

Synthese modifizierter Oligonucleotid- Sonden für den DNA-Nachweis durch katalytische Signalamplifikation

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt
von Diplom-Chemikerin
Nora Julie Charlotte Graf
aus Berlin-Charlottenburg

2006

Kurzfassung auf Deutsch

Die Arbeit behandelt die Synthese Metallkomplex-funktionalisierter Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren (PNAs) und deren Anwendung als Sonden für den sequenzspezifischen DNA-Nachweis. Zum einen wurde dazu Metallkatalyse am DNA-Templat genutzt, zum anderen Signalverstärkung durch chemische oder enzymatische Katalyse.

Eine Nucleinsäure kann als Templat funktionalisierte Oligonucleotide in räumliche Nähe zueinander bringen und deren intermolekulare Reaktion beschleunigen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Redoxreaktion zwischen einer Metallkomplex- und einer Thiol-funktionalisierten Peptidnucleinsäure am DNA-Templat wurde fluorimetrisch verfolgt.

Für die Nachweisreaktionen, die auf Signalverstärkung beruhen, wurden Konjugate von DNA-Oligonucleotiden mit Metallkomplexen synthetisiert, die bei Hybridisierung mit komplementärer DNA das Metallion (Cu^{II} , Zn^{II}) freisetzen. Das Cu^{II} -Ion (bzw. Zn^{II} -Ion) aktiviert als Cofaktor einen chemischen Präkatalysator (bzw. ein Apoenzym) und die anschließend durch den Katalysator (bzw. das Holoenzym) initiierten Reaktionen machen das DNA-Target durch Umsetzung fluoro- oder chromogener Substrate fluorimetrisch, photometrisch oder sogar für das Auge direkt sichtbar. Das DNA-Target konnte mithilfe dieser Signalwandlung ($\text{DNA} \Rightarrow \text{Metallion}$) mit hoher Empfindlichkeit und Sequenzspezifität nachgewiesen werden. Die verwendeten Metallkomplex-funktionalisierten Oligonucleotide wurden zum besseren Verständnis der Signalwandlung hinsichtlich ihrer thermodynamischen und kinetischen Stabilität charakterisiert. In einer Variante dieser Oligonucleotid-Konjugate wirkte das Metallion Cu^{II} als intramolekularer Fluoreszenzlöcher, sodass die Bindung einer komplementären Nucleinsäure in Form eines Fluoreszenzsignals verfolgt werden kann.

Short summary in English

The thesis covers the synthesis of metal complex functionalized oligonucleotides and peptide nucleic acids (PNA) and their application for DNA sequence detection, including both metal catalysis on DNA templates and signal cascades with chemical or enzymatic amplification.

A nucleic acid template can trigger the intermolecular reaction of two functionalized, complementary oligonucleotides by promoting their spatial proximity. In the context of this work, a DNA-templated redox reaction between a metal complex and a thiol, both attached to oligo peptide nucleic acids, was followed fluorimetrically.

As components of an artificial signal cascade, conjugates of DNA oligonucleotides with metal complexes were synthesized. These conjugates release the metal ion (Cu^{II} or Zn^{II}) on hybridization with complementary DNA. The Cu^{II} ion (or Zn^{II} ion) acts as a cofactor for a chemical precatalyst (or an apoenzyme) resulting in an active catalyst (or the holoenzyme). Subsequent reactions initiated by the catalyst give rise to the conversion of fluorogenic or chromogenic substrates. Thus, the signal can be monitored fluorimetrically or photometrically or is even visible to the naked eye. This methodology allows one to detect complementary DNA targets with high sensitivity and sequence specificity. For a better understanding of the underlying mechanisms, the metal complex functionalized oligonucleotides were characterized with respect to their thermodynamical and kinetical stability.

Finally a fluorescent oligonucleotide conjugate was designed, with Cu^{II} acting as an intramolecular fluorescence quencher. This approach enables direct conversion of the hybridization event into a fluorescence signal.

Synthese modifizierter Oligonucleotid- Sonden für den DNA-Nachweis durch katalytische Signalamplifikation

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer
PD Dr. Katja Heinze

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2006

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von August 2003 bis Juni 2006 am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

Herrn PROF. DR. ROLAND KRÄMER, unter dessen Anleitung diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich herzlich für zahlreiche Anregungen, Diskussionen, sein stetes Interesse an meiner Arbeit sowie die materielle Unterstützung.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung vom 01.05.2004 – 30.04.2006.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DNA und PNA.....	1
1.2	Reaktionen an Nucleinsäure-Templaten.....	4
1.3	Sequenzspezifischer Nachweis von Nucleinsäuren durch katalytische Signalverstärkung	6
2	ZIELSETZUNG	9
3	METALLKATALYSE AM DNA-TEMPLAT	11
3.1	Synthese modifizierter Peptidnucleinsäuren	13
3.1.1	Synthese von Thiol-PNAs (C-terminal).....	13
3.1.2	Synthese von phen-PNA (N-terminal)	15
3.2	Detektion von Nucleinsäuren	16
4	SIGNALKASKADEN	19
4.1	Signalamplifikation durch chemische Katalyse.....	21
4.1.1	Vorversuche	22
4.1.2	Modifizierung von DNA mit Chelatliganden	25
4.1.2.1	Synthese von Chelatliganden	25
4.1.2.2	Synthese von modifizierten DNAs (L ₂ DNAs)	29
	a) Flüssigphasensynthese	29
	b) Festphasensynthese	29
4.1.3	Thermodynamische und kinetische Untersuchungen	36
4.1.3.1	(tpy ₂ DNA)M	36
4.1.3.2	(Phen Green/tpy-DNA)M	41
4.1.4	Detektion von Nucleinsäuren.....	48
4.2	Signalamplifikation durch enzymatische Katalyse.....	54
4.2.1	Aldolase-Isolierung	59
4.2.2	Gewinnung der Apoenzyme	61
4.2.3	Detektion von Nucleinsäuren.....	64

5	MOLECULAR MODELLING	73
5.1	PNAs am DNA-Templat	74
5.2	(tacn ₂ DNA)Cu	75
5.3	(tpy ₂ DNA)Cu	76
6	ZUSAMMENFASSUNG	77
7	EXPERIMENTELLER TEIL	81
7.1	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	81
7.2	Synthesen kleiner Moleküle.....	85
7.2.1	Trt-geschützte Thiole	85
7.2.2	Derivate von 1,10-Phenanthrolin	87
7.2.3	Derivate von 1,4,7-Triazacyclononan	90
7.2.4	Derivat von 2,2':6',2"-Terpyridin.....	103
7.2.5	Derivate von Phen Green	104
7.3	DNA- und PNA-Synthesen	107
7.4	Enzyme	113
7.4.1	Aldolase-Isolierung	113
7.4.2	Gewinnung der Apoenzyme	118
7.5	Fluorimetrie und Photometrie.....	119
8	LITERATURVERZEICHNIS	123
	ANHANG	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	DNA-Struktur nach Watson und Crick (links) und gezeichnet nach dem Koordinatensatz des PDB-Eintrags 2BNA (rechts)	1
Abb. 1.2	Gegenüberstellung eines PNA- (links) und eines DNA-Oligomers (rechts)	2
Abb. 3.1	MALDI-Massenspektren der PNA 4	13
Abb. 3.2	Bildung von DCF aus DCFH infolge der Oxidation der Thiol-PNAs 1 – 4 durch phen-Cu-PNA 5 in An- und Abwesenheit eines komplementären DNA-Templats	16
Abb. 4.1	Oxidation von DCFH zu DCF in Gegenwart 22 verschiedener Liganden	22
Abb. 4.2	Oxidation von DCFH zu DCF in Gegenwart von 1, 2 und 4 Äq. tacn jeweils ohne phen, mit 1, 10 bzw. 100 Äq. phen	23
Abb. 4.3	Oxidation von DCFH zu DCF in Gegenwart von 1, 2 und 10 Äq. tpy	24
Abb. 4.4	Übersicht über die Carbonsäure-funktionalisierten Chelatliganden, die an aminomodifizierte DNA gekoppelt werden konnten	31
Abb. 4.5	PAGE-Analyse von (8)M	33
Abb. 4.6	Chelatisierende Fluorescein-Derivate für die Kopplung an aminomodifizierte DNA	34
Abb. 4.7	Vergleich der UV-Spektren von Cu(tpy) _{1/2} (links) und (4)Cu _{1/2} (rechts)	37
Abb. 4.8	ESR-Spektren von (4)Cu und Cu(tpy) ₂	37
Abb. 4.9	Titration von tpy ₂ DNA 4 mit ZnSO ₄	38
Abb. 4.10	Kinetik der Dissoziation des (4)Zn-Komplexes bei verschiedenen tpen-Konzentrationen	40
Abb. 4.11	Effekt von Metallionen auf die Fluoreszenzintensität von Phen Green-Derivaten	43
Abb. 4.12	Titration von Phen Green 28 mit CuSO ₄	43
Abb. 4.13	Titration von (28)Cu mit verschiedenen Liganden L2	44
Abb. 4.14	Titration des Phen Green-DNA-Konjugats 6 mit CuSO ₄	45
Abb. 4.15	UV-Spektrum des Phen Green-Konjugats 6	46
Abb. 4.16	Titration des Phen Green/tpy-DNA-Konjugats 7 mit CuSO ₄	47

Abb. 4.17	<i>Inhibierung der Cu(phen)-katalysierten Oxidation von DCFH zum fluoreszierenden DCF durch DNA 1</i>	49
Abb. 4.18	<i>Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Oxidation von DCFH zu DCF vom phen/Cu-Verhältnis</i>	50
Abb. 4.19	<i>HPLC-Analyse unter Assay-Bedingungen</i>	51
Abb. 4.20	<i>Nachweis der Selektivität (links) und Sensitivität (rechts)</i>	52
Abb. 4.21	<i>Beobachtung der DCF-Fluoreszenz über 12 h</i>	53
Abb. 4.22	<i>Röntgenstruktur der Carboanhydrase</i>	55
Abb. 4.23	<i>Röntgenstruktur von Astacin</i>	56
Abb. 4.24	<i>Röntgenstruktur von Class II Aldolase</i>	57
Abb. 4.25	<i>Spaltung von Diacetylfluorescein durch reaktivierte CA zum DNA-Nachweis</i>	65
Abb. 4.26	<i>Einstellung des CO₂/HCO₃⁻-Gleichgewichts durch reaktivierte CA zum DNA-Nachweis</i>	66
Abb. 4.27	<i>Oxidation von NADH zu NAD⁺ durch reaktivierte Aldolase nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an Zink</i>	68
Abb. 4.28	<i>Oxidation von NADH zu NAD⁺ durch reaktivierte Aldolase zum DNA-Nachweis</i>	69
Abb. 4.29	<i>Fluorimetrische Beobachtung der Spaltung eines Molecular Beacon durch Mung Bean Nuclease</i>	70
Abb. 4.30	<i>Fluorimetrische Beobachtung der Spaltung eines Molecular Beacon durch reaktivierte Mung Bean Nuclease</i>	71
Abb. 5.1	<i>PNA/DNA-Duplex mit Thiol- und Phenanthrolin-Modifikation am lokalen Energieminimum</i>	74
Abb. 5.2	<i>Struktur des modifizierten 12mer DNA-Loops (tac₂DNA)Cu 1 am lokalen Energieminimum</i>	75
Abb. 5.3	<i>Struktur des modifizierten 20mer DNA-Loops (tpy₂DNA)Cu 4 am lokalen Energieminimum</i>	76
Abb. 7.1	<i>Chromatogramme des Anionenaustauschers (A) und der Gelfiltration (B)</i>	116
Abb. 7.2	<i>SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit der Aldolase während der Isolierung</i>	117

Schemataverzeichnis

Schema 1.1	<i>Metallkatalysierte Esterspaltung am DNA-Templat</i>	5
Schema 1.2	<i>Allosterische Kontrolle der Hybridisierung von tpy₂DNA durch Zn^{II}-Ionen</i>	7
Schema 3.1	<i>System für die templatvermittelte Redoxreaktion (oben) und verwendete Thiol-PNAs 1 - 4 (unten)</i>	11
Schema 3.2	<i>Verseifung und Oxidation von DCFH-DA</i>	12
Schema 3.3	<i>Synthese der S(Trt)-Carbonsäuren 1 und 2</i>	13
Schema 3.4	<i>Synthese von C-Thiol-modifizierten PNAs 1 - 4</i>	14
Schema 3.5	<i>Synthese von 3-(1,10-Phenanthrolin-5-ylcarbamoyl)propansäure 4</i>	15
Schema 3.6	<i>Synthese von N-phen-modifizierter PNA 5</i>	15
Schema 4.1	<i>Nachweis von DNA durch eine zweistufige Signalkaskade mit allosterischer Signaltransduktion</i>	20
Schema 4.2	<i>Prinzip der allosterischen Signalwandlung bei Hybridisierung.</i>	21
Schema 4.3	<i>Synthese von Thiol-modifiziertem tacn 9</i>	25
Schema 4.4	<i>Versuch der Synthese von tacn₂-Disulfid</i>	26
Schema 4.5	<i>Synthese der tacn-Derivate 12 a - f</i>	27
Schema 4.6	<i>Synthese von tacn 20</i>	27
Schema 4.7	<i>Synthese der tacn-Derivate 24 a - c</i>	28
Schema 4.8	<i>Synthese von 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)-hexansäure 25</i>	28
Schema 4.9	<i>Flüssigphasensynthese mit Thiol-Disulfid-Austausch</i>	29
Schema 4.10	<i>3',5'-Festphasensynthese L₂-modifizierter Oligo-DNAs</i>	30
Schema 4.11	<i>Synthese von Phenyl-1,10-phenanthrolin-5-yl-carbamat 5</i>	32
Schema 4.12	<i>3',5'-Festphasensynthese phen₂-modifizierter Oligo-DNA 8</i>	32
Schema 4.13	<i>Synthese von Phen Green FL 27 (oben) sowie eines Phen Green SK-Analogons 28 (unten)</i>	35
Schema 4.14	<i>Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und Dissoziationsraten der (tpy₂DNA)_M-Komplexe über die Reaktion mit Nitrilotriacetat</i>	39
Schema 4.15	<i>Fluoreszierende Sonde mit zwei Chelatliganden für den Cu^{II}-Nachweis</i>	41

Schema 4.16	<i>Metallgelöschter Molecular Beacon mit Haarnadel-Struktur</i>	42
Schema 4.17	<i>Metallgelöschter Molecular Beacon ohne Stammregion</i>	42
Schema 4.18	<i>Im Gleichgewicht vorliegende 2'-Fluoresceinamid-Formen</i>	46
Schema 4.19	<i>Signalkaskade mit chemischer Amplifikation</i>	48
Schema 4.20	<i>Signalkaskade mit enzymatischer Amplifikation</i>	54
Schema 4.21	<i>Estersubstrate für die Carboanhydrase</i>	55
Schema 4.22	<i>STANA als Substrat für Astacin</i>	56
Schema 4.23	<i>Fructose-1,6-bisphosphat als Substrat für Aldolase und Folgereaktionen</i>	57
Schema 4.24	<i>Spaltung von (tpy₂DNA)Zn durch eine einzelstrangspezifische Endonuclease</i>	58
Schema 6.1	<i>Redoxreaktion am DNA-Templat</i>	77
Schema 6.2	<i>Nachweis von DNA durch eine zweistufige Signalkaskade</i>	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	<i>Verwendete Carbonsäuren und deren DNA-Konjugate</i>	31
Tabelle 4.2	<i>Wiederherstellung der Cu^{II}-gelöschten Phen Green-Fluoreszenz durch die Liganden L2 a) - f)</i>	45
Tabelle 4.3	<i>AAS-Bestimmung des Zn-Gehaltes von Enzymen und Apoenzymen</i>	63
Tabelle 7.1	<i>Herstellung der 10%igen SDS-PAA-Gele</i>	115
Tabelle 7.2	<i>Apoenzym-Herstellung</i>	118
Tabelle 7.3	<i>Molmassen und Extinktionskoeffizienten der Enzyme zur Konzentrationsbestimmung</i>	119

Abkürzungen

A	Adenosin <i>oder</i> Absorption
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AMBER	Assisted Model Building and Energy Refinement (Kraftfeld)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalent(e)
Ala	Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
Asp	Asparaginsäure
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl-Schutzgruppe
C	Cytosin
CA	Carboanhydrase
CDI	<i>N, N'</i> -Carbonyldiimidazol
CPG	Controlled Pore Glass
d	Tag <i>oder</i> desoxy
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
DCFH	2',7'-Dichlorfluorescein (2',7'-Dichlordihydrofluorescein)
DCFH-DA	2',7'-Dichlorfluorescein-diacetat (2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat)
dest.	destilliert
DHAP	Dihydroxyaceton-phosphat
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin, Hünigs Base)
DMAP	4-Di(methylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
ds	double stranded (doppelsträngig)

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
ESI	Electrospray Ionisation
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
G	Guanin
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
ges.	gesättigt
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Hal	Halogen
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HOBT	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Intensität
konz.	konzentriert
Lys	Lysin
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight
MB	Molecular Beacon (Molekulares Leuchtfeuer)
Me	Methyl
mmu	milli mass unit
MMT	Monomethoxytrityl
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse pro Ladung
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NTA	Nitrilotriacetat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PG	protective group (Schutzgruppen der Nucleobasen) (PNA: C, A, G: Benzhydryloxycarbonyl-Schutzgruppe Bhoc) (DNA: C, A: Benzoyl-, G: Isobutyryl-Schutzgruppe)
phen	1,10-Phenanthrolin
Ph	Phenyl
PDB	Protein Data Bank
PNA	Peptide nucleic acid (Peptidnucleinsäure)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Ser	Serin
ss	single stranded (einzelsträngig)
STANA	<i>N</i> -Succinyl-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> -Nitroanilid
T	Thymin
tacn	1,4,7-Triazacyclononan
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylendiamin
Tfa	Trifluoracetyl
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
Ts / Tosyl	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
tpen	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethyldiamin
TPI	Triosephosphat-Isomerase
tpy	2,2':6',2''-Terpyridin
t _R	Retentionszeit (HPLC)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
TSU	<i>TraceSelectUltra</i> (für die Spurenanalytik)
Tyr	Tyrosin
UV/VIS	ultraviolett/visible (Wellenlängenbereich)
Val	Valin

1 EINLEITUNG

1.1 DNA und PNA

DNA und RNA sind die informationstragenden Moleküle in biologischen Systemen. Die DNA ist aus Desoxyribonucleotiden zusammengesetzt; diese sind durch Phosphodiesterbrücken verknüpft. Überwiegend liegt die DNA nicht als einzelsträngiges Molekül vor. Aufgrund des konstanten Basenverhältnisses sowie Röntgenstrukturanalyse schlugen James Watson und Francis Crick 1953 als DNA-Struktur die Doppelhelix vor. Dabei verlaufen die beiden Einzelstränge antiparallel und werden durch Wasserstoffbrücken stabilisiert (zwischen A und T sowie G und C). Die negativ geladene Rückgratstruktur der beiden Stränge ist nach außen orientiert, die hydrophoben Basen nach innen. Die beiden Stränge sind schraubenförmig umeinander gewunden. In der überwiegend vorliegenden B-DNA findet sich eine rechtsgängige Doppelhelix mit etwa 10 Basenpaaren pro Wendelgang auf einer Länge von 3,3 nm (**Abb. 1.1**).

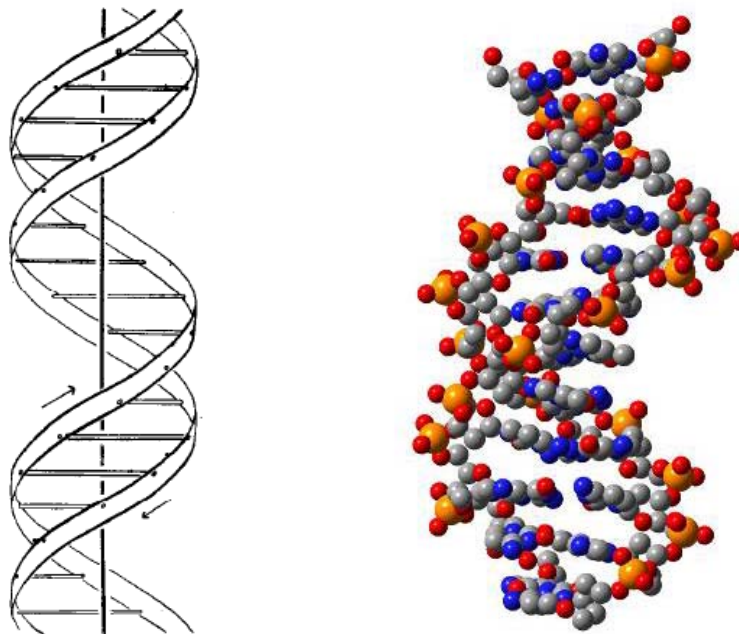


Abb. 1.1 DNA-Struktur.

Links: DNA-Struktur von Watson und Crick 1953 in *Nature*^[1] postuliert.

Rechts: Struktur einer 12mer DNA (gezeichnet mit GaussView nach dem Koordinatensatz des PDB-Eintrags 2BNA).

Peptidnucleinsäuren (PNAs) wurden während der 1980er Jahre von den Arbeitsgruppen um den organischen Chemiker Ole Buchardt und den Biochemiker Peter Nielsen in Kopenhagen entwickelt. 1991 wurden sie als neue sequenzspezifische Nucleinsäure-Reagenzien vorgestellt.^[2]

PNAs sind DNA-Analoga und -Mimetika, in denen das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-Polyamidstruktur ersetzt ist. Bei der Aminosäure *N*-(2-Aminoethyl)-glycin ist die sekundäre Aminogruppe mit einer Essigsäure, die eine Nucleobase als Substituenten trägt, acyliert. Zu den Vorteilen der PNA zählen neben ihrer hohen chemischen und thermischen Stabilität die hohe Bindungsaffinität und -spezifität an Nucleinsäuren sowie die Resistenz gegenüber Nucleasen und Proteasen.^[3] Da der PNA- im Gegensatz zu einem DNA-Strang keine negativ geladenen Phosphatgruppen trägt, ist die Hybridisierung unabhängig von der Ionenstärke. Peptidnucleinsäuren kombinieren somit gewissermaßen die Vorteile der DNA mit der Robustheit, Flexibilität und den Eigenschaften der Peptidchemie.

PNAs binden in Einklang mit den Watson-Crick-Basenpaarungsregeln und mit höherer Affinität als ihre natürlichen Vorbilder an komplementäre Nucleinsäuren; so ist die Verdrängung eines Strangs der DNA-Doppelhelix und Triplexbildung möglich. Die antiparallele Orientierung der Oligonucleotide ist in Duplices bevorzugt. Konventionsgemäß wird der Amino-Terminus eines PNA-Oligomers als äquivalent zum 5'-Ende der DNA angesehen (**Abb. 1.2**).

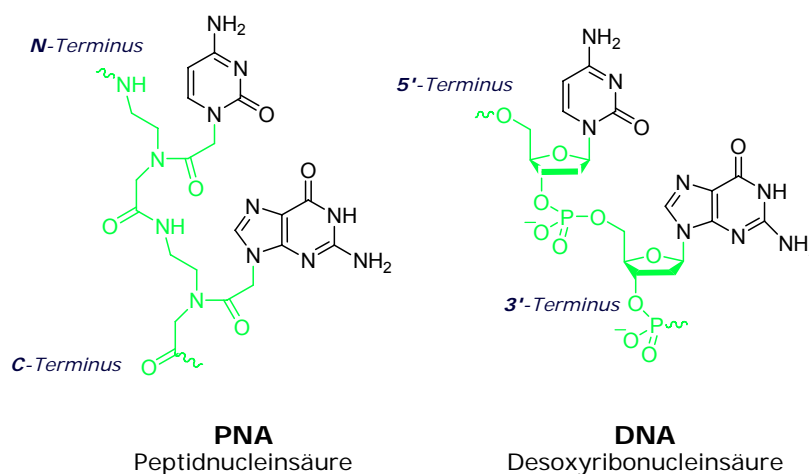


Abb. 1.2 Gegenüberstellung eines PNA- (*links*) und eines DNA-Oligomers (*rechts*).

Bei den reinen PNAs handelt es sich um neutrale, zur Selbstaggregation neigende Verbindungen mit eingeschränkter Wasserlöslichkeit. Diese lässt sich jedoch durch den Einbau geladener Gruppierungen, etwa eines C-terminalen Lysinamids, stark verbessern.

Für eine therapeutische Nutzung als Antisense- (Inhibierung der Translation) und Antigen-Wirkstoffe (Modulierung der Transkription) müssen die PNAs eine ausreichende biologische Stabilität in Serum und Zellen aufweisen. Dies ist tatsächlich der Fall, da PNA gegenüber enzymatischer Spaltung resistent ist. Allerdings ist die Aufnahme von PNAs in Zellen nur gering.^[4] Bei zu hohen extrazellulären PNA-Konzentrationen wurden sogar cytotoxische Effekte beobachtet.^[2] Verschiedene nichtinvasive Transportstrategien wurden entwickelt: u. a. die Konjugation mit Oligopeptiden, mit lipophilen Molekülen wie Adamantan oder mit zellspezifischen Rezeptoren.

In unserer Arbeitsgruppe wurden Terpyridin-PNA-Konjugate bezüglich ihrer Aufnahme in die Zelle sowie den Zellkern untersucht, bei Zugabe von Zn^{II} konnte diese sogar noch weiter gesteigert werden.^[5]

1.2 Reaktionen an Nucleinsäure-Templaten

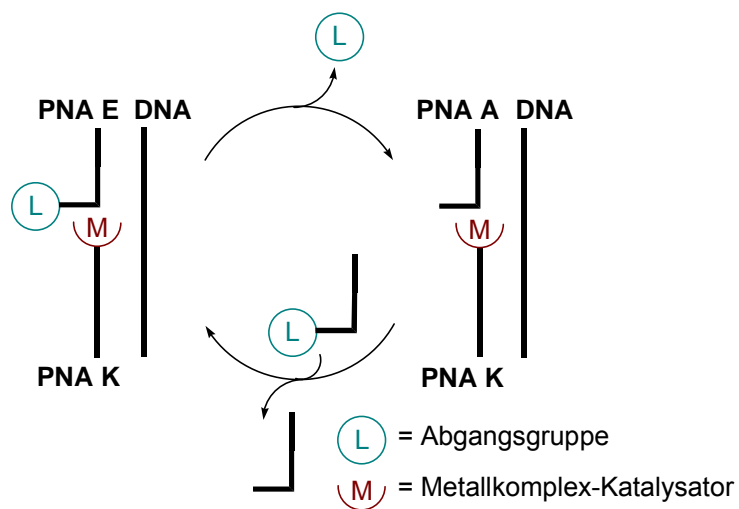
Seit fast zwanzig Jahren ist bekannt, dass Nucleinsäuren chemische Reaktionen beschleunigen können. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen legen nahe, dass katalytisch aktive Nucleinsäuren -ähnlich wie Enzyme- Reaktionen durch präzise räumliche Anordnung der Reaktionspartner, Stabilisierung der Übergangszustände und Bindung der Reaktionsprodukte auf ausgeklügelte Weise beschleunigen. Eine spezielle Variante Nucleinsäure-vermittelter Reaktionen ist die Ligation chemisch modifizierter Oligonucleotide, die komplementär zu zwei aufeinander folgenden Sequenzen am Nucleinsäure-Templat sind. Deren terminale Modifikationen werden durch das Templat in räumliche Nähe zueinander gebracht und können so miteinander reagieren. Von Seitz *et al.*^[6] wurde gezeigt, dass zwei mit Aminosäuren modifizierte PNAs, die zu einer DNA-Templat-Sequenz komplementär sind, sequenzspezifisch über eine Peptidbindung verknüpft werden können; mithilfe dieses Systems ist auch der Nachweis von Einzelbasenpolymorphie möglich. Czapinski und Sheppard^[7] haben die Bildung von Metallosalen-DNA-Konjugaten aus zwei Salicylaldehyd-Einheiten mit DNA als Templat beschrieben. Liu *et al.* berichteten über die organische Synthese an DNA-Templaten.^[8]

DNA-Templatreaktionen mit chemisch modifizierten Oligonucleotiden^[9] bergen ein großes Potential für die nichtenzymatische Erkennung von Nucleinsäuren und für die Entwicklung chemischer Replikationssysteme. Die meisten der bisher bekannten Reaktionen beinhalten die kovalente Bindung zweier modifizierter Oligonucleotid-Stränge, die komplementär zum Templat sind.

Die nichtenzymatische DNA-Bindung gehört zu den sequenzselektivsten DNA/RNA-Erkennungsstrategien, allerdings ist die Empfindlichkeit durch die hohe Affinität des gebundenen Produkts an die Target-DNA beschränkt, was eine effiziente Signalamplifizierung verhindert.

Eine Produktinhibierung kann verhindert werden, wenn die Ligation durch eine katalytische Reaktion wie die Abspaltung einer reaktiven Gruppe ersetzt wird. Dies wurde erstmals durch eine organokatalytische Esterspaltung realisiert,^[10]

und die erste metallkatalysierte Reaktion am DNA-Templat (**Schema 1.1**) wurde von der Arbeitsgruppe Krämer beschrieben.^[11, 12]



Schema 1.1 Metallkatalysierte Esterspaltung am DNA-Templat.

Katalysezyklus der Spaltung des Esters PNA E durch den Kupferkomplex PNA K am DNA-Templat unter Bildung des Alkohols PNA A.

1.3 Sequenzspezifischer Nachweis von Nucleinsäuren durch katalytische Signalverstärkung

Amplifikation ist ein wichtiger Aspekt der Bioanalytik. Enzyme, DNAzyme und Nanopartikel werden bereits für die sensitive Detektion von Bioerkennungseignissen genutzt. Dabei ist die amplifizierte Detektion von DNA eine besondere Herausforderung, da sie dazu dienen kann, Pathogene zu identifizieren, genetische Störungen zu analysieren und forensische Anwendungen möglich zu machen. Vor allem die Detektion von DNA durch Hybridisierung mit komplementärer DNA kann durch molekulare Amplifizierungsmethoden verbessert werden.^[13] Neben der weit verbreiteten PCR zur Target-Amplifikation wurden in den letzten Jahren auch katalytische Reaktionen zur Signalamplifizierung unmarkierter DNA entwickelt.^[14 - 18] Mit einem Polythiophen-Polymer, das in Gegenwart von ssDNA andere Fluoreszenzeigenschaften aufweist als von dsDNA, konnten Leclerc *et al.* sogar 5 DNA-Moleküle in 3 ml Lösung nachweisen (entspricht 3 zM).^[19]

Homogene, autonome Verfahren auf Fluoreszenzbasis^[20, 21] bieten den Vorteil einer besonders einfachen Handhabung, da eine Immobilisierung oder Abtrennung der Nucleinsäuretargets nicht mehr nötig ist, haben aber den Nachteil einer relativ geringen Empfindlichkeit. Die Entwicklung von Strategien für die Steigerung der Sensitivität homogener Detektionsverfahren durch effiziente chemische oder enzymatische Signalamplifikation ist daher eine aktuelle wissenschaftliche Herausforderung.^[18, 22, 23]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in diesem Zusammenhang autonome Signalkaskaden genutzt. Dies sind Sequenzen von chemischen Reaktionen, die - in Anlehnung an biologische Vorbilder - sobald einmal initiiert, ohne weiteres Eingreifen von außen fortschreiten und in einem detektierbaren Signal resultieren. Die modulare Kombination signalübertragender und signalverstärkender Einheiten in einem solchen Nachweissystem vereinfacht zudem die Optimierung.

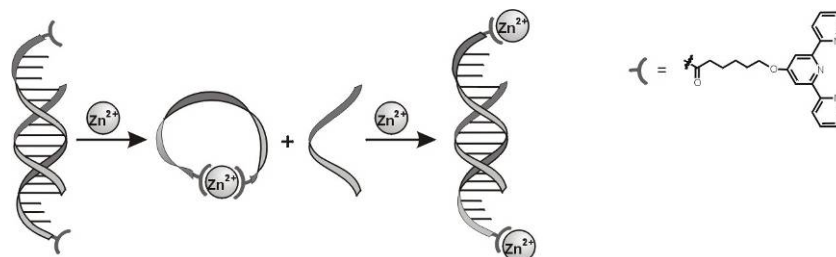
Die Integration künstlicher allosterischer Bindungsstellen in Nucleinsäuren eröffnet die Möglichkeit, deren Funktion durch chemische oder biologische Effektoren „nach Wahl“ zu kontrollieren. Die Effektoren können beispielsweise die katalytische Aktivität von Enzymen und Ribozymen „einschalten“ und dadurch eine für die analytische Detektion nutzbare Signalverstärkung auslösen; auf der Grundlage dieses Konzepts entsteht zur Zeit eine neue Generation molekularer Biosensoren.^[24, 25]

Allosterisch schaltbare Ribozyme, RNA-Aptamere, Enzyme^[17, 26] und Proteinrezeptoren wurden bisher in erster Linie durch Sequenzvariation oder durch die Kombination von allosterischen und funktionellen Nucleinsäure- oder Proteindomänen generiert. Trotz wichtiger methodischer Fortschritte wie der Anwendung von *in vitro* Evolutionstechniken bleibt das „Maßschneidern“ allosterischer Eigenschaften eine Herausforderung.

Eine bisher wenig erforschte Alternative zum „genetischen“ Ansatz ist die Einführung kleiner synthetischer Moleküle als allosterische Schalter in Biomoleküle. Profitieren kann diese Strategie von der Erforschung synthetischer, supramolekularer Rezeptoren und Katalysatoren,^[27] die als bioinspirierte Modellsysteme zum generellen Verständnis allosterischer Wechselwirkungen beigetragen haben.

Die Funktionalisierung von DNA-Oligonucleotiden mit Chelatliganden wie Terpyridin, Bipyridin, Salen etc. wurde von anderen Arbeitsgruppen genutzt, um Hybride durch Metallionen zu stabilisieren^[7, 28 - 31] und DNA-Nanostrukturen zu konstruieren^[32 - 34], aber nicht im Sinne einer allosterischen Regulation.

Die in dieser Arbeit verwendete Bis(2,2':6',2''-terpyridin)modifizierte DNA (tpy₂DNA) und die allosterische Kontrolle der Hybridisierung durch Metallionen wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt.^[35]



Schema 1.2 Allosterische Kontrolle der Hybridisierung von tpy₂DNA durch Zn^{II}-Ionen.

tpy₂DNA ist ein allosterischer Rezeptor mit räumlich separierten Untereinheiten für die Bindung einer komplementären Nucleinsäure und eines Metallions. Die Bindung eines Metallions schwächt die Wechselwirkung mit einer komplementären Nucleinsäure und umgekehrt (negative Allosterie). Je nach Metallion bildet tpy₂DNA kinetisch stabile (Fe^{II}, Ni^{II}) oder labile (Zn^{II}, Cu^{II}), cyclische Komplexe.

2 ZIELSETZUNG

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

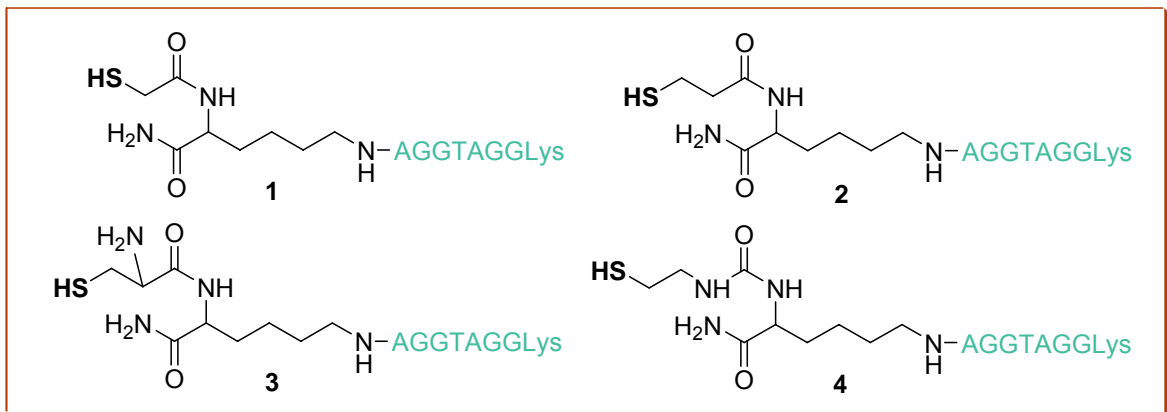
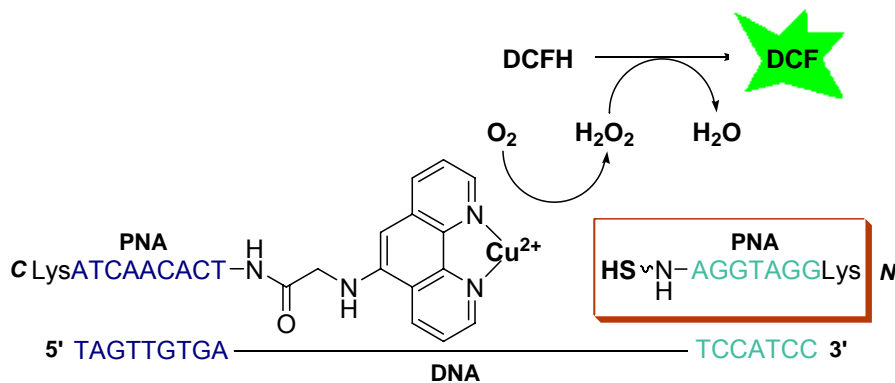
Katalytische Reaktionen chemisch modifizierter Oligonucleotide (bzw. deren Analoga) an DNA-Templaten sind aufgrund des Potentials in der DNA-Sequenzerkennung mit Signalamplifikation bzw. bei der genspezifischen Freisetzung von Wirkstoffen *in vivo* für die Forschung von erheblichem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine metallkatalysierte Reaktion chemisch modifizierter Peptidnucleinsäuren am DNA-Templat entwickelt werden, die im Vergleich zu in der Arbeitsgruppe etablierten, lediglich massenspektrometrisch verfolgbaren Reaktionen die direkte fluorimetrische Beobachtung erlaubt.

Aufbauend auf in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen zur allosterischen Kontrolle der Konformation von Bis-Ligand-modifizierten DNAs (L_2 DNA) durch Metallionen sollten neue, homogene Detektionsverfahren für Nucleinsäuren entwickelt werden. Das Prinzip dabei ist, durch allosterische Destabilisierung von $(L_2$ DNA) M bei Wechselwirkung mit einer komplementären Nucleinsäure (Target-DNA) die Freisetzung des Metalls aus dem Komplex zu erreichen (Signalwandlung Biomolekül \Rightarrow Metall), sodass das Metall als Cofaktor einen chemischen Präkatalysator (z. B. 1,10-Phenanthrolin) oder ein Apoenzym (z. B. Apocarboanhydrase) aktivieren kann. Die aktiven Katalysatoren amplifizieren dann effizient das (bio)molekulare Primärsignal durch Umsetzung fluorogener oder chromogener Substrate, sodass eine empfindliche und sequenzspezifische Detektion von Nucleinsäuren möglich ist.

3 METALLKATALYSE AM DNA-TEMPLAT

Das in der Arbeitsgruppe entwickelte Verfahren für die Nucleinsäuredetektion durch templatgesteuerte Metallkomplex-Katalyse erfordert eine massenspektrometrische Reaktionskontrolle.^[11] In dieser Arbeit wurde das Verfahren so weiterentwickelt, dass die Reaktion *in situ* anhand eines Fluoreszenzsignals verfolgt werden kann.

Die Oxidation eines Thiol-PNA-Konjugats durch ein Cu^{II}(phen)-PNA-Konjugat an einem komplementären DNA-Templat sollte aufgrund der lokal erhöhten Konzentration der Reaktionspartner schneller verlaufen als ohne Templat. Um dies zu untersuchen, wurden vier Thiol-PNAs mit jeweils unterschiedlichen Linkern synthetisiert.

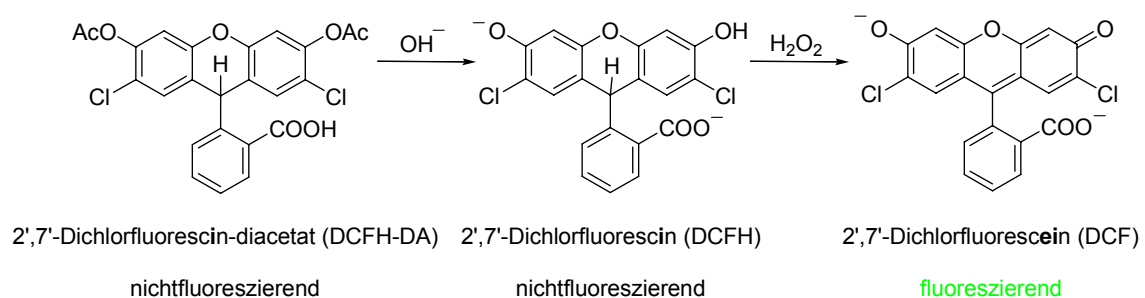


Schema 3.1 System für die templatvermittelte Redoxreaktion (*oben*) und verwendete Thiol-PNAs 1-4 (*unten*).

Als Cosubstrat der Cu^{II}-katalysierten Redoxreaktion wurde ein Fluorescein-Derivat eingesetzt, das nicht fluoresziert, aber in Gegenwart von Sauerstoffradikal-Spezies wie O₂^{·-} oder H₂O₂/Cu^{II} zur fluoreszierenden Fluorescein-Form oxidiert wird. Auf diese Weise können Cu^{II}-katalysierte Redoxreaktionen mit Luftsauerstoff, der in eben diese Spezies überführt wird, durch Entwicklung einer Fluoreszenz indirekt und sehr empfindlich detektiert werden.

Fluorescein, Rhodamin und viele andere Farbstoffe lassen sich chemisch zu farblosen, nichtfluoreszierenden Leucofarbstoffen reduzieren. Diese Dihydro-Derivate werden durch reaktive Sauerstoffspezies leicht zu den Stammverbindungen zurückoxidiert, was zur Untersuchung oxidativer Aktivität in Zellen und Gewebe („oxidativer Stress“) dienen kann. Die intrazelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten wurde mit chemischer Toxizität, Entzündungskrankheiten, Krebs und dem Altern in Verbindung gebracht.^[36]

Die Verwendung von 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (DCFH-DA) als fluoreszierendes Nachweisreagenz für Wasserstoffperoxid wurde erstmals von Keston und Brandt beschrieben.^[37] Sie stellten stabile Leucofluorescein-Derivate (Fluoresceine) dar, die erst nach einer Aktivierung im alkalischen Milieu fluoreszieren, sobald sie mit kleinsten Mengen H₂O₂ (10⁻¹¹ M) und Peroxidase behandelt werden. Zur Überführung in DCFH wird DCFH-DA 30 min bei RT mit NaOH verseift.^[38]



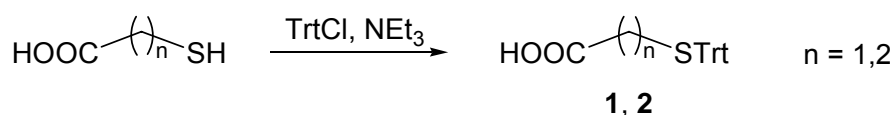
Schema 3.2 Verseifung und Oxidation von DCFH-DA.

In Zellen diffundiert DCFH-DA durch die Zellmembran, und wird enzymatisch durch intrazelluläre Esterase zum hydrophileren nichtfluoreszierenden Leucofarbstoff DCFH deacetyliert. In der Gegenwart von reaktiven Sauerstoffmetaboliten wird DCFH schnell zum fluoreszierenden DCF oxidiert.^[39]

3.1 Synthese modifizierter Peptidnucleinsäuren

3.1.1 Synthese von Thiol-PNAs (C-terminal)

Die zur Kopplung an die PNA verwendeten Thiole mussten zunächst Trityl-geschützt werden^[40] (**Schema 3.3**), damit es während der PNA-Synthese nicht zu Nebenreaktionen kommen konnte. Bei der Abspaltung der PNA-Konjugate von der Festphase im stark sauren Milieu kommt es zugleich zur Abspaltung der Schutzgruppe.



Schema 3.3 Synthese der S(Trt)-Carbonsäuren **1** und **2**.

Trityl-Schützen von Mercaptoessigsäure ($n = 1$) und -propionsäure ($n = 2$).

Die Trityl-geschützte Mercaptoessigsäure **1** und -propionsäure **2** sowie Cystein wurden an das C-Ende der PNA gekoppelt (PNAs **1 - 3** in **Schema 3.4 oben**). Ebenso wurde das Disulfid Cystamin eingesetzt (PNA **4** in **Schema 3.4 unten**). Letztgenannte PNA wurde nach der Abspaltung von der Festphase in wässriger Lösung mit TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid) behandelt, um das Disulfid-Derivat mit zwei PNA-Sequenzen in das gewünschte Thiol-Derivat mit Cysteamin-Einheit zu überführen (vgl. MALDI-Massenspektren in **Abb. 3.1**).

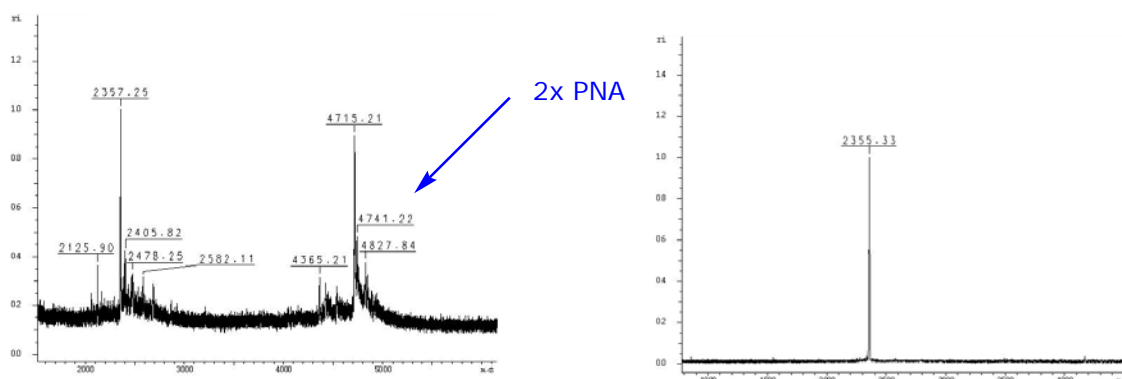
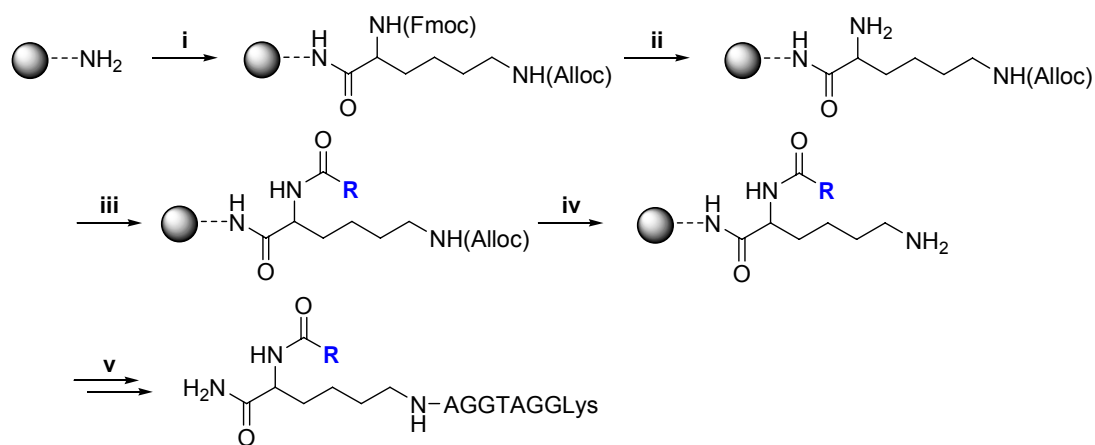


Abb. 3.1 MALDI-Massenspektren der PNA **4**.

Reaktionskontrolle nach Abspaltung von der Festphase (**links**) und nach Spaltung mit TCEP und Aufreinigung durch HPLC (**rechts**).



i (Fmoc)Lys(Alloc), HOBT, HBTU, DIEA

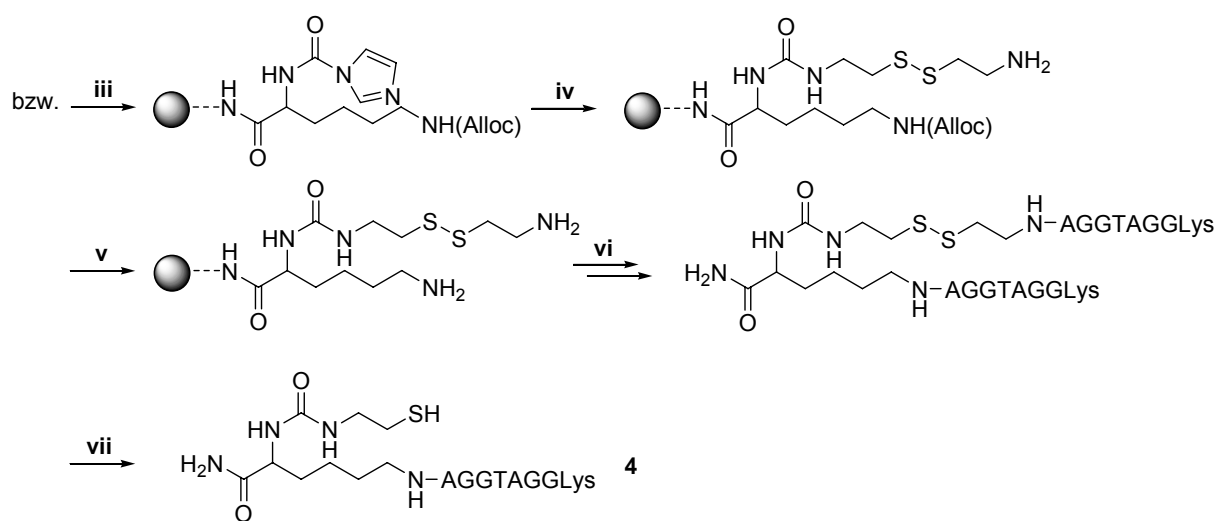
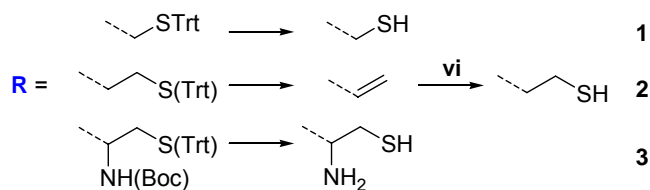
ii Piperidin

iii R-COOH, HOBT, HBTU, DIEA

iv Pd(PPh₃)₃/PPh₃

v PNA-Synthese; TFA, m-Cresol

vi Thioacetamid, NH₃



iii CDI

iv Cystamin

v Pd(PPh₃)₃/PPh₃

vi PNA-Synthese; TFA, m-Cresol

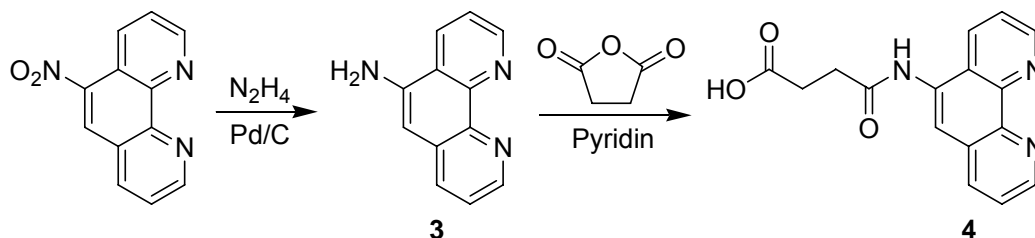
vii TCEP

Schema 3.4 Synthese von C-Thiol-modifizierten PNAs **1 - 4**.

Verwendung der Thiole (Trt)Mercaptoessigsäure, -propionsäure und (Trt)Cystein(Boc) (*oben*) sowie Cystamin (*unten*).

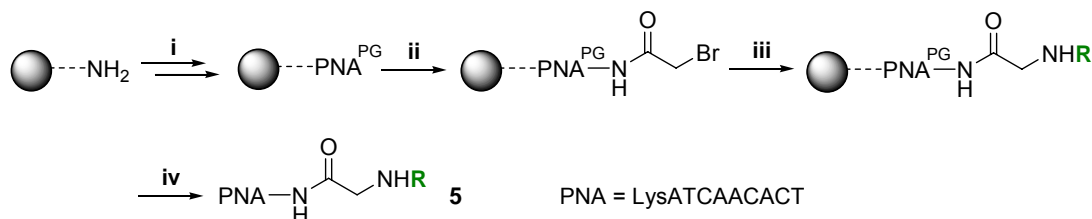
3.1.2 Synthese von phen-PNA (N-terminal)

Zur Kopplung von phen an das N-Ende der PNA wurde das Carbonsäure-Derivat **4** synthetisiert.^[41]

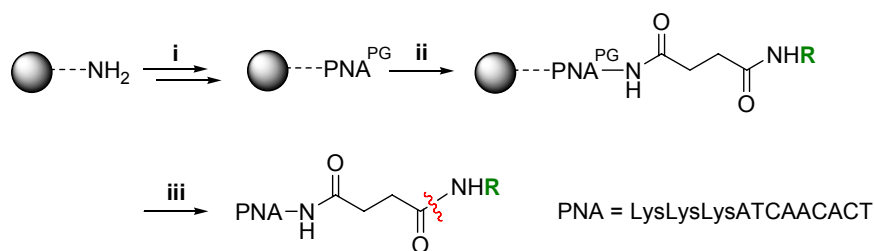
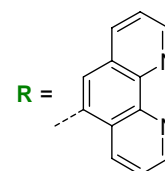


Schema 3.5 Synthese von 3-(1,10-Phenanthroline-5-ylcarbamoyl)propansäure **4**.

Da sich herausstellte, dass die Carbonsäure **4** unter PNA- und DNA-Abspaltbedingungen nicht stabil ist (TFA/m-Cresol bzw. konz. NH_3 , Spaltung angedeutet mit einer roten Linie in **Schema 3.6 unten**), wurde die PNA **5** über eine Substitution mit phen- NH_2 **3** hergestellt (**Schema 3.6 oben**).



- i PNA-Synthese
- ii Bromoacetyl bromid, DIEA
- iii R- NH_2 **3**, DIEA
- iv TFA, m-Cresol



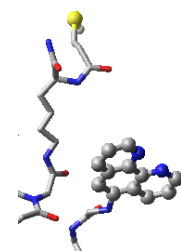
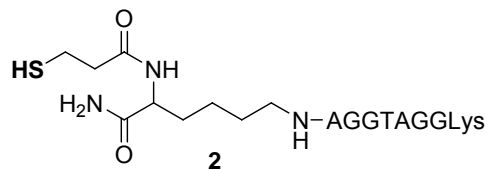
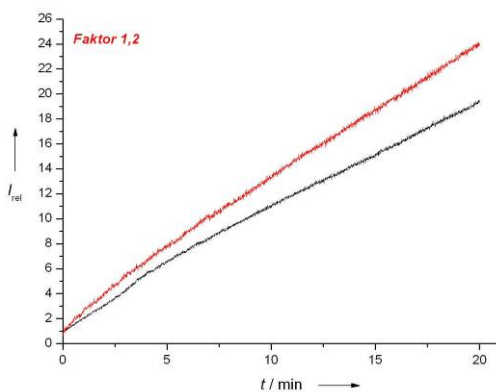
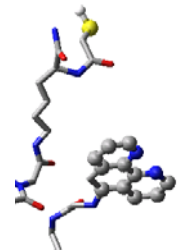
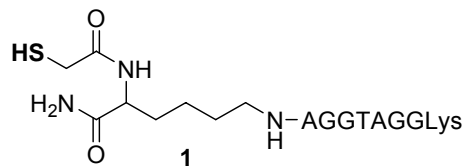
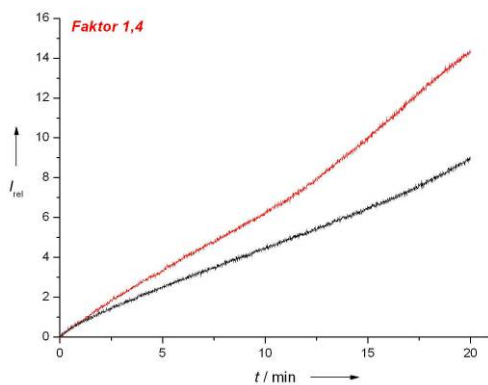
- i PNA-Synthese
- ii R-COOH **4**, HOBT, HBTU, DIEA
- iii TFA, m-Cresol

Schema 3.6 Synthese von N-phen-modifizierter PNA **5**.

3.2 Detektion von Nucleinsäuren

Die Bildung des Produkts DCF wurde durch den Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität bei 523 nm mit der Zeit beobachtet. Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei An- und Abwesenheit von komplementärer Templat-DNA unterscheiden sich maximal um Faktor 3 (Verhältnis der relativen Fluoreszenzintensität nach 5 min, Mittelwert aus je 3 Messungen). Zum Teil zeigt die Templat-DNA **9** sogar einen inhibierenden Effekt.

Neben der Fluoreszenzmessung sind jeweils die Formel der entsprechenden Thiol-PNA sowie ein Ausschnitt aus der optimierten Struktur der PNA/DNA-Duplex (vgl. Kapitel 5.1 über Molecular Modelling) abgebildet.



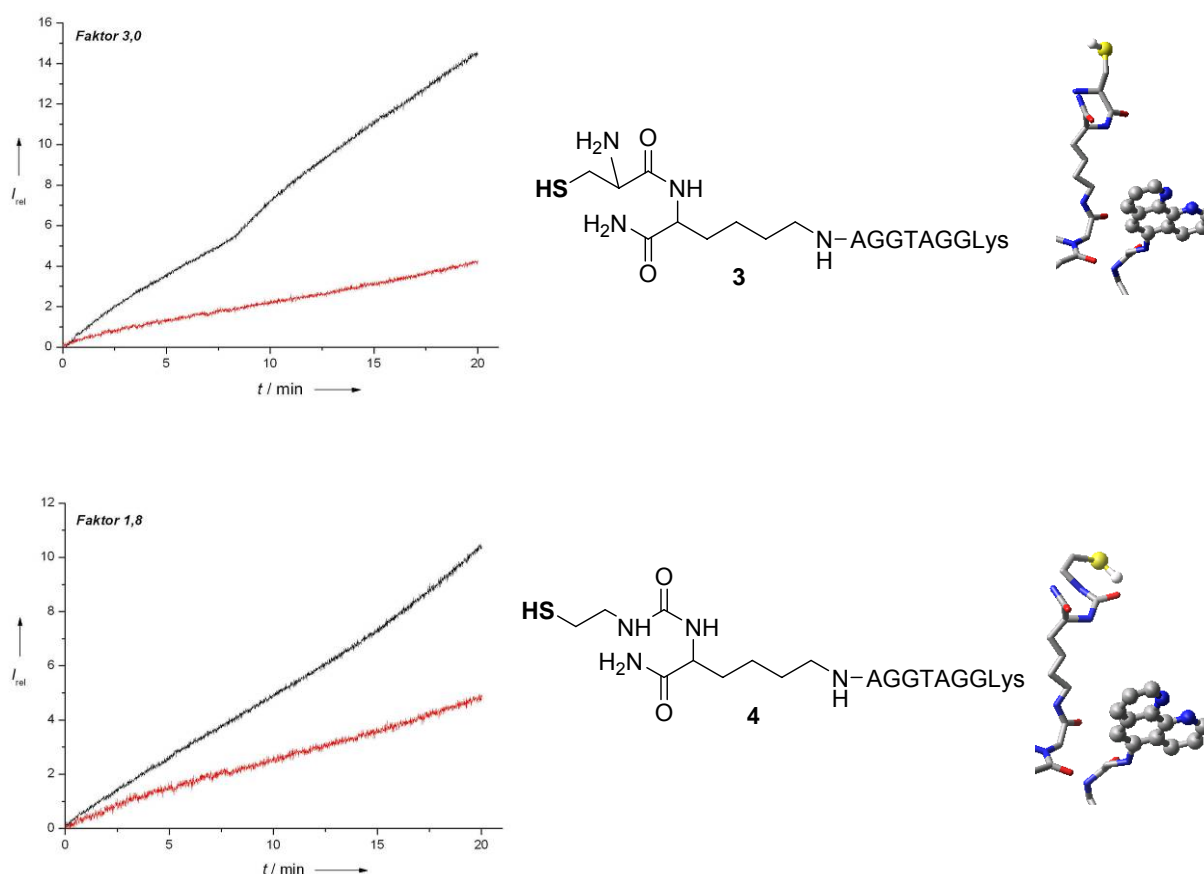


Abb. 3.2 Bildung von DCF ($\lambda_{ex} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$) aus DCFH infolge der Oxidation der Thiol-PNAs **1 – 4** durch phen-Cu-PNA **5** in An- (rote Linie) und Abwesenheit (schwarze Linie) eines komplementären DNA-Templats.

$1 \mu\text{M}$ PNAs **1 – 4** und **5**, $1 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $1 \mu\text{M}$ Templat-DNA **9**, $1,5 \text{ M}$ NaCl , $100 \mu\text{M}$ Cysteamin und $2 \mu\text{M}$ DCFH bei $\text{pH } 7,0$ (10 mM MOPS-Puffer) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Cu^{II} -katalysierte Thiol-Oxidation mit Luftsauerstoff (mit anschließender DCFH-Oxidation durch gebildetes H_2O_2) wird durch das DNA-Templat viel ineffizienter beschleunigt als die templatgesteuerte Esterhydrolyse durch Cu^{II} .^[11, 12] Die Ursachen hierfür sind nicht klar. Weitere Untersuchungen (wie z. B. mismatch-Experimente) wurden daher nicht durchgeführt.

4 Signalkaskaden

In biologischen Systemen werden chemische oder physikalische Signale sehr effizient verstärkt und durch Signalkaskaden, die mehrere Signaltransduktions- und katalytische Amplifizierungsschritte kombinieren, schnell in eine biochemische Antwort umgesetzt. In der Bio- und Chemosensorik wird die Signalamplifikation durch Katalyse bereits in hoch sensitiven Detektionsverfahren genutzt.

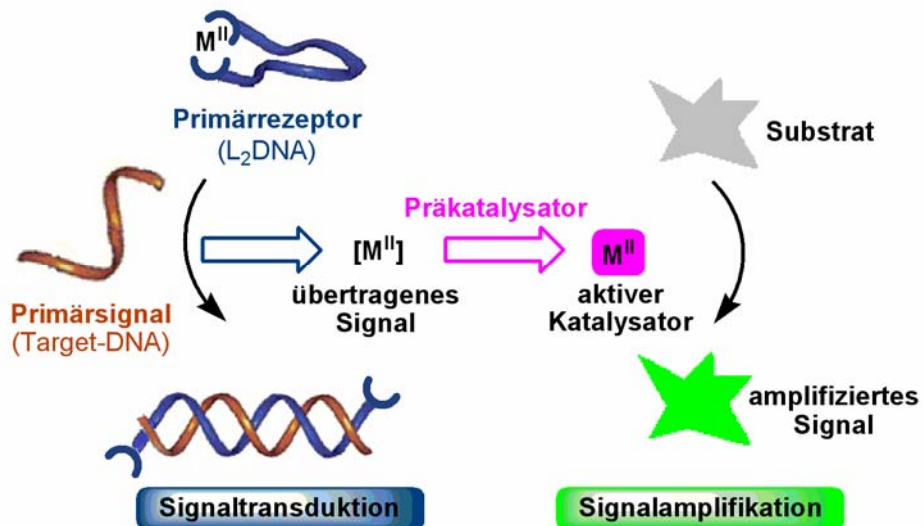
Der Fokus bei der PCR-unabhängigen, amplifizierten katalytischen Detektion von Nucleinsäuresequenzen liegt bisher auf leistungsfähigen Enzym- und Ribozym basierenden Techniken (u. a. heterogen Enzym-basiert^[14, 15, 42, 43], homogen Enzym-basiert^[17, 18, 26] und Ribozym-basiert^[16, 44 - 46] sowie Nucleinsäuretemplat-Katalyse^[10, 11]).

Ein Beispiel ist der weit verbreitete heterogene ELISA-Test (enzyme-linked immunosorbent assay), wo Targeterkennung und Amplifizierung allerdings durch ausgiebige, zeitraubende Waschschriffe voneinander getrennt sind.

Die Entwicklung bioinspirierter Amplifikationsstrategien mit chemischen Katalysatoren ist ein wachsendes Forschungsfeld.^[47] Als Beispiel ist ein Chloridionen-Sensor zu nennen, in dem der Analyt als allosterischer Regulator wirkt und einen synthetischen Katalysator „anschaltet“.^[48] In einem Assay, das von Anslyn *et al.* entwickelt wurde,^[49, 50] interagiert ein Metallionen-Analyt (das Primärsignal) mit einem macrocyclischen Rezeptor und ersetzt dabei ein anderes, bereits gebundenes Metallion. Letzteres (das übertragene Signal) assoziiert als Cofaktor mit einem Präkatalysator zum aktiven, signalamplifizierenden Katalysator.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Prototyp einer autonomen Signalkaskade für die Detektion von Biomolekülen auf Basis der Signaltransduktion Biomolekül \Rightarrow Metallion entwickelt. Das freigesetzte Metallion aktiviert dabei als Cofaktor einen Katalysator. Als Präkatalysatoren, die durch das freigesetzte Metallion aktiviert werden, kommen sowohl chemische Systeme als auch Apoenzyme in Frage.

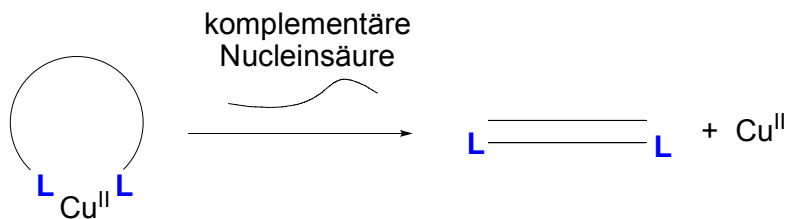
Die Destabilisierung eines M^{II} -Komplexes von L_2 DNA durch Bindung komplementärer DNA wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in ein Detektionsverfahren umgesetzt:^[51] Das Metallion wird freigesetzt und aktiviert als Cofaktor entweder einen chemischen Präkatalysator oder ein Apoenzym, wodurch die zweite Stufe einer Signalkaskade zu einem amplifizierten Signal führt.



Schema 4.1 Nachweis von DNA („Primärsignal“) durch eine zweistufige Signalkaskade mit allosterischer Signaltransduktion. Die Target-DNA destabilisiert die Wechselwirkung von L_2 DNA („Primärrezeptor“) mit M^{II} . Das Metallion wird in Gegenwart eines konkurrierenden Liganden (oder eines Apoenzyms) freigesetzt („übertragenes Signal“) und bildet den aktiven Katalysator (oder das Holoenzym), der das amplifizierte fluorimetrische oder colorimetrische Signal erzeugt.

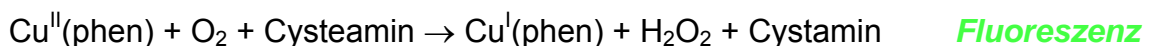
4.1 Signalamplifikation durch chemische Katalyse

Die Amplifikation beruht hier auf einer allosterischen Transduktion des Primärsignals in ein Cu^{II} -Metallionensignal (vgl. **Schema 4.1**). Kupfer(II) fungiert als Cofaktor und aktiviert einen chemischen Redoxpräkatalysator, der dann ein nichtfluoreszierendes Substrat in ein stark fluoreszierendes Produkt umwandelt. Das Prinzip der allosterischen Signalwandlung ist in **Schema 4.2** verdeutlicht: In Abwesenheit von komplementärer DNA liegt Cu^{II} im koordinativ gesättigten Bischelatkomplex $(\text{L}_2\text{DNA})\text{Cu}^{\text{II}}$ vor und ist damit katalytisch inaktiv. In Anwesenheit von komplementärer DNA (Signal) wird durch Ausbildung der starren Doppelhelix der Bischelat-Komplex destabilisiert. Jetzt kann das Cu^{II} -Ion von anderen im Reaktionsgemisch enthaltenen Liganden wie 1,10-Phenanthrolin (phen) komplexiert und als $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})$ katalytisch aktiv werden.



Schema 4.2 Prinzip der allosterischen Signalwandlung bei Hybridisierung von $(\text{L}_2\text{DNA})\text{Cu}^{\text{II}}$ mit komplementärer Nucleinsäure (dem „Primärsignal“).

Die von $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})$ katalysierten Reaktionen verlaufen analog zu den Redoxreaktionen am DNA-Templat (Kapitel 3): $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})$ oxidiert ein Thiol (hier: Cysteamin) zum Disulfid (hier: Cystamin) und die dabei generierten reaktiven Sauerstoffspezies führen zur Oxidation des fluorogenen Farbstoffs DCFH zum fluoreszierenden DCF:



4.1.1 Vorversuche

Um geeignete Liganden **L** zu finden, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt: 22 Liganden (aromatische Amine, Aminosäuren, aliphatische cyclische und lineare Amine) wurden im hundertfachen Überschuss zu dem Katalysator Cu^{II}(phen) gegeben, und die Oxidation des Thiols Cysteamin über die entstehende Fluoreszenz von DCF beobachtet (**Abb. 4.1**). Besonders geeignet für eine Anwendung im DNA-Konjugat erschienen die Liganden, die durch Bildung stabiler Bischelat-Komplexe mit Cu^{II} die Oxidationskatalyse durch Cu(phen) möglichst effizient hemmen. tacn (1,4,7-Triazacyclononan) hat unter den aliphatischen Aminen den größten Effekt, tpy (2,2':6',2''-Terpyridin) und Di-(2-picolyl)amin bei den aromatischen. Zunächst lag deshalb der Fokus auf der Synthese von tacn₂-Oligonucleotid-Konjugaten. Später wurden die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten tpy₂-Konjugate^[35] eingesetzt.

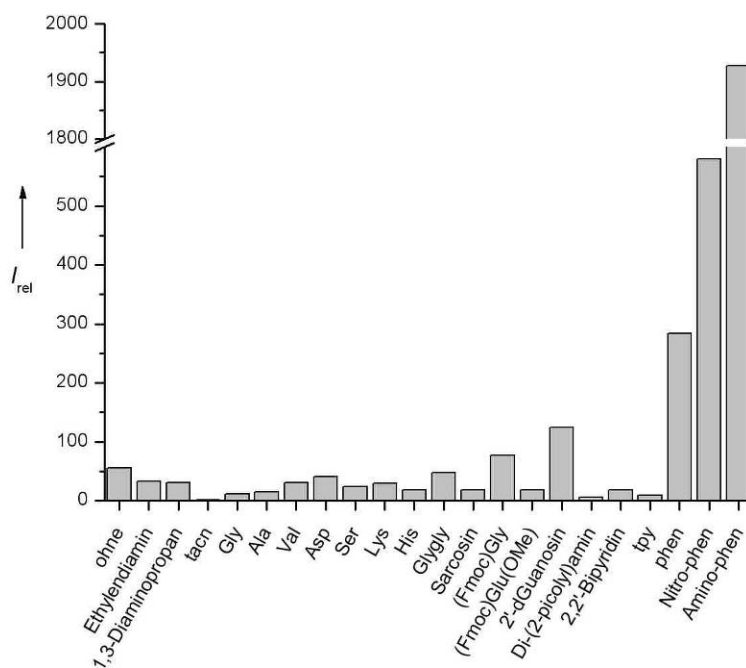


Abb. 4.1 Oxidation von DCFH zu DCF in Gegenwart 22 verschiedener Liganden.

2 μ M DCFH, 1 μ M CuSO₄, 1 μ M phen, 100 μ M **L**, 100 μ M Cysteamin bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C, $\Delta t = 10$ min.

In Anwesenheit von 1, 2 bzw. 4 Äq. tacn wird die Redoxaktivität von $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})$ deutlich eingeschränkt (**Abb. 4.2**). Die durch $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})$ katalysierte Oxidation von Cysteamin mit O_2 und die daran gekoppelte, ebenfalls $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})$ katalysierte Oxidation des Fluorogens durch eine reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 folgen einer komplizierten Kinetik.^[52] Der Intensitätsanstieg der DCF-Fluoreszenz bei $[\text{phen}] \gg [\text{tacn}]$ (vgl. blaue Linie in **Abb. 4.2**) lässt vermuten, dass es sich um eine autokatalytische Reaktion handelt. Dieses „Aufschaukeln“ der Reaktion wird durch die Anwesenheit von tacn gehemmt, und zwar umso stärker, je größer das Verhältnis $[\text{tacn}]:[\text{phen}]$ ist.

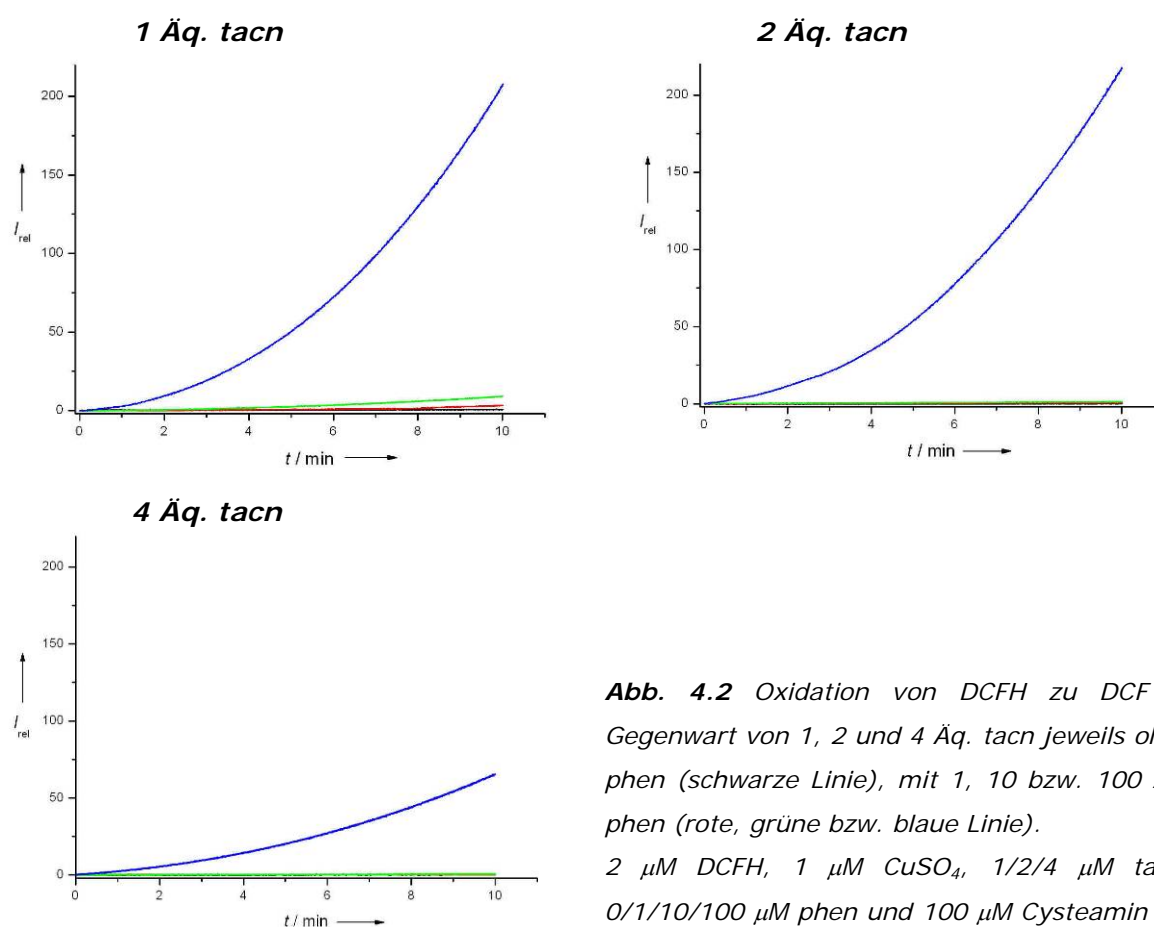


Abb. 4.2 Oxidation von DCFH zu DCF in Gegenwart von 1, 2 und 4 Äq. tacn jeweils ohne phen (schwarze Linie), mit 1, 10 bzw. 100 Äq. phen (rote, grüne bzw. blaue Linie). $2 \mu\text{M}$ DCFH, $1 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $1/2/4 \mu\text{M}$ tacn, $0/1/10/100 \mu\text{M}$ phen und $100 \mu\text{M}$ Cysteamin bei $\text{pH } 7,0$ (10 mM MOPS-Puffer) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten bei An- und Abwesenheit des Liganden phen (blaue / schwarze Linie in den Graphiken) konnte durch Verwendung anderer DCFH-Konzentrationen so verstärkt werden, dass nach 10 min dieser sogar mit dem Auge wahrnehmbar war.

Die Redoxaktivitäten von Cu(tpy)- und Cu(tpy)₂-Komplexen sind laut Literatur sehr gering^[53]. In der unterstehenden Graphik (**Abb. 4.3**) ist der Anstieg der DCF-Fluoreszenz in Gegenwart von 1, 2 bzw. 10 Äquivalenten tpy dargestellt. Die geringe katalytische Aktivität wird bestätigt und wird umso kleiner, je mehr tpy den Reaktionslösungen zugesetzt wird.

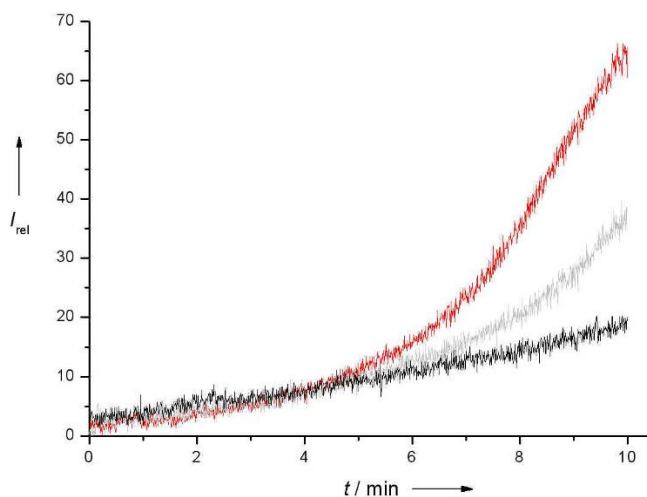


Abb. 4.3 Oxidation von DCFH zu DCF in Gegenwart von 1, 2 und 10 Äq. tpy. 10 μM DCFH, 1 μM CuSO₄, 10 μM phen, 1, 2 bzw. 10 μM tpy (rote, graue bzw. schwarze Linie) und 100 μM Cysteamin bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C.

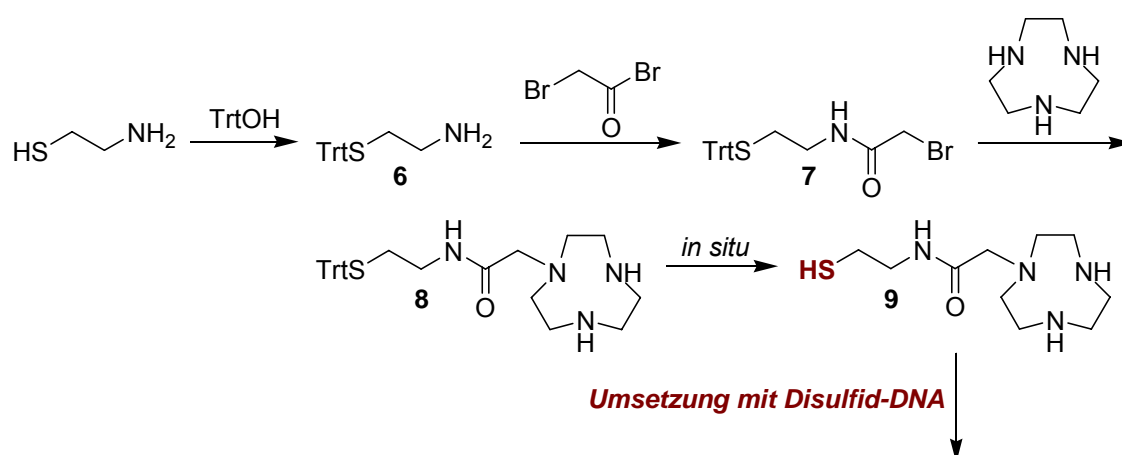
4.1.2 Modifizierung von DNA mit Chelatliganden

Die Synthese von N-funktionalisierten und für die Kopplung an Biomoleküle potentiell geeigneter Azamacrocyclen ist zwar oft beschrieben, allerdings nicht trivial.^[54]

Die Bis-Ligand-modifizierte DNA-Sonde sollte zunächst mit 1,4,7-Triazacyclononan aufgebaut werden. Syntheserouten sowohl in Flüssigphase als auch an der Festphase waren denkbar. Für die Flüssigphasensynthese, einen Thiol-Disulfid-Austausch, sollte ein Thiol- bzw. Disulfid-substituiertes tacn hergestellt werden (für die Umsetzung mit Disulfid- bzw. Thiol-DNA). Für die Festphasensynthese sollte ein Carbonsäure-modifiziertes tacn eingesetzt werden.

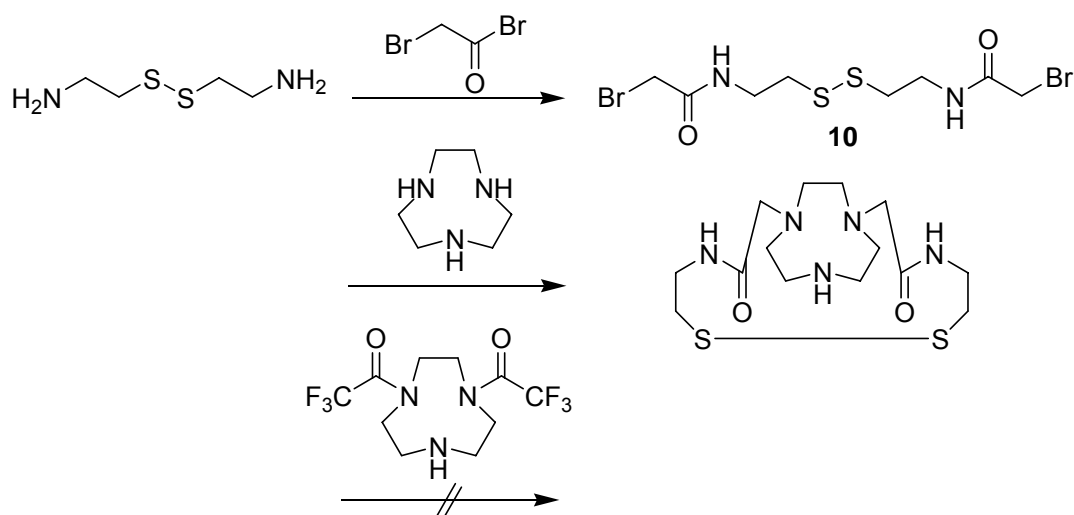
4.1.2.1 Synthese von Chelatliganden

Das Thiol-substituierte tacn **9** ist in 4 Stufen erhältlich (**Schema 4.3**). Für die Spaltung der S-Trt-Bindung im letzten Schritt wurden u. a. Schwermetallionensalze wie $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ oder AgNO_3 mit 1,4-Dithioerythritol getestet. Das Produkt konnte aber in keinem der Fälle sauber isoliert werden, und wurde deshalb für die Umsetzung mit DNA *in situ* verwendet.



Schema 4.3 Synthese von Thiol-modifiziertem tacn **9**.

Die Herstellung des tacn₂-Disulfids sollte in zwei Stufen erfolgen (**Schema 4.4**). Bei der Reaktion des Dibromids **10** mit tacn bildete sich nicht das gewünschte tacn₂-Disulfid, sondern vermutlich eine bicyclische Struktur durch intramolekulare Reaktion am tacn-Ring. Dies wurde durch ESI-Massenspektrometrie bestätigt. Die Umsetzung mit tfa₂-geschütztem tacn lieferte kein Produkt.



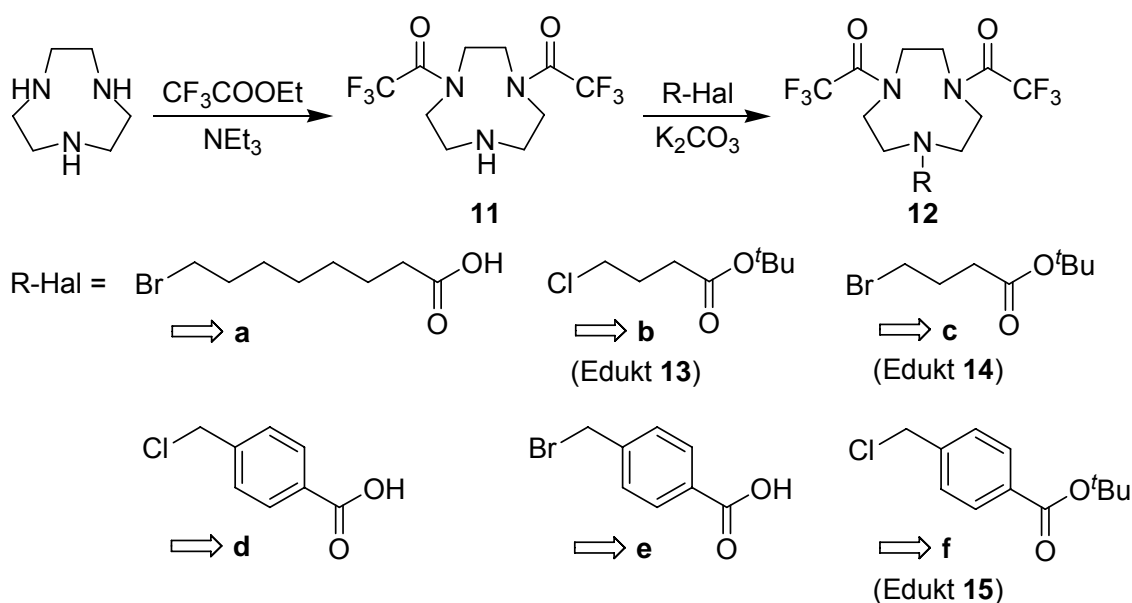
Schema 4.4 Versuch der Synthese von tacn₂-Disulfid.

Für die Festphasensynthese, d. h. die Kopplung einer Carboxylfunktion an aminomodifizierte DNA, wurde ein Carbonsäure-modifiziertes tacn benötigt.

Die Einführung eines Substituenten an tacn erfordert entweder das Schützen zweier N-Atome und nachfolgende Substitution am verbleibenden ungeschützten N-Atom oder die direkte Cyclisierung aus entsprechenden Bausteinen, die auch das gewünschte Substitutionsmuster ergeben. Beide Syntheserouten wurden ausgeführt.

Zunächst wurde das relativ teure, kommerziell erhältliche tacn mit zwei Trifluoracetylgruppen geschützt. Als säurestabile sowie basenlabile Schutzgruppen sind sie mit der DNA-Synthese kompatibel und werden erst am Ende der Festphasensynthese durch konz. NH₃ abgespalten. Yang *et al.* fanden, dass 4 Äquivalente des milden Acetylierungsmittels Ethyltrifluoracetat selektiv zu Bis-substituiertem tacn führen.^[55]

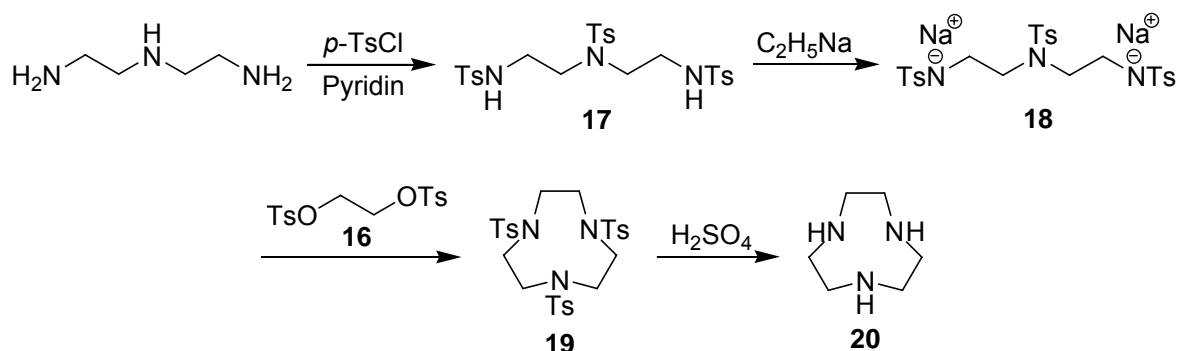
Sechs verschiedene Halogencarbonsäuren (**a – f** in **Schema 4.5**) wurden für die nachfolgende Substitutionsreaktion eingesetzt, wobei drei von ihnen zuvor noch ^tBu-geschützt wurden, um die Aufarbeitung zu erleichtern.



Schema 4.5 Synthese der tacn-Derivate **12 a – f**.

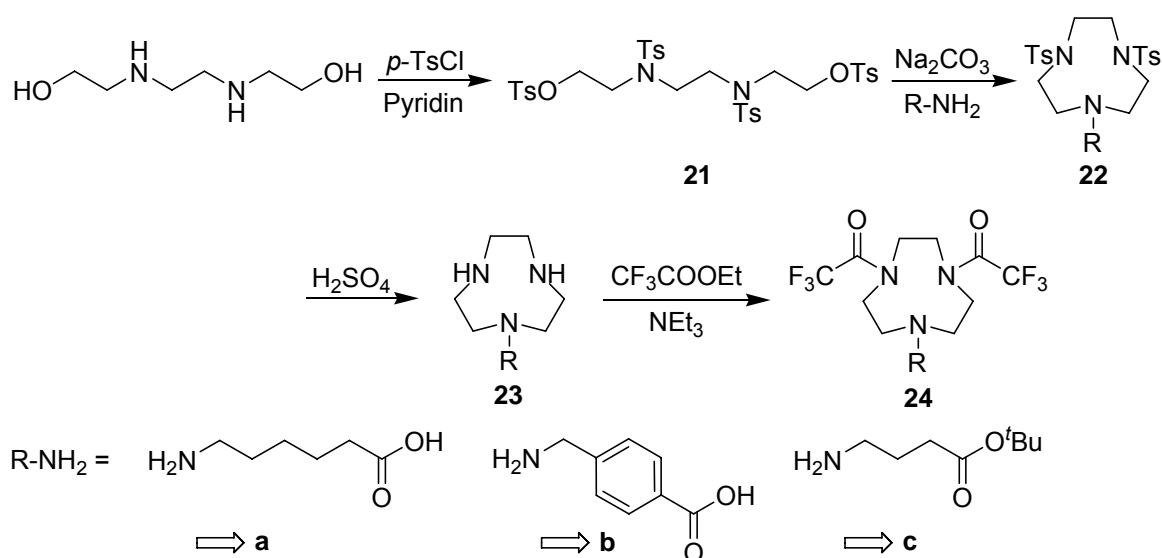
Substitutionsreaktionen mit R-Hal **a – f** an geschütztem tacn **11**.

Um größere Mengen des relativ teuren tacn einsetzen zu können, wurde dieses auch nach Literaturvorschrift synthetisiert. Die Substitutionsreaktionen (Schützen und Einführung von R) finden dann in Analogie zu den oben gezeigten Reaktionen statt.



Schema 4.6 Synthese von tacn **20**.

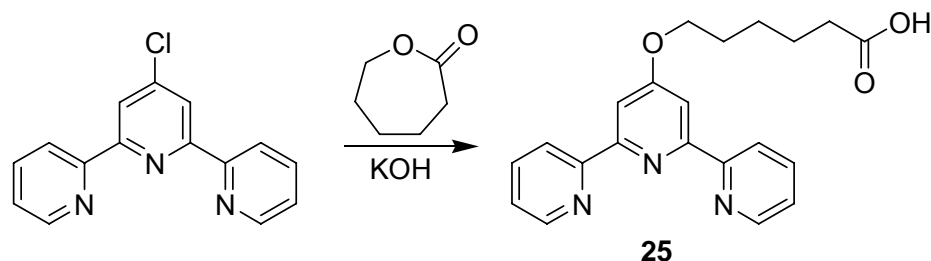
Trotz der Verwendung von stark alkylierenden Agenzien ist die Alkylierung von zweifach geschützten *taen* mit geringen Ausbeuten verbunden. Deshalb wurde als alternative Syntheseroute auch die Cyclisierung bereits N-substituierter Vorläufermoleküle getestet. Für diese Route benötigt man lediglich primäre Amine mit den entsprechenden Resten, diese reagieren mit *N,N'*-Ditosylgeschützten Ditosylatestern zum gewünschten macrocyclischen Ring^[56], sodass man in vier Stufen zu dem an DNA koppelbaren Carbonsäure-Derivat kommt.



Schema 4.7 Synthese der *taen*-Derivate **24 a - c**.

Cyclisierung mit den Aminocarbonsäuren **a - c**.

Das funktionalisierte Terpyridin **25** wurde in einer einstufigen Reaktion nach Literaturvorschrift erhalten:^[57]

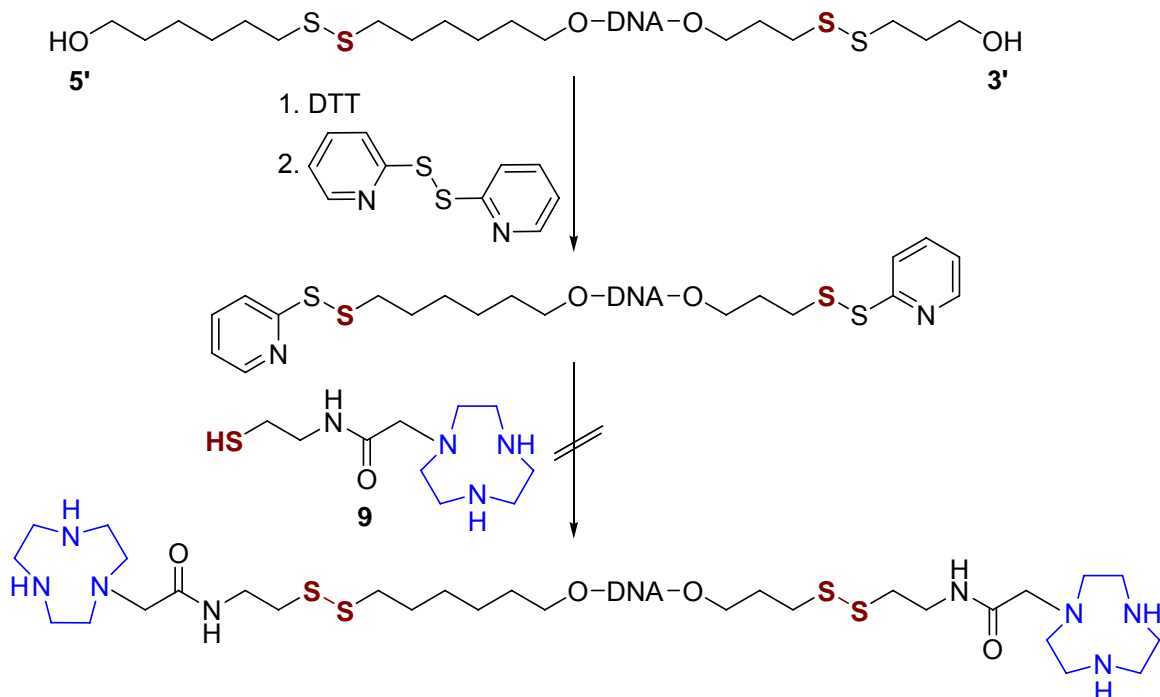


Schema 4.8 Synthese von 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)-hexansäure **25**.

4.1.2.2 Synthese von modifizierten DNAs (L₂DNAs)

a) Flüssigphasensynthese

Die Umsetzung des *in situ* hergestellten Thiol-funktionalisierten tacn **9** mit Bis(disulfid)-DNA über einen Thiol-Disulfid-Austausch lieferte nicht das gewünschte Produkt. Zur Aktivierung der Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion wurde die Disulfid-DNA zunächst mit DL-Dithiothreitol (DTT) gespalten und mit 2,2'-Dipyridyl-disulfid zum 2-Pyridyl-Disulfid umgesetzt (1. und 2. in **Schema 4.9**). Allerdings konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden.



Schema 4.9 Flüssigphasensynthese mit Thiol-Disulfid-Austausch.

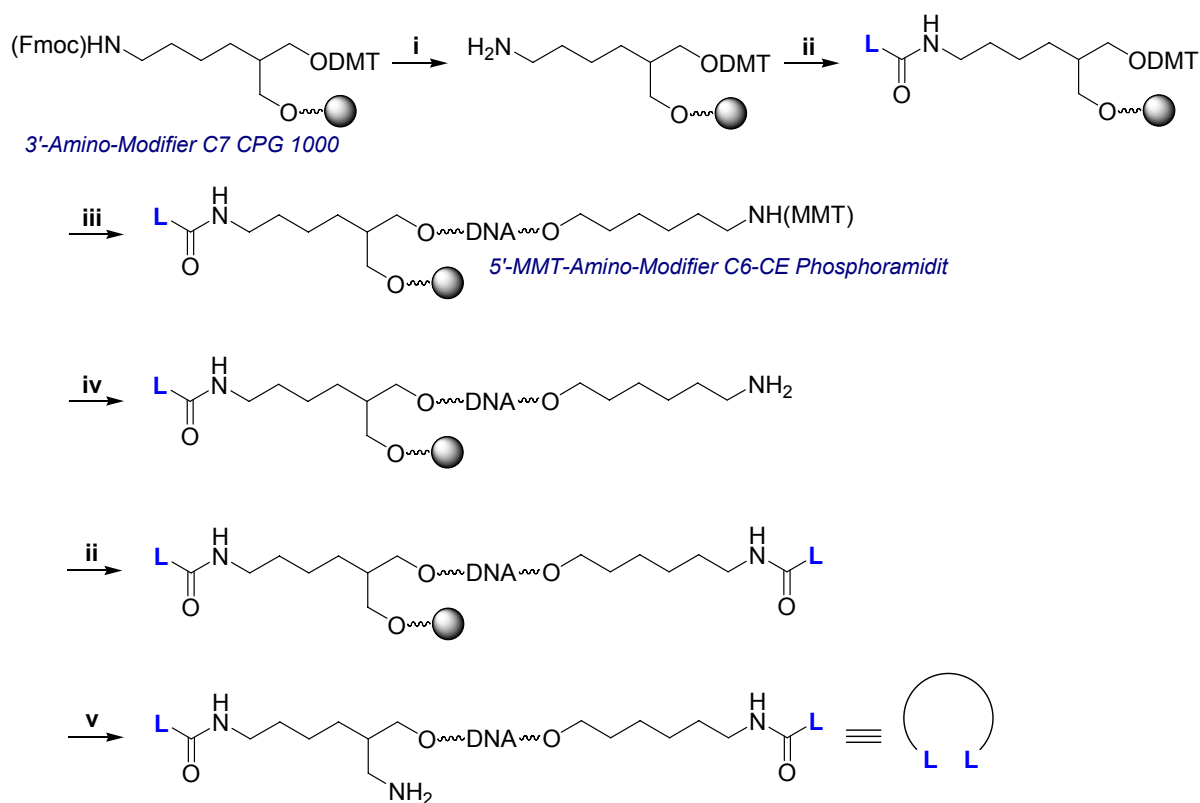
b) Festphasensynthese

Bei der Festphasensynthese sollten Amid-Bindungen zwischen Carbonsäuren und Amino-Funktionalitäten an der Festphase bzw. festphasengebundenen DNA geknüpft werden. Die Ausbeuten konnten durch Verwendung von käuflichen 3'- sowie 5'-Aminolinkern im Vergleich zu den zuvor eingesetzten in mehreren Stufen zu koppelnden Homoserin- (3'-Ende) und Ethylendiamin-Linkern (5'-Ende) stark verbessert werden.

***tacn*₂DNA und *tpy*₂DNA**

tacn wurde zunächst als im Arbeitskreis vorhandenes Carbonsäurederivat **29** (mit CH₂-Linker) eingesetzt. Es erfolgte die Herstellung eines 3',5'-modifizierten DNA-Trimers und -12mers **1**.

Von den übrigen Carbonsäurederivaten **12 a - f** und **24 a - c** konnten aufgrund der geringen Ausbeuten und teilweise noch enthaltenen Verunreinigungen lediglich zwei (**12 a** und **24 b**) erfolgreich an das 5'-Ende der DNA gekoppelt werden (DNA **2** und **3**). Das *tpy*-Carbonsäure-Derivat **25**, das in einer literaturbekannten Stufe in hohen Ausbeuten rein zu gewinnen ist, wurde ebenfalls eingesetzt (DNA **4**).



- i Piperidin
- ii *L*-COOH, HOBt, HBTU, DIEA
- iii DNA-Synthese
- iv TCA
- v NH₃ konz.

Schema 4.10 3',5'-Festphasensynthese *L*₂-modifizierter Oligo-DNAs.

Die für die Amidkopplungen eingesetzten Carbonsäuren sind in **Abb. 4.4** gezeigt und in **Tabelle 4.1** mit den resultierenden DNA-Konjugaten zusammengestellt.

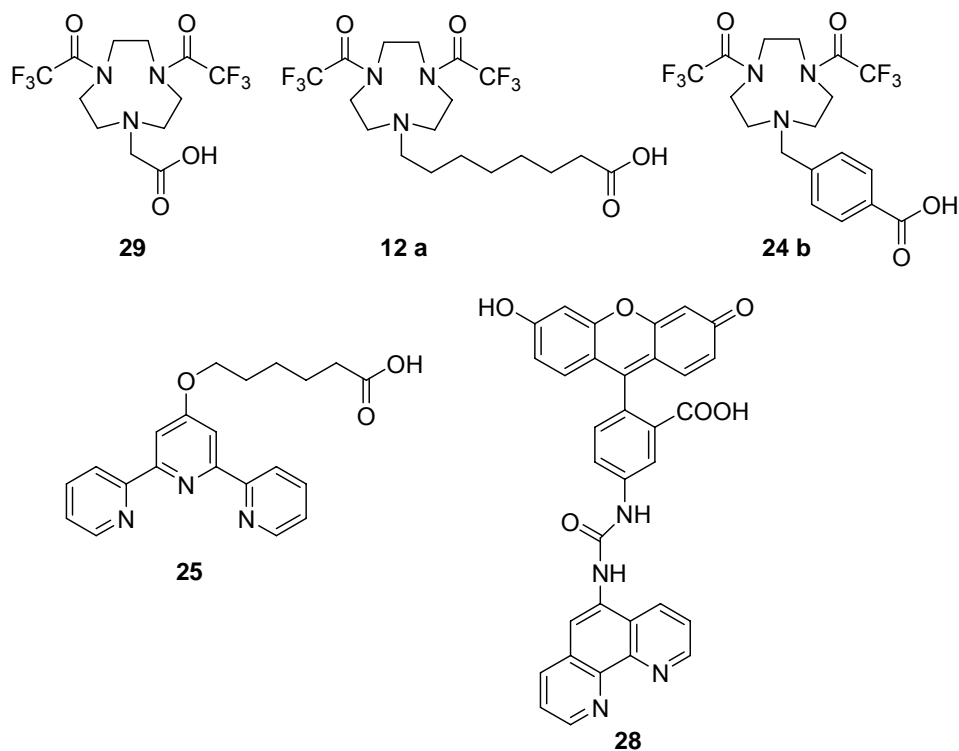


Abb. 4.4 Übersicht über die Carbonsäure-funktionalisierten Chelatliganden, die an aminomodifizierte DNA gekoppelt werden konnten.

Tabelle 4.1 Verwendete Carbonsäuren und deren DNA-Konjugate.

Derivat von	<i>L</i> -COOH	DNA-Sequenz	DNA
tacn	29	5'-LTCA.CAA.CTA.GCGL	1 ^a
		5'-LTCA	^b
	12 a	5'-LTCA.CAA.CTA.GCG	2
	24 b	5'-LTCA.CA	3
tpy	25	5'-LATC.GTT.ACC.AAA.GCA.TCG.TAL	4 ^c
	25	5'-ATC.GTT.ACC.AAA.GCA.TCG.TAL	12 ^{a, c}
Fluorescein		5'-LTCA.CAA.CTA.CA	5 ^b
Phen Green	28	5'-LTCA.CAA.CTA	6
Phen Green, tpy	28, 25	5'-LATC.GTT.ACC.AAA.GCA.TCG.TAL	7

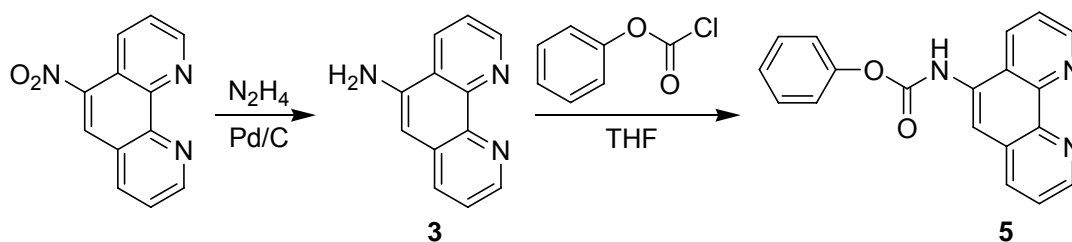
^a hier am 3'-Ende statt Amino-Modifizier Kopplung von Homoserin

^b zu Vergleichszwecken synthetisiert

^c zunächst von Dr. Mareike Göritz zur Verfügung gestellt

phen₂DNA

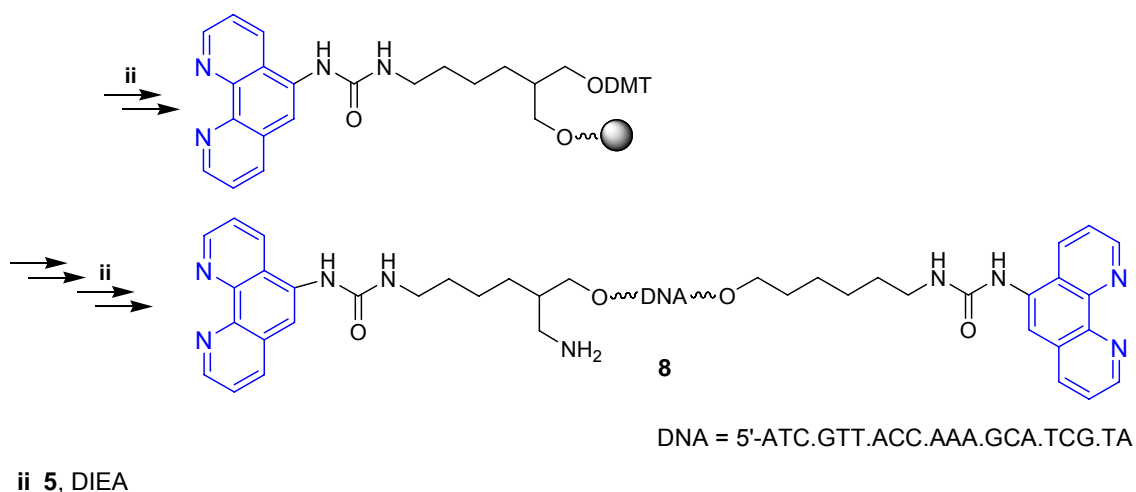
Die Synthese eines weiteren phen-Derivats **5**, das für die Synthese von DNA-Konjugaten eingesetzt wurde, ist in **Schema 4.11** gezeigt. **5** reagiert in hohen Ausbeuten mit Aminogruppen und die Produkte sind unter den Bedingungen der DNA-Abspaltung (konz. NH₃) stabil.



Schema 4.11 Synthese von Phenyl-1,10-phenanthroline-5-yl-carbamate **5**.

Die in Analogie zur tpy₂DNA hergestellte phen₂DNA zeigt vergleichbare Eigenschaften, d. h. die Ringbildung mit Metallionen. Die meisten bisher literaturbekannten Synthesen der phen- oder Neocuproin (das 2,9-Dimethyl-Derivat) -Konjugate sind sehr viel aufwendiger^[58] als die hier gezeigte. Man bediente sich bisher häufig der Flüssigphasensynthese nach einer mehrstufigen Synthese von Oligonucleotid-Bausteinen.

Die durchgeführte Festphasensynthese (**Schema 4.12**) entspricht der aus **Schema 4.10**, lediglich Schritt ii wurde ausgetauscht.



Schema 4.12 3',5'-Festphasensynthese phen₂-modifizierter Oligo-DNA **8**.

Bei Zugabe äquimolarer Mengen Zn^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , Cu^{II} und Fe^{II} erhält man im MALDI-Massenspektrum die charakteristischen Peaks $[\text{M}_{\text{DNA}}+\text{M}_{\text{M}}]^+$. Mithilfe von nicht-denaturierender Gelelektrophorese (**Abb. 4.5**) konnte aber nur beim Cu^{II} -Komplex eine für die cyclischen Komplexe typische^[35] höhere Mobilität im Vergleich zum metallfreien Oligonucleotid **8** festgestellt werden. Die Cu^{II} -, Co^{II} - und Ni^{II} -enthaltenden Oligonucleotide konnten nach Elution aus dem Gel durch MALDI-Massenspektrometrie detektiert werden. Im Gel wird kein deutlicher Spot für den Fe^{II} -Komplex beobachtet. Dies könnte mit der hohen Tendenz des Fe^{II} zusammenhängen, oktaedrische tris(phen)-Komplexe und damit oligomere Strukturen zu bilden.

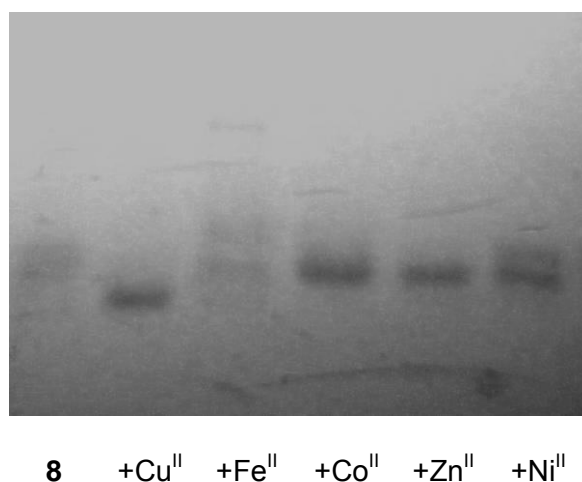


Abb. 4.5 PAGE-Analyse von (**8**)M.

Nicht-denaturierende 20%ige Polyacrylamid-Gelelektrophorese (50 mM TRIS-Puffer pH 7,5 mit 100 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ bei 4 °C) mit je 10 μl 10^{-4} M (phen_2DNA)M-Lösung pro Spur. Die Banden wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht.

In der Literatur ist lediglich ein Beispiel für eine cyclische Struktur eines 11mer Oligoribonucleotids mit zwei durch fünf Nucleobasen voneinander getrennte Neocuproin-Einheiten (mit Cu^{II} komplexiert) beschrieben.^[59]

Fluoreszierende L₂DNA-Sonden

Sonden des Typs L₂DNA, in denen ein Chelatligand L an ein Fluorophor gekoppelt ist, eröffnen die Möglichkeit, die Wechselwirkung mit dem Metallion und eventuell die „Ringöffnung“ direkt durch Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgen zu können. Zusätzlich sind die in Gegenwart von Metallionen fluoreszenzgelöschten Systeme als eine neue Klasse von Molecular Beacons von Interesse, in der die Fluorophor-Quencher-Wechselwirkungen durch koordinative Bindung kontrolliert und in ihrer Stärke eingestellt werden können.

Als Fluorophor kam der chelatisierende Fluoreszenzfarbstoff Phen Green in Frage, der beispielsweise dazu genutzt wird, den Eisen-^[60] und Kupfergehalt^[61] in tierischen Leberzellen über Fluoreszenzlöschung zu bestimmen. Phen Green ist bei der Firma Molecular Probes in zwei verschiedenen Formen erhältlich (SK und FL, **Abb. 4.6**), allerdings zu sehr hohen Preisen. Deshalb wurden Phen Green FL sowie ein Analogon von Phen Green SK synthetisiert.

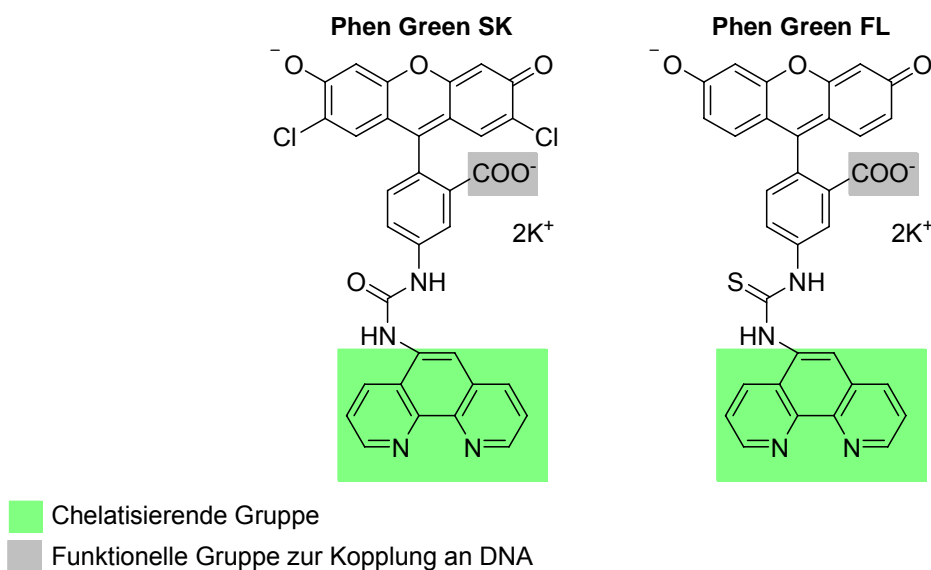
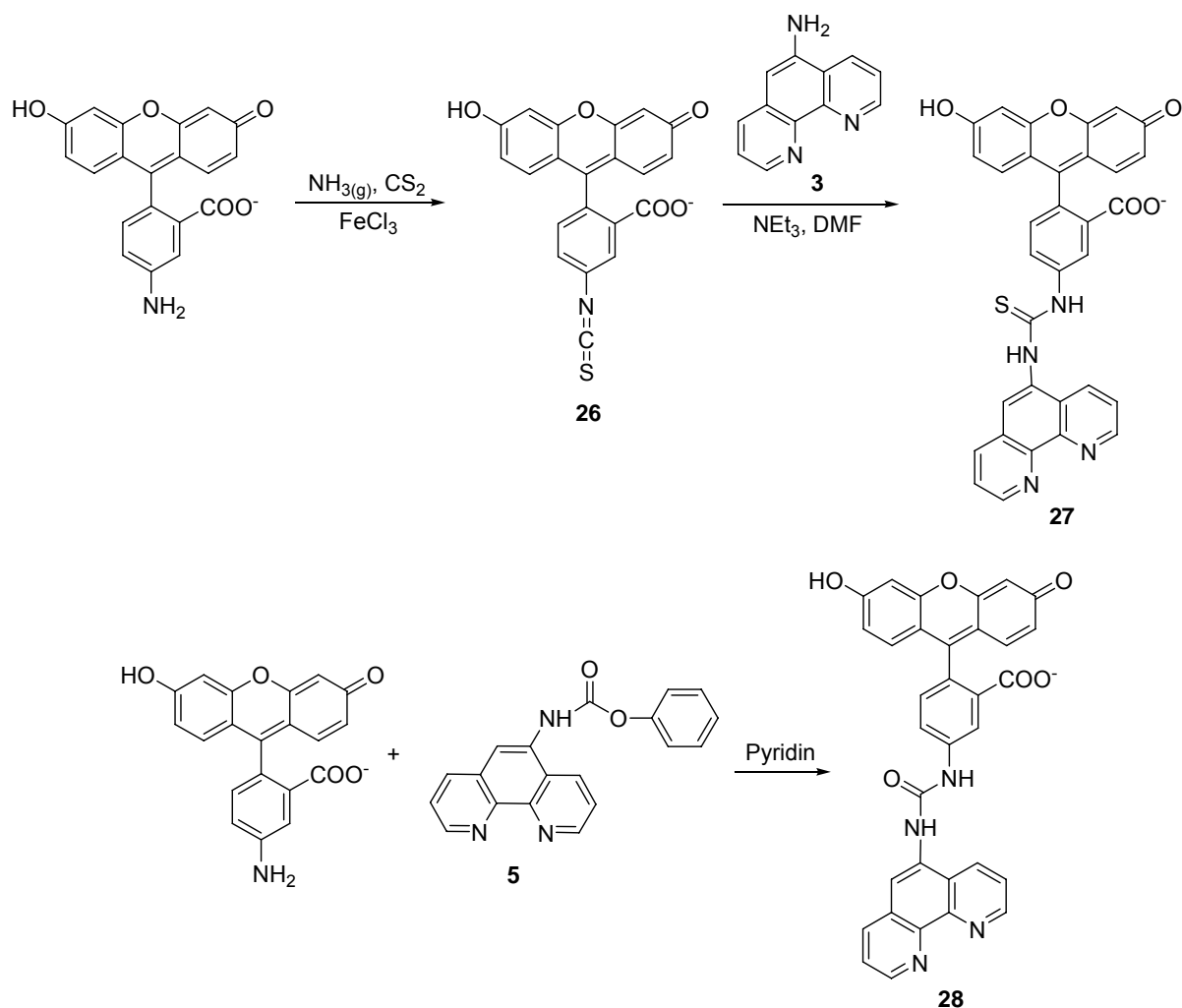


Abb. 4.6 Chelatisierende Fluorescein-Derivate für die Kopplung an aminomodifizierte DNA.

Phen Green FL **27** wurde ausgehend von Fluorescein-Isothiocyanat **26** und 5-Amino-1,10-phenanthrolin **3** hergestellt. Das Phen Green SK-Analogon **28** ist nicht Chlor-substituiert und wurde durch Kopplung von 5-Aminofluorescein mit dem phen-Derivat **5** in einer Stufe erhalten (**Schema 4.13**).



Schema 4.13 Synthese von Phen Green FL **27** (**oben**) sowie eines Phen Green SK-Analogons **28** (**unten**).

Die Kopplung von Fluorescein über die 2'-Carboxylfunktion an aminomodifizierte DNA ist in hohen Ausbeuten möglich, ebenso wie die literaturbeschriebene Kopplung von Eosin^[62]. Die Thioharnstoff-Verknüpfung zwischen Phenanthrolin und Fluorescein in Phen Green FL (**27** in **Schema 4.13 oben**) ist jedoch nicht kompatibel mit den Standardbedingungen der DNA-Festphasensynthese (NH_3 -Behandlung während der Abspaltung der Oligonucleotide von der Festphase). Wir haben daher ein Analogon von Phen Green SK (im Folgenden nur noch mit Phen Green bezeichnet) mit einer Harnstoff-Verknüpfung entwickelt, das NH_3 -stabil ist (**28** in **Schema 4.13 unten**). Die Kopplung an 5'-aminomodifizierte DNA über die 2'-Carboxylatgruppe gelang in hohen Ausbeuten.

4.1.3 Thermodynamische und kinetische Untersuchungen

Von den in Kapitel 4.1.2.2 beschriebenen synthetisierten DNA-Konjugaten standen nicht alle in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung, um zusätzliche Studien durchzuführen. Die Untersuchungen beschränken sich daher hier auf die DNAs **4** (tpy₂DNA), **6** (Phen Green-DNA) und **7** (Phen Green/tpy-DNA).

4.1.3.1 (tpy₂DNA)M

Für den direkten Nachweis von (tpy₂DNA)M-Komplexen und deren Hybride mit komplementären Nucleinsäuren wurden UV- und ESR-Spektroskopie eingesetzt. Dabei liefert die ESR-Spektroskopie Informationen über die koordinative Umgebung paramagnetischer Metallionen wie Cu^{II} und erlaubt die Unterscheidung von cyclischen Bichelat-Komplexen (tpy₂DNA)M und acyclischen Komplexen, in denen nur eine tpy-Einheit an das Metall koordiniert. Mithilfe der UV-Spektroskopie kann die Anwesenheit von Metallionen (Cu^{II} oder Zn^{II}) im (tpy₂DNA)M-Komplex durch charakteristische Absorptionsbanden nachgewiesen werden.

Die Koordination des Kupfer(II)-Ions durch beide Terpyridin-Einheiten in (tpy₂DNA)Cu konnte sowohl durch UV-spektrophotometrische Titration als auch durch ESR-Spektroskopie bestätigt werden.

Das UV-Spektrum von tpy₂DNA **4**, das bei Zugabe von einem Äquivalent Cu^{II} erhalten wird (**Abb. 4.7 rechts**, rote Linie), ähnelt dem von (tpy)₂Cu^[63] (**Abb. 4.7 links**, rote Linie) und wird dem cyclischen Bichelat (**4**)Cu zugeschrieben; das Spektrum, das bei Zugabe von zwei Äquivalenten Cu^{II} erhalten wird (**Abb. 4.7 rechts**, grüne Linie), ist ähnlich dem von (tpy)Cu (**Abb. 4.7 links**, grüne Linie) und wird (**4**)Cu₂ zugeschrieben, in dem jedes tpy von einem Cu^{II} koordiniert wird.

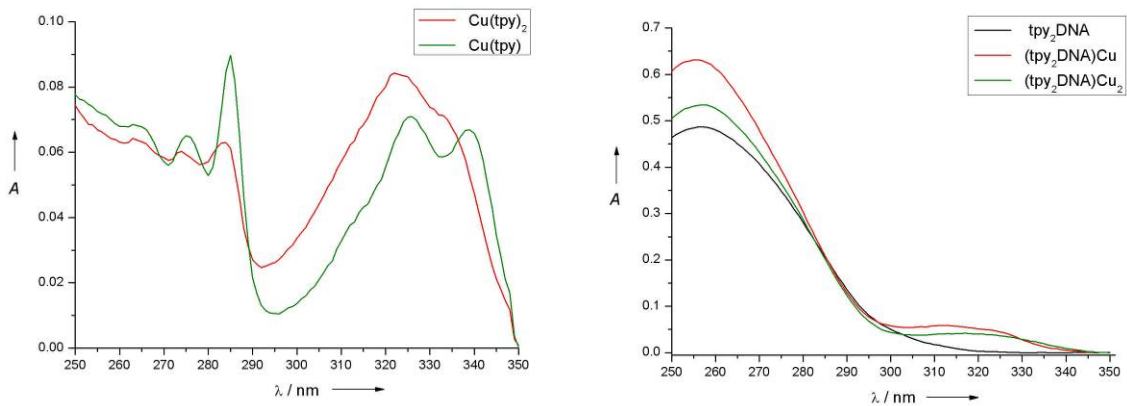


Abb. 4.7 Vergleich der UV-Spektren von $2 \mu\text{M}$ $\text{Cu}(\text{tpy})_{1/2}$ (links) und $(4)\text{Cu}_{1/2}$ (rechts). Die Lösungen enthalten außerdem $0,1 \text{ M}$ NaCl bei $\text{pH } 7,4$ ($0,1 \text{ M}$ TRIS-Puffer) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Betrachtet werden die Banden bei 320 nm , da die restlichen charakteristischen Banden in tpy_2DNA von der Absorption der Nucleobasen bei 260 nm überdeckt sind.

$(4)\text{Cu}$ zeigt ein charakteristisches ESR-Signal (durchgezogene Linie in **Abb. 4.8**): Das ESR-Spektrum einer $4/\text{CuSO}_4$ -Mischung ist vergleichbar mit dem von $(\text{tpy})_2\text{Cu}$ ($g_{\parallel} = 2,23$, $A_{\parallel} = 156 \text{ G}$). Für $[(\text{tpy})\text{Cu}(\text{OH}_2)]^{2+}$, das man durch Mischen von tpy und CuSO_4 im Verhältnis $1:1$ erhält, misst man hingegen $g_{\parallel} = 2,26$ und $A_{\parallel} = 165 \text{ G}$.

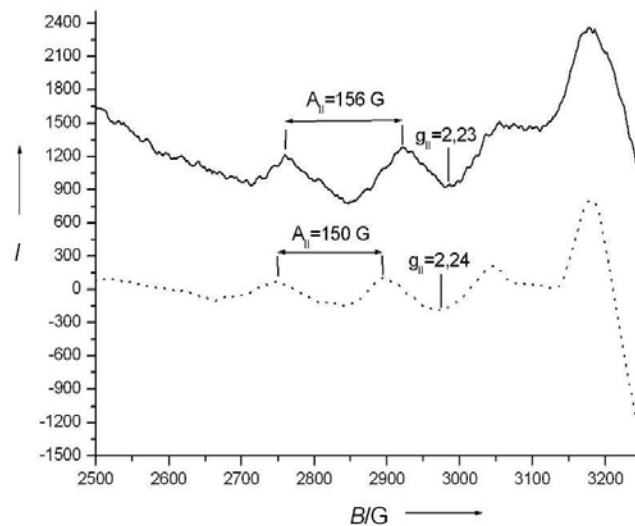


Abb. 4.8 ESR-Spektren von $(4)\text{Cu}$ und $\text{Cu}(\text{tpy})_2$. Durchgezogene Linie: ESR-Spektrum einer $4/\text{CuSO}_4$ -Mischung ($58 \mu\text{M}/47 \mu\text{M}$) in Wasser:Glycerin = $7:3$ mit $0,1 \text{ M}$ NaCl bei $\text{pH } 7,0$ (10 mM MOPS-Puffer) und $-196 \text{ }^\circ\text{C}$. Gestrichelte Linie: Spektrum von $\text{Cu}(\text{tpy})_2$ (in situ hergestellt durch Mischen von $200 \mu\text{M}$ tpy und $70 \mu\text{M}$ CuSO_4) unter den gleichen Bedingungen.

Das bei Titration von tpy_2DNA **4** mit ZnSO_4 erhaltene UV-Profil (**Abb. 4.9**) ähnelt dem von $\text{Zn}(\text{tpy})_2$. Auch in $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Zn}$ ist demnach von der Koordination beider Terpyridin-Einheiten an das Metallion auszugehen.

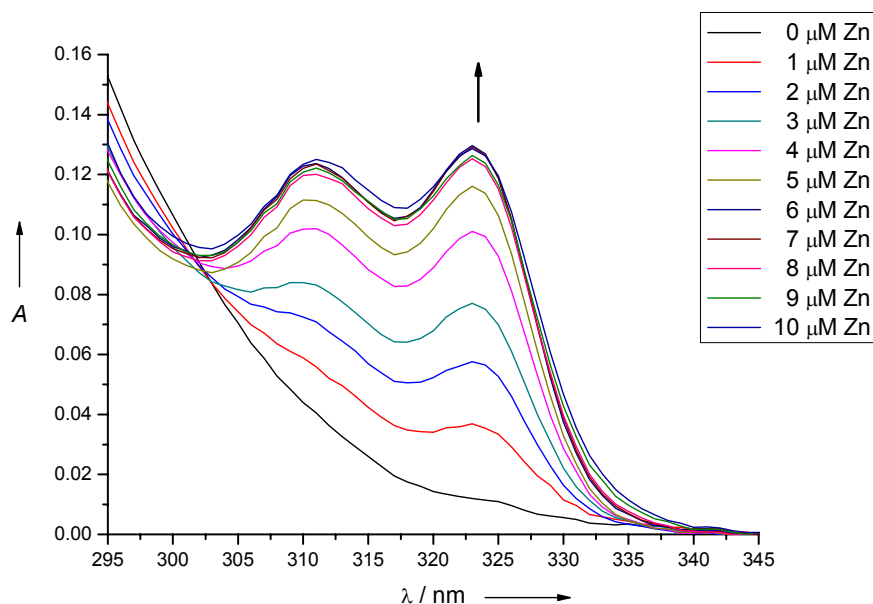


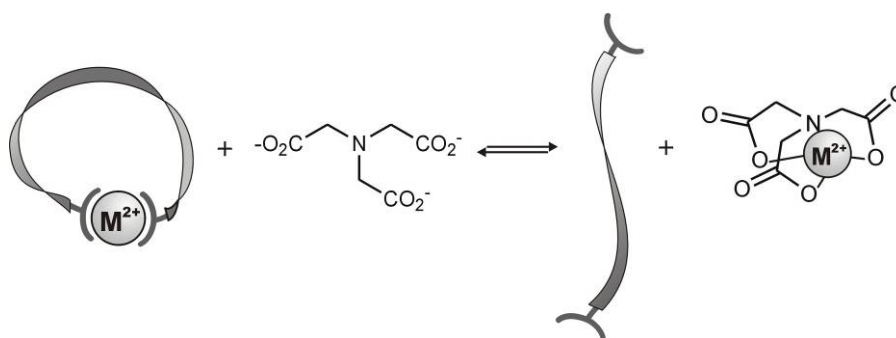
Abb. 4.9 Titration von tpy_2DNA **4** mit ZnSO_4 .

Die Konzentrationen in der Küvette betragen $5 \mu\text{M}$ DNA **4**, $0 - 5 \mu\text{M}$ ZnSO_4 , $0,1 \text{ M}$ NaCl bei pH $7,0$ (10 mM MOPS-Puffer) und 25°C . Die Umwandlung von $(\mathbf{4})\text{Zn}$ zu $(\mathbf{4})\text{Zn}_2$ kann aufgrund der geringen Änderungen im Spektrum nicht photometrisch detektiert werden.

Neben der qualitativen Charakterisierung wie bei $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Cu}$ wurde der Bischelat-Komplex $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Zn}$ auch hinsichtlich seiner thermodynamischen (Komplexstabilität) und kinetischen Stabilität (Dissoziationsgeschwindigkeit) in Lösung analysiert. Durch intramolekulare Bischelatisierung sollten die $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Zn}$ -Komplexe gegenüber den literaturbekannten $\text{Zn}(\text{tpy})_2$ -Komplexen erheblich stabilisiert werden.

Die UV-spektrophotometrische Verfolgung der Komplexbildung von Zn^{II} durch tpy_2DNA anhand der $\text{Zn}(\text{tpy})_{1/2}$ -Bande bei 323 nm wurde auch genutzt, um die konkurrierende Komplexbildungsreaktion mit tpy_2DNA und einem Chelatliganden L, der nicht im UV-Bereich absorbiert und in variabler Konzentration eingesetzt werden kann, zu verfolgen. L und tpy_2DNA sollten Metallkomplexe nicht zu unterschiedlicher Stabilität bilden, und L sollte nicht zur Bildung ternärer Komplexe $\text{Zn}(\text{tpy})(\text{L})$ neigen, sondern das Metall aus tpy_2DNA

extrahieren. Illustriert ist dies in **Schema 4.14** mit dem vierzähligen Liganden Nitrilotriacetat (NTA).



Schema 4.14 Bestimmung von Komplexbildungskonstanten $\log K$ und Dissoziationsraten k_d der $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{M}$ -Komplexe ($M = \text{Zn}$) über die Reaktion mit Nitrilotriacetat (NTA).

NTA stellte sich jedoch als zu schwacher Ligand heraus ($\log K = 8$ für Zn), denn auch die Zugabe von 1000 Äquivalenten dieses Liganden hatten keinen Effekt. Der Ligand konnte aber für Stabilitätsbestimmungen von $(\text{tpyDNA})\text{Zn}$ -Komplexen herangezogen werden, wobei sich ergab, dass $\log K$ von $(\text{tpyDNA})\text{Zn}$ ungefähr im Bereich von $\text{Zn}(\text{NTA})$ liegt.

Statt NTA wurde zunächst EDTA ($\log K_{\text{eff}} = 13$ für Zn bei pH 7) eingesetzt: Ein 1:1-Verhältnis von tpy_2DNA - und EDTA-Komplex liegt im thermodynamischen Gleichgewicht mit $5 \mu\text{M}$ $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Zn}$ bei einer EDTA-Konzentration von $375 \mu\text{M}$ vor. Daraus wurde die Komplexbildungskonstante $\log K = 14,8$ für $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Zn}$ errechnet. Dies bestätigt, dass die Stabilitätskonstante durch intramolekulare Bischelatisierung der beiden tpy-Einheiten im Vergleich zu $\text{Zn}(\text{tpy})_2$ deutlich erhöht wird (vgl. $\log K = 6$ für $\text{Zn}(\text{tpy})$).

Für die kinetischen Bestimmungen wurde der Ligand *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethyldiamin (tpen, Stabilitätskonstante $\log K_{\text{eff}} = 15$ für Zn bei pH 7^[64]) verwendet, da zu große EDTA-Konzentrationen ($> 2\text{mM}$) benötigt wurden, um Zn bei Raumtemperatur vollständig zu extrahieren. Die charakteristische Absorption des $\text{Zn}(\text{tpy})_2$ -Komplexes von $(4)\text{Zn}$ bei 323 nm (A_{323}) nimmt in Gegenwart von tpen mit der Zeit aufgrund der Bildung eines $\text{Zn}(\text{tpen})$ -Komplexes ab. Die Absorption A_{323} wurde über 40 h verfolgt und deren Verlauf ist in **Abb. 4.10** dargestellt.

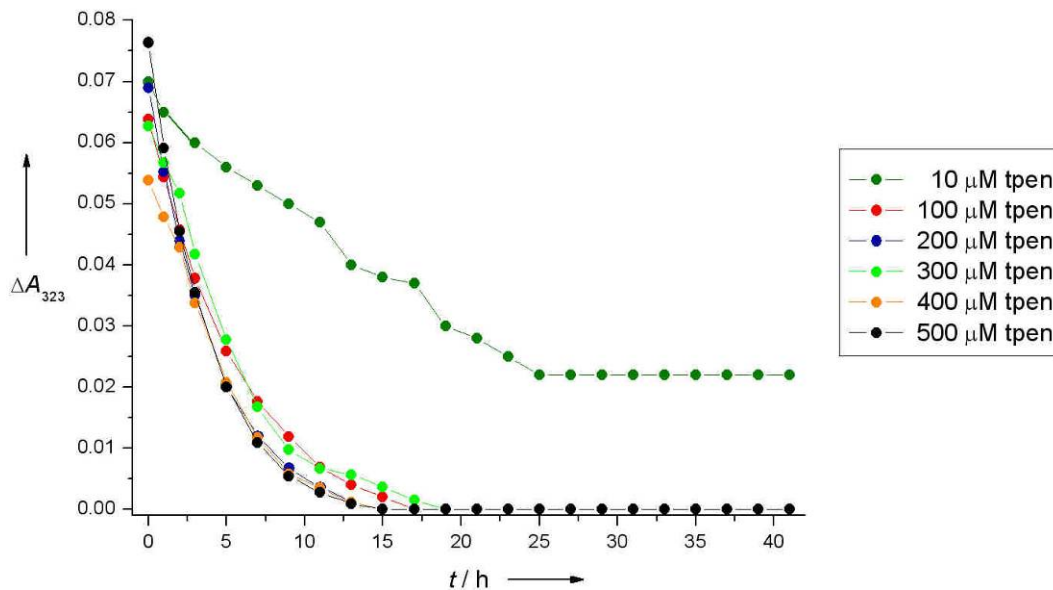


Abb. 4.10 Kinetik der Dissoziation des (4)Zn-Komplexes bei verschiedenen tpen-Konzentrationen.

Abfall der Zn(tpy)₂-Bande von (4)Zn bei 323 nm relativ zu A₃₂₃ von 4 ohne Zn (ΔA_{323}) in Gegenwart von tpen mit der Zeit. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 5 μ M DNA 4, 5 μ M ZnSO₄ und 0,1 M NaCl bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C.

Ab einer Konzentration von 100 μ M tpen ist nach 18 h die Zn-Extraktion aus (tpy₂DNA)Zn vollständig abgelaufen ($\Delta A_{323} = 0$). Ein 1:1-Verhältnis von tpy₂DNA- und tpen-Komplex liegt im thermodynamischen Gleichgewicht mit 5 μ M (tpy₂DNA)Zn bei einer tpen-Konzentration von 10 μ M vor (vgl. **Abb. 4.10**). Daraus wurde die Komplexbildungskonstante $\log K = 14,7$ für (tpy₂DNA)Zn errechnet. Im Rahmen der Messgenauigkeit konnte damit die Komplexbildungskonstante mit einem zweiten Liganden reproduziert werden. Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Zn-Extraktion bei tpen-Konzentrationen ≥ 100 μ M unabhängig von der Konzentration ist, handelt es sich nicht um eine Reaktion zweiter Ordnung. Die Dissoziationsgeschwindigkeit wird somit von der Frequenz der DNA-Ringöffnung bestimmt. Die Halbwertszeit dafür liegt im Bereich von etwa $t_{1/2} = 5$ h, woraus sich eine Dissoziationsrate von $k_d = \ln 2 / t_{1/2} \approx 0,1$ h⁻¹ für (tpy₂DNA)Zn ergibt. Bei (tpy₂DNA)Zn handelt es sich demnach um einen kinetisch sehr stabilen Zink-Komplex.

4.1.3.2 (Phen Green/tpy-DNA)M

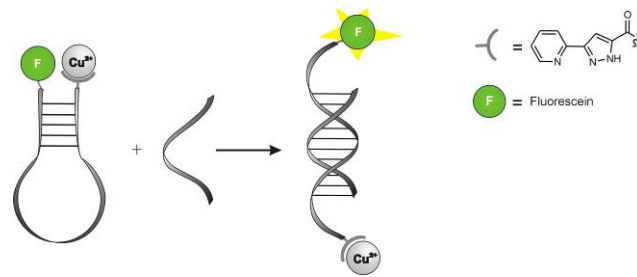
Die fluoreszierende Sonde L₂DNA (**Schema 4.15**), in der eine chelatisierende Gruppe L an Fluorescein gekoppelt ist, bietet den Vorteil der fluorimetrischen Beobachtung der Metallbindung. Dadurch kann das Verhalten der Sonde auch in submikromolaren Konzentrationen analysiert werden, insbesondere auch die Ringöffnung bei Hybridisierung. Daneben ist dieses System auch als Molecular Beacon („molekulares Leuchtfeuer“) von Interesse.



Schema 4.15 Fluoreszierende Sonde mit zwei Chelatliganden für den Cu^I-Nachweis.
Ein Chelatligand L ist über Fluorescein an die DNA gekoppelt.

Molecular Beacons wurden erstmals 1996 beschrieben.^[65] Der Prototyp des Molecular Beacon ist ein partiell selbstkomplementäres DNA-Oligonucleotid mit Haarnadel-Struktur, das terminal mit einem Fluorophor und einem Quencher modifiziert ist. Im „geschlossenen“ Zustand führt die räumliche Nähe von Fluorophor und Quencher zu einer Fluoreszenzlöschung. Die Hybridisierung mit komplementärer Nucleinsäure führt zu einer Konformationsänderung und räumlichen Trennung von Fluorophor und Quencher, das Fluoreszenzsignal nimmt zu. Große Anwendungspotentiale werden in der funktionellen Genomik und medizinischen Diagnostik gesehen. Damit dieses Potential voll ausgeschöpft werden kann, muss das Design der Molecular Beacons optimiert werden, insbesondere im Hinblick auf die Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses.^[66]

Abgesehen von der allosterischen Wirkung ist die Fähigkeit von Metallionen, in Oligonucleotid-Konjugaten Fluorophore effizient zu quenchen relevant. Erstmals demonstriert wurde dies in unserer Arbeitsgruppe an einem „metallgelöschten“ Molecular Beacon.^[67]



Schema 4.16 Metallgelöschter Molecular Beacon mit Haarnadel-Struktur.^[67]

Die Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff Fluorescein und dem Fluoreszenzlöschler Cu^{II} wird bei Hybridisierung unterbunden, das Fluoreszenzsignal nimmt zu.

Im abgebildeten Prototyp (**Schema 4.16**) ist die Wechselwirkung zwischen dem paramagnetischen Cu^{II} -Ion und dem Fluorophor Fluorescein schwach und muss durch eine selbstkomplementäre Stammregion unterstützt werden. Dieser Prototyp wurde zu einer Sonde weiterentwickelt, von der man Vorteile im Vergleich zu literaturbeschriebenen, kommerziell erhältlichen Molecular Beacons mit organischen Quenchern erwartet: Ein hohes Signal/Hintergrund-Verhältnis durch effiziente Kontaktlöschung des Fluorophors, eine schnelle Hybridisierung und eine verbesserte Selektivität durch Wegfall der selbstkomplementären Stammregion.

Stammlose herkömmliche Molecular Beacons haben normalerweise einen viel zu hohen Hintergrund, da sich die DNA aufgrund ihres polyanionischen Rückgrates entfaltet (v. a. bei geringen Salzkonzentrationen) und so Fluorophor und Quencher voneinander entfernt werden, was Fluoreszenz zur Folge hat. Unter Verwendung chelatisierender Fluorophore^[z. B. 68] kann die Stammregion entfallen, wodurch man sich die oben genannten Vorteile erhofft.



Schema 4.17 Metallgelöschter Molecular Beacon ohne Stammregion.

Auch hier wird die Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff Fluorescein und dem Fluoreszenzlöschler Cu^{II} bei Hybridisierung unterbunden, wodurch das Fluoreszenzsignal zunimmt.

Die Synthese des verwendeten fluoreszierenden Phen Green-Derivats **28** wurde weiter oben beschrieben (Kapitel 4.1.2.2). Eine Übersicht zu den Metallionen, die ein Quenchen der beiden käuflichen Phen Green-Derivate verursachen können, findet sich in **Abb. 4.11**. Das Quenching in Phen Green kann u. a. mit dem Schwermetalleffekt erklärt werden – dies ist der Einfluss von ungepaarten Elektronenspins des Metallions auf ein Intersystem crossing des Fluorophors, was in einem Elektronentransfer vom Farbstoff zum Metall resultiert. Dabei zählt Cu^{II} zu den am besten quenchenden Metallionen (Dissoziationskonstante $K_d = 4 \mu\text{M}^{[69]}$).

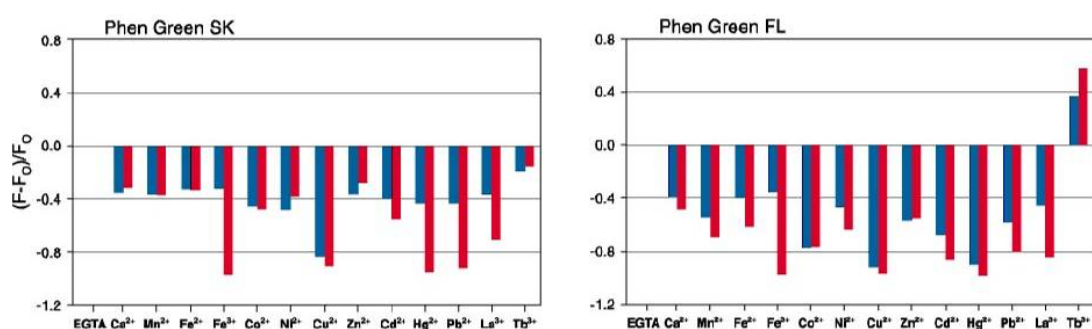


Abb. 4.11 Effekt von Metallionen auf die Fluoreszenzintensität von Phen Green-Derivaten. Die Ergebnisse sind in Änderungen $(F-F_0)/F_0$ relativ zum freien Phen Green dargestellt. Die blauen (roten) Balken beziehen sich auf die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ ($100 \mu\text{M}$) Metallion. Die Diagramme wurden dem aktuellen Handbuch von Molecular Probes entnommen.

Phen Green **28** wird durch Cu^{II} bis auf 1% gequencht, wie in der untenstehenden Titration (**Abb. 4.12**) mit CuSO_4 deutlich wird.

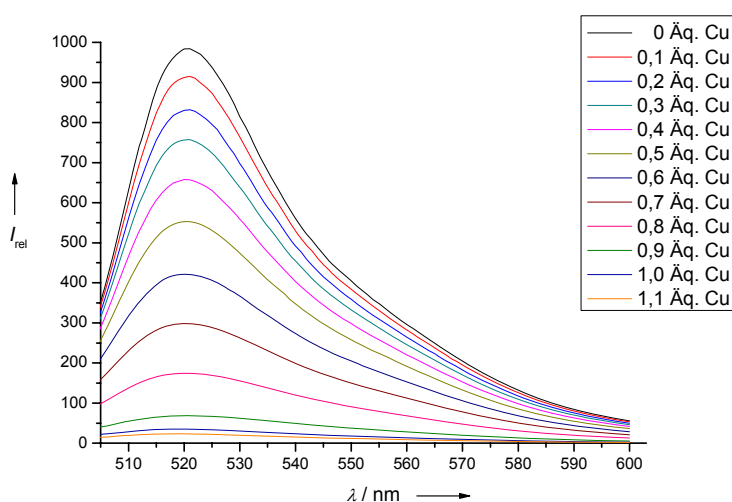


Abb. 4.12 Titration von $10 \mu\text{M}$ Phen Green **28** mit CuSO_4 , $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$.

Um den Effekt konkurrierender Liganden zu testen, wurde das mit Cu^{II} gequenchte Phen Green mit sechs verschiedenen Liganden L2 titriert. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Wiederherstellung (I_{rel} in %) sind in **Abb. 4.13** und **Tabelle 4.2** veranschaulicht.

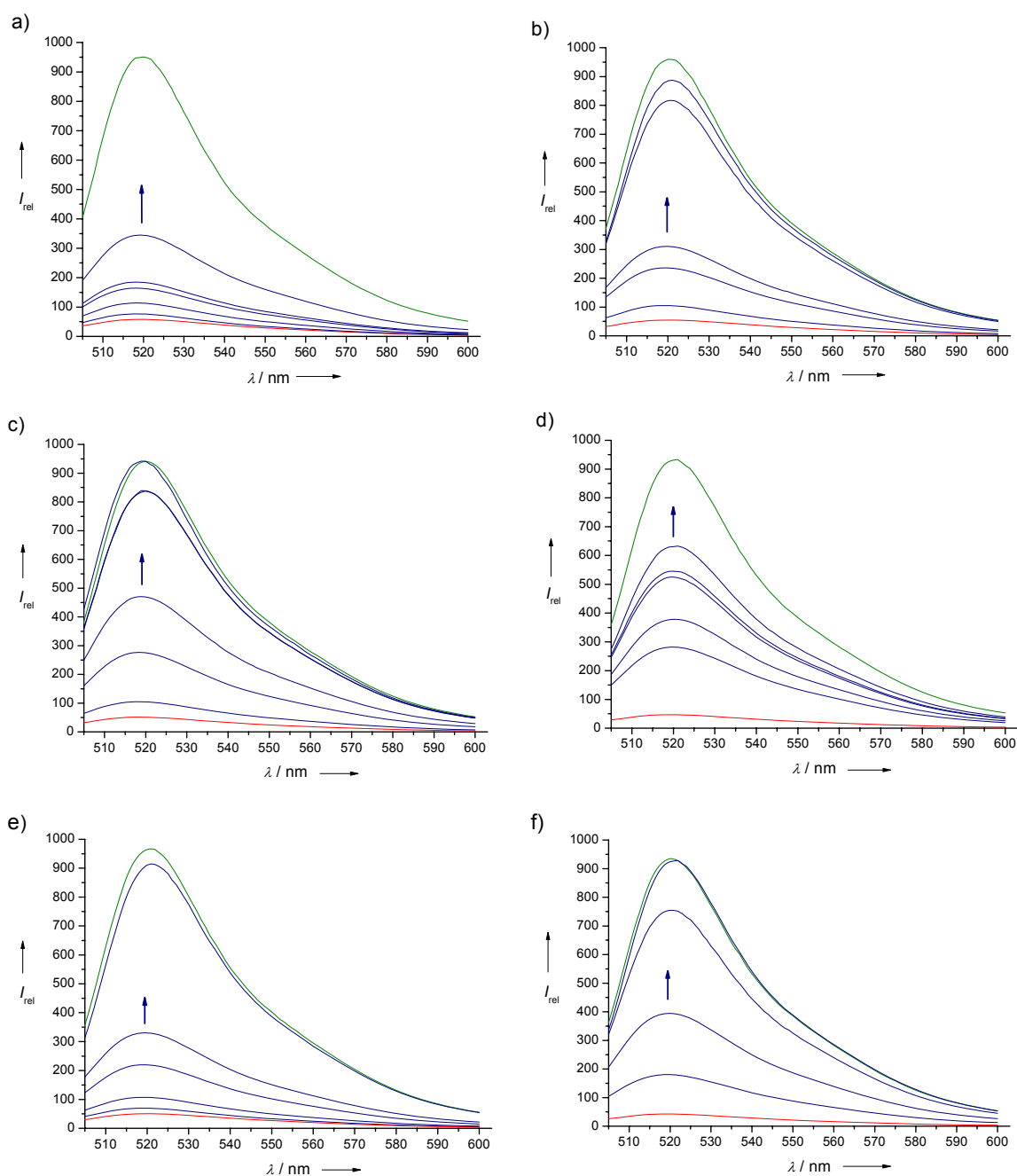


Abb. 4.13 Titration von **(28)**Cu mit verschiedenen Liganden L2.

Die Lösungen enthalten $10 \mu\text{M}$ Phen Green **28** (grüne Linie) mit $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 (rote Linie), Zutitration von L2 **a) - f)** (1, 5, 20, 35, 50 Äq. blaue Linien, außer L2 **f)** 1, 4, 10, 35 Äq.), $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$.

Tabelle 4.2 Wiederherstellung der Cu^{II} -gelöschten Phen Green-Fluoreszenz durch die Liganden L2 **a) - f)**. tpy zeigt bei geringster Zugabe den größten Effekt.

Ligand L2	a) Ethylen- diamin	b) Cyclam	c) tacn	d) Di-(2-picoyl) amin	e) phen	f) tpy
$\log K(\text{Cu})^*$	10,7	27,3	15,9	12,5	8,7	9,5
$\%I_{\text{rel}}^{**}$	36%	93%	100%	68%	95%	99%

* bei Ethylendiamin, Cyclam und tacn effektive Bindungskonstanten bei pH 7 deutlich geringer aufgrund der Protonierung der Liganden

** nach 50 Äq. L2 (nur tpy 35 Äq.)

Das Phen Green-DNA-Konjugat **6**, das durch Kopplung der 2'-Carboxylfunktion von Phen Green an aminomodiﬁzierte DNA erhalten wurde, wird durch Cu^{II} auf 30% gequench (**Abb. 4.14**).

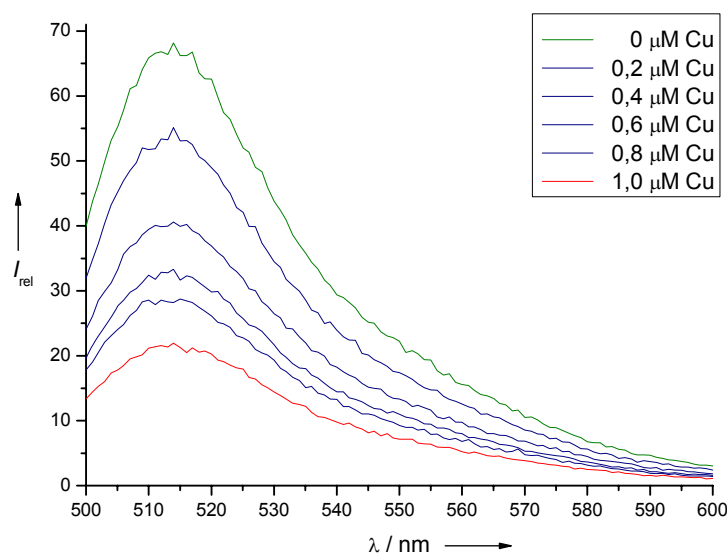
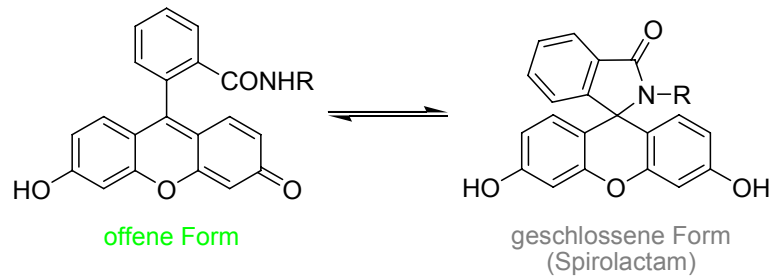


Abb. 4.14 Titration des Phen Green-DNA-Konjugats **6** mit CuSO_4 .

Die Konzentrationen in der Küvette betragen 1 μM DNA **6**, 0,1 M NaCl und 0 – 1 μM CuSO_4 bei pH 7,4 (0,1 M TRIS-Puffer) und 25 °C.

Die Fluoreszenz des ungelöschten Phen Green-Konjugats **6** ist sehr viel niedriger als die des Phen Green **28** selbst, das mit einer Quantenausbeute von 0,75 ein stark fluoreszierender Farbstoff ist.

Eine mögliche Erklärung ist das teilweise Quenchen der Fluoreszenz durch die Bildung eines Lactam-Rings (**Schema 4.18**).



Schema 4.18 Im Gleichgewicht vorliegende 2'-Fluoresceinamid-Formen.

In der Literatur sind Reaktionen von 2'-Fluoresceinmethylestern mit Aminen beschrieben, die zu 2'-Amiden führen, die analog zu Fluorescein selbst in einer offenen oder geschlossenen Form (Spirolactam) vorkommen können. Als Spirolactame sind diese nicht fluoreszierend.^[70] Zum anderen wurden aber auch Fluoresceinamide berichtet, z. B. an Proteine gekoppelt, deren Fluoreszenz gut messbar ist.^[71] Wegen des vermutlich Probleme bereitenden „Lactam-Effekts“ wurde versucht, sekundäre Amine (z. B. *N*-Methyl-NH-) an das 5'-Ende der DNA zu koppeln. Allerdings war die Weiterreaktion mit Phen Green wahrscheinlich aufgrund sterischer Hinderung nicht möglich.

Weitere Hinweise auf das Vorliegen der farblosen Spiro-Form liefert das UV-Spektrum des Phen Green-Konjugats **6** (**Abb. 4.15**): Die Intensität der Absorptionsbanden passt nicht zu den Extinktionskoeffizienten der Einheiten DNA und Phen Green.

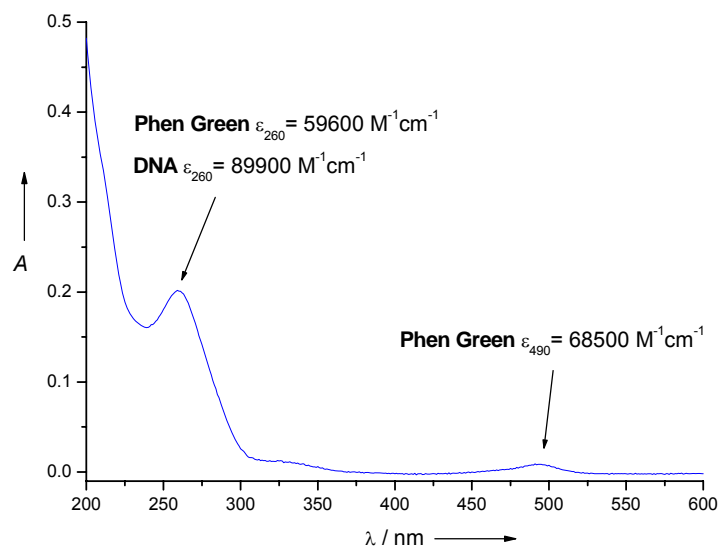


Abb. 4.15 UV-Spektrum des Phen Green-Konjugats **6** ($5 \mu\text{M}$).

Als Molecular Beacon ohne Stammregion wurde das Phen Green/tpy-Konjugat **7** synthetisiert. Der Ligand tpy wurde aufgrund der Ergebnisse der vorhergehenden Versuche (**Tabelle 4.2 f**) zur Wiederherstellung der Cu^{II}-gelöschten Phen Green-Fluoreszenz (**Abb. 4.13**) ausgewählt. Ähnlich wie das Phen Green-Konjugat **6** zeigt **7** nur eine sehr geringe Quantenausbeute. Nach Dialyse von DNA **7** gegen EDTA wurden auch völlig metallfreie Fraktionen erhalten (MALDI-TOF-MS-Analyse), die ebenfalls nur geringe Fluoreszenz zeigen. Die Fluoreszenzabschwächung scheint also nicht von Metallspuren herzurühren, sondern tatsächlich von der Spirolactam-Bildung.

Das Phen Green/tpy-Konjugat **7** wurde mit Cu^{II}, Ni^{II}, Zn^{II} und Fe^{II} titriert. Die besten Ergebnisse wurden mit Cu^{II} erzielt (**Abb. 4.16**, 25 % Restfluoreszenz). Bei Zugabe von 10 µM komplementärer DNA **10** kommt es zu einer teilweisen Wiederherstellung der Fluoreszenz (graue Linien).

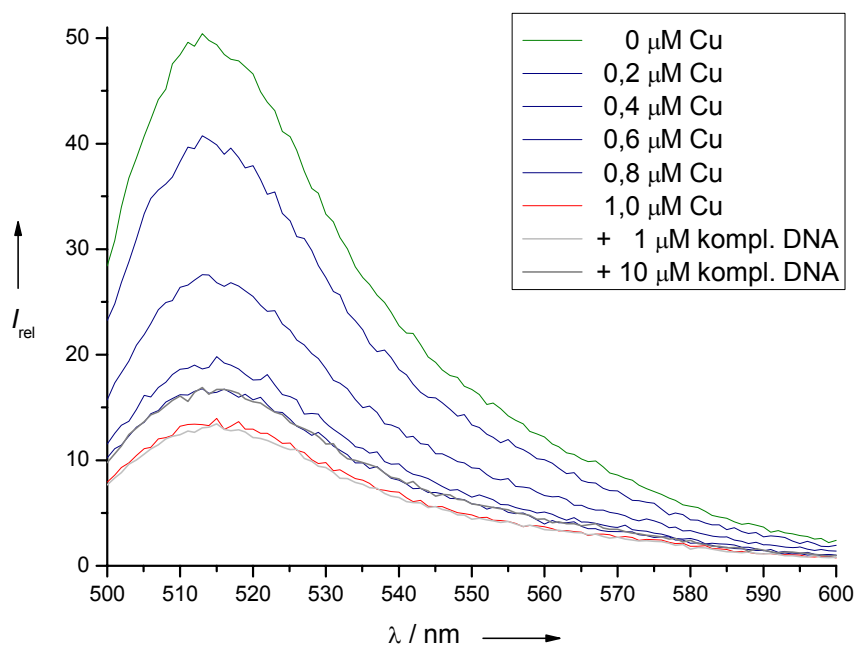


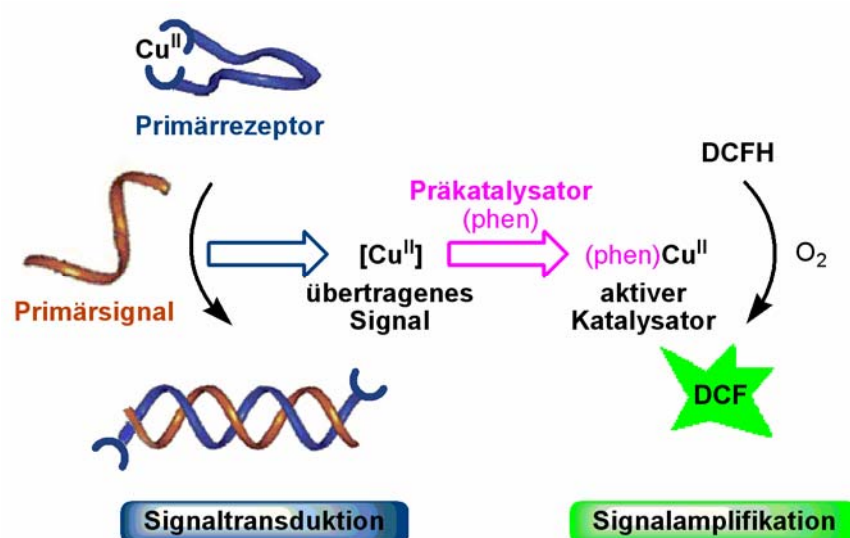
Abb. 4.16 Titration des Phen Green/tpy-DNA-Konjugats **7** mit CuSO₄.

Die Konzentrationen in der Küvette betragen 1 µM DNA **7**, 0,1 M NaCl und 0 – 1 µM CuSO₄ sowie 1 bzw. 10 µM komplementäre DNA **10** bei pH 7,4 (0,1 M TRIS-Puffer) und 25 °C.

Die Phen Green/tpy-Systeme wurden nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt (wie Stabilitätsmessungen, Signalkaskaden), da sie nur in zu geringer Menge und Reinheit vorlagen.

4.1.4 Detektion von Nucleinsäuren

Die synthetisierten Sonden **1** (tacn₂DNA) und **4** (tpy₂DNA) wurden als Komponenten einer Signalkaskade für den Nucleinsäurenachweis erprobt. Dieser beruht auf einer allosterischen Transduktion des Primärsignals (einem komplementären DNA-Oligonucleotid) in ein Metallionensignal (vgl. **Schema 4.19**). Letzteres fungiert als Cofaktor und aktiviert den chemischen Redoxkatalysator phen, der das nichtfluoreszierende Substrat DCFH in das fluoreszierende Produkt DCF umwandelt.



Schema 4.19 Signalkaskade mit chemischer Amplifikation.

Die allosterische Signaltransduktion wird ausgelöst durch eine Destabilisierung von (L₂DNA)Cu^{II} (Primärrezeptor) bei Bindung der komplementären Nucleinsäure (Primärsignal). Durch nachfolgende katalytische Amplifizierung wird der Fluoreszenzfarbstoff DCF gebildet.

Als Primärrezeptor wurde zunächst tacn₂DNA(Cu) **1** eingesetzt. In Gegenwart der 12mer DNA **1** verläuft die Oxidation von DCFH durch das phen/Cu-Gemisch zehnmal langsamer (**Abb. 4.17**). Die als Kontrolle synthetisierte Trimer-DNA (keine intramolekulare Cyclisierung möglich) reduzierte unter den gleichen Bedingungen die Aktivität der phen/Cu-Gemisches nicht.

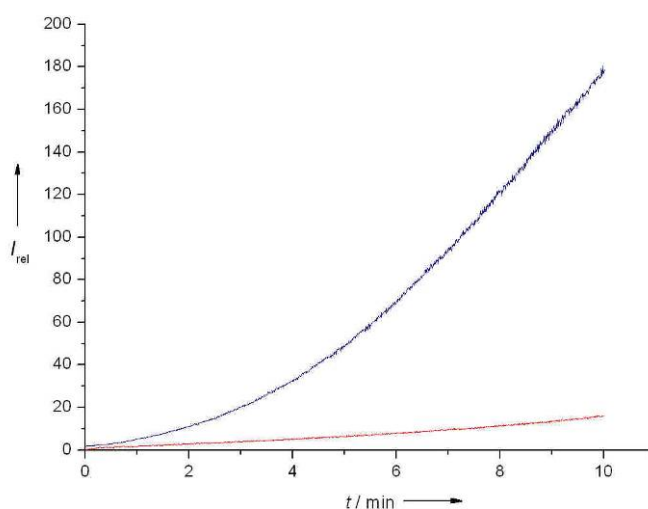


Abb. 4.17 Inhibierung der Cu(phen)-katalysierten Oxidation von DCFH zum fluoreszierenden DCF durch DNA **1**.

2 μM DCFH, 0,5 μM CuSO₄, 0 bzw. 1 μM DNA **1** (blaue bzw. rote Linie), 10 μM phen und 100 μM Cysteamin bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C.

Die Erwartung war, dass DNA **1** die Redoxreaktion effizienter inhibieren sollte. Eine sterische Behinderung der Bischelat-Bildung durch die benachbarte Amidgruppe könnte eine Rolle spielen. Daher wurde versucht, auch weitere DNA-Konjugate mit längeren Alkyllinkern zwischen tacn und Amidgruppe zu synthetisieren (vgl. tacn-DNA-Konjugate **2** und **3**). Die Verbindungen konnten jedoch nicht in ausreichender Reinheit erhalten werden.

Die hohe Stabilität des Primärrezeptors (tpy₂DNA)Cu **4** wird durch die Beobachtung belegt, dass überschüssiges 1,10-Phenanthrolin (phen), ein hochaffiner Cu^{II}-Chelator (Komplexbildungskonstante logK = 9,2^[72] für (phen)Cu^{II} vs. logK = 9,1 für (tpy)Cu^{II} ^[73]), den (**4**)Cu-Komplex nicht zersetzen kann. Jedoch nimmt die UV-Bande von Cu^{II} koordiniertem tpy bei 320 nm spontan ab, wenn komplementäre 20mer DNA **10** zu der (**4**)Cu/phen-Mischung gegeben wird, und nach einer Minute sind keine weiteren Änderungen in der Absorption zu beobachten. Scheinbar verhindert die Bildung einer rigiden **4:10** DNA-Doppelhelix die intramolekulare Bischelatisierung und destabilisiert die **4**/Cu-Wechselwirkung.

Das katalytische Modul des Nucleinsäuredetektions-Assays beinhaltet den Präkatalysator phen, seinen Cofaktor Cu^{II}, das nichtfluoreszierende Substrat DCFH, Sauerstoff aus der Luft als Oxidans und Cysteamin (H₂NCH₂CH₂SH) als reduzierendes Cosubstrat. Ein plausibler Weg für die Bildung des fluoreszierenden Produktes DCF ist die Cu(phen) unterstützte Bildung von H₂O₂ aus Cysteamin und O₂, gefolgt von der Cu(phen) katalysierten H₂O₂-Oxidation von DCFH zu DCF (vgl. Kapitel 3).^[52] Der Einfachheit halber bezeichnen wir die aktive Spezies als Cu(phen), obwohl wahrscheinlich sowohl Cu(phen) als auch Cu(phen)₂ gebildet werden und die Oxidation von DCFH katalysieren. Die katalytischen Aktivitäten der *in situ* hergestellten Komplexe Cu(tpy)_{1/2} sind vernachlässigbar. Eine 1:1:1 Mischung von tpy, phen und Cu^{II} in Abwesenheit jeglicher DNA hat nur 10% der Aktivität einer 1:1 phen/Cu-Mischung unter Reaktionsbedingungen. Aus den Stabilitätskonstanten der Komplexe Cu(phen) und Cu(phen)₂ ist zu schließen, dass bei einem 1:1 phen/Cu-Verhältnis nur der 1:1-Komplex gebildet wird, falls Cu tatsächlich in der Oxidationsstufe +II vorliegt. In einem Kontrollexperiment wurde die Geschwindigkeit der DCF-Bildung in Abhängigkeit vom phen/Cu-Verhältnis untersucht (**Abb. 4.18**).

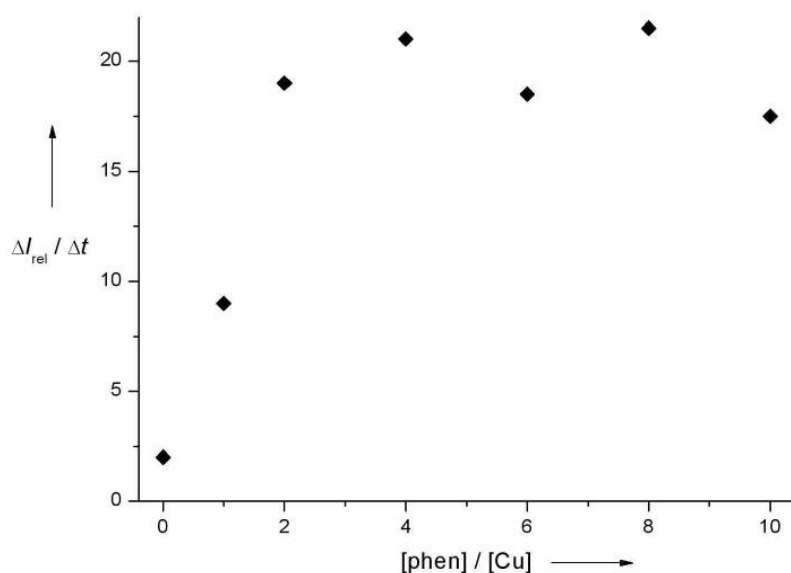


Abb. 4.18 Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Oxidation von DCFH zu DCF vom phen/Cu-Verhältnis. Gezeigt ist die Anfangsgeschwindigkeit ($\Delta I_{rel}/\Delta t$, $\Delta t = 2$ min) der DCF-Fluoreszenzzunahme.

Die Reaktionslösungen enthalten 0,5 μ M CuSO₄, entsprechende Äquivalente an phen, 10 μ M DCFH, 100 μ M Cysteamin und 0,1 M NaCl bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C.

Der Cu(phen)-1:1-Komplex scheint demnach auch eine signifikante katalytische Aktivität zu haben. Sowohl die 2:1- als auch die 1:1-Spezies wurden als aktive Katalysatoren in Substratoxidationen durch O₂ oder H₂O₂ in der Anwesenheit von Reduktionsmitteln vorgeschlagen.^[74, 75]

Obwohl es wahrscheinlich ist, dass bei der Reaktion auch die Bildung von OH[•]-Radikalen oder anderen aggressiven Sauerstoffspezies involviert ist, wurde unter Reaktionsbedingungen keine signifikante Spaltung von Oligo-DNA detektiert (HPLC-Analyse, **Abb. 4.19**). Bei literaturbekanntem^[75, 76] oxidativen Cu/phen/Thiol-basierten DNA-Spaltreaktionen wurde mehr Thiol eingesetzt und bei Temperaturen > RT verfahren. Wir vermuten auch, dass DCFH als Antioxidans fungieren kann und damit die DNA vor Zersetzung bewahrt.

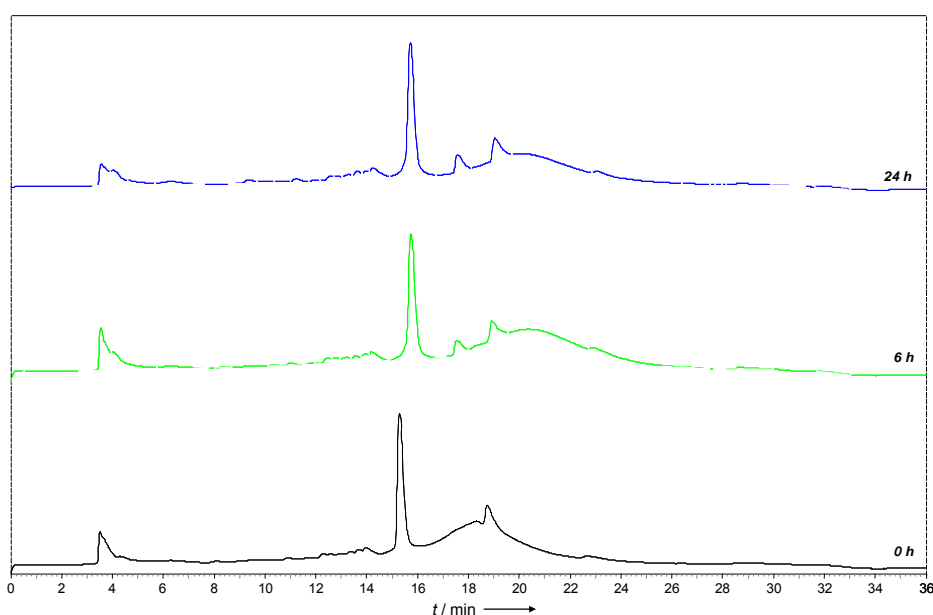


Abb. 4.19 HPLC-Analyse unter Assay-Bedingungen (vgl. **Abb. 4.20 links**).

2 μM unmodifizierte 20mer DNA (5'-ATC.GTT.ACC.AAA.GCA.TCG.TA) wurde zu einer Mischung von 2 μM CuSO₄, 5 μM phen, 100 μM Cysteamin und 10 μM DCFH bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 0,1 M NaCl gegeben. Nach 0 h, 6 h und 24 h wurden 100 μl der Reaktionslösung mit 5 μl 1% EDTA-Lösung gemischt (zum Entfernen von Cu^{II}) und in das HPLC-System injiziert. Die Intensität des scharfen DNA-Peaks bei $t_R = 16$ min hat nach 24 h nicht signifikant abgenommen. Der breite Peak bei etwa $t_R = 19$ min rührt von anderen Komponenten der Reaktionsmischung her.

Die untenstehenden Abbildungen illustrieren die Sequenzselektivität (**Abb. 4.20 links**) und Sensitivität (**Abb. 4.20 rechts**) des Assays. Die Reagenskonzentrationen wurden für ein hohes Signal-Hintergrund-Verhältnis optimiert. Während die DCFH-Oxidation durch (4)Cu auch in Gegenwart von überschüssigem phen sehr langsam ist, steigt die Geschwindigkeit in Gegenwart von komplementärer DNA **10** dramatisch an. Die Aktivität ist im Bereich von zwei Dritteln der einer "DNA-freien" phen/Cu^{II}-Mischung, was auf die weitgehende Bildung des aktiven (phen)Cu-Katalysators hinweist. Im Gegensatz zu einer (4)Cu/phen-Mischung mit tpy₂DNA **4** zeigt eine (12)Cu/phen-Mischung mit tpyDNA **12** katalytische Aktivität in der Abwesenheit von komplementärer DNA (**Abb. 4.20 links**). Dies ist ein Hinweis auf die vergleichsweise geringe Stabilität des (tpyDNA)Cu-Komplexes und bestätigt die signifikante Stabilisierung von (4)Cu durch intramolekulare Bischelatisierung. Das Assay ist sensitiv für Einzelbasen-mismatches: die Geschwindigkeit der DCF-Bildung in der Gegenwart von DNA **11** (C/T mismatch) ist nur leicht über dem Hintergrund. Bei geringen (4)Cu-Konzentrationen ist 5 nM (250 fmol) komplementäre DNA **10** detektierbar (**Abb. 4.20 rechts**).

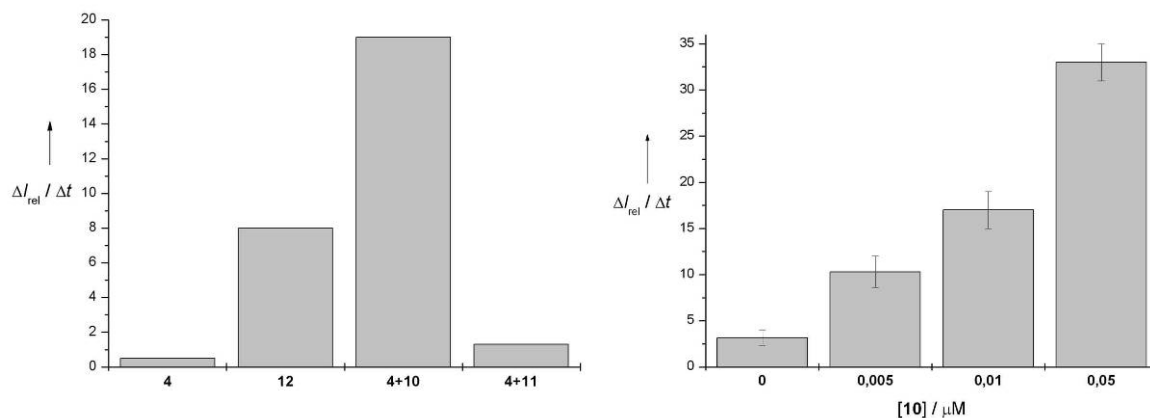


Abb. 4.20 Nachweis der Selektivität (**links**) und Sensitivität (**rechts**).

Anfänglicher ($\Delta t = 10 \text{ min}$) Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität mit der Zeit ($\Delta I_{rel} / \Delta t$, $\lambda_{ex} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$) in den Reaktionsmischungen bei pH 7,0 (10 mM MOPS-Puffer) und 25 °C: 10 μM DCFH, 100 μM Cysteamin, 0,1 M NaCl und 5 μM phen, 0,5 μM CuSO₄ und 2 μM der betreffenden DNA-Oligonucleotide (**links**) oder 0,2 μM phen, 0,02 μM CuSO₄, 0,05 μM **4** und unterschiedliche Mengen an **10** (**rechts**).

Nach 12 h Reaktionszeit kann die Fluoreszenz der **4+10**-Mischung (schwarze Linie in **Abb. 4.21 rechts**) sogar mit dem bloßen Auge detektiert werden (linkes Eppendorf-Reaktionsgefäß in **Abb. 4.21 links**). Es wurden 20 bzw. 5 Turnover relativ zu Cu^{II} bzw. Analyt-DNA **10** bestimmt.

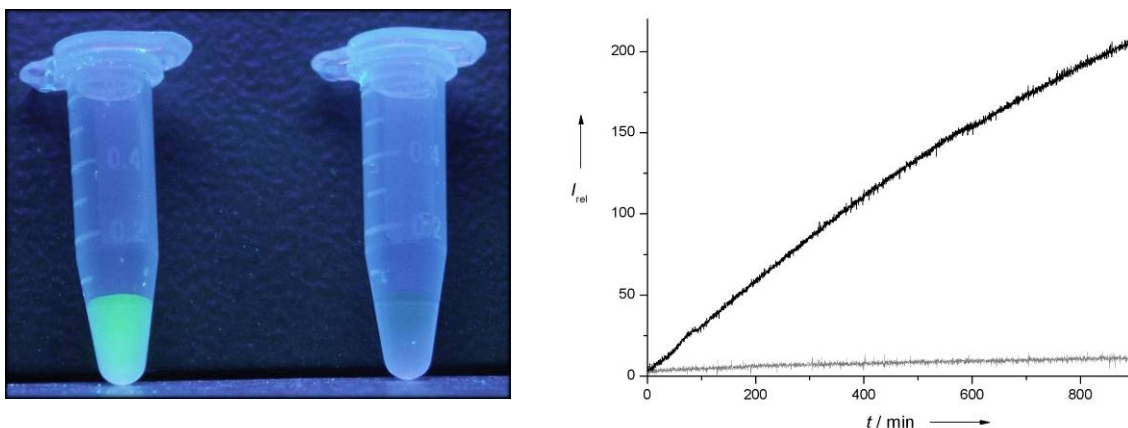


Abb. 4.21 Beobachtung der DCF-Fluoreszenz über 12 h.

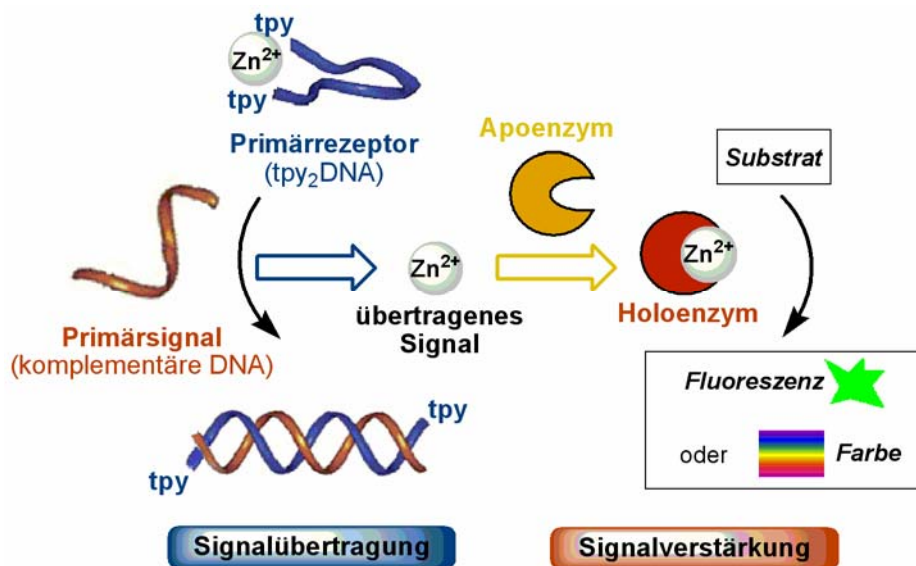
Links: Beobachtung der Reaktionslösungen aus **Abb. 20 links** unter UV-Licht mit DNA **4** (rechts) und **4+10** (links) nach 12 h.

Rechts: Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität mit der Zeit (graue Linie: DNA **4**, schwarze Linie: DNA **4+10**).

Unser prototypischer DNA-Sensor erreicht nicht die niedrigen Detektionslimits einiger anderer signalamplifizierender Verfahren.^[14, 15, 17, 42, 43] Die Sensitivität ist im nanomolaren Bereich begrenzt durch die unkatalysierte Hintergrundoxidation des fluorogenen Substrats DCFH.^[77] Außerdem setzt die niedrige katalytische Turnoverrate (2 h^{-1}) die Effizienz der Signalamplifikation herab. Um eine bessere Sensitivität und eine effizientere Amplifikation zu erhalten, muss das katalytische Modul optimiert werden. Das Signal-Hintergrund-Verhältnis und damit die Sensitivität konnte bei den geringsten DNA-Konzentrationen von 3:1 auf 5:1 leicht verbessert werden, indem der Präkatalysator phen durch 5-Amino-1,10-phenanthrolin ersetzt wurde.

4.2 Signalamplifikation durch enzymatische Katalyse

Das oben beschriebene Verfahren (Kapitel 4.1.4) zur Nucleinsäuredetektion wurde modifiziert, indem der chemische Präkatalysator phen durch ein Apoenzym ersetzt wird, das durch einen Metallion-Cofaktor aktiviert wird^[78] (**Schema 4.20**). Der entscheidende Vorteil liegt in den höheren Turnover-Raten von Enzymen und dadurch gesteigerter Signalamplifikation.



Schema 4.20 Signalkaskade mit enzymatischer Amplifikation.

Die Nucleinsäuredetektion mit (tpy₂DNA)Zn erfolgt über Reaktivierung von Apoenzymen durch Zink-Cofaktoren.

Das Apoenzym sollte keine oder nur geringe Aktivität zeigen und nach Reaktivierung z. B. mit Zn im Idealfall die Aktivität des Holoenzym erlangen. Auswahlkriterien waren zudem niedrige K_m - und hohe k_{cat} -Werte. Apoenzyme wurden wegen ihrer hohen Sensitivität bereits eingesetzt, um kleinste Metallionenkonzentrationen (ppm bis ppb) zu bestimmen (z. B. Fe(III) mit Meerrettichperoxidase, Zn(II) alkalische Phosphatase).^[79]

Im Anhang ist in einer Tabelle eine Auswahl in Frage kommender Enzyme zusammen mit deren wichtigsten Parametern aufgelistet. Die blau unterlegten Enzyme wurden im Rahmen der Doktorarbeit eingesetzt.

Carboanhydrase

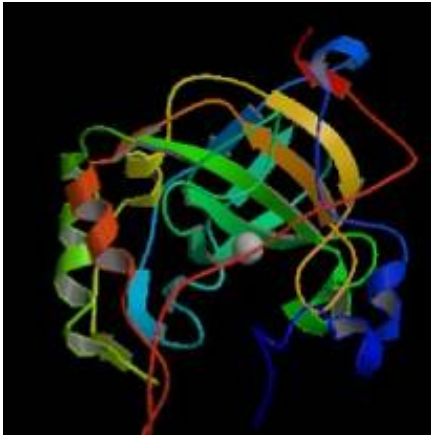
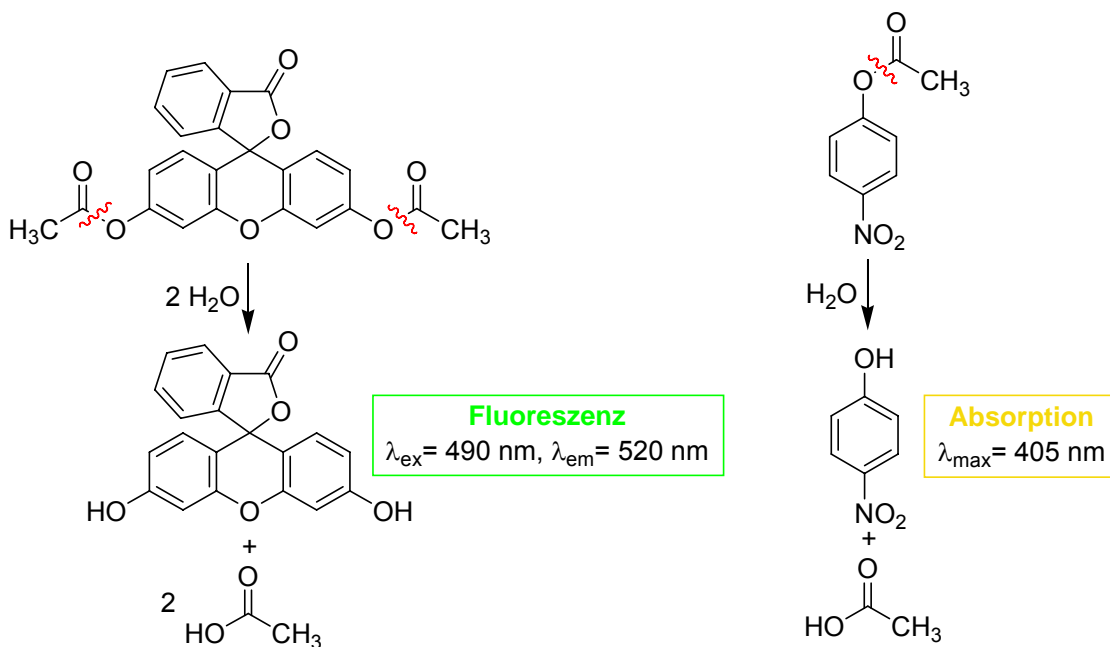


Abb. 4.22 Röntgenstruktur der Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (PDB-Eintrag 1V9E).

Carboanhydrase (CA) wurde aufgrund ihrer hohen Turnoverrate bei der reversiblen Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- und Protonen ausgewählt. Zudem katalysiert CA die Hydrolyse verschiedener Ester, wenn auch mit viel geringerer Effizienz.

Die Carboanhydrase (aus Rindererythrocyten) wird durch Dialyse gegen 2,6-Pyridindicarbonsäure inaktiviert und kann anschließend durch Zn^{II} -Ionen wieder aktiviert werden.^[80] Als Indikatorreaktionen können neben der H^+ -Freisetzung bei der CO_2 -Hydratation auch

literaturbeschriebene Esterhydrolysen eingesetzt werden, die zu fluoreszierenden oder farbigen Produkten führen (z. B. Diacetylfluorescein^[81] oder *p*-Nitrophenylacetat als Substrate, vgl. **Schema 4.21**).



Schema 4.21 Estersubstrate für die Carboanhydrase.

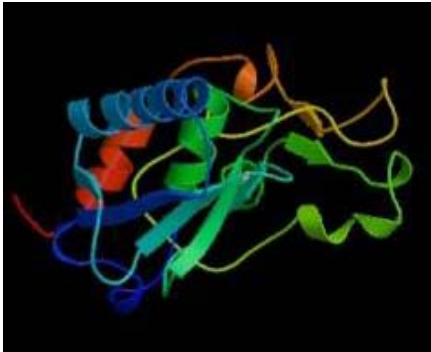
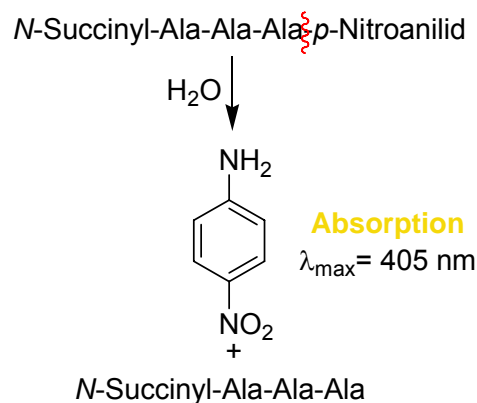
Astacin

Abb. 4.23 Röntgenstruktur von Astacin (PDB-Eintrag 1IAC).

Astacin wird aus dem Magensaft des Flusskrebse *Astacus astacus* isoliert. Eine Probe dieses Enzyms wurde vom Institut für Zoologie der Universität Heidelberg bereitgestellt. Astacin ist eine Zn-abhängige Peptidase, die am katalytischen Zink-Ion eine außergewöhnliche pentavalente Koordination aufweist (3 His, H₂O, Tyr). Im Gegensatz zu anderen Proteasen wie aus Bakterien (z. B.

Thermolysin) werden für die Aktivität keine zusätzlichen Calcium-Ionen benötigt. Astacin kann durch Dialyse gegen 1,10-Phenanthrolin deaktiviert werden und wird durch anschließende Zn^{II}-Zugabe reaktiviert.^[82] Die Aktivität kann bei Spaltung des synthetischen Tetrapeptids STANA verfolgt werden (vgl. **Schema 4.22**).



Schema 4.22 STANA als Substrat für Astacin.

Aldolase



Abb. 4.24 Röntgenstruktur von Class II Aldolase (PDB-Eintrag 1ZEN) - ein Protein-Dimer mit zwei Zink-Cofaktoren.

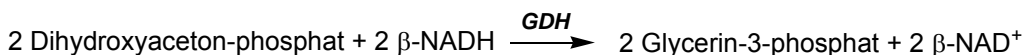
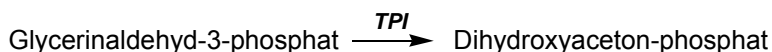
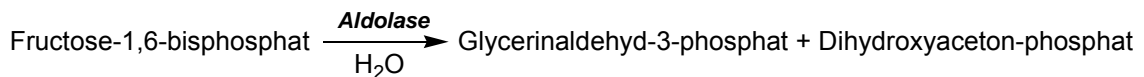
Weiterhin kommt die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (aus Bäckerhefe) in Frage, deren Apoenzym ebenfalls durch Zn^{II} -Ionen reaktiviert werden kann.^[83]

Fructose-1,6-bisphosphat-aldolase katalysiert die reversible Kondensation von GAP (Glycerinaldehyd-3-phosphat) und DHAP (Dihydroxyaceton-phosphat), eine essentielle Reaktion in der Glykolyse in allen Tieren und Pflanzen sowie den meisten Mikroorganismen.

Die tetramere Class I Aldolase, in Tieren und höheren Pflanzen vorkommend, ist dadurch

charakterisiert, dass sie keinen Metallion-Cofaktor benötigt und ein „Schiffsche-Basen“-Intermediat mit dem Substrat Dihydroxyaceton-phosphat bildet. Class II Aldolase, ein dimeres Protein, das in primitiven Zellen wie Hefe und Bakterien angetroffen wird, benötigt zwei Zn^{II} -Ionen als Cofaktor und wird deshalb beispielsweise durch EDTA inhibiert.

Die Spaltung des Substrats Fructose-1,6-bisphosphat kann nach mehreren gekoppelten Reaktionen durch die Entstehung von NAD^+ aus $NADH$ photometrisch verfolgt werden. Die Oxidation von 2 μmol $NADH$ im unten gezeigten Reaktionsschema (**Schema 4.23**) deutet die Spaltung von 1 μmol Fructose-1,6-bisphosphat an.



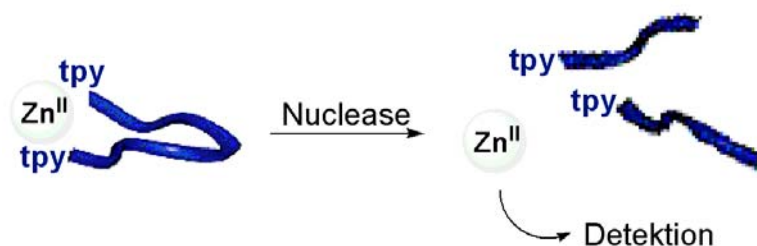
Absorption
 $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$

Schema 4.23 Fructose-1,6-bisphosphat als Substrat für Aldolase und enzymatisch katalysierte Folgereaktionen (TPI = Triosephosphat-Isomerase, NAD = Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid, GDH = Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase) zum Nachweis der Spaltung.

Nucleasen

Phosphodiester-Bindungen wie sie in DNA und RNA vorkommen, sind außerordentlich resistent gegen Hydrolyse. Die Halbwertszeit des einfachsten Phosphodiesters Dimethylphosphat in 1 M NaOH beträgt beispielsweise 15 Jahre bei 35 °C.^[84] Nucleasen sind Teil einer größeren Gruppe von Enzymen, den Phosphodiesterasen, die die Geschwindigkeit der DNA-Hydrolyse um Faktoren $> 10^{10}$ beschleunigen. Die meisten Nucleasen wie P1, S1 oder Mung Bean Nuclease haben ein oder mehrere Zn-Ionen als Cofaktoren. Die Mung Bean Nuclease enthält 3 Zn-Ionen, die kokatalytisch wirken (ein Zn-Ion mit katalytischer und zwei Zn-Ionen mit struktureller Funktion), und schneidet ssDNA und ssRNA sequenzspezifisch.^[85, 86]

Ein Ansatz zum Nachweis von Endonucleasen nutzt die Spaltung des DNA-Strangs in $(tpy_2DNA)Zn$. Auch dadurch kann der Bichelat-Metallkomplex destabilisiert werden und das Metall u. U. freigesetzt werden. Ein Gewinn an Empfindlichkeit kann so durch eine zweifache Signalverstärkung erreicht werden (**Schema 4.24**): Die Nuclease katalysiert die Spaltung des DNA-Strangs in $(tpy_2DNA)Zn$, das freigesetzte Metallion aktiviert als Cofaktor einen chemischen Katalysator oder auch ein zweites Enzym, welches die Spaltung eines fluorogenen Substrats katalysiert. Das Design der Nuclease-Substrate stützt sich auf die Beobachtung, dass ringförmige Einzelstrang-DNA-Sequenzen (Hairpin-Loops) von einzelstrangspezifischen Nucleasen als Substrate akzeptiert werden.^[87, 88]



Schema 4.24 Spaltung von $(tpy_2DNA)Zn$ durch eine einzelstrangspezifische Endonuclease.

4.2.1 Aldolase-Isolierung

Da die Hefe-Aldolase nicht kommerziell erhältlich ist, musste sie zunächst isoliert werden. Die Aufreinigung der Aldolase aus Bäckerhefe wurde in Anlehnung an die von Belasco *et al.* beschriebene Methode^[89] am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg (BZH) durchgeführt.

Die folgenden Schritte **a) - f)** fanden alle bei 4 °C statt:

a) Aufschluss der Zellen

Durch Behandlung von Hefe-Würfeln mit flüssigem Stickstoff werden die Hefezellen zerstört.

b) Ammoniumsulfatfällung

Das Ausfällen von Proteinen durch hohe Salzkonzentrationen aus einer Lösung steht häufig am Anfang einer Proteinaufreinigung. Die gelösten Ionen entziehen hierbei den Domänen des Proteins, die nur schwache Wechselwirkungen mit Wasser eingehen, ihre Solvathülle. Die solvathüllenfreien Regionen der Proteine interagieren und bewirken eine Aggregation der Proteine. Proteine mit ausgeprägten hydrophoben Domänen fallen bei niedrigeren Salzkonzentrationen aus als stark hydrophile Proteine. Die Ammoniumsulfatfällung ist eine reversible Fällung, d. h. die Proteine können renaturiert und in ihrer nativen Konformation erhalten werden.

c) Dialyse

Die Dialyse ist ein konzentrationsgetriebener Membranprozess, der dem Entfernen von Ionen und kleinen Molekülen aus einer Lösung dient. Im Anschluss an eine Ammoniumsulfatfällung dient die Dialyse zur Entfernung des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, welches bei der weiteren Aufreinigung stören würde.

d) Ionenaustauscherchromatographie

Bei der Ionenaustauscherchromatographie binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Matrix, welche positiv geladene (Anionenaustauscher) oder negativ geladene Gruppen (Kationenaustauscher) trägt. Die Stärke der Bindung des Proteins an die Matrix hängt von pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins sowie der Dichte der Ladung auf der Matrix ab.

e) Gelfiltration / Größenausschlusschromatographie

Bei der Gelfiltration erfolgt die Trennung aufgrund des hydrodynamischen Radius'. Die Trennsäule enthält kleine Kügelchen aus porösem hochvernetztem Material. Große Moleküle passieren die Säule ungehindert, wohingegen kleine Moleküle viele Poren durchwandern, bevor sie die Säule verlassen. Große Moleküle eluieren daher zuerst gefolgt von immer kleineren.

f) SDS-PAGE

Die Elektrophoresetechnik ist ein wichtiges analytisches Hilfsmittel zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Reinheit von Proteinen. Als Trägermaterial dienen Polyacrylamid-Gele, welche durch Copolymerisation von Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid hergestellt werden. Der Vernetzungsgrad und damit die Trenneigenschaften sind abhängig von den verwendeten Konzentrationen. Die lineare Verknüpfung der Acrylamid-Monomere sowie die Quervernetzung mit Bisacrylamid erfolgt durch radikalische Polymerisation, welche mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet wird. *N,N,N',N'*-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) dient als Katalysator. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese bewirken unterschiedliche Polyacrylamid-Konzentrationen und pH-Werte in Sammel- und Trenngel eine erhöhte Bandenschärfe durch den Sammeleffekt am Übergang zwischen den beiden Gelen. Die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) zur Probe bewirkt die Dissoziation von nicht kovalent verknüpften Untereinheiten sowie die Zerstörung der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine. 1 g Protein bindet ungefähr 1,4 g SDS, sodass die resultierenden SDS-Protein-Komplexe ein konstantes m/z-Verhältnis aufweisen und im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt werden.

Die Aldolase konnte erfolgreich isoliert werden. Die Aktivität des Enzyms wurde nach jedem Schritt **a) - e)** überprüft. Die Ausbeute (ausgehend von 16 Hefewürfeln à 42 g) betrug 31 mg mit einer Reinheit von 67%. Literaturbeschrieben sind größere Ausbeuten und Reinheiten. Für erste Versuche mit dem Apoenzym der Aldolase waren die Ergebnisse aber zufriedenstellend.

4.2.2 Gewinnung der Apoenzyme

Ein Problem bei der Herstellung der Apoenzyme ist es, diese möglichst frei von Metallspuren zu erhalten. Dazu wurden größere Mengen der verwendeten Lösungen (> 250 ml, z. B. Puffer für die Dialyse) mit Dithizon in CHCl_3 ausgeschüttelt. Dithizon (Diphenylthiocarbazon) ist ein Komplexligand, der in organischen Lösungsmitteln löslich ist und mit vielen Metallen reagiert, um organisch lösliche Chelate zu bilden. Kleinere Mengen (z. B. Puffer und Substratlösungen für die Reaktionen) wurden entweder in Batch- oder Column-Technik mit dem Kationenaustauscher Chelex behandelt (vgl. experimenteller Teil). Chelex ist ein Styroldivinylbenzol-Copolymer, das mit Iminodiacetat-Anionen als Chelatoren versehen ist.

Zink-Konzentrationen im Bereich von 10^{-8} M können trotz der oben genannten Behandlungen und weiterer Maßnahmen nicht ausgeschlossen werden.^[90] Obwohl es beeindruckend scheint, Metallkontaminationen von lediglich 1:1.000.000.000 zu erreichen, ist dies relativ zu sehen: Beispielweise kann so ein Enzym in 10^{-8} M Konzentration vollständig reaktiviert werden. Die Apoenzyme sollten deshalb immer in Konzentrationen $> 10^{-8}$ M verwendet werden.

Nach der Aufreinigung der Apoenzyme wurde deren Konzentration über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der resultierende Zn-Gehalt wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt, wobei zu Vergleichszwecken auch der Gehalt in HPLC-Wasser, Chelex-vorbehandeltem HPLC-Wasser und TSU-Wasser (für die Spurenanalytik) bestimmt wurde.

Carboanhydrase^[91]

Apocarboanhydrase wurde nach Literaturangaben durch Dialyse gegen 0,075 M Pyridin-2,6-dicarbonsäure hergestellt. Dadurch erreicht man 5% Rest-Zink und noch 8% katalytische Aktivität.^[78] Die Dialyse gegen ein Gemisch von Pyridin-2,6-dicarbonsäure und EDTA brachte keine wesentliche Verbesserung.

Astacin^[82]

Apoastacin wurde durch Dialyse gegen 1,10-Phenanthrolin hergestellt. Die Restaktivität sollte laut Literatur unter 3% liegen, und die Reaktivierung auf 100% durch Zn-Zugabe möglich sein.

Aldolase^[83]

Aldolase wurde mit EDTA inkubiert und über Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Nach Literaturangaben sollten 1% des Zinks im Protein verbleiben, und keine katalytische Aktivität mehr messbar sein.^[78]

Mung Bean Nuclease^[92]

Apo Mung Bean Nuclease wurde durch Dialyse gegen 50 mM EDTA hergestellt. Eine vollständige Deaktivierung ist möglich, die Reaktivierung mit Zn-Ionen ist allerdings sehr langsam und nur zu 50% möglich.

In **Tabelle 4.2** sind die durch AAS erhaltenen Zinkkonzentrationen den erwarteten Konzentrationen gegenübergestellt. Im Fall der Apoenzyme wurden die erwarteten Zinkkonzentrationen mit Hilfe der in der Literatur angegebenen Restaktivitäten der Apoenzyme berechnet (apoCA 5%, Apoastacin 0,7%, Apoaldolase 1%). Der erwartete Zn-Gehalt der Holoenzyme berechnet sich aus der Proteinkonzentration multipliziert mit der Anzahl von Zn-Ionen pro Enzymmolekül. Da die Flammen-AAS Standardabweichungen von bis zu 6 µg/l zeigte, und die Kalibration im Bereich unterhalb von 50 µg/l mit hohen Abweichungen verbunden war, sind die Ergebnisse für die Apoenzyme nur eingeschränkt aussagekräftig. Im Fall der Carboanhydrase ist der berechnete Zn-Gehalt sehr ungenau, da die Reinheit des von der Firma Fluka bezogenen Enzyms unbekannt ist. Die Verunreinigung der Aldolase mit weiteren Proteinen erklärt den zu hoch eingeschätzten Zn-Gehalt.

Tabelle 4.3 AAS-Bestimmung des Zn-Gehaltes von Enzymen und Apoenzymen.

Übersicht über erhaltene und erwartete Zn-Konzentrationen in drei Wasserproben sowie Enzym- und Apoenzym-Lösungen.

Probe	Protein-Konzentration	erhaltene Zn-Konzentration [µg/l]	berechnete Zn-Konzentration [µg/l]
HPLC-Wasser	-	0	max. 100*
Chelex-vorbehandeltes HPLC-Wasser	-	0	max. 1*
TSU-Wasser	-	0	max. 0,1*
Carboanhydrase-Lösung	3,5 µM	445	233
Astacin-Lösung	2,8 µM	163	183
Aldolase-Lösung	4,6 µM	253	605
Apocarboanhydrase-Lösung	1,7 µM	20	5
Apoastacin-Lösung	1,4 µM	32	2
Apoaldolase-Lösung	6,6 µM	20	9

* laut Herstellerangaben max. zulässige Zn-Konzentration

4.2.3 Detektion von Nucleinsäuren

Carboanhydrase-Assay

Die Substrate *p*-Nitrophenylacetat und Diacetylfluorescein wurden zunächst hinsichtlich ihrer Spontanhydrolyse untersucht. Dabei war im Fall des *p*-Nitrophenylacetats das Verhältnis von unkatalysierter zu enzymkatalysierter Reaktion unter gleichen Bedingungen höher als beim Fluorogen Diacetylfluorescein. Die folgenden Versuche wurden deshalb ausschließlich mit Diacetylfluorescein durchgeführt. Die Substratkonzentration wurde mit Hilfe einer kinetischen Analyse nach Michaelis-Menten optimiert (10 μ M).

In Vorversuchen wurde die Reaktivierung der apoCA mit Zn untersucht, wobei mit einem apoCA:Zn-Verhältnis von 1:1 etwa 20% der Aktivität des Holoenzym erreicht wurden. Zunächst wurden verschiedene Zink-Konzentrationen (10^{-3} bis 10^{-6} M) angeboten; unterhalb von 1 μ M Zn war keine Unterscheidung vom Hintergrund mehr möglich. In den Versuchen wurde deshalb *TraceSelectUltra*-Wasser von Fluka (für die Spurenanalytik, < 1 nM Zn) verwendet. Wie sich herausstellte, war die Hauptursache für den relativ hohen Hintergrund aber die Restaktivität des Apoenzym.

Durch Zugabe starker Chelatoren (DOTA, Cyclam, Cyclen, EDTA und tpen), deren Assoziation und Dissoziation mit Zn relativ langsam ist, wurde versucht, den Hintergrund zu senken. Problematisch war allerdings, dass die Liganden Zink nicht effizient genug komplexieren (Cyclam, Cyclen) oder dass extern zugegebenes Zn vom Liganden abgefangen wurde (DOTA, EDTA, tpen).

Die 20mer DNA **4** mit dem tridentaten Chelator tpy an 3'- und 5'-Terminus bildet auch mit Zn^{II} -Ionen einen sehr stabilen 1:1-Komplex, wobei das Metallion von beiden tpy-Einheiten komplexiert ist.^[35] Bei der Zugabe von komplementärer DNA **10** wird die Bichelatisierung des Metallions aufgrund der Bildung einer rigiden Doppelhelix unterbrochen. Wenn apoCA in μ M Konzentrationen in der Reaktionsmischung anwesend ist, bindet sie das freigesetzte Zn^{II} aufgrund ihrer höheren Affinität ($\log K = 10^{12}$)^[93] im Vergleich zu tpy ($\log K = 10^6$)^[94].

Die Aktivität des Holoenzym wurde zunächst über die Hydrolyse des fluorogenen Estersubstrats Diacetylfluorescein beobachtet^[81] (**Abb. 4.25**). Die Reaktivierung von CA innerhalb von Minuten wird durch die mit der Zeit zunehmende Reaktionsgeschwindigkeit deutlich und ist in Übereinstimmung mit einer Assoziationskonstante zweiter Ordnung $k_2 = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ von apoCA und Zn.^[95]

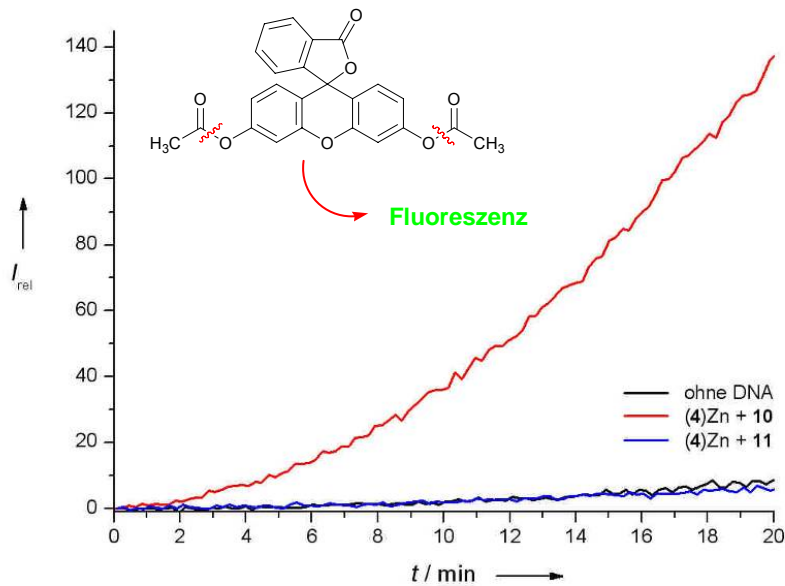


Abb. 4.25 Spaltung von Diacetylfluorescein durch reaktivierte CA zum DNA-Nachweis.

Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität mit der Zeit ($\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$). Die Reaktionslösungen enthalten $1 \mu\text{M}$ apoCA, $10 \mu\text{M}$ Diacetylfluorescein, $0,1 \text{ M}$ NaCl und 10 mM MgCl_2 bei pH 7,4 ($0,1 \text{ M}$ TRIS-Puffer) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $1 \mu\text{M}$ DNA (**4**)Zn, $2 \mu\text{M}$ komplementäre DNA **10** oder mismatch-DNA **11**.

Die Gegenwart von komplementärer DNA **10** wird innerhalb von wenigen Minuten detektiert (**Abb. 4.25**), während die mismatch-DNA **11** kaum einen Effekt auf die Geschwindigkeit der Esterspaltung hat. Die Restaktivität des Apoenzym trägt zu einer signifikanten Hintergrundreaktion bei, was die Empfindlichkeit des Assays auf ca. $0,1 \mu\text{M}$ Target-DNA limitiert.

Als nächstes wurde die Umwandlung des "natürlichen" CA-Substrats CO_2 betrachtet. Die Hydratation von CO_2 wurde direkt durch den pH-Abfall und damit den Farbenwechsel des Indikators Phenolrot beobachtet ($\text{pK}_a = 7.3$, rot bei $\text{pH} > 8,6$, gelb bei $\text{pH} < 6$). Abhängig von der Menge aktiver CA wird CO_2 mehr oder weniger schnell in HCO_3^- und H^+ umgewandelt, was in einer Protonierung eines zugesetzten Puffers (HEPES) resultiert, einem Sinken des pH-Wertes und einem Farbwechsel von rot nach gelb (**Abb. 4.26**). In Abwesenheit des Puffers fällt der pH-Wert zu schnell, um verfolgt werden zu können. In einer Reaktionsmischung mit HEPES-Puffer (12,5 mM), (4)Zn (1 μM), apoCA (0,25 μM) und komplementärer 20mer DNA **10** (1,1 μM), dauert der Farbwechsel 28 (± 5) s, verglichen mit 55 (± 5) s in der Anwesenheit von mismatch-DNA **11** oder 75 (± 5) s in Abwesenheit von Target-DNA.

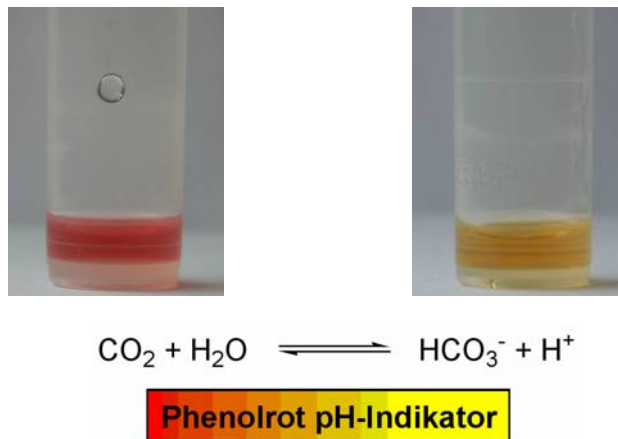


Abb. 4.26 Einstellung des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gleichgewichts durch reaktivierte CA zum DNA-Nachweis.

Die mit CO_2 gesättigten Reaktionslösungen enthalten 0,1 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , (4)Zn (1 μM), apoCA (0,25 μM) und Phenolrot (17,5 μM) bei 0 °C. Die Reaktion wird durch Zugabe von HEPES-Puffer (12,5 mM, pH 9,0) gestartet und die Bilder wurden nach 30 s aufgenommen. **Links:** in Abwesenheit von DNA **10**, pH = 8,5. **Rechts:** in Gegenwart von DNA **10** (1,1 μM), pH = 6,5.

Der Amplifikationsfaktor, d. h. die Anzahl der umgesetzten CO_2 -Moleküle pro Target-DNA-Molekül, kann unter Berücksichtigung des $\text{pK}_a = 7.6$ für HEPES-Puffer abgeschätzt werden. Während eines pH-Abfalls von 9,0 nach 6,5 werden unter Katalyse von CA mindestens 11 mM Protonen freigesetzt. Das bedeutet, dass nach 30 s ein Umsatz von $> 10\,000$ CO_2 -Molekülen von einem Molekül

Target-DNA ausgelöst wird, wie in **Abb. 4.26 rechts** zu sehen. Wiederum begrenzt die Hintergrundreaktion, sowohl durch den spontanen Umsatz von CO_2 als auch durch die Restaktivität von apoCA, die Sensitivität des Assays auf etwa $0,1 \mu\text{M}$ Target-DNA.

Astacin

Die Enzymaktivität wurde colorimetrisch mit dem Substrat STANA verfolgt. Die ansteigende Absorption aufgrund des Freiwerdens von *p*-Nitroanilin wurde bei 405 nm aufgezeichnet.

Im Gegensatz zu den anderen Apoenzymen gelang es in diesem Fall jedoch nicht, das Apoenzym zu reaktivieren. Auch nach Zugabe steigender Zinkkonzentrationen konnte keine Astacin-Aktivität festgestellt werden. Die Versuche mit Astacin wurden aufgrund der unzureichenden Reaktivierung nicht weitergeführt.

Aldolase

Die Spaltung des Substrats Fructose-1,6-bisphosphat wird indirekt nach mehreren gekoppelten enzymkatalysierten Schritten über den Abfall der Absorption von NADH bei 340 nm beobachtet. Es ist beschrieben, dass das Wiedererlangen der Reaktivität ausgehend von dem vollständig deaktivierbaren Apoenzym optimal ist, falls das Verhältnis Apoaldolase:Zn = 1:2 ist.^[78] Der relativ große Reaktivitätsunterschied von Apoenzym zu Enzym kann in Gegenwart von $0,1 \text{ M}$ Kaliumacetat noch gesteigert werden, da das Holoenzym so um den Faktor 7 reaktiver ist.^[83]

In einem Vorversuch wurde zunächst diejenige Zink-Konzentration ermittelt, die benötigt wird, um 100 nM Apoaldolase signifikant zu reaktivieren. **Abb. 4.27** zeigt den Abfall der NADH-Absorption bei 340 nm . Die oberen drei Kurven (Zink-Konzentrationen $\leq 20 \text{ nM}$) zeigen auch noch nach 80 min (abgebildet sind nur die ersten 20 min) weiterhin die maximale Absorption bei 340 nm , das in der Lösung enthaltene NADH wurde nicht zu NAD^+ umgesetzt. Liegt die Zink-Konzentration dagegen bei 100 nM und höher, kann die Aktivität der reaktivierten Aldolase signifikant vom Hintergrund unterschieden werden. Die

Geschwindigkeit verdoppelt sich, wenn das Verhältnis Apoaldolase:Zn von 1:1 auf 1:2 erhöht wird.

Dass bei Konzentrationen unterhalb von 100 nM keine Reaktion stattfindet, kann durch geringe EDTA-Spuren in der Probe erklärt werden, die bei der Apoenzym-Herstellung nicht vollständig abgetrennt wurden. Aufgrund der relativen hohen Unreinheit der Apoaldolase (67% Homogenität) war zudem über den Proteingehalt die genaue Konzentration nur schwer bestimmbar. Das Verhältnis [Apoaldolase]:[Zn] kann deshalb nur annäherungsweise angegeben werden. Außerdem benötigt die Aldolase zwei Zn^{II} -Ionen, und aus der Literatur geht nicht hervor, ob die Metallionen kooperativ in das aktive Zentrum eingebaut werden oder eine mehr oder weniger statistische Assoziation zu erwarten ist.

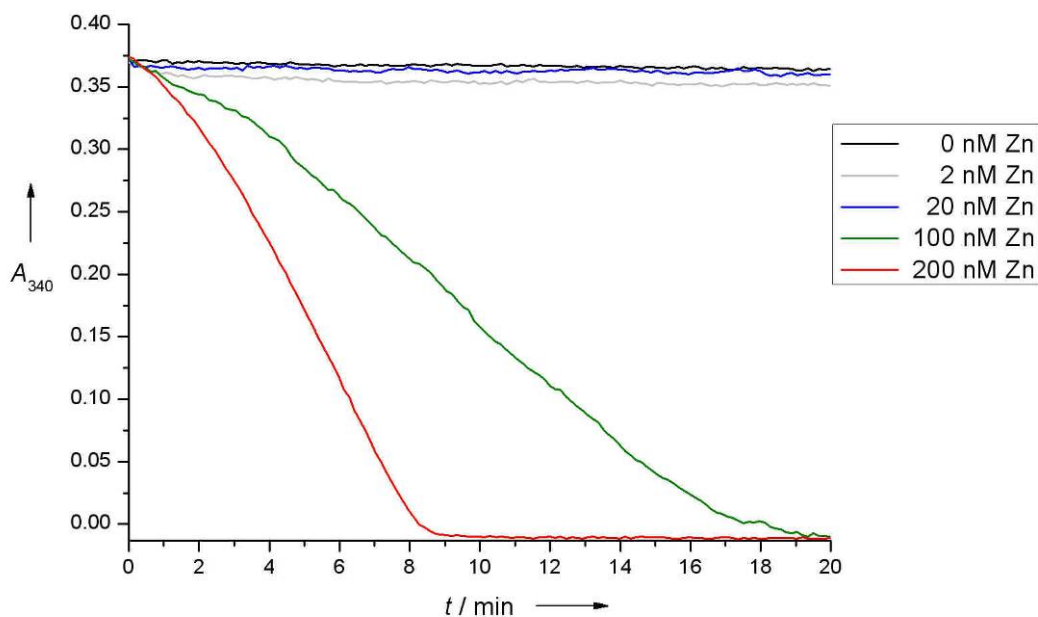


Abb. 4.27 Oxidation von NADH ($\lambda_{max} = 340 \text{ nm}$) zu NAD^+ durch reaktivierte Aldolase nach Zugabe verschiedener Zink-Konzentrationen.

Die Reaktionslösungen enthalten 100 nM Apoaldolase, 1,9 mM Fructose-1,6-bisphosphat, 0,13 mM NADH, 1,7 U/ml GDH/TPI (bezogen auf GDH) sowie die angegebenen $ZnSO_4$ -Konzentrationen bei pH 7,3 (100 mM HEPES-Puffer) und 25 °C.

Abb. 4.28 zeigt die Reaktivierung der Apoaldolase nach Zugabe von verschiedenen Zn-haltigen DNA-Proben. Wie erwartet verläuft die Reaktion bei Zugabe von (tpyDNA)Zn (blaue Linie) am schnellsten. Im Gegensatz dazu

dauert es bei Zugabe von $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Zn}$ (schwarze Linie) wesentlich länger, bis das Substrat verbraucht ist. Wird $(\text{tpy}_2\text{DNA})\text{Zn}$ zuvor mit komplementärer DNA inkubiert, verläuft der NADH-Abbau wesentlich schneller (rote Linie). Eine mismatch-Diskriminierung ist möglich, da in Anwesenheit von mismatch-DNA (grüne Linie) der Abbau des Substrats länger dauert als bei Anwesenheit von komplementärer DNA.

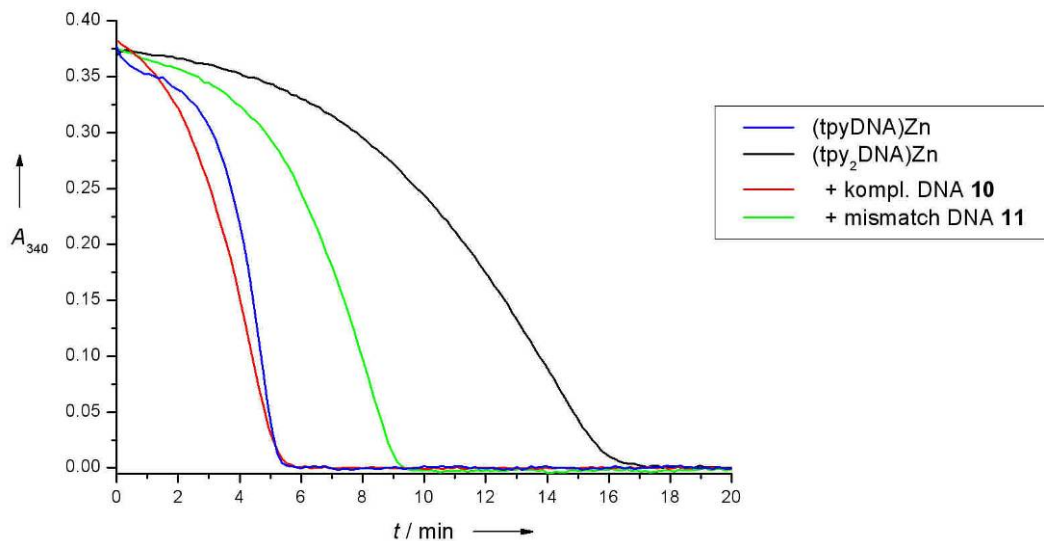


Abb. 4.28 Oxidation von NADH ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) zu NAD^+ durch reaktivierte Aldolase zum DNA-Nachweis.

Die Reaktionslösungen enthalten 20 nM Apoaldolase, 1,9 mM Fructose-1,6-bisphosphat, 0,13 mM NADH, 1,7 U/ml GDH/TPI (bezogen auf GDH), 0,1 M NaCl, 10 mM MgCl_2 und 0,1 M KOAc sowie 100 nM der DNAs **4** (tpy_2DNA) und **12** (tpyDNA), die mit 50 nM Zn und im Fall von **4** mit der komplementären DNA **10** bzw. mismatch-DNA **11** (je 100 nM) präinkubiert wurden, bei pH 7,3 (100 mM HEPES-Puffer) und 25 °C.

Die im Vergleich zu den Versuchen ohne DNA aus **Abb. 4.27** generell erhöhten Geschwindigkeiten lassen sich auf die Zugabe von KOAc zurückführen, das eine stimulierende Wirkung auf die Enzymaktivität der Aldolase hat.

Mung Bean Nuclease

Als käufliches fluorogenes Substrat für die Mung Bean Nuclease wurde ein Molecular Beacon, d. h. ein modifizierter DNA-Strang mit Haarnadelstruktur und Fluorophor-Quencher-Paar (TAMRA-DABCYL), eingesetzt.^[87] Bei Spaltung des DNA-Einzelstrangs dissoziieren die Fragmente, und Fluorophor und Quencher werden räumlich getrennt. Die Fluoreszenz steigt sofort an, sobald das Enzym zugegeben wird. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis beträgt etwa 40.

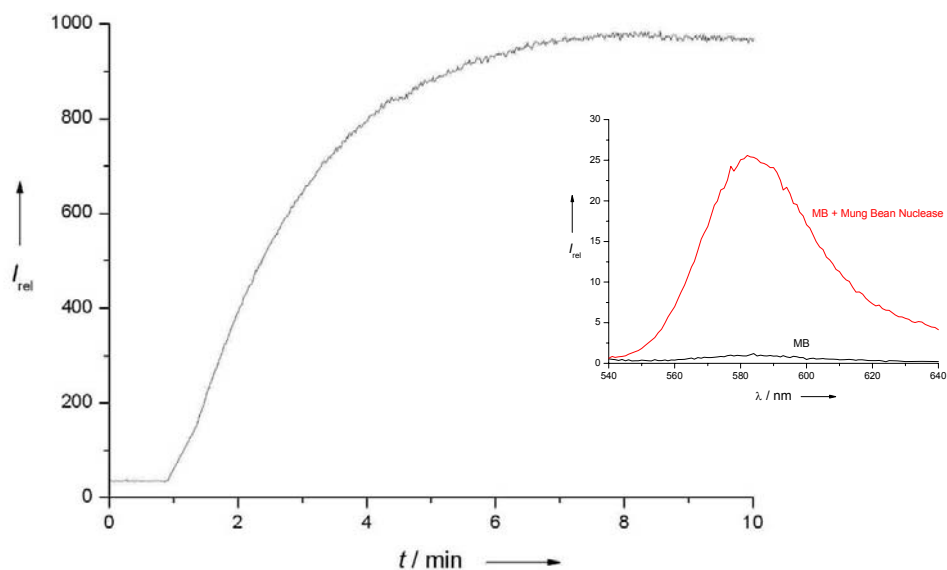


Abb. 4.29 Fluorimetrische Beobachtung der Spaltung eines Molecular Beacon (MB) durch die Mung Bean Nuclease.

Die Reaktionslösungen enthalten 500 nM MB (Molecular Beacon, 5'-TAMRA-GCT.CGT.CCA.TAC.CCA.AGA.AGG.AAG.CGA.GC-DABCYL) und 500 U/ml Mung Bean Nuclease bei pH 4,6 (Nuclease-Puffer mit 30 mM NaOAc, 50 mM NaCl, 1 mM Zinkacetat und 0,1% Triton X-100) und 37 °C. Das Enzym wurde 1 min nach Start der Messung zugegeben ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$).

Der Einschub zeigt das Fluoreszenzspektrum von MB kurz vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) Zugabe der Nuclease ($\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}$).

Die Reaktivierung des Apoenzyms durch Zn ist literaturbeschrieben^[92], allerdings relativ langsam (50% in 24 h). Es werden auch sehr hohe Zn-Konzentrationen dafür gebraucht.

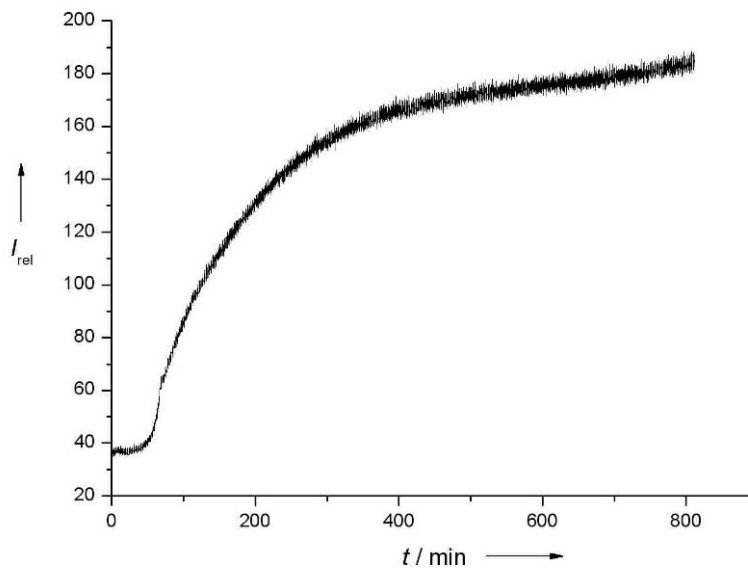


Abb. 4.30 Fluorimetrische Beobachtung der Spaltung eines Molecular Beacon (MB) durch die reaktivierte Mung Bean Nuclease.

Die Reaktionslösungen enthalten 500 U/ml Apo Mung Bean Nuclease, 500 nM Molecular Beacon, 30 mM NaCl und 1 mM ZnSO₄ bei pH 5,0 (50 mM NaOAc) und 37 °C.

Wie **Abb. 4.30** entnommen werden kann, konnte die Reaktivierung durchgeführt werden; die Fluoreszenzintensität war aber geringer als erwartet. Der Kurvenverlauf ist schwer zu erklären, aber eine Zersetzung des Molecular Beacon ohne Einwirkung des Enzyms kann ausgeschlossen werden, da dieses unter den Reaktionsbedingungen stabil ist.

Die für die Reaktivierung benötigten Zn-Konzentrationen (1mM) und die Dauer der Reaktivierung machen die Mung Bean Nuclease eigentlich ungeeignet für die Anwendung einer schnellen und sensitiven Detektion von Biomolekülen. Sowohl bei der Deaktivierung als auch bei der Reaktivierung sind aber Alternativen möglich: Wird die Dialyse zur Apoenzym-Gewinnung ohne starke Chelatoren wie EDTA durchgeführt, funktioniert die Reaktivierung besser, da eventuell durch das Entfernen aller drei Zn-Ionen irreversible Inaktivierung eintritt. In der Gegenwart von Thiolen wie Cystein soll die Reaktivierung mit Zn-Ionen zudem in nur 30 min komplett vollzogen sein.^[92]

5 MOLECULAR MODELLING

Im Rahmen des Graduiertenkollegs 850 („Modellierung von Moleküleigenschaften“) wurden die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Oligonucleotid-Konjugate auch auf theoretischer Ebene behandelt. Dabei ging es vor allem um die Abschätzung der Eigenschaften der PNAs am DNA-Templat sowie der cyclischen DNAs (tacn₂DNA)Cu und (tpy₂DNA)Cu und den Vergleich mit experimentellen Daten. Methoden zur Dichtefunktionaltheorie (DFT), Molekularmechanik und Molekulardynamik kamen zur Anwendung. Die DFT-Rechnungen wurden mit Gaussian 98, die molekularmechanischen Rechnungen mit MacroModel durchgeführt.

Molecular Dynamics

Für DNA, RNA und Proteine ist eine Konformationssuche zu zeitaufwendig. Molecular Dynamics ist deshalb die wohl beliebteste Methode, um flexible Nucleinsäuren zu untersuchen. Die Methode basiert auf der Integration der Newton'schen Bewegungsgleichungen und ergibt ein repräsentatives Set von Konformationen.^[96]

Benötigt werden dafür eine Startstruktur, die Temperatur, die Schrittgröße (meist 1 fs) und die Länge der Simulation (meist 10 ps). Hält man alle C-H-Bindungen fest (da kaum beeinflusst durch Bewegung der Struktur), ist dies eine gute Näherung, und es können größere Schrittweiten verwendet werden. Man startet am lokalen Minimum und erhöht während der Simulation die Temperatur. Das Molekül vibriert und hat nach dem Abkühlen die Potential-Barriere überquert, um eine neue Struktur einzunehmen.

Die Analyse einer molekulardynamischen Simulation erfolgt über die durchschnittliche Energie aller Strukturen oder die Überlagerung bzw. den Vergleich der Strukturen.

5.1 PNAs am DNA-Templat

Im Rahmen einer molekularmechanischen Analyse der vier synthetisierten Thiol-PNA-Konjugate **1 - 4** (Kapitel 3) wurde mithilfe von Kraftfeldmethoden berechnet, wie nahe sich die beiden Reaktionspartner (Thiol-PNAs **1 - 4** und phen-PNA **5**) bei Anwesenheit eines Templats kommen. Dazu wurde eine aus der Protein Data Bank importierte PNA/DNA-Duplex (Datenbankeintrag 1PDT) entsprechend mit den Thiol- und Phenanthrolin-Modifikationen versehen. In wässrigem Medium und bei eingefrorenen Koordinaten der PNA/DNA-Duplex ergaben sich bei Minimierung der Energie im AMBER* (Assisted Model Building and Energy Refinement)-Kraftfeld folgende Strukturen (**Abb. 5.1**):

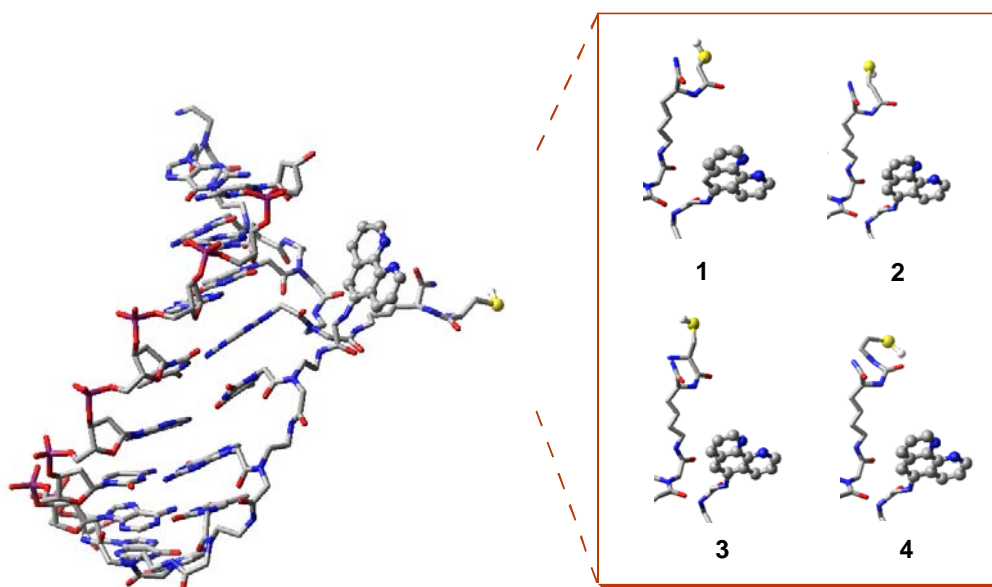


Abb. 5.1 PNA/DNA-Duplex mit Thiol- und Phenanthrolin-Modifikation am lokalen Energieminimum sowie Ausschnitte mit den Thiol-Modifikationen der PNAs **1 - 4**.

Es resultieren Abstände von 11 bis 13 Å zwischen den Thiolgruppen und dem Kupfer-komplexierenden Phenanthrolin. Die Flexibilität der Linker zwischen Thiol bzw. Cu-Komplex und PNA sollte eine Annäherung bzw. Koordination der Thiolgruppe ohne weiteres ermöglichen. Eine offensichtliche Erklärung für den nur geringen Effekt des DNA-Templats auf die Reaktion zwischen Thiolgruppe und Cu^{II} liefern die Rechnungen nicht.

5.2 (tacn₂DNA)Cu

Als Startstruktur wurde der mit B3LYP/LanI2DZ voroptimierte Cu(tacn)₂-Komplex ohne Kupferion und mit Linkern versehen an den DNA-Loop mit Natriumionen als Gegenionen addiert, um Elektroneutralität zu gewähren. Die DNA wurde mit den in MacroModel vorhandenen Nucleotiden aufgebaut und zu einem Ring geschlossen. Die resultierende Struktur wurde unter Fixierung der Geometrieparameter der 1,4,7-Triazacyclononan-Liganden mit AMBER* optimiert (**Abb. 5.2**). Die Nucleobasen sind nach innen gerichtet, die Phosphatgruppen nach außen. Hinweise auf eine Ringspannung gibt es nicht.

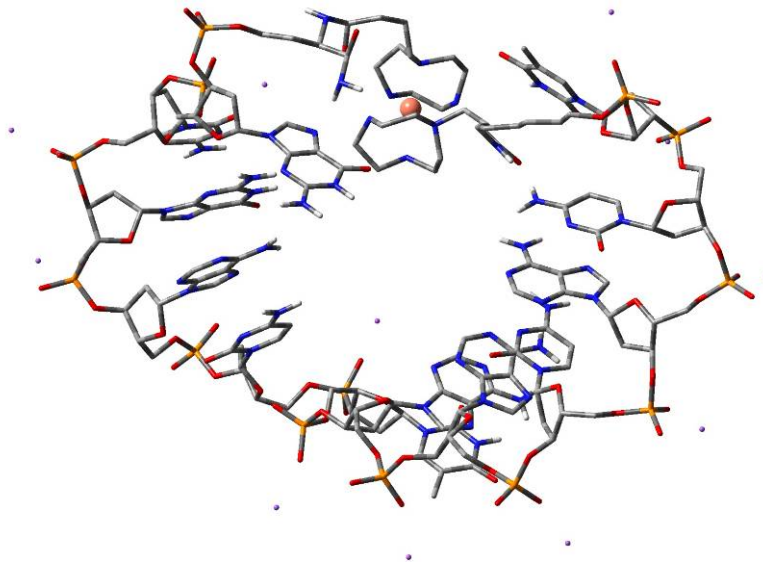


Abb. 5.2 Struktur des modifizierten 12mer DNA-Loops (tacn₂DNA)Cu **1** am lokalen Energieminimum (Lösungsmittel: Wasser, Methode: PRCG, Gradient: 0,2 kcal/mol, konstante Dielektrizität).

5.3 (tpy₂DNA)Cu

In Analogie zu der Struktur von (tacn₂DNA)Cu **1** in **Abb. 5.2** wurde bei der 20mer DNA **4** vorgegangen. Auch hier erhält man einen stabilen DNA-Loop am lokalen Energieminimum.

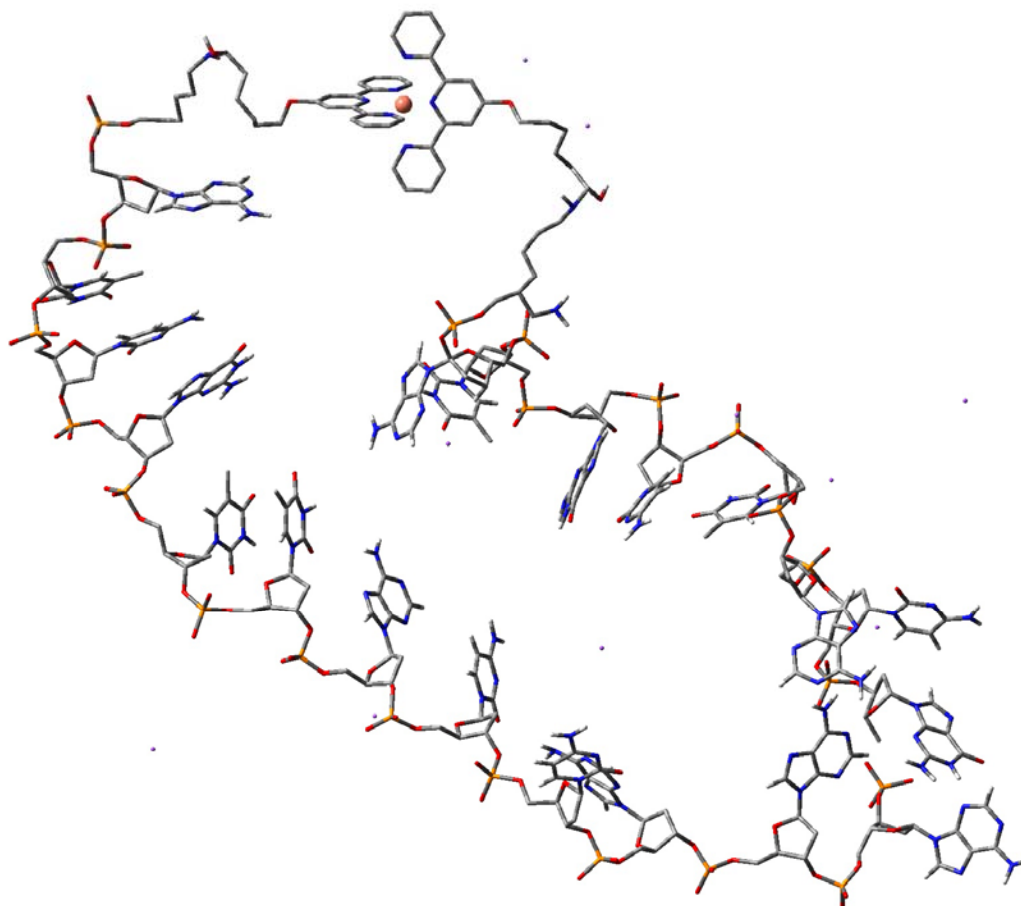


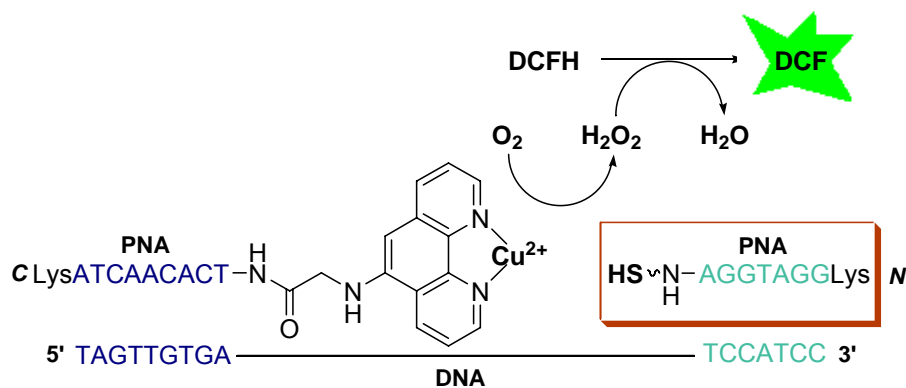
Abb. 5.3 Struktur des modifizierten 20mer DNA-Loops (tpy₂DNA)Cu **4** am lokalen Energieminimum (Lösungsmittel: Wasser, Methode: PRCG, Gradient: 0,2 kcal/mol, konstante Dielektrizität).

Eine Verfeinerung der gezeigten Struktur wurde durch eine Molecular Dynamics Simulation erreicht. Die durchgeführten molekulardynamischen Rechnungen zeigten die Stabilität des DNA-Loops (Simulations-Temperatur 300 K, Schrittgröße 1,5 fs, Gleichgewichtszeit 1 ps, Dauer der Simulation 500 ps, mithilfe von SHAKE werden die Bindungen zu Wasserstoffatomen festhalten).^[96]

6 ZUSAMMENFASSUNG

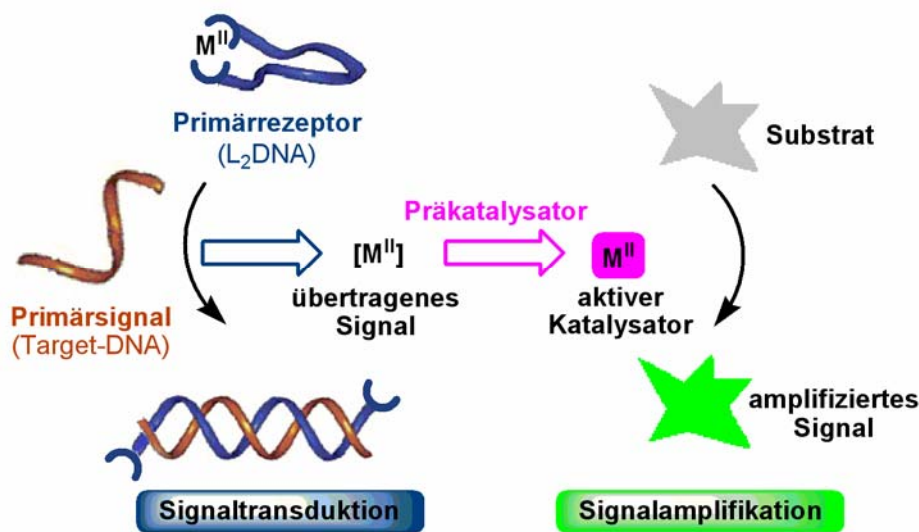
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Chelatliganden modifizierte Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren (PNAs) synthetisiert und deren Metallkomplexe als Sonden für den sequenzspezifischen DNA-Nachweis eingesetzt.

Es wurde erstmals eine Redoxreaktion an einem DNA-Templet durchgeführt (**Schema 6.1**). Die Oxidation einer Thiol-funktionalisierten PNA durch eine Kupfer(II)komplex-funktionalisierte PNA resultierte in einem fluorimetrischen Signal, das zur Detektion genutzt wurde. Die als Templet fungierende Nucleinsäure hatte allerdings nur einen geringen Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit.



Schema 6.1 Redoxreaktion am DNA-Templet.

In einem zweiten Projekt wurden Bis-Ligand-modifizierte DNA-Oligonucleotide (L_2 DNA) synthetisiert ($L = 1,4,7$ -Triazacyclononan, 1,10-Phenantrolin, 2,2':6',2''-Terpyridin, Phen Green). Deren Wechselwirkungen mit Metallionen konnten mithilfe von UV- und ESR-Spektroskopie bzw. Fluorimetrie (im Fall $L =$ Phen Green) charakterisiert werden, woraus thermodynamische und kinetische Daten gewonnen werden konnten. Die modifizierten Nucleinsäuren L_2 DNA wurden schließlich als Komponenten von Signalkaskaden für die DNA-Detektion verwendet (**Schema 6.2**).



Schema 6.2 Nachweis von DNA durch eine zweistufige Signalkaskade.

Für diese DNA-Nachweisreaktionen wurden die Metallkomplex-Konjugate von L₂DNA (L₂DNA)_M als Primärrezeptor für eine komplementäre Target-DNA (Primärsignal) eingesetzt. Bei Hybridisierung wird das Metallion M^{II} freigesetzt. Das Metallion aktiviert als Cofaktor einen chemischen Präkatalysator oder ein Apoenzym und die anschließend initiierten Reaktionen machen das DNA-Target durch Umsetzung fluoro- oder chromogener Substrate fluorimetrisch, photometrisch oder sogar für das Auge direkt sichtbar.

Im Fall der chemischen Signalamplifikation durch Cu^{II} mit 1,10-Phenanthrolin als Präkatalysator konnte DNA innerhalb von 10 min sensitiv (Nachweisgrenze 5 nM) und sequenzspezifisch (eine mismatch-Base) durch Entstehung eines Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden. Nach 12 h Reaktionszeit war die Anwesenheit der Target-DNA sogar mit dem bloßen Auge unter UV-Licht wahrnehmbar.

In einer Variante dieser Oligonucleotid-Konjugate wirkt das Metallion Cu^{II} als intramolekularer Fluoreszenzlöcher, sodass die Bindung einer komplementären Nucleinsäure direkt in ein Fluoreszenzsignal umgesetzt werden kann. Es konnte damit der Prototyp eines stammlosen, „metallgelöschten“ Molecular Beacon hergestellt werden.

Auch zink-abhängige Enzyme haben sich als effektive katalytische Module von künstlichen Signalkaskaden herausgestellt, was in viel höheren Amplifikationsfaktoren als bei den chemischen Katalysatoren resultierte. Hierbei werden durch die Hybridisierung des Primärrezeptors mit komplementärer DNA Zn^{II} -Ionen freigesetzt. Diese können die zuvor hergestellten Apoenzyme von Carboanhydrase, Aldolase, Astacin oder Mung Bean Nuclease reaktivieren - Aldolase wurde zu diesem Zweck eigens aus Hefe isoliert. Die dann durch die Holoenzyme umgesetzten Substrate machen das Signal sichtbar. Im Fall von Carboanhydrase und Aldolase gelang es, über eine solche zweistufige Signalkaskade DNA fluorimetrisch bzw. photometrisch sequenzspezifisch nachzuweisen. Unter Verwendung von Apocarboanhydrase konnte ein colorimetrischer Test entwickelt werden, bei dem nach 30 s bereits mit dem bloßen Auge die Anwesenheit einer Target-DNA wahrnehmbar ist. Hohe Hintergrundreaktionen sowohl durch spontane Reaktion der Substrate als auch durch die Restaktivität der Apoenzyme begrenzte die Empfindlichkeit dieser enzymatischen Assays auf ~ 100 nM.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Chemikalien

Die für die Synthesen und die Experimente verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Merck Biosciences (Schwalbach, Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Reagenzien für die PNA- und DNA-Synthesen

Die Reagenzien für die PNA- und DNA-Synthesen wurden von den Firmen Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) und Prologo Reagents (Hamburg, Deutschland) bzw. Link Technologies (Bellshill Lanarkshire, Großbritannien) erhalten und die jeweiligen Biokonjugate mit einem Expedite™ 8909 System der Firma Applied Biosystems synthetisiert.

DNA-Oligonucleotide

Die unmodifizierten DNA-Oligonucleotide wurden von Metabion (Plannegg-Martinsried, Deutschland) bezogen und waren HPLC-gereinigt.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-MS-Untersuchungen wurden an einem Bruker BIFLEX III Spektrometer durchgeführt, wobei für Messungen von DNA- der negative und für Messungen der PNA-Konjugate der positive Messmodus verwendet wurde. Soweit nicht anders angegeben, wurde für MALDI-TOF-MS-Analysen von DNA als Matrix eine 1:1 Mischung bestehend aus einer gesättigten Lösung von 6-Aza-2-thiothymin in MeCN sowie von 0,1 M Diammoniumhydrogencitrat in Wasser benutzt, wohingegen für die PNA-Konjugate eine Lösung von 50 mM Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxizimtsäure) in MeCN:H₂O:MeOH = 1:1:1 mit 1% TFA verwendet wurde. Die zu untersuchende Probe (1 µl) wurde auf einen MALDI-Träger gegeben und mit der Matrix vermischt. Für die PNA-

Proben wurde für Wasser- und Wasser/MeCN-Lösungen ein Probe:Matrix-Verhältnis von 1:2 verwendet, wohingegen für TFA/m-Cresol-Lösungen (4:1) ein Verhältnis von 1:20 benutzt wurde. Bei den DNA-Proben wurde ein Probe:Matrix-Verhältnis von 1:2 verwendet. Die Proben trockneten an der Luft und wurden sofort untersucht. Die Genauigkeit der MALDI-TOF-MS-Untersuchungen mit externer Kalibrierung betrug $\pm 0,1\%$ der Molekülionenne-masse.

ESI-Massenspektrometrie

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

HPLC

Die HPLC-Trennungen wurden bei 22 °C (für DNA) und 49 °C (für PNA) an einem Shimadzu Flüssigkeits-Chromatographen durchgeführt, der mit einem UV/VIS-Detektor und einem Säulenofen ausgerüstet war. Als Säule wurde eine Nucleosil C4-Säule (250 x 4,6 mm) der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Für die HPLC-Reinigung der PNA- und DNA-Biokonjugate wurde eine 500 μ l-Injektionsschleife verwendet; das Injektionsvolumen betrug 300 μ l. Für die PNA-Trennung wurde ein Lösungsmittelgradient von MeCN (0,1% TFA, Lösungsmittel B) und Wasser (0,1% TFA, Lösungsmittel A) verwendet: in 35 min 0-35% B, in 10 min 35-90% B, 10 min 90% B. Für die DNA-Trennung wurde ein Gradient von MeCN (Lösungsmittel B) und 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser (Lösungsmittel A) eingesetzt: in 35 min 0-25% B, in 10 min 25-90% B, 10 min 90% B.

UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Experimente wurden an einem Varian Cary 100 Bio UV/VIS-Spektrophotometer durchgeführt, wobei für Absorptionsmessungen meist schwarzwandige Quarz-Semi-Mikroküvetten (0,9 ml) der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) benutzt wurden. Die Experimente mit Apoenzymen

wurden zur Vermeidung von Metallkontaminationen in Kunststoff-UV-Küvetten mikro Plastibrand der Firma Brand (Wertheim, Deutschland) durchgeführt. Die Schichtdicke betrug jeweils 1 cm.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm wurde mit dem UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 der Firma Peqlab (Erlangen, Deutschland) am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg durchgeführt.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer aufgenommen, wobei meist eine Ultra-Mikro-Küvette (50 μ l) der Firma Hellma (Müllheim, Deutschland) verwendet wurde, nur bei Verwendung von Diacetylfluorescein wurde eine schwarze 96 well Mikrotiterplatte der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) eingesetzt. Experimente mit Phen Green wurden in Makroküvetten (3 ml) der Firma Hellma durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

NMR-Messungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut mit einem Bruker AVANCE DPX 200 NMR-Spektrometer durchgeführt (^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz). Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero (Kastellaun, Deutschland) bezogen. Zur Standardisierung der chemischen Verschiebungen wurden die Restwasserstoffsignale der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard verwendet.

ESR-Spektroskopie

ESR-Spektren wurden von Volker Seifried an einem EPR-300E mit Hochempfindlichkeitsresonator der Firma Bruker aufgenommen.

Atom-Absorptionsspektroskopie (AAS)

Die Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie-Messungen (Acetylen-Luft-Flamme, λ_{Zn} = 213,9 nm) der verwendeten Enzyme sowie deren Apoenzyme

wurden an einem AAS Vario6 der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) am Institut für Umweltgeochemie von Silvia und Stefan Rheinberger durchgeführt. Die Eichgerade wurde für den Bereich 0 - 500 $\mu\text{g/l}$ Zn mit Hilfe von vier Lösungen bekannter Konzentrationen (0, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$) erstellt.

Enzyme

Für die Dialyse zur Gewinnung der Apoenzyme wurden Dialysemembrane Spectra/Por®7 MWCO 3500 der Firma Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA) verwendet. Nach der Dialyse wurden Apocarboanhydrase und Apoaldolase mithilfe einer Econo-Pac P6-Kartusche der Firma Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) gereinigt.

Sonstiges

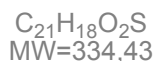
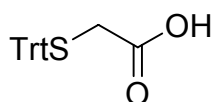
Als Reaktionsgefäße wurden low retention Reaktionsgefäße (0,6 und 1,7 ml) der Firma Kisker (Steinfurt, Deutschland) bzw. Safe Lock Reaktionsgefäße (1,7 ml) der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) benutzt. Um Reaktionslösungen zu zentrifugieren, wurde die Biofuge pico von Heraeus (Hanau, Deutschland) verwendet. Lösungen wurden mit einem MS2 Minishaker der Firma IKA (Staufen, Deutschland) gemischt bzw. mit einem Thermomixer comfort für 1,5 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf temperiert und durchmischt.

Wässrige Oligonucleotid-Lösungen wurden bis zur Trockene mit einem Gefriertrockner VaCo 5 der Firma Zirbus (Bad Grund, Deutschland) eingengt. Für alle Versuche wurde Wasser mit mindestens HPLC-Reinheit verwendet. Mit Ausnahme der Metallsalz-, Ligand- und Puffer-Lösungen wurden alle anderen Lösungen vor den Experimenten frisch angesetzt.

7.2 Synthesen kleiner Moleküle

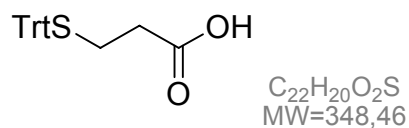
7.2.1 Trt-geschützte Thiole

S-Trityl-mercaptoessigsäure 1^[40]



6,13 g Tritylchlorid (22 mmol) werden in 50 ml Toluol gelöst, dann werden 3,1 ml NEt₃ und 1,4 ml 2-Mercaptoessigsäure (20 mmol) bei RT zugegeben. Nach 3 h wird die Reaktionsmischung bis zur Trockene im Vakuum eingengt, in 100 ml CH₂Cl₂ gelöst und zweimal mit je 100 ml Wasser extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und im Vakuum eingengt. Der gelbe Rückstand wird aus 20 ml Toluol umkristallisiert.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	3,12 g (9,3 mmol, 42%).
MS (HR-ESI)	m/z = 333,0923 [M-H] ⁻ , ber. 333,0949 (-2,7 mmu).
¹H-NMR (DMSO-d₆)	δ = 12,84 (br s, 1H, COOH); 7,22-7,36 (m, 15H, H _{arom}); 2,84 (s, 2H, CH ₂).
¹³C-NMR (DMSO-d₆)	δ = 170,6 (COOH); 144,4 (C _{arom}); 129,5; 128,2; 127,4 (C _{arom}); 66,7 (C _q); 35,1 (CH ₂).

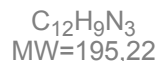
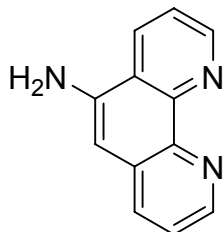
S-Trityl-mercaptopropionsäure 2

Die Synthese erfolgt analog zur Herstellung des Essigsäure-Analogons **1**.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	2,13 g (6,1 mmol, 28%).
MS (HR-ESI)	$m/z = 347,1132 [M-H]^-$, ber. 347,1106 (2,6 mmu).
1H-NMR (DMSO-d_6)	$\delta = 12,31$ (br s, 1H, COOH); 7,22-7,36 (m, 15H, H_{arom}); 2,88 (t, 2H, CH_2); 2,62 (t, 2H, CH_2).
^{13}C-NMR (DMSO-d_6)	$\delta = 173,2$ (COOH); 144,8 (C_{arom}); 129,5; 128,2; 127,4 (C_{arom}); 66,6 (C_q); 33,4; 27,1 (CH_2).

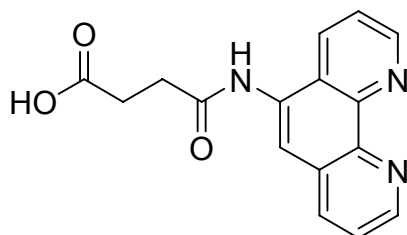
7.2.2 Derivate von 1,10-Phenanthrolin

5-Amino-1,10-phenanthrolin 3^[41]



In einem 100 ml-Zweihalskolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter werden 1,47 g 5-Nitro-1,10-phenanthrolin (6,5 mmol) in 45 ml EtOH suspendiert. Daraufhin lässt man 10 min bei RT rühren. 0,29 g Palladium auf Aktivkohle (10%) werden zugegeben und 10 min weitergerührt. Tropfenweise wird eine Mischung aus 1,5 ml Hydrazinhydrat (98%ig, 47 mmol) und 30 ml EtOH zugegeben. Die resultierende Suspension wird 5 h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit einem Büchnertrichter abfiltriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer bis auf etwa 10 ml eingeeengt. Nach Aufbewahrung über Nacht bei 4 °C wird der ausgefallene Niederschlag abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet.

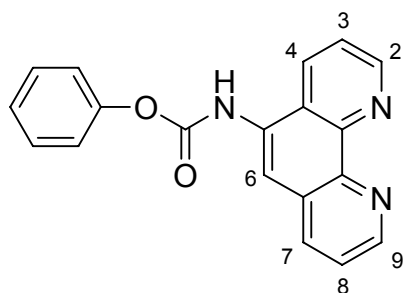
Habitus	Gelber Feststoff.
Ausbeute	1,06 g (5,5 mmol, 87%).
MS (HR-ESI)	m/z = 196,0846 [M+H] ⁺ , ber. 196,0875 (-2,9 mmu).
¹H-NMR (DMSO-d₆)	δ = 9,05 (dd, J = 4,1; 1,4 Hz, 1H); 8,70 (dd, J = 1,4; 1,0 Hz, 1H); 8,66 (dd, J = 2,7; 1,7 Hz, 1H); 8,07 (dd, J = 8,2; 1,7 Hz, 1H); 7,75 (dd, J = 8,4; 4,1 Hz, 1H); 7,52 (dd, J = 8,2; 4,1 Hz, 1H); 6,87 (s, 1H); 6,15 (s, 2H, NH ₂).
¹³C-NMR (DMSO-d₆)	δ = 149,3; 144,8; 142,6; 140,5; 132,7; 130,8; 130,5; 123,1; 122,0; 121,8; 121,3; 101,7.

3-(1,10-Phenanthrolin-5-ylcarbamoyl)propansäure 4^[41]

C₁₆H₁₃N₃O₃
MW=295,29

0,74 g **3** (3,8 mmol) werden dreimal mit Pyridin abgedampft und in einem 50 ml-Schlenk Kolben in 10 ml abs. Pyridin suspendiert. 0,53 g Bernsteinsäureanhydrid (5,3 mmol) und eine Spatelspitze DMAP werden in 5 ml abs. Pyridin gelöst und unter Argon zu **3** gespritzt. Nach 25 h Rühren bei RT wird der Niederschlag abfiltriert und mit 45 ml eiskaltem Pyridin gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und bei Zugabe von 50 ml Wasser fällt das Produkt als weißer Niederschlag aus. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Wasser wird das Produkt im Vakuum getrocknet.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	0,62 g (2,1 mmol, 55%).
MS (HR-ESI)	m/z = 296,1014 [M+H] ⁺ , ber. 296,1035 (-2,1 mmu).
¹H-NMR (DMSO-d₆)	δ = 10,20 (s, 1H); 9,12 (dd, J = 4,2; 1,5 Hz, 1H); 9,04 (dd, J = 4,4; 1,5 Hz, 1H); 8,65 (dd, J = 8,5; 1,4 Hz, 1H); 8,45 (dd, J = 8,4; 1,7 Hz, 1H); 8,14 (s, 1H); 7,81 (dd, J = 8,5; 4,3 Hz, 1H); 7,74 (dd, J = 8,2; 4,3 Hz, 1H); 2,79 (t, J = 6,3 Hz, 2H); 2,61 (t, J = 6,7 Hz, 2H).
¹³C-NMR (DMSO-d₆)	δ = 173,9; 171,4; 149,7; 149,1; 145,4; 135,5; 131,7; 128,0; 123,5; 122,6; 119,1; 30,0; 28,4.

Phenyl-1,10-phenanthrolin-5-yl-carbamat 5

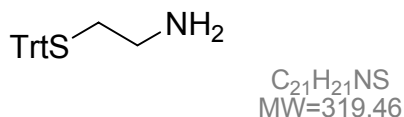
$C_{19}H_{13}N_3O_2$
MW=315,33

240 μ l Chlorameisensäure-phenylester (1,9 mmol) werden in 30 ml THF gelöst und 370 mg **3** (1,9 mmol) werden langsam dazugegeben. Die Reaktionslösung wird 25 min gerührt, danach werden 50 ml Eiswasser und 1,5 ml 2 M HCl zugegeben. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt. Das Produkt wird durch säulenchromatographische Aufreinigung ($CHCl_3$:EtOH = 2:1) erhalten.

Habitus	Roter Feststoff.
Ausbeute	0,55 g (1,7 mmol, 90%).
MS (HR-ESI)	$m/z = 316,1078 [M+H]^+$, ber. 316,1086 (-0,8 mmu).
1H-NMR (DMSO-d_6)	$\delta = 10,83$ (s, 1H, NH); 9,33 (d, 1H, H2); 9,20 (d, 1H, H9); 8,52 (s, 1H, H6); 8,21 (d, 1H, H3); 8,16 (d, 1H, H8); 7,28-7,53 (m, 7H, HPh, H4, H7).

7.2.3 Derivate von 1,4,7-Triazacyclononan

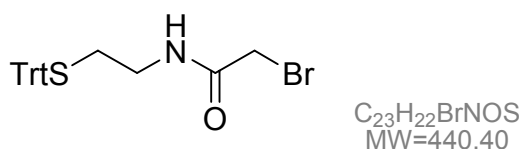
S-Trityl-2-aminoethanthiol 6^[97]



In einem 100 ml-Rundkolben werden 3,4 g Cysteamin Hydrochlorid (0,03 mol) bei RT in 40 ml Trifluoressigsäure (0,45 mol) gelöst und 7,8 g Triphenylmethanol (0,03 mol) als Feststoff zugegeben. Nach 1 h Rühren bei RT wird die Reaktionslösung eingeeengt, das verbleibende orange-rote Öl mit 30 ml Essigester versetzt und dreimal mit 20 ml 3 M NaOH und je zweimal mit 20 ml Wasser, 20 ml NaHCO₃-Lösung und 20 ml NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen werden mit 20 ml Essigester rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Man lässt im Kühlschrank auskristallisieren.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	5,9 g (0,02 mol, 62%).
MS (HR-ESI)	m/z = 320,1446 [M+H] ⁺ , ber. 320,1473 (-2,7 mmu).
¹H-NMR (CDCl₃)	δ = 7,63 (br s, 2H); 7,40 (dd, J = 6,7; 1,6 Hz, 6H); 7,32-7,20 (m, 9H); 2,58 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 2,24 (t, J = 6,7 Hz, 2H).
¹³C-NMR (CDCl₃)	δ = 144,1; 129,4; 128,2; 127,0; 67,3; 38,4; 29,0.

N-(2-Bromacetyl)-S-trityl-2-aminoethanthiol 7^[97]

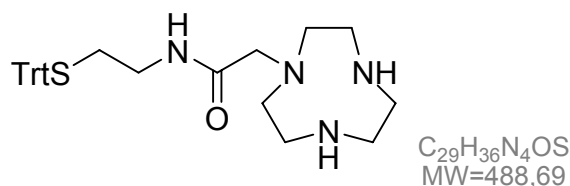


1,1 ml Bromacetyl bromid (12,5 mmol) werden in 6 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und auf -20 °C abgekühlt. 1,7 ml NEt₃ (12,5 mmol) und 4,0 g **6** (12,5 mmol) werden in 15 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und zu Bromacetyl bromid getropft. Nach dem

Auftauen auf RT wird 15 min gerührt und anschließend mit 50 ml Wasser gequenchet. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase wird mit 1 M HCl, Wasser, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen (je 50 ml) und über MgSO₄ getrocknet. Man engt im Vakuum auf 35 ml ein, gibt 100 ml Hexan dazu und lässt im Kühlschrank auskristallisieren.

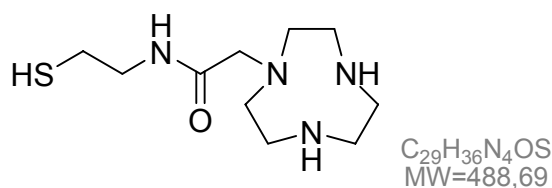
Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	2,94 g (6,7 mmol, 54%).
¹H-NMR (CDCl₃)	δ = 7,44-7,22 (m, 15H); 6,56 (s, 1H); 3,81 (s, 2H); 3,01 (q, J = 6,2 Hz, 2H); 2,43 (t, J = 6,3 Hz, 2H).
¹³C-NMR (CDCl₃)	δ = 165,1 (C _q); 144,5 (C _q); 129,5; 128,0; 126,9 (CH); 66,9; 38,7; 31,6; 29,1.

***N*-(2-[1,4,7-Triazacyclononan-1-yl-acetyl])-S-trityl-2-aminoethanthiol 8**



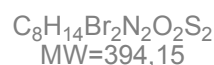
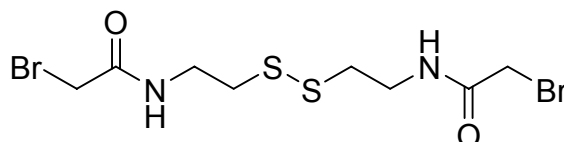
88 mg **7** (0,2 mmol) werden in CH₂Cl₂/MeOH im Verhältnis 1:1 gelöst. Parallel werden 48 mg tacn·3 HCl (0,2 mmol) in 3 ml CH₂Cl₂ und 140 μl DIEA (0,8 mmol) gelöst. Die beiden Lösungen werden zusammengegeben. Die Reaktionskontrolle nach 2 h mittels ESI-MS zeigt den Produktpeak von m/z = 489,2 [M+H]⁺. Die Weiterreaktion zu **9** erfolgt *in situ*.

***N*-(2-[1,4,7-Triazacyclononan-1-yl-acetyl])-2-aminoethanthiol 9**



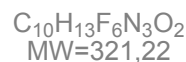
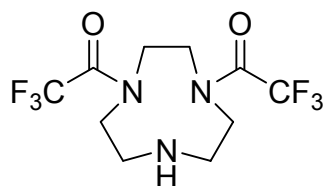
Die Trt-Abspaltung erfolgt mit AgNO_3 / Dithioerythritol oder TFA und führt zu einem Produktpeak bei $m/z = 247,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ im ESI-MS. Das Produkt ist nicht isolierbar.

***N,N'*-(Dithiodi-2,1-ethandiyl)bis(2-brom)-acetamid 10**



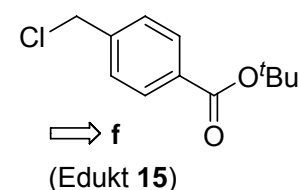
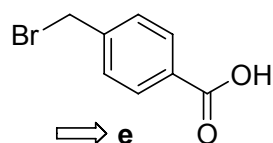
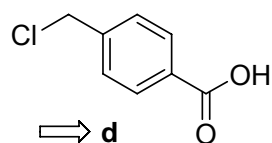
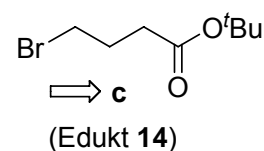
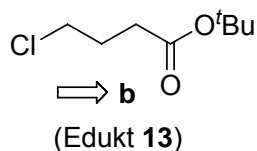
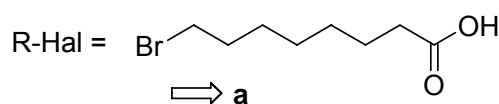
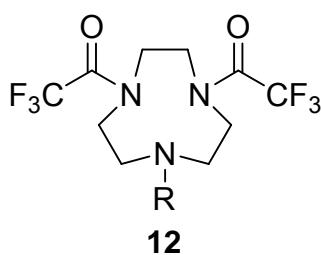
In einem 100 ml-Schlenkkolben werden 4,5 g Cystamin Dihydrochlorid (20 mmol) in 60 ml 1 M Natronlauge gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Über ein Septum werden 3,5 ml Bromacetyl bromid (40 mmol) zugegeben, worauf sich die Lösung leicht bräunlich verfärbt und sich langsam ein weißer Feststoff abscheidet. Man lässt die Reaktionsmischung noch 1 h bei 0 °C weiterrühren, danach über Nacht bei RT. Zur Aufarbeitung wird die stark saure Lösung zunächst mit 1 M Natronlauge neutralisiert. Dann wird filtriert, der Rückstand mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	1,16 g (2,9 mmol, 15%).
MS (HR-ESI)	$m/z = 392,8958$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 392,8942 (+1,6 mmu).
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)	$\delta = 7,03$ (s, 2H, NH); 3,91 (s, 4H, CH_2Br); 3,63 (q, $J = 6,2$ Hz, 4H, CH_2NH); 2,85 (t, $J = 6,3$ Hz, 4H, CH_2S).
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)	$\delta = 166,0$ (C_q); 39,0 (CH_2NH); 37,3 (CH_2S); 29,0 (CH_2Br).

1,4-Bis(trifluoracetyl)-1,4,7-triazacyclononan 11^[55]

130 mg 1,4,7-Triazacyclononan (1 mmol) werden in 2,2 ml Methanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 140 μl Triethylamin (1 mmol) gegeben, gefolgt von 480 μl Ethyltrifluoracetat (4 mmol) innerhalb von 5 min. Die Reaktionslösung wird 15 h unter Stickstoffatmosphäre gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 2 ml CH_2Cl_2 gelöst. Die Lösung wird über eine kurze Kieselgelsäule gegeben (~ 5 cm) und das Produkt mit Essigester eluiert. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	286 mg (0,89 mmol, 89%).
MS (HR-ESI)	$m/z = 322,1000$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 322,0990 (+ 1,0 mmu).
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)	$\delta = 3,99\text{-}4,04$ (m, 2H); $3,77\text{-}3,82$ (m, 2H); $3,40\text{-}3,50$ (m, 4H); $2,97\text{-}3,09$ (m, 4H); $2,40$ (s, 1H).

Generelle Vorschrift für die Substituierung an 11

a: 1,1 g **11** (3,4 mmol), 2,3 g 8-Bromooctansäure (10,2 mmol) und 2,2 ml DIEA (13,6 mmol) werden in 50 ml abs. DMF gelöst, 2 d gerührt und 1 d zum Rückfluss erhitzt. Die Aufreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie mit Essigester.

b, c, d, f: 322 mg **11** (1 mmol) werden in 2,5 ml MeCN gelöst und 10 min gerührt. 400 mg K_2CO_3 (3 mmol), 16,5 mg KI (0,1 mmol) und 162 mg 4-(Chlormethyl)-benzoesäure bzw. **13 - 15** (1 mmol) werden zugegeben. Man erhitzt 16 h unter Stickstoffatmosphäre zum Rückfluss. Nach dem Abkühlen auf RT werden die Salze abfiltriert, das Filtrat wird zweimal mit MeCN gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Im Fall von **b** und **f** schließt sich eine säulenchromatographische Aufreinigung mit Essigester an. Bei der Umsetzung mit **c** konnte kein Produkt erhalten werden.

e: 261,4 mg **11** (0,81 mmol) werden in 5 ml MeCN gelöst, 1,22 mmol 4-(Bromomethyl)-benzoesäure und 225 mg K_2CO_3 (1,22 mmol) werden dazugegeben. Man erhitzt 12 h unter Rückfluss und filtriert die Rückstände ab. Die t Bu-Abspaltung bei **b** und **f** erfolgt durch TFA (95%). Nach 1 h Rühren werden 50 ml Wasser hinzugegeben. Das Produkt wird nach Lyophilisieren erhalten.

MS (ESI) **a** $m/z = 464,1984 [M+H]^+$, ber. 464,1984 (**HR-ESI**, 0,0 mmu).

b $m/z = 464,2 [M+H]^+$, ber. 464,2.

Nach t Bu-Abspaltung $m/z = 408,1 [M+H]^+$, ber. 408,1.

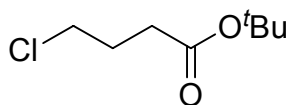
c $m/z = 322,1$ (Edukt), ber. 464,2.

d $m/z = 456,1 [M+H]^+$, ber. 456,1.

e $m/z = 456,1 [M+H]^+$, ber. 456,1.

f $m/z = 512,2 [M+H]^+$, ber. 512,2.

Nach t Bu-Abspaltung $m/z = 456,0 [M+H]^+$, ber. 456,1.

4-Chlorbuttersäure-*tert*-butylester 13^[98]

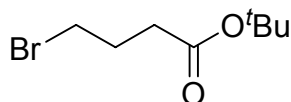
$C_8H_{15}ClO_2$
MW=178,65

16,6 ml 4-Chlorbuttersäurechlorid (147 mmol) werden bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre tropfenweise zu einer Lösung von 10 mg DMAP in 50 ml abs. Pyridin und 50 ml *tert*-Butanol gegeben. Anschließend wird die Suspension 1 h gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 500 ml Essigester gelöst und mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt.

Habitus Braunes Öl.

Ausbeute 19,1 g (107 mmol, 73%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ = 3,58 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 2,40 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 2,06 (m, 2H); 1,45 (s, 9H, CH₃).

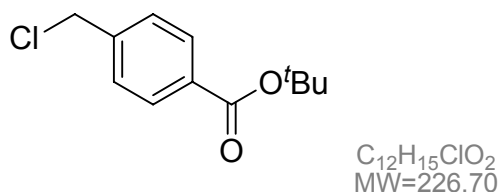
4-Brombuttersäure-*tert*-butylester 14^[99]

$C_8H_{15}BrO_2$
MW=223,11

1,7 ml konz. H₂SO₄ (30 mmol) werden zu einer stark rührenden Suspension aus 14,5 g wasserfreiem MgSO₄ (120 mmol) und 120 ml abs. CH₂Cl₂ gegeben und für 15 min bei RT gerührt. Danach werden 5 g 4-Brombuttersäure (30 mmol) und 14,4 ml abs. *tert*-Butanol (150 mmol) zugegeben und 48 h bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Mit 230 ml NaHCO₃-Lösung wird die Reaktion gequencht und solange weitergerührt, bis sich das MgSO₄ auflöst. Die organische Phase wird mit Wasser ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis zu Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgt über eine Säulenchromatographie mit CHCl₃.

Habitus	Braunes Öl.
Ausbeute	1,3 g (6 mmol, 20%).
¹H-NMR (CDCl₃)	δ = 3,45 (t, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H, H _α BrCH ₂); 2,40 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H, H _γ); 2,13 (q, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H, H _β); 1,45 (s, 9H, CH ₃).

4-(Chlormethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester 15^[100]



4,4 g *tert*-Butyl-trichloracetimidat (20 mmol) in 20 ml THF werden zu 1,56 g 4-(Chlormethyl)-benzoesäure (10 mmol) in 10 ml THF gegeben. 200 μl BF₃·Et₂O werden dazugegeben, und die Reaktionslösung wird 16 h bei RT gerührt. Danach wird festes NaHCO₃ hinzugegeben und anschließend über Kieselgel filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	1,3 g (6 mmol, 60%).
MS (ESI)	<i>m/z</i> = 226,9 [M+H] ⁺ , ber. 227,0.
¹H-NMR (CDCl₃)	δ = 8,10 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H); 7,50 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H); 4,63 (s, 2H); 1,59 (s, 9H, CH ₃).

Ditosylethylenglykol 16^[101]

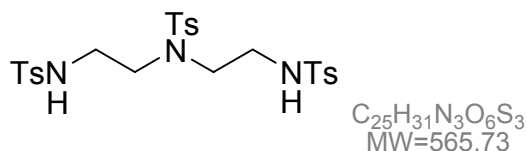


Zu einer Lösung von 64 ml NEt₃ (0,46 mol) und 87,8 g Tosylchlorid (0,46 mol) in 320 ml CH₂Cl₂ werden bei 0 °C innerhalb von einer Stunde 11,3 ml Ethylenglykol (0,21 mol) zugetropft. Danach wird die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird in 2 l Wasser geschüttet und fünfmal mit je 160 ml

CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

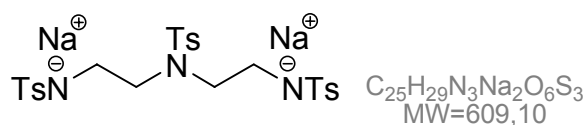
Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	71,0 g (0,19 mol, 92%).
MS (HR-ESI)	m/z = 371,0620 [M+H] ⁺ , ber. 371,0623 (- 0,3 mmu).
¹H-NMR (CDCl₃)	δ = 7,74 (d, J = 8,2 Hz, 4H); 7,34 (d, J = 8,2 Hz, 4H); 4,18 (s, 4H); 2,49 (s, 6H).

***N,N',N''*-Tritosyl-diethylentriamin 17^[102]**



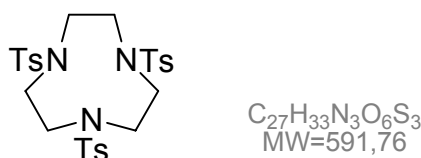
In einem 2 l-Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Thermometer und Tropftrichter werden 287,5 g Tosylchlorid (1,5 mol) und 750 ml Pyridin (zuvor über KOH getrocknet und destilliert) vorgelegt. Die Mischung wird gerührt und auf 50 °C erwärmt, wobei sich der Feststoff auflöst. Bei 30 °C werden dann über 1 h 54 ml Diethylentriamin (0,5 mol) in 75 ml Pyridin zugetropft. Nach 30 min bei 60 °C wird auf RT abgekühlt und unter Rühren 500 ml Wasser zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT und 2 h im Eisbad wird der weiße Feststoff abfiltriert, gründlich mit eiskaltem 95%igem EtOH gewaschen und getrocknet.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	236,8 g (0,42 mol, 84%).
MS (ESI)	m/z = 566,4 [M+H] ⁺ , ber. 566,1.
¹H-NMR (DMSO-d₆)	δ = 7,65 (d, J = 8,1 Hz, 6H); 7,40 (d, J = 8,0 Hz, 6H); 3,01 (t, J = 6,9 Hz, 8H); 2,39 (s, 9H).

N,N',N''-Tritosyl-diethylentriamin-N,N''-dianatrium Salz 18^[102]

In einem 1 l-Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter werden 250 ml abs. EtOH und 106 g **17** (0,19 mol) unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt. Nachdem zum Rückfluss erhitzt wurde, wird die Heizquelle entfernt und schnell 250 ml 1,5 N Na-Ethanolat-Lösung (8,6 g Na in 250 ml abs. EtOH) über den Tropftrichter zugegeben. Die Lösung wird von unlöslichen Resten in einen Erlenmeyerkolben abdekantiert. Das Produkt kristallisiert über Nacht aus, wird unter Stickstoffatmosphäre filtriert, mit abs. EtOH gewaschen und getrocknet.

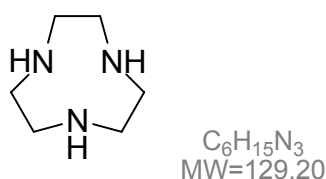
Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	71,1 g (0,12 mol, 62%).
MS (ESI)	m/z = 564,2 [M-H] ⁻ , ber. 564,1.
¹H-NMR (DMSO-d₆)	δ = 7,46 (d, J = 8,0 Hz, 6H); 7,28 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 7,11 (d, J = 8,0 Hz, 4H); 2,88 (m, 4H); 2,62 (m, 4H); 2,36 (s, 3H); 2,30 (s, 6H).

1,4,7-Tritosyl-1,4,7-triazacyclononan 19^[102]

In einem 1 l-Dreihalskolben mit Thermometer und Tropftrichter werden 30,2 g **18** (0,05 mol) in 400 ml DMF vorgelegt. Die Lösung wird bei 100 °C gerührt, während 18,5 g **16** (0,05 mol) in 160 ml DMF gelöst über 40 min zugegeben werden. Nach 30 min wird die Heizquelle entfernt, und 100 ml Wasser werden über den Tropftrichter zugegeben. Nach Abkühlen auf RT und Rühren über Nacht wird die Reaktionslösung im Vakuum auf ~200 ml eingengt und mit Wasser aufgefüllt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit 95%igem EtOH gewaschen und getrocknet.

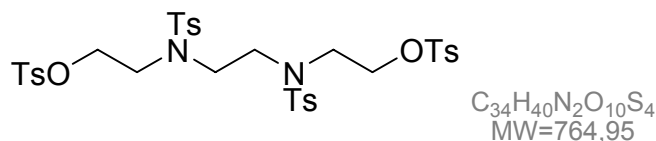
Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	26,0 g (0,04 mol, 88%).
MS (HR-ESI)	$m/z = 592,1599 [M+H]^+$, ber. 592,1610 (-1,1 mmu).
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)	$\delta = 7,70$ (d, $J = 8,3$ Hz, 6H); $7,32$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); $3,42$ (s, 12H); $2,43$ (s, 9H).
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)	$\delta = 143,9; 134,6; 129,9; 127,5; 51,9; 21,5$.

1,4,7-Triazacyclononan 20^[102]



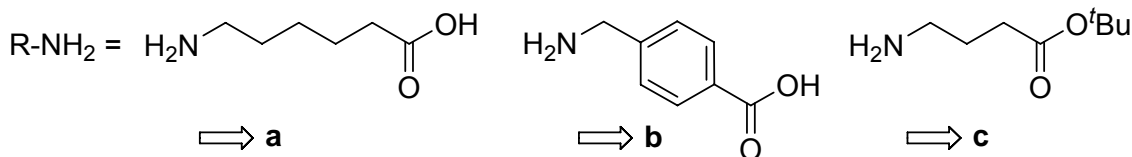
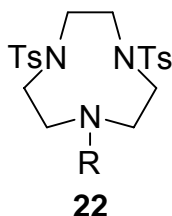
Ein 500 ml-Einhalskolben mit Rückflusskühler wird mit 23,6 g **19** (0,04 mol) beschickt. Nach Zugabe von 120 ml konz. H_2SO_4 wird 70 h unter Stickstoffatmosphäre auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT werden im Eisbad langsam 320 ml abs. Et_2O zugegeben. Der Niederschlag (Polyhydrosulfat) wird abfiltriert und mit Et_2O gewaschen. Der Niederschlag wird unter Eiskühlung in 50 ml Wasser gegeben und zum Neutralisieren werden 17 ml 50%ige NaOH dazugegeben. Nach Zugabe von 700 mg Aktivkohle wird auf 80 °C erhitzt und anschließend filtriert. Das Filtrat wird unter Eiskühlung durch Zugabe von 10 ml konz. H_2SO_4 auf pH 1 eingestellt. Der weiße Feststoff (Trisschwefelsäuresalz) wird abfiltriert und mit 95%igem EtOH gewaschen. Der Niederschlag wird in 50 ml eisgekühltes Wasser gegeben; dazu gibt man 95 ml 50%ige NaOH und anschließend wird 4 d kontinuierlich mit THF extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus MeCN (20 ml pro g) umkristallisiert.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	0,9 g (0,007 mol, 17%).
MS (HR-ESI)	$m/z = 130,1 [M+H]^+$, ber. 130,1.
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)	$\delta = 2,74$ (s, 12H).

Tetratosyl-*N,N'*-bis(2-hydroxyethyl)ethylendiamin 21^[103]

52 g Tosylchlorid (0,27 mol) werden in 70 ml Pyridin gelöst und innerhalb von 2 h zu 10 g *N,N'*-Bis(2-hydroxyethyl)ethylendiamin (0,07 mol) in 135 ml Pyridin bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre getropft. Die Reaktionslösung wird 4 h bei RT weitergerührt und anschließend unter Rühren zu einer Mischung aus je 170 ml konz. HCl und Eis gegeben. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser und MeOH gewaschen und dreimal aus MeOH umkristallisiert.

Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	22 g (0,03 mol, 41%).
MS (ESI)	$m/z = 765,2 [M+H]^+$, ber. 765,2
¹H-NMR (CDCl₃)	$\delta = 7,31-7,78$ (m, 16H, H _{arom}); 4,13 (t, 4H, CH ₂ O); 3,35 (t, 4H, N-CH ₂); 3,29 (s, 4H, CH ₂ N); 2,44 (s, 12H, CH ₃).

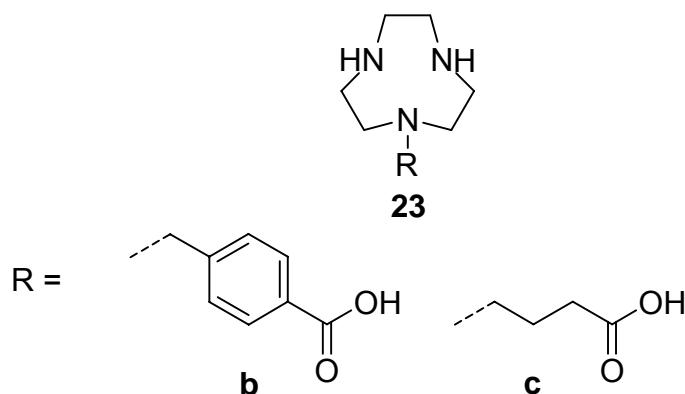
Generelle Vorschrift für den Ringschluss von substituiertem tacn^[56]

Zu einer Mischung des primären Amins **a - c** (10 mmol) und 10,6 g Na₂CO₃ (100 mmol) in 300 ml MeCN werden 7,7 g **21** (10 mmol) gegeben, und die resultierende Lösung wird 72 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wird auf RT abgekühlt und filtriert. Der Filtrerrückstand wird mit 100 ml CH₂Cl₂ gewaschen und das Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockene eingengt.

Das Rohprodukt wird im Fall von **a** zusätzlich durch Säulenchromatographie mit Essigester aufgereinigt, im Fall von **c** mit 25% Essigester und Hexan. Aufgrund der hohen Unreinheit wurde **23 a** nicht weiter umgesetzt.

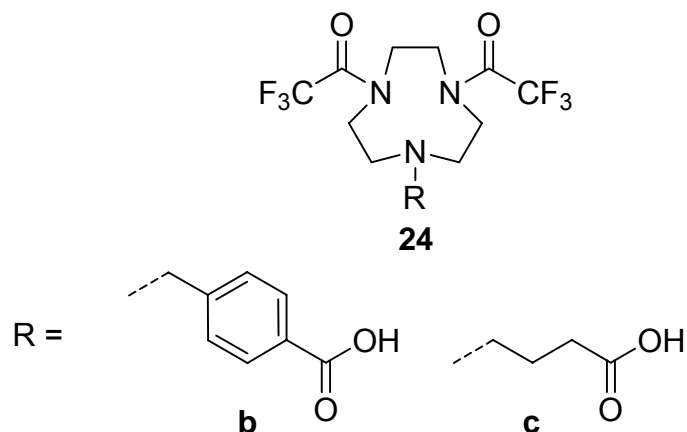
Ausbeute	a 2,6 g (4,8 mmol, 48%).
	b 5,0 g (8,7 mmol, 87%).
	c 4,5 g (7,7 mmol, 77%).
MS (ESI)	a $m/z = 552,2$ $[M+H]^+$, ber. 552,2.
	b $m/z = 572,3$ $[M+H]^+$, ber. 572,2.
	c $m/z = 580,2$ $[M+H]^+$, ber. 580,3.

Generelle Vorschrift für die Ts-Entschützung von **22**^[56]



22 b bzw. **c** (1mmol) wird in 5 ml konz. H_2SO_4 gelöst und 72 h unter Argon auf 115 °C erhitzt. Die resultierende Lösung wird auf RT abgekühlt und portionsweise in 150 ml Et_2O gegeben (bei -60 °C). Der resultierende Niederschlag wird abfiltriert, mit 20 ml Et_2O gewaschen und sofort in 25 ml Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wird mit 10 ml Et_2O extrahiert, im Vakuum auf 5 ml eingengt, und mit 50%iger NaOH neutralisiert. Die resultierende Lösung wird dreimal mit je 50 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt.

MS (HR-ESI)	b $m/z = 264,1738$ $[M+H]^+$, ber. 264,1712 (+2,6 mmu).
	c $m/z = 216,1698$ $[M+H]^+$, ber. 216,1712 (-1,4 mmu).

Generelle Vorschrift für das Tfa-Schützen von 23

Die Synthese verläuft analog der Herstellung von **11**.

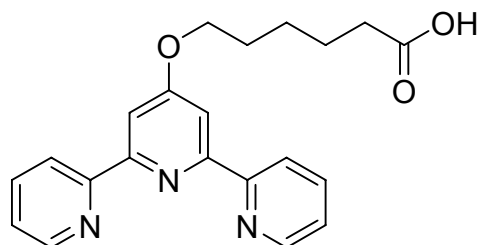
MS (ESI)

b $m/z = 456,1$ $[M+H]^+$, ber. 465,1.

c $m/z = 408,1352$ $[M+H]^+$, ber. 408,1358 (**HR-ESI**, -0,6 mmu).

7.2.4 Derivat von 2,2':6',2''-Terpyridin

6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)-hexansäure 25^[57]

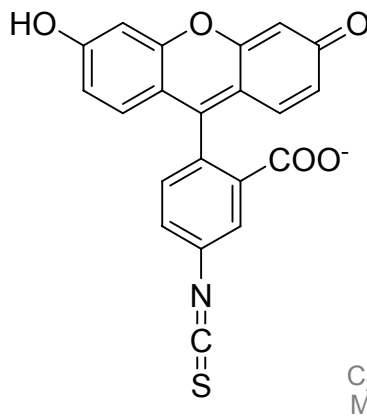


C₂₁H₂₁N₃O₃
MW=363,16

200 μ l ϵ -Caprolacton (1,88 mmol) werden tropfenweise zu einer 60 °C warmen Suspension von 266 mg fein gemörsertem KOH (4,74 mmol) in 5 ml abs. DMSO gegeben. Nach 30 min werden 250 mg 4'-Chlor-2,2':6',2''-terpyridin (0,93 mmol) zugegeben, und 48 h bei 60 °C gerührt. Die abgekühlte Reaktionslösung wird in 60 ml Wasser gegossen und die Lösung mit konz. HCl versetzt, bis sich ein weißer Niederschlag bildet (pH = 6). Der Niederschlag wird abfiltriert und aus THF umkristallisiert.

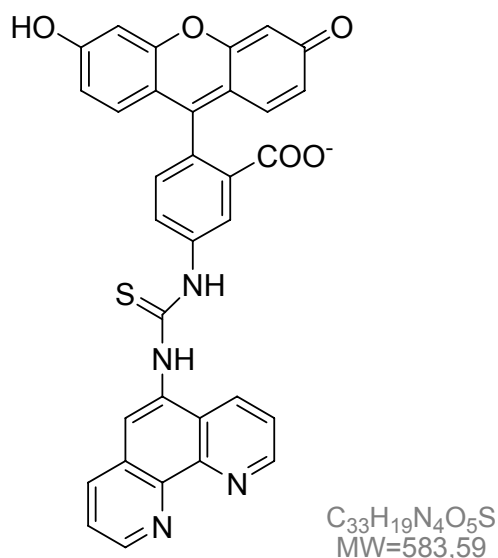
Habitus	Weißer Feststoff.
Ausbeute	140 mg (0,39 mmol, 41%).
MS (HR-ESI)	m/z = 364,1680 [M+H] ⁺ , ber. 364,1661 (+ 1,9 mmu).
¹H-NMR (CDCl₃)	δ = 1,60-1,94 (m, 6H); 2,42 (t, J = 6,8 Hz, 2H); 4,27 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 7,35 (ddd, J = 1,1; 3,5; 4,8 Hz, 2H); 7,87 (ddd, J = 1,6; 5,8; 7,5 Hz, 2H); 7,99 (s, 2H); 8,61 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 8,70 (d, J = 4,9 Hz, 2H).

7.2.5 Derivate von Phen Green

Fluorescein-isothiocyanat 26^[104]

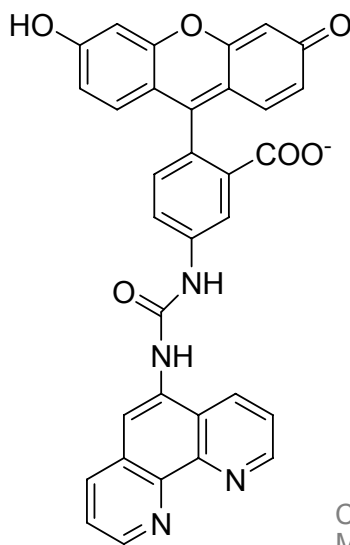
Zu einer Lösung von 1 g 5-Aminofluorescein (2,9 mmol) in 2,7 ml konz. NH₄OH (zunächst bei 5 °C mit NH₃ gesättigt) werden bei 10 °C innerhalb von 2 h 2 ml CS₂ (33,3 mmol) zugetropft. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt. Anschließend werden unter Eiskühlung 7,1 g FeCl₃·6 H₂O (26,2 mmol) in 30 ml Wasser hinzugegeben und weitere 30 min gerührt. Nach Zugabe von 15%iger HCl bei <10°C erreicht die Lösung pH 2; man saugt ab und nimmt den Rückstand in Aceton auf. Es wird wieder abgesaugt, um das restliche Eisen(III) zu entfernen, und das produktthaltige Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockene eingengt.

Habitus	Orangener Feststoff.
Ausbeute	0,6 g (1,5 mmol, 58%).
MS (HR-ESI)	m/z = 390,0450 [M+H] ⁺ , ber. 390,0436 (+1,4 mmu).
¹H-NMR (DMSO-d₆)	δ = 10,17 (s, 1H, COOH); 8,04 (s, 1H, H _{arom}); 7,82 (d, 1H, H _{arom}); 7,35 (d, 1H, H _{arom}), 6,53-6,69 (m, 6H, H _{arom}).

Phen Green FL 27

Eine Lösung aus 84 mg **3** (0,43 mmol) in 1,3 ml abs. DMF wird mit 180 μ l NEt_3 versetzt. 200 mg **26** (0,52 mmol) werden hinzugegeben und solange gerührt, bis bei Kieselgel-Dünnschichtchromatographie der Spot von **3** verschwunden ist. Die Lösung wird in 10 ml Wasser geschüttelt, und mit 6 M HCl wird pH 4 - 5 eingestellt. Das Produkt wird abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen.

Habitus	Orangener Feststoff.
Ausbeute	150 mg (0,26 mmol, 60%).
MS (HR-ESI)	m/z = 585,1248 $[M+H]^+$, ber. 585,1233 (+1,5 mmu).

Phen Green 28

$C_{33}H_{19}N_4O_6$
MW=567,53

315 mg **5** (1 mmol) und 288 mg 5-Aminofluorescein (0,8 mmol) werden in 3,3 ml abs. Pyridin gelöst, und über Nacht bei 70 °C gerührt. Nach dem Einengen im Vakuum wird Toluol zugegeben und erneut eingengt. Der Vorgang wird mit EtOH/H₂O wiederholt, wobei danach bis zu Trockene eingengt wurde.

Habitus

Roter Feststoff.

Ausbeute

360 mg (0,63 mmol, 76%).

MS (HR-ESI)

m/z = 569,1449 [M+H]⁺, ber. 585,1461 (-1,2 mmu).

7.3 DNA- und PNA-Synthesen

Synthese der PNA-Konjugate

Die Synthese der PNA-Sequenzen erfolgt nach dem Fmoc-Standard-Protokoll für 2 μmol PNA-Ansätze an der Festphase. Bei den Festphasensynthesen wird die Festphase in einer 3 ml-Plastikspritze mit Frittenboden vorgelegt und die gelösten Reagenzien aufgezogen. Das Reinigen der Festphasen und das Abspalten vom polymeren Träger erfolgt ebenfalls in der Spritze.

Synthese der DNA-Konjugate

Die Synthese der DNA-Sequenzen erfolgt nach dem DMT-Standard-Protokoll für 1 μmol DNA-Ansätze an (Bz)dA-CPG- bzw. 3'-Amino-Modifier-C7-CPG-Festphasen. Die Kopplungsreaktionen werden in 3 ml-Plastikspritzen mit Frittenboden durchgeführt, in denen die Festphase vorgelegt und die Reaktionslösung durch Aufziehen zugefügt wird. Reinigung und Abspaltung vom polymeren Träger werden ebenso in der Filterspritze durchgeführt.

Reaktionen von PNA und DNA an der Festphase

► Kopplung von Carbonsäuren

Die Carbonsäure (100 Äq.), HBTU (90 Äq.) und HOBt (100 Äq.) werden vor der Reaktion 1 h im Vakuum getrocknet. Die Mischung wird in 1 ml DMF gelöst und mit DIEA (220 Äq.) versetzt. Die entstandene Lösung wird sofort zum festen Träger (2 μmol PNA oder 1 μmol DNA) gegeben und 1 h (2 h im Fall der DNAs **5 - 7**) bei RT geschüttelt.

► Kopplung von **5**

31,5 mg **5** (100 μmol) werden in 1 ml abs. DMF gelöst und mit 100 μl DIEA (600 μmol) versetzt. Die entstandene Lösung wird zum festen Träger gegeben (1 μmol) und 2 h bei 60 °C geschüttelt. Nach dem Verwerfen der Lösung wird der Rückstand mit DMF (3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Auf diese Weise wird die DNA **8** hergestellt.

► **Kopplung von Aminen**

a) 16,2 mg CDI (100 μmol) werden in 1 ml DMSO gelöst und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 8 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird der flüssige Anteil verworfen. Die Festphase wird mit DMSO (3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Dann wird das Amin (100 μmol) in 1 ml DMSO gelöst, mit 17,5 μl DIEA (100 μmol) versetzt, und zum festen Träger gegeben. Diese Reaktionslösung schüttelt man bei RT über Nacht. Anschließend wird die überschüssige Reaktionslösung entfernt und der Rückstand mit DMSO (3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet. Auf diese Weise wird die PNA **4** hergestellt.

b) 17,4 μl Bromacetyl bromid (200 μmol) werden in 0,5 ml DMF gelöst, mit 35,0 μl DIEA (200 μmol) versetzt, und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die braune Reaktionsmischung wird 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird der flüssige Anteil verworfen. Die Festphase wird mit DMF (3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Dann wird das Amin (200 μmol) in 0,5 ml DMSO gelöst, mit 35,0 μl DIEA (200 μmol) versetzt, und zum festen Träger gegeben. Diese Reaktionslösung schüttelt man 24 h bei RT. Anschließend wird die überschüssige Reaktionslösung entfernt und der Rückstand mit DMSO (3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet. Auf diese Weise wird die PNA **5** hergestellt.

► **Abspaltung von Fmoc-Schutzgruppen**

Zu der polymergebundenen PNA (2 μmol) oder DNA (1 μmol) bzw. zum Polymerträger mit Fmoc-geschützten Aminogruppen gibt man 1 ml PNA-Deblock-Lösung (Piperidin:DMF = 1:4) und schüttelt 30 min bei RT. Dann wird die Lösung verworfen und die Festphase mit DMF (3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen. Anschließend trocknet man im Vakuum. Im Fall der N-terminal modifizierten PNAs geschieht dieser Schritt bereits am Syntheseautomaten.

► Abspaltung von Alloc-Schutzgruppen

Unter Argon-Atmosphäre wird eine Mischung von 7,0 mg Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (6,1 μmol) und 1,4 mg Triphenylphosphin (4,2 mmol) in 0,5 ml CH_2Cl_2 gelöst. Separat werden 7,0 mg Diethylammonium-hydrogencarbonat (51,4 μmol) in 0,5 ml CH_2Cl_2 ebenfalls unter Argon-Atmosphäre suspendiert. Die beiden Mischungen werden 1 min mit Argon gespült und vereinigt. Dann gibt man die Lösung zum modifizierten Polymer (2 μmol), das Alloc-geschützte Aminogruppen enthält, und schüttelt 2 h bei RT, wobei man das Reaktionsgemisch mit Alufolie vor Lichteinstrahlung schützt. Die überschüssige Reaktionslösung wird verworfen und der Rückstand mit CH_2Cl_2 (3 x 1 ml), DMF (mit 0,15% DIEA und 0,5% *N,N*-Diethyldithiocarbamidsäure Natriumsalz Trihydrat, 3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen. Anschließend trocknet man im Vakuum. Dieser Schritt wurde bei den Modifikationen am C-Terminus, also bei den PNAs 1 - 4, durchgeführt.

► Abspaltung von DMT- und MMT-Schutzgruppen

Zu der polymergebundenen DNA (1 μmol) bzw. zum Polymerträger mit DMT- oder MMT-geschützten Aminogruppen gibt man 1 ml DNA-Deblock-Lösung (~ 1% TCA in CH_2Cl_2) und schüttelt 30 s bei RT. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis die verworfene Lösung nicht mehr gelb ist. Anschließend wird die Festphase mit CH_2Cl_2 (3 x 1 ml), DMF (3 x 1 ml) und MeCN (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Im Fall der 5'-DMT-geschützten DNAs geschieht dieser Schritt bereits am Syntheseautomaten.

Abspaltung der PNA von der Festphase und Aufarbeitung

Das festphasengebundene PNA-Konjugat (2 μmol) wird 1,5 h bei RT mit 400 μl Abspalllösung (TFA:m-Cresol = 4:1) umgesetzt. Die Festphase wird abgefiltert und mit 200 μl TFA/m-Cresol-Mischung nachgewaschen; das Filtrat wird anschließend mit 2,5 ml Et_2O versetzt. Der gebildete weiße Niederschlag wird nach 1,5 h bei 4 °C gefiltert, mit Et_2O (3 x 1 ml) gewaschen, bei RT getrocknet und mittels HPLC gereinigt.

Besonderheiten bei Thiol-PNAs

TCEP-Spaltung bei PNA 4

Eine Lösung von 10^{-2} M PNA 4 wird mit 1 M TCEP in 200 μ l Wasser versetzt, und über Nacht geschüttelt. Danach wird wie üblich eine HPLC-Trennung durchgeführt.

H₂S-Reaktion bei PNA 2

Eine Lösung von 10^{-2} M PNA 2 wird mit 1 M Thioacetamid und 20 μ l konz. NH₃ in 200 μ l Wasser versetzt und 2 h bei 70 °C geschüttelt, danach erfolgt die HPLC-Aufreinigung.

Abspaltung der DNA von der Festphase und Aufarbeitung

Das festphasengebundene DNA-Konjugat (1 μ mol) wird 24 h bei RT mit 1 ml konz. NH₃ behandelt. Die Festphase wird abgefiltert und mit Wasser nachgewaschen (3 x 1 ml). Nach dem Lyophilisieren wird der Rückstand in 200 μ l Wasser gelöst und mittels HPLC gereinigt.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von PNAs und DNAs wird über die Absorption der Nucleobasen bei 260 nm bestimmt. Bei den phen- und Fluorescein-haltigen PNAs und DNAs werden zusätzlich die Extinktionskoeffizienten der Modifikationen berücksichtigt. Im Fall der tpy-haltigen DNAs wird zur genaueren Bestimmung noch eine Titration mit Cu^{II} durchgeführt.

Charakterisierung der PNAs und DNAs

PNA 1	Ausbeute	2,0%		
	HPLC	$t_R = 26,5$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{91}H_{122}N_{52}O_{22}S$		$[M+H]^+$: gef. 2328, ber. 2328
PNA 2	Ausbeute	0,2%		
	HPLC	$t_R = 29,0$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{92}H_{124}N_{52}O_{22}S$		$[M+H]^+$: gef. 2340, ber. 2342
PNA 3	Ausbeute	4,6%		
	HPLC	$t_R = 21,7$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{92}H_{125}N_{53}O_{22}S$		$[M+H]^+$: gef. 2355, ber. 2357
PNA 4	Ausbeute	1,5%		
	HPLC	$t_R = 26,9$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{92}H_{125}N_{53}O_{22}S$		$[M+H]^+$: gef. 2355, ber. 2357
PNA 5	Ausbeute	3,0%		
	HPLC	$t_R = 24,5$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{116}H_{143}N_{57}O_{27}$		$[M+H]^+$: gef. 2767, ber. 2767

DNA 1	Ausbeute	2,1%		
	HPLC	$t_R = 40,7$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{142}H_{200}N_{55}O_{77}P_{13}$	[M-H] ⁻ : gef. 4307, ber. 4309	
DNA 2	Ausbeute	17%		
	HPLC	$t_R = 37,6$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{136}H_{188}N_{50}O_{72}P_{12}$	[M-H] ⁻ : gef. 4047, ber. 4043	
DNA 3	Ausbeute	15%		
	HPLC	$t_R = 37,0$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{68}H_{95}N_{22}O_{31}P_5$	[M-H] ⁻ : gef. 1865, ber. 1870	
DNA 4	Ausbeute	10%		
	HPLC	$t_R = 36,6$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{250}H_{315}N_{84}O_{126}P_{21}$	[M-H] ⁻ : gef. 7156, ber. 7159	
DNA 5	Ausbeute	1,7%		
	HPLC	$t_R = 37,2$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{132}H_{161}N_{42}O_{68}P_{11}$	[M-H] ⁻ : gef. 3764, ber. 3762	
DNA 6	Ausbeute	6,6%		
	HPLC	$t_R = 42,7$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{126}H_{145}N_{38}O_{58}P_9$	[M-H] ⁻ : gef. 3397, ber. 3396	
DNA 7	Ausbeute	4,0%		
	HPLC	$t_R = 42,5$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{262}H_{316}N_{85}O_{129}P_{21}$	[M-H] ⁻ : gef. 7365, ber. 7366	
DNA 8	Ausbeute	1,7%		
	HPLC	$t_R = 32,6$ min		
	MS (MALDI-TOF)	$C_{234}H_{291}N_{34}O_{124}P_{21}$	[M-H] ⁻ : gef. 6911, ber. 6910	

7.4 Enzyme

Maßnahmen zur Vermeidung von Metallkontaminationen

Die Verwendung von Glasgeräten wurde generell vermieden. Aufbewahrt wurden die Puffer in neuen oder mit 30%iger Salpetersäure und metallfreiem Wasser gespülten PE-Plastikflaschen, ansonsten wurden metallfreie Einweg-Plastikküvetten, Pipettenspitzen, Plastikspatel und Plastikpinzetten verwendet. Alle Lösungen (außer ZnSO_4 und DNA) wurden mit Chelex 100 vorbehandelt. Zur Entmetallisierung größerer Mengen Pufferlösungen wurde mit 0,01% Dithizon (= 1,5-Diphenylthiocarbazon) in CHCl_3 extrahiert. Kleinere Mengen wurden über eine kurze Chelex-Säule gegeben. Mengen $< 1\text{ ml}$ wurden mit Chelex inkubiert. Die Biogel-P6-Säule wurde vorher mit 10 mM 8-Hydroxychinolin-sulfonsäure in Puffer gesäubert. Das für die Reaktionen genutzte Wasser war von TraceSelectUltra-Qualität.

7.4.1 Aldolase-Isolierung

Die Aufreinigung der Aldolase wurde in Anlehnung an die von Belasco *et al.*^[89] beschriebene Methode durchgeführt. Alle Schritte wurden bei einer Temperatur von 4 °C ausgeführt.

Herstellung der Puffer A - C

Puffer A: Eine 0,3 M K_2HPO_4 -Lösung (Endvolumen 750 ml) wird zur Entfernung von Schwermetallionen mit 0,05 g 8-Hydroxyquinolin versetzt und 30 min bei RT gerührt. Im Anschluss an fünfmaliges Waschen mit CH_2Cl_2 wird Stickstoff durch die Lösung geleitet, um Rückstände des organischen Lösungsmittels zu entfernen. Der pH-Wert wird mit H_3PO_4 auf 7,5 eingestellt.

Direkt vor Verwendung des Puffers werden 0,75 ml Tosylfluorid (0,1 M in EtOH) und 0,55 ml β -Mercaptoethanol hinzugegeben.

Puffer B: Eine 20 mM TRIS-HCl-Lösung (Endvolumen 5 l) mit 5% v/v Glycerin wird hergestellt und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Direkt vor Verwendung

werden Tosylfluorid (0,1 M in EtOH; Endkonzentration 0,1 mM) und β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 mM) hinzugegeben.

Puffer C: Eine 20 mM TRIS-HCl-Lösung (Endvolumen 2 l) mit 5% v/v Glycerin und 150 mM KCl wird hergestellt und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Direkt vor Verwendung werden Tosylfluorid (0,1 M in EtOH; Endkonzentration 0,1 mM) und β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 mM) hinzugegeben.

Die für die Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration vorgesehenen Puffer werden vor Gebrauch entgast.

a) Aufschluss der Zellen

16 Hefewürfel (Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*) werden für 30 min in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend für 2 h auf RT aufgetaut. Nach Zugabe von 625 ml Puffer A wird das entstandene Gemisch über Nacht im Kühlraum gerührt.

b) Ammoniumsulfatfällung

Die entstandene hellbraune Suspension wird für 1 h bei 11000 g zentrifugiert und der Überstand (800 ml) im Verlauf von 2 h mit 365 g Ammoniumsulfat (65% Sättigung) versetzt und für weitere 2 h gerührt. Anschließend wird wiederum 1 h bei 11000 g zentrifugiert und der Überstand über Nacht im Kühlraum gerührt. Der Überstand wird dann tropfenweise innerhalb von 30 min mit 250 ml gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt und für weitere 20 min gerührt. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation (1 h bei 11000 g) wird der Überstand innerhalb von 40 min mit 397 ml gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt; nach Zugabe von 0,25 ml β -Mercaptoethanol erfolgt die Fällung über Nacht. Nach einer erneuten Zentrifugation (1 h bei 11000 g) wird das Pellet in 90 ml Puffer B resuspendiert.

c) Dialyse

Die Proteinlösung wird über Nacht dreimal gegen 2 l Puffer B dialysiert.

d) Ionenaustauscherchromatographie

Für die Ionenaustauscherchromatographie wird eine Source 30Q-Säule (2,6 x 3,5 cm) von GE Healthcare verwendet. Nach Äquilibration mit Puffer B wird die Dialyselösung mit einer Schlauchpumpe auf die Säule aufgetragen. Die Laufgeschwindigkeit beträgt 5 ml/min. 60 Fraktionen zu je 5 ml werden gesammelt, die Elution erfolgt mit einem linearen Salzgradienten (50 mM – 1 M KCl). Mithilfe des Aldolase-Aktivitätstests werden die enzymhaltigen Fraktionen selektioniert und für die Gelfiltration unter Verwendung von Amicon Ultra 15 Centrifugation Filter Devices auf 3 ml eingengt.

e) Gelfiltration / Größenausschlusschromatographie

Die Säule (2,6 x 60 cm; Säulenmaterial Superdex) wird mit 350 ml H₂O gewaschen und mit 400 ml Puffer C äquilibriert. Vor dem Auftragen auf die Säule wird die Probe zur Entfernung von Aggregaten für 5 min bei 13000 g zentrifugiert. 2,5 ml der Probe werden anschließend über einen 4 ml-Loop auf die Säule aufgetragen. Die Laufgeschwindigkeit beträgt 2,5 ml/min. 60 Fraktionen zu je 3 ml werden gesammelt.

Mithilfe eines Aktivitätstests werden die Aldolase-haltigen Fraktionen selektioniert. Zur Aufbewahrung wird Glycerin (20% v/v) zugegeben, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

f) SDS-PAGE

Zur Analyse der Reinheit der verschiedenen Fraktionen werden zwei 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele folgender Zusammensetzung hergestellt:

Tabelle 7.1 Herstellung der 10%igen SDS-PAA-Gele.

	Sammelgel	Trenngel
1 M TRIS-Puffer (pH 6,8)	200 µl	-
3 M TRIS-Puffer (pH 8,8)	-	1 ml
H ₂ O	3 ml	4,2 ml
20% SDS	15 µl	40 µl
Acrylamid / Bisacrylamid (30% / 0,8%)	500 µl	2,7 ml
10% APS	30 µl	40 µl
TEMED	4 µl	16 µl

Die Reagenzien für das Trenngel werden gemischt und in die Apparatur (BioRad, Deutschland) gegeben. Durch Überschichten mit Isopropanol erzielt man eine ebene Abschlussfläche. Nach Abschluss der Polymerisation wird das Isopropanol entfernt und die Mischung für das Sammelgel in die Apparatur gegeben sowie der Kamm platziert. Nach Abschluss der Polymerisation kann der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur überführt werden. Diese wird mit Laufpuffer befüllt. Die Proben werden mit Ladepuffer versetzt und mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Gels gefüllt. Anschließend wird die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung ($U = 200 \text{ V}$) durchgeführt, bis die Lauffront (das Bromphenolblau des Ladepuffers) die untere Kante des Gels erreicht.

Das Gel kann nun entnommen und mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt werden. Die proteinhaltigen Banden werden nach Behandlung mit der Entfärbelösung (enthält Essigsäure) sichtbar.

In **Abb. 7.1** sind die Chromatogramme des Anionenaustauschers (**Abb. 7.1 A**) und der Gelfiltration (**Abb. 7.1 B**) zu sehen. Die Aldolase-haltigen Fraktionen sind in **Abb. 7.1 A** (F 9 - 17) markiert. Diese wurden vereinigt und mit Hilfe der Gelfiltration weiter aufgereinigt. Die Aldolase-haltigen Fraktionen können hier dem zweiten, größeren Peak (F 27 - 37) zugeordnet werden.

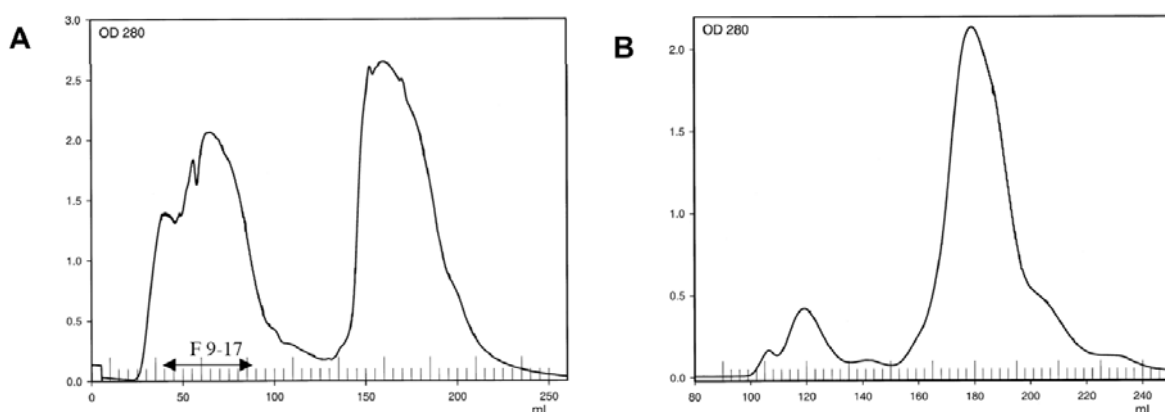


Abb. 7.1 Chromatogramme des Anionenaustauschers (**A**) und der Gelfiltration (**B**).

Die Effizienz des Aufreinigungsprozesses und die Reinheit der Fraktionen wurden mit zwei SDS-PAGE-Gelen (vgl. **Abb. 7.2**) analysiert. Spur 2 in Gel A

zeigt das ursprüngliche Proteingemisch nach Aufschluss der Zellen, in welchem die Monomere der Aldolase bereits als schwache Bande bei knapp 40 kDa zu erkennen sind. Dieses Laufverhalten entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von 39 kDa. Spur 9 zeigt eine Probe, welche nach der Aufreinigung über die Ionentauschersäule entnommen wurde. Im Vergleich zu den vorangehenden Spuren ist die Bande bei knapp 40 kDa, welche die Aldolase enthält, wesentlich breiter; dies bestätigt, dass der Aufreinigungsschritt erfolgreich war.

Die Fraktionen, die im Anschluss an die Gelfiltration gewonnen wurden (vgl. **Abb. 7.2 A** Spur 10 - 11 und **Abb. 7.2 B** Spur 2 - 5 und 7 - 11), zeigen ebenfalls eine Bande bei knapp 40 kDa. Die größere Dicke der Bande in den Fraktionen 30 - 33 (vgl. Spur 3 - 5 und 7) deutet auf eine höhere Aldolase-Konzentration hin; das Ergebnis der Aktivitätstests bestätigt diese Annahme. Aus diesem Grund wurden diese vier Fraktionen für die weiteren Experimente ausgewählt. Eine Vermessung der Spuren 4 und 5 in Gel B (vgl. **Abb. 7.2 B**) ergab einen Aldolase-Anteil von ca. 67% bezogen auf die Gesamtproteinmenge der Probe. Die Ausbeute an Aldolase in den vier Fraktionen betrug insgesamt 31 mg durch Messung der Absorption unter Berücksichtigung der Reinheit von 67%.

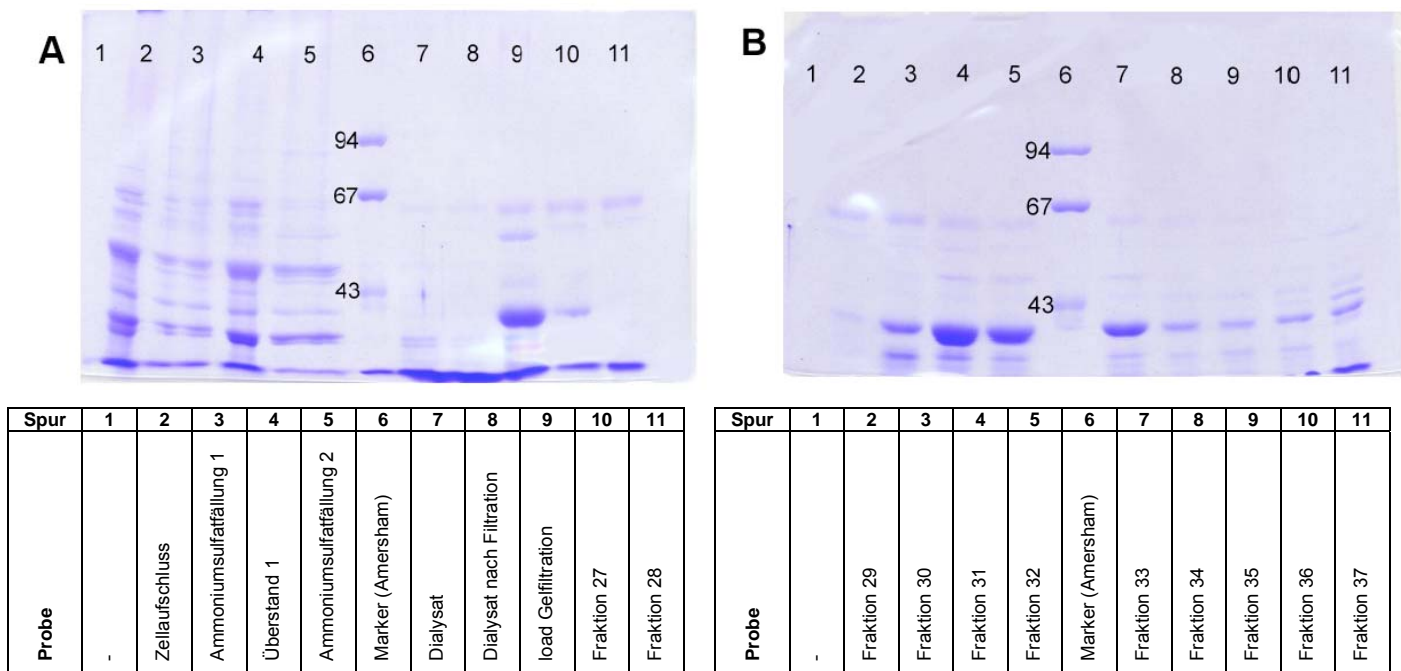


Abb. 7.2 SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit der Aldolase während der Isolierung. Die Zahlen in Spur 6 geben die Größe der Markerproteine in kDa an.

7.4.2 Gewinnung der Apoenzyme

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die experimentellen Daten in einer Tabelle zusammengefasst. Die Apoenzyme wurden in den entsprechenden Puffern bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Herstellung der Apoaldolase wurde die Fraktion 33 der Gelfiltration verwendet.

Tabelle 7.2 Apoenzym-Herstellung.

Enzym	Carboanhydrase ^[91]	Astacin ^[82]	Aldolase ^{a[83]}	Mung Bean Nuclease ^[92]
Herkunft	Rinder-erythrocyten (Fluka Biochemika)	Magensaft des Flusskrebses (Inst. für Zoologie)	eigene Isolierung aus Bäckerhefe	Mungobohnensprossen (Epicentre Technol.)
Einwaage	5 mg in 500 µl Puffer	0,5 mg in 500 µl Puffer	1,5 ml 3 mg/ml in Puffer	1 ml 1,25 kU/ml in Puffer
Dialysepuffer	500 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4	4 x 100 ml 50 mM HEPES pH 8	50 mM TRIS pH 7,5	50 mM NaOAc pH 5,0
Chelator	75 mM Pyridin-2,6-dicarbonsäure ^b	10 mM 1,10-Phenanthrolin (Stammlsg. 100 mM in EtOH)	75 mM EDTA	50 mM EDTA
Dialysezeit, -temperatur	4 - 12 h, 25 °C	4 d (4 x Wechsel), 4 °C	2 h, 4 °C	16 h, 4 °C
Aufreinigung	Biogel-P6	Dialyse gg. 50 ml metallfreien Puffer, bis $A_{265} < 0,001$	Biogel-P6 ^c	Dialyse gg. metallfreien Puffer

^a Inkubation statt Dialyse

^b Stammlösung: 0,3 M in 0,2 M Phosphatpuffer. Pyridin-2,6-dicarbonsäure wird in etwas Phosphatpuffer suspendiert, mit 10 M NaOH versetzt, bis der Feststoff sich gerade löst, und dann wird mit konz. H₃PO₄ pH 7,4 eingestellt.

^c zuvor mit 25 ml 0,01 M 8-Hydroxyquinolin-sulfonsäure (pH 8) gespült und dann mit 25 ml 0,05 M TRIS-Puffer (pH 8) äquilibriert

Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Enzymen und Apoenzymen erfolgte über die typische Protein-Absorptionsbande (der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin) bei 280 nm:

Tabelle 7.3 Molmassen und Extinktionskoeffizienten der Enzyme zur Konzentrationsbestimmung.

Enzym	CA	Astacin	Aldolase	Mung Bean Nuclease
Molmasse [g/mol]	30000	22614	75000- 80000	39000
ϵ_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]	57000	42800	75000	unbekannt

7.5 Fluorimetrie und Photometrie**Fluorimetrische Detektion der Oxidation von DCFH**

DCFH-DA wird in abs. Ethanol gelöst (1 mM), 30 μ l dieser Lösung werden zu 120 μ l 0,01 M NaOH gegeben und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 150 μ l 50 mM MOPS-Puffer auf 7,0 eingestellt. Phen, DCFH und Cysteamin werden in die vorbereitete Fluoreszenzküvette gegeben, eventuell gefolgt von komplementärer und oder mismatch-DNA.

Fluorimetrische Detektion der Hydrolyse von Diacetylfluorescein mit CA

Diacetylfluorescein wird jeden Tag frisch in abs. EtOH gelöst (1 mM). Die DNAs werden zuvor 30 min mit entsprechenden Mengen an NaCl, MgCl₂ und ZnSO₄ inkubiert und dann in die vorbereiteten Mikrotiterplatten pipettiert. Diacetylfluorescein und apoCA werden unmittelbar vor Start der Messung in die Kavitäten pipettiert.

Colorimetrische Detektion der Hydratation von CO₂ mit CA^[105]

Alle Lösungen werden in einem Eis-Wasser-Bad gelagert, um eine konstante Temperatur von 0 °C beizubehalten.

Die DNAs werden zuvor 30 min mit entsprechenden Mengen an NaCl, MgCl₂ und ZnSO₄ inkubiert.

Die Reaktionskammer ist ein 6,5 ml fassender Plastikzylinder mit einem kleinen Rührfisch, der vor Beginn der Messung bereits mit CO₂ durchspült wird.

Die folgenden Lösungen werden nacheinander in die Reaktionskammer gegeben, wobei darauf geachtet wird, dass die Temperatur bei 0 °C konstant ist und der CO₂-Strom kontinuierlich bläst:

1) *200 µl Phenolrot-Lösung*

(0,13 mg Phenolrot gelöst in 10 ml 35 µM NaOH).

2) *Eine frisch angesetzte Mischung von 150 µl Wasser, präinkubierten DNAs und apoCA*

Nach Zugabe wird die Reaktionslösung 3 min bei niedriger Rotation des Rührfischs gerührt, um die Zn-apoCA Assoziation zu gewährleisten.

3) *50 µl HEPES-Puffer (100 mM, pH 9,0)*

Gleichzeitig wird die Rotationsgeschwindigkeit erhöht, und die Stoppuhr wird gestartet (rote Lösung). Bei einem eindeutigen Farbumschlag des Indikators (gelbe Lösung) wird die Stoppuhr angehalten und die Zeit notiert.

Photometrische Detektion der Spaltung von STANA mit Astacin

Die Bestimmung der Aktivität des Astacins erfolgt mit Hilfe des synthetischen Peptids Suc-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilid als Substrat. Es wird die durch die Freisetzung von *p*-Nitroanilin hervorgerufene Absorptionsänderung bei $\lambda_{\max} = 405 \text{ nm}$ beobachtet.

Stammlösungen:

- 1 M HEPES-Puffer (pH 8)
- 10 mM STANA in 50 mM Puffer (immer frisch)

Die Konzentrationen in der Küvette beträgt 1 mM STANA in 50 mM HEPES-Puffer. Zum Testen der Aktivität des Apoenzyms werden 2 µl der Protein-Stammlösung entnommen.

Photometrische Detektion der Oxidation von NADH mit Aldolase

Die Aktivität der Aldolase wird in Anlehnung an die von Sigma beschriebene Methode bestimmt (Sigma quality control test procedure, Enzymatic Assay of ALDOLASE). Die DNAs werden zuvor 30 min mit entsprechenden Mengen an NaCl, MgCl₂ und ZnSO₄ inkubiert.

Stammlösungen:

- 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,3)
- 58 mM Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung
- 4 mM β-NADH (in 100 mM Puffer aufgrund der Säureempfindlichkeit)
- GDH/TPI-Lösung mit 50 U/ml GDH
- 2 M KOAc

Die Aktivität der Aldolase in Units/ml kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Units/ml Enzym} = (\Delta A_{340} / 0,05 \text{ min} \times 0,07) / (2 \times 6,22 \times 0,002)$$

Eine Unit ist definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen je min 1 µmol Substrat umsetzt, im Fall der Aldolase also der Umsatz von 1 µmol Fructose-1,6-bisphosphat in Dihydroxyaceton-phosphat bei pH 7,3 und 25 °C.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [2] A. Ray, B. Nordén, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041-1060.
- [3] *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications* (Hrsg.: P. E. Nielsen, M. Egholm), Horizon Scientific, Wymondham, **1999**.
- [4] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2954-2983.
- [5] A. Füßl, A. Schleifenbaum, M. Göritz, A. Riddell, C. Schultz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5986-5987.
- [6] A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3277-3280.
- [7] J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618-8619.
- [8] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956-4979.
- [9] D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 93-95.
- [10] Z. Ma, J.-S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 11159-11163.
- [11] J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410-12411.
- [12] I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7849-7856.
- [13] B. Schweitzer, S. Kingsmore, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 21-27.
- [14] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 770-772.
- [15] F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3548-3552.
- [16] S. Sando, T. Sasaki, K. Kanatani, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15720-15721.
- [17] A. Saghatelian, K. M. Guckian, D. A. Thayer, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 344-345.
- [18] P. Simon, C. Dueymes, M. Fontecave, J.-L. Décout, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2824-2827.

- [19] H. A. Ho, K. Doré, M. Boissinot, M. G. Bergeron, R. M. Tanguay, D. Boudreau, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12673-12676.
- [20] V. V. Didenko, *BioTechniques* **2001**, *31*, 1106-1121 (Review).
- [21] O. Seitz in *Highlights in Bioorganic Chemistry* (Hrsg.: C. Schmuck, H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 311-328.
- [22] R. M. Dirks, N. A. Pierce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 15275-15278.
- [23] Y. Weizmann, Z. Cheglakov, V. Pavlov, I. Willner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2296-2300.
- [24] Allosterische Ribozyme: R. R. Breaker, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 31-39.
- [25] Allosterische Enzyme: A. Villaverde, *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 169-172.
- [26] V. Pavlov, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6522-6523.
- [27] Synthetische allosterische Rezeptoren und Katalysatoren: L. Kovbasyuk, R. Krämer, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3161-3188.
- [28] L. Zapata, K. Bathany, J.-M. Schmitter, S. Moreau, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1022-1028.
- [29] T. Ihara, Y. Takeda, A. Jyo, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1772-1773.
- [30] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714-10715.
- [31] I. Horsey, Y. Krishnan-Ghosh, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2002**, 1950-1951.
- [32] J. S. Choi, C. W. Kang, K. Jung, J. W. Yang, Y.-G. Kim, H. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8606-8607.
- [33] D. Mitra, N. Di Cesare, H. F. Sleiman, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5928-5932.
- [34] K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Cló, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1044-1046.
- [35] M. Göritz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18016-18017.
- [36] H. Zhu, G. L. Bannenberg, P. Moldéus, H. G. Shertzer, *Arch. Toxicol.* **1994**, *68*, 582-587.

- [37] A. S. Keston, R. Brandt, *Anal. Biochem.* **1965**, *11*, 1-5.
- [38] Y. Oyama, A. Hayashi, T. Ueha, K. Maekawa, *Brain Res.* **1994**, *635*, 113-117.
- [39] C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227-231.
- [40] Z. Kupihár, Z. SchméL, Z. Kele, B. Penke, L. Kovács, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1241-1247.
- [41] W. C. Putnam, A. T. Daniher, B. N. Trawick, J. K. Bashkin, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2199-2204 und Supplementary Information.
- [42] T. Niazov, V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1683-1687.
- [43] F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13918-13919.
- [44] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 411-415.
- [45] J. S. Hartig, I. Grüne, S. H. Najafi-Shoushtari, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 722-723.
- [46] S. Sando, A. Narita, K. Abe, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5300-5301.
- [47] L. Zhu, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1208-1215.
- [48] N. C. Gianneschi, S. T. Nguyen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1644-1645.
- [49] L. Zhu, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7267-7275.
- [50] Q. Wu, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14682-14683.
- [51] N. Graf, M. Göritz, R. Krämer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4117-4119.
- [52] T. Kamidate, I. Kuniya, T. Segawa, H. Watanabe, *Chem. Lett.* **1992**, 887-890.
- [53] M. H. Robbins, R. S. Drago *J. Catal.* **1997**, *170*, 295-303.
- [54] S. Pulacchini, M. Watkinson, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4233-4238.
- [55] C. M. Giandomenico (Anormed Inc.), WO 200226721 A1, **2002**; W. Yang, C. M. Giandomenico, M. Sartori, D. A. Moore, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2481-2483.

- [56] H. Chong, M. W. Brechbiel, *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1147-1154.
- [57] P. R. Andres, R. Lunkwitz, G. R. Pabst, K. Böhn, D. Wouters, S. Schmatloch, U. S. Schubert, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3769-3776.
- [58] C. B. Chen, L. Milne, R. Landgraf, D. M. Perrin, D. S. Sigman, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 735-740.
- [59] D. A. Ossipov, R. Strömberg, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 901-905.
- [60] F. Petrat, U. Rauen, H. de Groot, *Hepatology* **1999**, *29*, 1171-1179.
- [61] P. Chavez-Crooker, N. Garrido, G. A. Ahearn, *J. Exp. Biol.* **2001**, *204*, 1433-1444.
- [62] A. Mokhir, C. N. Tetzlaff, S. Herzberger, A. Mosbacher, C. Richert, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 374-386.
- [63] G. U. Priimov, P. Moore, L. Helm, A. E. Merbach, *Inorg. React. Mech.* **2001**, *3*, 1-23.
- [64] C. E. Outten, T. V. O'Halloran, *Science* **2001**, *292*, 2488-2492.
- [65] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [66] Reviews: A. P. Silverman, E. T. Kool, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 225-230; W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547-553; Z. Paroo, D. R. Corey, *J. Cell. Biochem.* **2003**, *90*, 437-442; siehe auch: M. M. Mhlanga, D. Y. Vargas, C. W. Fung, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1902-1912.
- [67] J. Brunner, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13626-13627.
- [68] A. Mokhir, R. Krämer, *Chem. Commun.* **2005**, 2244-2246.
- [69] M. A. Kuhn, B. Hoyland, S. Carter, C. Zhang, R. P. Haugland, *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* **1995**, *2388*, 238-244.
- [70] M. Adamczyk, J. Grote, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 807-809.
- [71] B. Packard, M. Edidin, A. Komoriya, *Biochemistry* **1986**, *25*, 3548-3552.
- [72] P. R. Mitchell, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1564-1570.
- [73] A. Odani, H. Masuda, K. Inukai, O. Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6294-6300.
- [74] D. R. Graham, L. E. Marshall, K. A. Reich, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5419-5421.

- [75] B. C. Bales, T. Kodama, Y. N. Weledji, M. Pitié, B. Meunier, M. M. Greenberg, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5371-5379.
- [76] D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12269-12272.
- [77] D. E. Ryan, J. Holzbecher, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1971**, *1*, 159-168.
- [78] A. O. Udom, F. O. Brady, *Biochem. J.* **1980**, *187*, 329-335.
- [79] T. N. Shekhovtsova, S. V. Muginova, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1328-1335.
- [80] J. Thumann, E. Grill, E.-L. Winnacker, M. H. Zenk, *FEBS Lett.* **1991**, *284*, 66-69.
- [81] J. D. Cohen, H. D. Husic, *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 60-64.
- [82] W. Stöcker, R. L. Wolz, R. Zwilling, D. J. Strydom, D. S. Auld, *Biochemistry* **1988**, *27*, 5026-5032.
- [83] R. D. Kobes, R. T. Simpson, B. L. Vallee, W. J. Rutter, *Biochemistry* **1969**, *8*, 585-588.
- [84] J. Chin, F. Banaszczyk, V. Jubian, X. Zou, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 186-190.
- [85] C. Silva Pires de Castro, J. Rodrigues SouzaDe, C. Bloch Jr., *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94*, 365-371.
- [86] C. Silva Pires de Castro, J. Rodrigues SouzaDe, C. Bloch Jr., *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2579-2592.
- [87] J. J. Li, R. Geyer, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e52 i-vi.
- [88] J. B. Biggins, J. R. Prudent, D. J. Marshall, M. Ruppen, J. S. Thorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 13537-13542.
- [89] J. G. Belasco, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1983**, *22*, 122-129.
- [90] B. Holmquist, *Methods Enzymol.* **1988**, *158*, 6-12.
- [91] J. B. Hunt, M.-J. Rhee and C. B. Storm, *Anal. Biochem.* **1977**, *79*, 614-617.
- [92] D. Kowalski, W. D. Kroeker, M. Laskowski, *Biochemistry* **1976**, *15*, 4457-4463.
- [93] S. Lindskog, P. O. Nyman, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *85*, 462-474.

- [94] R. H. Holyer, C. D. Hubbard, S. F. A. Kettle, R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.* **1966**, 5, 622-625.
- [95] R. W. Henkens, J. M. Sturtevant, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2669-2676.
- [96] M. Orozco, A. Pérez, A. Noy, F. J. Luque, *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 350-364.
- [97] J. P. O'Neil, S. R. Wilson, J. A. Katzenellenbogen, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 319-323.
- [98] M. P. Glenn, P. Kahnberg, G. M. Boyle, K. A. Hansford, D. Hans, A. C. Martyn, P. G. Parsons, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2984-2994.
- [99] V. Chaleix, V. Sol, Y.-M. Huang, M. Guilloton, R. Granet, J. C. Blais, P. Krausz, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1486-1493.
- [100] O. Lorthioir, S. C. McKeown, N. J. Parr, M. Washington, S. P. Watson, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 8609-8613.
- [101] J. Kang, J. H. Jo, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, 24, 1403-1406.
- [102] T. J. Atkins, J. E. Richman, W. F. Oettle, *Org. Synth.* **1978**, 58, 86-98.
- [103] C. Nicolas, M. Borel, J.-C. Maurizis, N. Gallais, M. Rapp, M. Ollier, M. Verny, J.-C. Madelmont, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2000**, 43, 585-594.
- [104] S. Smolik, CS 19640723, **1966**.
- [105] W. Bruns, G. Gros in *The Carbonic Anhydrases: cellular physiology and molecular genetics* (Hrsg.: S. J. Dodgson, R. E. Tashian, G. Gros, N. D. Carter), Plenum, New York, **1991**, S. 127-131.
- [106] J. N. Earnhardt, M. Qian, C. Tu, M. M. Lakkis, N. C. H. Bergenheim, P. J. Laipis, R. E. Tashian, D. N. Silverman, *Biochemistry* **1998**, 37, 10837-10845.
- [107] A. Scozzafava, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 2241-2246.
- [108] J. E. Coleman, B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 390-395.
- [109] M. L. Ludwig, W. M. Lipscomb in *Inorganic Biochemistry* (Hrsg.: G. L. Eichhorn), Elsevier, Amsterdam, **1973**, S. 438-487.
- [110] E. J. Billo, K. K. Brito, R. G. Wilkins, *Bioinorg. Chem.* **1978**, 8, 461-475.
- [111] B. Holmquist, B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 4601-4607.

- [112] J. Feder, L. R. Garrett, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 943-948.
- [113] G. Morgan, J. S. Fruton, *Biochemistry* **1978**, *17*, 3562-3568.
- [114] L. B. Hersh, K. Morihara, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 6433-6437.
- [115] G. Voordouw, C. Milo, R. S. Roche, *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 313-326.
- [116] F.-X. Gomis-Rüth, F. Grams, I. Yiallourous, H. Nar, U. Küsthardt, R. Zwillig, W. Bode, W. Stöcker. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17111-17117.
- [117] I. Yiallourous, Dissertation, Universität Heidelberg, **1996**.
- [118] S. V. Muginova, A. M. Zhavoronkova, T. N. Shekhovtsova, *J. Anal. Chem.* **2005**, *60*, 218-233 (Review).
- [119] H. Csopak, *Eur. J. Biochem.* **1969**, *7*, 186-192.
- [120] T. T. Tibbitts, X. Xu, E. R. Kantrowitz, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 2005-2014.
- [121] M. J. Hehir, J. E. Murphy, E. R. Kantrowitz, *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 645-656.
- [122] J. F. Chlebowski, S. Mabrey, M. C. Falk, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 5745-5753.
- [123] J. T. Kadonaga, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1983**, *22*, 130-136.
- [124] O. C. Richards, W. J. Rutter, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 3185-3192.
- [125] S. Gite, V. Shankar, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 437-441.
- [126] V. M. Vogt, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *33*, 192-200.
- [127] V. N. Senchenko, G. I. Yakovlev, E. Yu. Kolbanovskaya, I. V. Smirnov, M. Ya. Karpeiskii, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **1981**, *7*, 1348-1356.

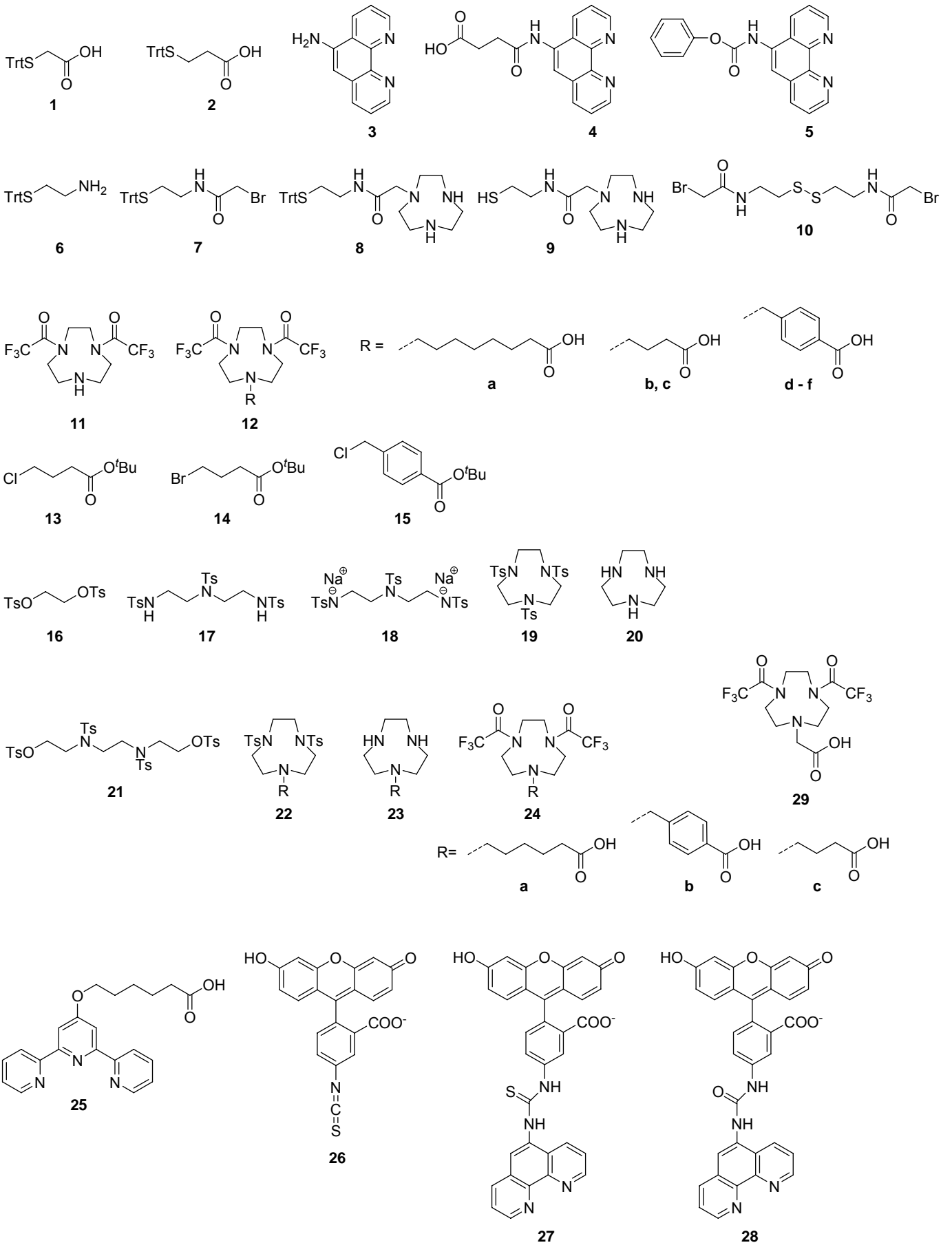
ANHANG

Tabelle: Zn-haltige Enzyme, deren Deaktivierung und Reaktivierung
Übersicht zu synthetisierten und verwendeten Verbindungen, PNAs und DNAs
Publikationen und Posterpräsentationen
Dank
Erklärungen gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung

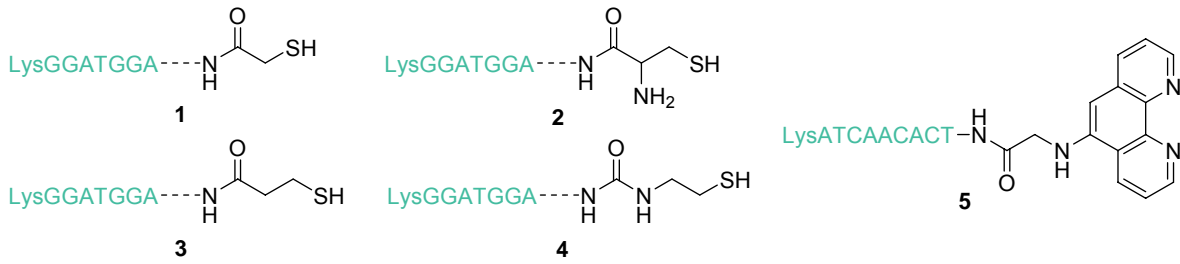
Zn-haltige Enzyme, deren Deaktivierung und Reaktivierung

Enzym	Quelle	Apoenzym-Gewinnung	Substrat	Deaktivierung / Reaktivierung	k_{cat} / s^{-1}	K_M / mM	logK	log k_f
Carboanhydrase CAS 9001-03-0 EC 4.2.1.1	Erythrocyten (hCA vom Menschen oder BCA vom Rind)	Dialyse gegen 2,6-Pyridindicarbonsäure (5h) ^[91]	CO ₂ Diacetylfluorescein p-Nitrophenylacetat	Deakt. 8% Reakt. 43% (ZnSO ₄ < 10 min) ^[78]	< 900000 (Maus, CO ₂) ^[106]	> 2,9 (hCA II, pNPA) ^[107]	11,4 ^[93]	4 ^[95]
Carboxypeptidase A CAS 11075-17-5 EC 3.4.17.1	Pankreas (vom Menschen oder Rind)	Dialyse gegen 1,10-Phenanthrolin (12 h) ^[108]	Oligopeptide, z. B. Z-Gly-Phe	Deakt. 5% Reakt. 90% ^[108]	100-200 ^[109]	2 - 40 ^[109]	10,5 ^[110]	5,8 ^[110]
Thermolysin CAS 9073-78-3 EC 3.4.24.27	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Dialyse (mit Ca ²⁺) gegen 1,10-Phenanthrolin (24 h) ^[111]	Oligopeptide, z. B. Z-Gly-Leu-Ala	Deakt. 40% (evtl. unsauber) ^[78] bzw. < 1% ^[111] bzw. 9% ^[112] Reakt. 86% (Zn(NO ₃) ₂) ^[78] bzw. 100% (ZnCl ₂) ^[112]	300 - 900 ^[113]	1 - 17 ^[114]	11,3 ^[115]	-
Astacin CAS 143179-21-9 EC 3.4.24.21	<i>Astacus astacus</i> (Flusskrebs)	Dialyse gegen 1,10-Phenanthrolin ^[117]	Oligopeptide, z. B. STANA	Deakt. 3% Reakt. 100% ^[116]	0,5 ^[117]	11 ^[117]	-	-
Alkalische Phosphatase CAS 9001-78-9 EC 3.1.3.1	<i>E. coli</i> , Leukocyten, Rinderleber, Kalbsdarm	u. a. Dialyse gegen 1,10-Phenanthrolin (120 h) ^[118]	p-Nitrophenylphosphat	Deakt. 5% Reakt. 16% (ZnSO ₄ 2 h) bzw. 43% (Zn(OAc) ₂ 2 h) ^[78] bzw. 100% ^[119]	< 230 ^[120]	> 0,01 ^[121]	10 ^[122]	-
Fructose-1,6-bisphosphat-aldolase CAS 9024-52-6 EC 4.1.2.13	Hefe	Inkubation mit EDTA (1h) und Chromatographie ^[83]	Fructose-1,6-bisphosphat	Deakt. 0% Reakt. 100% (ZnSO ₄) ^[78]	34 ^[123]	0,4 ^[124]	-	-
S1 Nuclease CAS 37288-25-8 EC 3.1.30.1	<i>Aspergillus oryzae</i> (Schimmelpilz)	Inkubation mit EDTA (30 min) und Dialyse ^[125]	ssDNA ssRNA (weniger spezif. als Mung Bean)	Deakt. 0% Reakt. 70% ^[126]	42 ^[87]	0,007 ^[87]	10,5 ^[127]	-
Mung Bean Nuclease CAS 37288-25-8 EC 3.1.30.1	Mungobohnensprossen	Dialyse gegen EDTA („exhaustively“) ^[85]	ssDNA ssRNA	Deakt. 0% Reakt. 50% (Zn(OAc) ₂ 24 h) bzw. 100% (Zn(OAc) ₂ + Cystein 30 min) ^[92]	-	-	8 ^[85]	-

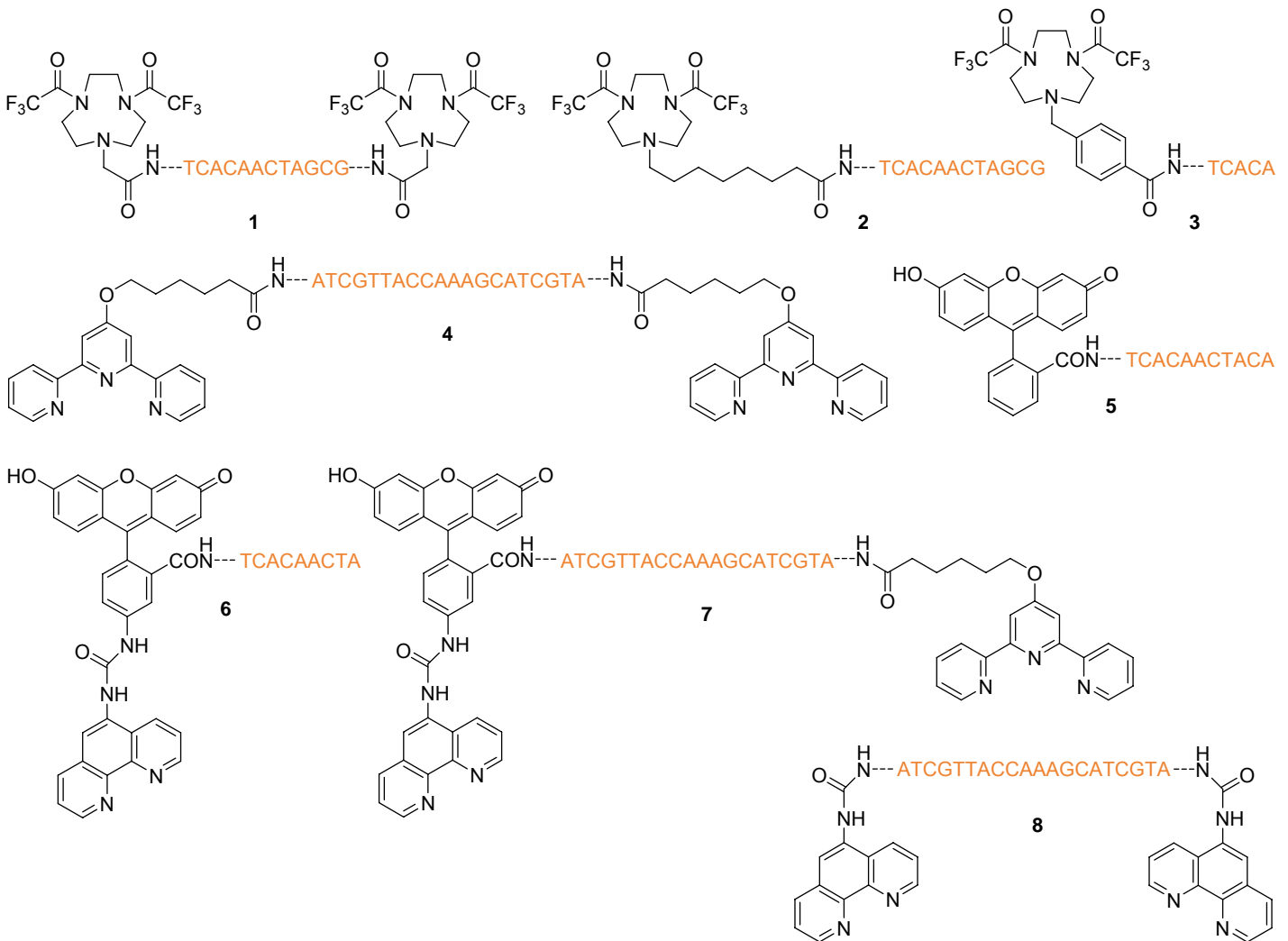
Übersicht zu synthetisierten und verwendeten Verbindungen



PNAs



DNAs



Sonstige eingesetzte DNAs

9 5'-TAG.TTG.TGA.TCC.ATC.C (DNA-Templat)

10 5'-TAC.GAT.GCT.TTG.GTA.ACG.AT (komplementäre DNA)

11 5'-TAC.GAT.GCT.TTG.GTA.AIG.AT (mismatch-DNA)

12 5'-ATC.GTT.ACC.AAA.GCA.TCG.TAtpy (tpyDNA)

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

“Eine Metallionen freisetzende Sonde für den DNA-Nachweis durch katalytische Signalverstärkung”

N. Graf, M. Göritz, R. Krämer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4117-4119.

“Enzymatic amplification in a bioinspired, autonomous signal cascade”

N. Graf, R. Krämer, *Chem. Commun.*, eingereicht.

Posterpräsentationen

„Redoxreaktionen mit Kupferkomplexen an DNA-Templaten“

N. Härdle, R. Krämer

Posterbeitrag am Weihnachtsskolloquium des Graduiertenkollegs 850

16. Dezember 2003 in Heidelberg.

„Nachweis von Nucleinsäuren mittels redoxkatalytischer Signalverstärkung“

N. Graf, M. Göritz, R. Krämer

Posterbeitrag beim Vernetzungstreffen der Graduiertenkollegs 850 und 352

30. November – 2. Dezember 2005 in Berlin.

„A metal-releasing probe for DNA detection by catalytic signal amplification“

N. Graf, R. Krämer

Posterbeitrag bei der Eurobic8 (8th European Biological Chemistry Conference)

2. – 6. Juli 2006 in Aveiro (Portugal).

Dank

Dem gesamten Arbeitskreis Krämer danke ich für das gute Arbeitsklima, besonders erwähnen möchte ich *Iris Boll, Jens Brunner, Gosia Jagoda, Elmar Jentzsch, Radek Kierat, Ann-Kathrin Marguerre* und die neu hinzugekommenen Postdocs *Helga Szelke, Janos Kovacs* und *Sascha Rotaru*.

Ann-Kathrin Marguerre danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Meiner Auszubildenden *Julia Dietze* möchte ich für zwei gemeinsame Jahre im Labor 209 und die oftmals aufwendigen Ligandensynthesen danken.

Meinen Forschungspraktikanten *Daniel Siegberg, Andrea Seehuber, Patricia Wolny, Nathalie Oliván, Daniel Barzan* und *Susanne Kassube* danke ich für die Hilfe bei meiner Arbeit.

Bei *Claudia Dienemann* möchte ich mich für die zahlreichen DNA-Automatensynthesen, bei *Karin Gabel* für die ESI-Messungen, bei *Heike Vongerichten* für die Organisation im Großraumlabor, bei *Volker Seifried* für die Messungen am ESR-Gerät und bei *Beate Termin* für die NMR-Messungen bedanken.

Andriy Mokhir danke ich für das Lösen technischer Probleme an fast allen Geräten des Arbeitskreises und für die Bereitstellung eines Liganden. *Mareike Göritz* danke ich für die bereitgestellte DNA-Sonde.

Frank Möhrlen vom Zoologischen Institut danke ich für ein paar Milligramm Astacin. *Silvia und Stefan Rheinberger* vom Institut für Umweltgeochemie haben dankenswerterweise AAS-Messungen mit meinen Proteinen vorgenommen. Bei *Klemens Wild* und *Bernd Segnitz* möchte ich mich für die Unterstützung bei der Aldolase-Aufreinigung bedanken.

Dem *Graduiertenkolleg 850* danke ich für viele lehrreiche Veranstaltungen und besonders für die unterhaltsamen Auswärtsseminare. Mein Dank soll v. a. *Karin Memminger* gelten - für das gute Teamwork bei der Organisation derselben.

Meinem Mann *Tobias* danke ich für die Hilfe bei Computerproblemen und allerhand anderen technischen Schwierigkeiten, für die Fotos von diversen Küvetten und Eppendorf-Gefäßen, für das Korrekturlesen der Arbeit und zahlreiche gute Ideen.

Noch viel wichtiger als das alles war zudem seine liebevolle Unterstützung.

Erklärungen gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung

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

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

Heidelberg, den 25.08.2006

.....

(Nora Graf)