38] A. Füßl, A. Schleifenbaum, M. Göritz, A. Ridell, C. Schultz, and R. Krämer. Zinc-enhanced cellular uptake of pna-terpyridine conjugates. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *submitted*.
- [39] T. Tennilä, K. Ketomaki, P. Penttinen, U. Tengvall, E. Azhayeva, S. Auriola, H. Lönnberg, and A. Azhayev. *Chem. & Biodivers.*, 1, 609–625, **2004**.
- [40] G. U. Priimov, P. Moore, L. Helm, and A. E. Merbach. *Inorg. React. Mech.*, 3, 1–23, **2001**.
- [41] P. Mitchell and H. Sigel. *J. Am. Chem. Soc.*, 114(5), 6294–6300, **1992**.

- [42] F. Patolsky, Y. Weizman, and I. Willner. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(5), 770–772, **2002**.
- [43] F. Patolsky, E. Katz, and I. Willner. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 114(18), 3398–3402, **2002**.
- [44] A. Saghatelian, K. M. Guckian, D. A. Thayer, and M. R. Ghadiri. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(2), 344–345, **2003**.
- [45] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5179, **1995**.
- [46] M. Orozco, A. Pérez, A. Noy, and F. J. Luque. *Chem. Soc. Rev.*, 32, 350–364, **2003**.
- [47] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, and T. Hendrickson. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 6127, **1990**.
- [48] S. Sen and L. Nilsson. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(30), 7414–7422, **2001**.
- [49] Advanced ChemTech, Inc., Louisville, Kentucky. *Advanced ChemTech Handbook of Combinatorial and Solid Phase Organic Chemistry*, 1998.

## Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

M. Göritz, R. Krämer, *Allosteric Control of Oligonucleotide Hybridization by Metal-induced Cyclization*, J. Am. Chem. Soc. 2005, 127 (51), 18016-18017.

N. Härdle, M. Göritz, R. Krämer, *Towards Chemical Signal Cascades: A Metal-Releasing Probe for DNA Detection by Catalytical Signal Amplification*, submitted 2005.

A. Füßl, A. Schleifenbaum, M. Göritz, A. Ridell, C. Schultz, R. Krämer, *Zinc-Enhanced Cellular Uptake of PNA-Terpyridine Conjugates*, submitted 2005.



Erklärung gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

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

b) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich an keiner anderen Stelle ein 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 05.01.2006

---

Mareike Göritz